



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Doctorado en Ciencias Químicas

“Estudio fitoquímico y biológico de *Aristolochia foetida*
Kunth, y análisis del consenso farmacológico de derivados
neolignánicos”

Tesis

Que para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Químicas

Presenta:

M.C.Q.B. Martin Alonso Lerma Herrera

Director:

D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez

Morelia, Michoacán.

Noviembre de 2022

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Medicinal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez, con una beca de inversión en el conocimiento (264405) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Proyecto realizado con el apoyo otorgado por la CIC-UMSNH (6790306) y el CONACYT-Ciencia Básica (A1-S-47352).

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme llegar a culminar esta etapa de mi vida con bien. A mi familia (Elma, Martín y Janet) por estar brindándome la fortaleza y las motivaciones para continuar en momentos difíciles. A mi suegro (Arturo), mi cuñado (Jésus) y su familia por su apoyo en este recorrido. A mi esposa Rosaura por apoyarme en todo momento y ayudarme en que lograra cumplir nuestras metas. A la Dra. Lidia Beiza por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, ayudarme en mi formación, por motivarme, así como incluirme en su laboratorio, además de los consejos que me permitieron alcanzar los objetivos planteados. Agradezco a mi asesor el Dr. Hugo García por apoyarme y darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Por la oportunidad de trabajar y el apoyo brindado en el laboratorio del CMEB con la Dra. Alejandra Ochoa y el Dr. Joel López. Por los consejos y el apoyo brindado durante mi formación de la Dra. Judit Aviña, el Dr. Pedro Navarro y el Dr. Carlos Cerda. Al Dr. Juan Diego Hernández y al Dr. Rafael Herrera por sus consejos y apoyo. A mis compañeros de laboratorio de CU, David, Luisja, Fidel, Perla, Marili, Fran, Güero, Alex, Vero, Heidy, Gregorio, Fernanda, Ale, Victor, Adriana, Karen, Angie, Nereyda, Gaby, Andrea, Cesar, Erick. Así como a mis compañeros del CMEB, Marisol, Andrea, Marco, Pao, Chava, Robert, Paty, Lupita, Gladys, Josh, Araceli, Lupita, Yliana, Diego, Caro, Lalo, Inés y los chicos que me faltó por mencionar. A mi compañera de generación Odessa. Al atlético cascajo. A mis amigos que estuvieron al pendiente principalmente Alejandra y Cobos. A la Dra. Yliana por su compromiso y seguimiento durante el doctorado, a Rocío y el personal administrativo. A Conny, José Manuel y José Luis por su apoyo en los análisis de RMN y cromatografía de gases.

¡¡¡¡¡Gracias a todos!!!!

Parte de este trabajo generó las siguientes publicaciones:

1. **Lerma-Herrera M.A.**, Beiza-Granados L., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E., Hernández-Hernández J.D., Aviña-Verduzco J., García-Gutiérrez H.A. *In vitro* cytotoxic potential of extracts from *Aristolochia foetida* Kunth against MCF-7 and bMECs cell lines. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, 28, 7082–7089. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.08.007.
2. **Lerma-Herrera M.A.**, Beiza-Granados L., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E., Navaro-Santos P., Herrera-Bucio R., Aviña-Verduzco J., García-Gutiérrez H.A. Biological activities of organic extracts of the genus *Aristolochia*: A review from 2005 to 2021. *Molecules* **2022**, 27, 3937. doi: 10.3390/molecules27123937
3. **Lerma-Herrera M.A.**, García-Gutiérrez H.A. COVID-19 (SARS-CoV-2): ¿Existen alternativas naturales para su tratamiento o prevención? *Milenaria, Ciencia y Arte* **2022**, 20, 3-7. ISSN: 2954-4289.

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes eventos académicos:

4. **Lerma-Herrera M.A.**, Beiza-Granados L., Aviña-Verduzco J., Navaro-Santos P., Ochoa-Zarzosa A., García-Gutiérrez H.A. “Estudio fitoquímico de los extractos de mediana polaridad de hojas y tallos de *Aristolochia foetida* Kunth”. Presentado en el III Foro del Posgrado en Ciencias Químicas, celebrado del 1 al 5 de Julio de 2019, Morelia, Michoacán, México.
5. **Lerma-Herrera M.A.**, Guillen-Heredia P., Beiza-Granados L., Aviña-Verduzco J., Hernández-Hernández J.D., García-Gutiérrez H.A. “Esterificación de neolignanos de *Aristolochia glossa* Pfeifer y su caracterización por RMN”. Presentado en la 6ª Reunión de Resonancia Magnética Nuclear Experimental, celebrada en Huajuapán, Oax., el 12 y 13 de noviembre del 2020.
6. **Lerma-Herrera M.A.**, Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E., Hernández-Hernández J.D., Aviña-Verduzco J., García-Gutiérrez H.A. “Evaluación de la citotoxicidad de los extractos de *Aristolochia foetida* Kunth en células de cáncer de mama humano”. Modalidad cartel edición virtual. Presentado en la 16ª Reunión Internacional de

Investigación en Productos Naturales, celebrado del 19 al 21 de mayo de 2021 en Zacatecas, Zac., México.

7. **Lerma-Herrera M.A.**, García-Gutiérrez H.A. Aviña-Verduzco J., Navaro-Santos P., Ochoa-Zarzosa A., Cerda-García Rojas C.M. “Potencial citotóxico *in vitro* de *Aristolochia foetida* Kunth y *Aristolochia glossa* Pfeifer contra las líneas celulares MCF-7 y CEMB”. Presentado en el V Foro del Posgrado en Ciencias Químicas, celebrado del 26 al 30 de julio de 2021, Morelia, Michoacán, México.
8. **Lerma-Herrera M.A.**, Beiza-Granados L., Guzmán-Mejía R., Aviña-Verduzco J., García-Gutiérrez H.A. “Esterificación de neolignanós de *Aristolochia glossa* Pfeifer y su caracterización por RMN”. Modalidad cartel edición virtual. Presentado en el 11^{er} Congreso Internacional de Investigación en el Posgrado, celebrado del 13 al 15 de octubre de 2021 en Aguascalientes, Ags., México.
9. **Lerma-Herrera M.A.**, Beiza-Granados L., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E., Aviña-Verduzco J., García-Gutiérrez H.A. “Potencial citotóxico de *Aristolochia foetida* Kunth contra células de cáncer de mama MCF-7”. Presentado en el 16° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y el 10° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado del 20 al 22 de octubre de 2021 en Morelia, Michoacán.
10. **Lerma-Herrera M.A.**, Beiza-Granados L., Cortés-Muñoz V., Guillen-Heredia P., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J.E., Aviña-Verduzco J., García-Gutiérrez H.A. “Obtención de neolignanós y derivados tipo éster de *Aristolochia glossa* Pfeifer”. Presentado en el 17° Congreso Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación y 11° Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán, celebrado en Morelia, Mich., del 26 al 28 de octubre de 2022.

Índice

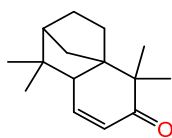
I	Resumen de Estructuras	1
II	Índice de Figuras	4
III	Índice de Tablas	7
IV	Glosario	8
1.	Resumen	11
2.	Abstract	12
3.	Introducción	13
3.1.	Metabolismo en las plantas	14
3.2.	Terpenos	17
3.3.	Alcaloides	19
3.4.	Compuestos fenólicos	20
4.	Antecedentes	21
4.1.	Familia Aristolochiaceae	21
4.2.	Género <i>Aristolochia</i>	22
4.3.	<i>Aristolochia foetida</i> Kunth	23
4.4.	<i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer	25
4.5.	Efectos biológicos de especies del género <i>Aristolochia</i>	25
4.5.1.	Terpenos de especies del género <i>Aristolochia</i>	25
4.5.2.	Alcaloides de especies del género <i>Aristolochia</i>	27
4.5.3.	Compuestos fenólicos de especies del género <i>Aristolochia</i>	28
4.5.4.	Estudios biológicos de extractos crudos de especies del género <i>Aristolochia</i>	30
4.5.5.	Cáncer en el mundo	32
4.5.6.	Líneas celulares	33

5.	Justificación	34
6.	Objetivos	34
6.1.	Objetivo General	34
6.2.	Objetivos Específicos	34
7.	Resultados y discusión	35
7.1.	Análisis de los extractos de tallos y hojas de <i>Aristolochia foetida</i> Kunth	35
7.1.1.	Modificaciones químicas	42
7.1.2.	Estudio biológico de los extractos crudos de <i>Aristolochia foetida</i> Kunth	45
7.2.	Compuestos presentes en extractos orgánicos de <i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer	51
7.2.1.	Análisis de los extractos orgánicos de tallos gruesos	51
7.2.2.	Obtención de compuestos (19-22 y 30-41)	55
7.3.	Derivado de la licarina-A (21)	68
7.3.1.	<i>p</i> -Yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(<i>E</i>)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (30)	68
7.4.	Estudio biológico de neolignanos aislados y sus derivados de <i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer	73
7.4.1.	Análisis <i>in silico</i> de actividad biológica de <i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer	73
7.4.2.	Análisis de consenso farmacológico de compuestos y derivados de <i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer	75
7.5.	Estudio biológico de neolignanos aislados y sus derivados de <i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer	78
8.	Conclusiones	82
9.	Parte experimental	83
9.1.	Procedimientos generales	83
9.2.	Procesamiento de la planta	83

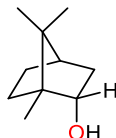
9.3.	Obtención de extractos	83
9.4.	Condiciones cromatográficas	84
9.5.	Identificación de compuestos	84
9.6.	Ensayos de citotoxicidad	84
9.7.	Preparación de medios de cultivo para la línea celular MCF-7, HeLa, A549, K562, MCF-12 y CEMB	85
9.8.	Cultivo celular MCF-7, HeLa, A549, K562 y MCF-12	85
9.9.	Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)	86
9.10.	Ensayo MTT	86
9.11.	Azul de tripano	87
9.12.	Citometría de flujo	87
9.12.1.	Evaluación de células vivas y muertas	87
9.12.2.	Determinación de apoptosis y necrosis	88
9.12.3.	Ensayo de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	88
9.12.4.	Medición del potencial de membrana	88
9.12.5.	Ensayo de hemólisis de eritrocitos humanos	89
9.13.	Análisis de los extractos de tallos gruesos de <i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer	89
9.14.	Preparación de ésteres con el empleo de la DCC	90
9.15.	Análisis <i>in silico</i> de compuestos y derivados acetilados de <i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer	90
9.16.	Análisis estadístico	90
10.	Datos espectroscópicos	91
10.1.	Eupomatenoide-1 (19)	91
10.2.	Eupomatenoide-7 (20)	91
10.3.	Licarina-A (21)	92
10.4.	Licarina-B (22)	92

10.5.	β -Sitosterol (25)	93
10.6.	Estigmasterol (26)	93
10.7.	Feofitina-a (27)	93
10.8.	<i>p</i> -Yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(<i>E</i>)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (30).	94
11.	Referencias	95
12.	Anexos	102

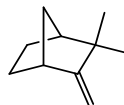
I. Resumen de Estructuras



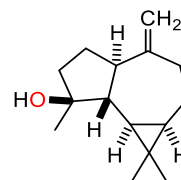
1



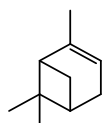
2



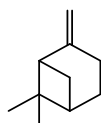
3



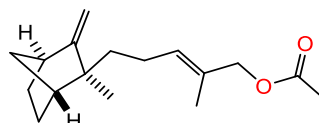
4



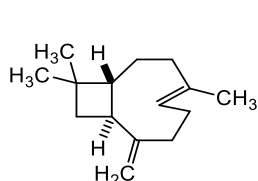
5



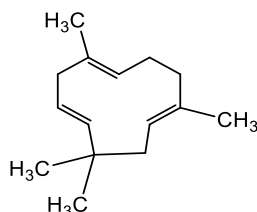
6



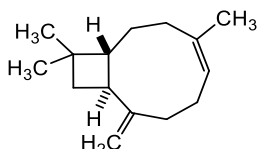
7



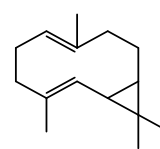
8



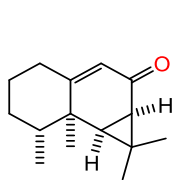
9



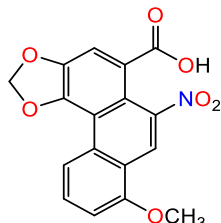
10



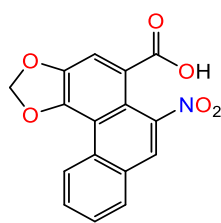
11



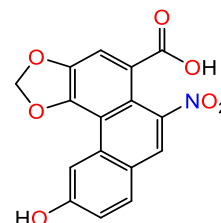
12



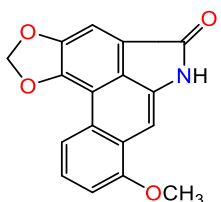
13



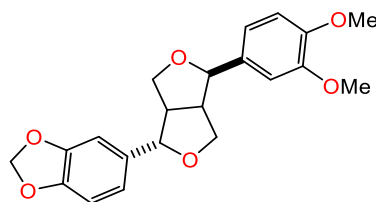
14



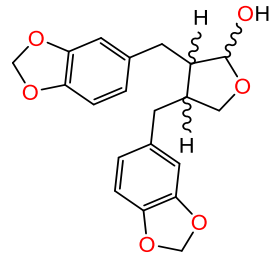
15



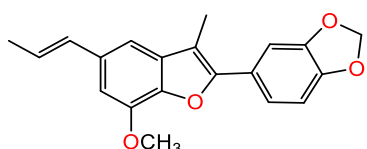
16



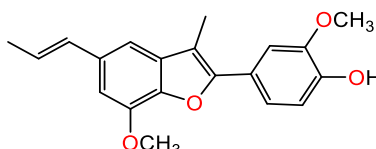
17



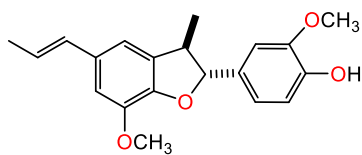
18



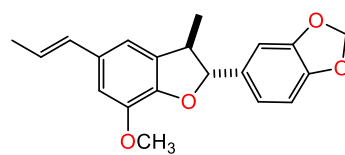
19



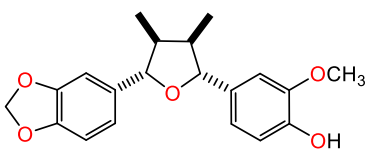
20



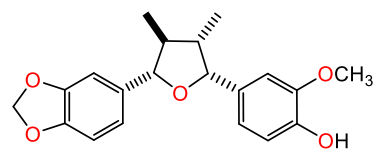
21



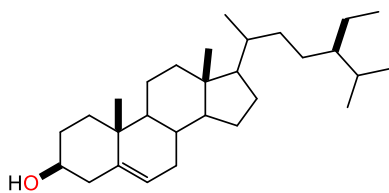
22



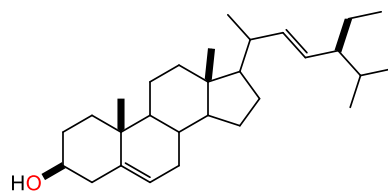
23



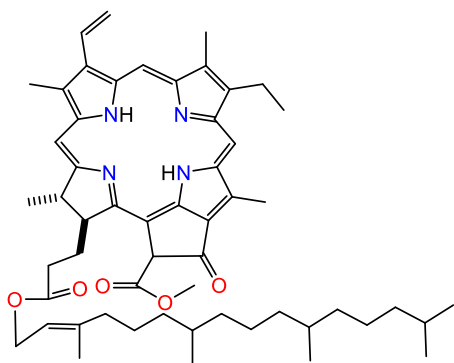
24



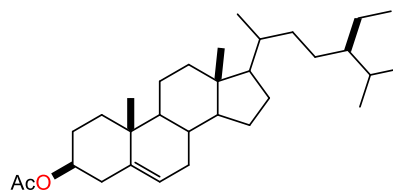
25



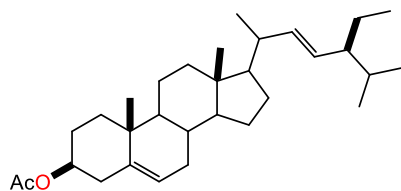
26



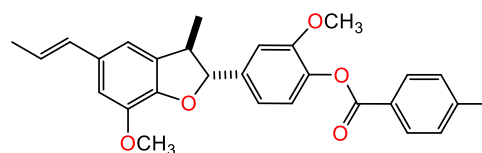
27



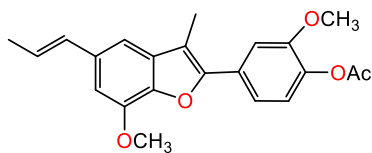
28



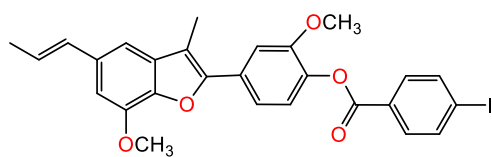
29



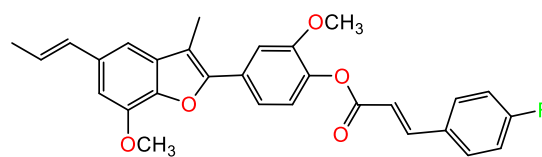
30



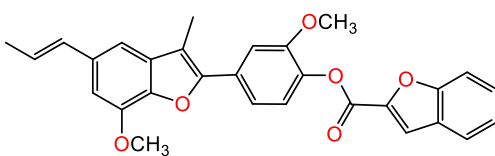
31



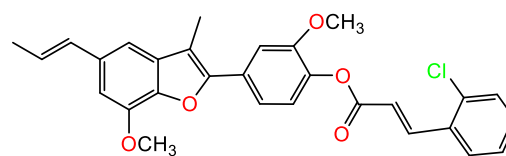
32



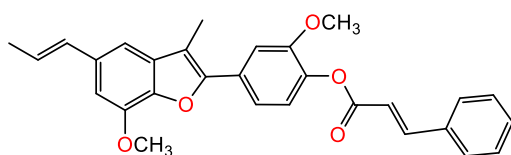
33



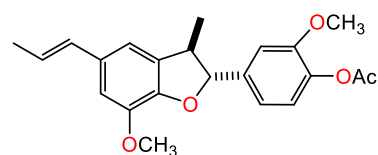
34



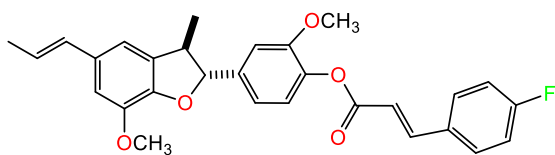
35



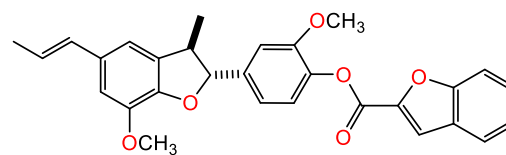
36



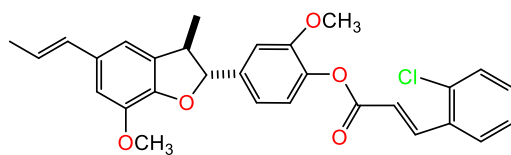
37



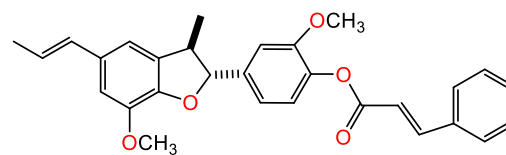
38



39



40



41

II. Índice de Figuras

Figura 1.	Compuestos con actividad anticancerosa obtenidos de fuentes naturales.	14
Figura 2.	Biosíntesis de metabolitos secundarios.	16
Figura 3.	Ejemplos de Terpenos.	18
Figura 4.	Alcaloides de distintas plantas.	19
Figura 5.	Compuestos fenólicos de fuentes vegetales.	20
Figura 6.	Miembros de la familia Aristolochiaceae (A) <i>A. indica</i> . (B) <i>A. elegans</i> . (C) <i>A. baetica</i> . (D) <i>A. maurorum</i> . (E) <i>A. taliscana</i> . (F) <i>A. brevipes</i> . (G) <i>A. mollissima</i> . (H) <i>A. ringens</i> .	21
Figura 7.	Distribución de la familia Aristolochiaceae en el mundo.	22
Figura 8.	<i>Aristolochia foetida</i> Kunth.	23
Figura 9.	Distribución de <i>Aristolochia foetida</i> Kunth en México.	24
Figura 10.	<i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer.	25
Figura 11.	Constituyentes de <i>A. mollissima</i> .	26
Figura 12.	Estructuras de sesquiterpenos obtenidos de <i>A. indica</i> , <i>A. elegans</i> y <i>A. ringens</i> .	27
Figura 13.	Alcaloides de <i>A. maurorum</i> , <i>A. baetica</i> y <i>A. brevipes</i> .	28
Figura 14.	Compuestos fenólicos de <i>A. elegans</i> y <i>A. taliscana</i> .	29
Figura 15.	Distribución de distintos tipos de cáncer en el mundo.	32
Figura 16.	Espectro de RMN de ^1H en DMSO- d_6 a 400 MHz del extracto hexánico de tallos (A) y hojas (B).	35
Figura 17.	Espectro de RMN de ^1H en DMSO- d_6 a 400 MHz del extracto de CH_2Cl_2 de tallos (A) y hojas (B).	36
Figura 18.	Espectro de RMN de ^1H en DMSO- d_6 a 400 MHz del extracto de AcOEt de tallos (A) y hojas (B).	36
Figura 19.	Espectro de RMN de ^1H en DMSO- d_6 a 400 MHz del extracto de MeOH de tallos (A) y hojas (B).	37
Figura 20.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la mezcla de β -sitosterol (25) y estigmasterol (26).	38
Figura 21.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de feofitina-a (27).	39

Figura 22.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la mezcla ésteres (28) y (29).	44
Figura 23.	Citometría de flujo por Syto-9 y yoduro de propidio (IP). (A) Células sin tratamiento. (B) Actinomicina D 10 μM . (C) Vehículo (EtOH). (D) IC_{50} del 45.9 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de CH_2Cl_2 de tallos. (E) IC_{50} del 47.3 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de CH_2Cl_2 de hojas. (F) IC_{50} del 50.3 $\mu\text{g/mL}$ de mezcla de β -sitosterol 25 y estigmasterol 26 a 24 h.	46
Figura 24.	Citometría de flujo de apoptosis y necrosis. (A) Células sin tratamiento. (B) Actinomicina D 10 μM . (C) Vehículo (EtOH). (D) EDTA 250 mM. (E) IC_{50} del 45.9 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de CH_2Cl_2 de tallos. (F) IC_{50} del 47.3 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de CH_2Cl_2 de hojas. (G) IC_{50} del 50.3 $\mu\text{g/mL}$ de mezcla de β -sitosterol 25 y estigmasterol 26 (Cmp) intensidad de fluorescencia relativa de los tratamientos a 24 h. ANOVA, Tukey $p < 0.05$.	48
Figura 25.	Citometría de flujo de potencial de membrana mitocondrial (JC-1). (A) Vehículo (EtOH). (B) Actinomicina D 10 μM . (C) IC_{50} del 45.9 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de CH_2Cl_2 de tallos. (D) IC_{50} del 47.3 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de CH_2Cl_2 de hojas. (E) IC_{50} del 50.3 $\mu\text{g/mL}$ de mezcla de β -sitosterol 25 y estigmasterol 26 a 24 h.	49
Figura 26.	Ensayo de potencial de membrana DISC ₃ (5). Valinomicina, Vehículo (EtOH), IC_{50} del 45.9 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de CH_2Cl_2 de tallos, IC_{50} del 47.3 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de CH_2Cl_2 de hojas, IC_{50} del 50.3 $\mu\text{g/mL}$ de mezcla de β -sitosterol 25 y estigmasterol 26 (Cmp).	50
Figura 27.	Ensayo de hemólisis de eritrocitos. ANOVA, Tukey $p < 0.05$. * Muestra diferencias significativas respecto al control.	50
Figura 28.	Espectro de RMN de ^1H en DMSO-d_6 a 400 MHz de (A) tallos gruesos del extracto hexánico y (B) de diclorometano.	52
Figura 29.	Espectro de RMN de ^1H en DMSO-d_6 a 400 MHz de tallos gruesos del extracto (A) de AcOEt y (B) de MeOH.	52
Figura 30.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz del eupomatenoide-1 (19).	57
Figura 31.	Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz del eupomatenoide-1 (19).	58
Figura 32.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 100 MHz del eupomatenoide-7 (20).	60
Figura 33.	Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz del eupomatenoide-7 (20).	61
Figura 34.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la licarina-A (21).	63
Figura 35.	Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de la licarina-A (21).	64
Figura 36.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la licarina-B (22).	66

Figura 37.	Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de la licarina-B (22).	67
Figura 38.	Reactivos y condiciones para 30 . (a) Ácido <i>p</i> -yodobenzoico, HOBt, DCC, baño de hielo 1 h. (b) Metabolito 21 , DIPEA, 4 h en agitación, t.a, hxn 1 h, 12 h, 2°C.	68
Figura 39.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 100 MHz de <i>p</i> -yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(<i>E</i>)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (30).	69
Figura 40.	Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de <i>p</i> -yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(<i>E</i>)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (30).	70
Figura 41.	Mecanismo de reacción propuesto para 32 con CDI.	72
Figura 42.	Mecanismo de reacción propuesto para 30 con DCC.	72
Figura 43.	Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz con BINOL de 21 de <i>A. glossa</i> Pfeifer (—) y 21 de <i>A. mycteria</i> Pfeifer (—).	73
Figura 44.	Citometría de flujo de apoptosis y necrosis en K562. (A) Actinomicina D (10 μM). (B) EDTA (250 mM). (C) Vehículo (EtOH). (D) IC_{50} del 25.0 μM de 21 . (E) IC_{50} del 22.3 μM de 31 . (F) IC_{50} del 21.5 μM de 35 . (G) IC_{50} del 22.3 μM de 37 . (H) IC_{50} del 24.3 μM de 41 . Ensayo a 24 h.	80
Figura 45.	Citometría de flujo de apoptosis y necrosis en MCF-7. (A) Actinomicina D (10 μM). (B) EDTA (250 mM). (C) Vehículo (EtOH). (D) IC_{50} del 23.0 μM de 21 . (E) IC_{50} del 40.31 μM de 31 . (F) IC_{50} del 89.6 μM de 35 . (G) IC_{50} del 40.3 μM de 37 . (H) IC_{50} del 73.2 μM de 41 . Ensayo a 24 h.	81
Figura 46.	Ensayo de citotoxicidad MTT.	86
Figura 47.	Estructura del azul de tripano.	87

III. Índice de Tablas

Tabla 1.	Clasificación y ejemplos de terpenos.	18
Tabla 2.	Ejemplos de alcaloides y actividad farmacológica.	19
Tabla 3.	Clasificación Sistema APG III (2009).	24
Tabla 4.	Valores de IC ₅₀ de extractos crudos.	31
Tabla 5.	Extractos crudos de <i>A. foetida</i> Kunth.	35
Tabla 6.	Compuestos identificados en <i>A. foetida</i> Kunth.	40
Tabla 7.	IC ₅₀ a 24 h en MCF-7 y CEMB.	45
Tabla 8.	IC ₅₀ a 24 h de los compuestos 25-29 en MCF-7, MCF-12 y CEMB.	47
Tabla 9.	Extractos crudos de <i>A. glossa</i> Pfeifer.	51
Tabla 10.	Compuestos identificados en <i>A. glossa</i> Pfeifer para extractos de hexano y diclorometano respectivamente.	53
Tabla 11.	Rendimientos de los derivados esterificados de 20 y 21 .	71
Tabla 12.	Estimación del efecto agonista de apoptosis.	73
Tabla 13.	Predicción de citotoxicidad en el tumor.	74
Tabla 14.	Predicción de sitios diana.	75
Tabla 15.	Análisis de consenso farmacológico de compuestos y derivados de <i>Aristolochia glossa</i> Pfeifer.	77
Tabla 16.	Valores de IC ₅₀ de neolignanós y sus derivados.	78

IV. Glosario

7AAD	7-Aminoactinomicina D
ANOVA	Análisis de varianza
A549	Células de carcinoma de pulmón humano
AcOEt	Acetato de etilo
BGC-823	Células de carcinoma gástrico
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CDI	1,1'-Carbonildiimidazol
CEMB	Células de epitelio mamario bovino
CH₂Cl₂	Cloruro de metileno
CHCl₃	Cloroformo
CO₂	Dióxido de carbono
COSY	Espectroscopia de correlación homonuclear
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Cmp	Mezcla de β -sitosterol y estigmasterol
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DISC₃ (5)	Yoduro de 3,3'-dipropiltiadicarbocianina
DIPEA	<i>N,N'</i> -Diisopropiletilamina
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium/nutrient F-12 Ham
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
E	Entgegen
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDT	Extracto de diclorometano de tallos
EDH	Extracto de diclorometano de hojas
EHH	Extracto de hexano de hojas
EHT	Extracto de hexano de tallos
EHTG	Extractos de hexano de tallos gruesos
EDTG	Extractos de diclorometano de tallos gruesos
EIMS	Espectrometría de masas por impacto electrónico
ent	Enantiómero
FDA	Administración de medicamentos y alimentos de EUA

FPP	Pirofosfato de farnesilo
GPP	Pirofosfato de geranilo
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranilo
H₂	Hidrógeno
HBL-100	Células derivadas de epitelio mamario normal
HeLa	Adenocarcinoma cervical humano
HETCOR	Resonancia magnética nuclear de correlación heteronuclear
Hex	Hexano
HMBC	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de coherencia heteronuclear a múltiples enlaces
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HSQC	Espectroscopia de coherencia cuántica única heteronuclear
HCT-116	Carcinoma de colon humano
Hep G-2	Cáncer hepático
HT-29	Adenocarcinoma de colon
IC₅₀	Concentración inhibidora media máxima
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IP	Yoduro de propidio
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
J	Constante de acoplamiento
JC-1	Yoduro de 5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
K562	Leucemia mieloide crónica
M	Molaridad
MeOH	Metanol
μL	Microlitro
μM	Micromolar
MCF-7	Células de cáncer de mama
MCF-12	Células epiteliales de mama no tumorales
MDA-MB-231	Células de cáncer de mama triple negativo
MEP	Metileritritol fosfato

Mesh	Malla
MHz	Megahertz
MM	Milimolar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
N	Normalidad
N₂	Nitrógeno
NCI-H1650	Carcinoma de pulmón
NOESY	Espectroscopia de efecto nuclear Overhauser
OMS	Organización mundial de la salud
PAC-1	Células de denocarcinoma pancreático
PBS	Solución de buffer de fosfatos
PC3	Células de cáncer de próstata
p. f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
R	Rectus
Re	Rectus
RMN	Resonancia magnética nuclear
t.a.	Temperatura ambiente
S	Sinister
THF	Tetrahidrofurano
THP-1	Células de leucemia monocítica aguda
TLC	Cromatografía en capa fina
TMS	Tetrametilsilano
T-24	Carcinoma de vejiga humano
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
Z	Zusammen
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
δ	Desplazamiento químico
®	Marca registrada

1. Resumen

Los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol de la especie *A. foetida* Kunth se analizaron mediante RMN de ^1H y CG-MS para elucidar los metabolitos en cada extracto. En el análisis CG-MS, los principales compuestos fueron hexadecanoato de metilo, ácido hexadecanoico, dodecanoato de 2-butoxietilo, hexadecanoato de etilo, octadeca-9,12,15-trienoato de metilo y el ácido (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoico. Los resultados mostraron una reducción significativa en la viabilidad celular de la línea celular MCF-7 (cáncer de mama) causada por extractos orgánicos de manera dependiente de la concentración. La actividad citotóxica del extracto de diclorometano de los tallos (EDT) mostró valores de IC_{50} de 45.9 $\mu\text{g/mL}$ y el extracto de diclorometano de las hojas (EDH) mostró valores de IC_{50} de 47.3 $\mu\text{g/mL}$. EDT y EDH indujeron una pérdida en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y puede causar muerte celular por apoptosis a través de la vía intrínseca en la línea celular MCF-7. EDT y EDH son citotóxicos en las células cancerosas y causan apoptosis tardía. Se requieren concentraciones más altas de EDT y EDH para inducir un efecto citotóxico en células epiteliales mamarias sanas (CEMB). Por otro lado, en los tallos gruesos de los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo de la especie *A. glossa* Pfeifer se identificaron los compuestos β -sitosterol, estigmasterol y los neolignanos eupomatenoide-1, eupomatenoide-7, licarina-A y licarina-B. En los ensayos de citotoxicidad se obtuvieron valores de IC_{50} menores a 50 μM de los compuestos **19-22**, **31** y **37** en las líneas celulares MCF-7, A549 (cáncer de pulmón) K562 (leucemia mieloide crónica), así como en HeLa (cáncer cervicouterino) para **21** y fueron necesarias concentraciones elevadas para causar un daño en CEMB. Los compuestos **20-21**, **31** y **37** presentaron una correlación positiva con la predicción realizada mediante el análisis de consenso farmacológico.

Palabras clave: *A. foetida* Kunth, *A. glossa* Pfeifer, citotoxicidad, cáncer, neolignanos.

2. Abstract

The hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol extracts of *A. foetida* Kunth were analyzed by ^1H NMR and GC-MS to elucidate the metabolites in each extract. In the GC-MS analysis, the main compounds were methyl hexadecanoate, hexadecanoic acid, 2-butoxyethyl dodecanoate, ethyl hexadecanoate, methyl octadeca-9,12,15-trienoate, and (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoic acid. The results showed a significant reduction in cell viability of the MCF-7 (breast cancer) cell line caused by organic extracts in a concentration-dependent manner. The cytotoxic activity of the dichloromethane extract from the stems (EDT) showed IC_{50} values of 45.9 $\mu\text{g/mL}$ and the dichloromethane extract of the leaves (EDH) showed IC_{50} values of 47.3 $\mu\text{g/mL}$. Higher concentrations of EDT and EDH are required to induce a cytotoxic effect on healthy mammary epithelial cells (CEMB). EDT and EDH induced a loss in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and can cause cell death by apoptosis through the intrinsic pathway in the MCF-7 cell line. On the other hand, in the thick stems of the hexane, dichloromethane and ethyl acetate extracts of the species *A. glossa* Pfeifer, the compounds β -sitosterol, stigmasterol and the neolignans eupomatenoid-1, eupomatenoid-7, licarin-A, and licarin-B were identified. In the cytotoxicity assays, IC_{50} values lower than 50 μM of compounds **19-22**, **31** and **37** were obtained in the cell lines MCF-7, A549 (lung cancer) and K562 (chronic myeloid leukemia), as well as in HeLa (cervical cancer) for **21** and high concentrations were necessary to cause damage in CEMB. Compounds **20-21**, **31** and **37** showed a positive correlation with the prediction made by pharmacological consensus analysis.

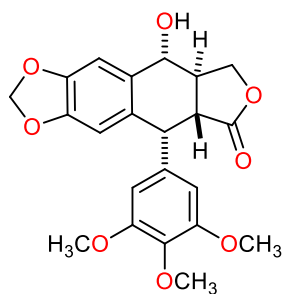
Keywords: *A. foetida* Kunth, *A. glossa* Pfeifer, cytotoxicity, cancer, neolignans.

3. Introducción

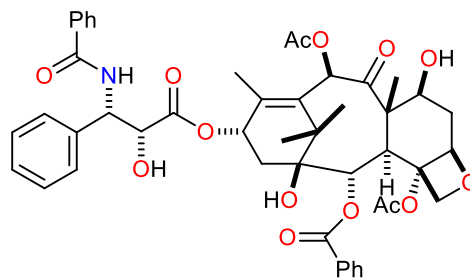
Los productos naturales están constituidos por una gran diversidad de moléculas con diferentes actividades biológicas. Estas moléculas se suelen sintetizar en bacterias, hongos, plantas así como en algas, esponjas u otros tipos de especies marinas, en los últimos 75 años se han caracterizado más de 23 000 moléculas distintas.¹

Las plantas son una fuente importante de moléculas anticancerosas lo que resulta importante es que, de los 141 medicamentos contra el cáncer existentes en el mercado americano, alrededor del 67% tienen su origen y diseño a partir de un producto natural. Estos fármacos se clasifican en: productos de origen natural, productos semisintéticos derivados de un producto natural o productos sintéticos que han utilizado para su realización un producto natural.²

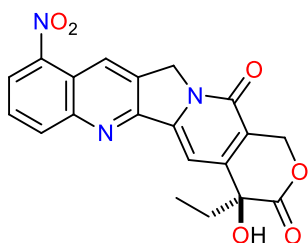
Distintos compuestos obtenidos de fuentes vegetales han mostrado actividad antitumoral, como los alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina) aislados de la especie *Catharanthus roseus* utilizados para el tratamiento de diferentes tipos de leucemia. La podofilotoxina y sus derivados obtenidos de especies de la familia Podophyllaceae tienen su uso en el tratamiento de cáncer de piel y verrugas genitales. Los taxanos aislados de varias especies del género *Taxus* en donde destaca el paclitaxel (Taxol®) un diterpeno obtenido de la corteza de *Taxus brevifolia* el cual es utilizado para el tratamiento de cáncer de mama, ovario y pulmón. Otros alcaloides análogos de la camptotecina obtenidos de *Camptotheca acuminata* se han empleado para el tratamiento de cáncer ovario y colon. La homoharringtonina es un compuesto aislado del árbol *Cephalotaxus harringtonia* tiene su efecto contra padecimientos como la leucemia.^{3,4} En la Figura 1 se muestran las estructuras representativas de los compuestos anteriormente descritos.



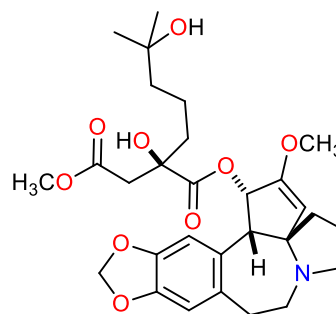
Podofilotoxina



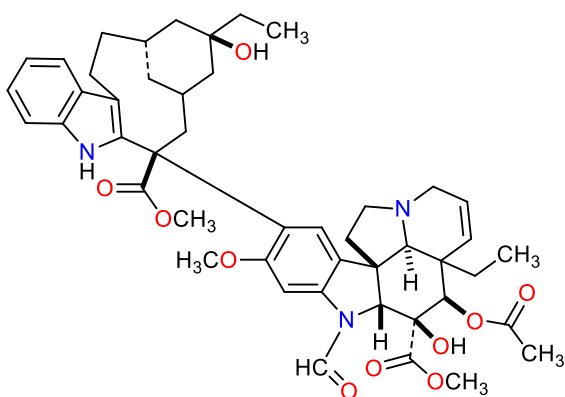
Paclitaxel



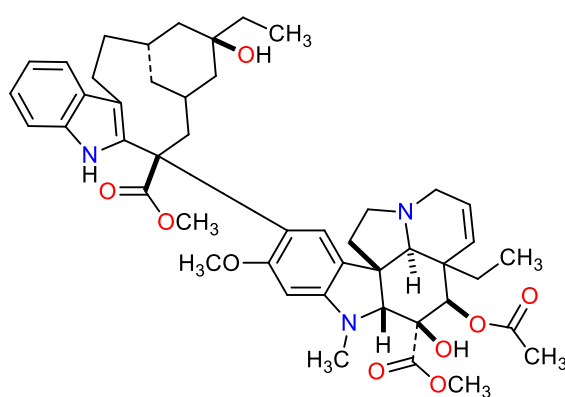
Campotecina



Homoharringtonina



Vincristina



Vinblastina

Figura 1. Compuestos con actividad anticancerosa obtenidos de fuentes naturales.

3.1. Metabolismo en las plantas

Los compuestos bioactivos en las plantas son productos formados a partir de una serie de reacciones y mecanismos en las células vegetales los cuales no suelen ser esenciales para la supervivencia de las plantas como lo son, los productos del metabolismo primario (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos).

Las plantas están sometidas a condiciones de estrés biótico y abiótico en el medio ambiente es por ello que los metabolitos secundarios están implicados en la protección contra herbívoros, bacterias, hongos, virus, así como de otras especies invasoras. Además, se han empleado estos compuestos para la comunicación simbiótica con otros organismos y en la atracción de polinizadores y dispersores de semillas.⁵

De acuerdo con distintos autores, los compuestos bioactivos se suelen clasificar en tres tipos por su abundancia en la naturaleza: terpenos (55%), alcaloides (27%) y compuestos fenólicos (18%).⁶ Los compuestos anteriormente mencionados tienen características estructurales particulares ya que dependen de las distintas vías de síntesis en la naturaleza.

Los terpenos se sintetizan a partir de la ruta del ácido mevalónico y del metileritritol fosfato (MEP), los alcaloides a partir de aminoácidos aromáticos y los compuestos fenólicos por la vía del ácido shikímico y del ácido malónico.^{7,8} La Figura 2 resume la biosíntesis de metabolitos secundarios.

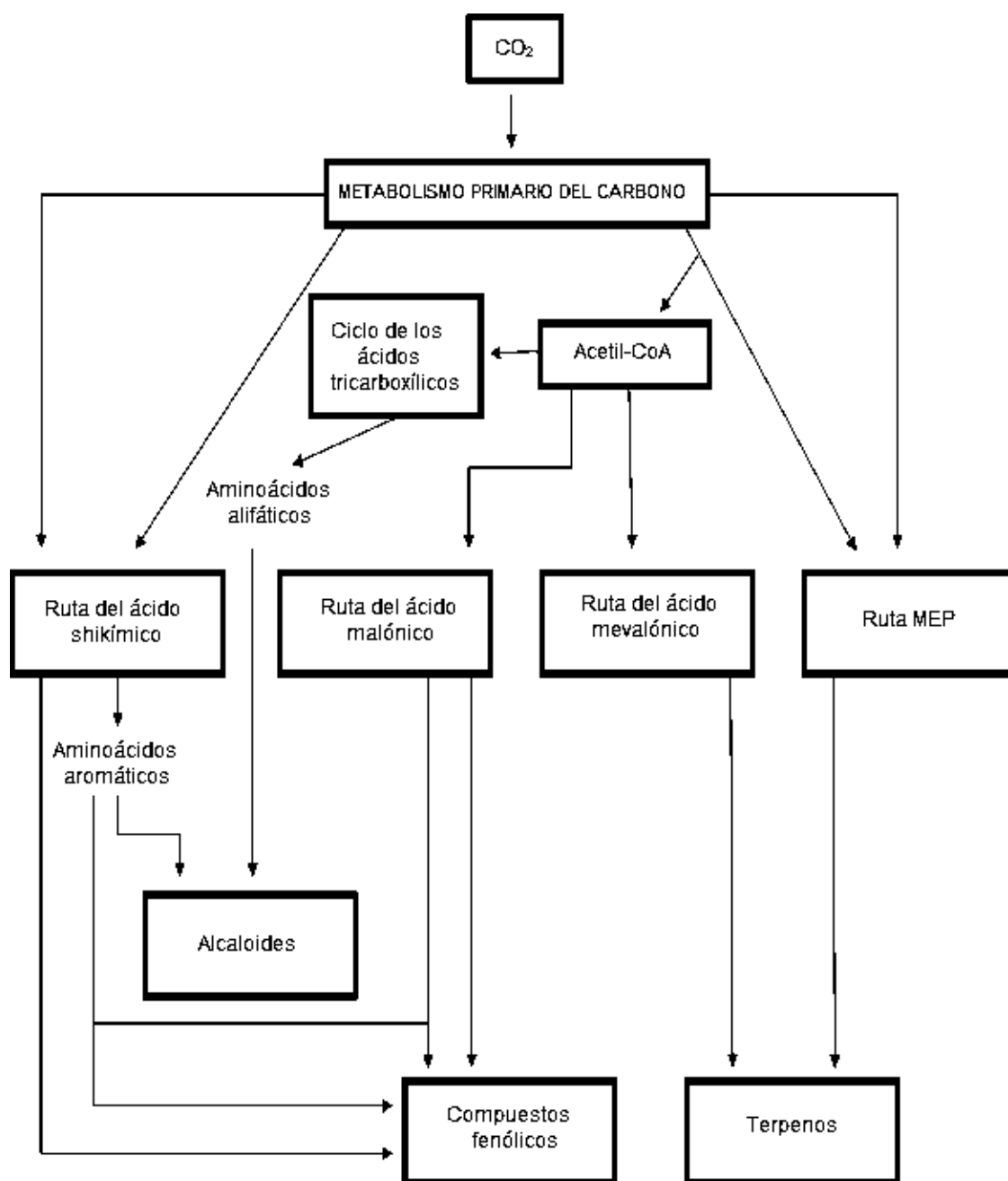


Figura 2. Biosíntesis de metabolitos secundarios.

3.2. Terpenos

Los terpenos son el grupo más abundante y diverso de metabolitos secundarios en las plantas. El término *terpeno* se otorgó los compuestos aislados de *trementina* (palabra del latín *balsamum terebinthinae*). En la actualidad se conocen alrededor de 55 000 estructuras diferentes en la naturaleza.⁹ Estos metabolitos secundarios tienen funciones importantes en las plantas como la defensa contra herbívoros, insectos y patógenos, así como la atracción de polinizadores, en la formación de membranas celulares, síntesis de hormonas, en participar en la elaboración de pigmentos y como agentes antioxidantes.⁷

Los terpenos suelen estar constituidos por unidades de isopreno de cinco carbonos. Su síntesis inicia a partir de la condensación del pirofosfato de isopentenilo (IPP) constituido por cinco unidades de carbono y por su isómero el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), los cuales dan origen al pirofosfato de geranilo (GPP) precursor de los monoterpenos. La unión del IPP y GPP permite la formación del pirofosfato de farnesilo (FPP) precursor de sesquiterpenos. Posteriormente, la condensación del IPP y el FPP forma al pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) y este a su vez a los diterpenos. El GGPP y el IPP permiten la formación del escueleno que participa en la síntesis de triterpenos, lípidos y esteroides. Los tetra y politerpenos se sintetizan generalmente por unidades de IPP.¹⁰

Estos metabolitos secundarios tienen una gran variedad de aplicaciones como la actividad analgésica del α -pineno, monoterpeno encontrado en aceites esenciales y del parthenolido, un sesquiterpeno aislado de la especie *Tanacetum parthenium*. En especies del género *Barringtonia* se ha identificado el triterpeno barringtogenol C al que se le atribuye un efecto analgésico importante.¹¹ El licopeno es un tetraterpeno importante con actividad antioxidante que puede reducir el riesgo de enfermedades coronarias.¹² En la Figura 3 y en la Tabla 1 se muestran las clasificaciones y algunos ejemplos de terpenos.¹³

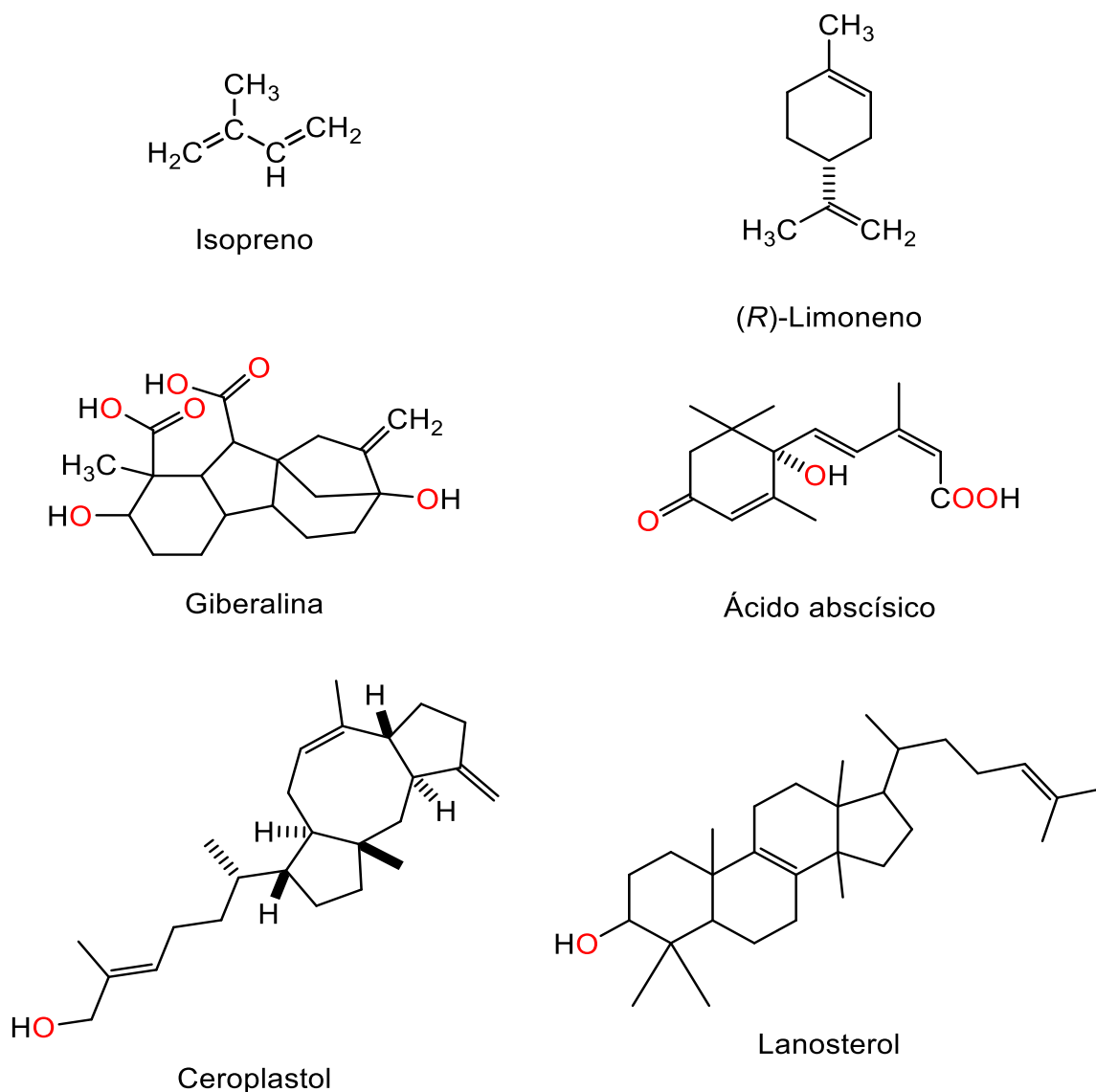


Figura 3. Ejemplos de Terpenos.

Tabla 1. Clasificación y ejemplos de terpenos.

Número de carbonos	Clasificación	Ejemplos
C ₅	Hemiterpeno	Isopreno, prenol
C ₁₀	Monoterpeno	Limoneno, eucaliptol
C ₁₅	Sesquiterpeno	Ácido abscísico
C ₂₀	Diterpeno	Gibberalina
C ₂₅	Sesterterpeno	Ceroplastol
C ₃₀	Triterpeno	Escualeno, lanosterol
C ₄₀	Tetraterpeno	Carotenoides, licopeno
C _{>40}	Politerpeno	Ubiquinonas, citocinas

3.3. Alcaloides

Los alcaloides son el segundo grupo de metabolitos secundarios más abundante en la naturaleza constituidos por alrededor de 20 000 moléculas distintas.¹⁴ Estos compuestos se caracterizan por contener átomos de nitrógeno en sus estructuras y se clasifican en función a los anillos presentes en la molécula agrupándose en familias como la quinolina, isoquinolina, indol, tropano, quinolizidina, piperidina, purina y pirrolizideno. Los alcaloides tienen efectos terapéuticos como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos y analgésicos.^{15,16} Como se muestran en la Figura 4 y en la Tabla 2.

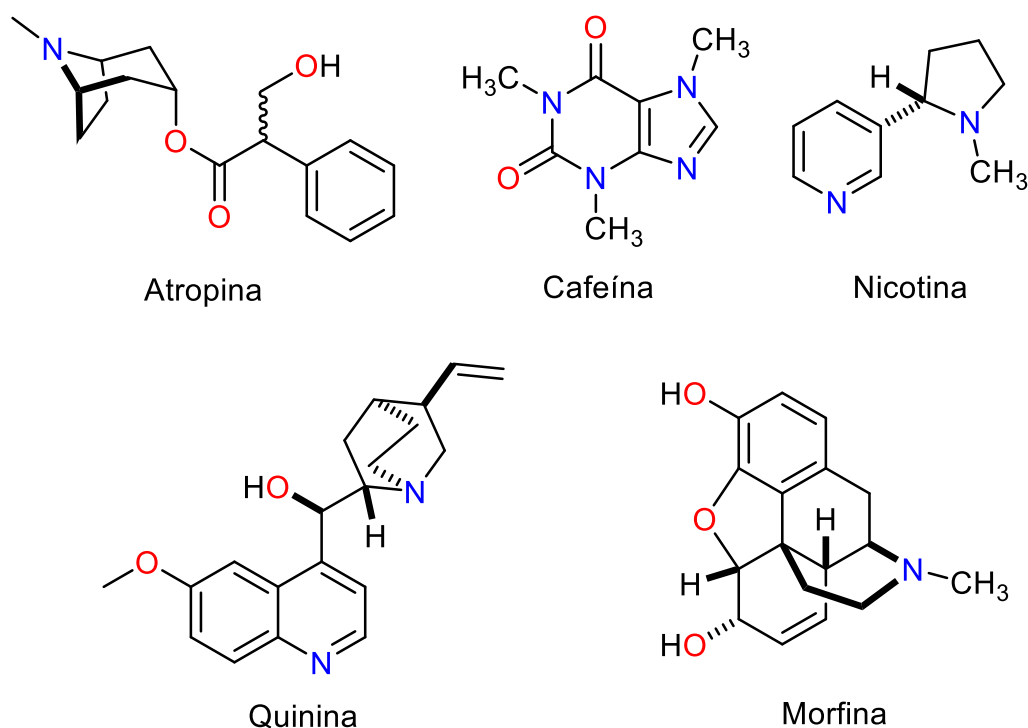


Figura 4. Alcaloides de distintas plantas.

Tabla 2. Ejemplos de alcaloides y actividad farmacológica.

Clasificación	Alcaloide	Fuente	Actividad farmacológica
Tropano	Atropina	<i>Atropa belladonna</i>	Antimiopía
Purina	Cafeína	<i>Coffea arabica</i>	Estimulante del sistema nervioso central
Piperidina	Nicotina	Familia Solanaceae	Insecticida, antiinflamatoria
Quinolina	Quinina	<i>Cinchona succirubra</i>	Antimalárico, antipirético, analgésico
Fenantreno	Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico, narcótico

3.4. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios caracterizados por poseer anillos aromáticos hidroxilados y en la naturaleza se han encontrado alrededor de 8000 compuestos diferentes. En las plantas este tipo de moléculas tienen su participación como atractores de polinizadores, antioxidante, protección contra luz ultravioleta, otorgar pigmentación, así como la protección contra patógenos y depredadores. Estos compuestos se agrupan principalmente en flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, estilbenos y lignanos. Este grupo de metabolitos tiene aplicaciones en la preservación de alimentos, en la protección contra aterosclerosis, disfunciones cerebrales y como agentes anticancerosos.^{17,18} En la Figura 5 se observan ejemplos de compuestos fenólicos.

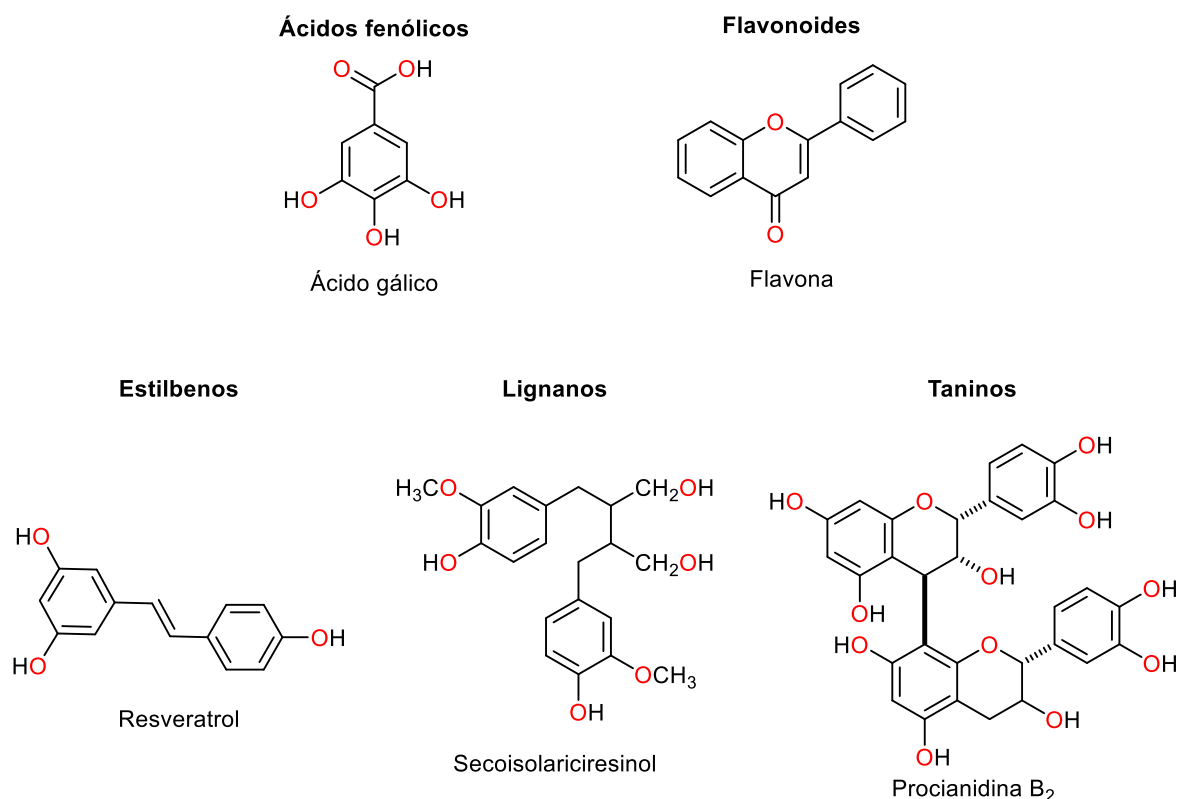


Figura 5. Compuestos fenólicos de fuentes vegetales.

4. Antecedentes

4.1. Familia Aristolochiaceae

La familia Aristolochiaceae fue clasificada recientemente en el orden de los piperales, comprende alrededor de 600 especies que se encuentran agrupadas en siete géneros *Aristolochia* (el más abundante con alrededor de 350 especies), *Asarum*, *Saruma*, *Lactoris*, *Hydnora*, *Prosopanche* y *Thottea*. Las especies de esta familia se caracterizan por tener flores muy atractivas, son herbáceas, postradas y trepadoras (Figura 6).



Figura 6. Miembros de la familia Aristolochiaceae (A) *A. indica*. (B) *A. elegans*. (C) *A. baetica*. (D) *A. maurorum*. (E) *A. taliscana*. (F) *A. brevipes*. (G) *A. mollissima*. (H) *A. ringens*.

Estas plantas se ubican en regiones tropicales y templadas con una mayor prevalencia en el continente americano, seguido de África, Europa, Asia y parte de Australia.^{19,20} En la Figura 7 se muestra la distribución de la familia Aristolochiaceae en el mundo.



Figura 7. Distribución de la familia Aristolochiaceae en el mundo.

4.2. Género *Aristolochia*

Aristolochia es el género más abundante de la familia Aristolochiaceae. Las especies de este género se utilizan de manera ornamental y en la medicina tradicional como abortivos, emenagogos, sedantes, analgésicos, anticancerosos, antiinflamatorios, relajantes musculares, antihistamínicos, antiparasitarios, para tratar el cólera, dolores abdominales, reumatismo, antimalárico, problemas dérmicos y diferentes tipos de picaduras y mordeduras de animales e insectos.²¹

Los metabolitos secundarios responsables de los efectos biológicos que presentan las especies de este género son los ácidos aristolóquicos y sus derivados, así como monoterpenos como el tujano, canfano y carano, diterpenos tipo kaurano, triterpenos como el lupeol entre otros. Así mismo metabolitos de alcaloides derivados de aristolactamas y compuestos fenólicos del tipo lignano están involucrados en esas funciones.^{22,23}

4.3. *Aristolochia foetida* Kunth

La especie es conocida como *cigarrillo* es una planta trepadora perene se localiza en lugares con bosque de encino la cual posee hojas de color verde oscuro o pálido de tamaño aproximado de 4 a 15 cm de largo son del tipo acorazonadas y rugosas. Su florecimiento se lleva a cabo entre los meses de marzo a noviembre sus flores se distribuyen de manera individual, son de color púrpura en la parte externa y al centro tonos amarillos con ligeras líneas blancas y su estructura tiene un alargamiento peculiar en forma de embudo. Los frutos son pequeños en forma de canastillas de tamaños de 2.5 a 3.5 cm de largo aproximadamente y estos suelen aparecer en los meses de julio a octubre.²⁴ En la Figura 8 se observan las características morfológicas de esta especie.



Figura 8. *Aristolochia foetida* Kunth.

Esta planta se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de resfriado, fiebre, asma, dolor de cabeza y en la mordedura de serpientes entre otros.^{25,26}

La especie *Aristolochia foetida* Kunth es una de las 70 especies de *Aristolochias* de México ubicada principalmente en la región sureste de la tierra caliente del estado de Michoacán, así como en los estados de Colima, Jalisco y Guerrero.²⁴ Como se puede apreciar en la Figura 9.



Figura 9. Distribución de *Aristolochia foetida* Kunth en México.

El orden de *Aristolochia foetida* Kunth fue reclasificado en 2009 en el orden de los piperales gracias a estudios moleculares ya que anteriormente estaba ubicado en el Aristolochiales por Cronquist (1981) y Takhtajan (1997).^{19,24} En la Tabla 3 se aprecia su clasificación botánica.

Tabla 3. Clasificación Sistema APG III (2009).

Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Orden: Piperales
Familia: Aristolochiaceae
Género: <i>Aristolochia</i>
Especie: <i>Aristolochia foetida</i> Kunth

4.4. *Aristolochia glossa* Pfeifer

La especie *Aristolochia glossa* Pfeifer presenta flores vistosas en forma de pipa, así como tallos leñosos gruesos y delgados, es nativa del estado de Michoacán y de la cual existen muy pocos estudios fitoquímicos.²⁷ En la Figura 10 se observan las características morfológicas de esta especie.



Figura 10. *Aristolochia glossa* Pfeifer.

Otras especies como *A. buntingii* Pfeifer, *A. cardiantha* Pfeifer, *A. flexuosa* Duch, *A. malacophylla* Standl, *A. mutabilis* Pfeifer, *A. mycteria* Pfeifer y *A. tentaculata* O. C. Schmidt, también han sido identificadas en el estado de Michoacán en localidades aledañas a la zona del Bajío.^{24,27,28}

4.5. Efectos biológicos de especies del género *Aristolochia*

4.5.1. Terpenos de especies del género *Aristolochia*

En aceites esenciales de raíces y partes aéreas de *A. mollissima* distribuida en China se ha identificado en mayor cantidad el sesquiterpeno 2,2,7,7-tetrametiltriciclo[6.2.1.0^{1,6}]undec-4-en-3-ona (1), (Figura 11). En esta misma especie se encontraron otros constituyentes como el borneol (2), canfeno (3), espatulenol (4), α - y β -pineno (5 y 6) y acetato de (*E*)- β -santalol (7). A los monoterpenos borneol, α - y β -pineno se les atribuye actividad antibacteriana (zona de inhibición 10-20 mm) y citotóxica (IC₅₀ = 20.6-50.6 μ g/ml) al sesquiterpeno mayoritario.²⁹

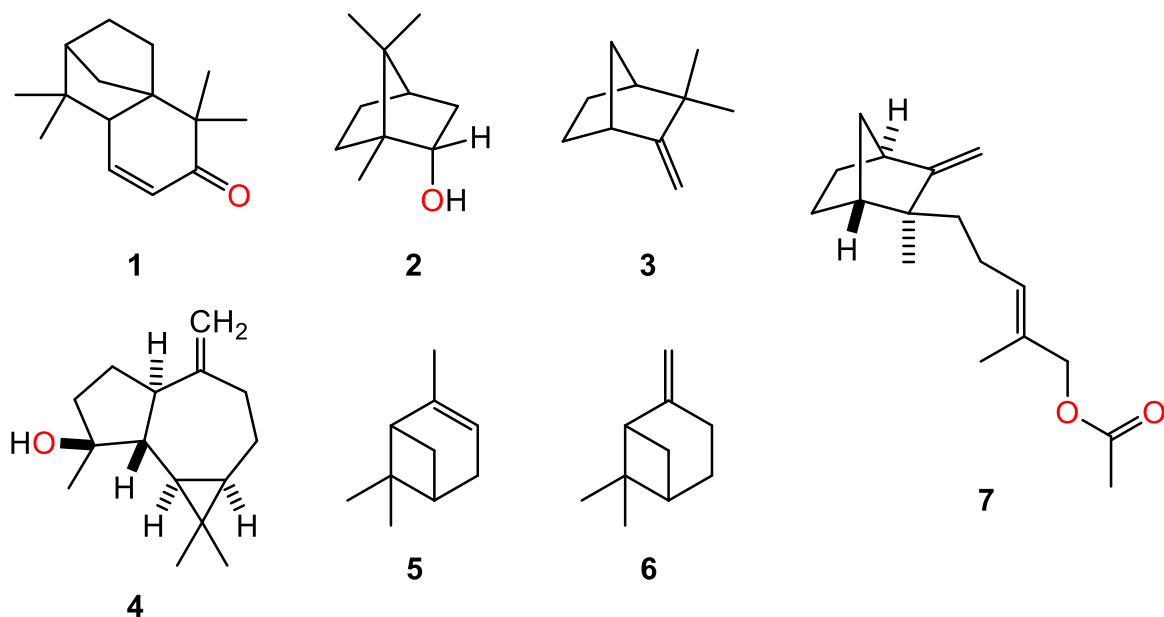


Figura 11. Constituyentes de *A. mollissima*.

En la especie *A. indica* se han encontrado los sesquiterpenos β -cariofileno (**8**) y α -humuleno (**9**) en aceites esenciales de partes aéreas a los que se le atribuye actividad antibacteriana (7-10 mm) contra especies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus sphaericus* y *B. subtilis*.^{30,31} (Figura 12).

Mohanraj y colaboradores, aislaron de extractos de acetato de etilo de las raíces y hojas de *A. elegans* los sesquiterpenos β -cariofileno e isocariofileno (**10**) los cuales mostraron actividad antibacteriana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* y *S. paratyphi* A. Estos compuestos así como al biciclogermacreno (**11**) se les atribuyeron actividad antiviral contra el antígeno p24 del VIH-1 con inhibición del 14.9-35.6%.³²

Del extracto etanólico de raíces de *A. ringens*, se identificó el compuesto mayoritario al sesquiterpeno conocido como aristolona (**12**). Se ha demostrado que posee un efecto antihiper glucémico en concentraciones de 75-300 mg/kg por lo que esta parte de la planta se podría emplear en decocciones para el tratamiento de diabetes.³³

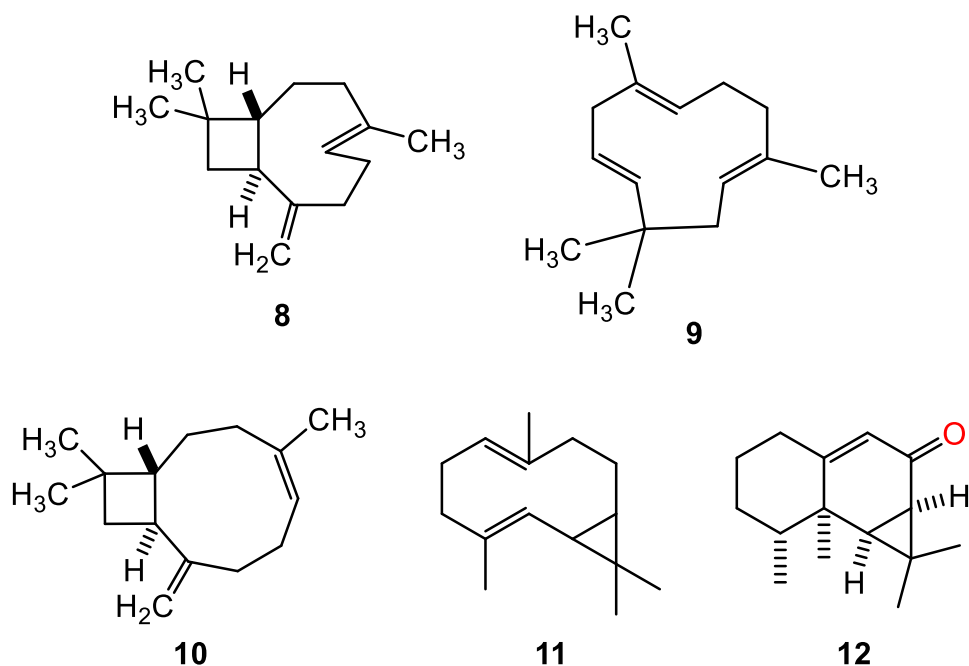


Figura 12. Estructuras de sesquiterpenos obtenidos de *A. indica*, *A. elegans* y *A. ringens*.

4.5.2. Alcaloides de especies del género *Aristolochia*

En el estudio químico y biológico de *A. maurarum* los componentes mayoritarios de raíces y partes aéreas de extractos metanólicos fueron el ácido aristolóquico I (**13**), II (**14**) y IIIa (**15**). El compuesto que mostró mayor efecto citotóxico fue el ácido aristolóquico I ($IC_{50} = 4.9 \mu\text{g/mL}$, en *Artemia salina*). Estos componentes mostraron a su vez actividad antiplaquetaria en concentraciones de 0.20-0.40 mg/mL.³⁴ Así mismo el compuesto **13** de raíces y hojas del extracto de cloroformo de *A. baetica* se le atribuye actividad citotóxica ($IC_{50} = 216.06 \mu\text{g/mL}$) contra la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.³⁵ Navarro-García y colaboradores, determinaron que en los extractos de diclorometano de raíces de *A. brevipes* colectada en México el compuesto aristolactama I (**16**) presentó mayor actividad antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* a una concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 13).³⁶

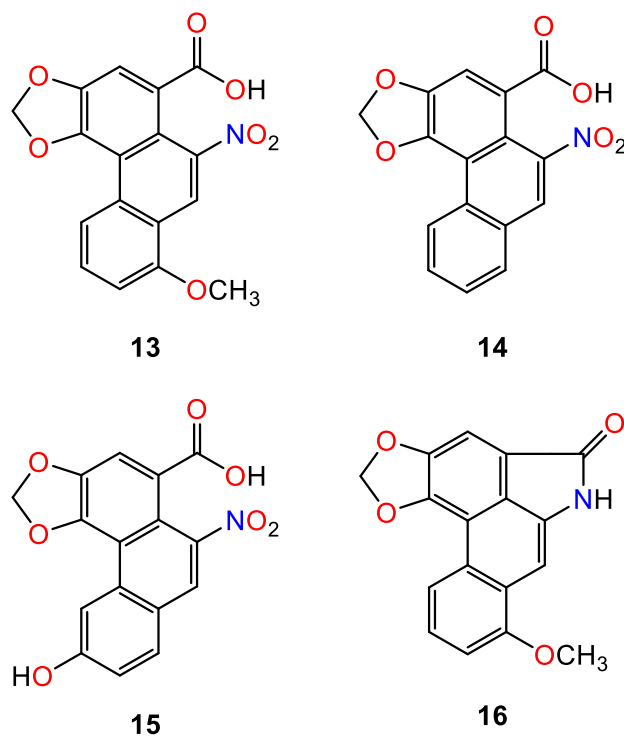


Figura 13. Alcaloides de *A. maurarum*, *A. baetica* y *A. brevipes*.

4.5.3. Compuestos fenólicos de especies del género *Aristolochia*

En los extractos hexánicos de los rizomas de la especie *A. elegans* fueron identificados compuestos fenólicos como, fargesina (17), (8*R*,8'*R*,9*R*)-cubebina (18) y eupomatenoides-1 (19) los cuales favorecieron la inhibición de *M. tuberculosis* (CMI = 50 µg/mL). El último compuesto mencionado también mostró actividad antiparasitaria (IC₅₀ < 0.624 µg/mL) contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.³⁷

A. taliscana es llamada comúnmente como: *guaco*. Abe y colaboradores en el 2002, identificaron en los extractos metanólicos de raíces compuestos como: eupomatenoides-7 (20), licarina-A (21) y -B (22), fragransina E₁ (23) y austrobalignano-7 (24). Los compuestos anteriores excepto el 22 mostraron actividad contra *Trypanosoma cruzi* en concentraciones mínimas de 25-75 µg/mL.³⁸

En la misma especie, pero en extractos hexánicos de rizomas se atribuyó actividad antioxidante a los compuestos 20 y 21. El eupomatenoides-1 (19) presentó actividad antibacteriana (CMI = 0.7 mg/mL) inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli*,

Pseudomona fluorescens y *Listeria monocytogenesis*.³⁹ En estudios realizados por León-Díaz y colaboradores, la licarina-A (**21**) redujo la neumonía inducida por *M. tuberculosis* en ratones a una concentración de 5 mg/kg (Figura 14).⁴⁰

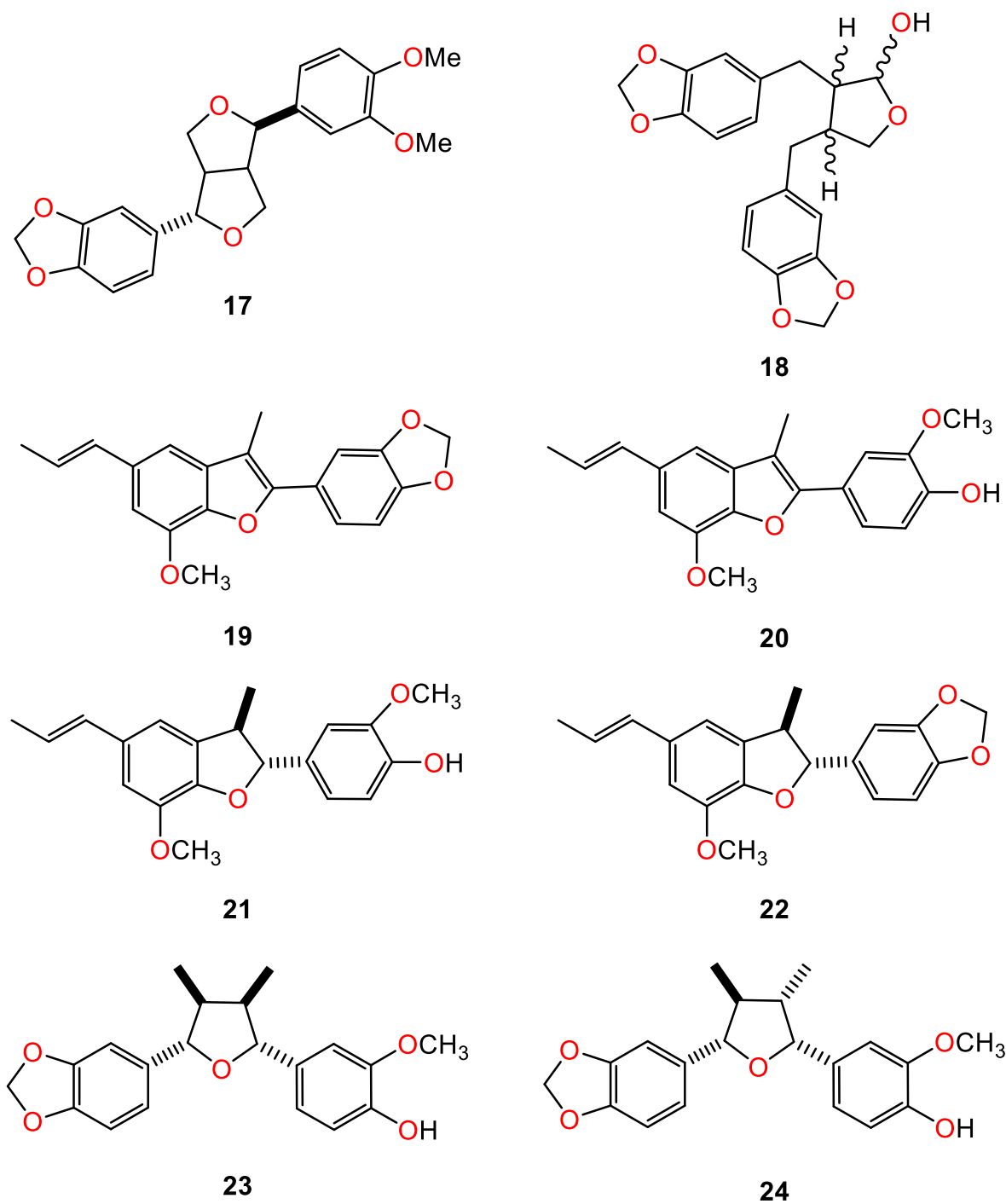


Figura 14. Compuestos fenólicos de *A. elegans* y *A. taliscana*.

Existen pocos antecedentes sobre estudios fitoquímicos y biológicos de especies del género *Aristolochia* como: *A. chiapensis*, *A. colimensis*, *A. emiliae*, *A. pueblana*, *A. occidentalis*, *A. manantlanensis*, *A. oaxacana*, *A. veracruzana*, *A. nana*, *A. islándica*, *A. tapilulensis* y *A. kalebii* entre otras, por lo que resulta interesante continuar con la búsqueda de metabolitos secundarios y sus efectos benéficos.^{24,41–43}

4.5.4. Estudios biológicos de extractos crudos de especies del género *Aristolochia*

En el 2015, Subramaniyan y colaboradores realizaron un estudio del extracto de cloroformo de hojas en la especie *Aristolochia indica* logrando obtener una citotoxicidad considerable a las 48 h de tratamiento en células de cáncer de mama MCF-7 debido a la presencia de fitoquímicos como los compuestos fenólicos.⁴⁴ De manera similar, en estudios realizados por Chaouki y colaboradores en el 2010 se observó un efecto antiproliferativo contra la misma línea celular del extracto de cloroformo de raíz en la especie *Aristolochia baetica* cuya actividad se le atribuye a los ácidos aristolóquicos.³⁵ Extractos de metanol de raíces de *A. baetica* también mostraron efectos antiproliferativos contra las líneas celulares de cáncer (T-24, HT-29, y Hep G-2) con valores de IC₅₀ de 48, 100 y 380 µg/mL respectivamente, cuyos efectos pueden ser atribuidos a compuestos fenólicos y alcaloides.⁴⁵ El extracto metanólico de tallos y hojas de la especie *Aristolochia tadungense* mostró una citotoxicidad muy efectiva frente la línea celular HeLa (IC₅₀ = 8.3 µg/mL), A549 (IC₅₀ = 75.5 µg/mL) y PANC-1 (IC₅₀ = 82.6 µg/mL). De este extracto se identificaron once compuestos por RMN de los cuales el aristolochiasido fue el que mostró una mayor citotoxicidad frente a la línea celular HeLa (IC₅₀ = 7.5 µg/mL) y PANC-1 (IC₅₀ = 54.7 µg/mL), así mismo la aristolactama AIIIa en la línea celular A-549 (IC₅₀ = 24.0 µg/mL).⁴⁶ De un extracto de etanol 95% de rizomas de la especie *Aristolochia championii* se aislaron catorce compuestos de los cuales el ácido aristchamico-A, un derivado del ácido aristolóquico, tuvo una actividad citotóxica mayor al resto de los compuestos frente a la línea celular HCT-116 (IC₅₀ = 0.19 µg/mL, Hep G-2 (IC₅₀ = 2.85 µg/mL), BGC-823 (IC₅₀ = 1.03 µg/mL), NCI-H1650 (IC₅₀ = 0.29 µg/mL).⁴⁷ El extracto de raíces de etanol de la especie *Aristolochia bracteolata* mostró una actividad citotóxica muy efectiva frente a la línea celular MCF-7 con una IC₅₀ = 19.1 µg/mL y además una actividad antioxidante considerable, cuya actividad es atribuida a compuestos fenólicos.⁴⁸

Por otro lado, en la especie *Aristolochia galeata* se encontró un efecto citotóxico moderado contra células de cáncer cervicouterino de extractos crudos de diclorometano, atribuyendo su actividad a sesquiterpenos.⁴⁹ En la línea celular A549 de pulmón humano ($IC_{50} = 20 \mu\text{g/mL}$), en células HCT-116 de cáncer de colon humano ($IC_{50} = 22 \mu\text{g/mL}$), en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata humano ($IC_{50} = 3 \mu\text{g/mL}$) y en THP-1 una línea celular monocítica humana derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda ($IC_{50} = 24 \mu\text{g/mL}$) se obtuvieron IC_{50} a bajas concentraciones con el extracto etanólico de raíz de *Aristolochia ringens*. Sin embargo, la actividad citotóxica no se atribuyó a ningún compuesto.⁵⁰ Así mismo en la especie *Aristolochia macroura* se determinó actividad citotóxica frente a células cancerosas hepáticas con el extracto metanólico de hojas, los compuestos que participan en su actividad son flavonoides, sesquiterpenos, catecoles, pentanos, carbohidratos, esteroides y alcaloides como se aprecia en la Tabla 4.⁵¹ En las líneas celulares de cáncer de mama se evaluó el efecto citotóxico del extracto acuoso de raíces de *Aristolochia longa* observando un mayor efecto en la primera línea celular por medio del ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), cuya actividad se debe a compuestos fenólicos en el extracto.⁵²

Tabla 4. Valores de IC_{50} de extractos crudos.

Línea celular	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Especie	Extracto
MCF-7	216.0	<i>A. baetica</i> L.	CHCl_3
T-24	48.0	<i>A. baetica</i> L.	MeOH
HT-29	100.0	<i>A. baetica</i> L.	MeOH
Hep G-2	380.0	<i>A. baetica</i> L.	MeOH
MCF-7	19.1	<i>A. bracteolata</i> Lank.	EtOH
HCT-116	0.19	<i>A. championii</i> Merr. & Chun.	EtOH
Hep G-2	2.85	<i>A. championii</i> Merr. & Chun.	EtOH
BGC-823	1.03	<i>A. championii</i> Merr. & Chun.	EtOH
NCI-H1650	0.29	<i>A. championii</i> Merr. & Chun.	EtOH
HeLa	90.0	<i>A. galeata</i> Mart. ex Zucc.	CH_2Cl_2
MCF-7	347.0	<i>A. indica</i> L.	CHCl_3
THP-1	24.0	<i>A. ringens</i> Vahl.	EtOH

A549	20.0	<i>A. ringens</i> Vahl.	EtOH
HCT-116	22.0	<i>A. ringens</i> Vahl.	EtOH
PC3	3.0	<i>A. ringens</i> Vahl.	EtOH
Hep G2	513.0	<i>A. macroura</i> Gomez.	MeOH
HBL-100	40.0	<i>A. longa</i> L.	H ₂ O
MDA-MB-231	97.0	<i>A. longa</i> L.	H ₂ O
HeLa	8.3	<i>A. tadungense</i> T. V. Do & Luu.	MeOH
A549	75.5	<i>A. tadungense</i> T. V. Do & Luu.	MeOH
PANC-1	82.6	<i>A. tadungense</i> T. V. Do & Luu.	MeOH

4.5.5. Cáncer en el mundo

El cáncer es uno de los principales problemas de salud con alrededor de 10 millones de muertes a nivel mundial en datos del 2020. Los principales tipos de cáncer son el de mama con 2.26 millones de casos, pulmón 2.21 millones, colorrectal 1.93 millones y próstata con 1.41 millones (Figura 15).⁵³

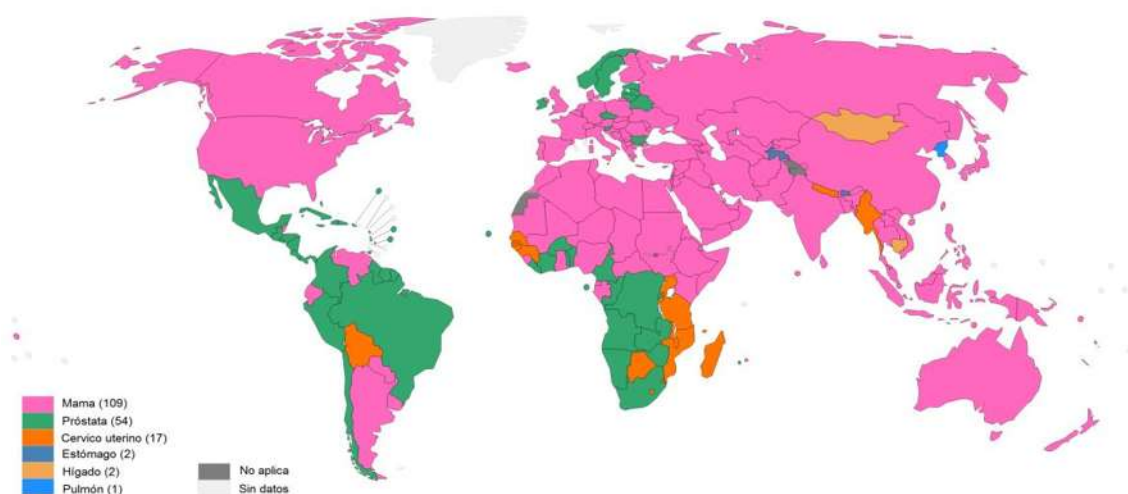


Figura 15. Distribución de distintos tipos de cáncer en el mundo.

En México, de acuerdo a datos consultados en el INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) en el año 2020, se registraron 683 823 defunciones de cáncer. En 2019 las

entidades con mayor tasa de defunciones por tumores malignos fueron: Ciudad de México, Sonora, Chihuahua, Veracruz, Nuevo León, Sinaloa y Nayarit. La mortalidad por cáncer en México ha ido incrementando drásticamente. Sin embargo, disponer de información actualizada sobre la prevalencia e incidencia del cáncer es limitada.⁵⁴

El cáncer se define como una enfermedad donde las células en el cuerpo crecen de manera descontrolada y se diseminan a otras partes del cuerpo.⁵⁵ La apoptosis es un proceso de muerte celular controlado en respuesta a diversos estímulos en donde la célula colapsa en el sentido de que existe una alteración en la membrana celular, contracción celular, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. La apoptosis se distingue de la necrosis por la ausencia de un proceso inflamatorio. La importancia de que los fármacos favorezcan la inducción de las células tumorales a la apoptosis, es debido a que las terapias sean más selectivas para los tejidos tumorales.⁵⁶ La apoptosis es inducida por dos vías de señalización: la vía intrínseca la cual es activada por la liberación de factores pro-apoptóticos mitocondriales y la vía extrínseca, activada por los receptores que se expresan en la superficie celular ambas vías tienen relación con la activación de las caspasas.⁵⁷

4.5.6. Líneas celulares

Las líneas celulares son uno de los principales modelos *in vitro* para la investigación en el cáncer. Las células MCF-7 poseen receptores de estrógeno y progesterona las cuales son candidatas adecuadas para el estudio de cáncer de mama, fueron aisladas en 1973 por Soule y colaboradores en el Michigan Cancer Foundation de una mujer de 69 años con un derrame pleural metastásico.⁵⁸ Las células MCF-12 son células no tumorales de mama inmortalizadas susceptibles a estrógenos obtenidas de la Michigan Cancer Foundation de una mujer posmenopausica de 63 años sin tejidos malignos.⁵⁹ Las células HeLa derivan de una paciente con cáncer cérvico-uterino obtenidas en febrero de 1951.⁶⁰ La línea celular A549 proviene de un adenocarcinoma epitelial basal alveolar humano de un hombre caucásico de 58 años.⁶¹ Las células K562 fueron de las primeras líneas de leucemia mielógena humana inmortalizadas derivadas de un paciente de 53 años.⁶²

5. Justificación

Aristolochia foetida Kunth y *Aristolochia glossa* Pfeifer son plantas endémicas de la región sureste de la tierra caliente del estado de Michoacán de lo cual se cuenta con pocos estudios fitoquímicos y citotóxicos descritos en la literatura. En el presente trabajo de tesis se investigan los extractos de mediana polaridad de *Aristolochia foetida* Kunth para su posible aplicación citotóxica en células de cáncer de mama. Los neolignanós y sus derivados de la especie *Aristolochia glossa* Pfeifer se evalúan por medio de un análisis de consenso farmacológico para su uso como agentes citotóxicos frente a células MCF-7, HeLa, A549 y K562.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Llevar a cabo un estudio fitoquímico y determinar la citotoxicidad de *Aristolochia foetida* Kunth y una evaluación de derivados neolignanós a partir de *Aristolochia glossa* Pfeifer por medio de un análisis del consenso farmacológico.

6.2. Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios por métodos físicos, químicos y espectroscópicos de tallos y hojas de *Aristolochia foetida* Kunth y los neolignanós eupomatenóide-7 (20) y licarina-A (21) y de los tallos gruesos de *Aristolochia glossa* Pfeifer.
- Determinar la viabilidad celular en células MCF-7 por reducción del compuesto MTT con los extractos crudos de tallos y hojas de *Aristolochia foetida* Kunth.
- Evaluar los neolignanós y sus derivados contra un modelo de cáncer por medio de un análisis de consenso farmacológico de la especie *Aristolochia glossa* Pfeifer.
- Preparar derivados tipo éster de los compuestos aislados y determinar la citotoxicidad en células MCF-7, HeLa, A549 y K562 de *Aristolochia glossa* Pfeifer.

7. Resultados y discusión

7.1. Análisis de los extractos de tallos y hojas de *Aristolochia foetida* Kunth

Inicialmente se procesaron los macerados de diferentes disolventes de la planta *Aristolochia foetida* Kunth. El rendimiento de los extractos crudos se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Extractos crudos de *A. foetida* Kunth.

Lote	Material vegetal	Muestra (g)	Disolventes			
			Hexano	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Metanol
1	Tallos y hojas	65	0.27	0.26	0.49	4.94
2	Tallos	490	0.21	0.05	3.39	6.98
	Hojas	655	1.94	2.31	22.28	39.07
3	Tallos y hojas	640	1.21	1.62	0.88	1.47
4	Tallos	3300	1.79	3.28	4.51	32.25
	Hojas	2800	8.95	8.62	14.04	50.00

En el análisis de los espectros desgrasados de los extractos hexánicos de tallos y hojas del lote 4 (Figura 16) mostró señales intensas en la región de los compuestos alifáticos. En el extracto de hexano, diclorometano, AcOEt y MeOH (Figura 17-19) se observaron señales en la región de los protones aromáticos, vinílicos, ésteres, éteres, alcoholes y alifáticos.

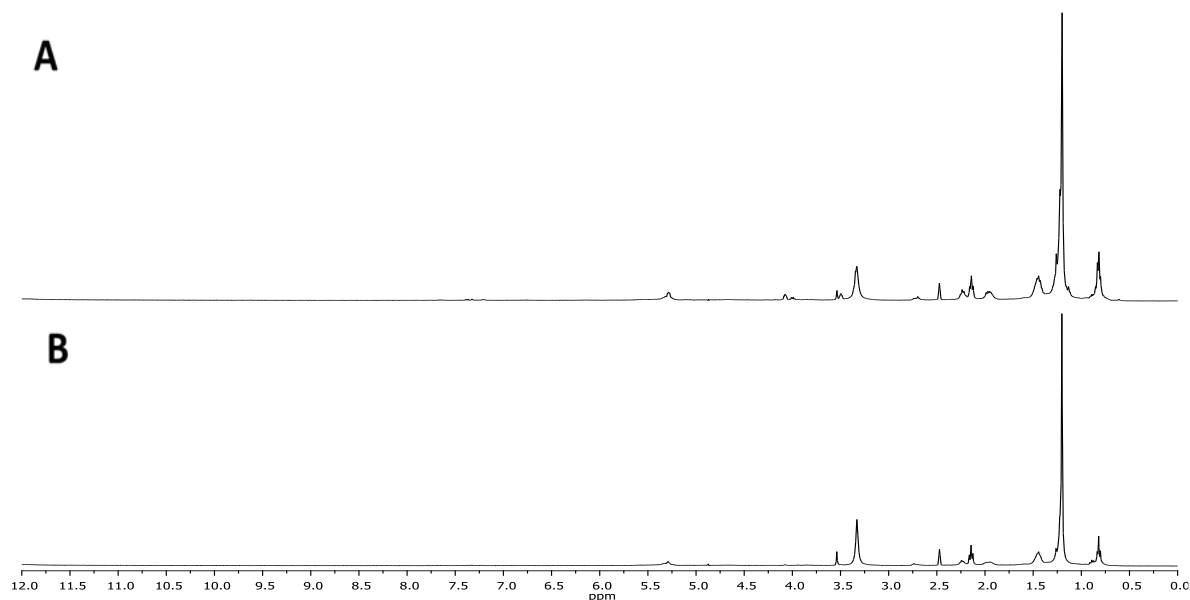


Figura 16. Espectro de RMN de ¹H en DMSO-d₆ a 400 MHz del extracto hexánico de tallos (A) y hojas (B).

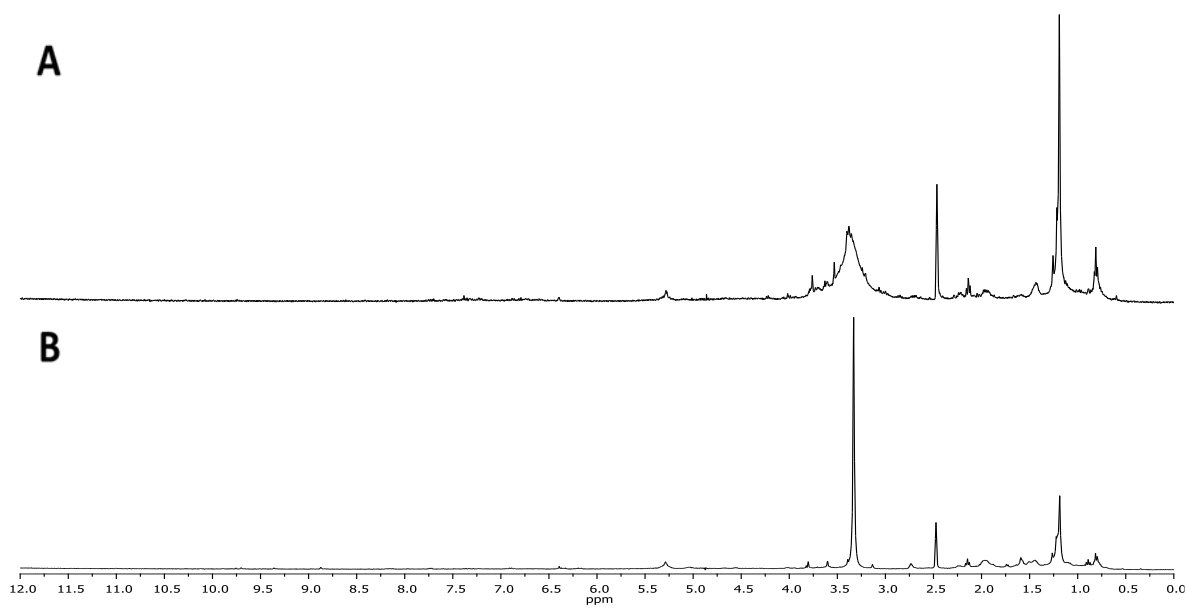


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H en DMSO-d_6 a 400 MHz del extracto de CH_2Cl_2 de tallos (A) y hojas (B).

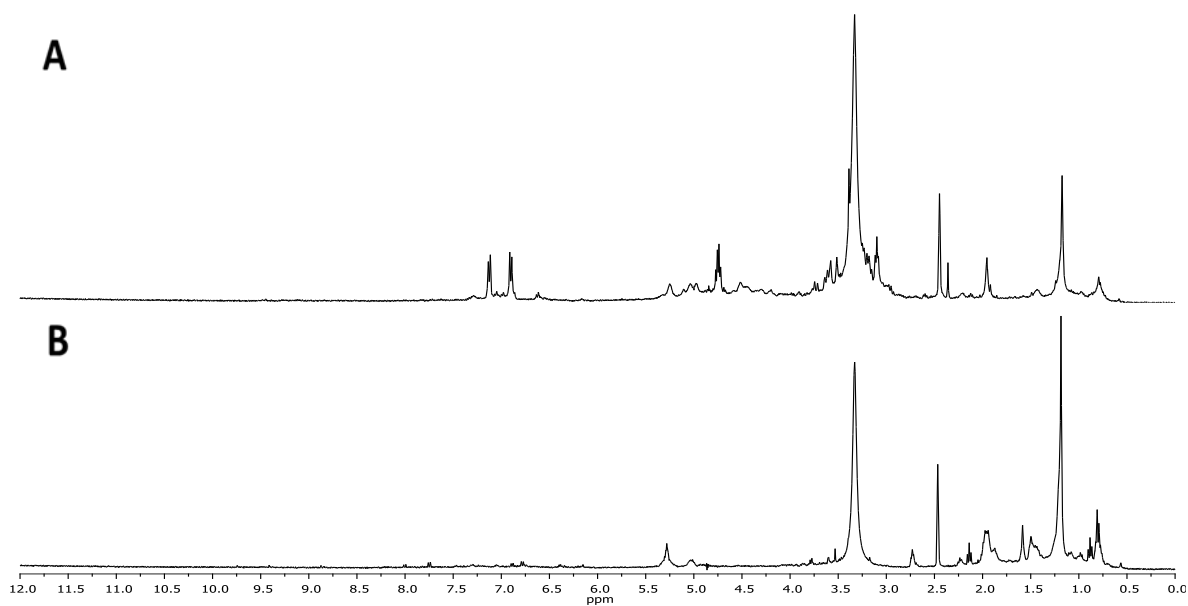


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H en DMSO-d_6 a 400 MHz del extracto de AcOEt de tallos (A) y hojas (B).

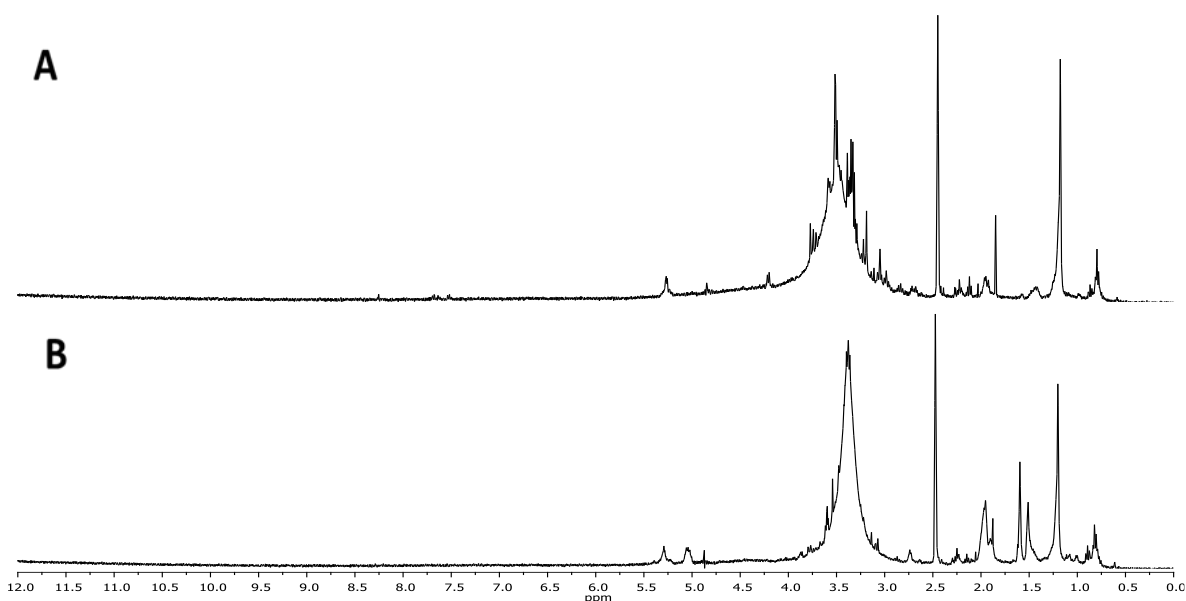


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H en DMSO-d_6 a 400 MHz del extracto de MeOH de tallos (A) y hojas (B).

El extracto de los tallos (EDT) y de las hojas (EDH) con diclorometano fueron sometidos a purificación mediante cromatografía en columna abierta usando como disolventes mezclas de Hex-AcOEt en orden ascendente de polaridad. De las fracciones eluidas con una polaridad 9:1 Hex-AcOEt, se obtuvo una mezcla de esteroides identificados como β -sitosterol (**25**) y estigmasterol (**26**).

En su espectro de RMN de ^1H (Figura 20) de la mezcla de compuestos **25** y **26** se observó en 5.36 ppm una señal doble con una $J = 5.6$ Hz para el protón vinílico H-6, en 5.15 ppm una señal doble de dobles con una $J = 15.2$ y 8.8 Hz correspondiente H-21, así como en 5.04 ppm una señal doble de dobles con una $J = 15.2$ y 8.8 Hz del H-20; en 3.50 ppm se encontró una señal múltiple correspondiente al metino base de hidroxilo H-3; a frecuencias altas se identificaron las señales pertenecientes a los metilos 19, 24, 26, 27, 28 y 29, respectivamente. La diferencia entre **25** y **26** se observó en el enlace C-20 y C-21 de **26**, cuya relación en mayor proporción de 3:1 fue **25**.^{63,64}

En la polaridad 9:1 Hex-AcOEt se identificó la feofitina-a (**27**) (450.0 mg) se analizó mediante RMN de ^1H (Figura 21) mostrando una señal simple alrededor de 3.39 ppm característica del metilo de la posición 7¹.⁶⁵⁻⁶⁷

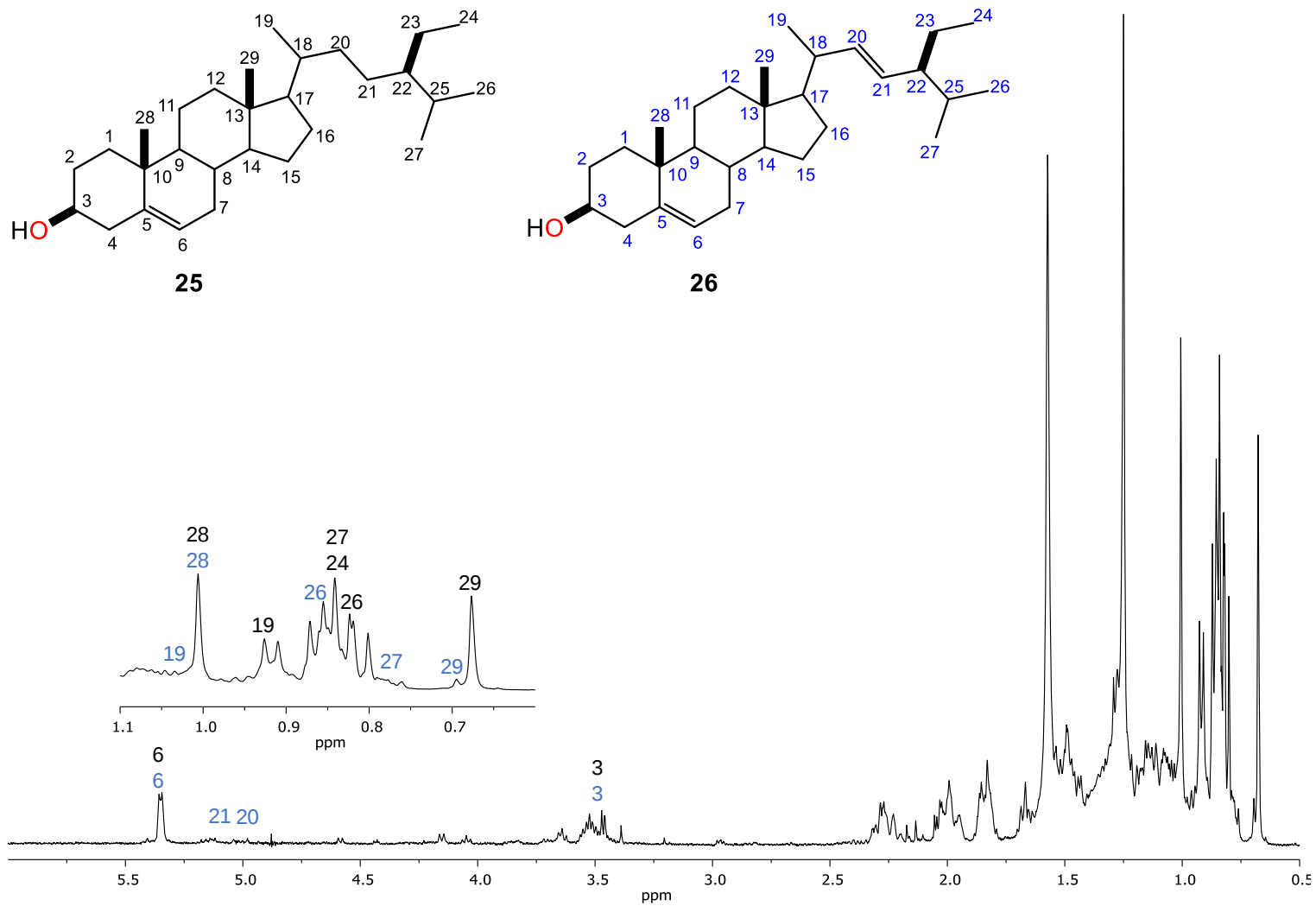


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la mezcla de β -sitosterol (25) y estigmasterol (26).

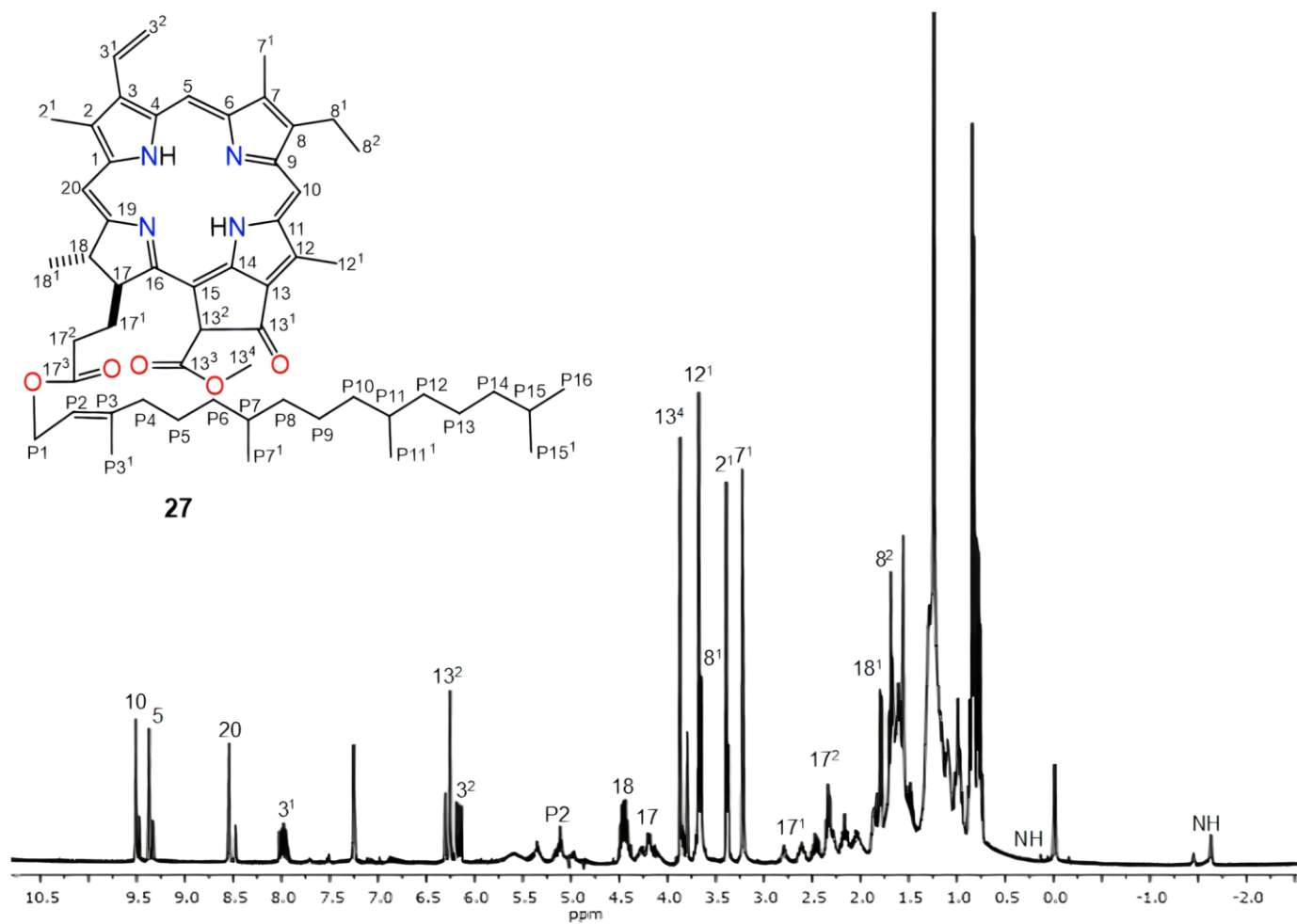


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de feofitina-a (27).

Los extractos hexánicos de tallos (EHT) y hojas (EHH) así como EDT y EDH se analizaron por CG-MS/MS y se obtuvieron los compuestos mayoritarios: hexadecanoato de metilo; ácido hexadecanoico, dodecanoato de 2-butoxietilo; hexadecanoato de etilo; ácido (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoico que se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Compuestos identificados en *A. foetida* Kunth.

Compuesto	EHT	EDT	EDT	EDH
Icosan-1-ol $C_{20}H_{42}O$	•			
Ácido pentadecanoico $C_{15}H_{30}O_2$	•			
*Hexadecanoato de metilo $C_{17}H_{34}O_2$	•	•	•	•
*Ácido hexadecanoico $C_{16}H_{32}O_2$	•	•	•	•
(9Z,11E)-Octadeca-9,11-dienoato de metilo $C_{19}H_{34}O_2$	•			
(E)-Octadec-13-enoato de metilo $C_{19}H_{36}O_2$	•			
Ácido oleico $C_{18}H_{34}O_2$	•	•		
(9Z,11E)-Octadeca-9,11-dienoato de etilo $C_{20}H_{36}O_2$	•			
*Dodecanoato de 2-butoxietilo $C_{18}H_{36}O_3$	•	•	•	
Bis(6-metilheptil)benceno-1,2-dicarboxilato $C_{28}H_{38}O_4$	•			
(Z)-Octadec-9-enoato de 2-butoxietilo $C_{24}H_{46}O_3$	•			
S-[2-[3-[(2,4-dihidroxi-3,3-dimetilbutanoil) amino] propanoilamino] etil] tetradec-2-inionato $C_{25}H_{44}N_2O_5S$	•			
Lupeol $C_{30}H_{50}O$	•			
Stigmast-4-en-3-ona $C_{29}H_{48}O$	•			
β-Sitosterol $C_{29}H_{50}O$	•	•	•	•

Etilisoalocoato	•
$C_{26}H_{44}O_5$	
[7,7,12,16-Tetrametil-15-[4-[2-propan-2-ilo-xiran-2-il)butan-2-il]-6- pentaciclo [9.7.0.0 ^{1,3} .0 ^{3,8} .0 ^{12,16}]acetato de octadecanilo	• •
$C_{33}H_{54}O_3$	
2,4-ditert-Butilfenol	•
$C_{14}H_{22}O$	
Óxido de cariofileno	•
$C_{15}H_{24}O$	
6-(3-Hidroxi-but-1-enil)-1,5,5-trimetil-7-oxabicyclo [4.1.0] heptan-2-ol	•
$C_{13}H_{22}O_3$	
6,10,14-Trimetilpentadecan-2-ona	•
$C_{18}H_{36}O$	
Fitol	•
$C_{20}H_{40}O$	
*Ácido (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoico	•
$C_{18}H_{30}O_2$	
Acetato de [(Z)-7-metiltetradec-8-eni]	•
$C_{17}H_{32}O_2$	
Pregnan-20-ona, 3-(acetiloxi)-5,6:16,17-diepoxi-, (3β,5α,6α,16α)	•
$C_{23}H_{32}O_5$	

*Muestra compuestos en mayor proporción.

7.1.1. Modificaciones químicas

Una vez obtenidos los triterpenos **25**, **26** se llevaron a cabo modificaciones químicas en el grupo hidroxilo con el fin de obtener una mayor pureza. A partir del β-sitosterol (**25**) y estigmasterol (**26**) se prepararon los derivados acetilados **28** y **29**, respectivamente, por tratamiento con anhídrido acético/piridina durante 2 h en baño de vapor. El crudo de reacción de mezcla de β-sitosterol y estigmasterol se llevó a purificación, obteniendo en la polaridad 9:1 Hex-AcOEt la mezcla de derivados acetilados **28** y **29** (111.0 mg) (23%), el cual se analizó mediante RMN de ¹H (Figura 22) mostrando una señal simple alrededor de 2.02 ppm característica del metilo de acetato, también se vio el desplazamiento de la señal múltiple que se encontraba en 3.50 ppm base de hidroxilo hacia 4.60 ppm ahora base de

éster, las demás señales del sistema no presentaron cambios significativos en su desplazamiento químico.⁶⁸

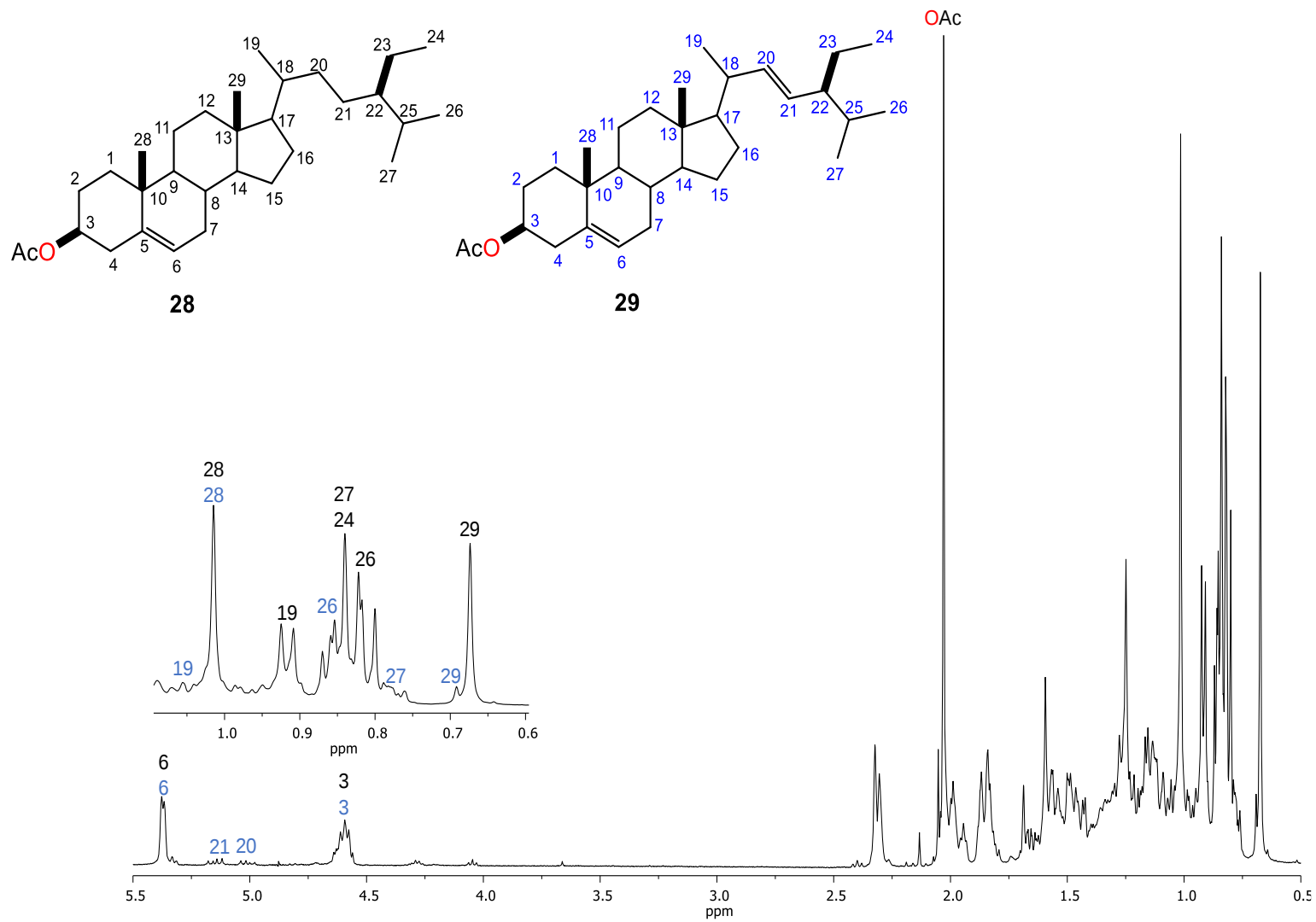


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la mezcla ésteres (28) y (29).

7.1.2. Estudio biológico de los extractos crudos de *Aristolochia foetida* Kunth

Se analizó la citotoxicidad de los extractos de las distintas polaridades de tallos y hojas en la línea celular MCF-7 a las 24 horas de tratamiento. Los extractos que tuvieron una IC₅₀ menor a 50 µg/mL fueron los extractos de tallos y hojas de diclorometano, 45.9 µg/mL y 47.3 µg/mL respectivamente. En la línea celular MCF-12 se probaron los extractos que tuvieron una mejor citotoxicidad hacia MCF-7 se obtuvo una mayor selectividad en los extractos de hexano (58.3 µg/mL) de las flores y de diclorometano (108.7 µg/mL) de los tallos. En las células de epitelio mamario bovino (CEMB) se evaluaron únicamente los extractos de hexano y diclorometano de la planta. Los extractos de diclorometano que presentaron una mayor selectividad fueron los de tallos con una IC₅₀ de 292.8 µg/mL y de las hojas (147.7 µg/mL) como se puede apreciar en la Tabla 7.

Tabla 7. IC₅₀ a 24 h en MCF-7 y CEMB.

		µg/mL			
		Hexano	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Metanol
MCF-7	Tallos	116.0	45.9	>300	162.1
	Hojas	60.0	47.3	126.8	>300
MCF-12	Tallos	117.0	108.7	-----	>300
	Hojas	48.0	46.0	33.3	-----
CEMB	Tallos	249.1	292.8	-----	-----
	Hojas	60.0	147.7	-----	-----

La citometría de flujo se realizó para corroborar los valores de IC₅₀ determinadas por los ensayos de MTT y azul de tripano de los extractos de tallos y hojas de diclorometano y de la mezcla de β-sitosterol y estigmasterol (Cmp) que mostraron un mayor efecto citotóxico y mejor selectividad contra MCF-7, MCF-12 y CEMB. Los valores de azul de tripano en las células que no recibieron un tratamiento se determinó una viabilidad del 97.0%, en el control positivo de muerte celular se empleó actinomicina D 10 µM con un 63.5% de células vivas, con el empleo de etanol al 2.0% la viabilidad fue del 95.2%, mientras tanto para el extracto de tallos de diclorometano la IC₅₀ calculada mostró un 20.2%, 0.21% en el

extracto de hojas del mismo disolvente y un 20.2% en la mezcla de β -sitosterol (**25**) y estigmasterol (**26**). Las distintas muestras fueron tratadas en MCF-7 a las 24 h y confirmadas a las 48 horas del tratamiento, Figuras 23.

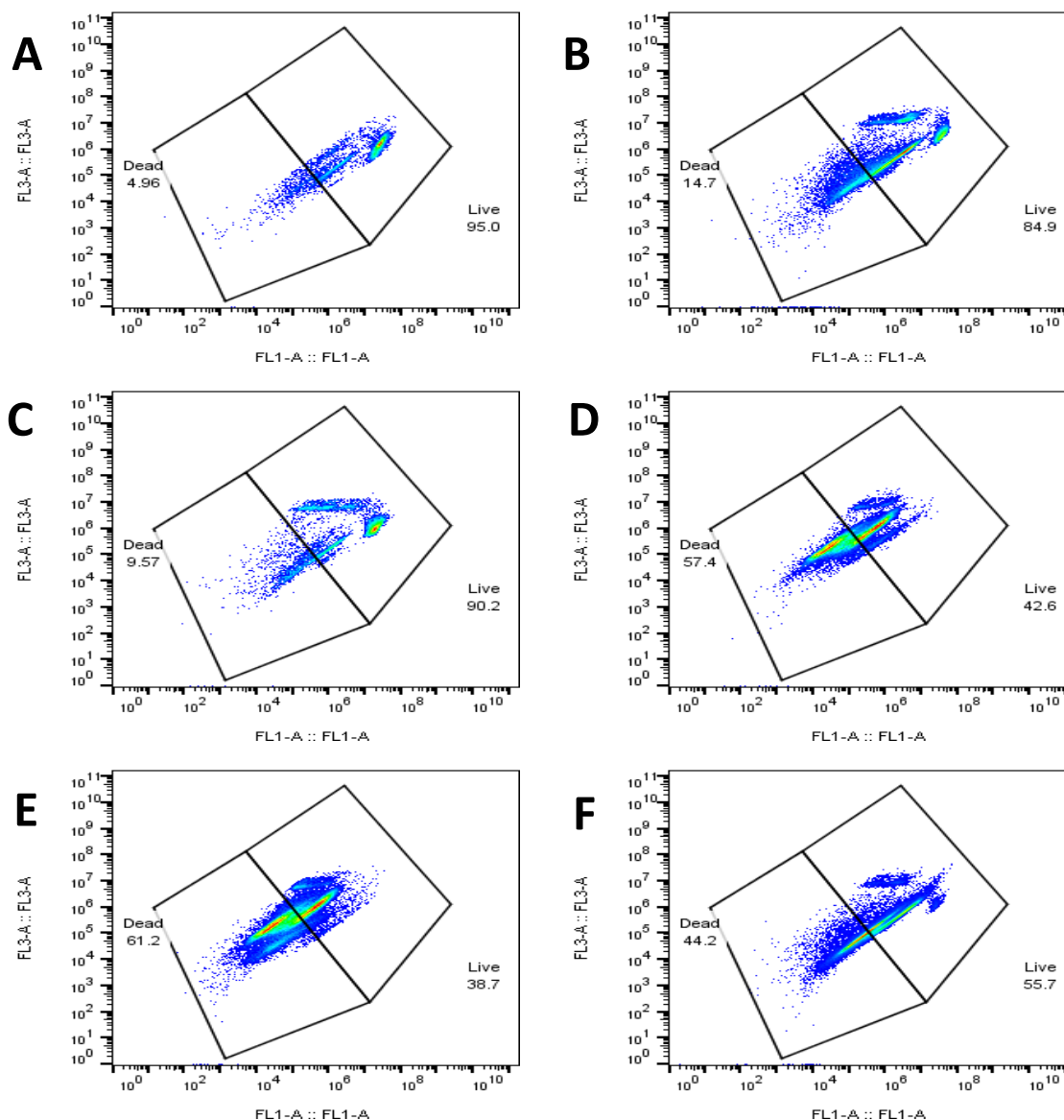


Figura 23. Citometría de flujo por Syto-9 y yoduro de propidio (IP). (A) Células sin tratamiento. (B) Actinomicina D 10 μ M. (C) Vehículo (EtOH). (D) IC₅₀ del 45.9 μ g/mL del extracto de CH₂Cl₂ de tallos. (E) IC₅₀ del 47.3 μ g/mL del extracto de CH₂Cl₂ de hojas. (F) IC₅₀ del 50.3 μ g/mL de mezcla de β -sitosterol **25** y estigmasterol **26** a 24 h.

Los compuestos **25**, **26** y los derivados **28** y **29** fueron evaluados en las células tumorales MCF-7 y en las no tumorales MCF-12 y CEMB. Los compuestos **25** y **26** tuvieron un mayor efecto citotóxico frente a MCF-7 en comparación con sus derivados acetilados, como se aprecia en la Tabla 8. Los compuestos **25** y **26** corresponden a las IC₅₀

determinadas en MCF-7 de las especies *Pereskia bleo* y *Alafia barteri* Oliv, mientras tanto ciertas clorofilas suelen tener valores de IC₅₀ mayores en la misma línea celular.⁶⁹⁻⁷¹

Tabla 8. IC₅₀ a 24 h de los compuestos **25-26** y **28-29** en MCF-7, MCF-12 y CEMB.

Células	Compuestos	µg/mL
MCF-7	25 y 26	50.3
	28 y 29	282.1
MCF-12	25 y 26	114.9
	28 y 29	>300
CEMB	25 y 26	>300
	28 y 29	>300

En el ensayo del modo de muerte celular por citometría de flujo en la línea celular MCF-7 a las 24 horas de tratamiento se emplearon como control positivo de apoptosis la actinomicina D y de necrosis el EDTA así como los fluoróforos de anexina V y 7AAD. La IC₅₀ de actinomicina D fue de 10 µM y se determinó la mayor parte de la población en apoptosis temprana. El EDTA a 250 mM mostró una parte de la población de las células en estado de necrosis. Los valores de IC₅₀ de los extractos de tallos de diclorometano mostraron una mayor concentración de la población en apoptosis tardía 91.2% al igual que en las hojas 77.0% y en la mezcla de triterpenos 80.7% a las 24 h, como se puede observar en la Figura 24.

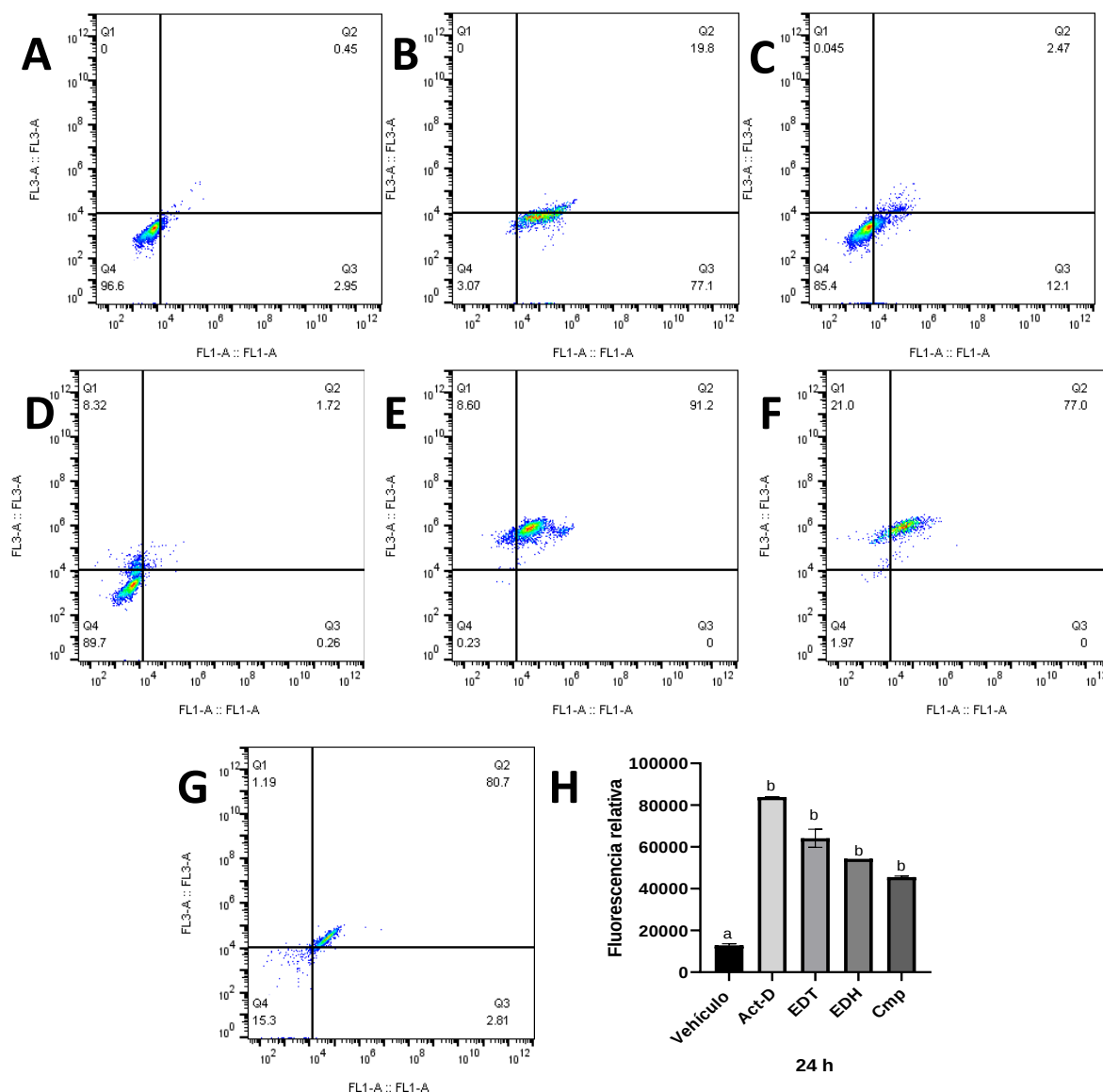


Figura 24. Citometría de flujo de apoptosis y necrosis. (A) Células sin tratamiento. (B) Actinomicina D 10 μ M (C) Vehículo (EtOH). (D) EDTA 250 mM. (E) IC₅₀ del 45.9 μ g/mL del extracto de CH₂Cl₂ de tallos. (F) IC₅₀ del 47.3 μ g/mL del extracto de CH₂Cl₂ de hojas. (G) IC₅₀ del 50.3 μ g/mL de mezcla de β -sitosterol 25 y estigmasterol 26 (Cmp) intensidad de fluorescencia relativa de los tratamientos a 24 h. ANOVA, Tukey $p < 0.05$.

En el ensayo de potencial de membrana mitocondrial se utilizó el fluoróforo JC-1 de manera que la despolarización de la membrana mitocondrial fue positiva en el control de actinomicina D 22.6%, así como en el extracto de tallos 79.0%, hojas 87.2% y en la mezcla de triterpenos 70.1%, de manera que es posible que exista el modo de muerte celular por apoptosis en la vía intrínseca como se puede observar en la Figura 25. Cabe mencionar que

la apoptosis por la vía intrínseca se activa desde el interior de la célula por daños en el ADN o en los microtubulos.⁵⁷

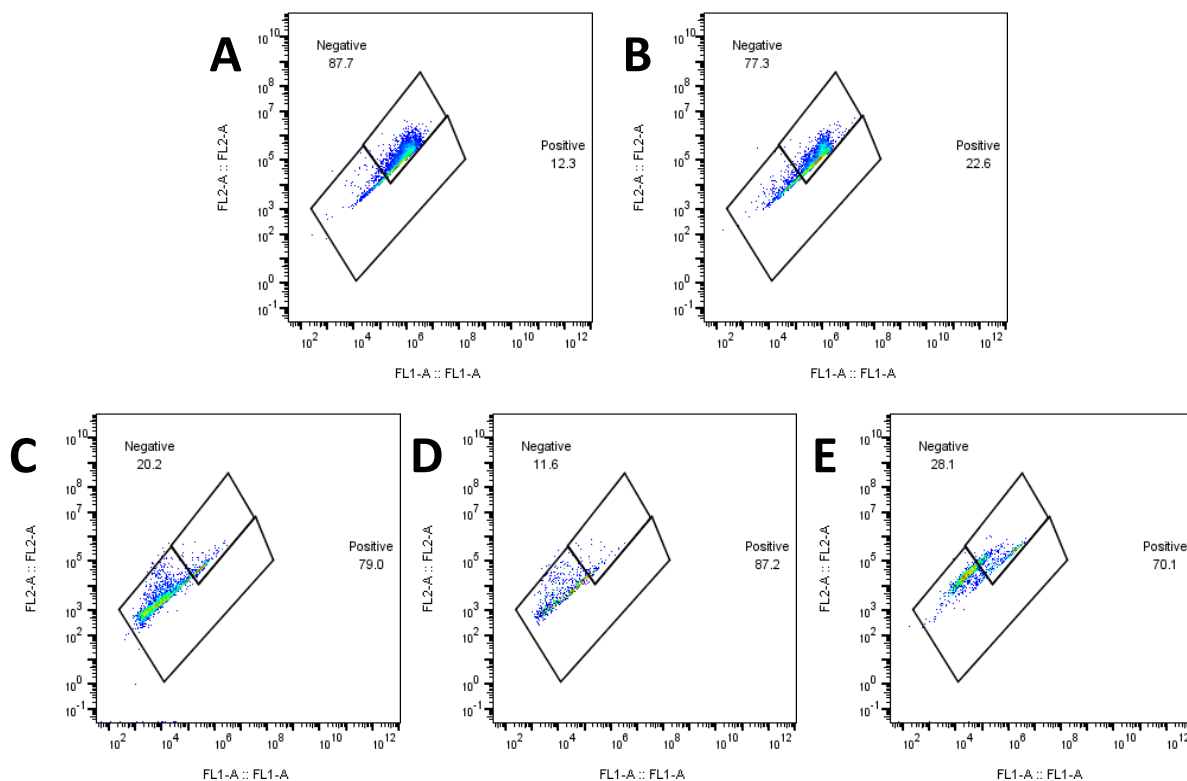


Figura 25. Citometría de flujo de potencial de membrana mitocondrial (JC-1). (A) Vehículo (EtOH). (B) Actinomicina D 10 µM. (C) IC₅₀ del 45.9 µg/mL del extracto de CH₂Cl₂ de tallos. (D) IC₅₀ del 47.3 µg/mL del extracto de CH₂Cl₂ de hojas. (E) IC₅₀ del 50.3 µg/mL de mezcla de β-sitosterol **25** y estigmasterol **26** a 24 h.

En el ensayo de potencial de membrana por el fluoróforo DISC₃ (5) se utilizó como control positivo la valinomicina 0.4 mM la cual mostró un cambio importante en el potencial de la membrana celular, mientras tanto el vehículo, los extractos, así como la mezcla de β-sitosterol **25** y estigmasterol **26** no se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia en MCF-7, Figura 26.

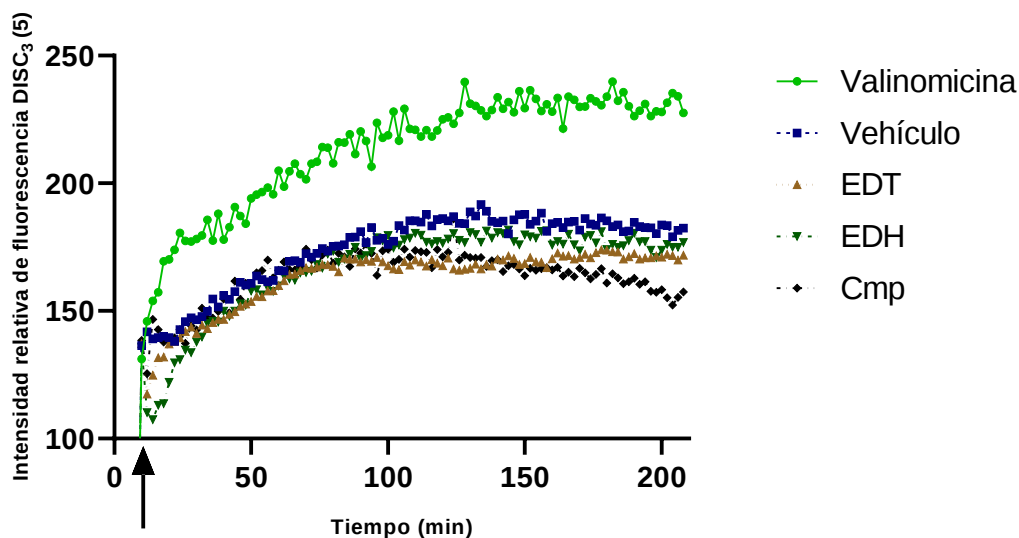


Figura 26. Ensayo de potencial de membrana DISC₃ (5). Valinomicina, Vehículo (EtOH), IC₅₀ del 45.9 µg/mL del extracto de CH₂Cl₂ de tallos, IC₅₀ del 47.3 µg/mL del extracto de CH₂Cl₂ de hojas, IC₅₀ del 50.3 µg/mL de mezcla de β-sitosterol **25** y estigmasterol **26** (Cmp).

En la hemólisis de eritrocitos humanos de sangre periférica se obtuvo con la IC₅₀ del extracto de tallos una hemólisis de 6.9%, seguida de las hojas con 14.1% y la mezcla de triterpenos en 40.3%. El método muestra una forma directa de necrosis en donde las concentraciones menores a un 10% de hemólisis en los tallos fueron en 1.4-45.9 µg/mL, hojas de 1.5-23.7 µg/mL y en la mezcla de compuestos en 1.6-12.6 µg/mL (Figura 27).

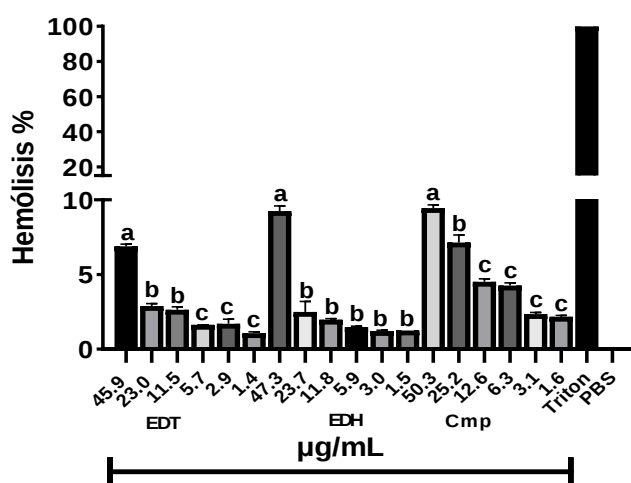


Figura 27. Ensayo de hemólisis de eritrocitos. ANOVA, Tukey $p < 0.05$. * Muestra diferencias significativas respecto al control.

7.2. Compuestos presentes en extractos orgánicos de *Aristolochia glossa* Pfeifer

Los tallos gruesos de *Aristolochia glossa* Pfeifer fueron sometidos a maceración y reflujo con disolventes en orden ascendente de polaridad. El rendimiento de los extractos se describe en la Tabla 9.

Tabla 9. Extractos crudos de *A. glossa* Pfeifer.

Material vegetal	Muestra (g)	Disolventes			
		Hexano	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	Metanol
*Tallos gruesos	610	3.2	5.5	2.3	40.5
**Tallos gruesos	1500	10.1	15.4	25.1	60.5

*Maceración, **Reflujo. Colectados en el 2020.

7.2.1. Análisis de los extractos orgánicos de tallos gruesos

En el análisis de los espectros RMN de ¹H en DMSO-d₆ de los extractos de hexano y de diclorometano de tallos gruesos (Figura 28) presentaron señales en la región de los hidrógenos vinílicos, base de alcohol, ésteres y éteres, además en la región de los hidrógenos aromáticos. En el extracto de AcOEt se apreciaron señales en desplazamientos similares a los extractos anteriores y en el extracto de MeOH presentaron en la región de los hidrógenos vinílicos, base de alcohol, ésteres, éteres y de los alifáticos (Figura 29).

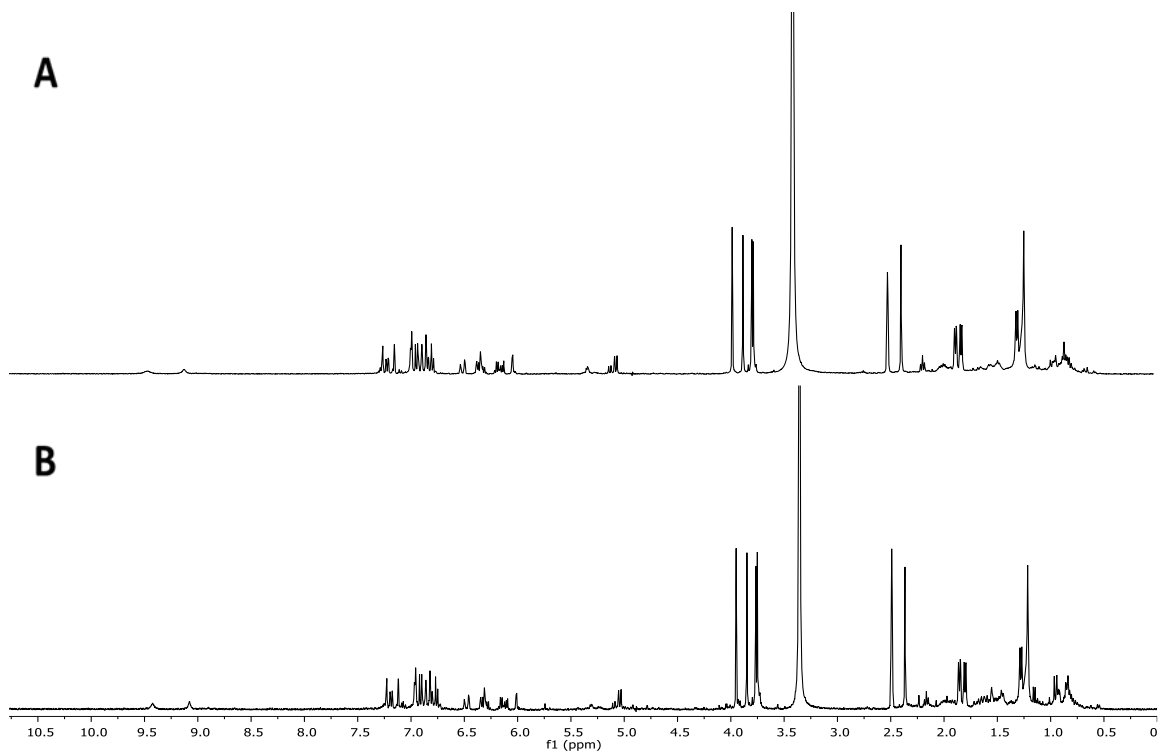


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H en DMSO-d_6 a 400 MHz de (A) tallos gruesos del extracto hexánico y (B) de diclorometano.

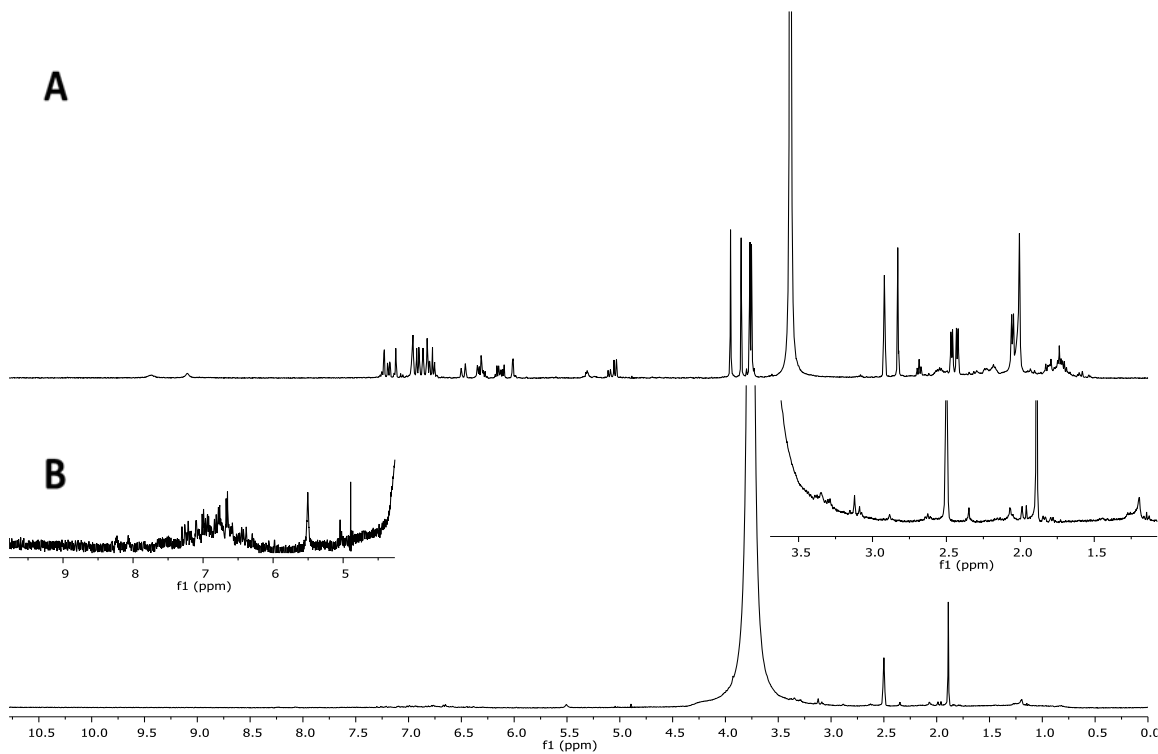


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H en DMSO-d_6 a 400 MHz de tallos gruesos del extracto (A) de AcOEt y (B) de MeOH .

Los extractos de hexano (EHTG) y de diclorometano (EDTG) de tallos gruesos de *A. glossa* Pfeifer fueron analizados por CG-MS, y se identificaron los compuestos en mayor proporción fueron: β -cariofileno, humuleno, nerolidol, epóxido de β -cariofileno, epóxido de isoaromadendreno, tetradecanoato de etilo, pentadecanoato de etilo, palmitato de metilo, palmitato de etilo, (-)-kaureno, ácido heptadecanoico, ácido linoleico, oleato de etilo, estearato de etilo, ácido araquídico, 6 β -hidroxitestosterona licarina-A, licarina-B, pentacosanoato de metilo, eupomatenoide-1, eupomatenoide-7, acetato de citronelilo, β -cubebeno, β -eudesmol, farnesol, acetato de farnesilo, ácido hexadecanoico y galbacina, Tabla 10.

Tabla 10. Compuestos identificados en *A. glossa* Pfeifer para extractos de hexano y diclorometano respectivamente.

Compuesto	EHTG	EDTG
(-)- <i>cis</i> -Sabinol	•	•
$C_{10}H_{16}O$		
Timol	•	
$C_{10}H_{14}O$		
Acetato de citronelilo	•	•
$C_{12}H_{22}O_2$		
(+)-Valenceno	•	
$C_{15}H_{24}$		
* β -Cariofileno	•	•
$C_{10}H_{14}$		
*Humuleno	•	•
$C_{15}H_{24}$		
*Nerolidol	•	•
$C_{15}H_{26}O$		
*Epóxido de β -cariofileno	•	•
$C_{15}H_{24}O$		
Epóxido de isoaromadendreno	•	
$C_{15}H_{24}O$		
*Tetradecanoato de etilo	•	
$C_{16}H_{32}O_2$		
*Pentadecanoato de etilo	•	
$C_{17}H_{34}O_2$		
*Palmitato de metilo	•	
$C_{17}H_{34}O_2$		

*Palmitato de etilo		
$C_{18}H_{36}O_2$	•	•
*(-)-Kaureno		
$C_{20}H_{32}$	•	•
*Ácido heptadecanoico		
$C_{17}H_{34}O_2$	•	
*Ácido linoleico		
$C_{18}H_{32}O_2$	•	
*Oleato de etilo		
$C_{20}H_{38}O_2$	•	•
*Estearato de etilo		
$C_{20}H_{40}O_2$	•	•
Ácido oleico		
$C_{18}H_{34}O_2$	•	
1-Heptatriacontanol		
$C_{37}H_{76}O$	•	•
*Ácido araquídico		
$C_{20}H_{40}O_2$	•	
6β-Hidroxitestosterona		
$C_{19}H_{28}O_3$	•	
*Licarina-A		
$C_{20}H_{22}O_4$	•	•
*Licarina-B		
$C_{20}H_{20}O_4$	•	•
*Pentacosanoato de metilo		
$C_{26}H_{52}O_2$	•	
*Eupomatenoides-1		
$C_{20}H_{18}O_4$	•	•
*Eupomatenoides-7		
$C_{20}H_{20}O_4$	•	•
Campesterol		
$C_{28}H_{48}O$	•	
Estigmasterol		
$C_{29}H_{48}O$	•	•
β-Sitosterol		
$C_{29}H_{50}O$	•	•
Lupeol		
$C_{30}H_{50}O$	•	

Sitostenona	•
C₂₉H₄₈O	
Citronelol	•
C₁₀H₂₀O	
2,3-Pinanodiol	•
C₁₀H₁₈O₂	
Acetato de citronelilo	•
C₁₂H₂₂O₂	
β-Cubebeno	•
C₁₅H₂₄	
β-Eudesmol	•
C₁₅H₂₆O	
Farnesol	•
C₁₅H₂₆O	
Acetato de farnesilo	•
C₁₇H₂₈O₂	
Ácido hexadecanoico	•
C₁₆H₃₂O₂	
Galbacina	•
C₂₀H₂₀O₅	

Extractos de hexano; EHTG y de diclorometano; EDTG de tallos gruesos. *muestra componentes en mayor proporción.

7.2.2. Obtención de compuestos (19-22 y 30-41)

Del EHTG y EDTG se obtuvieron 70 y 20 mg respectivamente de un sólido blanco denominado eupomatenoid-1 (**19**), obtenido de la polaridad 49:1 de Hex-AcOEt. En el espectro de RMN de ¹H (Figura 30), se apreciaron señales de dos conjuntos de anillos aromáticos; se observó una señal múltiple alrededor de 7.28 ppm asignada a los hidrógenos H-2' y H-6', dos señales dobles en 7.02 (*J* = 1.4 Hz) y 6.82 ppm (*J* = 1.5 Hz) para H-4 y H-6. En 6.89 ppm se identificó una señal doble del H-5' (*J* = 8.5 Hz). Así como una señal doble de dobles en 6.49 ppm (*J* = 15.7, 1.7 Hz) y una doble de cuádruples en 6.21 ppm (*J* = 15.7, 6.6 Hz) para los hidrógenos vinílicos H-α y H-β respectivamente. Se asignó una señal simple intensa en 6.00 ppm para los hidrógenos del metileno unido a los dos oxígenos. Además, se identificaron dos señales simples intensas en 4.03 ppm y 2.39 ppm de los hidrógenos del metoxilo en 9 y el metilo en 8. Los H-γ aparecieron en una señal doble de

dobles ($J = 6.6$ y 1.7 Hz) en 1.90 ppm del grupo metilo. El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 31), mostró 20 señales: 3 para carbonos de metilo, 1 para metileno, 7 para metinos (C-4, C-6, C-2', C-5', C-6', C- α , C- β) y C-9 carbonos cuaternarios. Se apreciaron señales en 151.1 y 110.5 ppm de los carbonos cuaternarios 2 y 3. Los datos espectroscópicos se compararon con la literatura.²⁷

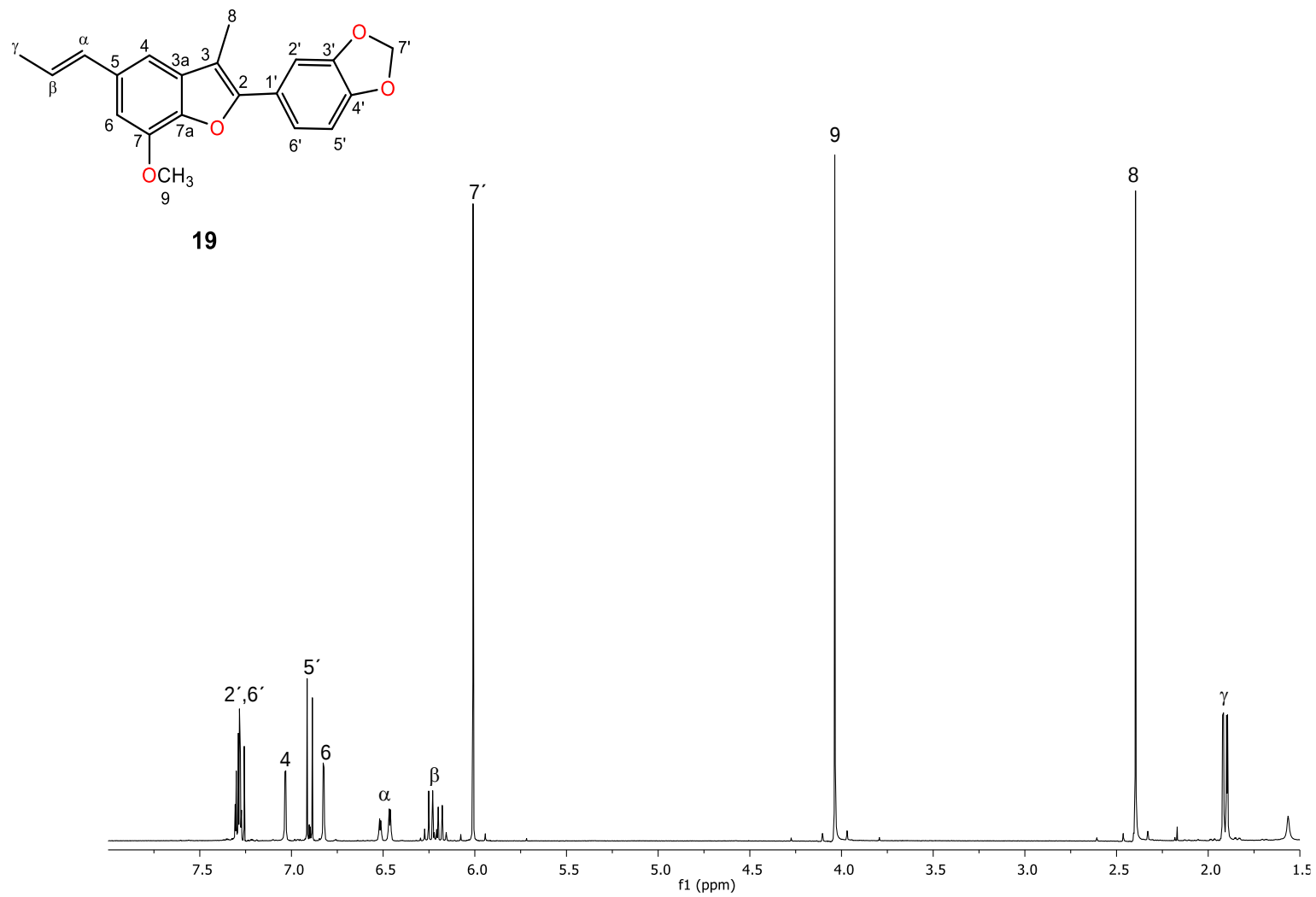


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz del eupomatenoide-1 (19).

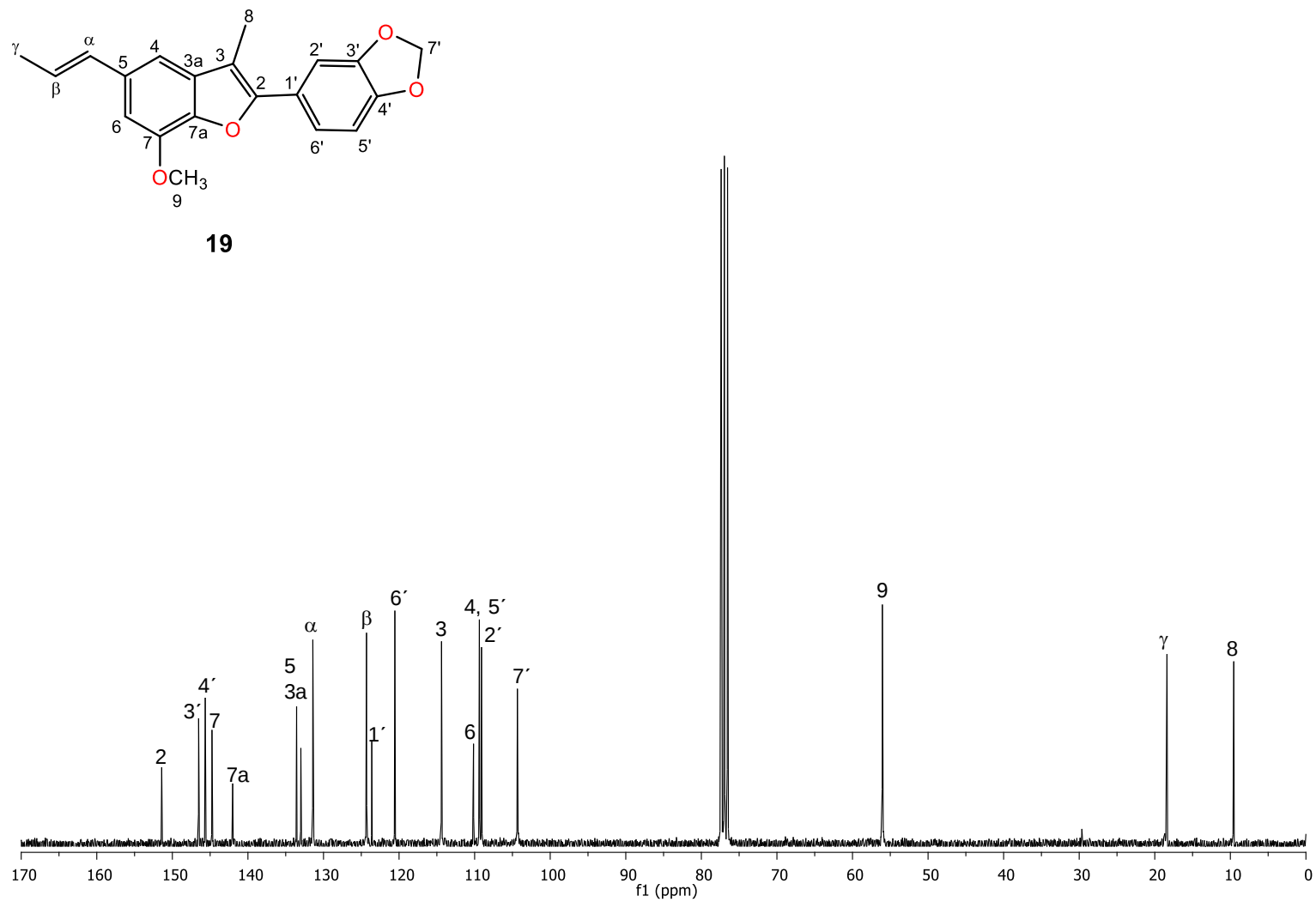


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz del eupomatenoide-1 (19).

El eupomatenoide-7 (**20**) se obtuvo como un sólido de color marrón y se aisló de los tallos gruesos en la polaridad de 19:1 Hex-AcOEt, obteniéndose 300 mg en el extracto de CH₂Cl₂ y en la polaridad 9:1 Hex-AcOEt 100 mg en el extracto de AcOEt de un lote de 5.0 g equitativamente. En el espectro de RMN de ¹H (Figura 32), se identificaron señales en dos conjuntos de anillos aromáticos; se apreció una señal múltiple en 7.29 ppm para los H-2' y H-6', una señal simple en 7.05 ppm asignada para el H-4, en 7.00 ppm una señal doble ($J = 8.3$ Hz) para el H-5', una señal simple en 6.82 ppm para H-6. Así mismo, se asignó en 6.49 ppm, una señal doble ($J = 15.7$ Hz) para el H- α , en 6.22 ppm una señal múltiple para el H- β , en 5.74 ppm una señal simple identificada para el hidrógeno del hidroxilo. Se identificaron dos señales simples intensas en 4.04 y 3.99 ppm para los hidrógenos de los metoxilos H-9 y H-7'. Posteriormente, se identificó una señal simple intensa en 2.41 ppm corresponde al metilo en 8 y los H- γ se identificaron como una señal doble de dobles en 1.91 ppm ($J = 6.6, 1.7$ Hz). En el espectro de RMN de ¹³C (Figura 33), se identificaron 20 señales: 4 para carbonos de metilo, 7 para metinos y 9 carbonos cuaternarios. Se identificaron señales entre 151.3 y 110.1 ppm que corresponden a carbonos cuaternarios 2 y 3 respectivamente.^{39,40,72}

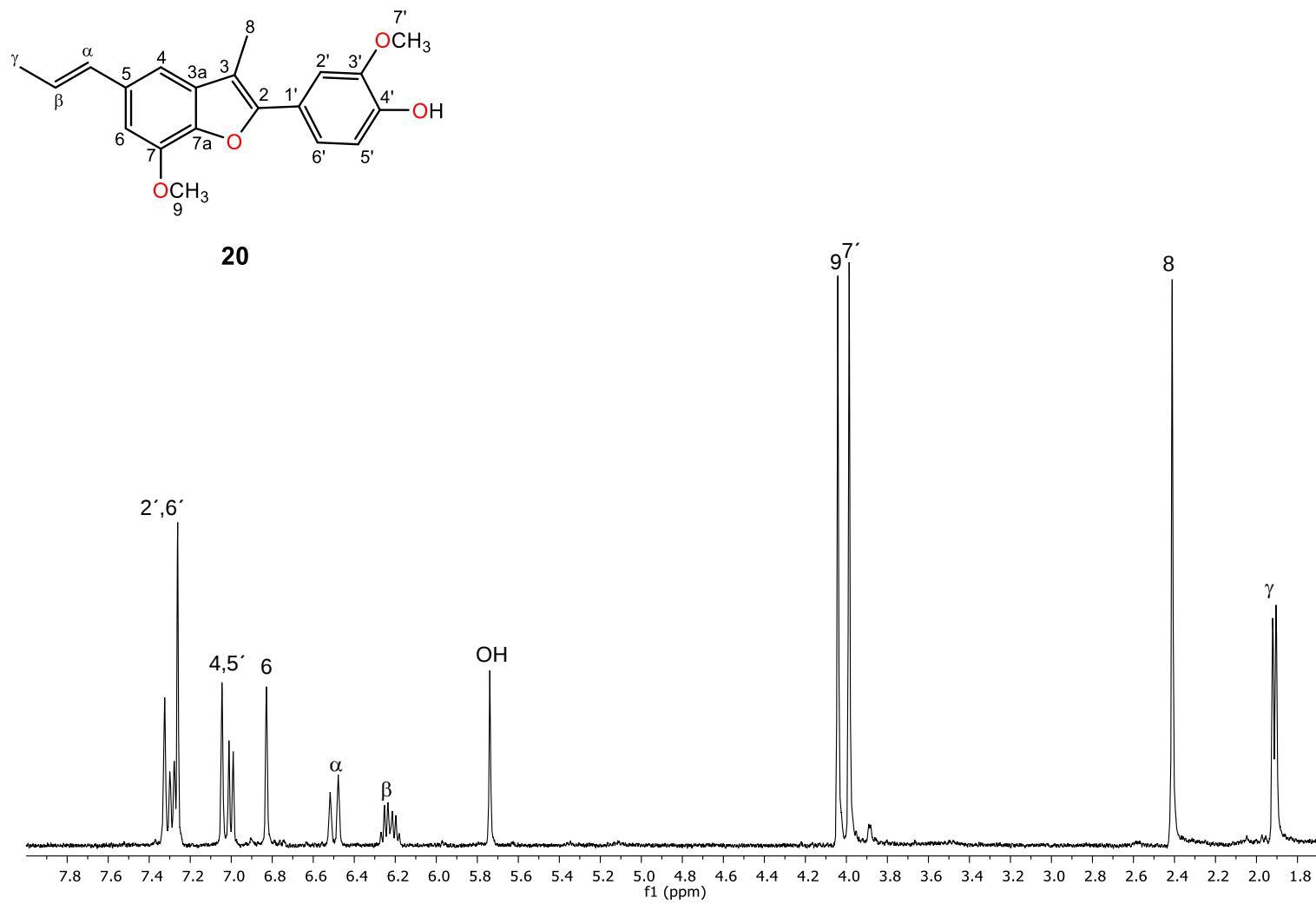


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 100 MHz del eupomatenoide-7 (20).

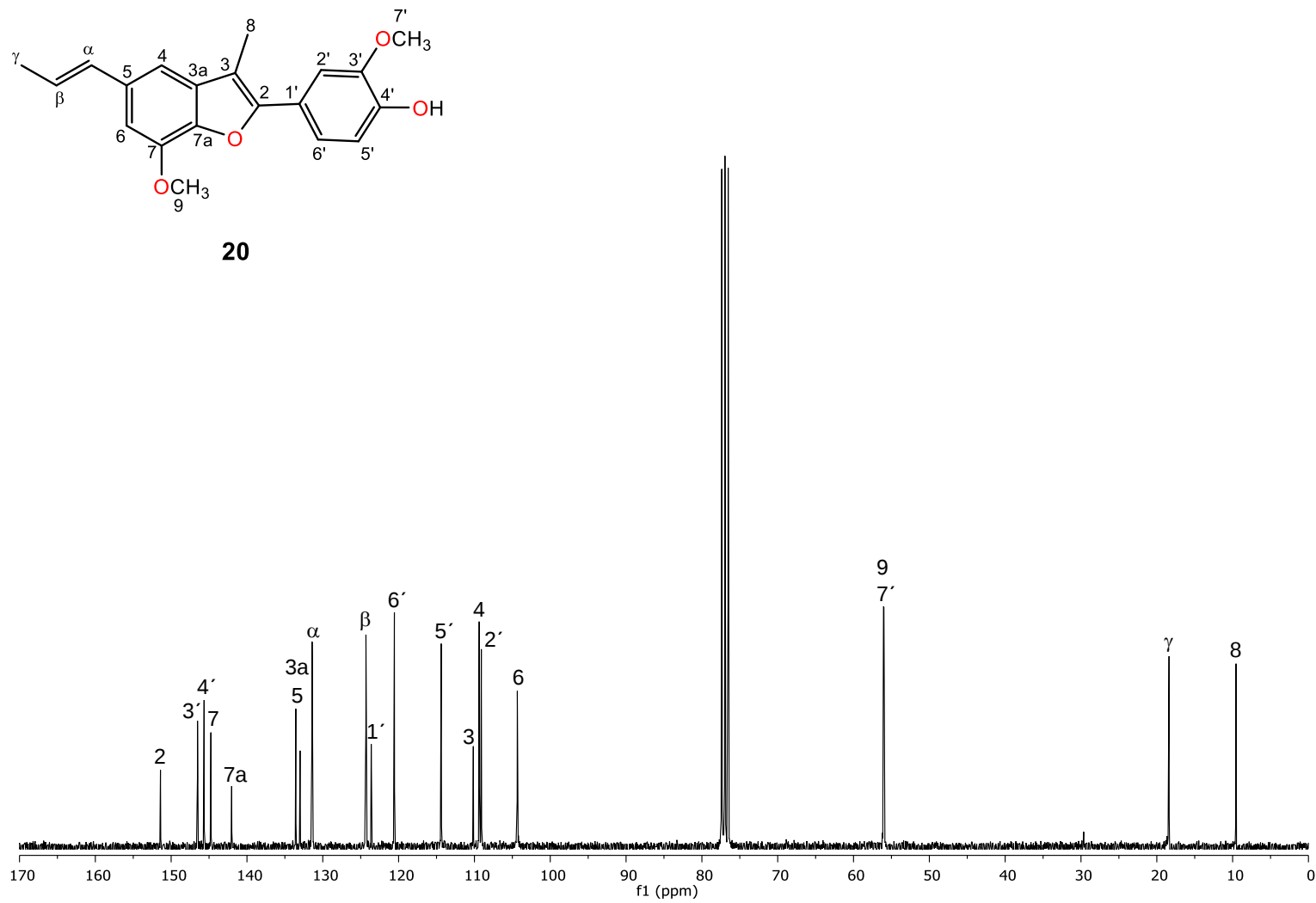


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz del eupomatenoide-7 (20).

De los EHTG, EDTG y de los extractos de acetato de etilo (EAETG) se aisló la licarina-A (**21**) en la polaridad de 19:1 Hex-AcOEt, obteniendo 50, 100 y 400 mg de un sólido cristalino incoloro de un lote de 5.0 g respectivamente. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 34) se apreciaron señales que corresponden para un conjunto de dos anillos aromáticos identificando una señal simple en 6.97 ppm para H-2', en 6.89 ppm una señal doble ($J = 1.8$ Hz) para H-5' y H-6', así como una señal doble en 6.78 ppm que integra para dos hidrógenos ($J = 8.3$ Hz) H-6 y H-4. Además, en la parte alifática insaturada se asignó una señal doble de dobles en 6.36 ppm ($J = 15.7, 2.0$ Hz) para el H- α . Se identificó una señal múltiple en 6.11 ppm para el hidrógeno H- β . En 5.66 ppm una señal simple para el hidrógeno de OH y en 5.10 ppm una señal doble ($J = 9.5$ Hz) para el H-2. Se apreciaron señales simples intensas para los hidrógenos de los metoxilos H-7 y H-9' en 3.89 y 3.87 ppm, en 3.45 ppm se asignó una señal doble de cuádruples ($J = 14.9, 7.5$ Hz) para el H-3. Los hidrógenos H- γ se identificaron como una señal doble de dobles ($J = 6.6, 1.6$ Hz) en 1.87 ppm del grupo metilo y una señal doble ($J = 6.8$ Hz) en 1.37 ppm corresponde al metilo H-8.

El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 35), mostró 20 señales: 4 para carbonos de metilo, 7 para los metinos y la presencia de 7 señales en la región de 132 a 146 ppm que representa los 7 carbonos cuaternarios presentes en la molécula (C-3a, C-5, C-7, C-7a, C-1', C-3', C-4').⁷²

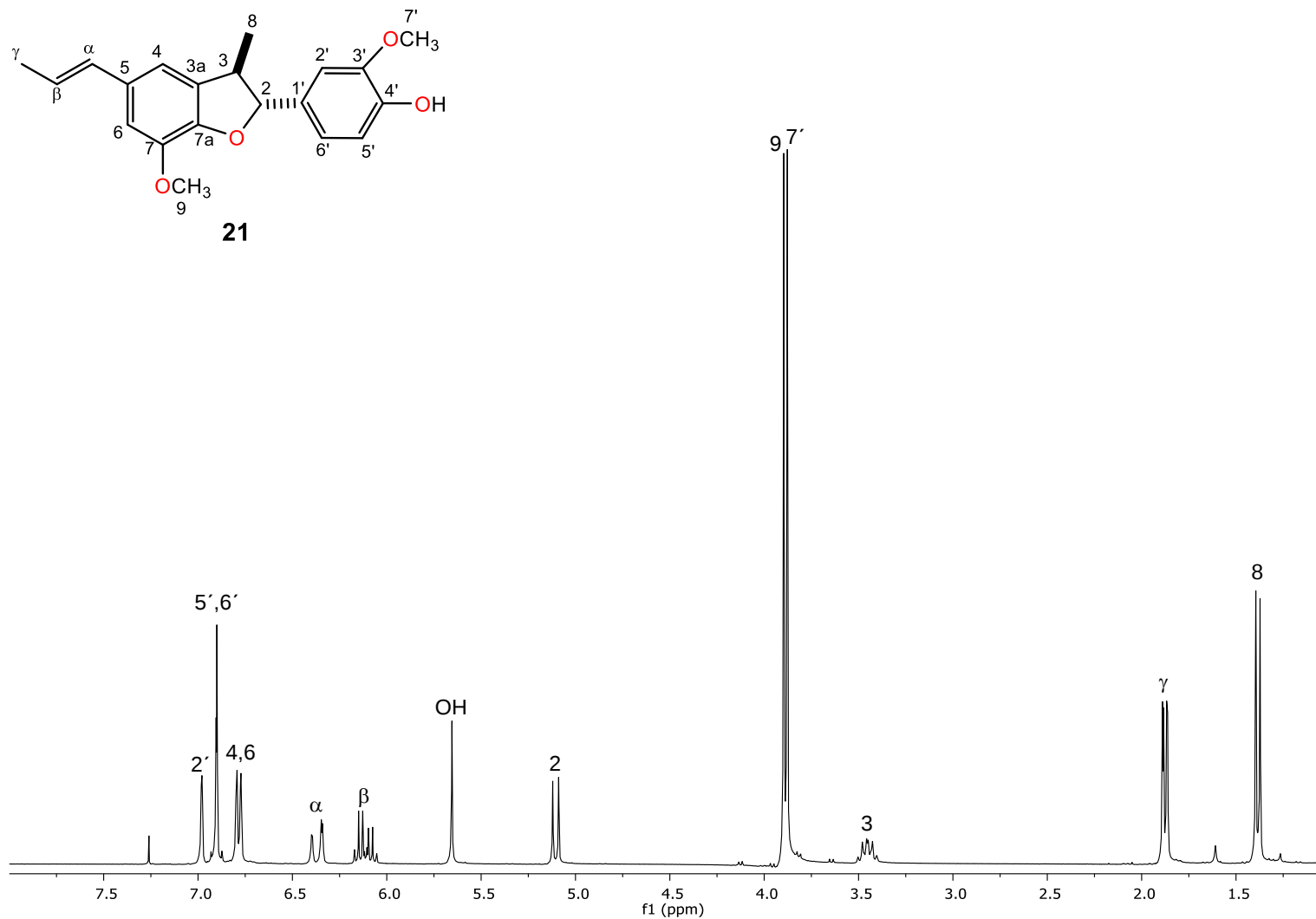


Figura 34. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la licarina-A (**21**).

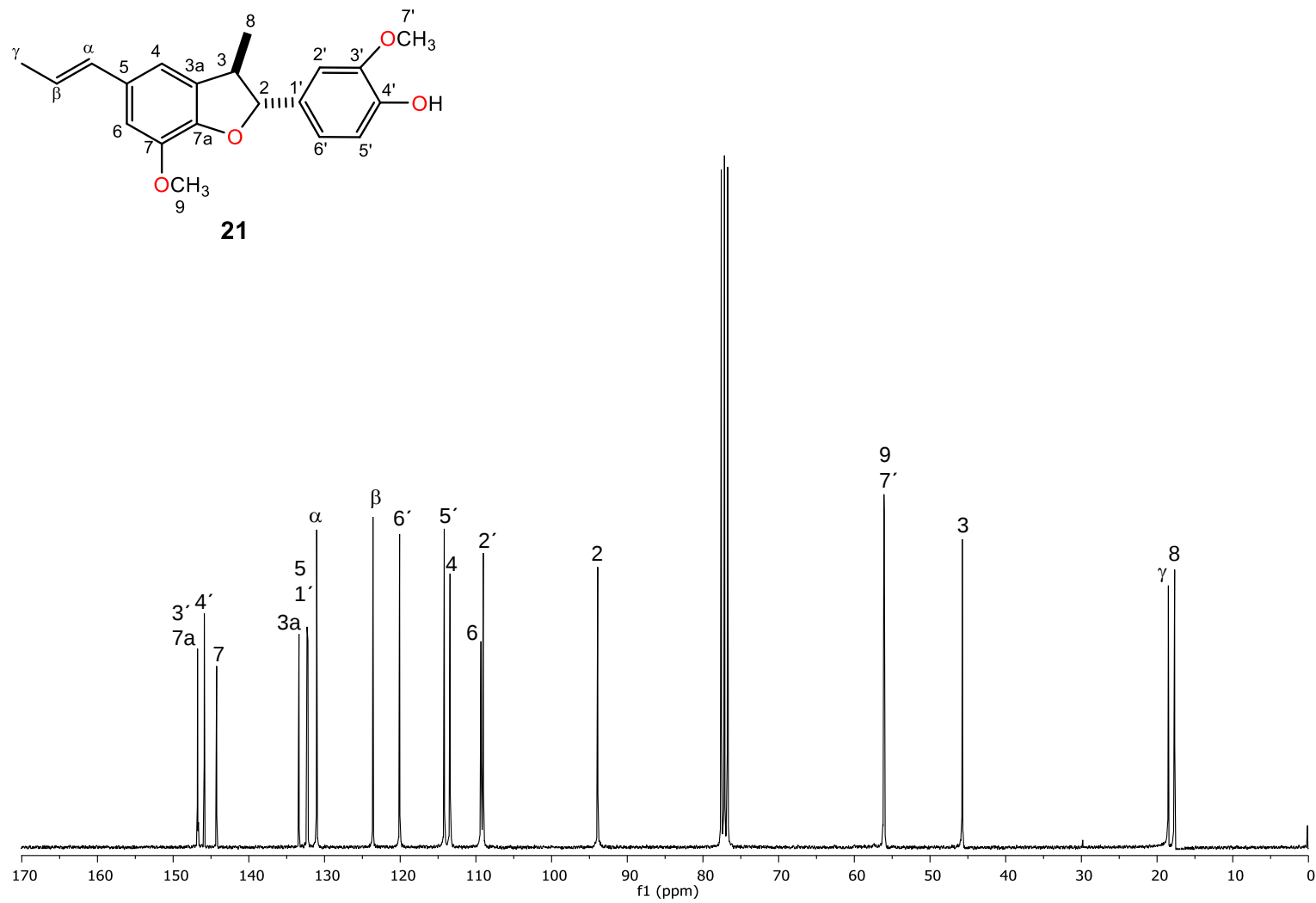


Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de la licarina-A (21).

De la polaridad 97:3 Hex-AcOEt del extracto del EHTG se aisló la licarina-B (**22**) y se obtuvieron 100 mg en forma de sólido amorfo blanco de un lote de 5.0 g. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 36) se identificaron señales de dos conjuntos de anillos aromáticos, se observó una señal doble en 6.95 ppm ($J = 6.9$ Hz) para H-2', en 6.90 ppm una señal doble de dobles ($J = 1.7, 0.5$ Hz) asignada para H-5', en 6.85 ppm una señal doble de dobles asignada para H-6' ($J = 1.7, 0.5$ Hz), en 6.80 ppm una señal múltiple para H-6 y H-4. En 6.35 ppm se localizó una señal doble de dobles ($J = 15.7$ Hz) para H- α , en 6.10 ppm una señal múltiple para el H- β , en 5.95 ppm se asignó una señal simple para los H-7' del metileno del anillo de dioxolano. También se identificó en 5.09 ppm una señal doble ($J = 9.0$ Hz) para el H-2, en 3.89 ppm se apreció una simple intensa que integra para 3H identificada para H-9 del metoxilo, en 3.45 ppm se asignó una señal doble de cuádruples ($J = 13.6, 6.9$ Hz) correspondiente para el H-3. Se identificó una señal doble de dobles ($J = 6.6, 1.6$ Hz) en 1.86 ppm para H- γ del grupo metilo y una señal doble ($J = 6.8$ Hz) en 1.38 ppm del metilo H-8. El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 37), se apreciaron 20 señales: 3 para carbonos de metilo, 1 para metileno, 9 para metinos (C-2, C-3, C-4, C-6, C-2', C-5', C-6', C- α , C- β) y la presencia de 7 señales en la región de 132 a 147 ppm para 7 carbonos cuaternarios presentes en la molécula (C-3a, C-5, C-7, C-7a, C-1', C-3', C-4'). Las señales en 93.4 y 45.8 ppm corresponden a los carbonos 2 y 3 respectivamente.

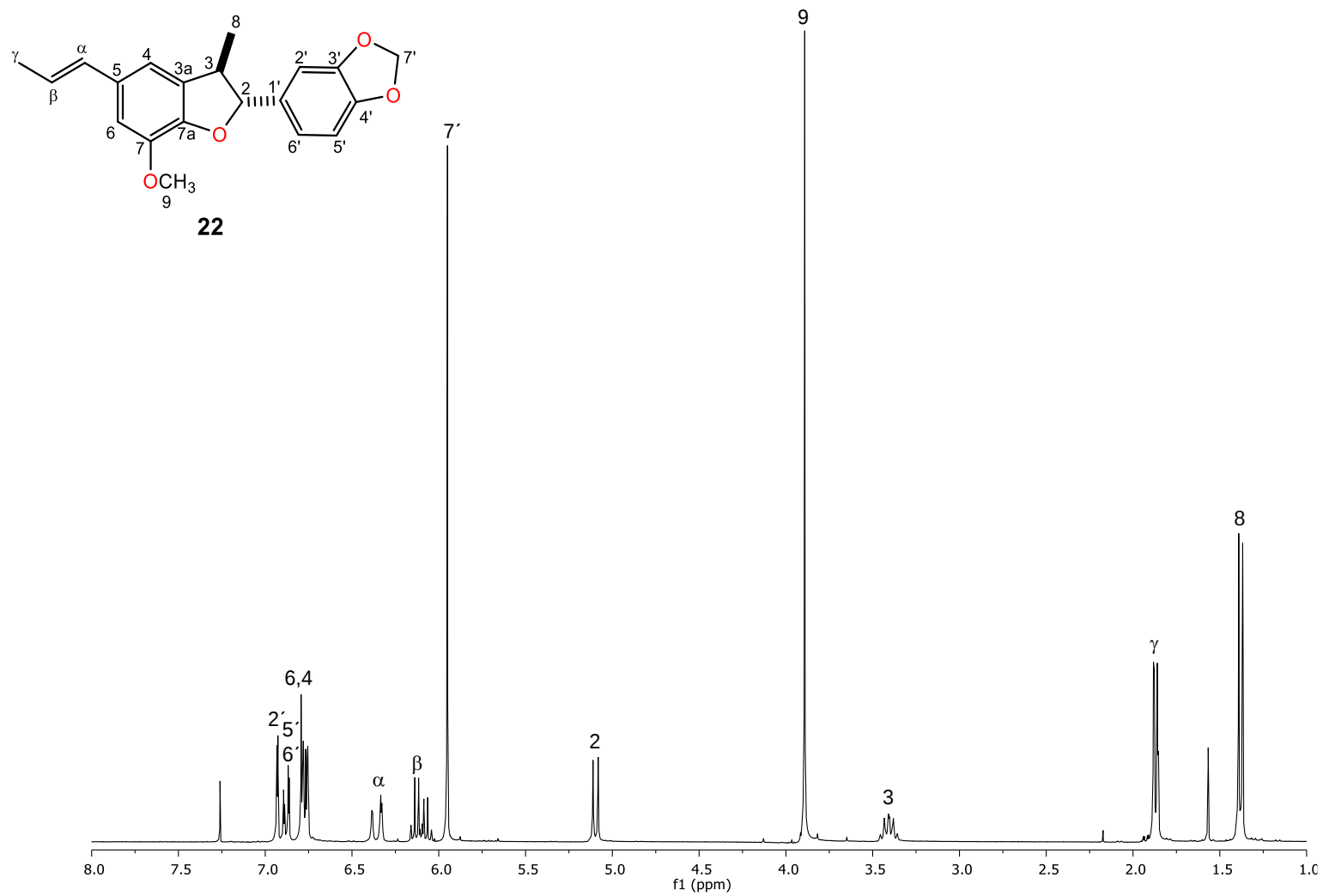


Figura 36. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de la licarina-B (22).

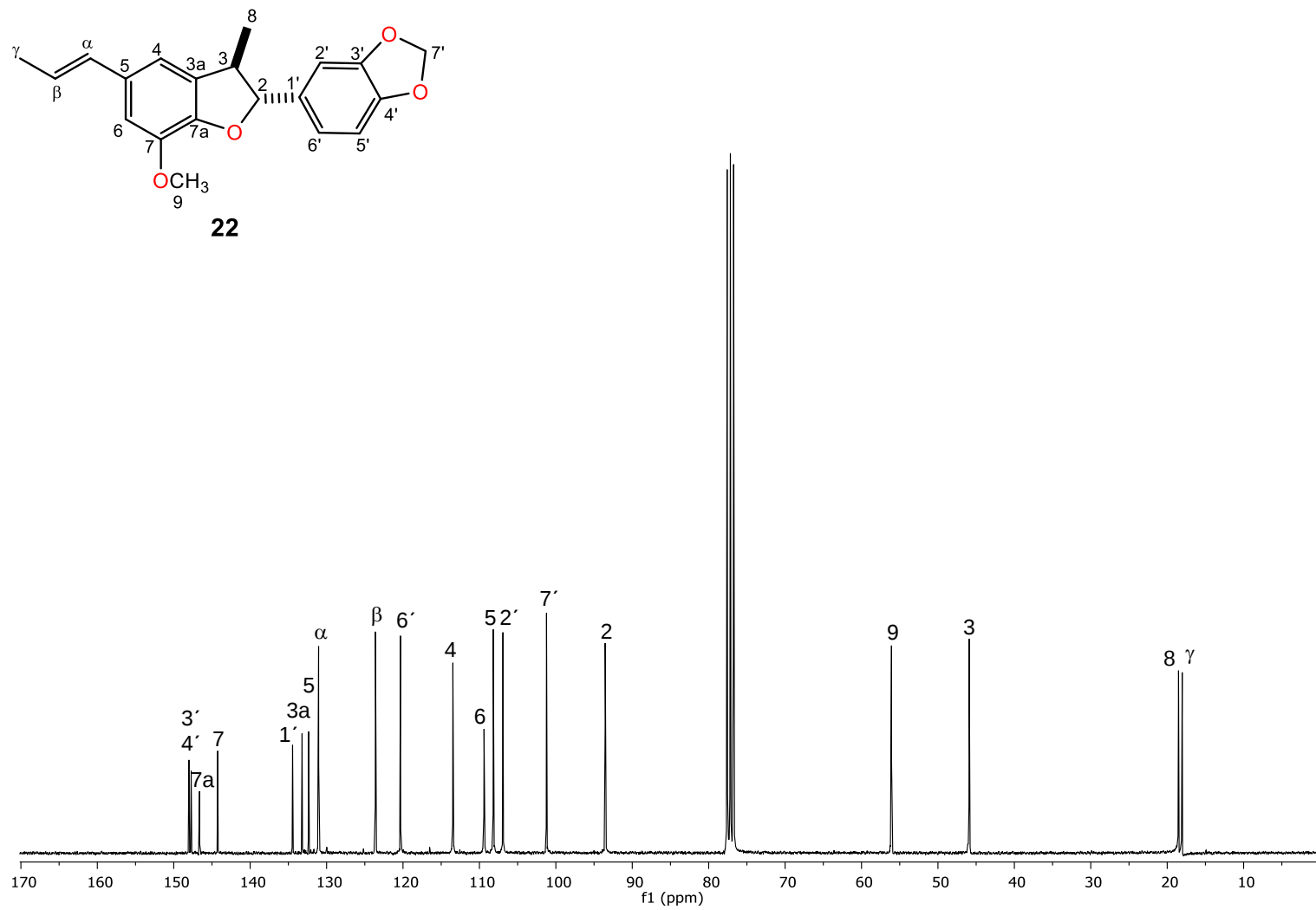


Figura 37. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de la licarina-B (22).

7.3. Derivado de la licarina-A (21)

7.3.1. *p*-Yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (30)

A partir de **21** se preparó su derivado **30** utilizando el ácido *p*-iodobenzoico como reactivo en presencia de HOBt (1-hidroxibenzotriazol), DCC (*N,N'*-diciclohexilcarbodiimida) y DIPEA (*N,N'*-diisopropiletilamina). Se obtuvieron 25 mg del derivado como una miel amarilla y se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 38.

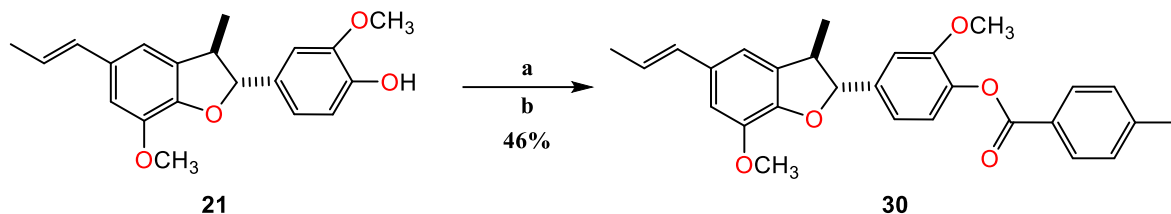


Figura 38. Reactivos y condiciones para **30**. (a) Ácido *p*-yodobenzoico, HOBt, DCC, baño de hielo 1 h. (b) Metabolito **21**, DIPEA, 4 h en agitación, t.a, hexano 1 h, 12 h, 2 °C.

Se apreció una señal doble en 7.91 ppm ($J = 8.6$ Hz) para H-12 y H-12', así como para H-13 y H-13' en 7.86 ppm con una $J = 8.6$ Hz. En 7.13 ppm una señal simple para H-2' así como una señal multiple en aproximadamente 7.11 ppm para H-5' asignada para el sistema aromático, como también en 7.02 para H-6' una señal doble de dobles ($J = 8.1, 1.9$ Hz) y en 6.79 para una señal doble de dobles para H-4 y H-6 con una $J = 8.9$ Hz. También una señal doble en 5.19 ppm correspondiente para H-2 con $J = 9.1$ Hz, Figura 39. En el resto de las señales no se mostraron diferencias notorias frente a **21**. En el espectro de RMN de ^{13}C de **30** (Figura 40) se identificaron 27 señales de las cuales en 165.0 ppm se identificó una señal para el carbonilo de éster (C-10). Entre las regiones de 150.0 y 130.0 ppm se apreciaron señales de los carbonos cuaternarios (C-3', C-3a, C-7a, C-7 y C-14). En la zona correspondiente a los hidrógenos aromáticos se apreció intensidad de las señales debido a la incorporación de la parte aromática del ácido yodobenzoico. En la zona de 56.0 ppm se apreciaron las señales para los carbonos de metoxilo (C-9 y C-7'). Posteriormente en 18.5 y 17.5 ppm las señales para los carbonos (C-γ y C-8).

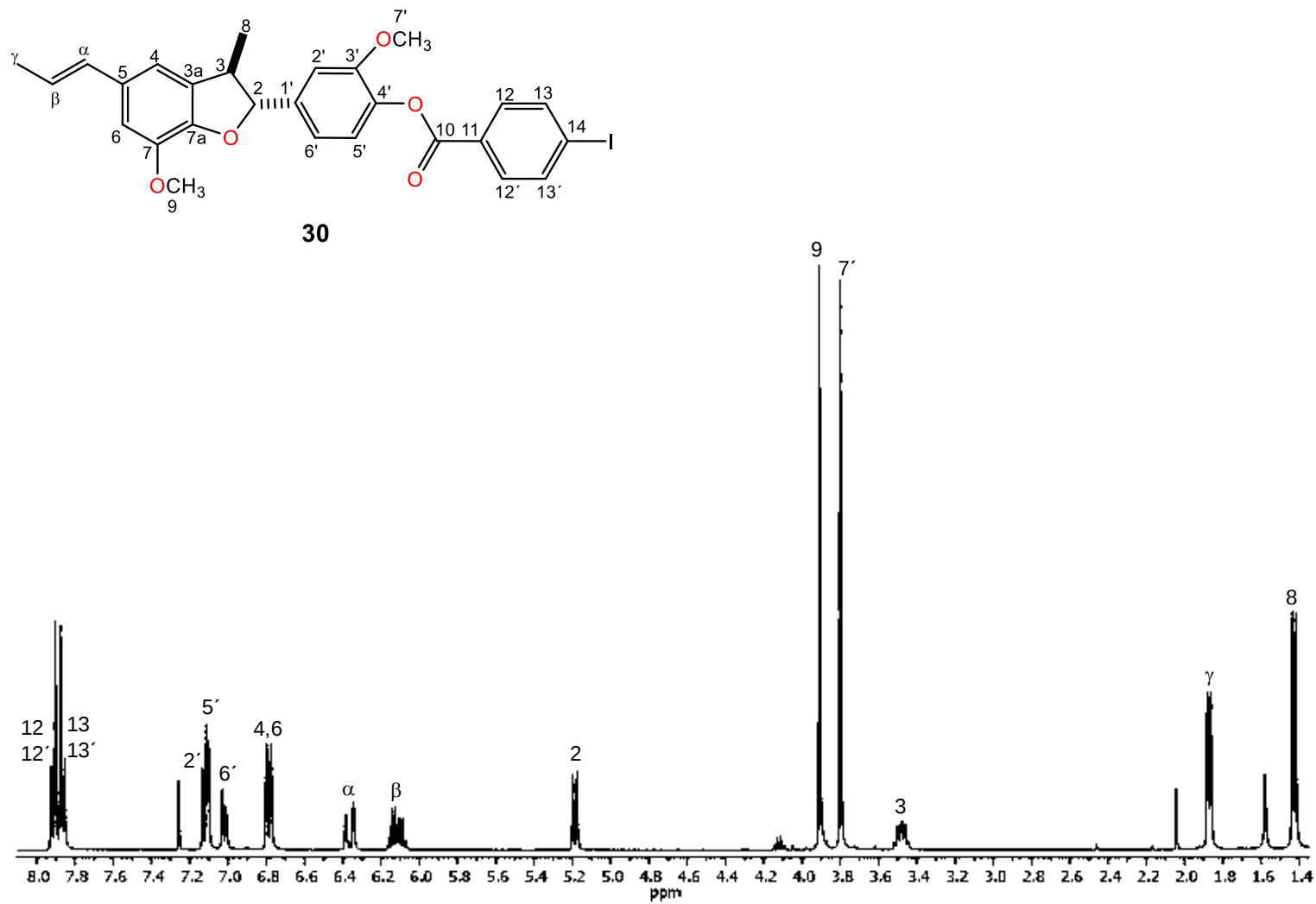


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 100 MHz de *p*-yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**30**).

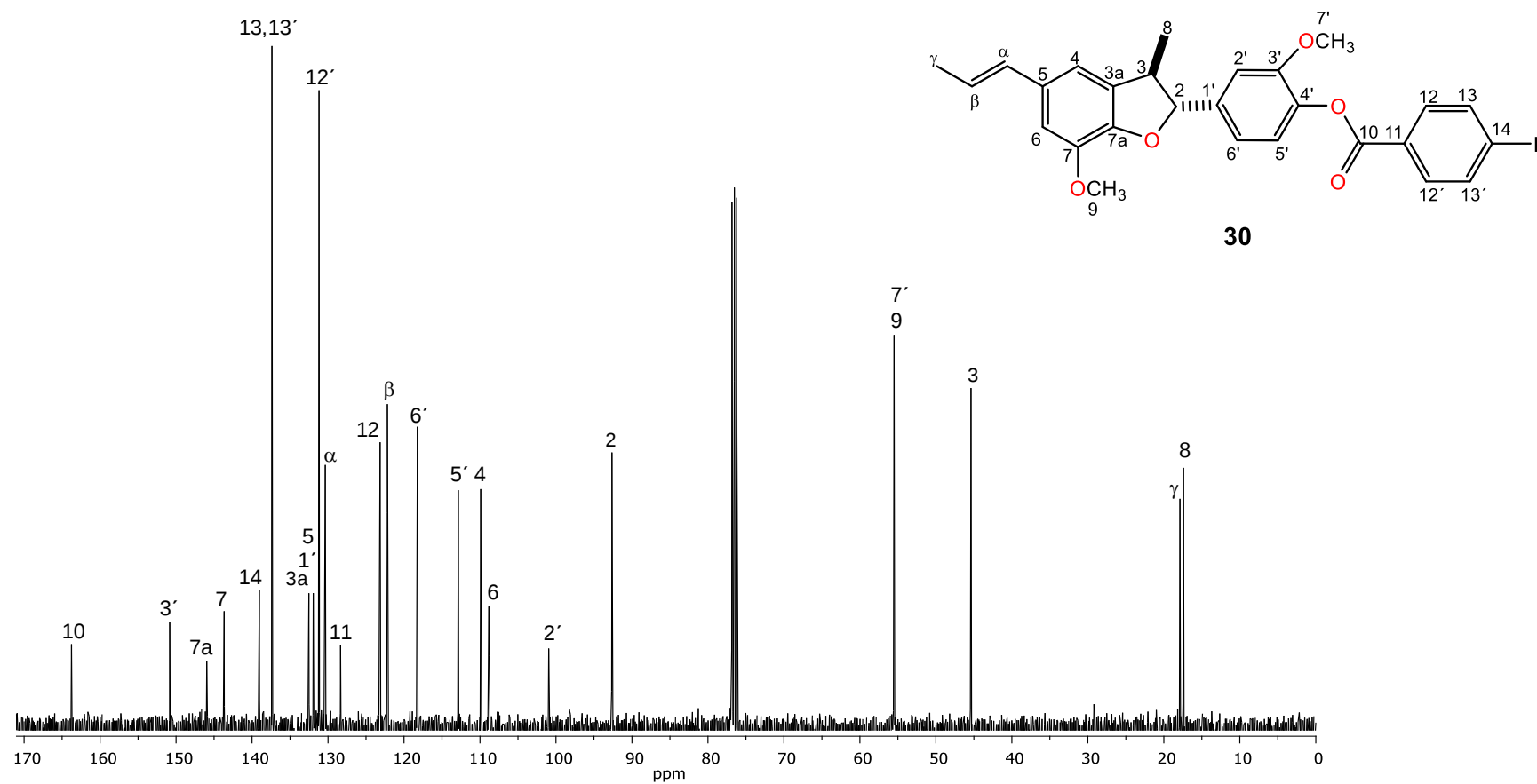


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de *p*-yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**30**).

Los compuestos fueron aislados por columna cromatográfica y cristalizados en los disolventes adecuados. Los derivados esterificados (**30-41**) fueron sintetizados a partir de (**20** y **21**) y sus rendimientos se muestran en la Tabla 11.²⁷

Tabla 11. Rendimientos de los derivados esterificados de **20** y **21**.

Compuestos	Rendimiento (%)	Guillen-Heredia 2020
30	46	—
31	85	75
32	45	56
33	84	86
34	49	42
35	55	65
36	45	60
37	83	55
38	45	64
39	48	46
40	49	55
41	50	52

(—) No procedió la reacción.

Los rendimientos obtenidos en el presente trabajo fueron similares a los obtenidos por Guillen-Heredia (2020) y fue posible obtener el derivado **30** con el empleo de DCC como agente activante. La reacción transcurre por el ataque nucleofílico del ácido carboxílico (en este ejemplo del ácido 4-yodobenzoico) al 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) y formar el acilimidazol después de la eliminación de CO₂. La adición de **20** da como resultado un desplazamiento nucleofílico del imidazol para la formación de **32**.⁷³ Es posible que el derivado **30** no procediera debido a la disminución de la reactividad dada por el intermediario generado por el CDI, como se aprecia en la Figura 41. Por otro lado, con la DCC y el ácido 4-yodobenzoico forman el intermediario *O*-acilisourea, que posteriormente el HOBt participa en el aumento del rendimiento de la reacción y minimiza la racemización dada por la activación de la carbodiimida. El HOBt influye a su vez en la formación de la diciclohexilurea (DCU) y el éster activado que es atacado por **21** para la formación de **30**, como se aprecia en la Figura 42.⁷⁴ Mientras tanto para **30** con el empleo de la DCC la reactividad fue mayor y se obtuvo un rendimiento del 46%.

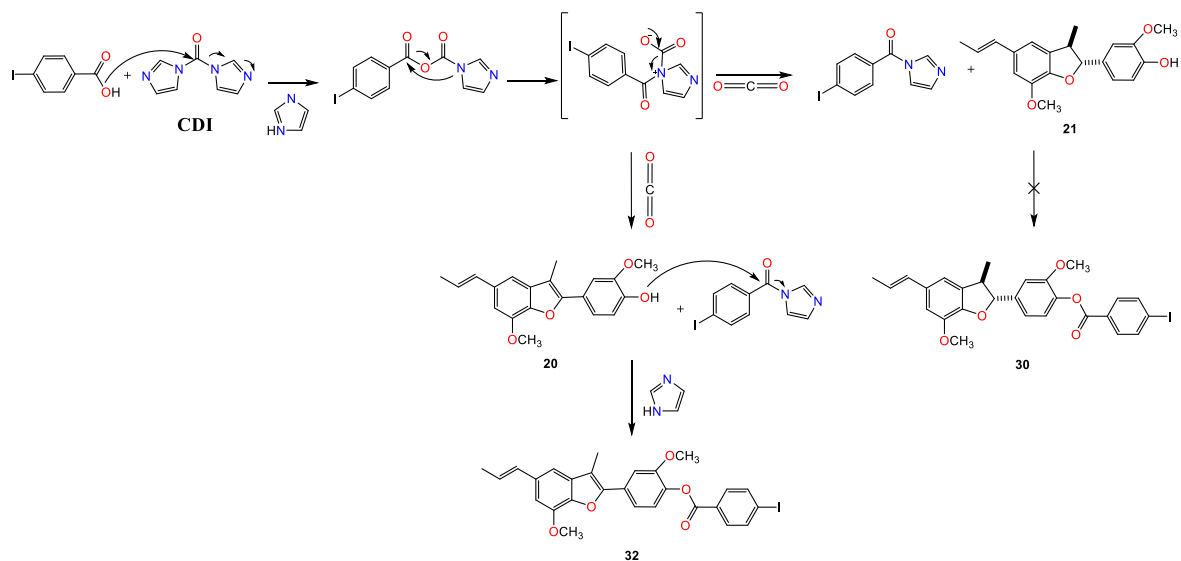


Figura 41. Mecanismo de reacción propuesto para **32** con CDI.

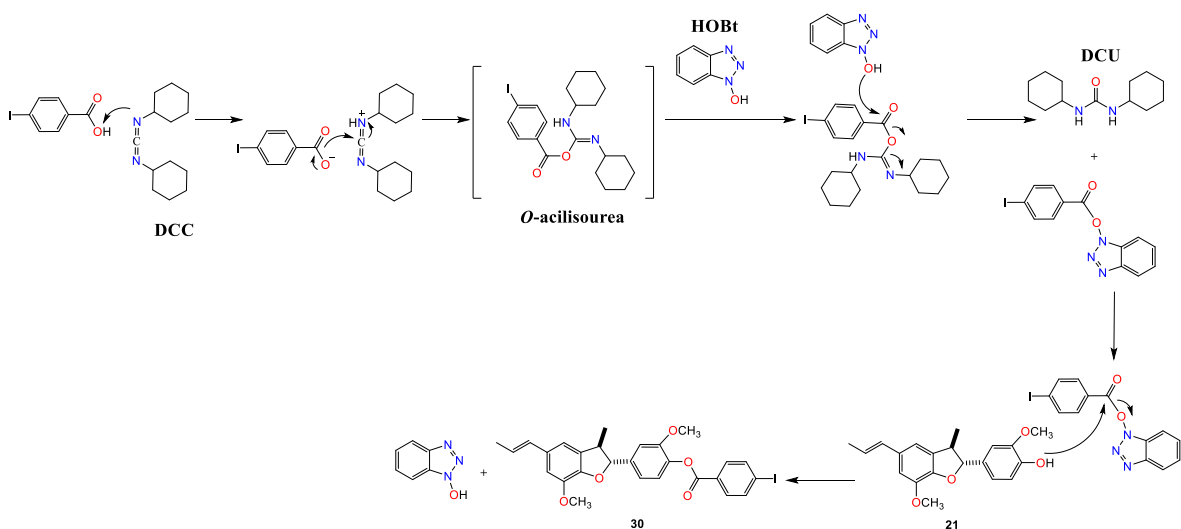


Figura 42. Mecanismo de reacción propuesto para **30** con DCC.

Los neolignanos **21** y **22** (6 mg) fueron sometidos a un ensayo con 30 mg de BINOL (1,1'-bi-2-naftol) con 0.7 mL de CDCl_3 pasados 5 min y analizados por RMN de ^1H para descartar la mezcla racémica del compuesto.⁷⁵ La comparación de los desplazamientos químicos con respecto al compuesto **21** aislado y determinada su estructura tridimensional por medio de difracción de rayos X de la especie *A. mycteria* Pfeifer y el **21** de *A. glossa* Pfeifer, no se apreciaron cambios respecto a los desplazamientos químicos, Figura 43.⁷²

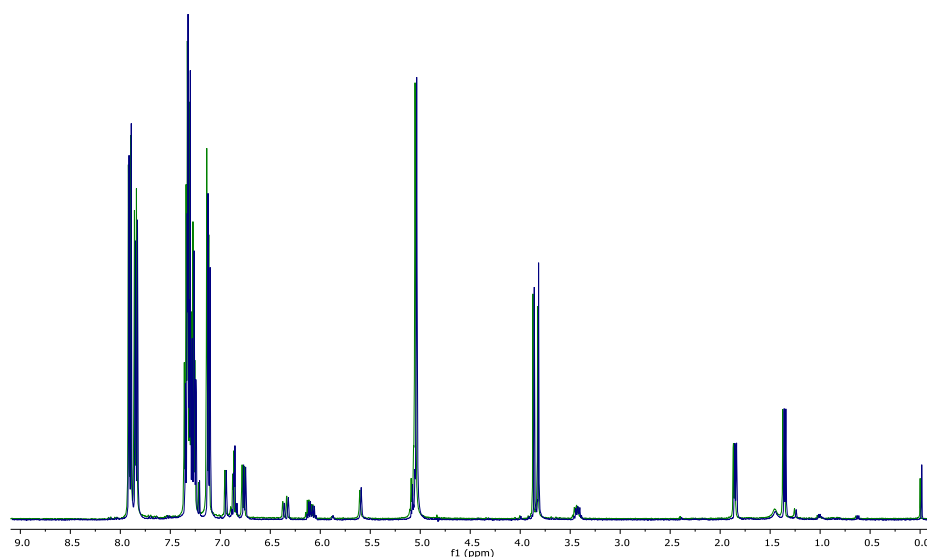


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz con BINOL de **21** de *A. glossa* Pfeifer (—) y **21** de *A. myceteria* Pfeifer (—).

7.4. Estudio biológico de neolignan aislados y sus derivados de *Aristolochia glossa* Pfeifer

7.4.1. Análisis *in silico* de actividad biológica de *Aristolochia glossa* Pfeifer

Los compuestos **19-22**, **30-41** fueron evaluados *in silico* con el empleo de las plataformas, Pass Online, pkCSM, ADMETlab 2.0, AdmetSAR 2.0 y Swiss TargetPrediction, para identificar sus perfiles farmacodinámicos, farmacocinéticos y riesgos toxicológicos. En el perfil farmacodinámico destaca el efecto agonista de apoptosis en donde los valores mayores al 70% fueron los compuestos **19**, **20**, **31** y **36** (Tabla 12).

Tabla 12. Estimación del efecto agonista de apoptosis.

Compuestos	Efecto agonista de apoptosis (%)
19	75.8
20	78.8
21	67.5
22	64.8
30	59.2
31	74.4
32	68.7
33	66.3
34	65.1

35	62.6
36	73.4
37	64.0
38	55.7
39	55.2
40	51.4
41	63.6

Se analizaron *in silico* los compuestos **19-22**, **30-41** de tal forma que se obtuvieron predicciones en las células MCF-7 así como en la línea NCI-H226 de pulmón determinando sus porcentajes de citotoxicidad entre 20.8-63.7%, destacando mayoritariamente la predicción >60% de citotoxicidad de **19**, como se observa en la Tabla 13.

Tabla 13. Predicción de citotoxicidad en el tumor.

Compuestos	MCF-7 (%)	NCI-H226 (%)
PAC	90.9	
19	31.0	63.7
20	38.0	43.8
21	-----	23.7
22	-----	41.6
30	24.5	28.9
31	40.8	39.7
32	48.7	46.3
33	-----	36.9
34	-----	37.9
35	31.4	39.7
36	34.2	37.1
37	-----	-----
38	-----	21.4
39	-----	20.8
40	-----	23.3
41	-----	-----

PAC. Paclitaxel.

La predicción de los sitios diana de los compuestos **19-22**, **30-41** se llevó a cabo en SwissADME de manera que el compuesto **34** con un 53.3% presenta como sitio diana a las cinasas, seguido de **41** con un 46.7% cuyo sitio diana se predice hacia receptores acoplados a proteína G de la familia A y el compuesto **33** con un 40.0% hacia cinasas, Tabla 14.

Tabla 14. Predicción de sitios diana.

Compuestos	Sitio	(%)
PAC	Cinasa	26.7
	Receptores acoplados a proteína G de la familia A	26.7
19	Receptores acoplados a proteína G de la familia A	33.3
20	Cinasa	26.7
21	Cinasa	33.3
	Receptores acoplados a proteína G de la familia A	
22	Cinasa	20.0
	Receptor nuclear	
30	Receptores acoplados a proteína G de la familia A	33.3
31	Cinasa	33.3
	Canales iónicos controlados por ligando	
32	Cinasa	26.7
33	Cinasa	40.0
34	Cinasa	53.3
	Transportador electroquímico	
35	Cinasa	20.0
	Canales iónicos controlados por ligando	
	Transportador electroquímico	
36	Cinasa	20.0
	Canales iónicos controlados por ligando	
37	Receptores acoplados a proteína G de la familia A	26.7
38	Receptores acoplados a proteína G de la familia A	33.3
39	Cinasa	26.7
	Canales iónicos controlados por ligando	
40	Receptores acoplados a proteína G de la familia A	33.3
41	Receptores acoplados a proteína G de la familia A	46.7

PAC. Paclitaxel.

7.4.2. Análisis de consenso farmacológico de compuestos y derivados de *Aristolochia glossa* Pfeifer

Los compuestos **19-22**, **30-41** fueron evaluados *in silico* para identificar sus potenciales farmacodinámicos, farmacocinéticos y riesgos toxicológicos mostrados en la Tabla 15. Los compuestos mostraron valores superiores al 70% respecto al perfil farmacodinámico en los efectos biológicos de agonismo de apoptosis (**19**, **20**, **31-32** y **36**) y antineoplásicos (**21-22**,

31, 37 y 41). Por otro lado, como antagonista de la tubulina el compuesto más satisfactorio fue **22**. En el perfil farmacocinético los compuestos analizados fueron ligera a moderadamente solubles en agua, por otro lado, en el compuesto **19** fue menor a la permeabilidad de los demás compuestos frente a células CaCo2. Los derivados **19, 20, 31-32 y 34** presentaron la mejor biodisponibilidad de manera oral. La predicción mostró que los compuestos **20, 21, 31 y 37** permiten la inhibición de la mayoría de las isoformas del citocromo P450 por lo que pudiese afectar en el metabolismo de dichos compuestos. En el perfil toxicológico, el ensayo de AMES para conocer si un compuesto puede inducir mutagenicidad **40 y 41** fueron positivos para el ensayo. En el aspecto de carcinogenicidad el compuesto **19** presentó una alerta en este aspecto. Respecto a la genotoxicidad, **34** fue el que tuvo este modelo elevado en mayor medida frente que **33, 35, 36, 38 y 40-41**, con valores moderados. En la inhibición de hERG I y II los compuestos **19, 20, 30-36, 38-41**, revelaron una inhibición moderada del 50% que esto pudiera desarrollar algún padecimiento encaminado a arritmias, mientras tanto los demás compuestos no tuvieron algún efecto inhibitorio frente hERG. El análisis de la toxicidad hepática mostró que en ninguno de los compuestos presentaba este tipo de efecto. El paclitaxel se empleó como control para comparación de los compuestos y derivados neolignánicos.

Tabla 15. Análisis de consenso farmacológico de compuestos y derivados de *Aristolochia glossa* Pfeifer.

Predicción de valores de los compuestos																		
Nombre del modelo	PAC	19	20	21	22	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	Unidad
Agonista de apoptosis	---	75.8	78.8	67.5	64.8	59.2	74.4	68.7	66.3	65.1	62.6	73.4	64.0	55.7	55.2	51.4	63.6	%
Antineoplásico	99.0	69.5	69.8	71.1	71.0	64.9	73.5	62.7	61.3	45.3	61.3	69.9	74.3	65.9	49.8	63.6	71.2	%
Antagonista de tubulina	92.0	50.2	38.7	62.6	71.9	47.1	34.1	24.9	22.8	16.3	22.8	28.0	58.1	45.3	32.9	43.2	52.5	%
Solubilidad en agua	-4.3	-5.2	-4.9	-4.9	-5.5	-6.4	-5.8	-6.2	-6.1	-5.6	-6.8	-6.6	-5.7	-6.0	-6.2	-6.7	-6.5	log mol/L
Biodisponibilidad oral humana	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	logK (%F)
Permeabilidad en Caco2	0.5	0.8	1.3	1.3	1.0	1.0	1.0	1.0	1.08	1.1	1.0	1.0	1.3	1.1	1.2	1.0	1.08	log Papp (10 ⁻⁶ cm/s)
Inhibidor del CYP 450 (2C9, 2D6, 3A4)	No	No	Si	Si	No	Si	Si	Si	No	No	No	No	Si	No	No	No	No	(Si/No)
AMES	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	(Si/No)
Carcinogenicidad	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Categorico
Genotoxicidad	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	1	0	1	0	1	1	Alertas
hERG	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	(Si/No)
Hepatotoxicidad	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	(Si/No)

Color verde muestra resultados muy satisfactorios, amarillo satisfactorios y rojo poco satisfactorios. PAC. Paclitaxel.

7.5. Estudio biológico de neolignanos aislados y sus derivados de *Aristolochia glossa* Pfeifer

Los valores de IC₅₀ de los neolignanos **19-22** y los derivados **30-41** fueron determinados por el ensayo de MTT durante 24 h en células de cultivo primario CEMB y líneas cancerosas HeLa, MCF-7, A549 y K562.

En el análisis de consenso farmacológico se estimó que los compuestos **20**, **21**, **31**, **37** y **39** pudieran tener un buen desempeño al realizarse en ensayos de citotoxicidad *in vitro*. Al realizar los ensayos de citotoxicidad se obtuvieron valores de IC₅₀ de los compuestos **19-22**, **31** y **37** menores a 50 µM en tres de las cuatro líneas celulares cancerosas y fueron necesarias concentraciones mayores para las células normales. De acuerdo al estudio *in vitro* el compuesto **21** fue el que mejores resultados mostró, debido a que su IC₅₀ fue ≤25 µM en las líneas cancerosas como se expresa por Cos y colaboradores en el 2006 y en células normales se apreció un daño menor.⁷⁶ Respecto a **21** se han reportado valores de IC₅₀ = 26.14 µM en células HeLa, MCF-7 IC₅₀ = 22.2 µM y A549 IC₅₀ = 22.19 µM.⁷⁷⁻⁷⁹ Los neolignanos y sus derivados fueron comparados con el paclitaxel como control, Tabla 16.

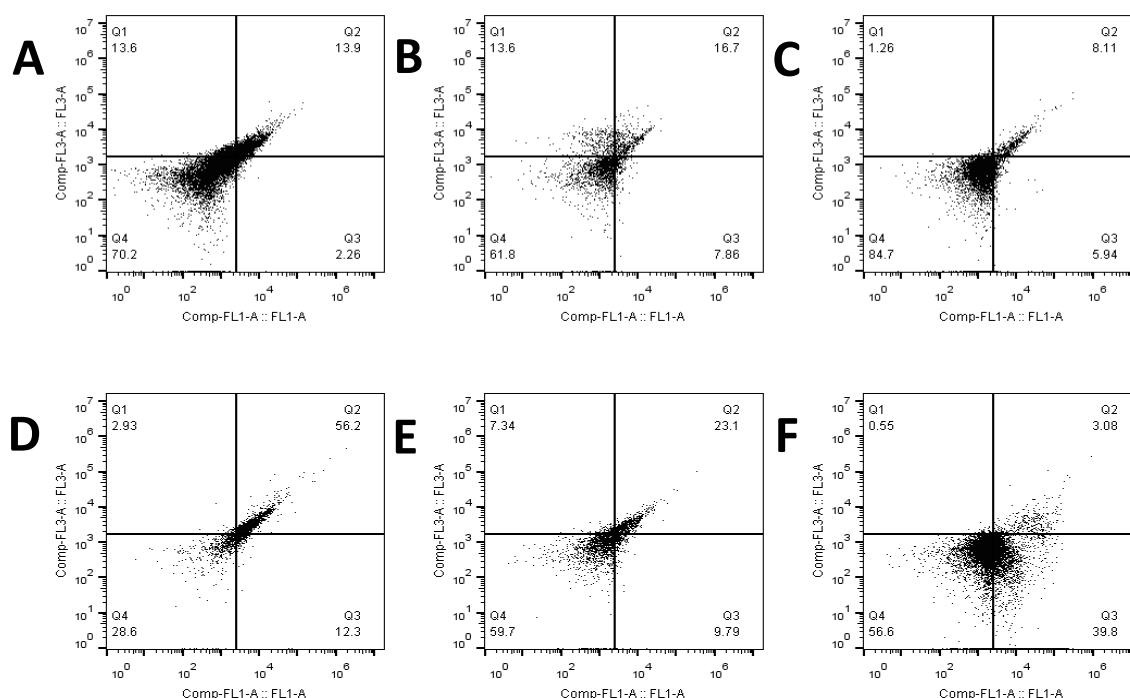
Tabla 16. Valores de IC₅₀ de neolignanos y sus derivados.

Compuestos	µM				
	CEMB	HeLa	MCF-7	A549	K562
PAC	-----	2.6 nM	2.5 nM	4.1 nM	1.26
19	176.3±1.3	>50	40.7±4.0	30.2±2.2	40.4±2.0
20	303.4±1.1	>50	29.7±2.5	28.7±2.1	22.1±2.3
21	362.5±3.1	22.6±2.1	23.0±3.1	19.2±2.1	25.0±1.3
22	211.6±2.2	>50	32.8±3.1	21.3±3.1	32.3±2.1
30	91.9±1.0	>50	>50	>50	>50
31	166.9±2.0	>50	35.5±2.9	48.9±4.7	21.4±3.1
32	134.1±2.3	>50	35.8±3.6	>50	36.5±1.4
33	90.2±3.1	>50	>50	>50	34.1±1.9
34	142.4±4.3	>50	>50	>50	40.4±1.4
35	139.4±2.5	>50	>50	>50	21.5±1.7
36	139.0±2.4	>50	32.5±3.3	>50	26.5±2.4
37	229.2±3.1	>50	40.3±4.1	41.0±1.4	22.3±3.1
38	125.4±3.5	>50	>50	>50	>50
39	135.5±3.4	>50	36.0±3.4	>50	>50
40	111.0±3.6	>50	28.2±2.4	>50	>50
41	169.6±3.4	>50	>50	>50	24.3±2.4

PAC: Paclitaxel.

La actividad citotóxica de los derivados **30-41** pudo estar disminuida en ésteres impedidos actuando como profarmacos, por otro lado, los ésteres poco impedidos pueden tener un mejor efecto biológico.⁸⁰ El compuesto **34** respecto a su constitución de tres anillos planos pudiera afectar su interacción con el ADN y evitar su acción citotóxica.⁸¹ Los derivados **30** y **32** estarían relacionados con el metabolismo del citocromo p450 debido a la presencia de yodo provocando la formación de cationes que podrían generar a su vez nefrotoxicidad y hepatotoxicidad.^{82,83} Los datos obtenidos *in silico* al estar validados *in vitro* suelen tener correlación, sin embargo, es necesario seguir refinando las predicciones y evaluar un mayor número de líneas celulares.

Los compuestos **21**, **31**, **35**, **37** y **41** fueron analizados por citometría de flujo mediante el ensayo de anexina V/7AAD que posteriormente fueron compensados para determinar el modo de muerte celular, en la línea celular K562 se obtuvo un 56.2% de apoptosis tardía en **21**, en **31** un 23.1%, en el derivado **35** con un 39.8% en apoptosis temprana, en **37** se obtuvo un 43.6% en apoptosis tardía y en **41** un 14.9% de efecto apoptótico, Figura 44.



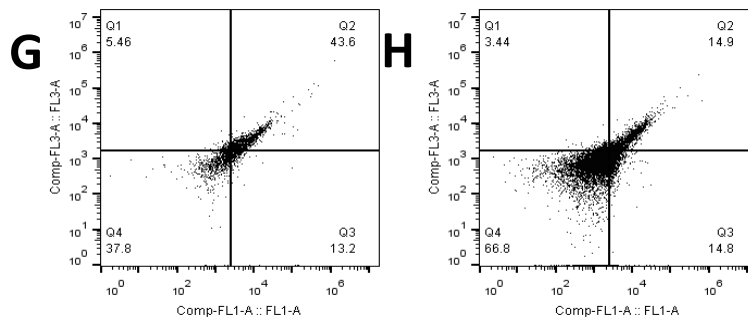
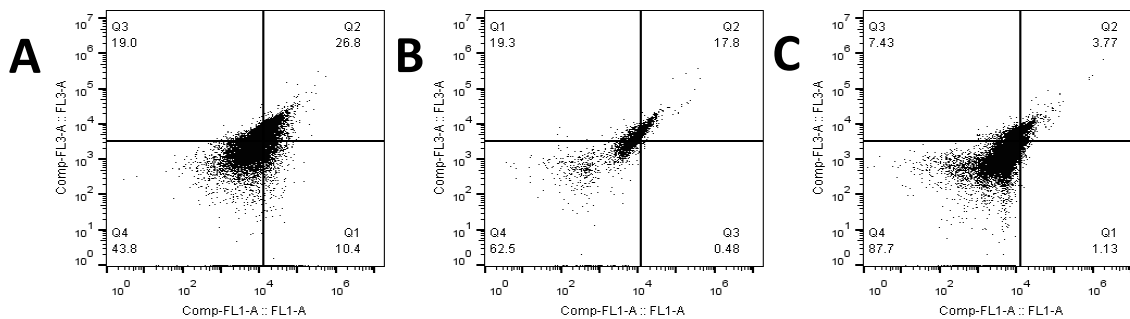


Figura 44. Citometría de flujo de apoptosis y necrosis en K562. (A) Actinomicina D (10 μ M). (B) EDTA (250 mM). (C) Vehículo (EtOH). (D) IC₅₀ del 25.0 μ M de **21**. (E) IC₅₀ del 22.3 μ M de **31**. (F) IC₅₀ del 21.5 μ M de **35**. (G) IC₅₀ del 22.3 μ M de **37**. (H) IC₅₀ del 24.3 μ M de **41**. Ensayo a 24 h.

En la línea celular MCF-7 se obtuvo un 74.1% de apoptosis tardía para **21**, con **31** un 20.7%, con el derivado **35** un 19.4% en apoptosis temprana, para **37** se obtuvo un 59.6% en apoptosis tardía y con **41** un 23.4% en apoptosis temprana, Figura 45.



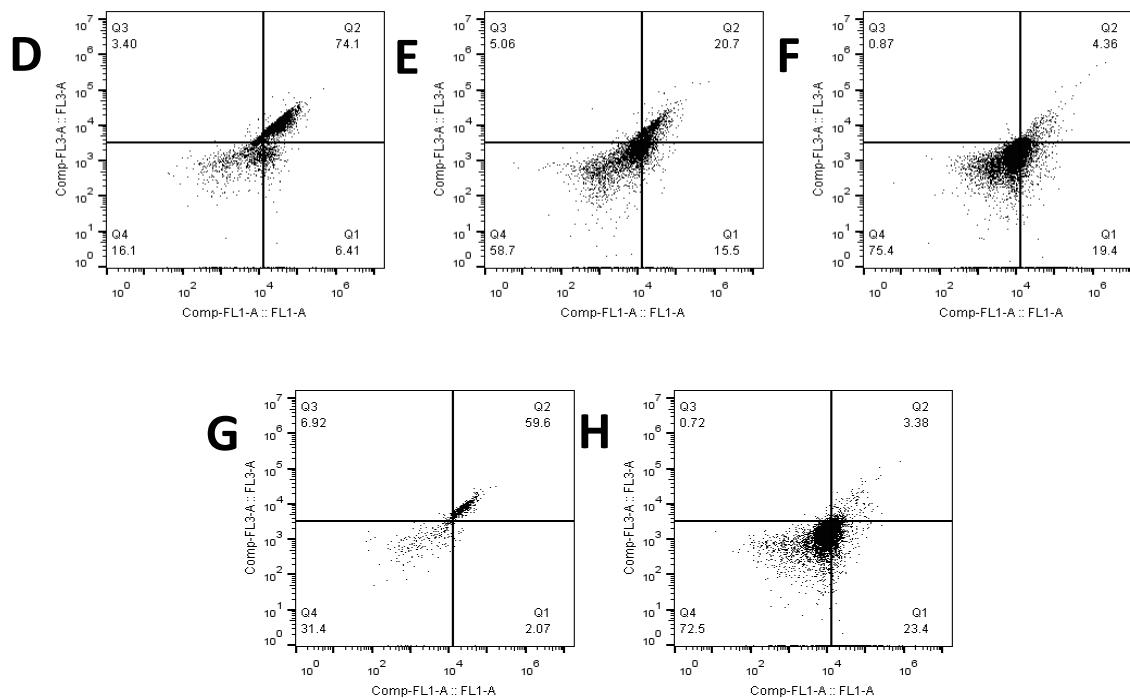


Figura 45. Citometría de flujo de apoptosis y necrosis en MCF-7. (A) Actinomicina D (10 μ M). (B) EDTA (250 mM). (C) Vehículo (EtOH). (D) IC₅₀ del 23.0 μ M de **21**. (E) IC₅₀ del 40.31 μ M de **31**. (F) IC₅₀ del 89.6 μ M de **35**. (G) IC₅₀ del 40.3 μ M de **37**. (H) IC₅₀ del 73.2 μ M de **41**. Ensayo a 24 h.

En células HL-60 de leucemia se determinó que la licarina-A induce el modo de muerte por apoptosis por medio de la vía de la caspasa 3.⁸⁴ En células CCRF-CEM de leucemia se apreció que la licarina-A induce apoptosis temprana por la activación de caspasas con un 48.9% a las 24 horas de tratamiento con una IC₅₀ = 4.3 μ M.⁸⁵

Por otro lado, en células de cáncer de pulmón como A549 se ha determinado que la licarina-A puede inducir la muerte celular por medio de inducción de autofagia por medio del incremento de especies reactivas de oxígeno por el arresto de la fase G1 del ciclo celular.⁷⁹ Nuestros resultados mostraron un modo de muerte por apoptosis en etapa temprana y tardía, datos similares a los reportados por la literatura.

8. Conclusiones

Mediante este proyecto de tesis se elucidaron y caracterizaron los principales compuestos: hexadecanoato de metilo, ácido hexadecanoico, dodecanoato de 2-butoxietilo, hexadecanoato de etilo, octadeca-9,12,15-trienoato de metilo y el ácido (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoico, así como a los compuestos aislados β -sitosterol y estigmasterol en EDT y EDH de *A. foetida* Kunth. EDT (IC_{50} de 45.9 $\mu\text{g/mL}$) y EDH (IC_{50} de 47.3 $\mu\text{g/mL}$) de *A. foetida* Kunth son citotóxicos contra MCF-7 produciendo apoptosis tardía por medio de la vía intrínseca. Se requirieron concentraciones mayores para mostrar un efecto citotóxico en el cultivo primario de células normales (CEMB).

La síntesis de **30** con el empleo de la DCC mostró un rendimiento de un 46%. Por otro lado, en los ensayos de citotoxicidad se obtuvieron valores de IC_{50} menores a 50 μM de los compuestos **19-22**, **31** y **37** en las líneas celulares MCF-7, A549 y K562. En las células HeLa únicamente **21** su IC_{50} fue menor a 50 μM . Con **19-22**, **31** y **37** fueron necesarias concentraciones elevadas para dañar las células CEMB. Los compuestos **20**, **21**, **31** y **37** presentaron una correlación positiva con la predicción realizada mediante el análisis de consenso farmacológico y los análisis *in vitro* de viabilidad celular. De **21**, **31**, **35**, **37** y **41** se determinó que el modo de muerte celular en mayor porcentaje es vía apoptosis tardía.

En *A. foetida* Kunth y *A. glossa* Pfeifer no se logró la identificación de ácidos aristolóquicos o sus derivados. Los extractos, compuestos y derivados requieren más estudios para corroborar el uso terapéutico de los mismos.

9. Parte experimental

9.1. Procedimientos generales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher Johns los valores no están corregidos. Los espectros de resonancia magnética nuclear a 400 MHz para ^1H y ^{13}C a 100 MHz en un equipo Varian Mercury Plus 400 del IIQB-UMSNH. En los extractos se empleó DMSO- d_6 y en los compuestos cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente, fueron referenciados con TMS y reportados en ppm, las constantes de acoplamiento (J) en Hz. Las purificaciones cromatográficas se realizaron con el empleo de gel de sílice MERCK 60 (230-400 mesh) y las reacciones fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa fina (TLC). Los espectros de masas por cromatografía de gases se determinaron en un Thermo Scientific Trace-1310 con un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple, equipado con una columna capilar de sílice TG-SQC (15 X 0.25 mm, con un espesor de 0.25 μm).

Las células MCF-7, HeLa, A549, K562 y MCF-12 se contaron en el contador automático Bio-Rad TC20TM, así como las CEMB en cámara de Neubauer. Las absorbancias para el ensayo de viabilidad celular MTT se determinaron con un espectrofotómetro Bio-Rad iMarkTM a una longitud de onda de 595 nm, los datos fueron procesados con el programa MPM 6, el IC_{50} de los compuestos activos se determinó con el programa de análisis de datos GraphPad Prism 8 para Windows. Los análisis de citometría de flujo se realizaron mediante un citómetro BD AccuriTM C6, los datos fueron procesados con el BD Accuri C6 Software.

9.2. Procesamiento de la planta

Las especies *Aristolochia foetida* Kunth fueron colectadas en el municipio de Apatzingán y la especie *Aristolochia glossa* Pfeifer localidad de Santa Casilda en el municipio de Gabriel Zamora en el estado de Michoacán. Las muestras fueron separadas en tallos y hojas.

9.3. Obtención de extractos

Las distintas partes de la planta fueron separadas manualmente, los tallos se cortaron en pequeños trozos y separados de las hojas. Cada una de las partes de la planta se sometió a maceración con el empleo de los disolventes hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol en un periodo de tres días repitiendo el procedimiento por triplicado con cada disolvente, se filtraron y se llevaron a sequedad bajo presión reducida en rotavapor. Los

extractos de hexano y diclorometano fueron disueltos en metanol y se dejaron a 4 °C para la precipitación de las grasas, el procedimiento se realizó de tres a cuatro veces, dependiendo de la cantidad de grasa que presentó cada muestra. Una vez obtenidos los extractos desengrasados se determinaron los rendimientos.

9.4. Condiciones cromatográficas

Los extractos de cada disolvente se purificaron por cromatografía en columna abierta con fase estacionaria de sílice gel 60, de 230-400 mallas y con fase móvil una mezcla de disolventes hexano-acetato de etilo (Hex-AcOEt) y acetato de etilo-metanol (AcOEt-MeOH) en orden ascendente de polaridad, estas fracciones fueron sometidas a recromatografía.

Para las recromatografías se utilizó la misma fase estacionaria anteriormente descrita y como fase móvil mezclas de Hex-AcOEt en orden ascendente de polaridad.

Las fracciones eluídas fueron analizadas por cromatografía en placa fina, observadas bajo luz UV y reveladas con sulfato cérico amoniacal.

9.5. Identificación de compuestos

Los extractos crudos, los desgrasados y las fracciones obtenidas fueron analizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de ^1H a 400 MHz, utilizando como disolventes DMOS- d_6 y CDCl_3 , con el empleo de un espectrómetro Varian Mercury Plus 400. Se empleó la cromatografía de gases Thermo Scientific Trace-1310 con un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple, equipado con una columna capilar de sílice TG-SQC (15×0.25 mm, con un espesor de $0.25 \mu\text{m}$). La identificación de los compuestos se basó en la comparación de su espectro de masas con la librería NIST.

9.6. Ensayos de citotoxicidad

A los extractos crudos y derivados debidamente caracterizados se les determinó su efecto citotóxico sobre células de cáncer de mama MCF-7 y la selectividad frente a células normales MCF-12 y CEMB en *A. foetida* Kunth. En *A. glossa* Pfeifer se determinó la citotoxicidad de los neolignanos y sus derivados en MCF-7, HeLa, A549, K562 y la selectividad en CEMB.

9.7. Preparación de medios de cultivo para la línea celular MCF-7, HeLa, A549, K562, MCF-12 y CEMB

Medio completo (MC)

10 g de medio F12-Ham (Medio de Eagle modificado por Dulbecco)

5% de suero fetal bovino (10% para MCF-12)

5% de suero de ternera

1% de antibiótico de penicilina-estreptomicina

250 µg/mL de Anfotericina B

1.5 g de Bicarbonato de sodio

Medio completo para K562

La línea celular de leucemia mieloide crónica K562 se obtuvo de la Colección American Type Culture, fueron cultivadas con medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Mayimex) y 100 U/mL penicilina-estreptomicina (Gibco).⁸⁶

Medio incompleto (MI)

10 g de medio F12-Ham (Medio de Eagle modificado por Dulbecco)

5% de suero fetal bovino

5% de suero de ternera

1.5 g de Bicarbonato de sodio

9.8. Cultivo celular MCF-7, HeLa, A549, K562 y MCF-12

Para el mantenimiento de las líneas celulares MCF-7, HeLa, A549, MCF-12 y CEMB, las células fueron sembradas en cajas de cultivo de 70 mm de diámetro en medio completo. Se incubaron en una atmosfera estéril a 37 °C y 5% de CO₂. Cuando el cultivo se encontró en una confluencia del 80-100% las células fueron tripsinizadas (con excepción de las células K562) centrifugadas por 2500 rpm x 10 min y contadas usando un hematocitómetro en un microscopio invertido (Primo Vert, Zeiss).

Dependiendo del destino de las células, se pasaron a cajas de cultivo de 70 mm de diámetro para su proliferación, o se sembraron en placas de 96 pozos para los ensayos de citotoxicidad. La criopreservación de las células se realizó en nitrógeno líquido, con dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% (v/v) y suero fetal bovino (10⁶ células/mL; 1 mL/vial).

9.9. Cultivo primario de células de epitelio mamario bovino (CEMB)

Las células de epitelio mamario bovino (CEMB) fueron aisladas de tejido alveolar de ubre de una vaca sana lactante. Las CEMB se cultivaron en medio de crecimiento compuesto de medio DMEM/mezcla de nutrientes F-12 Ham (Sigma), suplementado con suero fetal bovino (10%, Mayimex), insulina (10 µg/mL), hidrocortisona (5 mg/mL), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) y anfotericina B (1 µg/mL, Sigma). Las células fueron cultivadas en una atmósfera de 5% CO₂ a una temperatura de 37 °C.⁸⁷

9.10. Ensayo MTT

El ensayo se basa en la conversión del MTT a cristales de formazán por la reducción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas. La cantidad de formazán formado es proporcional al número de células viables, Figura 46.

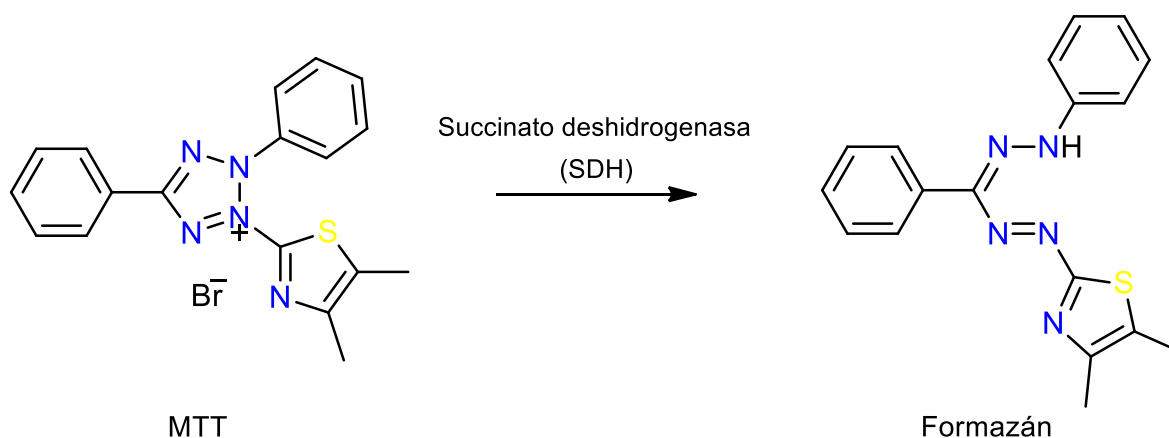


Figura 46. Ensayo de citotoxicidad MTT.

Las líneas celulares, así como el cultivo primario se cultivaron con una densidad de 1×10^4 células en placas de 96 pozos realizando el conteo en un contador automático Bio-Rad TC20TM con ayuda de azul de tripano y con el medio de crecimiento completo (MC) durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo se cambió por el medio incompleto (MI) y se volvió a incubar por 24 h. Los tratamientos se realizaron por triplicado mediante un barrido de concentraciones, 0.0-150.0 µg/mL para los extractos de tallos y hojas de los diferentes macerados, se colocaron 2 µL en cada pozo de extracto disuelto en EtOH como vehículo más 98 µL de MI, el tratamiento se dejó actuar durante 24 h para posteriormente ser

removido y colocarse el MI con 10% de MTT (5 mg/mL en PBS) dejando incubar durante 4 h a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂. Una vez que la incubación cumplió el tiempo establecido se retiró el medio, los cristales de formazán se disolvieron en una mezcla de isopropanol: HCl 1M (19:1), finalmente se midió la absorbancia del MTT reducido a 595 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad iMarkTM.⁸⁸ La viabilidad celular se determinó como porcentaje de células viables con respecto al vehículo (EtOH). La concentración inhibitoria máxima media (IC₅₀) se calculó utilizando el software Microsoft Excel.

9.11. Azul de tripano

El método de azul de tripano se empleó para evaluar muerte celular acompañado del ensayo de MTT. El ensayo consistió en la aplicación de 15 µL del colorante azul de tripano ácido (3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1Z)hidracin-2-il-1-ilideno]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-disulfónico al 0.4% en 15 µL de células previamente cultivadas y tratadas a 24 h en placas de 96 pozos. Con la ayuda de un hematocitómetro o con el contador automático se visualizaron las células dañadas en su membrana de color azul, diferenciándose de las viables que permanecieron incoloras, Figura 47.⁸⁹

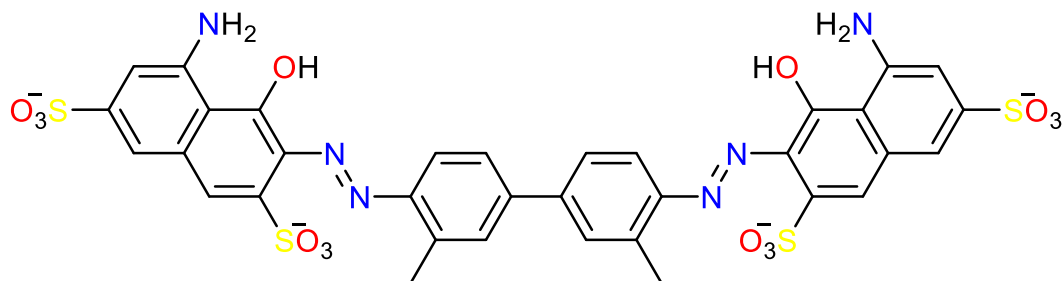


Figura 47. Estructura del azul de tripano.

9.12. Citometría de flujo

9.12.1. Evaluación de células vivas y muertas

El ensayo de células vivas y muertas se realizó para confirmar la IC₅₀ de los extractos de tallos y hojas de diclorometano de *A. foetida* Kunth, así como a la mezcla de β-sitosterol y estigmasterol con los fluoróforos de Syto-9-yoduro de propidio (IP). Se cultivaron 4×10⁴ células MCF-7 por pozo en placas de 24 pocillos incubadas durante 24 h. Después de la aplicación del tratamiento las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS,

posteriormente fueron tratadas con Syto-9-IP y se leyeron cada uno de los tratamientos en el citómetro de flujo.

9.12.2. Determinación de apoptosis y necrosis

En el ensayo de apoptosis y necrosis se cultivaron 4×10^4 células MCF-7 y K562 por pozo en placas de 24 pocillos incubadas durante 24 h. Después de que las células fueron tripsinizadas las células adherentes y lavadas con PBS se trataron con anexina V y 7AAD de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Annexin V, Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen). Para este ensayo se preparó un buffer para los fluoróforos y los tratamientos con 10 μ L de Hepes 1M más 90 μ L de agua desionizada estéril filtrada, así como 1400 μ L de NaCl 1M y 25 μ L de CaCl_2 1M, se ajustó el pH a 7.4 y se aforó a 10 mL con agua desionizada. Una vez preparado el buffer se prepararon los fluoróforos. El ensayo de apoptosis y necrosis fue analizado utilizando un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) y el software FlowJo (TreeStar, Inc.). La actinomicina D (Cayman Chemical Company, 10 μ M) fue utilizada como un control positivo de apoptosis y de necrosis el EDTA (250 mM). Se realizaron 10,000 eventos en el análisis. Las lecturas fueron compensadas en *A. glossa* Pfeifer.

9.12.3. Ensayo de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Una vez sembradas 4×10^4 células MCF-7 se preparó el buffer para JC-1 10x diluido 1:10 en agua desionizada. Se preparó una solución de trabajo 1:100 del stock de JC-1 reconstituido en DMSO en buffer 10x previamente atemperado a 37 °C. Posterior esto se adicionaron 100 μ L de solución de trabajo JC-1 a tubos eppendorf con las células y los tratamientos después se incubó a 37 °C 15 min y se agregaron 200 μ L de buffer 1x y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min. Una vez concluido lo anterior se resuspendieron en 100 μ L de buffer 1x esto se repitió dos veces para después leer en el citómetro de flujo.

9.12.4. Medición del potencial de membrana

En placa de 96 pozos de fondo oscuro se agregó colágeno de rata 1:10 en agua destilada estéril a cada pocillo la cual se incubó a 37 °C por 10 min, después el colágeno de rata fue retirado y se dejó en radiación UV por 15 min. Una vez tratada la placa se sembraron 1×10^4 células por pozo y se incubaron por 24 horas a 37 °C en presencia de CO_2 . Una vez

incubadas las células fueron lavadas dos veces con el buffer Hanks-Hepes y se agregaron 200 μ M de DISC₃ (5) por pozo y se incubó por 30 min a 37 °C en CO₂. Posteriormente se leyeron 5 puntos de fluorescencia basal a 625 nm-670 nm y después de la lectura se adicionaron los tratamientos y se realizó la lectura durante 3.5 horas. La valinomicina 0,4 mM se empleó como control positivo de cambio en el potencial de la membrana.

9.12.5. Ensayo de hemólisis de eritrocitos humanos

Para analizar la actividad hemolítica de EDT y EDH, se empleó el método de Rico-Mata et al. (2013). Se obtuvo sangre humana entera fresca en tubos con Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA, 0.2 mg / mL) la cual se centrifugó a 1500 rpm por 5 min y se lavó por triplicado con PBS, posteriormente se resuspendió hasta el volumen inicial y se consideró como el 100% de eritrocitos. A partir de la solución anterior, se preparó una dilución al 2% y los tratamientos se agregaron en un volumen de reacción de 200 μ L y se incubaron a 37 °C durante una 1 h. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min y se midió la absorbancia del sobrenadante a 540 nm en un espectrofotómetro (Bio-Rad iMark™). El control negativo fueron eritrocitos tratados con PBS y el control positivo fue Triton 1% (Sigma).⁹⁰

9.13. Análisis de los extractos de tallos gruesos de *Aristolochia glossa* Pfeiffer

En la búsqueda de metabolitos se utilizaron 5.0 g del extracto de hexano de tallos gruesos y de las fracciones eluidas con una polaridad 9:1 de Hex-AcOEt se obtuvieron 4.1, 5.0 y 5.1 mg de una mezcla de esteroides identificados como β -sitosterol (**25**) y estigmasterol (**26**) de las polaridades de hexano, diclorometano y acetato de etilo respectivamente. Del extracto de hexano y CH₂Cl₂ de los tallos gruesos se obtuvieron 70 y 20 mg respectivamente en forma de un sólido blanco del eupomatenoid-1 (**19**) obtenido de la polaridad 49:1 de Hex-AcOEt. El eupomatenoid-7 (**20**) se obtuvo como un sólido de color marrón y se aisló de los tallos gruesos en la polaridad de 19:1 Hex-AcOEt, obteniéndose 300 mg en el extracto de CH₂Cl₂ y en la polaridad 9:1 Hex-AcOEt 100 mg en el extracto de AcOEt de un lote de 5.0 g. De los extractos de los tallos gruesos de hexano, CH₂Cl₂ y AcOEt se aisló la licarina-A (**21**) en la polaridad de 19:1 Hex-AcOEt, obteniendo 50, 100 y 400 mg de un sólido cristalino incoloro de un lote de 5.0 g respectivamente. De la polaridad 97:3 Hex-

AcOEt del extracto de hexano de tallos gruesos se aisló la licarina-B (22) y se obtuvieron 100 mg en forma de sólido amorfo blanco de un lote de 5.0 g.

9.14. Preparación de ésteres con el empleo de la DCC

Se colocó el ácido carboxílico, un equivalente de HOBt y 1.4 equivalentes de DCC, 2.5 mililitros de acetato de etilo como disolvente, estos reactivos se colocaron en baño de hielo por un periodo de una hora obteniendo un precipitado color blanco. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se agregó el alcohol en este caso los metabolitos de la planta (20 ó 21), y se empleó como base DIPEA dejándose reaccionar 4 horas en agitación a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 3 mL de hexano y reaccionó por una hora, posteriormente se dejó durante 12 horas a una temperatura de 2 °C, se removió el DCU formado por filtración y se lavó el precipitado con acetato de etilo. Para la extracción se empleó HCl al 10% para realizar dos lavados, se neutralizó con solución saturada de bicarbonato de sodio y se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró, se llevó a concentrar con presión reducida.⁹¹

9.15. Análisis *in silico* de compuestos y derivados acetilados de *Aristolochia glossa* Pfeifer

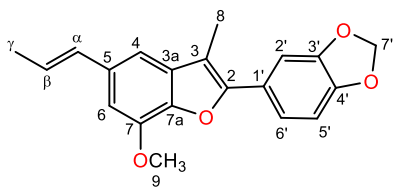
Las predicciones fueron realizadas *in silico* de los compuestos 30-41. Las predicciones del análisis del consenso farmacológico fueron empleadas para determinar las propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas de los compuestos como se describe por Daina *et al.* (2017), Pires *et al.* (2015), Dong *et al.* (2018) y Yang *et al.* (2019).⁹²⁻⁹⁵ La predicción del potencial biológico fue de acuerdo a Filimonov *et al.* (2014).⁹⁶

9.16. Análisis estadístico

Los datos se obtuvieron de manera independiente por triplicado cada uno, se realizó un análisis de varianza unidireccional utilizando una prueba de Tukey con un nivel de significancia $P < 0.05$. La concentración requerida para inhibir el 50% de la viabilidad celular (IC_{50}) y el error estándar de la media fueron calculados utilizando una curva de regresión lineal. El análisis estadístico fue realizado por el software GraphPad Prism (versión 8.0.2) para determinar diferencias significativas.

10. Datos espectroscópicos

10.1. Eupomatenoide-1 (19)



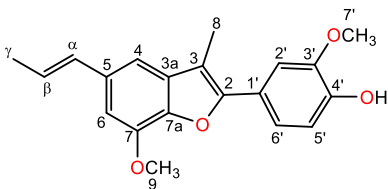
19

Sólido blanco con p.f. de: 154-157 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.28 (2H, m, H-2' y H-6'), 7.02 (d, $J = 1.4$ Hz, H-4), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.82 (d, $J = 1.5$ Hz, H-6), 6.49 (dd, $J = 15.7, 1.7$ Hz, H- α), 6.21 (m, H- β),

6.00 (2H, s, H-7'), 4.03 (3H, s, H-9), 2.39 (3H, s, H-8), 1.90 (3H, dd, $J = 6.6, 1.7$ Hz, H- γ).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 151.1 (C-2), 147.8 (C-3'), 147.4 (C-4'), 144.8 (C-7), 142.1 (C-7a), 133.6 (C-5), 132.9 (C-3a), 131.4 (C- α), 125.3 (C-1'), 124.4 (C- β), 120.9 (C-6'), 110.5 (C-3), 109.1 (C-4), 108.5 (C-5'), 107.3 (C-2'), 104.6 (C-6), 101.2 (C-7'), 56.1 (C-9), 18.4 (C- γ), 9.6 (C-8).

10.2. Eupomatenoide-7 (20)



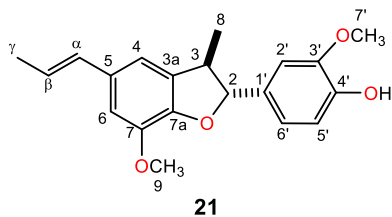
20

Sólido blanco con p.f. de: 154-157 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.29 (2H, m, H-2' y H-6'), 7.05 (1H, s, H-4), 7.00 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-5'), 6.82 (1H, s, H-6), 6.49 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H- α), 6.22 (1H, m, H- β), 5.74 (1H, s, OH-4'), 4.04 (3H, s, H-9), 3.99 (2H, s, H-7'), 2.41 (3H, s,

H-8), 1.91 (3H, dd, $J = 6.6, 1.7$ Hz, H- γ).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 151.4 (C-2), 146.6 (C-3'), 145.7 (C-4'), 144.8 (C-7), 142.1 (C-7a), 133.6 (C-5), 133.0 (C-3 α), 131.4 (C-a), 124.3 (C- β), 123.6 (C-1'), 120.6 (C-6'), 114.4 (C-5'), 110.4 (C-3), 109.4 (C-4), 109.1 (C-2'), 104.3 (C-6), 56.1 (C-7'), 55.9 (C-9), 18.4 (C- γ), 9.6 (C-8).

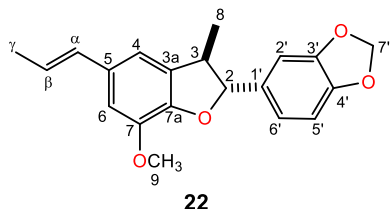
10.3. Licarina-A (21)



Sólido cristalino incoloro con p.f. de: 130- 132 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6.97 (1H, s, H-2'), 6.89 (2H, d, J = 1.8 Hz, H-5' y H-6'), 6.78 (2H, d, J = 8.3 Hz, H-6 y H-4), 6.36 (1H, dd, J = 15.7, 2.0 Hz, H- α), 6.11 (1H, m, H- β), 5.66 (1H, s, OH-4'), 5.10 (1H, d, J = 9.5 Hz, H-2), 3.88 (6H, d, J = 8.1 Hz, H-9 y H-7'), 3.44 (1H, dq, J = 13.6, 6.9 Hz, H-3), 1.87 (3H, dd, J = 6.6, 1.6 Hz, H- γ), 1.37 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-8).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 146.6 (C-3'), 146.5 (C-7a), 145.7 (C-4'), 144.1 (C-7), 133.2 (C-3a), 132.2 (C-5), 132.0 (C-1'), 130.9 (C- α), 123.5 (C- β), 119.9 (C-6'), 114.0 (C-5'), 113.3 (C-4), 109.2 (C-6), 109.1 (C-), 108.8 (C-2'), 93.8 (C-2), 55.9 (C-9), 55.8 (C-7'), 45.7 (C-3), 18.4 (C- γ), 17.5 (C-8).

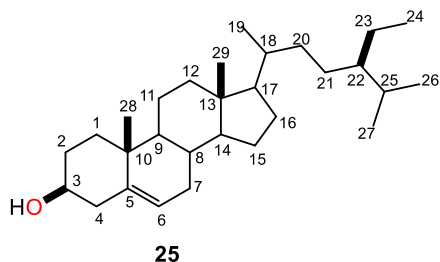
10.4. Licarina-B (22)



Sólido blanco con p.f. de: 85-87 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 6.95 (1H, d, J = 6.92 Hz, H-2'), 6.90 (dd, J = 1.7, 0.5 Hz, H-5'), 6.85 (1H, dd, J = 1.7, 0.5 Hz, H-6'), 6.80 (2H, m, H-4 y H-6), 6.35 (dd, J = 15.7 Hz, H- α), 6.10 (1H, m, H- β), 5.95 (2H, s, H-7'), 5.09 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-2), 3.89 (3H, s, H-9), 3.45 (1H, dq, J = 13.6, 6.9 Hz, H-3) 1.86 (3H, dd, J = 6.6, 1.6 Hz, H- γ), 1.38 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-8).

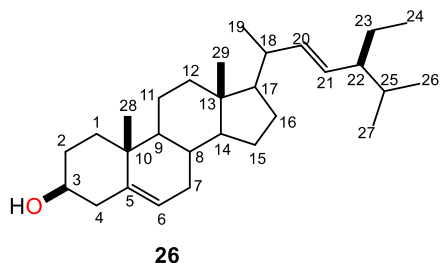
RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 147.9 (C-3'), 147.6 (C-4'), 146.5 (C-7a), 144.1 (C-7), 134.3 (C-1'), 133.0 (C-3a), 132.2 (C-5), 130.9 (C- α), 123.5 (C- β), 120.2 (C-6'), 113.3 (C-4), 109.2 (C-6), 108.0 (C-5'), 106.8 (C-2'), 101.1 (C-7'), 93.4 (C-2), 55.9 (C-9), 45.7 (C-3), 18.4 (C-8), 17.85 (C- γ).

10.5. β -sitosterol (25)



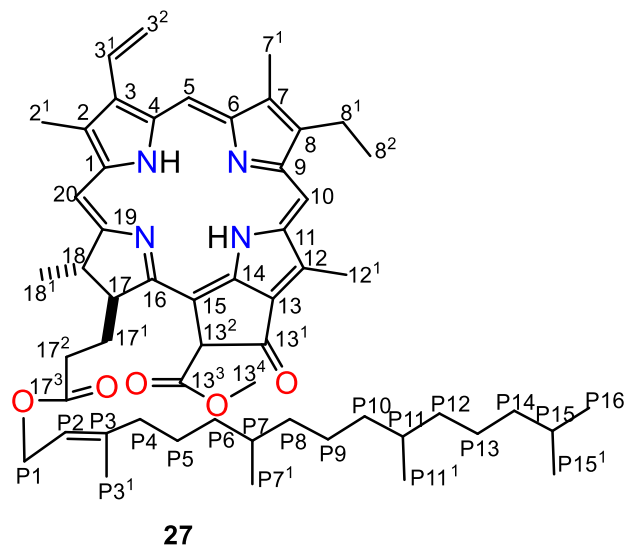
Sólido blanco amorfo con p.f. de: 137-138 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 5.36 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-6), 3.50 (1H, m, H-3), 1.00 (3H, s H-28), 0.92 (3H, d, J = 6.4 Hz, H-19), 0.84 (3H, d, J = 2.8 Hz, H-27), 0.82 (3H, d, J = 2.0 Hz, H-26), 0.68 (3H, s, H-29).

10.6. Estigmasterol (26)



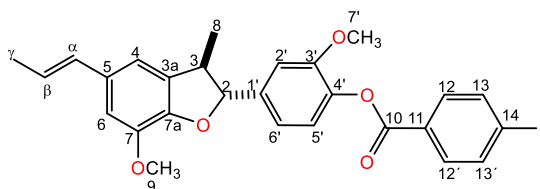
Sólido cristalino en forma de agujas blancas con p.f. de: 136-138 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 5.36 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-6), 5.15 (1H, dd, J = 15.0, 8.8 Hz, H-21), 5.05 (1H, dd, J = 15.2, 8.8 Hz, H-20), 3.50 (1H, m, H-3), 1.02 (3H, s, H-19), 1.00 (3H, s, H-28), 0.85 (3H, d, J = 2.8 Hz, H-26), 0.80 (3H, d, J = 2.0 Hz, H-27), 0.70 (3H, s, H-29).

10.7. Feofitina-a (27)



Sólido de color verde. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 9.51 (s, H-10), 9.35 (s, H-5), 8.60 (s, H-20), 7.95 (dd, J = 17.85, 11.48 Hz, H-3¹) 6.30 (s, H-13²), 6.27 (*trans*, d, J = 17.95 Hz, H-3²), 6.18 (*cis*, d, J = 11.10 Hz, H-3²), 4.34 (m, H-18), 4.15 (m, H-17), 3.91 (s, H-13⁴), 3.69 (s, H-12¹), 3.63 (m, H-8¹), 3.39 (s, H-2¹), 3.19 (s, H-7¹), 1.84 (d, H-18¹), 1.66 (m, H-8²).

10.8. *p*-Yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (30**).**



30

Líquido oleoso de color amarillo. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.91 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-12, H-12'), 7.86 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-13 y H-13'), 7.13 (1H, s, H-2'), 7.11 (1H, m, H-5'), 7.02 (1H, dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, H-

6'), 6.79 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H-4, H-6), 6.37 (1H, dd, $J = 15.7, 1.8$ Hz, H- α), 6.11 (1H, m, H- β), 5.19 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-2), 3.91 (3H, s, H-9), 3.80 (3H, s, H-7'), 3.47 (1H, m, H-3), 1.87 (3H, dd, $J = 6.6, 1.6$ Hz, H- γ), 1.43 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-8).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 164.2 (C-10), 151.3 (C-3'), 146.4 (C-7a), 144.1 (C-7), 139.6 (C-14), 137.8 (C-13 y C-13'), 133.2 (C-3a), 133.0 (C-1'), 132.4 (C-5'), 131.6 (C-12'), 130.9 (C- α), 128.85 (C-11), 123.6 (C-12), 122.6 (C- β), 118.7 (C-6'), 113.3 (C-5'), 110.3 (C-4'), 109.3 (C-6), 101.3 (C-2), 93.0 (C-2'), 55.9 (C-9), 55.8 (C-7'), 45.7 (C-3), 18.4 (C-8), 17.5 (C- γ).

11. Referencias

- (1) Katz, L.; Baltz, R. H. Natural Product Discovery: Past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 43 (2–3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>.
- (2) Vega-Ávila, E.; Velasco-Lezama, R.; Jiménez-Estrada, M. Las plantas como fuente de compuestos antineoplásicos. Revisión. *Bioquímica* **2006**, 31 (3), 97–111.
- (3) Prakash, O.; Kumar, A.; Kumar, P.; Ajeet, A. Anticancer potential of plants and natural products: A review. *AJPS* **2013**, 1 (6), 104–115. <https://doi.org/10.12691/ajps-1-6-1>.
- (4) Calderón-Rangel, D. Preparación de derivados diterpénicos a partir de los productos naturales de *Ageratina Jucotepecana* y evaluación de su actividad biológica. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, México, 2022.
- (5) Li, Y.; Kui-Shan, W.; Xiao, R.; Ying-Xian, Z.; Feng, W.; Qiang, W. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules* **2018**, 23 (4), 762.
- (6) Zwenger, S.; Basu, C. Plant Terpenoids: Applications and future potentials. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, 3 (1), 001–007.
- (7) Azmir, J.; Zaidul, I. S. M.; Rahman, M. M.; Sharif, K. M.; Mohamed, A.; Sahena, F.; Jahurul, M. H. A.; Ghafoor, K.; Norulaini, N. A. N.; Omar, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **2013**, 117 (4), 426–436.
- (8) Juárez-Carrillo, F. Modificaciones del grupo carboxilo del ácido 2-hidroxieperuico empleando ultrasonido. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, México, 2022.
- (9) *Fungal metabolites*; Mérillon, J.-M., Ramawat, K. G., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4>.
- (10) Cheng, A. X.; Lou, Y. G.; Mao, Y. B.; Lu, S.; Wang, L. J.; Chen, X. Y. Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *J. Integr. Plant Biol.* **2007**, 49 (2), 179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x>.
- (11) Guimarães, A. G.; Serafini, M. R.; Quintans-Júnior, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: A patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2014**, 24 (3), 243–265. <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.870154>.
- (12) Viuda-Martos, M.; Sanchez-Zapata, E.; Sayas-Barberá, E.; Sendra, E.; Pérez-Álvarez, J. A.; Fernández-López, J. Tomato and tomato byproducts. Human health benefits of lycopene and its application to meat products: A review. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2014**, 54 (8), 1032–1049. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.623799>.
- (13) Calvillo-Carranza, L. J. Preparación de nuevos derivados de triterpenos tipo lupano y nor-lupano. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, México, 2018.
- (14) Yang, L.; Stöckigt, J. Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. *Nat Prod Rep* **2010**, 27 (10), 1469. <https://doi.org/10.1039/c005378c>.
- (15) Avalos García, A.; Pérez-Urria Carril, E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* **2009**, 2 (3), 119–145.
- (16) Kabera, J. N.; Semana, E.; Mussa, A. R.; He, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol.* **2014**, 2, 377–392.

- (17) Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food. Chem.* **2011**, *126* (4), 1821–1835. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026>.
- (18) D'Archivio, M.; Filesì, C.; Benedetto, R. D.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanità.* **2007**, *43* (4), 348–361.
- (19) Wagner, S. T.; Hesse, L.; Isnard, S.; Samain, M.-S.; Bolin, J.; Maass, E.; Neinhuis, C.; Rowe, N. P.; Wanke, S. Major trends in stem anatomy and growth forms in the perianth-bearing piperales, with special focus on *Aristolochia*. *Ann. Bot.* **2014**, *113* (7), 1139–1154. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu044>.
- (20) Lawewnce, M. K. Aristolochiaceae. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. **2000**, *29*, 1–8.
- (21) Pacheco, A. G.; Machado de Oliveira, P.; Piló-Veloso, D.; Flávio de Carvalho Alcântara, A. ¹³C-NMR data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. *Molecules* **2009**, *14* (3), 1245–1262. <https://doi.org/10.3390/molecules14031245>.
- (22) Wu, T. S.; Damu, A. G.; Su, C. R.; Kuo, P. C. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21* (5), 594. <https://doi.org/10.1039/b401950d>.
- (23) Sartorelli, P.; Salomone Carvalho, C.; Quero Reimão, J.; Lorenzi, H.; Tempone, A. antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia Cymbifera*. *Planta Med.* **2010**, *76* (13), 1454–1456. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240952>.
- (24) Paizanni Guillén, A.; Santana-Michel, F. J. Flora del bajío y de regiones adyacentes; 2018.
- (25) Alonso-Castro, A. J.; Domínguez, F.; Ruiz-Padilla, A. J.; Campos-Xolalpa, N.; Zapata-Morales, J. R.; Carranza-Alvarez, C.; Maldonado-Miranda, J. J. Medicinal plants from north and central America and the caribbean considered toxic for humans: The other side of the coin. *Evid-Based Compl. Alt.* **2017**, *2017*, 1–28. <https://doi.org/10.1155/2017/9439868>.
- (26) Heinrich, M.; Chan, J.; Wanke, S.; Neinhuis, C.; Simmonds, M. S. J. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2—a global assessment based on bibliographic sources. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *125* (1), 108–144. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.028>.
- (27) Guillen-Heredia, P. Estudio Químico de *Aristolochia glossa* Pfeifer. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, 2020.
- (28) Pfeifer, H. W. Revision of the north and central american hexandrous species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1966**, *53* (2), 115. <https://doi.org/10.2307/2394940>.
- (29) Yu, J. Q.; Liao, Z. X.; Cai, X. Q.; Lei, J. C.; Zou, G. L. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. *Env. Toxicol. Phar.* **2007**, *23* (2), 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.08.004>.
- (30) Dey, A.; Nath De, J. *Aristolochia Indica* L.: A review. *Asian J. Plant Sci.* **2011**, *10* (2), 108–116.
- (31) Shafi, P. M.; Rosamma, M. K.; Jamil, K.; Reddy, P. S. Antibacterial activity of the essential oil from *Aristolochia indica*. *Fitoterapia* **2002**, *73* (5), 439–441. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00130-2](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00130-2).

- (32) Reyma, M.; Amrutha, P.; Mansee, R.; Nobre, M. Anti HIV-1 and anti-bacterial activity of the leaf extracts of *Aristolochia elegans*. *Int. J. Trop. Med.* **2009**, *10* (1), 9–12.
- (33) Sulyman, A. O.; Akolade, J. O.; Sabiu, S. A.; Aladodo, R. A.; Muritala, H. F. Antidiabetic potentials of ethanolic extract of *Aristolochia ringens* (Vahl.) roots. *J. Ethnopharmacol.* **2016**, *182*, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.02.002>.
- (34) Alali, F. Q.; Tawaha, K.; Shehadeh, M. B.; Telfah, S. Phytochemical and biological investigation of *Aristolochia maurorum* L. *ZNC* **2006**, *61* (9–10), 685–691. <https://doi.org/10.1515/znc-2006-9-1013>.
- (35) Chaouki, W.; Leger, D. Y.; Eljastimi, J.; Beneytout, J.-L.; Hmamouchi, M. Antiproliferative effect of extracts from *Aristolochia baetica* and *Origanum compactum* on human breast cancer cell line MCF-7. *Pharm. Biol.* **2010**, *48* (3), 269–274. <https://doi.org/10.3109/13880200903096588>.
- (36) Navarro-García, V. M.; Luna-Herrera, J.; Rojas-Bribiesca, Ma. G.; Álvarez-Fitz, P.; Ríos, M. Y. Antibacterial activity of *Aristolochia brevipes* against multidrug-resistant Mycobacterium Tuberculosis. *Molecules* **2011**, *16* (9), 7357–7364. <https://doi.org/10.3390/molecules16097357>.
- (37) Jiménez-Arellanes, A.; León-Díaz, R.; Meckes, M.; Tapia, A.; Molina-Salinas, G. M.; Luna-Herrera, J.; Yépez-Mulia, L. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of pure compounds from *Aristolochia elegans* rhizomes. *Evid-Based Compl. Alt.* **2012**, *2012*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/593403>.
- (38) Abe, F.; Nagafuji, S.; Yamauchi, T.; Okabe, H.; Maki, J.; Higo, H.; Akahane, H.; Aguilar, A.; Jiménez-Estrada, M.; Reyes-Chilpa, R. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25* (9), 1188–1191. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1188>.
- (39) Arellanes, M. A. J.; Cortés, N. R. R.; García, I. Antioxidant and antimicrobial activities of hexane extracts and pure compounds from *Aristolochia taliscana* rhizome. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **2011**, *42* (3), 35–41.
- (40) León-Díaz, R.; Meckes-Fischer, M.; Valdovinos-Martínez, L.; Campos, M. G.; Hernández-Pando, R.; Jiménez-Arellanes, M. A. Antitubercular activity and the subacute toxicity of (–)-Licarin A in BALB/c Mice: A neolignan isolated from *Aristolochia taliscana*. *Arch. Med. Res.* **2013**, *44* (2), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.12.006>.
- (41) Beutelspacher Baigts, C. R. Dos nuevas especies de *Aristolochia* L., (Aristolochiaceae) de Chiapas, México. *Lacandonia* **2007**, *1* (1), 5–11.
- (42) González, F.; Esquivel, H. E.; Murcia, G. A.; Pabón-Mora, N. *Aristolochia pentandra* (Aristolochiaceae) in Colombia: Biogeographic implications and proposed synapomorphies between the pentandrous species of *Aristolochia* and its south american sister group. *Rev. Acad. Colomb Ci Exact* **2010**, *34* (133), 467–478.
- (43) Santana-Michel, F. J.; Solís-Magallanes, J. A. *Aristolochia emiliae* (Aristolochiaceae: Subsección Pentandrae), Una especie nueva de la costa de Jalisco, México. *Acta Bot. Mex.* **2008**, No. 82, 7–13.
- (44) Subramaniam, V.; Saravanan, R.; Baskaran, D.; Ramalalingam, S. *In Vitro* free radical scavenging and anticancer potential of *Aristolochia indica* L. against MCF-7 Cell Line. *Int. J. Pharm.* **2015**, *7* (6), 392–396.

- (45) Bourhia, M.; Laasri, F. E.; Moussa, S. I.; Ullah, R.; Bari, A.; Saeed Ali, S.; Kaoutar, A.; Haj Said, A. A.; El Mzibri, M.; Said, G.; Khlil, N.; Benbacer, L. Phytochemistry, antioxidant activity, antiproliferative effect, and acute toxicity testing of two moroccan *Aristolochia* Species. *Evid-Based Compl. Alt.* **2019**, 2019, 1–8.
- (46) Truong, L. H.; Cuong, N. H.; Dang, T. H.; Hanh, N. T. M.; Thi, V. L.; Tran Thi Hong, H.; Tran Hong Quang; Nguyen, H. D.; Nguyen Xuan, C.; Nguyen Hoai, N.; Minh, C. V. Cytotoxic constituents from *Isotrema Tadungense*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2020**, 1–7. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1739661>.
- (47) Wang, X.; Shi, G. R.; Liu, Y. F.; Li, L.; Chen, R. Y.; Yu, D. Q. Aristolochic acid derivatives from the rhizome of *Arisolochia championii*. *Fitoterapia* **2017**, 118, 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.01.006>.
- (48) Taha, M.; Parveen, B.; Osman, B.; Abdoon, I. H.; Mohamed, M. S.; Osman, W. J. A.; Ahmad, S. *In Vitro* profiling of plants used in sudanese traditional medicine for antioxidant and anti-breast cancer activities. *Ann. Phytomedicine Int. J.* **2019**, 8 (1), 119–126. <https://doi.org/10.21276/ap.2019.8.1.15>.
- (49) Ian, A. A.; Vidyleison, N. C.; Ana, C. dos S. P. A.; Karina, M. S. H.; Rosy, I. M. de A. R.; Ian, A. A.; Vidyleison, N. C.; Ana, C. dos S. P. A.; Karina, M. S. H.; Rosy, I. M. de A. R.; Kamilla, M. dos S.; Juliana, T. de M.; Jos, C. M.; Luciana, A. R. dos S. L.; Jaqueline, M. S. F. Antibacterial and cytotoxic antibacterial potential of ethanol extract and fractions from *Aristolochia galeata* Mart. Ex Zucc. *J. Med. Plants Res.* **2014**, 8 (7), 326–330. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.5151>.
- (50) Akindele, A. J.; Wani, Z.; Mahajan, G.; Sharma, S.; Aigbe, F. R.; Satti, N.; Adeyemi, O. O.; Mondhe, D. M. Anticancer activity of *Aristolochia ringens* Vahl. (Aristolochiaceae). *J. Tradit. Complement. Med.* **2015**, 5 (1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.05.001>.
- (51) Ruffa, M. J.; Ferraro, G.; Wagner, M. L.; Calcagno, M. L.; Campos, R. H.; Cavallaro, L. Cytotoxic effect of argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 79 (3), 335–339. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00400-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00400-7).
- (52) Benarba, B.; Pandiella, A.; Elmallah, A. Anticancer activity, phytochemical screening and acute toxicity evaluation of an aqueous extract of *Aristolochia longa* L. *Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.* **2017**, 6 (1), 20. <https://doi.org/10.24896/eijppr.2016614>.
- (53) Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. *Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow*. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/tomorrow> (acceso 2022-11-14).
- (54) INEGI. *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf.
- (55) National Cancer Institute. *What Is Cancer?* <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer#definition>.
- (56) Renahan, A. G. What Is Apoptosis, and Why Is It Important? *BMJ* **2001**, 322 (7301), 1536–1538. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7301.1536>.
- (57) Pazo Cid, R. A.; Álvarez Alejandro, M.; Cebollero de Miguel, A.; Agustín, M. J.; Martínez Lostao, L.; Anel Bernal, A.; Pérez Gracia, J. L.; Antón Torres, A. Apoptosis, cáncer & Co. *Rev. Int. Grupos. Invest. Onco.l* **2012**, 1 (1) (7301), 23-28.

- (58) Comşa, Ş.; Cîmpean, A. M.; Raica, M. The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 years of experience in research. *Anticancer Res.* **2015**, 35 (6), 3147–3154.
- (59) Sweeney, M. F.; Sonnenschein, C.; Soto, A. M. Characterization of MCF-12A Cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer Cell Int.* **2018**, 18 (1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0534-y>.
- (60) Scherer, M. F.; Syverton, J. T. Gey, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* **1953**, 97 (5), 695–710. <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>.
- (61) Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *JNCI* **1973**, 51 (5), 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>.
- (62) Klein, E.; Vánky, F.; Ben-Bassat, H.; Neumann, H.; Ralph, P.; Zeuthen, J.; Polliack, A. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int. J. Cancer* **1976**, 18 (4), 421–431. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910180405>.
- (63) Leco-González, M. Estudio fitoquímico de los extractos polares de *Cestrum Roseum*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, 2018.
- (64) Rodríguez-López, F. Estudio fitoquímico de *Pistacia mexicana*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, México, 2020.
- (65) Maestrin, A. P. J.; Neri, C. R.; Oliveira, K. T. de; Serra, O. A.; Iamamoto, Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. *Quím. Nova* **2009**, 32 (6), 1670–1672. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600054>.
- (66) Smith, K. M.; Goff, D. A.; Abraham, R. J. The NMR spectra of porphyrins. 27—proton NMR spectra of chlorophyll-a and pheophytin-a. *Org. Magn. Reson.* **1984**, 22 (12), 779–783. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270221210>.
- (67) Gomes, R. A.; Teles, Y. C. F.; Pereira, F. de O.; Rodrigues, L. A. de S.; Lima, E. de O.; Agra, M. de F.; Souza, M. de F. V. Phytoconstituents from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell (Malvaceae) and antimicrobial activity of pheophytin a. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2015**, 51 (4), 861–867. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502015000400012>.
- (68) Santos, J.; Almeida, R.; Carvalho, M.; Conceição, M.; Souza, A. Avaliação da estabilidade térmica e oxidativa de óleo lubrificante automotivo recuperado usando o solvente metil-etil-cetona. *Quím. No Bras.* **2014**, 1, 49–56.
- (69) Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutellingsperger, C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, 184 (1), 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-I](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-I).
- (70) Malek, S. N. A.; Shin, S. K.; Wahab, N. A.; Yaacob, H. Cytotoxic components of *Pereskia Bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. *Molecules* **2009**, 14 (5), 1713–1724. <https://doi.org/10.3390/molecules14051713>.

- (71) Aiyelaagbe, O. O.; Negi, A. S.; Hamid, A. A.; Luqman, S.; Kumar, S. B.; Kaneez, F. chemical constituents from *Alafia barteri* Oliv. Leaves with cytotoxic activity. *Jnl Chin. Chem. Soc.* **2015**, 62 (9), 751–755. <https://doi.org/10.1002/jccs.201500213>.
- (72) Villanueva-Prado, L. Estudio fitoquímico de los extractos de baja y mediana polaridad de *Aristolochia mycteria*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH, Morelia, Michoacán, México, 2022.
- (73) Siengalewicz, P.; Mulzer, J.; Rinner, U. 6.09 Synthesis of Esters and Lactones. In *Comprehensive Organic Synthesis II*; Elsevier, 2014; pp 355–410. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097742-3.00612-1>.
- (74) Knochel, P. *Comprehensive Organic Synthesis*; Elsevier, 2014.
- (75) Arreaga-González, H. M.; Pardo-Novoa, J. C.; del Río, R. E.; Rodríguez-García, G.; Torres-Valencia, J. M.; Manríquez-Torres, J. J.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; Gómez-Hurtado, M. A. Methodology for the absolute configuration determination of epoxythymols using the constituents of *Ageratina Glabrata*. *J. Nat. Prod.* **2018**, 81 (1), 63–71. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00637>.
- (76) Cos, P.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V.; Maes, L. anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept.’ *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 106 (3), 290–302. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.04.003>.
- (77) Shi L.; Wang C.; Xu Y.; Wang Q. Synthesis and biological activity of benzodihydrofuran neolignans and their mannich base derivatives. *Chin. J. Org. Chem.* **2015**, 35 (7), 1537-1543. <https://doi.org/10.6023/cjoc201502003>.
- (78) Min, B. S.; Trang, T. T. T. Compounds from the aerial part of *Saururus Chinensis* and their cytotoxic activity. *Nat. Prod. Sci.* **2012**, 18 (4), 227-232.
- (79) Maheswari, U.; Ghosh, K.; Sadras, S. R. Licarin A induces cell death by activation of autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Apoptosis* **2018**, 23 (3–4), 210–225. <https://doi.org/10.1007/s10495-018-1449-8>.
- (80) Navarrete-Vázquez, G.; Torres-Gómez, H.; Hidalgo-Figueroa, S.; Ramírez-Espinosa, J. J.; Estrada-Soto, S.; Medina-Franco, J. L.; León-Rivera, I.; Alarcón-Aguilar, F. J.; Almanza-Pérez, J. C. Synthesis, in vitro and in silico studies of a PPAR γ and GLUT-4 modulator with hypoglycemic effect. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24 (18), 4575–4579. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.07.068>.
- (81) Navarrete-Vazquez, G.; Chávez-Silva, F.; Argotte-Ramos, R.; Rodríguez-Gutiérrez, M. del C.; Chan-Bacab, M. J.; Cedillo-Rivera, R.; Moo-Puc, R.; Hernández-Nuñez, E. synthesis of benzologues of nitazoxanide and tizoxanide: a comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, 21 (10), 3168–3171. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.02.100>.
- (82) Hernandez, M.; Cavalcanti, S. M.; Moreira, D. R.; de Azevedo Junior, W.; Leite, A. C. Halogen atoms in the modern medicinal chemistry: hints for the drug design. *Curr. Drug Targets* **2010**, 11 (3), 303–314. <https://doi.org/10.2174/138945010790711996>.
- (83) Kalgutkar, Dalvie, Obach, y Smith. *Reactive Drug Metabolites*; Wiley, 2012; Vol. 55.
- (84) Park, B. Y.; Min, B. S.; Kwon, O. K.; Oh, S. R.; Ahn, K. S.; Kim, T. J.; Kim, D. Y.; Bae, K.; Lee, H.-K. Increase of caspase-3 activity by lignans from *Machilus Thunbergii* in HL-60 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, 27 (8), 1305–1307. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1305>.
- (85) Mbaveng, A. T.; Wamba, B. E. N.; Bitchagno, G. T. M.; Tankeo, S. B.; Çelik, İ.; Atontsa, B. C. K.; Nkuété Lonfouo, A. H.; Kuete, V.; Efferth, T. Bioactivity of fractions and constituents of Piper Capense fruits towards a broad panel of cancer

- cells. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, 271, 113884. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113884>.
- (86) Flores-Alvarez, L. J.; Guzmán-Rodríguez, J. J.; López-Gómez, R.; Salgado-Garciglia, R.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J. E. PaDef defensin from avocado (*Persea Americana* Var. *Drymifolia*) is cytotoxic to K562 chronic myeloid leukemia cells through extrinsic apoptosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, 99, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.013>.
- (87) Báez-Magaña, M.; Ochoa-Zarzosa, A.; Alva-Murillo, N.; Salgado-Garciglia, R.; López-Meza, J. E. Lipid-rich extract from mexican avocado seed (*Persea Americana* Var. *Drymifolia*) Reduces *Staphylococcus Aureus* internalization and regulates innate immune response in bovine mammary epithelial cells. *J. Immunol. Res.* **2019**, 2019, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/7083491>.
- (88) Lozzio, B. B.; Lozzio, C. B. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int. J. Cancer* **1977**, 19 (1), 136.
- (89) Guzmán-Rodríguez, J. J.; López-Gómez, R.; Salgado-Garciglia, R.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J. E. The defensin from avocado (*Persea Americana* Var. *Drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cell line MCF-7. *Biomed. Pharmacother.* **2016**, 82, 620–627. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.048>.
- (90) Rico-Mata, R.; De Leon-Rodriguez, L. M.; Avila, E. E. Effect of antimicrobial peptides derived from human cathelicidin LL-37 on *Entamoeba histolytica* Trophozoites. *Exp. Parasitol.* **2013**, 133 (3), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.009>.
- (91) Sheikh, Md. C.; Takagi, S.; Yoshimura, T.; Morita, H. Mechanistic studies of DCC/HOBt-mediated reaction of 3-phenylpropionic acid with benzyl alcohol and studies on the reactivities of ‘active ester’ and the related derivatives with nucleophiles. *Tetrahedron* **2010**, 66 (36), 7272–7278. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.07.011>.
- (92) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>.
- (93) Pires, D. E. V.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B. PkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* **2015**, 58 (9), 4066–4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>.
- (94) Dong, J.; Wang, N. N.; Yao, Z. J.; Zhang, L.; Cheng, Y.; Ouyang, D.; Lu, A. P.; Cao, D. S. ADMETlab: A platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *J. Cheminform.* **2018**, 10 (1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0283-x>.
- (95) Yang, H.; Lou, C.; Sun, L.; Li, J.; Cai, Y.; Wang, Z.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics* **2019**, 35 (6), 1067–1069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>.
- (96) Filimonov, D. A.; Lagunin, A. A.; Glorizova, T. A.; Rudik, A. V.; Druzhilovskii, D. S.; Pogodin, P. V.; Poroikov, V. V. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the Pass Online web resource. *Chem. Heterocycl. Comp.* **2014**, 50 (3), 444–457. <https://doi.org/10.1007/s10593-014-1496-1>.

12. Anexos

Derivados del eupomatenoide-7 (20)

Acetato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (31)

Los derivados mostrados a continuación presentaron características similares a los reportados por Guillen-Heredia 2020. Se utilizó **20** como materia prima para preparar su derivado bajo las condiciones de acetilación, con el uso de anhídrido acético como reactivo y piridina como disolvente; se obtuvieron 29 mg del derivado **31** en forma de sólido blanco que fue caracterizado mediante sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 46.

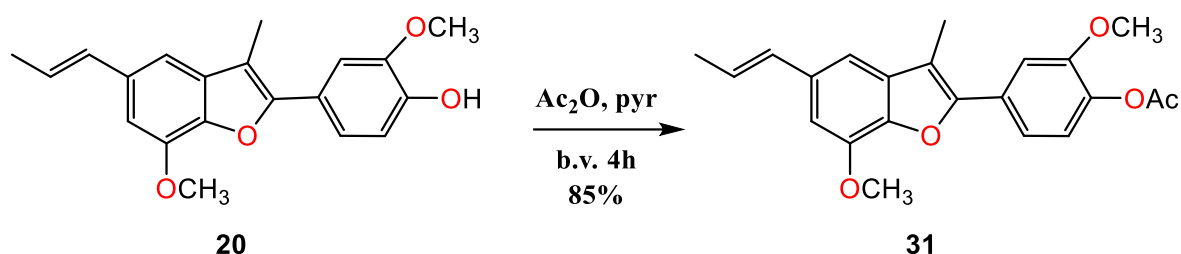


Figura 46. Condiciones para la obtención del acetato del eupomatenoide-7.

En el espectro de RMN de ^1H de **20** (Figura 47) se identificó una señal simple alrededor de 2.34 ppm típica del metilo de acetato, así como la ausencia de la señal en 5.78 ppm del hidrógeno del hidroxilo.

Las demás señales del sistema no presentaron cambios significativos en su desplazamiento químico. En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 48), se identificó en 169.1 ppm la señal del carbonilo de acetato y en 20.7 ppm la señal asignada al metilo del acetato.

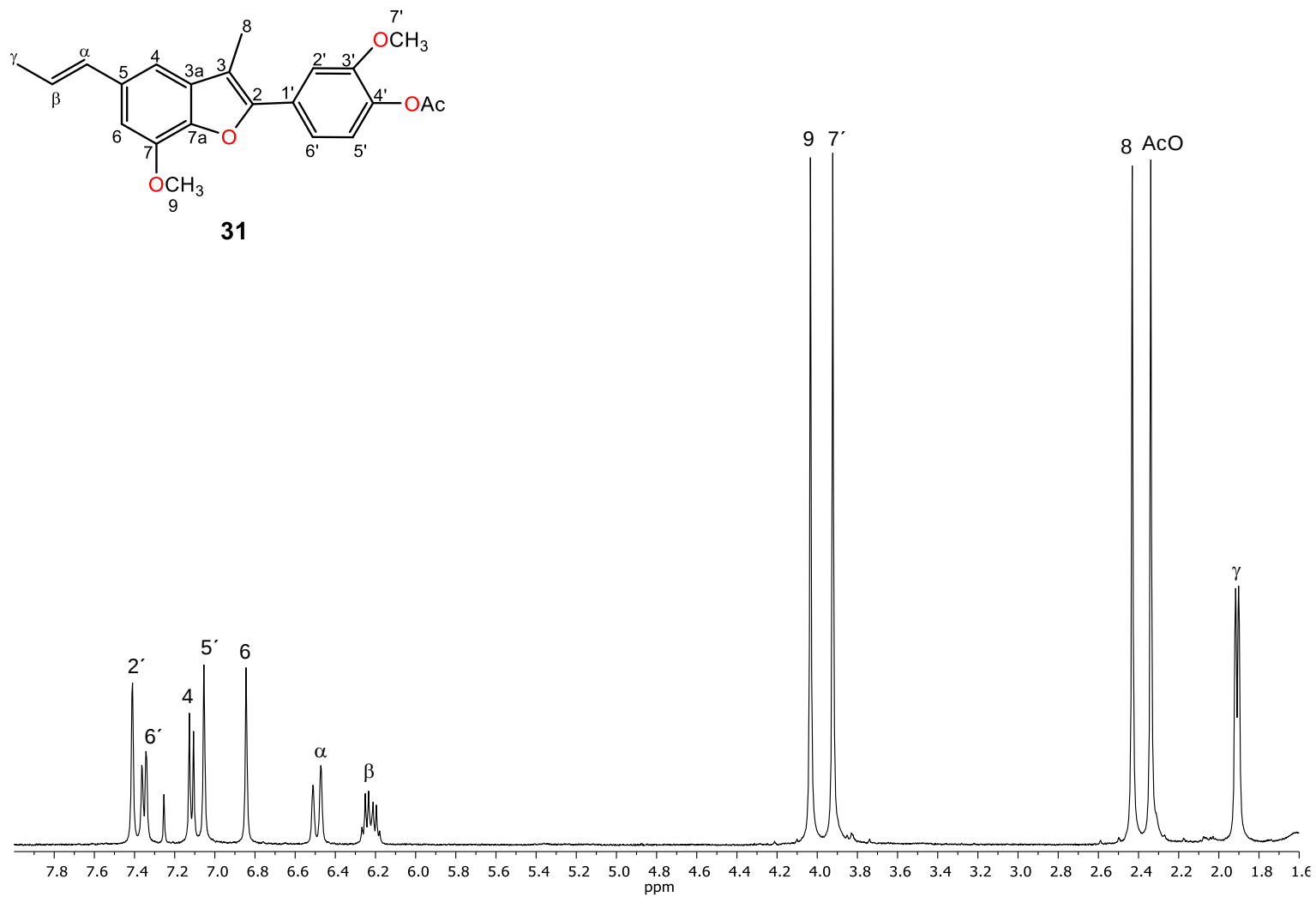


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de acetato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**31**).

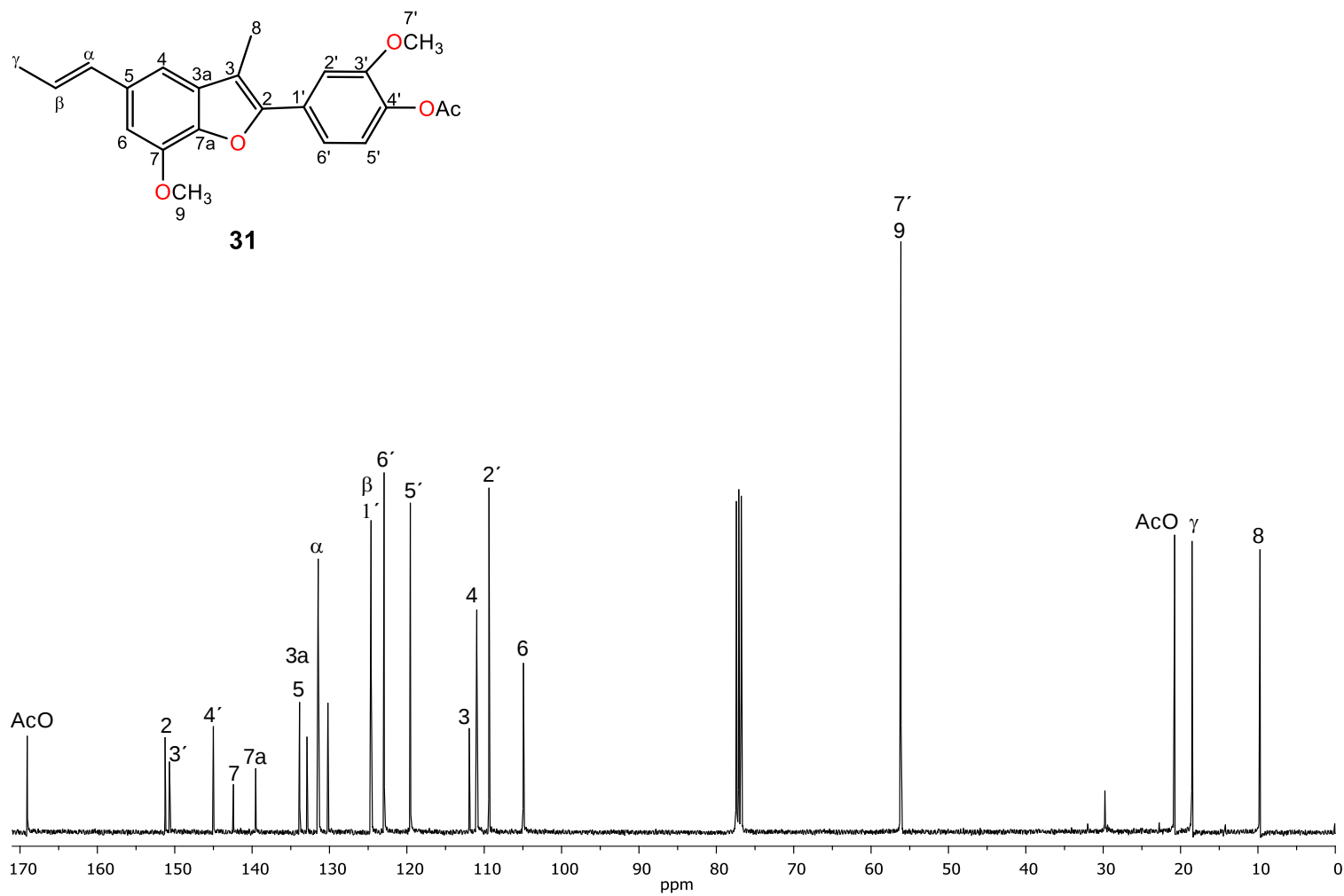


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 400 MHz de acetato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**31**).

***p*-Yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**32**)**

Partiendo de **20** como materia prima y se utilizó el ácido *p*-iodobenzoico, se obtuvieron 29 mg del derivado **32** en forma de sólido blanco. Esta técnica consta de dos etapas: en la primera etapa se debe de activar el carboxilo del ácido *p*-iodobenzoico con HOBT, DCC y después el metabolito **20** y la DIPEA se adicionan en agitación para posteriormente dejar en frio, Figura 49.

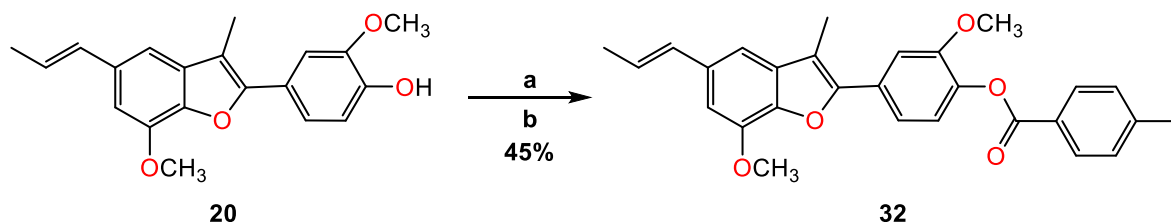


Figura 49. Reactivos y condiciones para **32**. (a) Ácido *p*-iodobenzoico, HOBT, DCC, baño de hielo 1 h. (b) Metabolito **20**, DIPEA, 4 h en agitación, t.a, hexano 1 h, 12 h, 2°C.

En el espectro de RMN de ^1H de **32** (Figura 50) se identificó de 7.94 ppm una señal doble con una constante de acoplamiento de $J = 8.5$ Hz que integra para 2 hidrógenos H-12, H-12' así como una doble en 7.88 ppm para H-13 y H-13' con una $J = 8.5$ Hz, de igual manera se observó la ausencia de la señal en 5.78 ppm del hidrógeno del hidroxilo. Las demás señales no mostraron cambios significativos. Se asignaron nuevas señales del derivado en su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 51), en 164.3 la señal correspondiente al carbono del carbonilo del éster C-10, en 142.2 ppm el carbono base de éster C-4', en 100.6 ppm la señal del carbono base de yodo y finalmente en 137.9, 133.9, 131.7 ppm las demás señales de los carbonos aromáticos del derivado C-12 y C-12', C-11, C-13 y C-13' respectivamente.

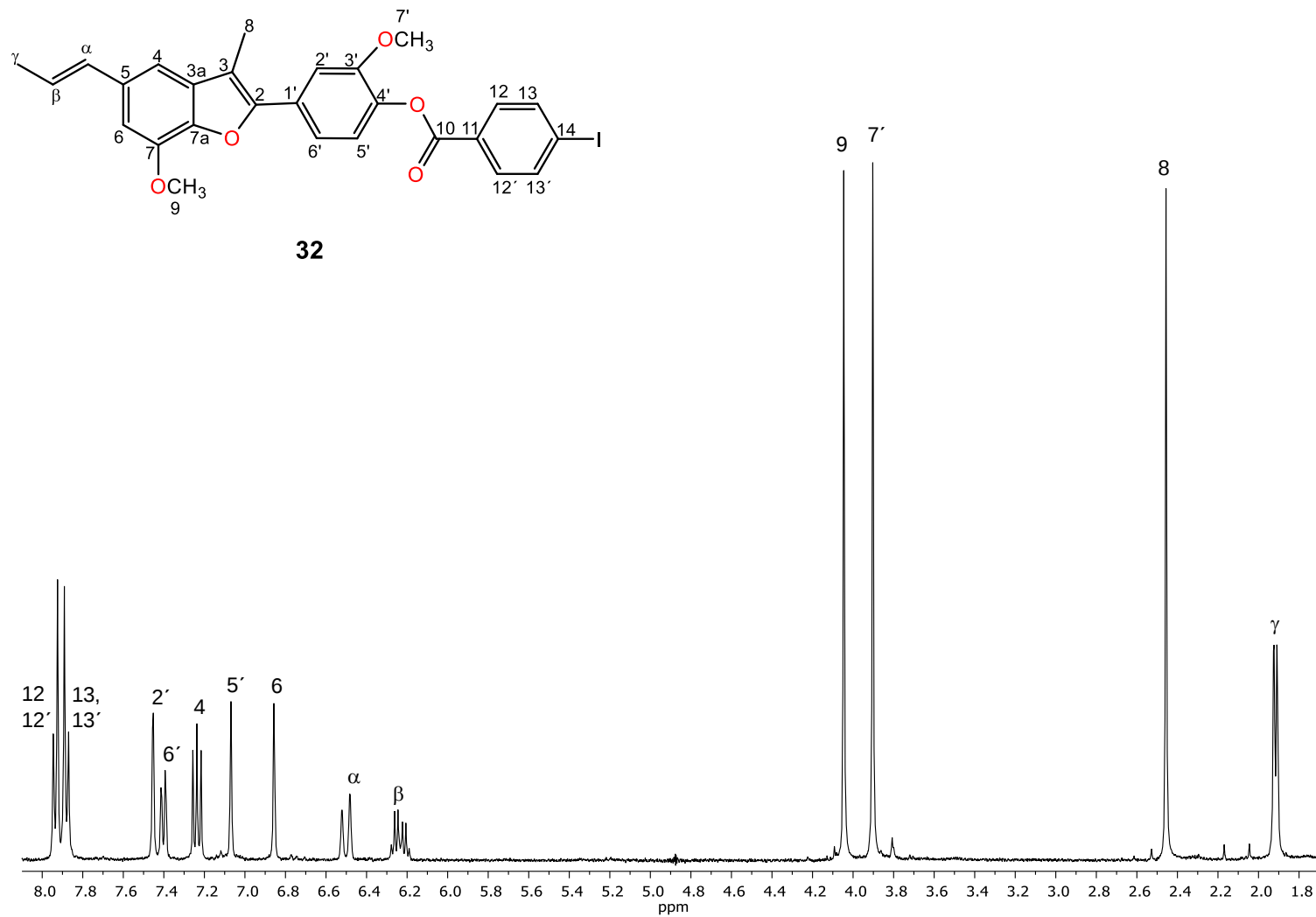


Figura 50. Espectro de RMN de ^1H en CDCl₃ a 400 MHz de *p*-iodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**32**).

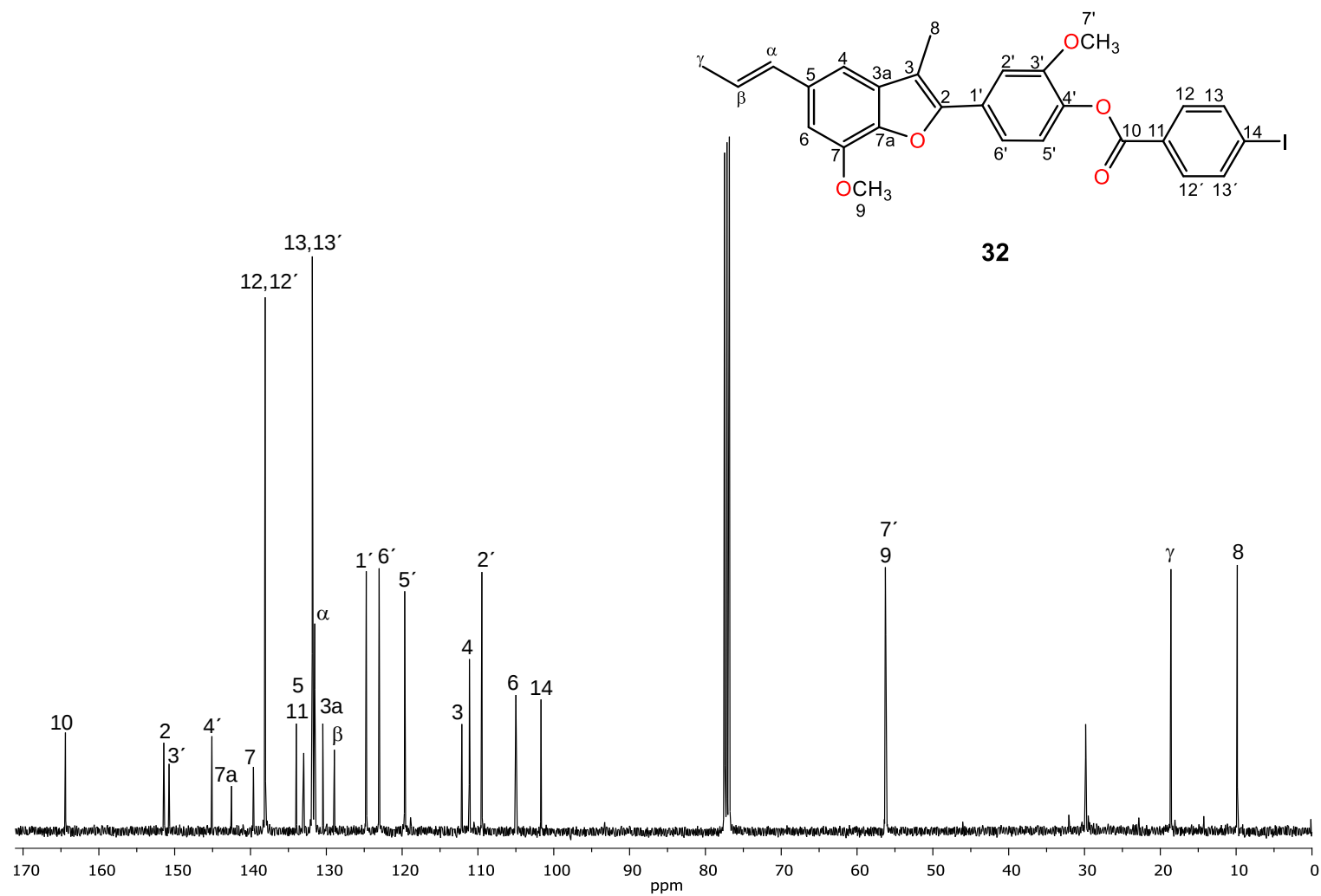


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 400 MHz de *p*-iodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**32**).

***p*-Fluorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**33**)**

El derivado **33** se preparó a partir de **20**, utilizando cloruro de *p*-fluorocinamoilo como reactivo en presencia de piridina en baño de vapor. Se obtuvieron 27 mg de dicho derivado en forma de sólido blanco y fue analizado mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 52.

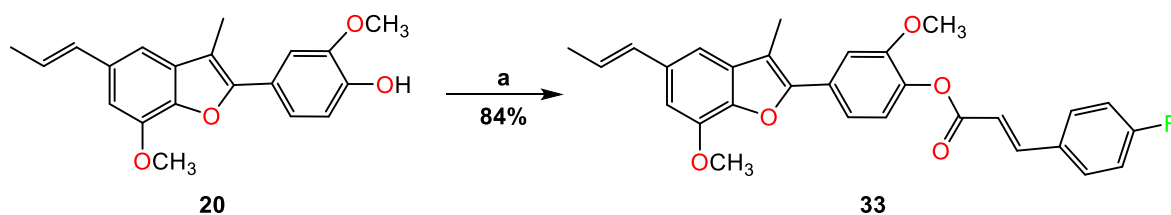


Figura 52. Reactivos y condiciones para **33**. (a) Cloruro de *p*-fluorocinamoilo, piridina, b.v., 4 h.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 53), se identificó en 7.87 ppm (d, $J = 16.0$ Hz) y en 6.62 ppm (d, $J = 16.0$ Hz) señales para los hidrógenos vinílicos H-12 y H-11 correspondientes a un sistema AX. Aproximadamente en 7.60 ppm (dd, $J = 8.6, 5.4$ Hz) se apreciaron señales para los hidrógenos H-14 y H-14' y en 7.20 ppm (d, $J = 8.2$ Hz) para H-15 y H-15'. El resto de las señales no mostraron efectos significativos con respecto a **20**. En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 54), se apreciaron señales alrededor de 165.4 donde se identificó la señal correspondiente al carbono del carbonilo del éster C-10. Se identificaron señales en 144.9 ppm el carbono base de éster C-4', en 145.4 y 116.6 ppm los carbonos vinílicos C-12 y C-11, en 164.8 ppm el carbono base de flúor C-16. Además de las señales en 130.3 ppm C-14 y C-14', 130.2 ppm C-13 y en 116.3 ppm C-15 y C-15'.

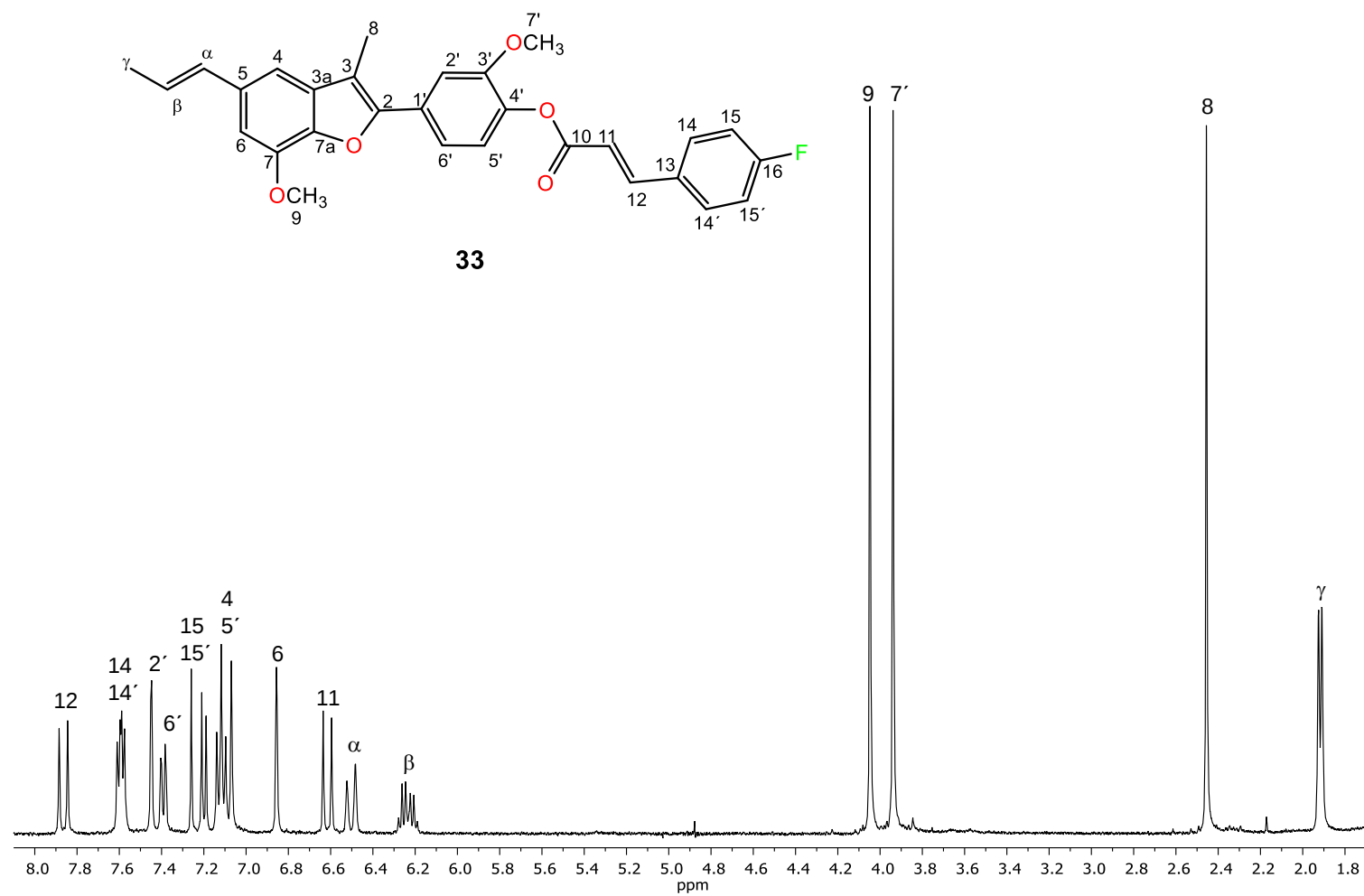


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de *p*-fluorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**33**).

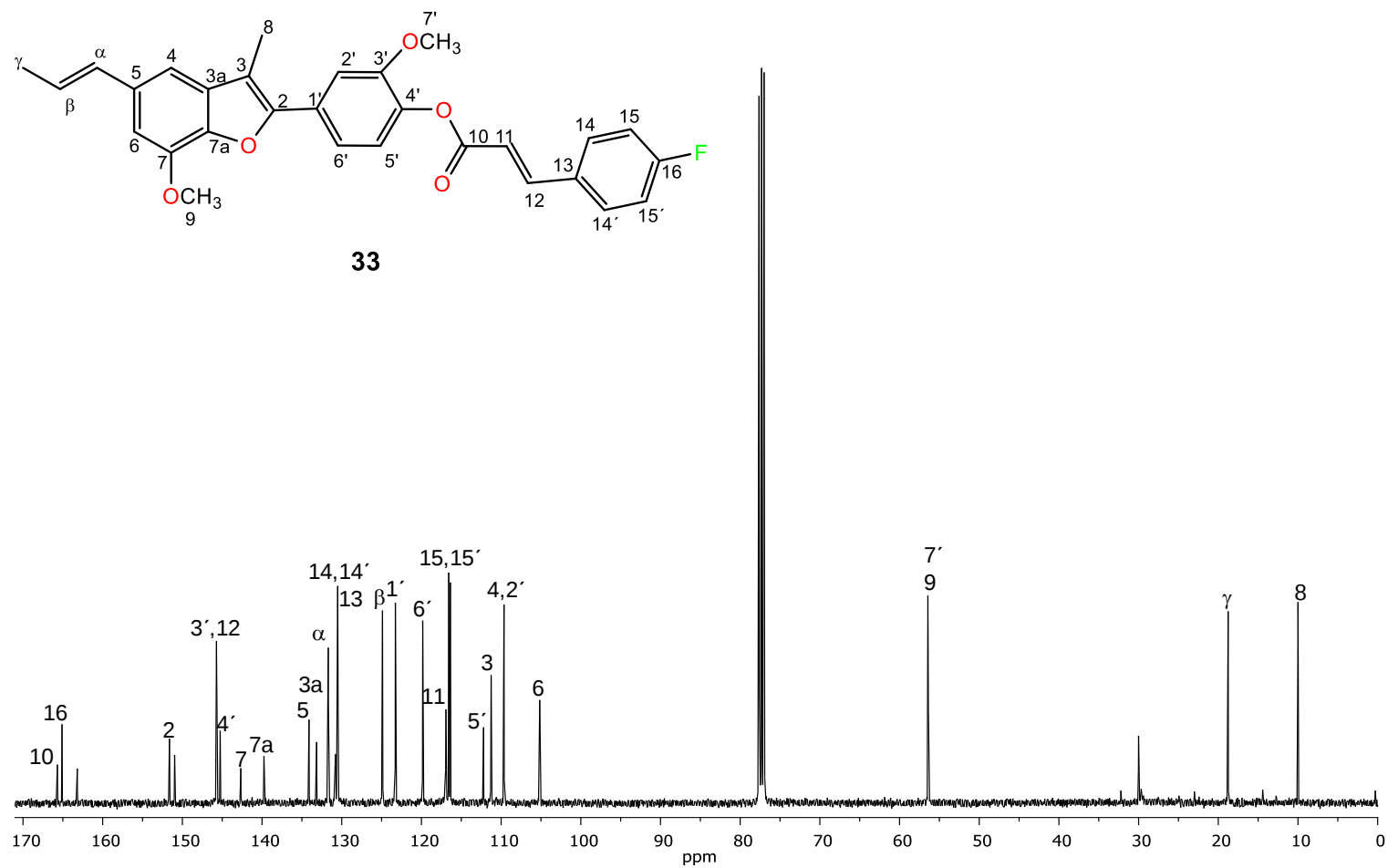


Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de *p*-fluorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**33**).

Benzofuran-2-carboxilato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (34**)**

A partir de **20** se preparó su derivado **34**, utilizando como reactivo el cloruro de benzofurano-2-carbonilo en presencia de piridina en baño de vapor, y se obtuvieron 23 mg del derivado en forma de sólido blanco, el cual se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 55.

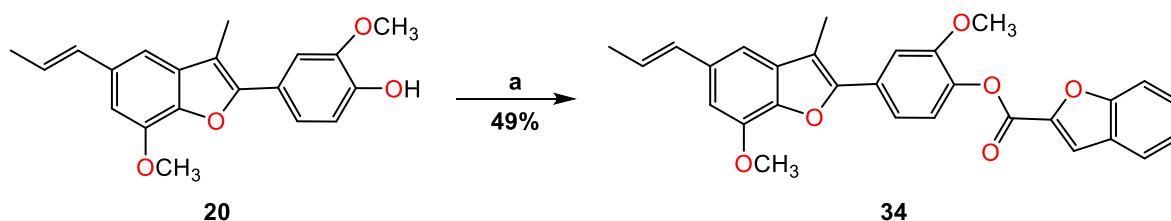


Figura 55. Reactivos y condiciones para **34**. (a) Cloruro de benzofurano-2-carbonilo, piridina, b.v., 4 h.

El derivado **34** mostró en su espectro de RMN de ^1H (Figura 56) la aparición de nuevas señales, una simple en 7.78 ppm que integra para H-12 y una doble en 7.75 con $J = 7.9$ Hz de H-13. Se identificaron otras señales dobles en 7.65 ppm para el H-16 y una señal doble de dobles en 7.49 $J = 15.0, 4.4$ Hz para H-15 y H-14. Las demás señales no mostraron diferencias significativas con respecto a **20**. El espectro de RMN de ^{13}C (Figura 57), se identificó alrededor de 157.2 la señal que corresponde al carbono del carbonilo del éster C-10, en 134.1 ppm el carbono base de éster C-4', en 127.8 y 151.2 ppm los carbonos puentes 12a y 16a, y en 110.7, 115.3, 115.6, 123.7, 124.3 ppm las demás señales del derivado **34**.

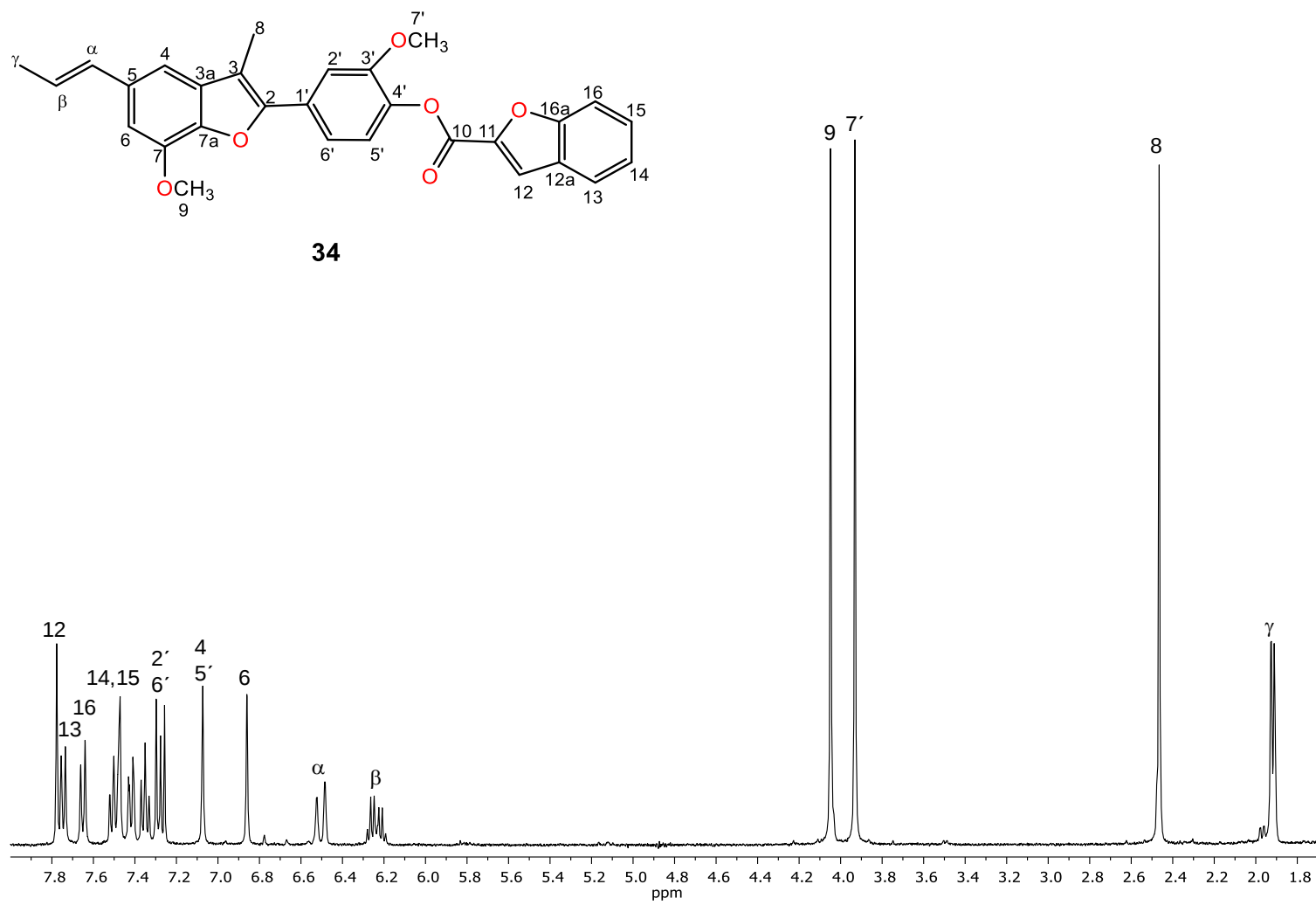


Figura 56. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de benzofuran-2-carboxilato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**34**).

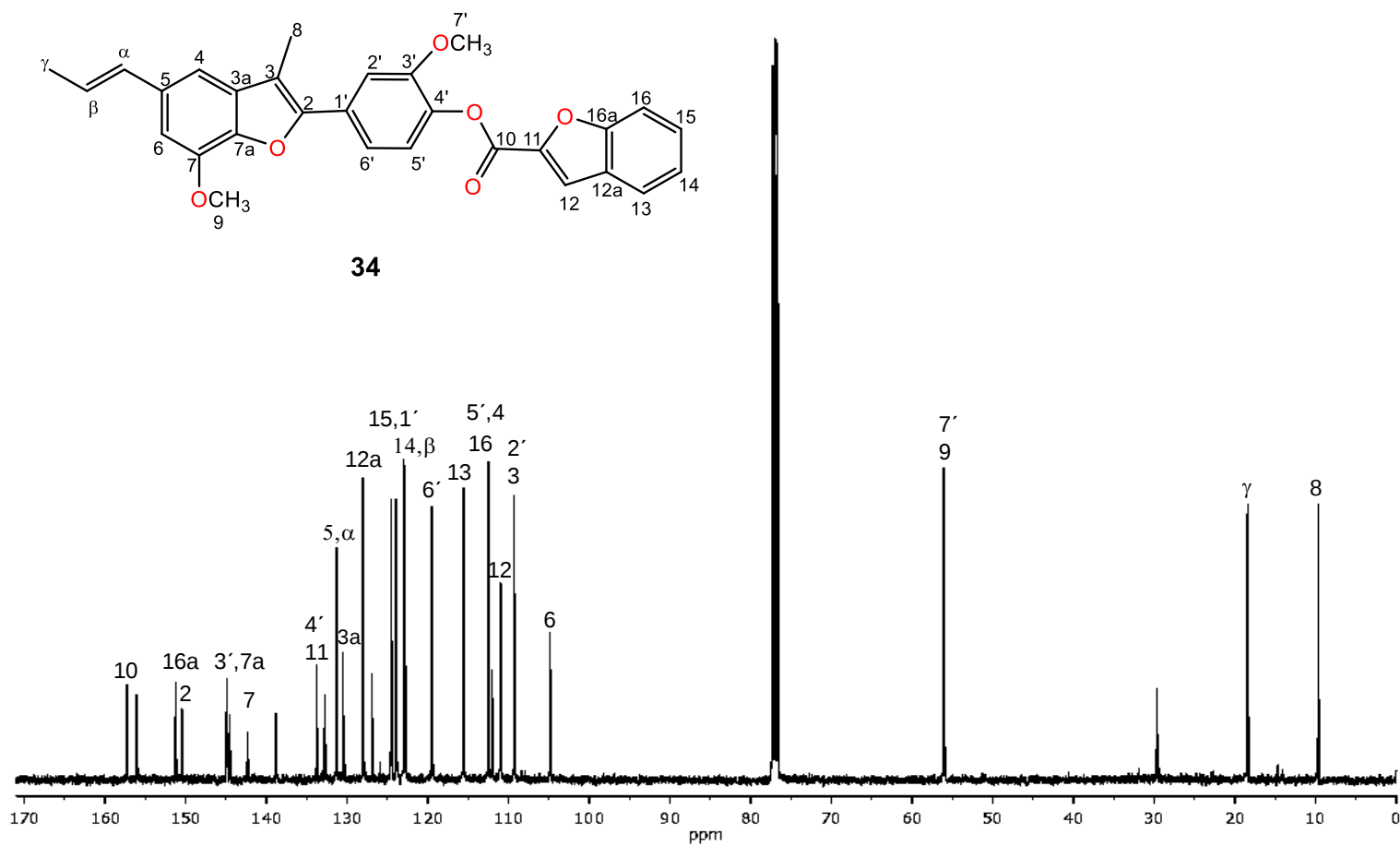


Figura 57. Espectro de RMN de ¹³C en CDCl₃ a 100 MHz de benzofuran-2-carboxilato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**34**).

***o*-Clorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (35)**

Se utilizó **20** como materia prima para la obtención del derivado **35**, utilizando cloruro de *o*-clorocinamoilo como reactivo en presencia de piridina en baño de vapor, se obtuvieron 22 mg en forma de sólido blanco y se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 58.

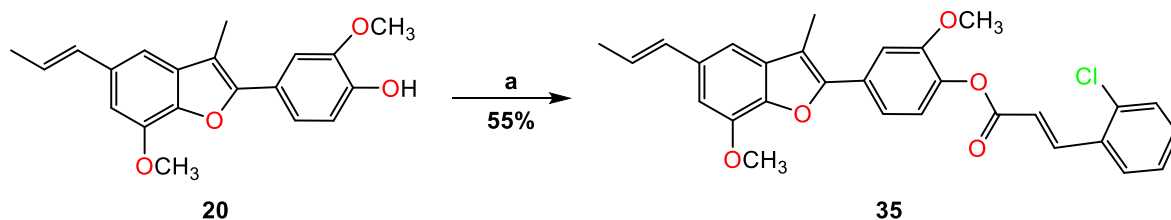


Figura 58. Reactivos y condiciones para **35**. (a) Cloruro de *o*-clorocinamoilo, piridina, b.v., 4 h.

En el espectro de RMN de ^1H de **35** (Figura 59), se observa en 8.32 ppm una señal doble ($J = 16.0$ Hz) para H-12 y en 6.69 ppm (d, $J = 16.0$ Hz) para el H-11 en un sistema AX. En 7.40 ppm una señal doble de dobles ($J = 8.3, 1.2$ Hz) para H-16. Entre 7.33 ppm una señal múltiple correspondiente a los hidrógenos H-17, H-16', H-2', no se identificó la señal en 5.78 ppm del hidrógeno de hidroxilo. En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 60), En 164.4 se aprecia la señal que corresponde al carbono del carbonilo del éster C-10, en 144.9 ppm el carbono base de éster C-4', en 139.4 y 119.4 ppm los carbonos vinílicos C-12 y C-11. Así mismo en 132.8 ppm el carbono base de Cl (C-14) y en 133.7, 130.2, 130.1, 127.8 y 127.1 ppm las demás señales de los nuevos carbonos aromáticos agregados al sistema correspondientes identificados como C-13, C-16, C-15, C-17 y C-18.

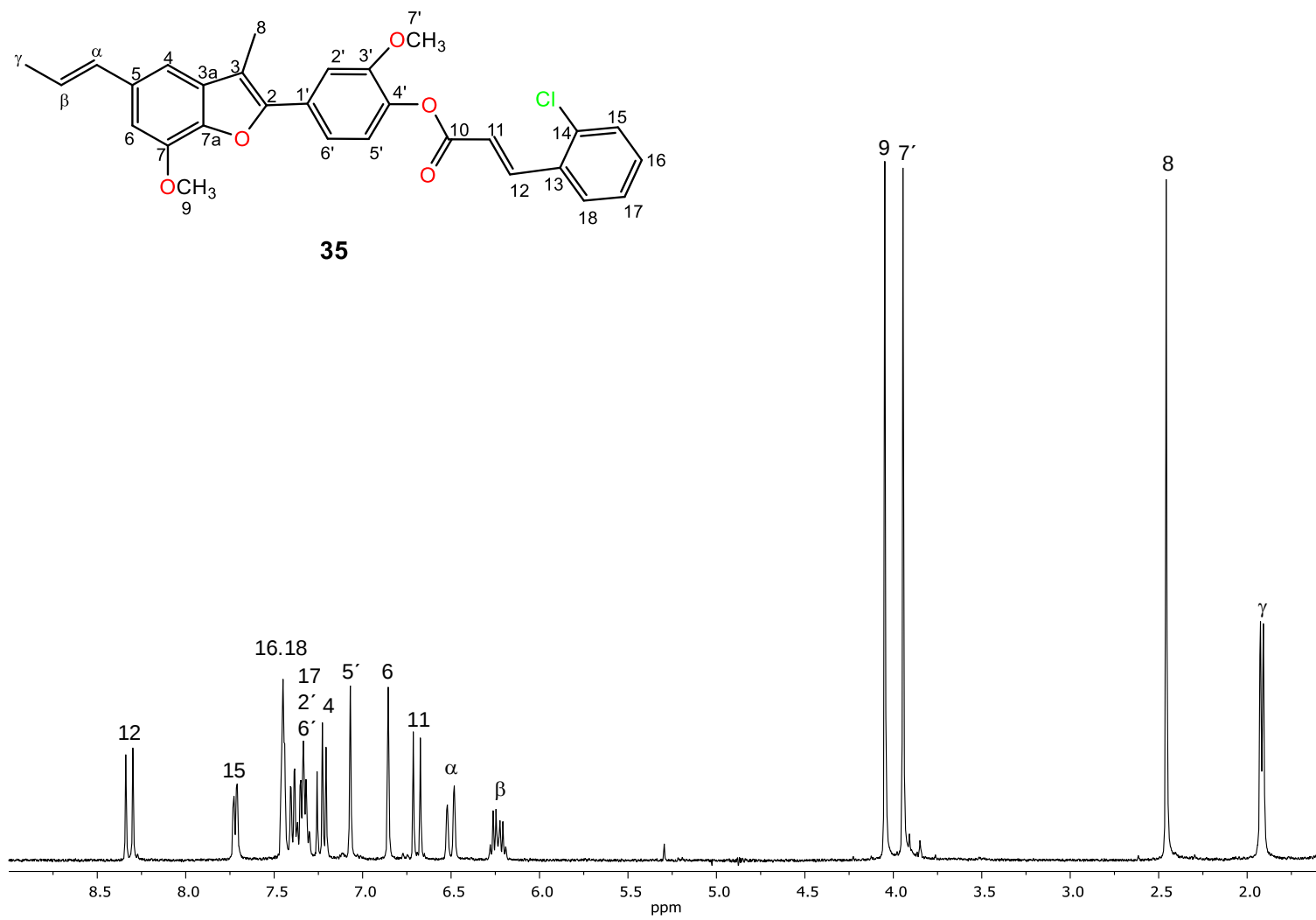


Figura 59. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de *o*-clorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**35**).

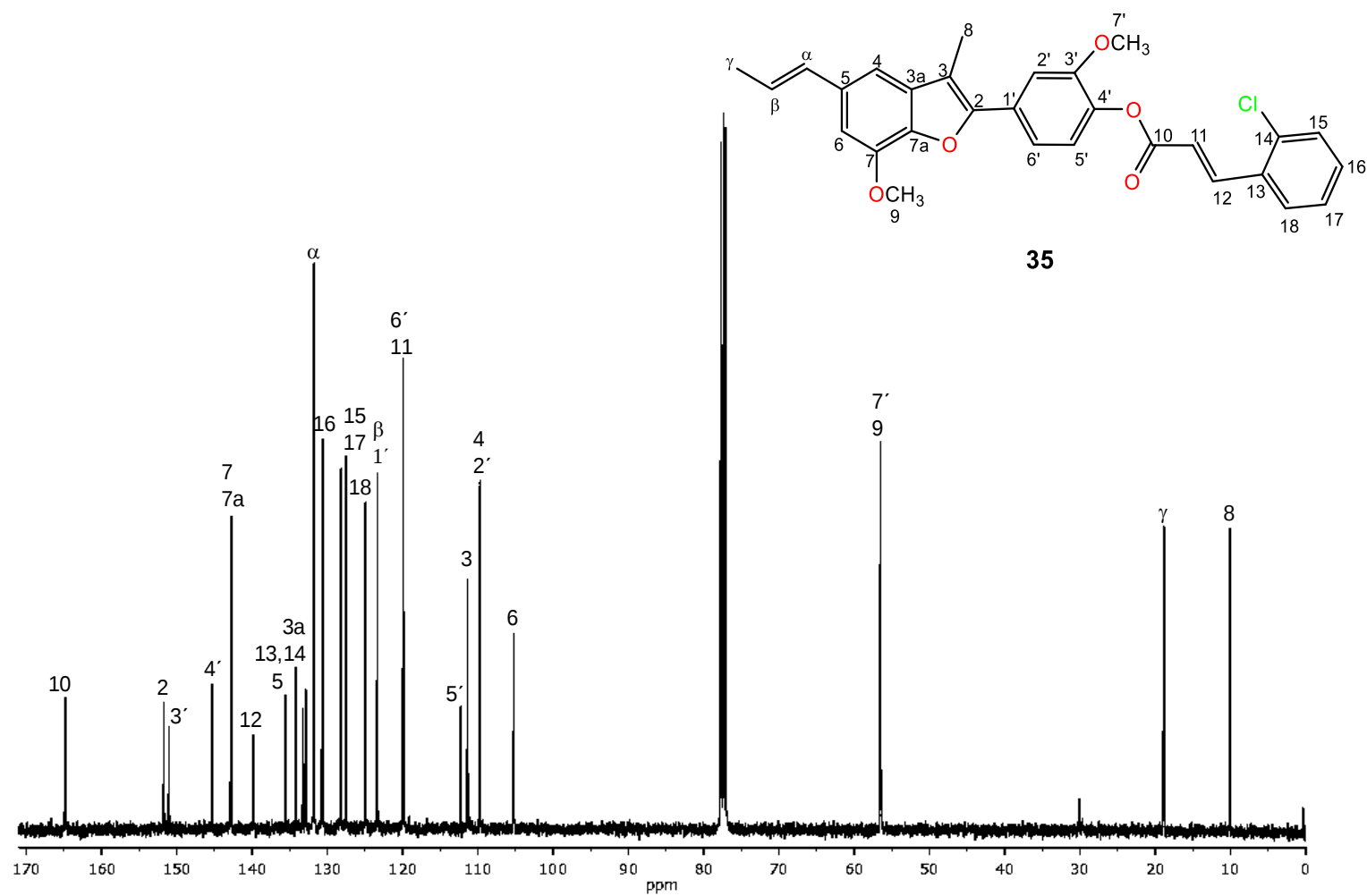


Figura 60. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de *o*-clorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**35**).

Cinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (36)

El derivado **36** se preparó a partir de **20** se utilizó como reactivo el cloruro de cinamoilo en presencia de piridina en baño de vapor y se obtuvieron 21 mg del derivado en forma de sólido blanco, el cual fue analizado mediante RMN ^1H y ^{13}C , Figura 61.

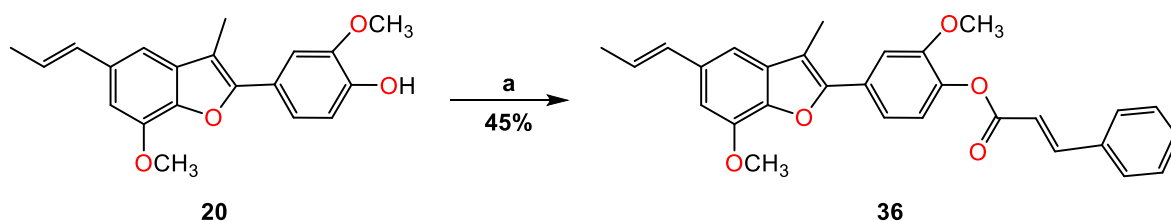


Figura 61. Reactivos y condiciones para **36**. (a) Cloruro de cinamoilo, piridina, b.v., 4 h.

En su espectro de RMN de ^1H (Figura 62), se apreció dos señales dobles con una constante de acoplamiento ($J = 16.0$ Hz) en 7.94 ppm y 6.73 ppm correspondientes a los hidrógenos vinílicos H-12 y H-11 en un sistema AX. En 7.63 ppm una señal doble de dobles ($J = 5.7, 2.5$ Hz) para los hidrógenos H-14 y H-14'. En aproximadamente de 7.45 ppm una señal múltiple para los hidrógenos H-16, H-15 y H-15'. No se apreció la señal en 5.78 ppm del hidrógeno de hidroxilo. En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 63), en aproximadamente 164.6 ppm la señal del carbono del carbonilo del éster C-10, en 144.8 ppm además el carbono base de éster C-4', en 139.4 y 119.6 ppm los carbonos vinílicos C-12 y C-11. También se apreciaron en 134, 132.4, 127.9 ppm, las demás señales no presentaron diferencias significativas frente a **20**.

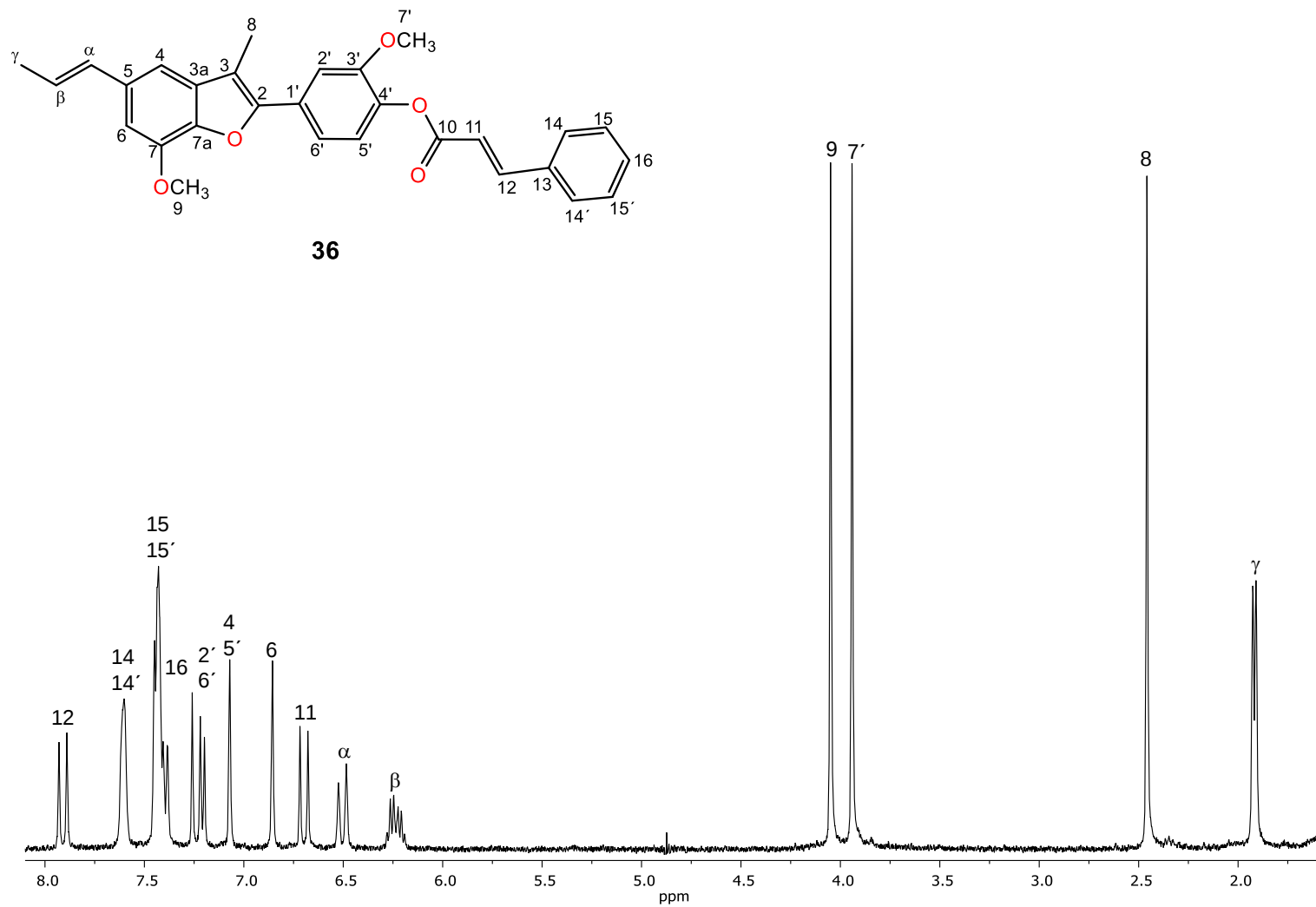


Figura 62. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de cinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**36**).

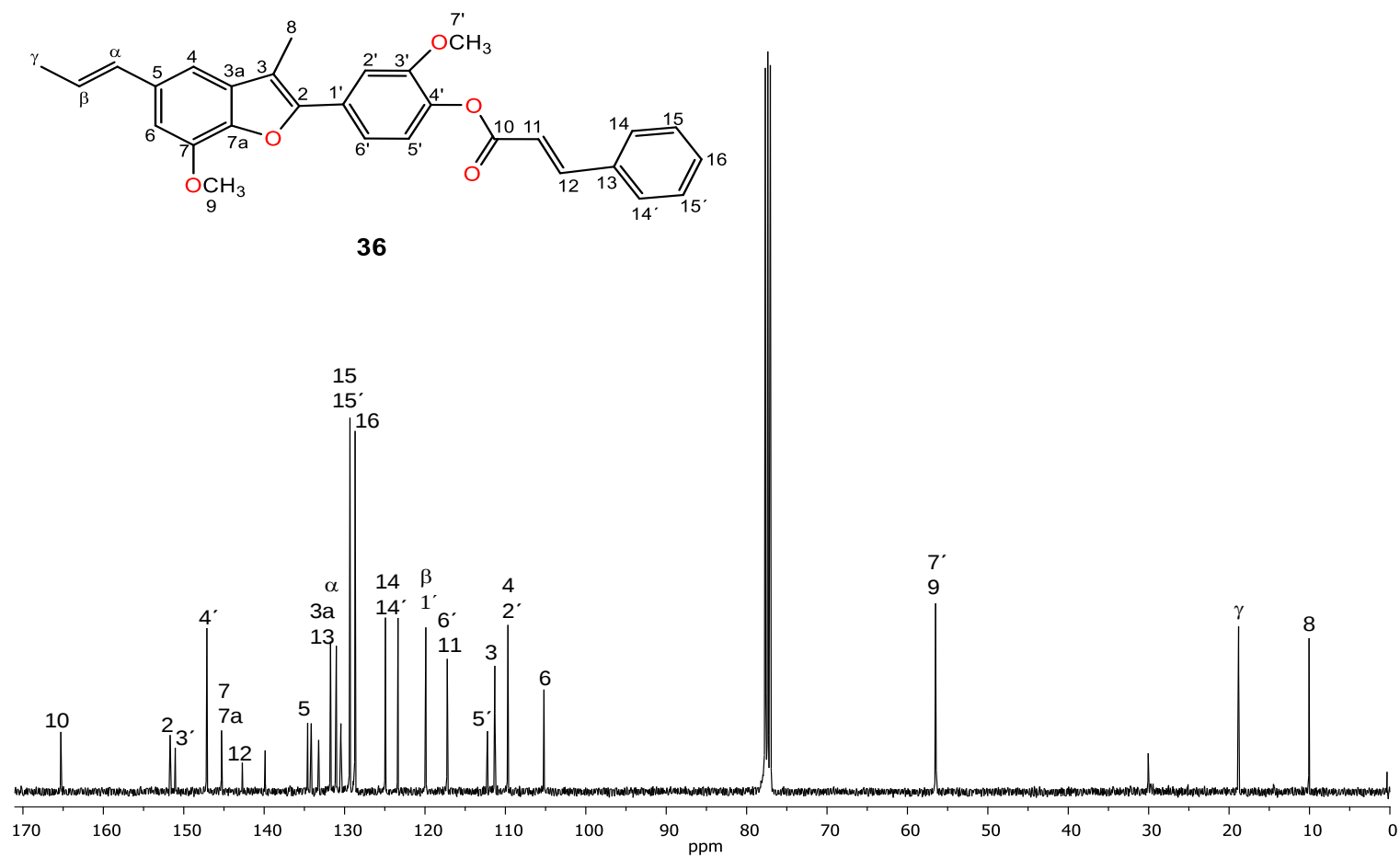


Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de cinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (36).

Derivados de la licarina-A (21)

Acetato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (37)

La preparación del derivado **37** se llevó a cabo por tratamiento de la licarina-A (**21**) con piridina y anhídrido acético en baño de vapor durante 4 horas, se obtuvieron 25 mg del compuesto de interés, el cual se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 64.

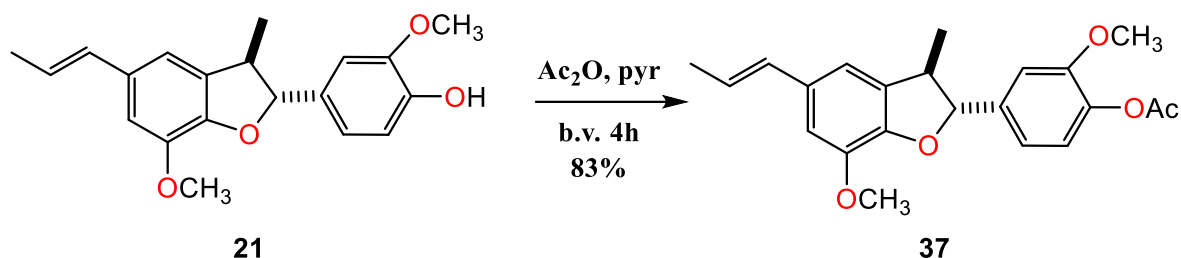


Figura 64. Condiciones para la obtención del acetato de la licarina-A.

El espectro de RMN de ^1H de **37** (Figura 65) se identificó una señal simple alrededor de 2.31 ppm característica del metilo de acetato, no se presentó la señal en 5.66 ppm del hidrógeno del hidroxilo. Las señales restantes no mostraron diferencias respecto a **21**.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 66) se identificó en 169.1 ppm la señal del carbonilo de acetato y en 20.5 ppm la señal identificada para el metilo del acetato.

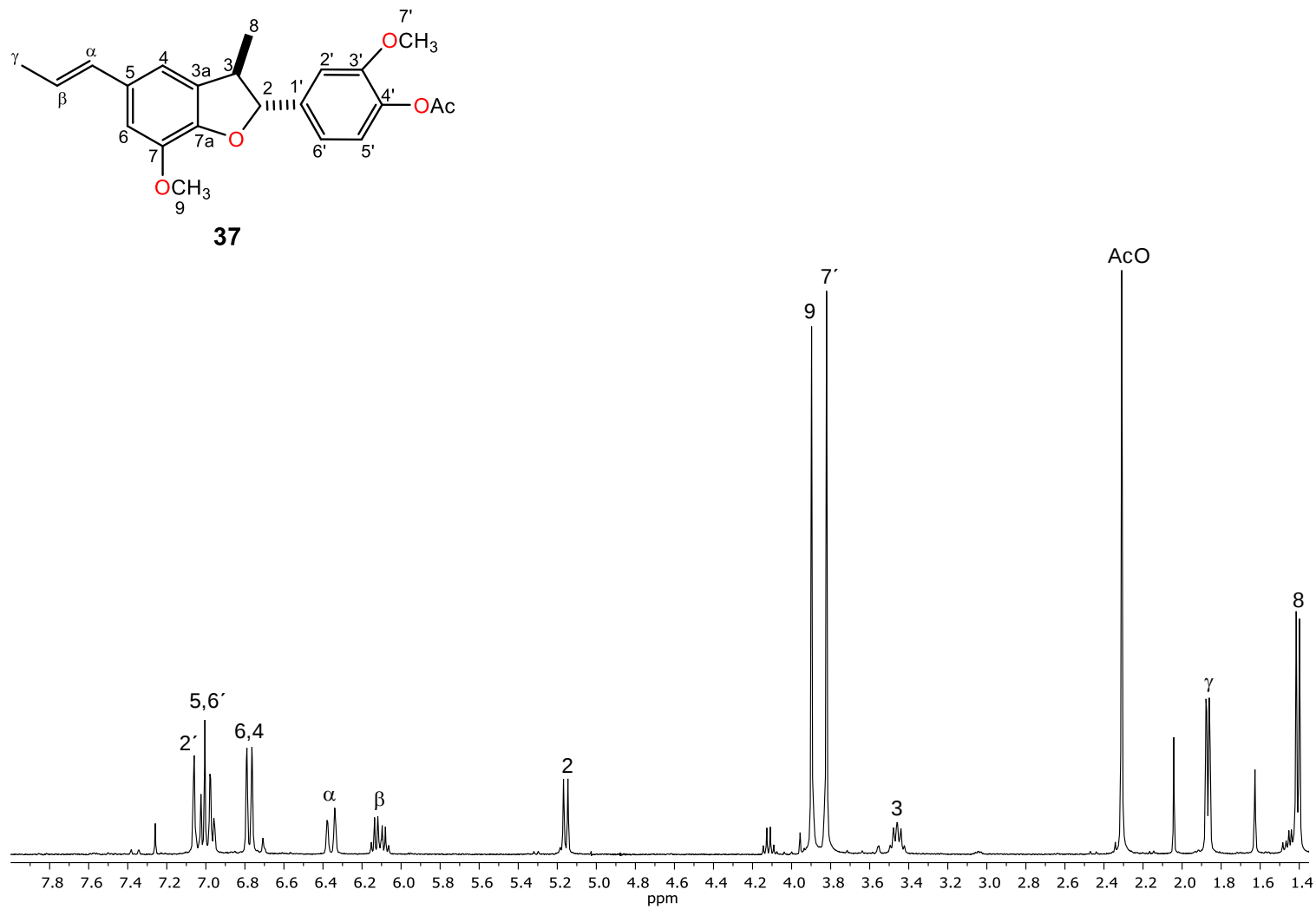


Figura 65. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de acetato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (37).

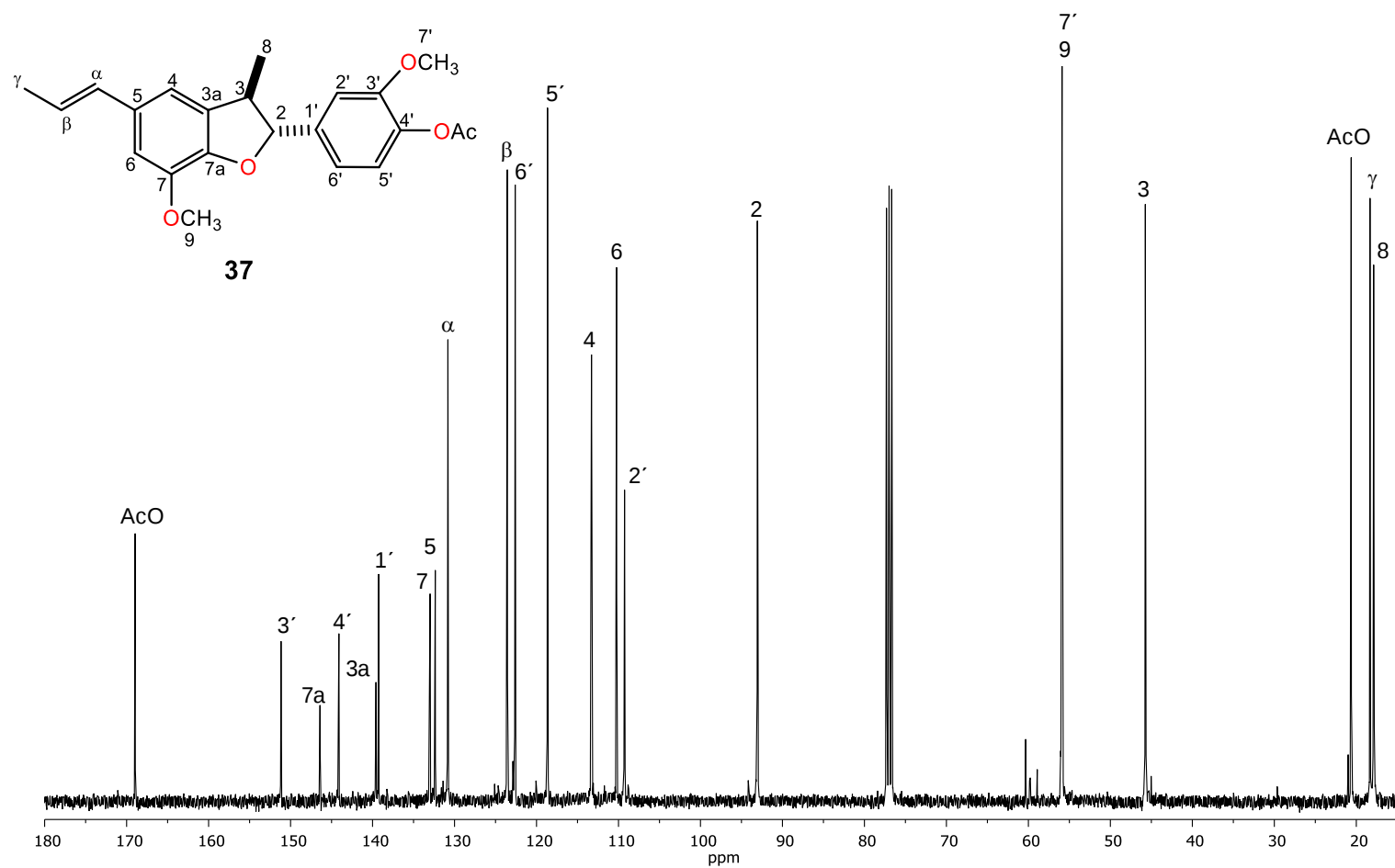


Figura 66. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de acetato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**37**).

***p*-Fluorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**38**)**

A partir de **21** se preparó su derivado **38** utilizando el cloruro de *p*-fluorocinamoilo como reactivo en presencia de piridina y en baño de vapor. Se obtuvieron 20 mg del derivado como una miel blanquecina y se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 67.

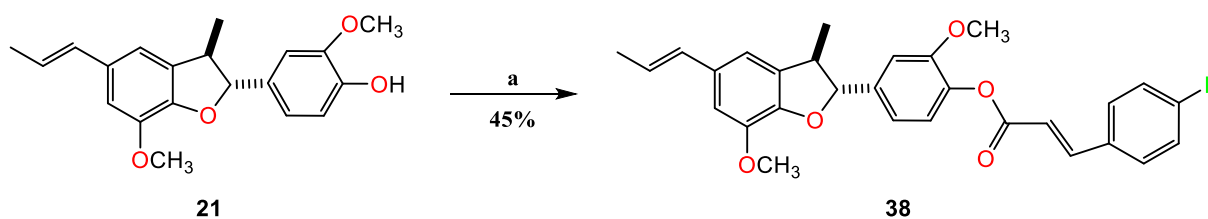


Figura 67. Reactivos y condiciones para **38**. (a) Cloruro de *p*-fluorocinamoilo, piridina, b.v., 4 h.

Se apreciaron nuevas señales en el espectro de RMN de ^1H del compuesto **38** (Figura 68) que corresponden al derivado formado; en 7.84 ppm (d, $J = 16.0$ Hz) y 6.59 ppm (d, $J = 16.0$ Hz) para los hidrógenos vinílicos H-12 y H-11 en un sistema AX. También en alrededor de 7.58 ppm una señal múltiple que integra para 2 hidrógenos correspondientes a H-14 y H-14'. En aproximadamente 7.10 ppm una señal múltiple que integra para 4 hidrógenos H-15, H-15', H-5' y H-6'. Respecto a su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 69), se apreció en 165.3 la señal que corresponde al carbono del carbonilo del éster C-10, en 144.1 ppm el carbono base de éster C-4', en 145.3 y 116.6 ppm los carbonos vinílicos C-12 y C-11. En 164.8 ppm se identificó el carbono base de fluor (C-16) y en 130.2, 130.1, y en 116.2 ppm para los carbonos C-14 y C-14', C-13, C-15 y C-15' respectivamente, las demás señales no sufren cambios significativos respecto a **21**.

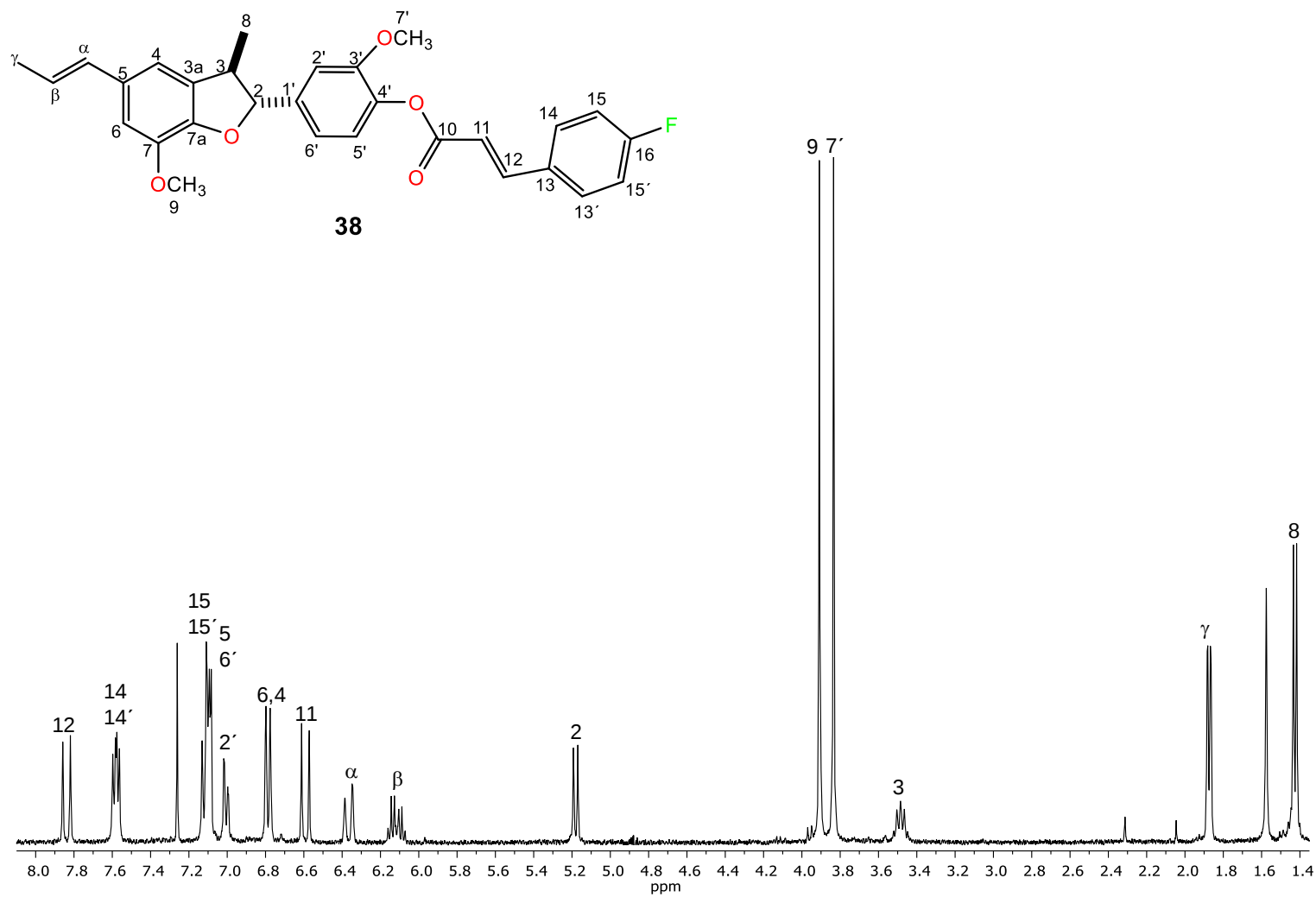


Figura 68. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de *p*-fluorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**38**).

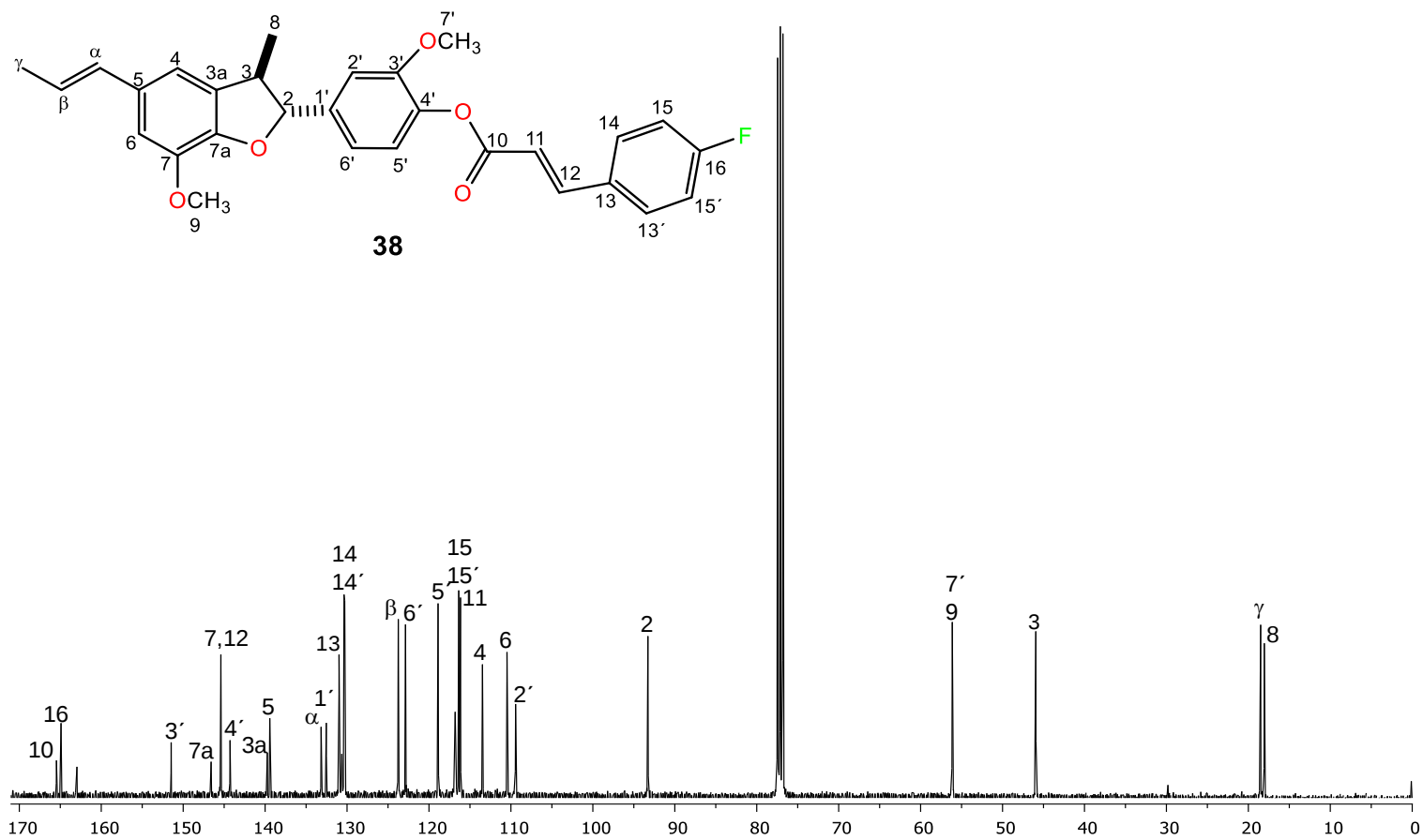


Figura 69. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de *p*-fluorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**38**).

Benzofuran-2-carboxilato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (39)

El derivado **39** se preparó a partir de **21** utilizando como reactivo el cloruro de benzofurano-2-carbonilo en presencia de piridina y en baño de vapor, se obtuvieron 23 mg de su derivado como un aceite denso amarillo, el cual se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 70.

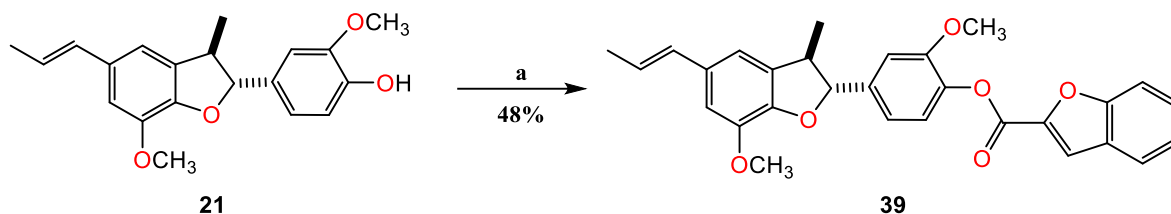


Figura 70. Reactivos y condiciones para **39**. (a) Cloruro de benzofurano-2-carbonilo, piridina, b.v., 4 h.

El espectro de RMN de ^1H del derivado **39** (Figura 71), se asignó una señal múltiple que integra para los 2 hidrógenos de H-12 y H-13 en 7.74 ppm. En aproximadamente 7.64 ppm una señal doble para H-16 ($J = 8.4$ Hz), así como en 7.49 ppm (t, $J = 7.8$ Hz) para H-15. En 7.34 ppm se identificó una señal triple con una $J = 7.3$ Hz para H-14. En H-5' y H-6' se identificaron señales dobles en 7.18 ppm con $J = 8.1$ Hz y en 7.12 ppm con una $J = 1.4$ Hz respectivamente. Se observó en su espectro de RMN de ^{13}C (Figura 72) alrededor de 157.3 ppm la señal que corresponde al carbono del carbonilo del éster C-10, en 144.1 ppm el carbono base de éster C-4', en 156.1 y 126.9 ppm los carbonos puentes 16a y 12a, y en 151.3, 127.9, 126.9, 123.6, 122.6, 113.3 y 112.4 ppm las demás señales de los carbonos aromáticos de nuevo derivado C-16a, C-15, C-12a, C-14, C-13, C-16 y C-12 respectivamente. Las demás señales no mostraron diferencias con respecto al compuesto de partida **21**.

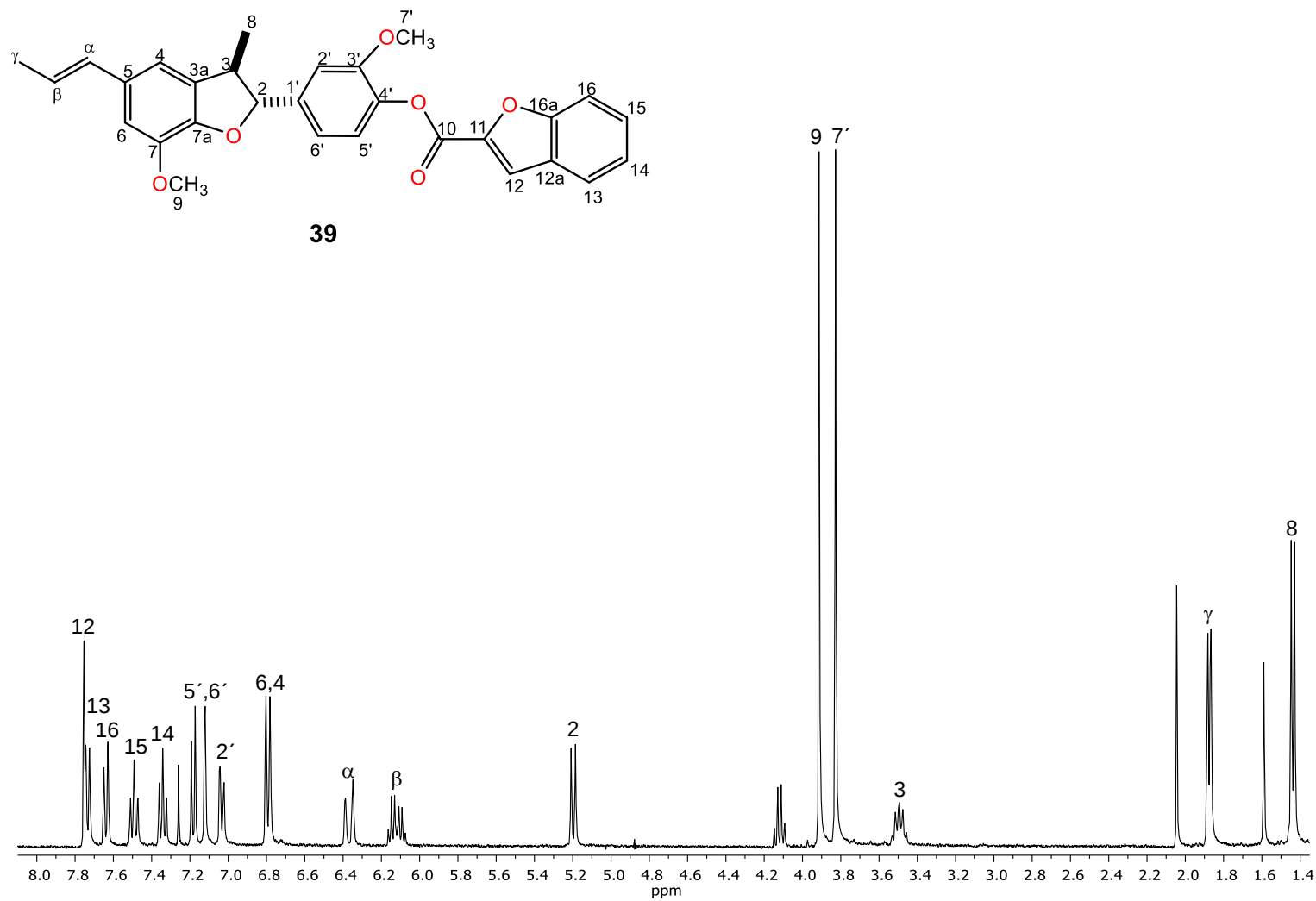


Figura 71. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de benzofuran-2-carboxilato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**39**).

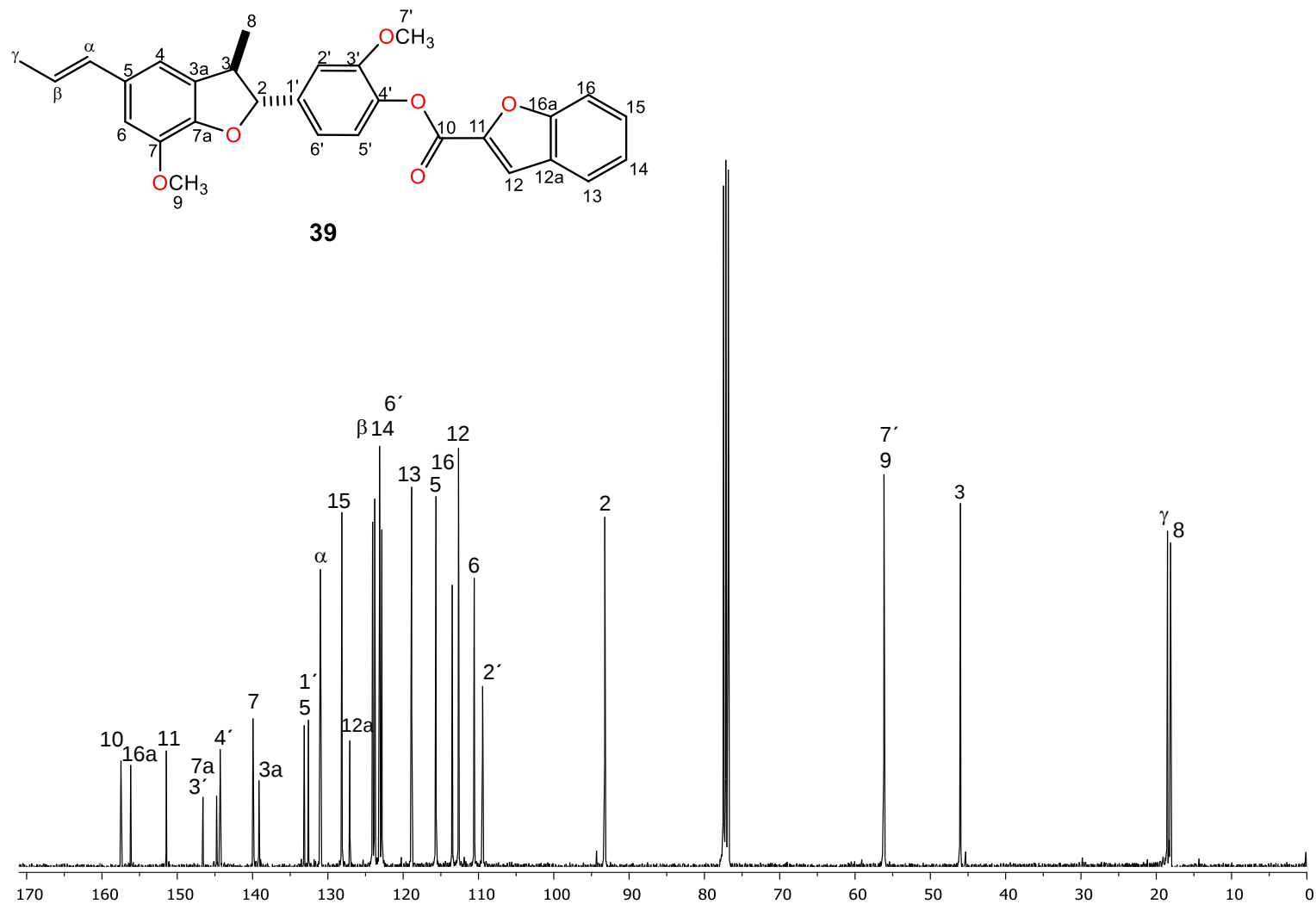


Figura 72. Espectro de RMN de ¹³C en CDCl₃ a 100 MHz de benzofuran-2-carboxilato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**39**).

***o*-Clorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**40**)**

A partir de **21** se preparó el derivado **40**, utilizando el cloruro de *o*-clorocinamoilo como reactivo en presencia de piridina y en baño de vapor, se obtuvieron 20 mg de dicho derivado como una miel transparente y fue analizado mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 73.

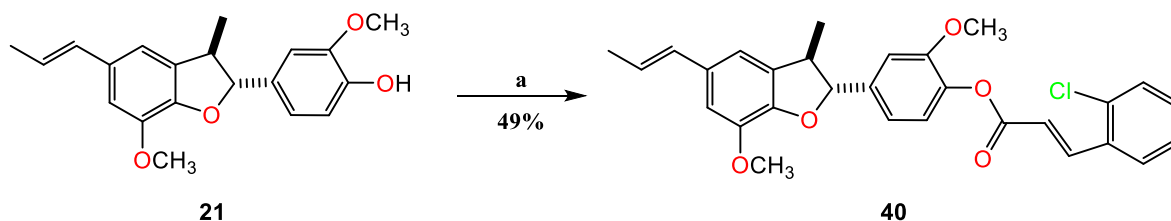


Figura 73. Reactivos y condiciones para **40**. (a) Cloruro de *o*-clorocinamoilo, piridina, b.v., 4 h.

En el espectro de RMN de ^1H del derivado **40** (Figura 74), se apreciaron señales respecto a una señal doble en 8.29 ppm para H-12 ($J = 16.0$ Hz) también una señal doble en 6.67 ppm con una constante de acoplamiento de 16.0 Hz para H-11 en la región vinílica de la molécula en un sistema AX. También se apreciaron señales en la sección adicionada del derivado **41** en 7.71 ppm se apreció una señal doble de dobles para H-15 con una $J = 7.1$, 1.9 Hz también una señal del sistema aromático adicionado en 7.45 ppm para el compuesto H-18 con una $J = 7.7$, 1.4 Hz. En las señales para H-16 y H-17 se apreció una señal múltiple en 7.34 ppm correspondientes al mismo sistema aromático. El resto de las señales para **41** no fue significativamente diferente a la materia de partida. En cuanto al espectro de RMN de ^{13}C (Figura 75), las señales se caracterizaron en 164.4 ppm por mostrar una señal del carbono del carbonilo del éster C-10. En 142.3 ppm se apreció una señal para el carbono base de éster C-4', en 139.3 ppm y 119.5 ppm los carbonos vinílicos C-12 y C-11, en 130.3 ppm el carbono base de cloro. Adicionalmente en 132.6 ppm se identificó una señal para C-13, 130.4 ppm para los carbonos C-14 y C-16, en 127.8 y 127.3 ppm para C-15 y C-18, 123.6 ppm para el C-17.

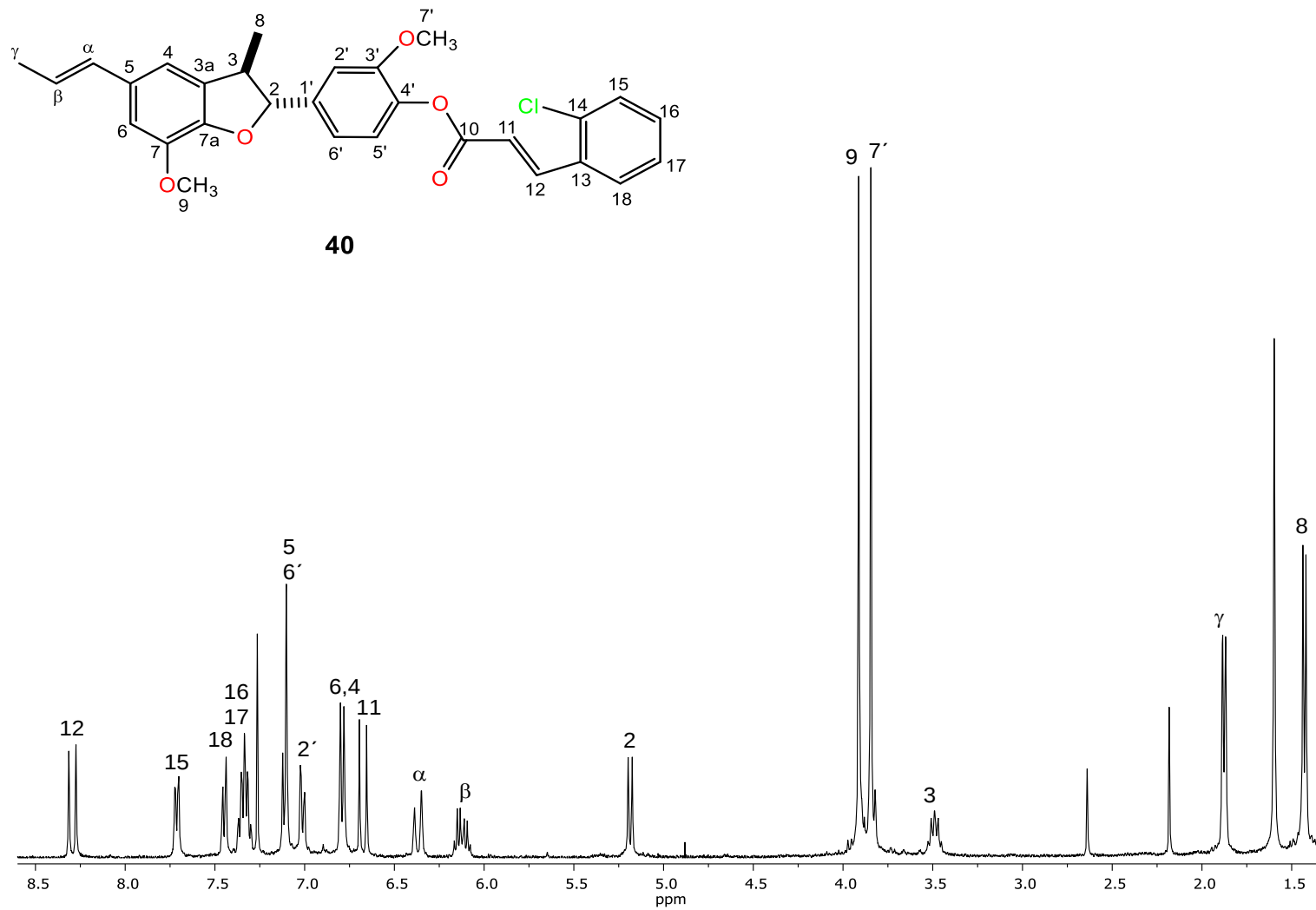


Figura 74. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de *o*-clorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**40**).

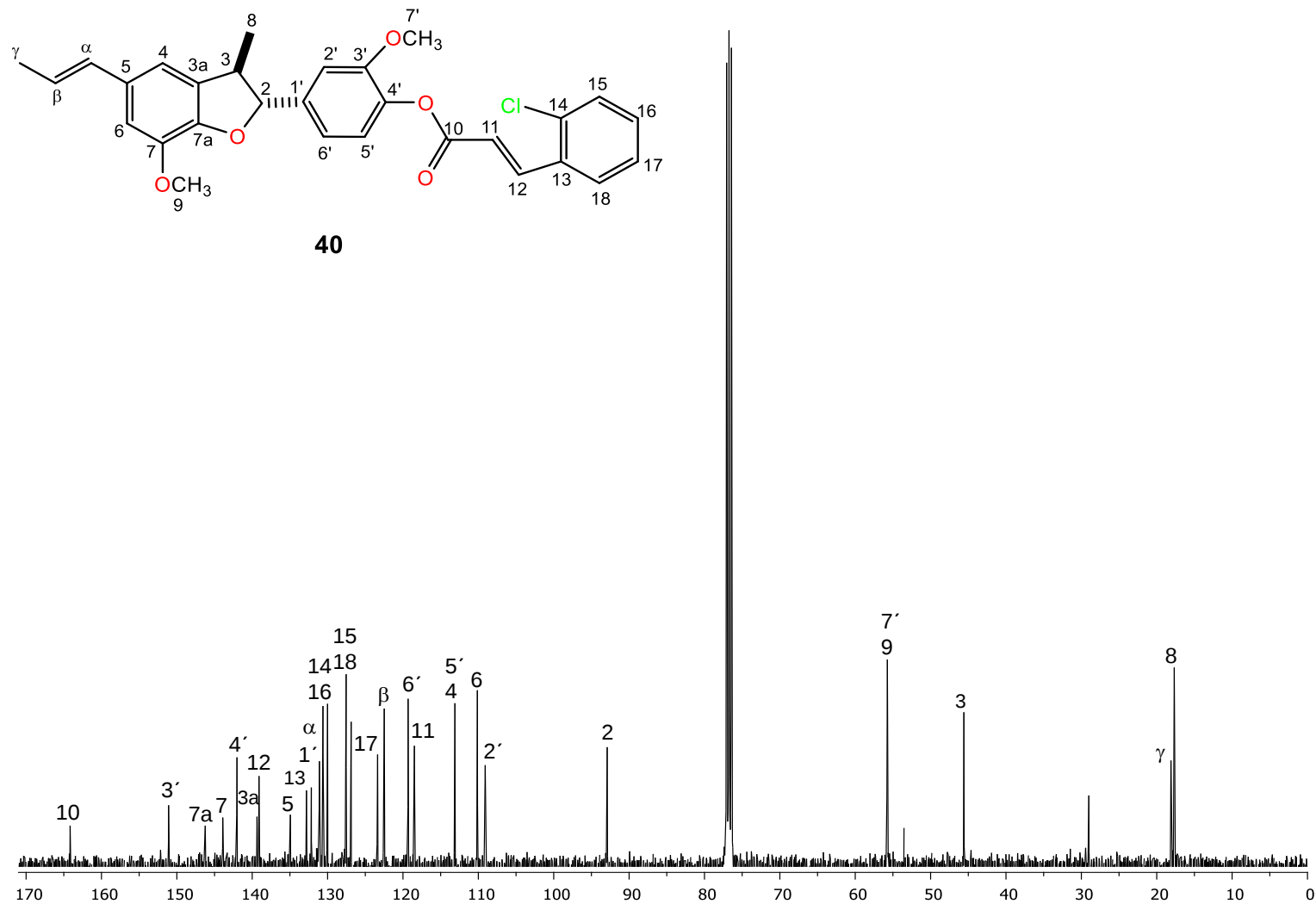


Figura 75. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de *o*-clorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**40**).

Cinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (41)

El derivado **41** se preparó a partir de **21** utilizando como reactivo el cloruro de cinamoilo en presencia de piridina y en baño de vapor, se obtuvieron 18 mg de su derivado como una miel transparente y se analizó mediante RMN de ^1H y ^{13}C , Figura 76.

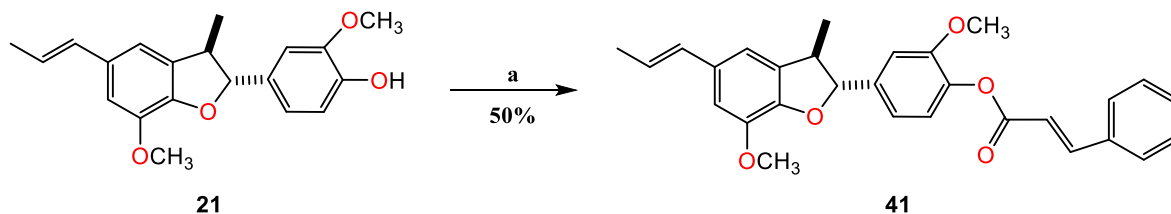


Figura 76. Reactivos y condiciones para **41**. (a) Cloruro de cinamoilo, piridina, b.v., 4 h.

En su espectro de RMN de ^1H (Figura 77) se apreciaron señales adicionales, una señal doble en 7.84 ppm y en 6.59 ppm (d, $J = 16.0, 15.9$ Hz) para los hidrógenos vinílicos H-12 y H-11 en un sistema AX. En 7.10 ppm se apreció una señal múltiple para H-16 y entre 7.54 y 7.61 ppm, así como un conjunto de señales múltiples para los hidrógenos H-14, H-14', H-15 y H-15' que integraron para 4 hidrógenos. Las demás señales no mostraron cambios significativos con respecto a **21**.

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 78), se observó en 164.8 ppm una señal asignada al carbono del carbonilo del éster C-10, en 151.4 ppm el carbono base de éster C-4', en 145.3 y 118.9 ppm los carbonos vinílicos C-12 y C-11. En 132.5, 130.8, 130.5, 130.2, 130.1 ppm se presentan las demás señales del derivado C-16, C-15, C-15', C-14 y C-14' respectivamente.

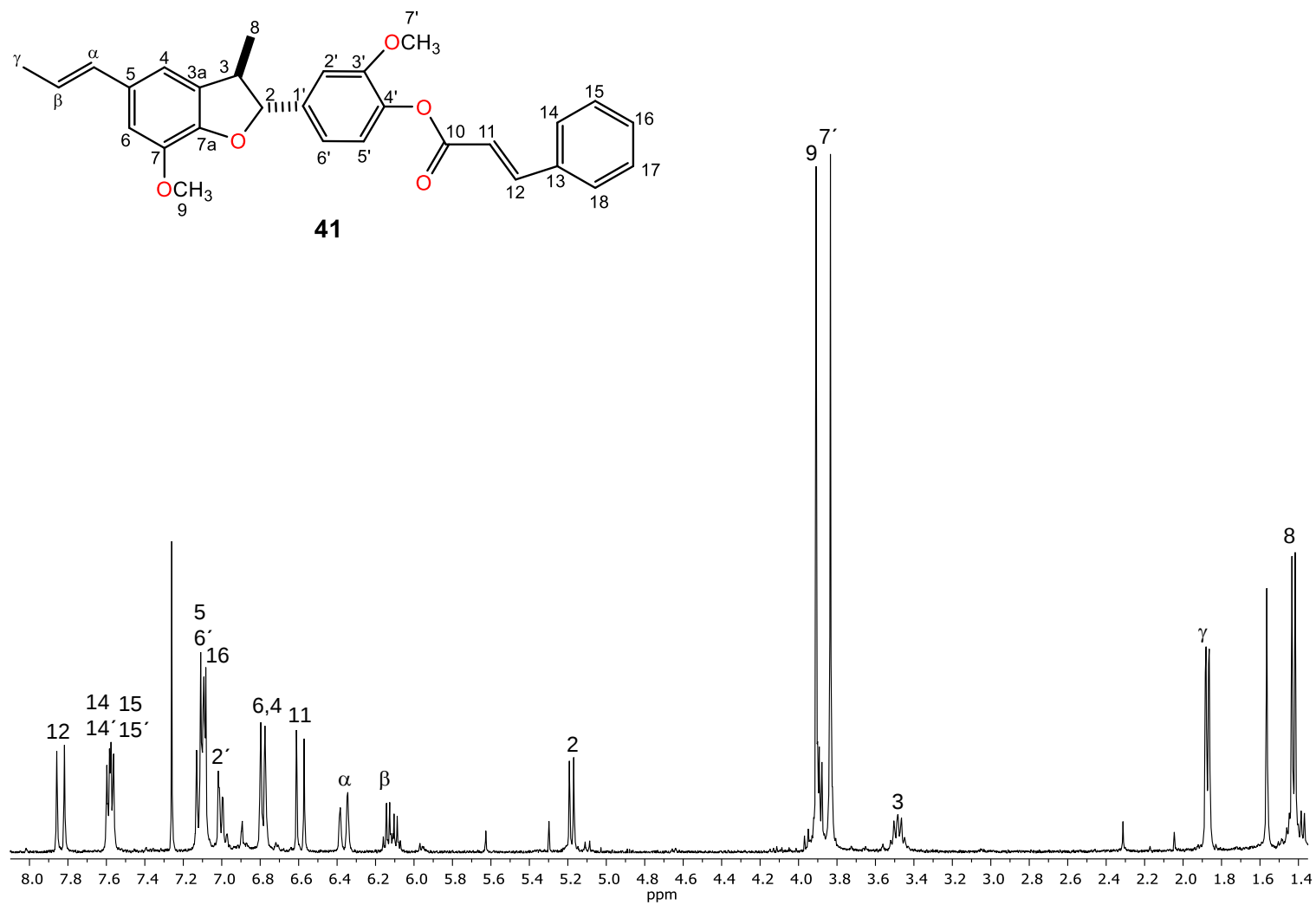


Figura 77. Espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 a 400 MHz de cinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**41**).

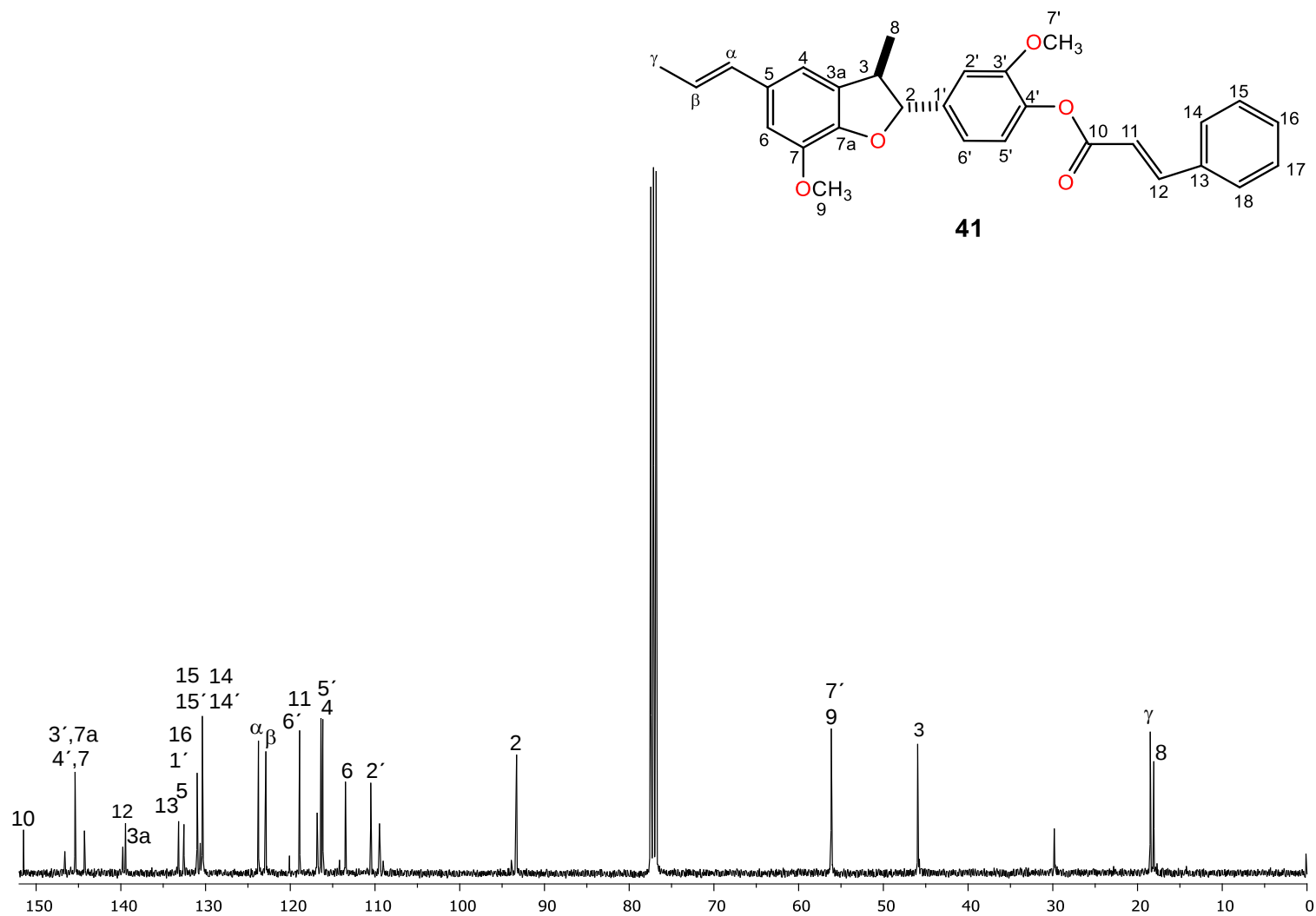
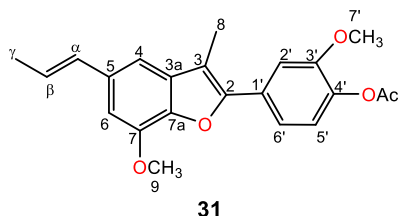


Figura 78. Espectro de RMN de ^{13}C en CDCl_3 a 100 MHz de cinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (**41**).

Datos espectroscópicos

Acetato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (31)

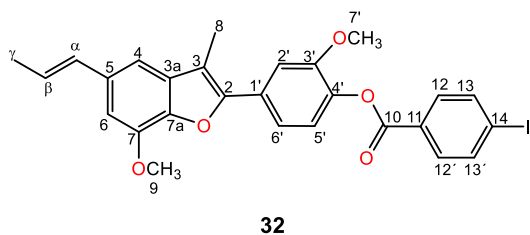


Sólido de color blanco con p.f. de: 108-110 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.41 (d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 7.36 (dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, H-6'), 7.12 (d, $J = 8.2$ Hz, H-4), 7.06 (s, H-5'), 6.85 (d, $J = 1.4$ Hz, H-6), 6.50 (d, $J = 15.7$, H- α), 6.23 (m, H- β), 4.04 (3H, s, H-9), 3.93 (3H, s, H-7'),

2.44 (3H, s, H-8), 2.34 (3H, s, AcO), 1.91 (3H, dd, $J = 6.6, 1.7$ Hz, H- γ).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 168.0 (C-AcO), 151.2 (C-2), 150.6 (C-3'), 144.9 (C-4'), 142.3 (C-7), 139.4 (C-7a), 133.8 (C-5), 131.4 (C-3 α), 130.1 (C-a), 124.6 (C- β y C-1'), 122.8 (C-6'), 119.5 (C-5'), 111.9 (C-3), 110.9 (C-4), 109.3 (C-2'), 104.8 (C-6), 56.1 (C-7' y C-9), 20.7 (Me-AcO), 18.4 (C- γ), 9.7 (C-8).

p-Yodobenzoato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (32)



Sólido de color blanco con p.f. de: 111-113 °C.

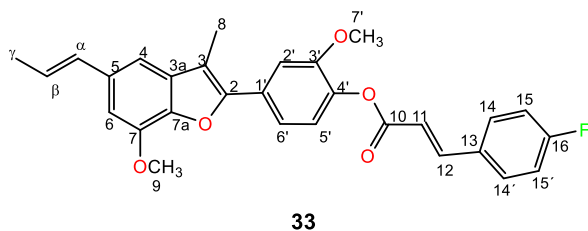
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.94 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-12, H-12'), 7.88 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-13 y H-13'), 7.45 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 7.40 (1H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz, H-6'), 7.24 (1H,

m, H-4) 7.07 (1H, s, H-5), 6.86 (1H, s, H-6), 6.50 (1H, dd, $J = 15.5, 2.0$ Hz, H- α), 6.23 (1H, m, H- β), 4.05 (3H, s, H-9), 3.91 (3H, s, H-7'), 2.46 (3H, s, H-8), 1.92 (3H, dd, $J = 6.7, 1.7$ Hz, H- γ).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 164.3 (C-10), 151.3 (C-2), 150.3 (C-3'), 144.9 (C-4'), 142.4 (C-7a), 139.4 (C-7), 139.4 (C-12 y C-12'), 133.8 (C-11), 133.0 (C-5), 131.8 (C-13 y C-13'), 131.4 (C-3 α), 130.5 (C- α), 128.7 (C- β), 124.6 (C-1'), 122.9 (6'), 119.5 (C-5'),

111.9 (C-3), 110.9 (C-4), 109.3 (C-2'), 104.8 (C-6), 101.5 (C-14), 56.1 (C-7' y C-9), 18.5 (C-γ), 9.7 (C-8).

***p*-Fluorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (**33**)**

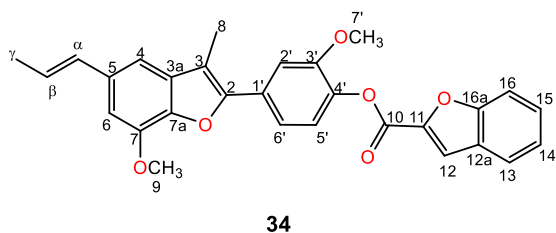


Sólido de color blanco con un p.f. de: 116-118 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.87 (d, $J = 16.0$ Hz, H-12), 7.60 (2H, dd, $J = 8.6, 5.4$ Hz, H-14 y H-14'), 7.45 (s, H-2'), 7.40 (1H, dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, H-6'),

7.20 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-15 y H-15'), 7.10 (2H, dd, $J = 18.2, 9.6$ Hz, H-4 y H-5'), 6.86 (1H, s, H-6), 6.62 (d, $J = 16.0$ Hz, H-11), 6.50 (1H, dd, $J = 15.3, 0.9$ Hz, H-α), 6.23 (1H, m, H-β), 4.05 (3H, s, H-9), 3.94 (3H, s, H-7'), 2.46 (3H, s, H-8), 1.93 (3H, dd, $J = 6.3, 0.6$ Hz, H-γ).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 165.4 (C-10), 164.8 (C-16), 151.3 (C-2), 150.3 (C-3' y C-12), 144.9 (C-4'), 142.4 (C-7a), 139.4 (C-7), 133.8 (C-5), 132.8 (C-3a), 132.4 (C-α), 130.6 (C-14 y C-14'), 130.2 (C-13), 124.6 (C-β), 122.9 (C-1'), 119.5 (6'), 116.7 (C-11), 116.5 (C-15 y C-15'), 111.9 (C-5'), 110.9 (C-3), 109.3 (C-4 y C-2'), 104.8 (C-6), 101.5 (C-14), 56.1 (C-7' y C-9), 18.5 (C-γ), 9.7 (C-8).

Benzofuran-2-carboxilato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (34**)**



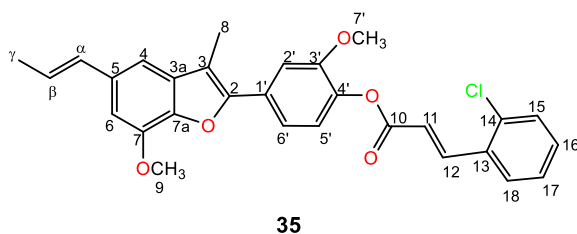
Sólido de color blanco con p.f. de: 105-107 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.78, (1H, s, H-12), 7.75 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-13) 7.65 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-16), 7.49 (2H, dd, $J = 15.0, 4.4$ Hz, H-15 y H-14), 7.41 (2H, m, H-2' y H-6'), 7.07 (2H, s, traslapadas, H-4 y H-5'), 6.86 (1H, s, H-6), 6.50 (dd, $J = 15.7, 1.3$

2' y H-6'), 7.07 (2H, s, traslapadas, H-4 y H-5'), 6.86 (1H, s, H-6), 6.50 (dd, $J = 15.7, 1.3$

Hz, H- α), 6.25 (1H, m, H- β), 4.05 (3H, s, H-9), 3.93 (3H, s, H-7'), 2.47 (3H, s, H-8), 1.92 (3H, dd, $J = 6.5, 1.1$ Hz, H- γ).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 157.2 (C-10), 151.2 (C-16a), 150.5 (C-2), 144.9 (C-3'), 144.5 (C-4'), 142.3 (C-11), 133.8 (C-7), 132.8 (C-7a), 131.3 (C-5 y C- α), 130.5 (C-3a), 124.3 (C-15), 115.3 (C-13), 123.7 (C-14), 122.9 (C- β), 120.8 (C-1'), 119.5 (C-6'), 115.6 (C-16), 110.7 (C-5' y C-12), 127.8 (C-12a), 110.9 (C-3), 109.3 (C-4 y C-2'), 104.8 (C-6), 56.1 (C-7' y C-9), 18.5 (C- γ), 9.7 (C-8).

o-Clorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (35)

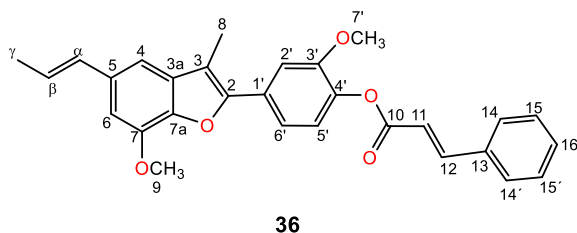


Sólido de color blanco con p.f. de: 108-109 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8.32 (d, $J = 16.0$ Hz, H-12), 7.72 (dd, $J = 7.2, 1.6$ Hz, H-15), 7.44 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-18), 7.40 (1H, dd, $J = 8.3, 1.2$ Hz, H-16), 7.33

(3H, m, traslapadas, H-17, H-6' y H-2'), 7.23 (s, H-4), 7.07 (s, H-5'), 6.86 (s, H-6), 6.69 (d, $J = 16.0$ Hz, H-11), 6.50 (d, $J = 15.6$ Hz, H- α), 6.23 (m, H- β), 4.05 (3H, s, H-9), 3.94 (3H, s, H-7'), 2.46 (3H, s, H-8), 1.92 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H- γ).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 164.4 (C-10), 151.3 (C-2), 150.6 (C-3'), 144.9 (C-4'), 142.4 (C-7 y C-7a), 139.4 (C-12), 135.2 (C-5), 133.8 (C-13), 132.9 (C-14), 131.4 (C-3a), 130.3 (C- α), 127.8 (C-16), 127.1 (C-15 y C-17), 124.5 (C-18), 122.9 (C- β y C-1'), 119.5 (C-6' y C-11), 111.9 (C-5'), 110.9 (C-3), 109.3 (C-4 y C-2'), 104.8 (C-6), 56.1 (C-7' y C-9), 18.4 (C- γ), 9.7 (C-8).

Cinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]benzofuran-2-il)fenilo (36)

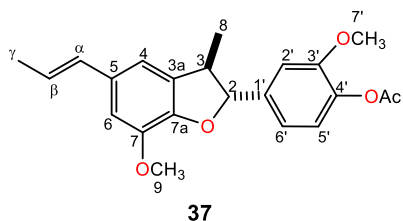


Sólido de color blanco con p.f. de: 100-103 °C. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.94 (d, $J = 16.0$ Hz, H-12), 7.63 (2H, dd, $J = 5.7$, 2.5 Hz, H-14 y H-14'), 7.45 (3H, m, traslapadas, H-16, H-15 y H-15'), 7.24 (2H,

d, traslapadas, H-2' y H-6'), 7.10 (2H, s, H-4 y H-5'), 6.89 (s, H-6), 6.73 (d, $J = 15.9$ Hz, H-11), 6.53 (dd, $J = 16.0$, 0.7 Hz, H- α), 6.26 (1H, m, H- β), 4.08 (3H, s, H-9), 3.97 (3H, s, H-7'), 2.49 (3H, s, H-8), 1.95 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H- γ).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 160.2 (C-10), 151.4 (C-2), 151.3 (C-3'), 146.8 (C-7), 146.5 (C-7a), 144.8 (C-12), 142.3 (C-4'), 134.2 (C-5), 133.8 (C-13), 133.7 (C- α), 133.0 (C-3a), 131.4 (C-15 y C-15'), 128.9 (C-14 y C-14'), 124.4 (C- β) 122.9 (C-1'), 120.6 (C-6'), 116.9 (C-11), 114.3 (C-5'), 110.9 (C-3), 109.4 (C-4 y C-2'), 104.8 (C-6), 56.1 (C-7' y C-9), 18.4 (C- γ), 9.7 (C-8).

Acetato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (37)



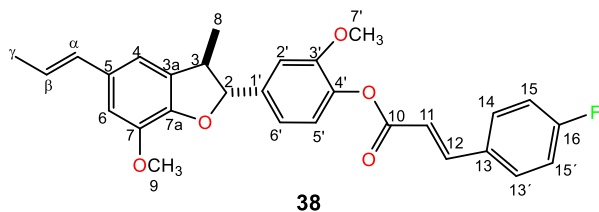
Miel blanquecina. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.06 (d, $J = 1.7$ Hz, H-2'), 7.00 (2H, m, H-5 y H-6'), 6.78 (2H, d, $J = 10.5$ Hz, H-6 y H-4), 6.36 (dd, $J = 15.7$, 1.9 Hz, H- α), 6.11 (m, H- β), 5.16 (d, $J = 9.1$ Hz, H-2), 3.90 (3H, s, H-9), 3.82 (3H, s, H-7'), 3.46 (m, H-3), 2.31 (3H, s, AcO),

1.87 (3H, dd, $J = 6.6$, 1.6 Hz, H- γ), 1.41 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-8).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 169.0 (C-AcO), 151.2 (C-3'), 146.5 (C-7a), 144.3 (C-4'), 139.6 (C-3a), 139.3 (C-1'), 133.0 (C-7), 132.4 (C-5), 130.8 (C- α), 123.6 (C- β), 122.6

(6'), 118.7 (C-5'), 113.3 (C-4), 110.3 (C-6), 109.3 (C-2'), 93.1 (C-2), 55.9 (C-7' y C-9), 45.8 (C-3), 20.7 (Me-AcO), 18.4 (C- γ), 17.9 (C-8).

***p*-Fluorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (38)**

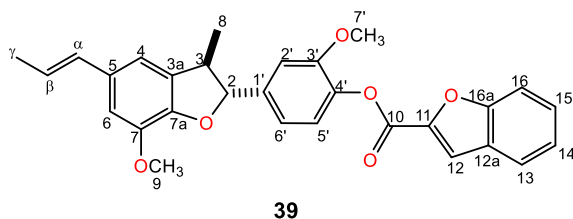


Miel blanquecina. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.84 (d, $J = 16.0$ Hz, H-12), 7.58 (2H, dd, $J = 8.6, 5.4$ Hz H-14 y H-14'), 7.10 (4H, m, H-15 y H-15', H-5' y

H-6'), 7.01 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, H-2'), 6.79 (2H, dd, $J = 9.0$ Hz, H-6 y H-4), 6.59 (d, $J = 16.0$ Hz, H-11), 6.37 (m, H- α), 6.12 (m, H- β), 5.18 (d, $J = 9.1$ Hz, H-2), 3.91 (3H, s, H-9), 3.83 (3H, s, H-7'), 3.48 (dq, $J = 9.6, 6.9$ Hz, H-3), 1.87 (3H, dd, $J = 6.6, 1.6$ Hz, H- γ), 1.43 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-8).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 165.3 (C-10), 164.8 (C-16), 151.3 (C-3'), 146.4 (C-7a), 145.3 (C-7 y C-12), 144.3 (C-4'), 139.6 (C-3a), 139.1 (C-5), 132.9 (C- α), 132.5 (C-1'), 130.9 (C-13), 130.3 (C-14 y C-14'), 123.9 (C- β), 122.8 (C-6'), 118.7 (C-5'), 116.3 (C-15 y C-15'), 116.0 (C-11), 113.4 (C-4), 110.5 (C-6), 109.5 (C-2'), 93.2 (C-2), 55.8 (C-7' y C-9), 45.7 (C-3), 18.3 (C- γ), 17.7 (C-8).

Benzofuran-2-carboxilato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (39)



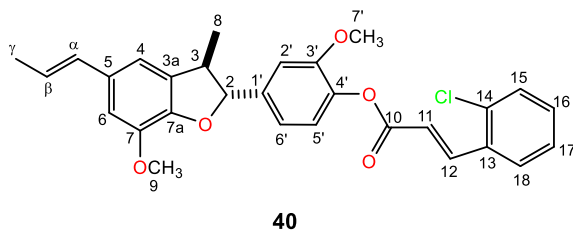
Miel de color amarilla. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.74, (2H, m, H-12 y H-13), 7.64 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-16), 7.49 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-15), 7.34 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-14) 7.18 (d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 7.12 (d, $J =$

1.4 Hz, H-6'), 7.03 (dd, $J = 8.2, 1.4$ Hz, H-2'), 6.79 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6 y H-4), 6.37 (dd, $J = 15.7, 1.2$ Hz, H- α), 6.12 (1H, m, H- β), 5.20 (d, $J = 9.1$ Hz, H-2), 3.91 (3H, s, H-9),

3.83 (3H, s, H-7'), 3.49 (dq, $J = 10.7, 7.0$ Hz, H-3), 1.88 (3H, dd, $J = 6.6, 1.1$ Hz, H- γ), 1.44 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-8).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 157.3 (C-10), 156.0 (C-16a), 151.3 (C-11), 146.4 (C-3'), 144.6 (C-7a), 144.2 (C-4'), 139.8 (C-7), 139.0 (C-3a), 133.1 (C-5), 132.5 (C-1'), 130.9 (C- α), 128.1 (C-15), 126.9 (C-12a), 123.8 (C- β), 120.8 (C-1'), 123.5 (C-14), 122.6 (6'), 118.6 (C-13), 115.5 (C-5'), 113.2 (C-16), 112.4 (C-12), 110.3 (C-6), 109.2 (C-2'), 93.1 (C-2), 55.9 (C-7' y C-9), 45.8 (C-3), 18.4 (C- γ), 17.9 (C-8).

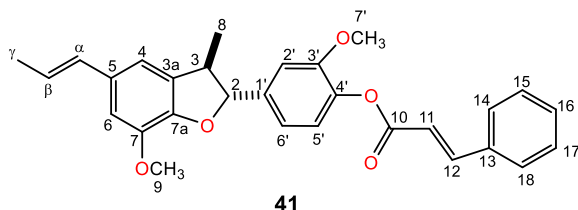
***o*-Clorocinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (40)**



Miel incolora. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8.29 (1H, d, $J = 16.0$ Hz, H-12), 7.71 (1H, dd, $J = 7.1, 1.9$ Hz, H-15), 7.45 (1H, dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, H-18), 7.34 (2H, m, H-16 y H-17), 7.11 (2H, d, $J = 8.1$, H-5 y H-6'), 7.01 (1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, H-2'), 6.79 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6 y H-4), 6.67 (d, $J = 16.0$ Hz, H-11), 6.37 (1H, dd, $J = 15.5, 0.8$ Hz, H- α), 6.12 (1H, m, H- β), 5.19 (d, $J = 9.2$ Hz, H-2), 3.91 (3H, s, H-9), 3.84 (3H, s, H-7'), 3.49 (1H, dq, $J = 9.9, 7.0$ Hz, H-3), 1.88 (3H, dd, $J = 6.5, 0.8$ Hz, H- γ), 1.43 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-8).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 164.4 (C-10), 151.3 (C-3'), 146.5 (C-7a), 145.3 (C-7), 142.3 (C-4'), 139.8 (C-3a), 139.4 (C-12), 135.3 (C-5), 132.4 (C-13), 131.4 (C-1'), 130.8 (C- α), 130.4 (C-14 y C-16), 127.9 (C-15), 127.1 (C-18), 123.6 (C-17), 122.8 (C- β), 119.5 (C-11), 118.9 (C-6'), 113.3 (C-5' y C-4), 110.3 (C-6), 109.5 (C-2'), 93.1 (C-2), 56.0 (C-7' y C-9), 45.7 (C-3), 18.4 (C- γ), 17.8 (C-8).

Cinamato de 2-metoxi-4-(7-metoxi-3-metil-5-[(*E*)-prop-1-en-1-il]-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)fenilo (41)



Miel incolora. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 7.84 (d, $J = 16.0$, H-12), 7.10 (m, H-16), 7.58 (2H, dd, H-15 y H-15') traslapada con 7.58 (2H, dd, H-14 y H-14'),

7.10 (2H, m, H-5 y H-6') traslapada con H-16, 7.01 (dd, $J = 8.1$, 2.0 Hz, H-2'), 6.79 (2H, d, H-6 y H-4), 6.59 (d, $J = 15.9$ Hz, H-11), 6.37 (dd, $J = 15.5$, 1.3 Hz, H- α), 6.11 (m, H- β), 5.18 (d, $J = 9.0$ Hz, H-2), 3.91 (3H, s, H-9), 3.84 (3H, s, H-7'), 3.49 (m, H-3), 1.87 (3H, dd, $J = 6.6$, 1.4 Hz, H- γ), 1.43 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-8).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 151.3 (C-10), 146.7 (C-4'), 146.6 (C-3' y C-7a), 145.7 (C-7), 144.1 (C-12), 139.2 (C-3a), 134.1 (C-13), 133.0 (C-5), 130.8 (C-1'), 130.6 (16), 128.9 (C-15 y 15'), 128.3 (C-14 y 14'), 123.6 (C- α), 122.7 (C- β), 119.1 (C-6), 118.7 (C-11), 113.9 (C-5'), 113.3 (C-4), 110.3 (C-6), 108.8 (C-2'), 93.8 (C-2), 55.9 (C-7' y C-9), 45.6 (C-3), 18.4 (C- γ), 17.8 (C-8).