

**DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES Y
SEMIVOLÁTILES, Y ÁCIDOS ARISTOLÓQUICOS EN *Aristolochia ringens*
Vahl.**

**NÉSTOR ARMANDO MARÍN SOLANO
SERGIO ANDRÉS ORDÓÑEZ CALDERÓN**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2008**

**DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES Y
SEMIVOLÁTILES, Y ÁCIDOS ARISTOLÓQUICOS EN *Aristolochia ringens*
Vahl.**

**NÉSTOR ARMANDO MARÍN SOLANO
SERGIO ANDRÉS ORDÓÑEZ CALDERÓN**

**Trabajo de Grado presentado como requisito
parcial para optar el Título de Químico**

Directora:

Elena E. Stashenko, Química Ph.D.

Co-director:

Jairo R. Martínez, Químico Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA

BUCARAMANGA

2008

Dedicado a mis padres Miguel Ángel y Graciela, especialmente a mi madre quien con su amor incondicional siempre supo mantener mi moral en alto.

Y a mis hermanos Juan Carlos y Cesar, quienes siempre supieron darme los mejores consejos en los momentos más difíciles.

Sergio Andrés Ordóñez Calderón

Dedicado a mis padres, Luis Eduardo Marín y Flor María Solano Modelo de valentía, perseverancia y de apoyo incondicional, este triunfo es nuestro.

A mis hermanos Luis Eduardo Marín y Alba Patricia Marín. A mi nonis

María Helena Solano. "Nuestra gloria más grande no consiste en no

haberse caído nunca, sino en haberse levantado después de

cada caída"(Confucio). A Yolanda Parada (mi flaquis)

Porque nada hay imposible para un corazón valeroso.

Néstor Armando Marín Solano

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer enormemente a los doctores Elena E Stashenko y Jairo René Martínez, por sus orientaciones y enseñanzas durante el desarrollo de la presente investigación, y por sus aportes para mi formación integral.

Con todo mi ser agradezco especialmente a mis padres Miguel Ángel Ordóñez y Graciela Calderón, por haber despertado en mí, desde niño, el interés por la academia. Por sus consejos, paciencia, preocupaciones, pero sobre todo por la confianza que tuvieron en mí.

A mi hermano Cesar Miguel por sus sabios consejos y amistad incondicional.
A mi hermano Juan Carlos, por ser mi ejemplo de perseverancia y lucha.

A la familia Herrera Calderón por su apoyo incondicional en mi vida universitaria.

A Néstor Marín, mi amigo y compañero de tesis, por el apoyo mutuo que siempre tuvimos en nuestras largas jornadas de trabajo.

A todos los compañeros del CENIVAM y el Laboratorio de Cromatografía, porque todos hicieron valiosísimos aportes en mi formación personal y profesional. Especialmente a Amandita, Martica, Carlitos, Ginna, Mónica, Alejo, Miguelo, Oscar, Fernando, Lautita, Fabián, Érica, Amner, Albertico, Elkin, Deya, el Churco, Margarita, Lucho y Eduardo.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron en mi realización profesional.

Sergio Andrés Ordóñez Calderón

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, porque todo lo puedo en Él, que me fortalece.

A mi maestra, la Dra. Elena E Stashenko, por su orientación, enseñanzas, y su confianza.

Al Dr. Jairo René Martínez, por sus aportes y aclaración de los diferentes conceptos.

A Sergio, por ser mi compañero de tesis y amigo, al cual le deseo fortuna y éxitos.

A los profesores de la UIS, en especial, al profesor Alirio Palma por su motivación.

A todos los compañeros de primer nivel y amigos, en especial, Melba, Jansen, Johan (El enano), Fredy, Carlos, Eder, Emilbus, Ximena, pablo, cuchi....

A todos los compañeros del centro de investigación CENIVAM y cromatografía, con los que compartimos tertulias, caminatas, trasnocho, hambre, sueño, y a los que molestaba por todo, el personal administrativo etc:

Carlos y Ginna (los chichos), Alejo (master`s MWHD), Mónica (la foca, puedes creerlo), Laura (la foquita), Miguel (canfeno), Oscar, Fabián y Erika, Manuel (mañe), a los profesores Amner, Alberto y Elkin, a Deya (por sus consejos), William, Margarita, a quienes cuidaron celosamente nuestras plantas (los jardineros), Cesar, Lucho y rambo.

Al biólogo y amigo Fernando Caropresse, por su importante aporte en el hallazgo y propagación de la *Aristolochia*.

A los compañeros de la SGS Carlos Salinas, Carlos Barros y Oscar Rangel (mala inversión), por cubrirme.

Néstor Armando Marín Solano

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEORICO	3
1.1 GENERALIDADES SOBRE LOS BEJUCOS	3
1.1.1 Semiepífitas trepadoras en Colombia	3
1.2 ARISTOLOCHIACEAE	3
1.2.1 <i>Aristolochias</i>	4
1.2.2 Análisis cuantitativo	4
1.2.3 Composición química de <i>Aristolochias</i>	9
1.2.4 Ácidos aristolóquicos	12
1.2.5 <i>Aristolochia ringens Vahl</i>	15
1.3 PROCESOS EXTRACTIVOS EN PLANTAS	16
1.3.1 Extracción de aceites esenciales	16
1.3.2 Extracción con solventes	19
1.3.3 Extracción con fluidos en estado supercrítico	19
1.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	20
1.4.1 Muestreo de sustancias orgánicas por <i>SPME</i>	21
1.5 TÉCNICA ANALÍTICA	23
1.5.1 Cromatografía	23
1.5.2 Cromatografía de gases	23
1.5.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	23
1.5.4 Cromatografía líquida	24
2. METODOLOGÍA	26
2.1 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA	26
2.2 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO	26
2.2.1 Reactivos y solventes	26
2.2.2 Materiales	27
2.2.3 Equipos menores	28

2.3 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	28
2.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON FLUIDO SUPERCRÍTICO	29
2.5 EXTRACCIÓN POR <i>HS-SPME IN-VITRO</i> DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE FLORES DE <i>ARISTOLOCHIA RINGENS</i>	31
2.6 EXTRACCIÓN <i>IN-VIVO</i> DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE FLORES DE <i>ARISTOLOCHIA RINGENS</i> POR <i>HS-SPME</i>	32
2.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	33
2.7.1 Análisis por <i>GC-MS</i> en columna apolar	33
2.7.2 Análisis por <i>GC-MS</i> en columna polar	35
2.7.3 Análisis cromatográfico de los compuestos volátiles de flores de <i>Aristolochia ringens</i> obtenidos por <i>HS-SPME</i>	36
2.7.4 Caracterización de las muestras	37
2.8 DETERMINACIÓN DE LOS AAI Y AAI EN <i>A. RINGENS</i>	38
2.8.1 Preparación de las muestras	38
2.8.2 Análisis por <i>HPLC/UV-DAD</i>	38
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
3.1 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS POR <i>GC-MS</i> DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS CON FLUIDO SUPERCRÍTICO	43
3.1.1 Análisis del AE y extracto de hojas de <i>A. ringens</i>	43
3.1.2 Análisis del AE y extracto de tallos de <i>A. ringens</i>	48
3.1.3 Análisis del extracto de flores de <i>A. ringens</i>	54
3.2 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE FLORES DE <i>A. RINGENS</i> POR <i>HS-SPME</i>	56
3.2.1 Determinación <i>in-vitro</i> de los compuestos volátiles de flores de <i>A. ringens</i> por <i>HS-SPME</i>	56
3.2.2 Determinación <i>in-vivo</i> de los compuestos volátiles de flores de <i>A. ringens</i> por <i>HS-SPME</i>	59
3.3 RUTAS DE FRAGMENTACIÓN DE ALGUNOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS	61
3.3.1 Posibles rutas de fragmentación del limoneno	61

3.3.2 Posibles rutas de fragmentación del <i>trans</i>-β-cariofileno	62
3.3.3 Posibles rutas de fragmentación del éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico.	65
3.4. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA EL ANÁLISIS POR HPLC-UV/DAD DE LOS AAI Y AAI EN <i>A. RINGENS</i>	67
3.4.1 Pruebas preliminares	67
3.4.2 Condiciones cromatográficas para el análisis de los AA presentes en <i>Aristolochia ringens</i>	69
3.4.3 Determinación por HPLC-UV/DAD de los AA I y II en la especie <i>A. ringens</i>	70
3.4.4 Determinación de las figuras analíticas de mérito	75
3.4.5 Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método	76
3.4.6 Determinación de los límites de detección y de cuantificación de los AA	78
3.4.7 Cuantificación y determinación de la reproducibilidad del método según los tiempos de retención y las áreas de los picos cromatográficos	79
4. CONCLUSIONES	81
5. RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFÍA	84
ANEXOS	94

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Revistas científicas con mayor número de publicaciones sobre <i>Aristolochias</i> .	6
Tabla 2. Publicaciones colombianas sobre <i>Aristolochias</i> según las diferentes categorías.	7
Tabla 3. Autores con mayor número de publicaciones sobre <i>Aristolochias</i> .	7
Tabla 4. Número de publicaciones sobre <i>Aristolochia</i> , por área de conocimiento.	8
Tabla 5. Patentes sobre <i>Aristolochias</i> .	9
Tabla 6. Aplicaciones de <i>SPME</i> , según el tipo de recubrimiento de la fibra.	22
Tabla 7. Sustancias químicas, empleadas en esta investigación.	26
Tabla 8. Número de <i>voucher</i> COL de la especie estudiada.	42
Tabla 9. Cantidad relativa (%), concentración (mg/L de AE) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por <i>MWHD</i> y <i>SFE</i> de hojas de <i>A. ringens</i> .	46

Tabla 10. Composición química de los metabolitos secundarios de tallos de <i>A. ringens</i> , aislados por <i>MWHD</i> y <i>SFE</i> , con sus respectivas cantidades relativas (%) y concentraciones (mg/L de AE).	51
Tabla 11. Concentración (mg/kg de flores secas) del único componente aislado por <i>SFE</i> , en las flores de <i>A. ringens</i> .	55
Tabla 12. Identificación de los componentes aislados por <i>HS-SPME</i> de flores de <i>A. ringens</i> .	58
Tabla 13. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes de flores de <i>A. ringens</i> , aislados <i>in-vivo</i> por <i>HS-SPME</i> , empleando una fibra con recubrimiento de <i>PDMS/DVB</i> , 65 μm .	60
Tabla 14. Longitud de onda de máxima absorbancia de los AA.	68
Tabla 15. Resolución y eficiencia cromatográfica para separar los AA, a diferentes temperaturas.	69
Tabla 16. Evaluación de la repetibilidad en los tiempos de retención del ácido AAll.	75
Tabla 17. Evaluación de la repetibilidad en los tiempos de retención del ácido AAI.	75
Tabla 18. Evaluación de la repetibilidad en las áreas de picos cromatográficos del ácido AAll.	76
Tabla 19. Evaluación de la repetibilidad en las áreas de picos cromatográficos del ácido AAI.	76

Tabla 20.	Estimación de la linealidad y la sensibilidad del método.	77
Tabla 21.	. Linealidad del método evaluada en función de los CV % de los factores de respuesta, en la curva de calibración del ácido AAll.	77
Tabla 22.	Linealidad del método evaluada en función de los CV % de los factores de respuesta, en la curva de calibración del ácido AAI.	78
Tabla 23.	Límites de detección y cuantificación de los AA.	78
Tabla 24.	Reproducibilidad en los tiempos de retención del AAll en extractos de flores.	79
Tabla 25.	Reproducibilidad en las áreas de picos del AAll en extractos de flores.	79
Tabla 26.	Concentración del AAll y su contenido en las flores de <i>A. ringens</i> .	80

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Países con más de 6 publicaciones sobre el género <i>Aristolochia</i> . Base de datos <i>Web of Science</i> , periodo de observación 2000-2007, fecha de consulta: Agosto de 2007.	5
Figura 2. Número de publicaciones por año durante el periodo 2000-2007 sobre el género <i>Aristolochia</i> , sin restricción de categorías. Base de datos <i>Web of Science</i> , fecha de consulta: Agosto de 2007.	6
Figura 3. Publicaciones realizadas en Colombia sobre <i>Aristolochia</i> . Base de datos <i>Web of Science</i> , periodo de observación 2000-2007, fecha de consulta: Agosto de 2007.	8
Figura 4. Estructura química de argenilactona.	10
Figura 5. Estructura química de los ácidos aristolóquicos.	12
Figura 6. Formación del aducto AA-ADN: 1. Ácido aristolóquico I (AAI) R=OCH ₃ , Ácido aristolóquico II (AAII) R=H; 2. N-Hidroxiaristolactama; 3. Ion iminio de la N-hidroxiaristolactama; 4. Aristolactamas I y II, 5. 7-Hidroxiaristolactama I y II; 6. dG-AAI, dG-AAII; 7. dA-AAI, dA-AAII.	14
Figura 7. <i>Aristolochia ringens</i> Vahl.	16
Figura 8. Dispositivo para SPME.	22
Figura 9. Montaje para hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.	29

Figura 10. Equipo de extracción Soxhlet de alta presión, para <i>SFE</i> con CO_2 .	30
Figura 11. Montaje para <i>SPME in-vitro</i> .	31
Figura 12. Muestreador para <i>SPME in-vivo</i> .	32
Figura 13. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus Serie GC System</i> acoplado a un detector selectivo de masas (<i>MSD Agilent Technologies 5973 Network</i>) y un inyector automático <i>Agilent Technologies 7683 Series</i> .	33
Figura 14. Cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890N Network Series GC</i> , equipado con un <i>MSD Agilent Technologies 5975</i> y un inyector automático <i>Agilent Technologies 7683B Series inyector</i> .	35
Figura 15. Cromatógrafo de gases <i>Hewlett-Packard 5890 Series II</i> , equipado con un <i>MSD Hewlett-Packard 5972</i> .	36
Figura 16. Cromatógrafo de líquidos <i>Agilent Technologies 1200 Series</i> , equipado con un detector ultravioleta visible con arreglo de diodos (<i>UV-VIS-DAD</i>) y una columna cromatográfica apolar <i>Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical</i> (4.6 mm x 150 mm, 5 μm).	39
Figura 17. Germinación de las semillas de <i>A. ringens</i> .	42
Figura 18. Perfiles cromatográfico típicos del AE y extracto de hojas de <i>A. ringens</i> , aislados por: A. <i>MWHD</i> y B. <i>SFE</i> . Columna DB-5 (60 m), <i>split</i> 1:30, <i>MSD</i> (EI, 70 eV).	44

- Figura 19.** Clasificación de los metabolitos identificados en el AE de hojas aislado por *MWHD*, según la familia de compuestos a la que pertenecen. 48
- Figura 20.** Perfiles cromatográficos típicos del AE y extracto aislados de tallos de *A. ringens*, por: **A.** *MWHD* y **B.** *SFE*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, *MSD* (EI, 70 eV). 49
- Figura 21.** Clasificación de los metabolitos identificados en el AE aislado por *MWHD* de tallos de *A. ringens*, según la familia de compuestos a la que pertenecen. 54
- Figura 22.** Perfil cromatográfico típico del extracto (*SFE*) de flores de *A. ringens*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, *MSD* (EI, 70 eV). 55
- Figura 23.** Estructura del éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico. 56
- Figura 24.** Perfiles cromatográficos típicos de los componentes volátiles aislados por *HS-SPME*, de flores de *A. ringens*: **A.** *PDMS*, 100 μm y **B.** *PDMS/DVB*, 65 μm . Columna HP-5MS (30 m), *split* 1:10, *MSD* (EI, 70 eV). 57
- Figura 25.** Perfil cromatográfico de los componentes volátiles aislados *in-vivo* por *HS-SPME*, de flores de *A. ringens*. Fibra *PDMS/DVB*, 65 μm . Columna HP-5MS (30 m), *split* 1:10, *MSD* (EI, 70 eV). 60
- Figura 26.** Espectro de masas del limoneno (EI, 70 eV). 61
- Figura 27.** Espectro de masas del *trans*- β -cariofileno (EI, 70 eV). 63
- Figura 28.** Espectro de masas del éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico (EI, 70 eV). 65

Figura 29. Perfil cromatográfico de los patrones certificados de los AA.70

Figura 30. Perfiles cromatográficos obtenidos por *HPLC-DAD* del extracto de flores de *A. ringens*: **A.** $\lambda=252$ nm y **B.** $\lambda=225$ nm. Columna cromatográfica apolar *Zorbax Eclipse XDB-C18 analytical* (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m). 71

Figura 31 Perfiles cromatográficos obtenidos por *HPLC-DAD* de los extractos de hojas de *A. ringens*. **A.** $\lambda=252$ nm y **B.** $\lambda=225$ nm. Columna cromatográfica apolar *Zorbax Eclipse XDB-C18 analytical* (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m). 72

Figura 32 Perfiles cromatográficos obtenidos por *HPLC-DAD* de los extractos de tallos de *A. ringens*: **A.** $\lambda=252$ nm y **B.** $\lambda=225$ nm. Columna cromatográfica apolar *Zorbax Eclipse XDB-C18 analytical* (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m). 74

LISTA DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1 Rutas de fragmentación del limoneno.	62
Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del <i>trans</i> - β -cariofileno.	64
Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico.	66

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Cromatogramas obtenidos en las pruebas preliminares para seleccionar la fase móvil. Modo isocrático, $\lambda=254$ nm	95
Anexo 2. Espectros UV-Vis de los ácidos AA, obtenidos empleando <i>DAD</i> . Selección de la longitud de onda de máxima absorbancia de los AA.	98
Anexo 3. Curvas de calibración de los AA, en altas concentraciones.	100
Anexo 4. Curvas de calibración de los AA, en la zona cercana al origen.	102

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A.	<i>Aristolochia(s).</i>
AA	Ácido (s) aristolóquico (s).
AAI	Ácido aristolóquico I.
AAII	Ácido aristolóquico II.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
AE	Aceite (s) esencial (es).
A:T	Adenina:Tiamina.
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Tropicales Aromáticas y Medicinales.
CHN	<i>Chinese-Herb Nephropathy</i> (Una forma de fibrosis renal).
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i> (Ovario de hámster Chino).
dA-AAI	7-[Deoxiadenosin- N^6 -il]-aristolactama I.
dA-AAII	7-[Deoxiadenosin- N^6 -il]-aristolactama II.
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos)
(dG-AAI)	7-[Deoxiguanosin- N^2 -il]-aristolactama I.
DPPH	<i>2,2-Diphenyl-1-picrylhidrazyl</i> (2,2 – Difenil-1-picrilhidracilo).
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases).
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
GLP	<i>Good Laboratory Practice</i> (Buenas Prácticas del Laboratorio).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta resolución).
HS-SPME	<i>Headspace-Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en el espacio de cabeza).
i.e.	<i>Id ets.</i> (Es decir).
INVIMA	Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos.

Istd	<i>Internal Standard</i> (Estándar interno).
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada).
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida).
LOD	<i>Limit of Detection</i> (Límite de detección).
LOQ	<i>Limit of Quantitation</i> (Límite de cuantificación).
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por radiación de microondas).
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
R_f	Factor de respuesta.
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluido supercrítico).
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i> (Extracción en fase sólida).
SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida).
ST	<i>Stephania tetrandra</i> (Especie vegetal China).
S9	Fracción microsomal de hígado de rata.
T:A	Tiamina:Adenina.
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total)
t_R	Tiempo de retención.
UIS	Universidad Industrial de Santander.
UV	Ultravioleta.

RESUMEN

TITULO: DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES Y SEMIVOLÁTILES, Y ÁCIDOS ARISTOLÓQUICOS EN *Aristolochia ringens* Vahl*

Autores: Sergio Andrés Ordóñez Calderón**
Néstor Armando Marín Solano**

Palabras Claves: *Aristolochia ringens*; ácidos aristolóquicos; aceite esencial; HPLC; GC-MS; MWHD; SFE; HS-SPME.

Se realizó el estudio de los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles, así como de los ácidos aristolóquicos (AA), presentes en hojas, tallos y flores de *Aristolochia ringens*. La obtención de los metabolitos se realizó usando diferentes técnicas de extracción: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), extracción con fluido supercrítico (SFE), y microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME), la composición química fue establecida por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). La determinación de los ácidos AAI y AAI se realizó mediante la obtención de extractos metanólicos de las diferentes partes de la planta y su análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

Los rendimientos de los aceites esenciales (AE) de hojas y tallos, fueron de 0.008 ± 0.0022 % y 0.047 ± 0.0026 %, respectivamente, las flores no presentaron AE. Los hidrocarburos sesquiterpénicos (66%) fueron los compuestos predominantes en el AE de hojas, mientras que los hidrocarburos monoterpénicos (73%) predominaron en el AE de tallos. Los rendimientos de los extractos aislados por SFE de hojas, tallos y flores, fueron de 4 ± 1.8 %, 1.2 ± 0.25 % y 4 ± 1.8 %, respectivamente. En las flores se aislaron por HS-SPME *in-vivo*, compuestos con notas odoríficas desagradables tales como aldehídos volátiles y ácidos carboxílicos de cadena corta. Se detectó la presencia del AAI en las flores de *Aristolochia ringens*, en una concentración de 610 ± 47 mg de AAI/Kg de flor seca.

* Trabajo de grado.

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directores Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez.

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION OF THE VOLATILE AND SEMI-VOLATILE SECONDARY METABOLITES, AND ARISTOLOCHIC ACIDS IN *Aristolochia ringens* Vahl*

Authors: Sergio Andrés Ordóñez Calderón **
Néstor Armando Marín Solano **

Key words: *Aristolochia ringens*; aristolochic acids; essential oil; HPLC, GC-MS; MWHD; SFE; HS-SPME.

We performed the determination of the volatile and semi-volatile secondary metabolites, as well as aristolochic acids (AA), present in leaves, stems and flowers of *Aristolochia ringens*. Metabolite isolation was performed using different extraction techniques: microwave-assisted hydrodistillation (MWHD), supercritical fluid extraction (SFE), and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME). The chemical composition of the extracts and oils was established by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The determination of aristolochic acids AAI and AAI1 was conducted by methanolic extraction of different plant parts followed by high performance liquid chromatographic (HPLC) analysis.

Yields of essential oils of leaves and stems, were $0,008 \pm 0.0022\%$ and $0,047 \pm 0.0026\%$, respectively. *Aristolochia ringens* flowers did not show essential oil. Sesquiterpene hydrocarbons (66%) were the predominant compounds in the essential oil of leaves, while monoterpene hydrocarbons (73%) predominated in the essential oil of stems. Yields of extracts isolated by SFE of leaves, stems and flowers, were $4 \pm 1.8\%$, $1.2 \pm 0.25\%$ and $4 \pm 1.8\%$ respectively. In-vivo HS-SPME of flowers isolated compounds with unpleasant smells such as volatile aldehydes and short-chain carboxylic acids. HPLC analysis detected the presence of AAI1 in the flowers of *Aristolochia ringens*, at a concentration of 610 ± 47 mg / kg of dried flower.

* Degree Project

** Universidad Industrial de Santander, Sciences Faculty, Chemistry Department. Directors Elena E. Stashenko and Jairo R. Martínez.

INTRODUCCIÓN

Colombia cuenta con una inmensa y aún poco estudiada y sabiamente aprovechada diversidad de especies vegetales. Esto ha despertado el interés de la comunidad científica en la investigación fitoquímica con fines agroindustriales. El Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Tropicales Aromáticas y Medicinales (CENIVAM), impulsa la investigación de especies nativas en Colombia, con el propósito de determinar cuáles de ellas son promisorias, para un proceso de agroindustrialización autosostenible en nuestro país.

Las especies vegetales del género *Aristolochia* (*A.*), pertenecientes a la familia *Aristolochiaceae*, clasificadas como semiepífitas trepadoras, han sido objeto de un gran número de investigaciones fitoquímicas, en diferentes partes del mundo [Wu, 2004]. Estos estudios han revelado que sus extractos y aceites esenciales (AE) presentan diversas actividades biológicas, entre las cuales figuran: antibacteriana, antiespasmódica y antiviral, entre otras [Otero, 2000; Wu, 2004]. Esto se debe seguramente a la amplia variedad de compuestos presentes en las especies de este género, entre los cuales se encuentra toda una gama de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y tetraterpenos [De Pascual, 1983; Chan, 1998; Júnior, 2002; Lopes, 2003; Priestap, 2003]. Este género se caracteriza además, por la presencia en la mayoría de sus especies, de derivados nitrofenantrénicos, denominados ácidos aristolóquicos (AA), acusados de tener carácter genotóxico [Hashimoto, 1999; Ioset, 2003; Jou, 2003; Chen, 2006; Feldmeyer, 2006].

En Colombia, las especies del género *A.*, no han sido objeto de estudios fitoquímicos. Una especie de ellas, *A. ringens* Vahl, denominada popularmente como “guaco”, está ampliamente difundida en diferentes zonas

del país, a saber: en Antioquia, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Valle y en Santander. Esta especie vegetal se utiliza en la medicina tradicional con diferentes propósitos; por ejemplo, contra mordeduras de serpientes, para prevenir los síntomas de la artritis, como abortiva, entre otros. En algunos sectores del Departamento de Santander, los tallos secos de la planta *A. ringens*, son empleados como un aditivo en la preparación de una bebida alcohólica conocida como “guarapo”.

En esta investigación, se determinó la composición química de los metabolitos secundarios presentes en hojas, tallos y flores de *A. ringens*, usando como métodos extractivos la hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (*MWHD*) y la extracción con fluido supercrítico (*SFE*); se caracterizaron los componentes volátiles presentes en las flores, usando la microextracción en fase sólida en modo *headspace* (*HS-SPME*), *in-vivo* e *in-vitro*, como técnica de preparación de muestra. La composición química de los AE y extractos se estableció usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*GC-MS*); empleando la cromatografía líquida de alta eficiencia (*HPLC*) como técnica analítica, se estudió la presencia de los AA I y II en hojas, flores y tallos de *A. ringens*., se detectó el AAII en las flores, lo cual cuestiona seriamente el uso tradicional de esta especie como planta medicinal.

El trabajo de investigación consta de 6 capítulos, contiene 32 figuras, 26 tablas, 73 referencias bibliográficas y 4 anexos.

1 ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO

1.1 GENERALIDADES SOBRE LOS BEJUCOS

Se entienden por epífitas aquellos organismos vegetales que viven sobre una planta sin extraer nutrientes de sus tejidos vivos.

El término epífita reseña, entre otras, a las semiepífitas trepadoras, conocidas como bejucos, trepadoras, lianas, enredaderas o escandentes. Estas plantas se encuentran ancladas al suelo, condición que nunca pierden, y emplean diferentes elementos, e.g. espinas, tallos, ramas y pecíolos, que hacen parte de su estructura para trepar, denominados “mecanismo prensil”. Dentro de algunas familias la mayor parte de los géneros o todos los géneros tienen especies trepadoras, como es el caso de las familias *Aristolochiaceae*, *Asclepiadaceae*, *Convolvulaceae*, y *Cucurbitaceae*, entre otras [Linares, 2000].

1.1.1 Semiepífitas trepadoras en Colombia. Las semiepífitas trepadoras de Colombia se encuentran representadas por 1820 especies, pertenecientes a 310 géneros y 70 familias. Las angiospermas constituyen el grupo más diverso con el 99.3% del total de especies; las dicotiledóneas con 60 familias, 294 géneros y 1706 especies, presentan la mayor diversidad, mientras que las monocotiledóneas, pteridofitas y gimnospermas reúnen menos especies [Linares, 2000].

1.2 ARISTOLOCHIACEAE

La familia *Aristolochiaceae* consta de 6-12 géneros de acuerdo con la autoridad consultada [González, 1997]; comprende unas 400 especies de plantas herbáceas o leñosas, que suelen vivir en los países cálidos. Las

hojas se disponen al parecer sin orden, esparcidas a lo largo del tallo, y carecen de apéndices estipulares. Las flores se protegen con solo una cubierta floral, o, si poseen 2, la interna y la externa tienen la misma textura y aspecto análogo. Hay flores perfectamente regulares, pero las del género *Aristolochia*, que comprende las tres cuartas partes de la totalidad de la familia, sólo pueden dividirse en 2 partes simétricas cuando se cortan a lo largo, es decir, sólo tienen un plano de simetría. Esta cubierta floral es de una sola pieza, de forma tubulosa, terminada en una lengüeta, y corona el fruto incipiente, que queda por debajo de la flor. Los estambres suelen ser 6, libres o unidos al estilo, y las anteras se abren hacia fuera. El fruto es una cápsula con numerosas semillas [Pio, 1983].

1.2.1 *Aristolochias*. *Aristolochia*, es uno de los principales géneros de *Aristolochiaceae*, debido al número de especies que lo constituyen (alrededor de 300) [Pio, 1983]. Se conocen comúnmente como “hierba amarga”, “mata culebra”, “raíz de mato” y “guaco”. En la medicina popular, algunas de estas especies se usan como conservantes y contravenenos (mordeduras de serpientes) [García, 1992; Carr, 1987; Otero, 2000], también se han empleado con éxito para aumentar el apetito (anorexia), para la amenorrea, clorosis, dispepsia, paludismo y orquitis [Balbachas]. Diversos estudios fitoquímicos y farmacológicos se han realizado intensamente, sobre todo, en las dos últimas décadas. El interés que despiertan las *A.*, está directamente relacionado con la gran variedad de compuestos que se han encontrado, alcaloides, *N*-óxidos, entre otros, de los cuales, las aristolactamas, las 4,5-dioxoaporfina y los ácidos aristolóquicos son los más relevantes [Kumar, 2003; Lopes 1997]. Estos compuestos se han encontrado en casi todas las especies de *Aristolochias*.

1.2.2 Análisis cuantitativo. La cuantimetría sobre el género *Aristolochia* se realizó empleando la base de datos *Web of Science*, desde el año 2000 hasta agosto de 2007, sin restricción alguna de categorías. Se

encontraron 168 publicaciones (157 artículos y 11 artículos de revisión). A pesar de que este género no es propio de los Estados Unidos, es allí donde más publicaciones se han hecho. En la República Popular de China se hallan distintas especies de *Aristolochias*, que se emplean en la medicina popular; la importancia de estas plantas se refleja en el número de publicaciones que este país realiza (**Figura 1**).

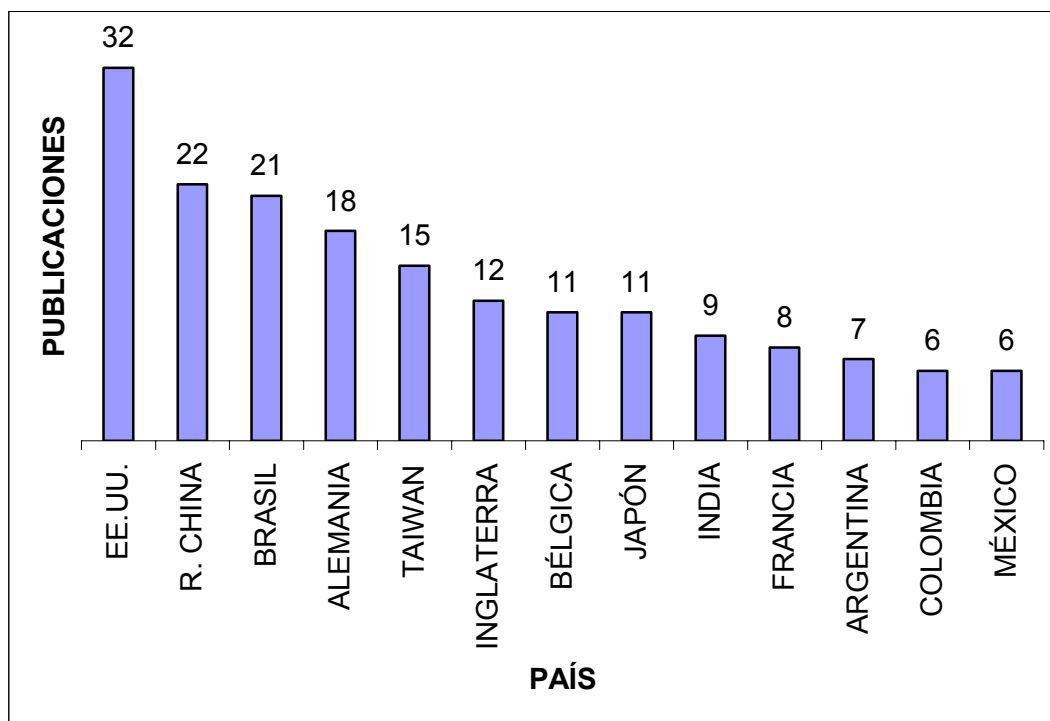


Figura 1. Países con más de 6 publicaciones sobre el género *Aristolochia*. Base de datos *Web of Science*, periodo de observación 2000-2007, fecha de consulta: Agosto de 2007.

Los años con más publicaciones sobre *Aristolochias* fueron el 2006 con 33, seguido del 2005, con 29 y el 2002, con 28 (**Figura 2**).

Las revistas científicas con más reportes fueron *Journal of Ethnopharmacology* (9 publicaciones), *Phytochemistry* (7 publicaciones) y *Journal of Natural Products* (5 publicaciones) (**Tabla 1**).

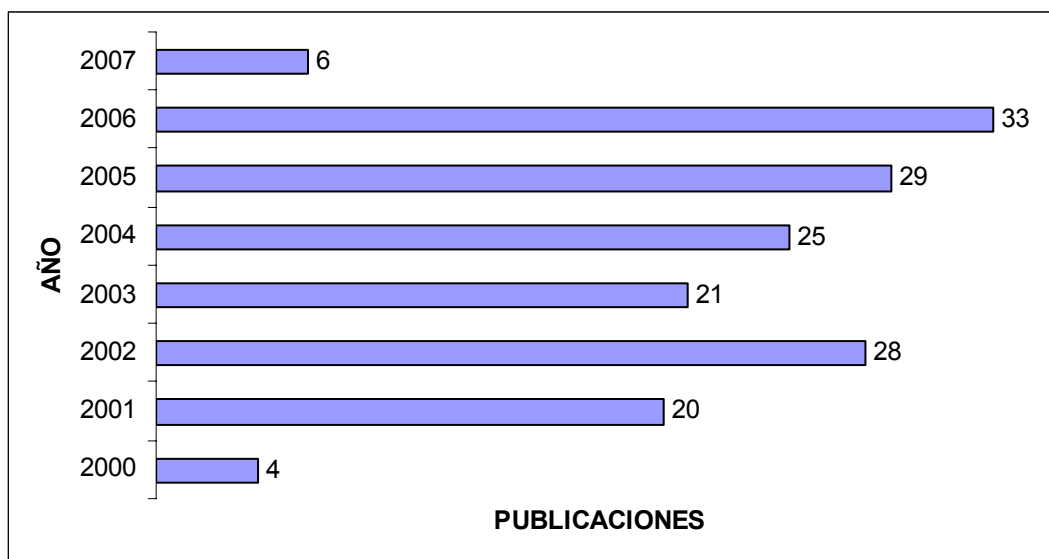


Figura 2. Número de publicaciones por año durante el periodo 2000-2007 sobre el género *Aristolochia*, sin restricción de categorías. Base de datos *Web of Science*, fecha de consulta: Agosto de 2007.

Tabla 1. Revistas científicas con mayor número de publicaciones sobre *Aristolochias*.

Revista	Publicaciones
<i>Journal of Ethnopharmacology</i>	9
<i>Phytochemistry</i>	7
<i>Journal of Natural Products</i>	5
<i>Pharmazie</i>	4
<i>American Journal of Botany</i>	3
<i>Biochemical Systematics and Ecology</i>	3
<i>Botanical Journal of the Linnean Society</i>	3
<i>Journal of Food and Drug Analysis</i>	3
<i>Natural Product Research</i>	3
<i>Nephrology Dialysis Transplantation</i>	3
<i>Pharmaceutical Biology</i>	3
<i>Phytotherapy Research</i>	3

Base de datos: *Web of Science*; periodo de observación: 2000-2007; fecha de consulta: agosto de 2007.

El aporte intelectual que hace Colombia, está enfocado hacia estudios botánicos y no fitoquímicos (**Tabla 2**). Es importante mencionar, que el único autor que ha publicado en nuestro país sobre este género de plantas es el doctor Fabio Gonzáles de la Universidad Nacional (6 publicaciones) (**Tabla 3**), los años 2000 y 2003 fueron cuando el autor más publicó (**Figura 3**).

Tabla 2. Publicaciones colombianas sobre *Aristolochias* según las diferentes categorías.

Categoría	Publicaciones
<i>Plant Sciences</i>	6
<i>Evolutionary Biology</i>	2

Base de datos: *Web of Science*; periodo de observación: 2000-2007; fecha de consulta: agosto de 2007.

Tabla 3. Autores con mayor número de publicaciones sobre *Aristolochias*.

Autor	Publicaciones
Wu, T.	9
Lopes, L.	8
Arlt, V.	7
Vanherweghem, J.	7
Gonzalez, F.	6
Neinhuis, C.	5
Wanke, S.	5
Fordyce, J.	4
Khan, I.	4
Nortier, J.	4
Schmeiser, H.	4

Base de datos: *Web of Science*; periodo de observación: 2000-2007; fecha de consulta: agosto de 2007.

El empleo tradicional de estas especies vegetales, con fines medicinales, acrecienta el interés farmacológico y la necesidad de conocer los mecanismos de acción y la química de sus principios activos (**Tabla 4**).

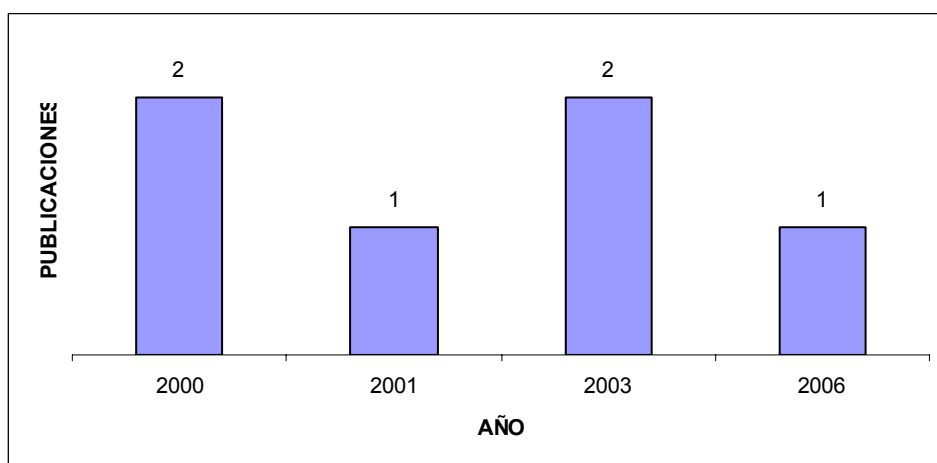


Figura 3. Publicaciones realizadas en Colombia sobre *Aristolochia*. Base de datos *Web of Science*, periodo de observación 2000-2007, fecha de consulta: Agosto de 2007.

Tabla 4. Número de publicaciones sobre *Aristolochia*, por área de conocimiento.

Categoría	Publicaciones
<i>Plant Sciences</i>	54
<i>Pharmacology & Pharmacy</i>	50
<i>Chemistry, Medicinal</i>	38
<i>Biochemistry & Molecular Biology</i>	28
<i>Chemistry, Applied</i>	13
<i>Toxicology</i>	13
<i>Chemistry, Analytical</i>	12
<i>Ecology</i>	12
<i>Chemistry, Multidisciplinary</i>	11
<i>Evolutionary Biology</i>	11
<i>Biochemical Research Methods</i>	10
<i>Urology & Nephrology</i>	10
<i>Food Science & Technology</i>	9
<i>Integrative & Complementary Medicine</i>	9
<i>Chemistry, Organic</i>	7
<i>Genetics & Heredity</i>	6

Base de datos: *Web of Science*; periodo de observación: 2000-2007; fecha de consulta: agosto de 2007.

Existen registrados 126 patentes sobre las especies de *A.*, según la base de datos *Scopus* (período: 1965 - agosto de 2007), en los cuales se resalta el empleo de sus extractos como alternativa médica para el tratamiento de enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (**Tabla 5**).

Tabla 5. Patentes sobre *Aristolochias*.

Oficina de Patentes	Patentes
<i>US Patent Office</i>	52
<i>World Intellectual Property Organization (WIPO)</i>	34
<i>Japanese Patent Office</i>	17
<i>European Patent Office</i>	16

Base de datos: *Web of Science*; periodo de observación: 1965-2007; fecha de consulta: agosto de 2007.

1.2.3 Composición química de *Aristolochias*. Los terpenos son una denominación genérica aplicada a todos los compuestos que se sintetizan a partir de precursores isoprénicos. Los terpenos se biosintetizan en última instancia a partir del isopentil pirofosfato (C_5) y del dimetilalil pirofosfato (C_5). Cuando éstos se combinan para producir el geranil pirofosfato (C_{10}), los terpenos formados se denominan monoterpenos. Otros compuestos denominados sesquiterpenos (C_{15}) y triterpenos (C_{30}), son derivados de 1 y 2 moles de farnesil pirofosfato (C_{15}), respectivamente. El geranilgeranil pirofosfato (C_{20}) produce o bien diterpenos (C_{20}) o bien tetraterpenos (C_{40}) [Mathews, 2000].

Los tipos de terpenoides que han sido encontrados en las *A.*, incluyen a monoterpenos [De Pascual, 1983], sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, y tetraterpenos [Chan, 1998; Júnior 2002; Lopes, 1987; 2003]. Entre éstos, sesquiterpenos y diterpenos son los más abundantes.

La especie *A. argentina*, se caracteriza por los niveles elevados de argenilactona (**Figura 4**), alrededor de 57-89% conforman los aceites esenciales obtenidos de diferentes partes de la planta, hojas, tallos y órganos subterráneos, se destaca la presencia de isómeros del undecatrieno (0.3-4%), acusados de dar un olor particular (olor terroso) a los aceites esenciales y extractos obtenidos de esta especie [Priestap, 2003]. Algunos productos naturales que contienen lactonas α , β -insaturadas han dejado ver la importancia a nivel biológico de dichos compuestos [De Oliveira, 2004]. La argenilactona, tiene efectos irritantes sobre la piel y la mucosa, y puede causar alergias sobre la piel. Sin embargo, se ha mostrado que tiene actividades antimicótica y antileishmanial [Wu, 2004].

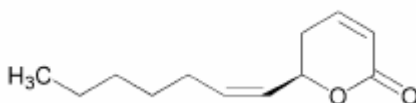


Figura 4. Estructura química de argenilactona.

De las partes aéreas de *A. longa* han sido aislados, dos pinano monoterpenos, pin-2-en-8ol y su acetyl derivado, así como β -cariofileno, óxido de cariofileno, linalol y acetato de bornilo [De Pascual, 1983]. De la fracción volátil de las partes subterráneas, se aislaron sólo sesquiterpenos tricíclicos [Wu, 2004].

24 tipos de sesquiterpenos han sido reportados hasta ahora en las especies de *A.* Los sesquiterpenos que están en mayor presencia son: cadinenos, aristolanos, germacrenos, y bicilogermacrenos [Wu, 2004]. Los aceites esenciales de tallos, hojas y raíces de *A. elegans* contienen principalmente sesquiterpenos hidrocarbonados, particularmente, β -cariofileno, isocariofileno y bicilogermacreno [Vila, 1997]. Los aceites esenciales obtenidos a partir

del rizoma y de las partes aéreas de la especie *A. mollissima* son ricos en sesquiterpenos oxigenados. El compuesto mayoritario en ambos aceites esenciales fue el 2,2,7,7-tetrametiltricyclo[6.2.1.0(1,6)]undec-4-en-3-ona, (15.9% y 13.5%, respectivamente). Otros compuestos como el acetato de (*E*)- β -santalol (10.3%) y canfeno (6.7%) fueron revelados en el aceite de rizoma, mientras que el espatulenol (6.8%) fue hallado en el aceite de las partes aéreas en *A. mollissima*. La actividad antimicrobiana del aceite esencial de rizoma y partes aéreas de *A. mollissima*, ha sido evaluada contra 20 microorganismos, empleando los métodos de difusión en disco y microdilución en caldo. Las bacterias *gram*-positivas fueron más sensibles a ambos aceites. La actividad bactericida más pronunciada fue la concedida por el aceite esencial de rizoma contra *Staphylococcus Saprophyticus* [Yu, 2006].

Un estudio realizado a partir de raíces y tallos de *A. mollissima*, permitió aislar, mediante extracción sucesiva con éter dietílico y metanol, y el empleo de cromatografía en columna, y elucidar cinco nuevos sesquiterpenos, citados como *Madolins* R, S, U, W, X [Wu, 2001]. Este tipo de compuestos, se caracteriza por tener un núcleo estructural común.

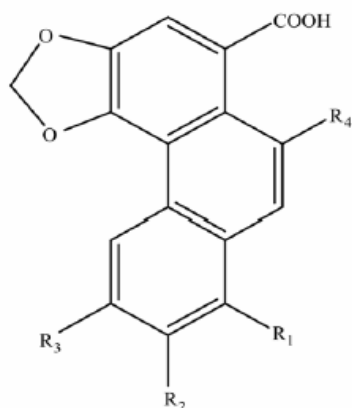
Un tipo de lactona sesquiterpenoide, α , β -insaturada, llamada aristolactona, es otro tipo de compuesto aislado de especies de *Aristolochia*, a saber: *A. reticulata*, *A. serpentaria* y *A. mollissima*. Un isómero de aristolactona, la isoaristolactona, fue aislado de las raíces de *A. versicolor*. De esta especie fueron aisladas otras lactonas tipo sesquiterpenoide, denominadas versicolactonas [Wu, 2004].

En un estudio fitoquímico del extracto, obtenido con éter de petróleo de los tallos de *A. brasilensis* y *A. esperanzae*, se aislaron 12 derivados del diterpeno clerodano. Otro tipo de diterpenos denominados *ent*-kaureno,

también se reportaron esta vez, en los aceites esenciales de *A. argentina* y *A. chilensis* [Wu, 2004].

1.2.4 Ácidos aristolóquicos. Los AA son derivados nitrofenantrénicos, característicos en las plantas del género *Aristolochia*, por poseer un grupo metilendioxi (**Figura 5**).

Los AA pueden ser consumidos por algunas larvas, exhibiéndose la presencia de estos compuestos en varios lepidópteros (ciertos géneros de la familia *Papilionidae*), donde se emplean como defensa química contra predadores vertebrados [Carreras, 1973; Muñoz, 1992].



Ácido aristolóquico		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(AA-a)	A. Aristolóquico A ó I	OCH ₃	H	H	NO ₂
(AA-b)	A. Aristolóquico B ó II	H	H	H	NO ₂
(AA-c)	A. Aristolóquico C ó IIIa	H	H	OH	NO ₂
(AA-d)	A. Aristolóquico D ó IVa	OCH ₃	H	OH	NO ₂
(AA-e)	A. Aristolóquico 7-hidroxi	OCH ₃	OH	H	NO ₂

Figura 5. Estructura química de ácidos aristolóquicos.

Una forma de fibrosis renal llamada *Chinese-Herb Nephropathy (CHN)*, fue adquirida por mujeres que consumieron píldoras de origen chino para

adelgazar, que contenían de manera indebida *A. fangchi*, en lugar de *Stephania tetrandra* (ST) y *Magnolia officinalis*. Estudios realizados, revelaron que la exposición crónica, a las toxinas de *A. fangchi* (AA y sus derivados), está involucrada en la aparición de CHN y el desarrollo del cáncer urotelial [Nortier, 2002]. Casos de CHN se han reportado en España, Francia, Japón, el Reino Unido y en Taiwán, al encontrarse el carcinoma urotelial en las biopsias [Vanherweghem, 2000].

Uno de los métodos que evaluó el carácter genotóxico de los AA, fue el ensayo con células de ovario de hámster chino (CHO) [Sánchez, 1999]. Con el empleo de CHO, *in vitro*, se apreciaron, las aberraciones cromosómicas y la inducción de la formación de micronúcleos en estas células, causados por los AA [Sánchez y Manuel, 1999]. Otro tipo de pruebas ratifica el carácter genotóxico de los AA, a saber, el ensayo de Ames, usando cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium*, y el test de mutación genética sobre el linfoma L5178Y de ratón [Zhang, 2004].

Han sido determinados, además, la formación de aductos de los AA con el ADN (AA-ADN) y la mutagenicidad de los AA, para ello, se usaron tejidos de hígado y riñón de ratas azules grandes. La formación de los aductos se examinó por medio del análisis con postmarcación empleando la proteína ^{32}P . Los siguientes fueron los tres principales aductos encontrados: 7-[Deoxiadenosin- N^6 -il]-aristolactama I (dA-AAI), 7-[deoxiadenosin- N^6 -il]-aristolactama II (dA-AAII) y 7-[deoxiguanosin- N^2 -il]-aristolactama I (dG-AAI), en todos los tejidos. La transversión A:T \Rightarrow T:A, fue la mutación predominante en ratas tratadas con AA [Nan, 2006; Chen, 2006]. Las especies químicas necesarias para la formación de los aductos con el ADN a partir de los AA, se forman por la acción conjunta de varias enzimas. Las aristolactamas e hidroxiaristolactamas obtenidas por reducción del grupo nitro en los AA, constituyen el conjunto de especies reactivas con el ADN (**Figura 6**) [Stiborova, 2005].

El seguimiento en las mutaciones a nivel genético del gen supresor de tumores p53, así como el análisis de las proteínas codificadas, ha sido en las últimas décadas un importante aliado en el estudio de la patogénesis del cáncer, sobre todo, aquellos que tienen que ver con el aparato digestivo [Roa, 2000]. En un ensayo empleando fibroblastos de embriones de ratón (*Hupki; Human p53 knock-in*), se estudiaron las mutaciones inducidas por el AAI. Las mutaciones identificadas fueron consistentes con las reportadas previamente, 9 de las mutaciones correspondieron a transversiones A:T y 8 fueron asociadas con la posible intervención del aducto dA-AAI [Feldmeyer, 2006].

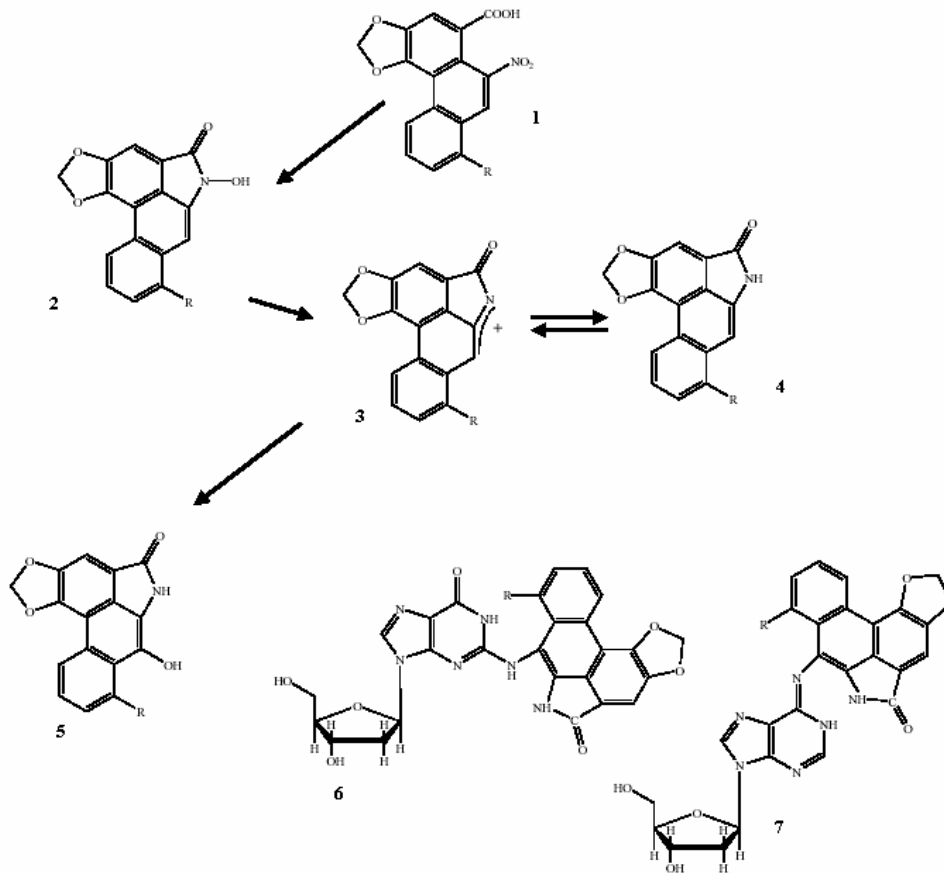


Figura 6. Formación del aducto AA-ADN: **1.** Ácido aristolóquico I (AAI) R=OCH₃, Ácido aristolóquico II (AAII) R=H; **2.** N-Hidroxiaristolactama; **3.** Ion iminio de la N-hidroxiaristolactama; **4.** Aristolactamas I y II; **5.** 7-Hidroxiaristolactama I y II; **6.** dG-AAI, dG-AAII; **7.** dA-AAI, dA-AAII.

En Colombia, el Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), publicó en el 2007 una alerta sobre el uso de productos herbales que contengan derivados de las especies de *Aristolochia* [INVIMA, 2007]. Se solicitó retirar del mercado, la Tintura de Curarina, registrada como producto natural, y la loción Astringente Carerina, registrada como producto cosmético.

El contenido de AA en diferentes plantas y productos comerciales ha sido determinado mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) [Hashimoto, 1999; Jinbin, *in press*; Jong, 2003; Koh, 2006]; Esta técnica operada en modo de fase reversa ha demostrado ser eficiente, alcanzando la separación hasta de 17 compuestos análogos entre ácidos aristolóquicos y aristolactamas [Jou, 2003].

1.2.5 *Aristolochia ringens* Vahl. *A. ringens* Vahl es una planta trepadora de tallos largos, hojas de unos 17 cm de longitud, y flores de 17.5 cm de largo aproximadamente (**Figura 7**). En Colombia, es una de las especies que se ha encontrado a mayor altura en estado silvestre; se ha reportado la presencia de *A. ringens* en Antioquia, Cundinamarca, Huila, Magdalena, Valle y Santander. Comúnmente se le ha denominado como “guaco blanco” y “contracapitana” [García, 1992; Uribe, 1955]. También se conoce como “*Gaping dutchman’s pipe*”. *A. ringens* es originaria de los países caribeños hasta la Amazonía, e introducida en los Estados Unidos. Sobre la composición química de extractos de *A. ringens* se conoce muy poco, algunos de los compuestos presentes, que se reportan en la única publicación científica encontrada, son: α -felandreno, *p*-cimeno-8-ol y β -cariofileno [Larrahondo, 1990].

El mercado de esta planta se reduce al comercio informal de sus tallos secos, así como de sus flores frescas con fines ornamentales.



Figura 7. *Aristolochia ringens* Vahl.

Sus extractos y aceite esencial aún no han sido introducidos en el mercado de productos naturales, seguramente por la poca investigación fitoquímica que sobre esta especie se ha realizado.

1.3 PROCESOS EXTRACTIVOS EN PLANTAS

1.3.1 Extracción de aceites esenciales.

A. Preparación del material vegetal. Los AE se localizan en diferentes partes de la planta. Dependiendo de la especie, algunos suelen localizarse en glándulas aceitosas, sacos de aceite, venas o en los cabellos glandulares, de donde pueden ser extraídos utilizando vapor de agua. Para facilitar tal proceso extractivo, y, de esta forma, aumentar el rendimiento del AE, generalmente, se hace necesario un tratamiento previo de la planta antes de su destilación, el cual depende del tipo de material vegetal con que se vaya a trabajar [Güenter, 1955; Hill, 1965; Muñoz 1987].

Las hojas, flores y partes no fibrosas de la planta, pueden ser sometidas a destilación sin tratamiento previo, mientras que las raíces, tallos y plantas leñosas deben ser cortados en pequeños trozos, antes de ser sometidos al proceso extractivo [Güenter, 1955].

B. Almacenamiento y secado del material vegetal. Éste se debe llevar a cabo en un ambiente seco y a temperaturas bajas, para minimizar pérdidas por evaporación y evitar procesos de oxidación y resinificación. El secado se lleva a cabo en desecadores bajo techo para evitar el contacto directo del material vegetal con los rayos solares [Güenter, 1955; Muñoz, 1987].

C. Métodos de obtención

Los siguientes son los principales métodos utilizados para obtener aceites esenciales a partir de plantas aromáticas [Bandoni, 2000]:

- Destilación con agua o hidrodestilación.
 - Destilación por arrastre con vapor.
 - Destilación con agua y vapor. Cohobación.
 - Destilación previa maceración.
 - Destilación sometida a una degradación térmica.
 - Expresión.
-
- **Destilación con agua (hidrodestilación).** Este método consiste en llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa del material vegetal, de tal manera, que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmiscible en agua, es posteriormente separado. Esta técnica es sencilla, pero de mucha precaución, ya que durante este proceso el aceite se somete a la acción de altas temperaturas, las cuales pueden ocasionar procesos indeseables, como la polimerización y resinificación de los terpenos, así como la hidrólisis de los ésteres [Denny, 1989; Schreier, 1984].

Un factor de especial importancia a considerar es que, si el calentamiento del alambique es con fuego directo, el agua presente en el alambique deberá ser suficiente y permanente para llevar a cabo toda la destilación a fin de evitar el sobrecalentamiento y la carbonización del material vegetal, dado que este hecho provoca la formación de olores desagradables en el producto final [Bandoni, 2000].

- **Destilación por arrastre con vapor.** La destilación por arrastre con vapor o destilación con vapor seco, que se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste, en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor [Bandoni, 2000]. En esta técnica el vapor de agua ligeramente sobrecalentado, proveniente de un generador, se hace llegar hasta el recipiente que contiene la planta, de donde arrastra los componentes volátiles que luego se condensan obteniéndose así una mezcla de agua y aceite, de la cual el AE se separa fácilmente por simple decantación [Güenter, 1955; Scherier, 1984; Denny, 1989].

- **Destilación con agua y vapor.** En este caso, el vapor se genera dentro del propio cuerpo del alambique, donde el material vegetal se encuentra suspendido sobre un tramado (falso fondo) que impide el contacto del material vegetal con el medio líquido en ebullición. En comparación con la hidrodestilación, este sistema reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del alambique pero mejora la calidad del aceite obtenido [Bandoni, 2000].

- **Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.** Esta técnica fue inicialmente patentada en Canadá, por el Dr. J. Paré y sus colaboradores, en 1991 [Paré, 1991; 1992]. Para la extracción de los AE mediante *MWHD*, el material vegetal se sumerge al agua y se somete a la

acción de la radiación de microondas, que, al calentar el agua hasta ebullición, produce vapores que atraviesan las estructuras celulares y permiten la expulsión del AE contenido en ellas, luego, el AE arrastrado por el vapor de agua, se condensa y se colecta [Kingston, 1988; Paré, 1991; 1992].

- **Expresión.** Estos procesos generalmente se aplican para extraer los volátiles presentes en la cáscara de los frutos cítricos, los cuales, al ser sometidos a elevadas temperaturas, pueden alterarse por degradación térmica [Güenter, 1955; Jennings, 1983]. La extracción del aceite se realiza sobre la fruta entera o sobre la cáscara, y se puede realizar con un proceso mecánico o manualmente [Bandoni, 2000]. Durante este proceso, las cáscaras de los frutos se someten a compresión o raspado, se produce de esta manera una mezcla acuosa, a partir de la cual la fase aceitosa se separa por centrifugación. Este proceso se lleva a cabo a bajas temperaturas [Güenter, 1955; Jennings, 1983].

1.3.2 Extracción con solventes. Existen varios tipos de aparatos con los cuales se puede llevar a cabo la extracción con solventes. Uno de los más utilizados es el extractor *Soxhlet*. Sin embargo, el material vegetal puede ser simplemente macerado con un solvente orgánico; los más usados son éter de petróleo, etanol, pentano, hexano, tolueno, benceno, *iso*-propanol, acetona, acetato de etilo, acetato de metilo o éter dietílico. Este método requiere de la concentración posterior del aceite, seguido de la evaporación del solvente. Esta es, por supuesto, una parte delicada de la operación y deben tomarse precauciones para evitar pérdidas por evaporación de los demás compuestos volátiles [Sandra, 1987].

1.3.3 Extracción con fluidos en estado supercrítico. El principio básico para la extracción con fluidos en estado supercrítico es el cambio de propiedades de transporte y solubilidad que presenta un solvente en este

estado. El poder disolvente del CO₂ supercrítico es mayor para compuestos menos polares y con masa molecular pequeña. De esta manera, son muy solubles en fluido supercrítico CO₂ los aromas, los terpenos y los lípidos debido a su baja polaridad. Otros compuestos que pueden ser medianamente solubles, a condición de que su masa molecular sea pequeña son el agua, los ácidos grasos, alcoholes, cafeína, nicotina, colesterol, etc. [Bandoni, 2000; Dean, 1998].

1.4 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La microextracción en fase sólida (*SPME*) fue introducida hace 15 años, por Arthur y Pawliszyn [Zhang, 1994]. Este método involucra una serie de configuraciones, donde una muestra puede estar expuesta a una fina capa de sorbente que cubre la superficie de una fibra de sílice fundida, o, sobre la superficie interna de un tubo capilar, entre otras [Mitra, 2003].

En la *SPME*, la extracción de los analitos no es exhaustiva, las muestras son analizadas después de alcanzar el equilibrio, o antes de éste, en un tiempo específico.

Ventajas de *SPME*:

- En el proceso de preparación de la muestra no se requieren solventes. Los procedimientos que comprende son de sorción y desorción.
- Es compatible con el sistema analítico cromatográfico [Setkova, 2007].
- El dispositivo para hacer el muestreo es portátil, lo que permite hacer monitoreos en campo [Musteata, 2007].
- Se necesita poca cantidad de muestra.
- Puede ser empleada para extraer sustancias orgánicas semivolátiles en muestras de aguas y matrices biológicas.
- Permite el análisis de compuestos a nivel de trazas [Mester, 2001].

Los sistemas que se estudian en el equilibrio, son susceptibles a los efectos sobre la matriz; un cambio en ésta, afecta las constantes de distribución de los analitos, lo que constituye una desventaja si se pretende realizar un análisis cuantitativo [Mitra, 2003].

1.4.1 Muestreo de sustancias orgánicas por SPME. El dispositivo empleado consta de una fibra de sílice fundida, cubierta con un sorbente. La fibra está protegida por una jeringa que además permite la penetración del *septum* del vial usado para muestrear, así como el del puerto de inyección del equipo cromatográfico.

En un análisis característico de *SPME*, hay dos formas de extraer los compuestos orgánicos volátiles. En modo directo, donde la fibra se expone directamente dentro de la matriz, o, en modo *headspace (HS-SPME)*, cuando la fibra se expone a los vapores de la muestra en el espacio de cabeza, donde ocurre la absorción o adsorción de los analitos, dependiendo del recubrimiento de la fibra que se emplea. Cuando la extracción termina, la fibra se retira, y se introduce al puerto de inyección de un *GC*, para la desorción de los compuestos [Mitra, 2003; Setkova, 2007]. En la **Figura 8**, se observa el dispositivo utilizado comúnmente para la *SPME*.

Algunas de las ventajas de *SPME* para el análisis de compuestos orgánicos volátiles:

- No requiere de instrumentos adicionales o *hardware*.
- El costo de las fibras es bajo en comparación con otros métodos para extracción de analitos volátiles.
- Con una variedad de recubrimientos para las fibras (**Tabla 6**), es posible cubrir un espectro amplio de compuestos orgánicos volátiles.
- Puede emplearse en matrices tales como aire, bebidas, alimentos, fármacos, productos naturales y fluidos biológicos [Musteata, 2007].

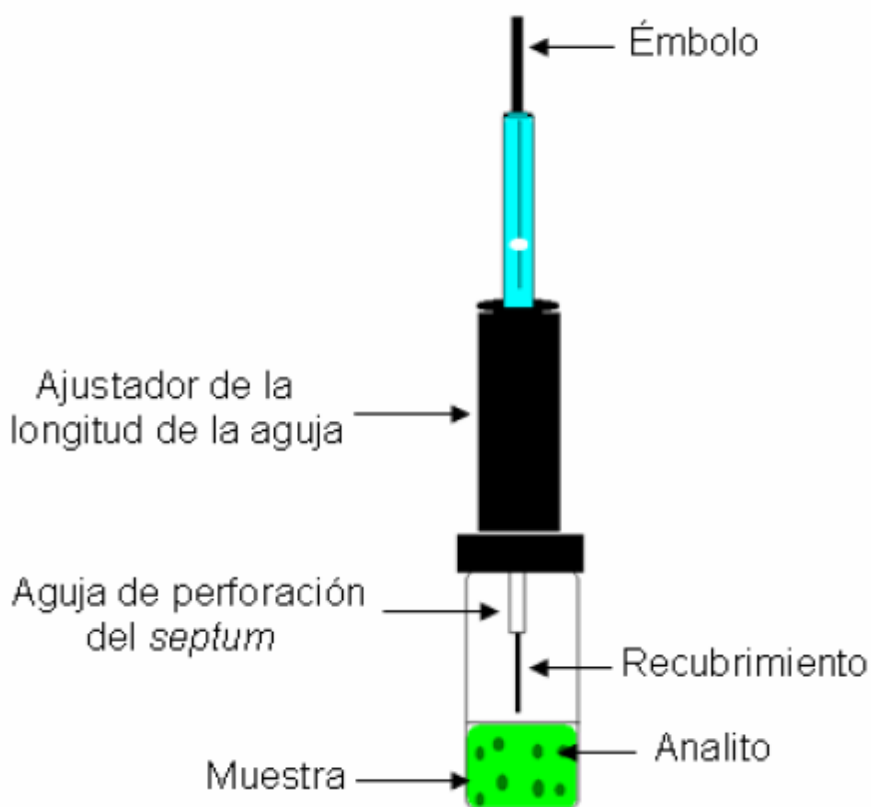


Figura 8. Dispositivo para SPME.

Tabla 6. Aplicaciones de SPME, según el tipo de recubrimiento de la fibra.

RECUBRIMIENTO DE LA FIBRA	ESPESOR (μm)	APLICACIONES
<i>Polydimethyl siloxane (PDMS)</i>	100	GC para volátiles.
<i>PDMS</i>	30	GC/HPLC para semivolátiles no polares.
<i>PDMS</i>	7	GC/HPLC para compuestos no polares de alto peso molecular.
<i>PDMS/Divinylbenzene (PDMS/DVB)</i>	65	GC/HPLC para volátiles, aminas, nitro-aromáticos.
<i>Polyacrilate (PA)</i>	85	GC/HPLC para semivolátiles polares.
<i>Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB)</i>	65,70	GC/HPLC para alcoholes y compuestos polares.
<i>Carboxen/PDMS</i>	75,85	GC para gases y compuestos de bajo peso molecular.
<i>PDMS/DVB</i>	60	HPLC para aminas y compuestos polares.
<i>Carbowax/Templated resin</i>	50	HPLC para surfactantes.

1.5 TÉCNICA ANALÍTICA

1.5.1 Cromatografía. Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (*IUPAC*), se define cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes, para ser separados, se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras que la otra, fase móvil, se mueve en una dirección definida. Según el estado físico de la fase móvil, se puede hacer una clasificación de la cromatografía así: cromatografía líquida (*LC*) y cromatografía de gases (*GC*). Es posible encontrar una subclasificación de acuerdo con el estado físico de la fase estacionaria [McNair, 1998].

1.5.2 Cromatografía de gases. En esta técnica los analitos se eluyen por el flujo de una fase móvil de gas inerte. Los analitos para cromatografía de gases, deben tener puntos de ebullición menores que 350°C y no descomponerse por debajo de esta temperatura; estas muestras pueden ser gases, líquidos o sólidos (estos últimos deben ser vaporizados). Las muestras de compuestos volátiles extraídos de las plantas que pueden ser ciertamente complejas, requieren métodos de separación de alta resolución; considerando esto, cromatografía de gases es la técnica de separación más apropiada [McNair, 1998; Schreier, 1984].

Con el propósito de realizar una identificación de los diferentes compuestos, se emplean los índices de retención de *Kovàts*, los cuales se utilizan para determinar la retención de un compuesto, comparándolo con los tiempos de retención de *n*-alcanos, analizados bajo las mismas condiciones operacionales [Rubinson, 2000].

1.5.3 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para la plena identificación de los compuestos presentes en una mezcla compleja de sustancias volátiles, es conveniente acoplar la cromatografía de

gases con una técnica espectroscópica, como la espectrometría de masas, que es considerada uno de los instrumentos de análisis químico más funcional e importante. La eficiencia de esta técnica en la identificación de los compuestos químicos de los AE, se manifiesta a través de los múltiples estudios realizados [Stashenko, 1995; 1996; 1999; 2004]. Así pues, los analitos se separan en el cromatógrafo e ingresan al detector de masas que proporciona el espectro, conjunto de las señales producidas por las especies generadas durante la ionización y la fragmentación de cada sustancia.

1.5.4 Cromatografía líquida. En *LC*, la fase móvil es un líquido; el poder de esta técnica, reside en la combinación de un amplio intervalo de posibles propiedades para la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, físico-químicamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores. Los diferentes tipos de *LC*, se clasifican según las interacciones que se producen entre la fase estacionaria y el soluto. Según ello, se denominan, cromatografías de fase normal, de fase reversa, de intercambio iónico o de filtración en gel [Rubinson, 2000].

Un tipo de *LC*, la cromatografía líquida de alta resolución (*HPLC*), es una de las técnicas cromatográficas más empleadas en la actualidad, la cual permite trabajar en régimen de alta presión. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ingeniería y para la sociedad en general, como, por ejemplo, proteínas, oligosacáridos, triglicéridos, vitaminas, fármacos, muestras medioambientales, entre otras [Iloset, 2003; Koh, 2006].

Antes de iniciar el desarrollo de un método en *HPLC*, es necesario examinar lo que se conoce sobre la muestra. En este aspecto es importante conocer

el número de compuestos presentes en la muestra, su estructura química y peso molecular, los valores de pK_a , los espectros ultravioleta (UV), así como la solubilidad de la muestra y el rango de concentración de los compuestos [Snyder, 1997].

2. METODOLOGÍA

2.1 CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA

Para obtener el material vegetal necesario para la investigación, se colectaron en el Kilómetro 2, vía a Ruitoque, en el municipio de Floridablanca, Departamento de Santander, las semillas de la planta *A. ringens*. Se realizó su germinación en la zona de cultivo del Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, Campus Principal de la UIS. Se ensayó un sustrato de 50% arena y 50% materia orgánica.

La caracterización taxonómica de la planta *A. ringens*, se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá). El pliego testigo de la planta quedó depositado como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), así: *Aristolochia ringens* (Vahl), número COL 519052. La planta fue clasificada por el doctor Fabio Gonzáles, a quien los autores expresan sus más sinceros agradecimientos.

2.2 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO

2.2.1 Reactivos y solventes. Los reactivos y solventes utilizados en la parte experimental de esta investigación, fueron grado *HPLC* y grado analítico. Las casas productoras y el grado de pureza de reactivos y solventes se resumen en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Sustancias químicas, empleadas en esta investigación.

REACTIVOS	PUREZA Y CASA PRODUCTORA
<i>n</i> -Tetradecano (sustancia de referencia para cromatografía de gases)	99.5%, Merck, Darmstadt, Alemania.

Tabla 7, continuación.

<i>n</i> -Hexano	99.9%, <i>Mallinckrodt Baker</i> , Inc., Paris, Francia.
Metanol	99.8%, <i>Riedel-de Haën</i> , <i>Seelze</i> , Alemania.
Cloruro de metileno	99.9%, <i>Mallinckrodt Baker</i> , Inc., Paris, Francia.
Ácidos aristolóquicos I y II (sustancia de referencia para <i>HPLC</i>)	AAI 28% y AAI 66%, <i>Sigma-Aldrich</i> . EE.UU.
Agua <i>HPLC</i>	<i>Mallinckrodt Baker</i> S.A., Estado de México, México.
Metanol <i>HPLC</i>	<i>Sigma-Aldrich</i> , Steinheim, Alemania.
Ácido acético	99.9%, <i>Mallinckrodt AR</i> , <i>Xalostoc</i> , Estado de México, México.

2.2.2 Materiales

- Tubos de ensayo tapa rosca de 16x150 mm (Kimax).
- Tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL (BRAND, *Postfach* 1155. D-97864 *Wertheim*, Alemania).
- Pipetas *Pasteur* de vidrio de 230 mm de longitud (BRAND, *Postfach* 1155. D-97861 *Wertheim*, Alemania).
- Embudo de vidrio (Kimax).
- Embudo de separación (Kimax).
- Balón de fondo redondo de 2 L, reductor de 45/50 a 24/40, alargadera 24/40, trampa *Dean-Stark*, condensador de bolas y condensador de espiras.
- Extractor *Soxhlet* de alta presión *J&W scientific*.inc.1500 psi.
- Micropipeteadores de 2-20, 25-250 y 100-1000 μ l (BRAND, *Postfach* 1155. D-97864 *Wertheim*, Alemania).
- *Holder* para *SPME* (Supelco).
- Fibra para *SPME* (Supelco) recubierta con una fase estacionaria de poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (*PDMS/DVB*) de 65 μ m de espesor.

- Fibra para *SPME* (Supelco) recubierta con una fase estacionaria de poli(dimetilsiloxano) (*PDMS*) de 100 μm de espesor.
- Viales estándar para *headspace* de 12 mL.
- Consumibles cromatográficos (*septa*, férrulas, *liners*, frascos de 1.5 mL para cromatografía de gases, jeringas Hamilton de 10 μL , otros).
- Gas especial (He, Aga FANO, S.A., Bucaramanga, Colombia).

2.2.3 Equipos menores

- Plancha de calentamiento con agitación magnética (SCHOTT MR 1065, Schott-Geräte GmbH, D-65719 *Hofheim*/Ts, Alemania).
- *Minishaker* (SCHOTT MR 1065, Schott-Geräte GmbH, D-65719 *Hofheim*/Ts, Alemania).
- Balanza digital (BA310S *Startius Basic*, ± 0.005 g, Alemania).
- Balanza analítica (AG285 METTLER TOLEDO, ± 0.00001 G, Suiza).
- Horno a microondas, *LG Intelowave*, con potencia de salida de 1200 W.
- Baño con circuito de flujo de agua, y temperatura programable (*Digital polystat temperature controller Cole Palmer*).
- Equipo de ultrasonido (Ultrasonic LC 20H).

2.3 OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.

El aceite esencial de la planta *A. ringens* se extrajo de hojas y tallos, por separado. Aproximadamente, 400 g de material vegetal fresco (hojas o tallos), fueron sometidos a hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, de acuerdo con el procedimiento descrito por Stashenko y colaboradores [2004]. El material vegetal fue sometido a extracción en un equipo de destilación tipo *Clevenger* con reservorio de destilación *Dean-Stark*, debidamente adaptado para calentamiento por la radiación de microondas en un horno doméstico (**Figura 9**). El tiempo total de extracción fue cuarenta minutos, en intervalos de 10 min (4 x 10 min), a 60% de la

potencia máxima del horno (720 W), empleando 300 mL de agua destilada. Este procedimiento se repitió seis veces para hojas y tallos, con el fin de obtener una cantidad “pesable” de AE; ya que los rendimientos fueron muy bajos. Posteriormente, el AE se separó por decantación y se pesó. El conjunto total de extracciones se realizó por triplicado, para poder reportar la desviación estándar del rendimiento del aceite esencial en hojas y tallos. Finalmente, se tomaron 50 μ L del AE a los cuales se le adicionaron 2 μ L de *n*-tetradecano como estándar interno (*Istd*) y se aforaron a 1 mL con diclorometano en un tubo cónico de poli(propileno). La muestra fue trasvasada a un vial estándar de 1.5 mL para su posterior análisis por GC-MS.

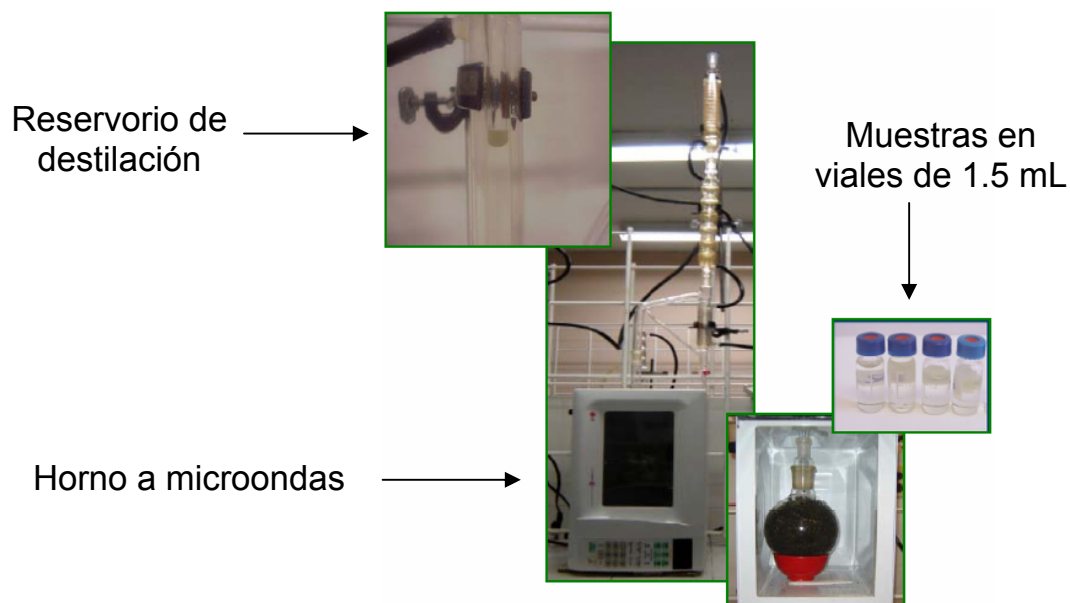


Figura 9. Montaje para hidroddestilación asistida por la radiación de microondas.

2.4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CON FLUIDO SUPERCRÍTICO

Los extractos con fluido supercrítico se obtuvieron de hojas, tallos y flores de la planta *A. ringens*, por separado, para lo cual se empleó material vegetal seco, previamente seleccionado y pesado.

Aproximadamente 4 g de hojas, 7 g de tallos y 2 g de flores, fueron sometidos a extracción con fluido supercrítico en un equipo de extracción *Soxhlet* de alta presión, empleando 300 g de CO₂ como disolvente en estado supercrítico (**Figura 10**). El *Soxhlet* fue sumergido en un baño María a 50°C, donde, una vez que el sistema alcanzó una presión de 1100 psi, se continuó con la extracción por un tiempo de 2 h. Posteriormente, el sistema se enfrió hasta conseguir una presión de 500 psi, después de lo cual se inició la despresurización por eliminación de CO₂. Los extractos fueron recogidos en diclorometano y trasvasados a tubos cónicos de poli(propileno), donde se concentraron con sumo cuidado con una corriente de nitrógeno, hasta un volumen inferior a 1 mL. Posteriormente, se les adicionó 1 µL de *n*-tetradecano como *istd* y se aforaron a 1 mL con el mismo solvente. Las muestras así preparadas se pasaron a viales estándar de 1.5 mL, para su posterior análisis por GC-MS. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado, para obtener datos de reproducibilidad.

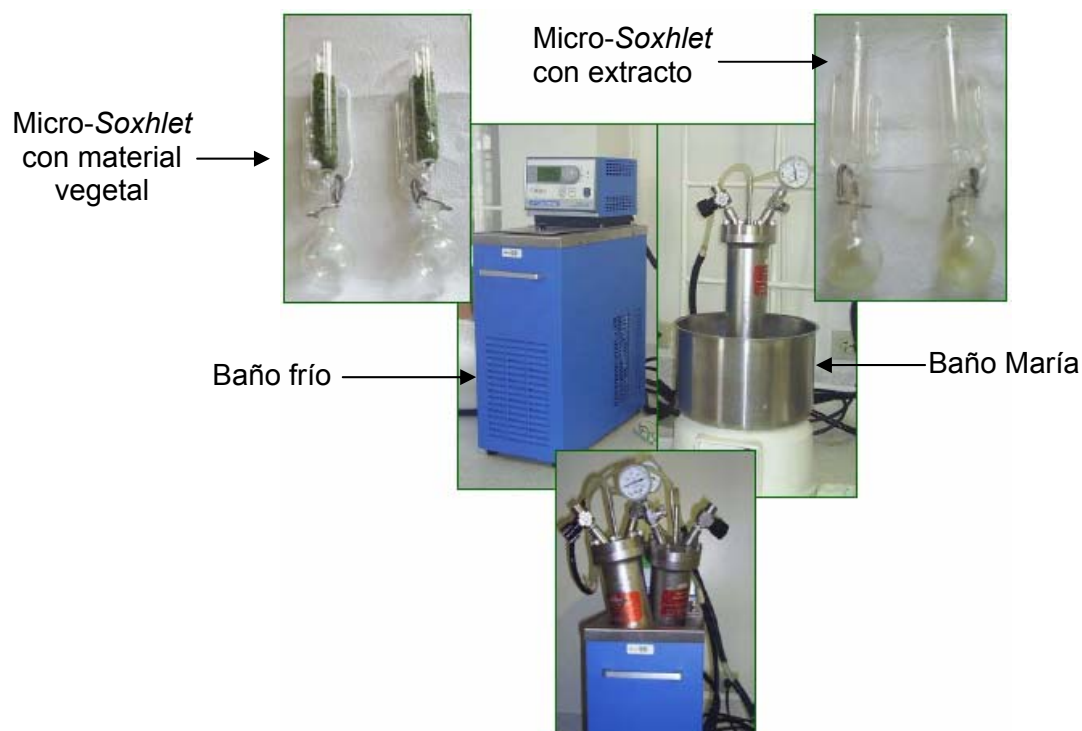


Figura 10. Equipo de extracción Soxhlet de alta presión, para la SFE con CO₂.

2.5 EXTRACCIÓN POR *HS-SPME IN-VITRO* DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE FLORES DE *ARISTOLOCHIA RINGENS*

Se tomaron aproximadamente 2.5 g de flores frescas de la especie *A. ringens*, previamente picadas y homogeneizadas, y se transfirieron a un vial ámbar tapa rosca para *SPME*, de 12 mL (**Figura 11**).

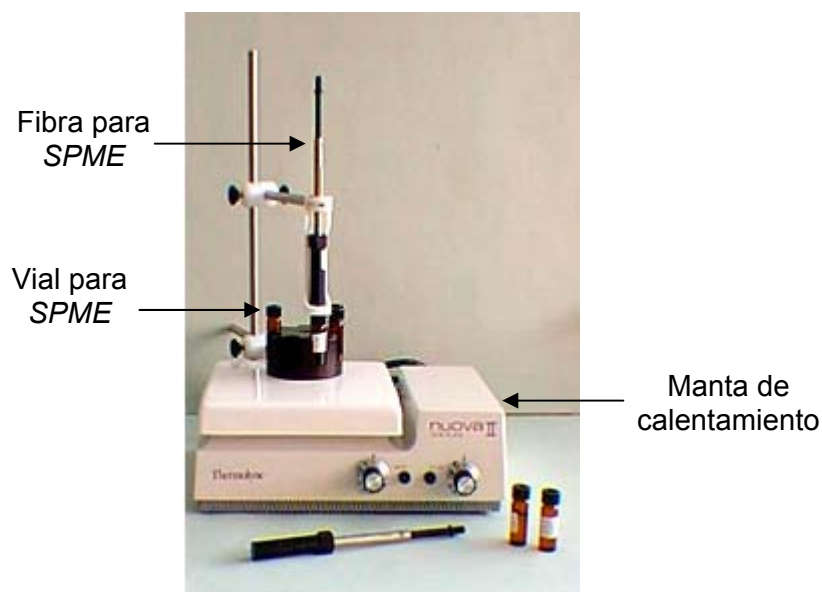


Figura 11. Montaje para *SPME in-vitro*.

Este sistema fue introducido en un baño María durante 10 min, a una temperatura de 60 °C, con el fin de lograr la etapa de pre-equilibrio de la muestra, antes de exponer la fibra para *SPME*. Después de concluida la etapa de pre-equilibrio, se procedió a exponer la fibra para *SPME* en el espacio de cabeza del vial, por un tiempo de 30 min, manteniendo la temperatura en el baño. Una vez transcurrido este tiempo, la fibra se retiró del vial que contenía la muestra y se llevó al puerto de inyección del equipo cromatográfico, para realizar la desorción de compuestos y su respectivo análisis. De la misma forma, se analizó un patrón de hidrocarburos (C_{10} - C_{25}), así como los blancos de los viales empleados. Este procedimiento se realizó por triplicado, utilizando dos tipos de fibras para *SPME* con diferentes

recubrimientos poliméricos, a saber: poli(dimetilsiloxano) (*PDMS*, 100 μm) y poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (*PDMS/DVB*, 65 μm).

2.6 EXTRACCIÓN *IN-VIVO* DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE FLORES DE *ARISTOLOCHIA RINGENS* POR *HS-SPME*

Una flor viva de la planta *A. ringens*, fue cuidadosamente puesta en pre-equilibrio a temperatura ambiente por 20 min, en un recipiente acrílico de forma cilíndrica. Una vez concluida la etapa de pre-equilibrio, se procedió a exponer la fibra para *SPME* de *PDMS/DVB* (65 μm), por un periodo de 30 min (**Figura 12**), luego, la fibra se retiró del dispositivo que contenía la flor y se llevó al puerto de inyección del equipo cromatográfico, donde se analizaron los compuestos adsorbidos. Este procedimiento se realizó por duplicado.

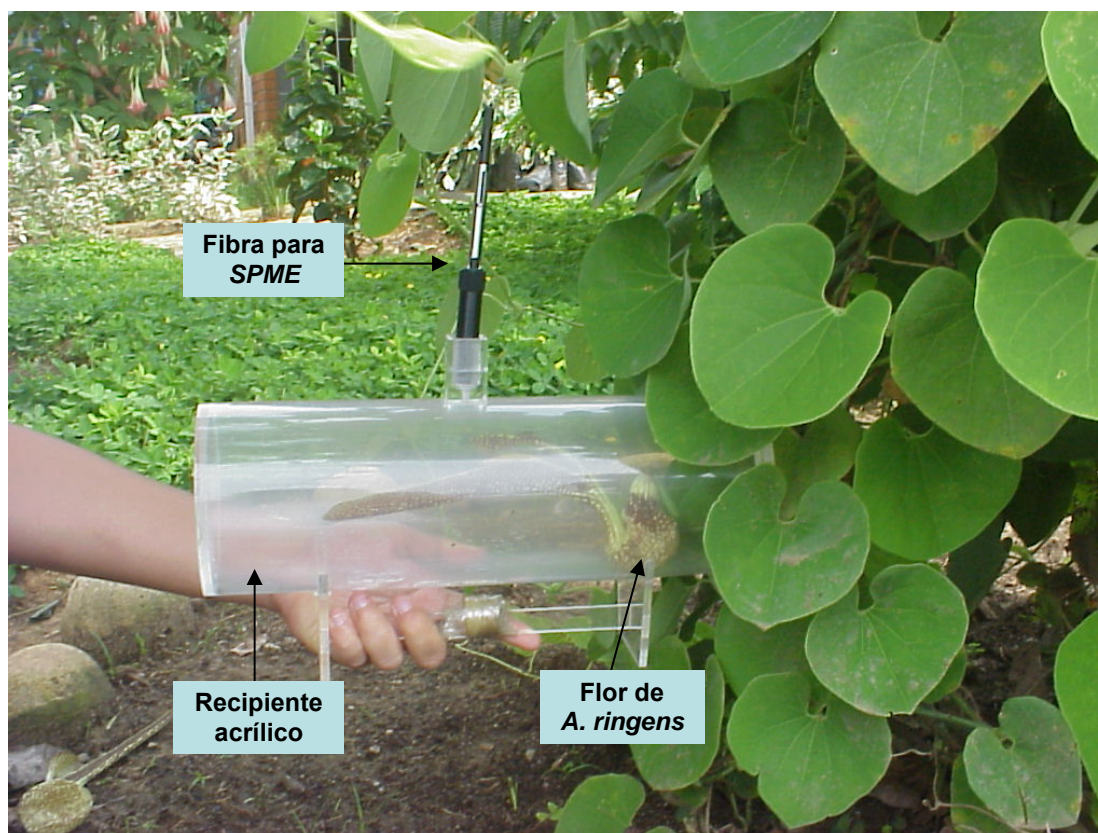


Figura 12. Muestreador para *SPME in-vivo*.

2.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Las muestras de AE y extractos se analizaron, empleando como técnica analítica, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para el análisis se usaron dos columnas cromatográficas de diferente polaridad, como se describe a continuación.

2.7.1 Análisis por GC-MS en columna apolar. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Serie GC System*, equipado con un detector selectivo de masas (*MSD Agilent Technologies 5973 Network*) y un inyector automático *Agilent Technologies 7683 Series* (**Figura 13**).

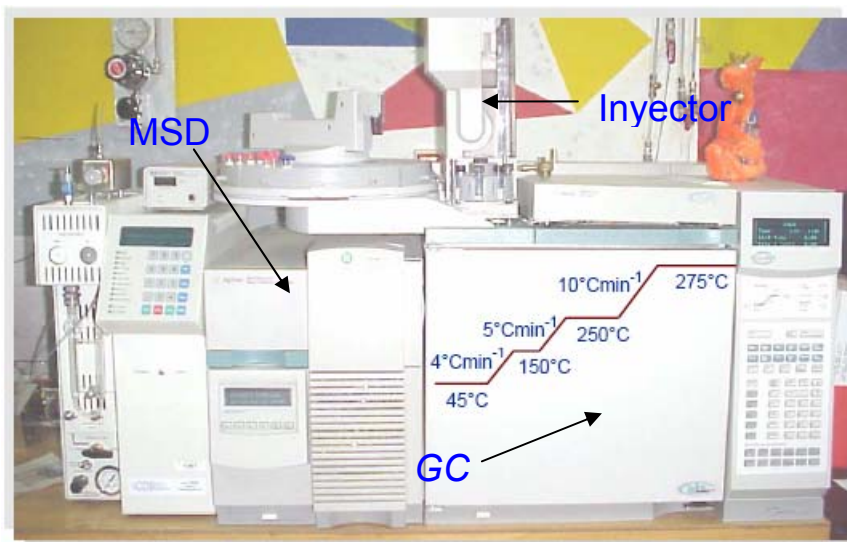


Figura 13. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus Serie GC System* acoplado a un detector selectivo de masas (*MSD Agilent Technologies 5973 Network*) y un inyector automático *Agilent Technologies 7683 Series*.

La separación de los analitos se realizó en una columna capilar de sílice fundida *DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.)* de 60 m x 0.25 mm (D.I.), recubierta con una fase estacionaria 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de

0.25 μm de espesor. Como gas de arrastre se empleó helio (99.995%, Aga Fano S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi y un flujo de 1 mL min^{-1} . La temperatura del horno del cromatógrafo de gases fue programada de la siguiente forma: el calentamiento inició a 45°C (5 min) hasta 150°C (2 min) @ 4°C min^{-1} , luego, hasta 250°C (5 min) @ 5°C min^{-1} y, finalmente, hasta alcanzar 275°C (15 min) @ 10°C min^{-1} . La relación de *split* empleada fue 1:30.

Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con una energía promedio de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron constantes en 230 y 285 °C, respectivamente. El *MSD* fue operado en el modo de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), en un rango de masas de *m/z* 40-350 Daltons. Los datos fueron procesados a través de un sistema de datos *HP-ChemStation* (Versión D.02.00.275).

La cuantificación de los metabolitos identificados se llevó a cabo según la **Ecuación 1**, usando el método de estandarización interna, suponiendo que el factor de respuesta del estándar interno es aproximadamente el mismo que el de los analitos. Como *Istd* se usó *n*-tetradecano, y se supuso que el volumen adicionado a cada una de las réplicas, fue exactamente el mismo.

$$C_x = \frac{C_{Istd} * A_x}{A_{Istd}}$$

Ecuación 1

Donde:

C_x : Concentración (g/L) del analito en la muestra;

C_{Istd} : Concentración (g/L) de *Istd*;

A_x : Área del pico cromatográfico del analito, *cuentas*;

A_{Istd} : Área del pico cromatográfico del *Istd*, *cuentas*.

2.7.2 Análisis por GC-MS en columna polar. El análisis cromatográfico en columna polar se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Serie GC*, equipado con un *MSD Agilent Technologies 5975* y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series* (**Figura 14**).

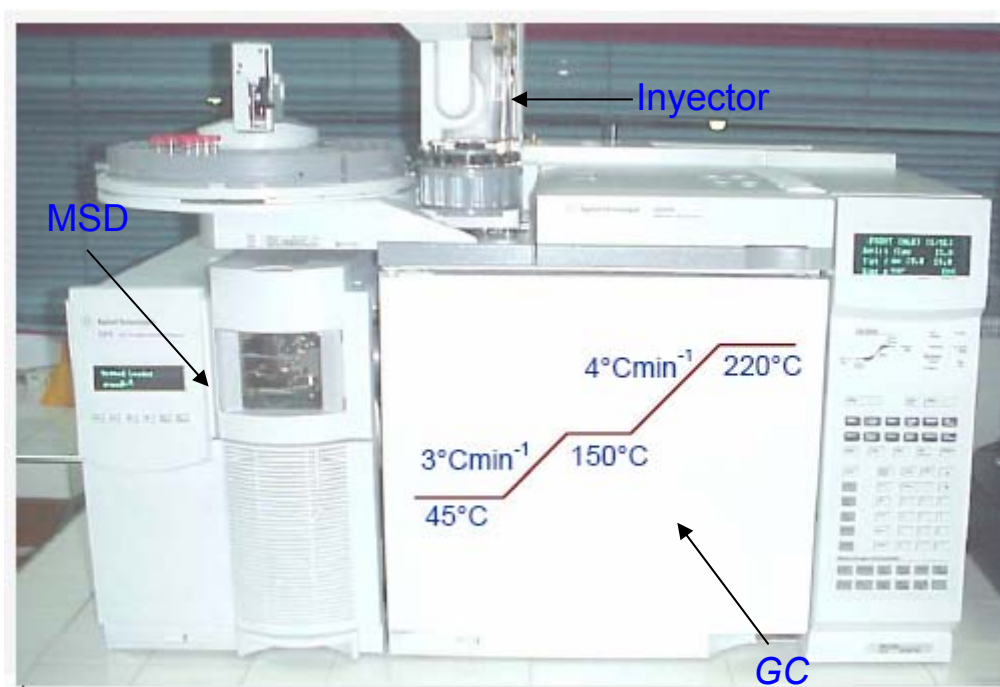


Figura 14. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Series GC*, equipado con un *MSD Agilent Technologies 5975* y un inyector automático *Agilent Technologies 7683B Series inyector*.

La separación de los analitos se llevó a cabo en una columna capilar de sílice fundida *DB-WAX (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.)* de 60 m x 0.25 mm (D.I.), recubierta con una fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada de poli(etilenglicol) de 0.25 μm de espesor. Como gas de arrastre se empleó helio (99.995 %, Aga Fano S.A.), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16.47 psi y un flujo de 1 mL min^{-1} . La temperatura del horno del cromatógrafo de gases se programó así: la temperatura inicial fue de 45°C (5 min) hasta 150°C (3 min) @ 3°C min^{-1} , seguidamente, se aumentó hasta 220°C (5 min) @ 4°C min^{-1} . La relación de *split* empleada fue 1:50.

Los espectros de masas fueron obtenidos por impacto de electrones con una energía promedio de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron constantes en 230 y 180 °C, respectivamente. El MSD fue operado en el modo de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), en un rango de masas de m/z 40-350 Daltons. Los datos fueron procesados a través de un sistema de datos *HP-ChemStation* (Versión D.02.00.275).

2.7.3 Análisis cromatográfico de los compuestos volátiles de flores de *Aristolochia ringens* obtenidos por HS-SPME. El análisis de compuestos volátiles extraídos por HS-SPME se realizó en un cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard 5890 Series II*, equipado con un *MSD Hewlett-Packard 5972* (Figura 15).

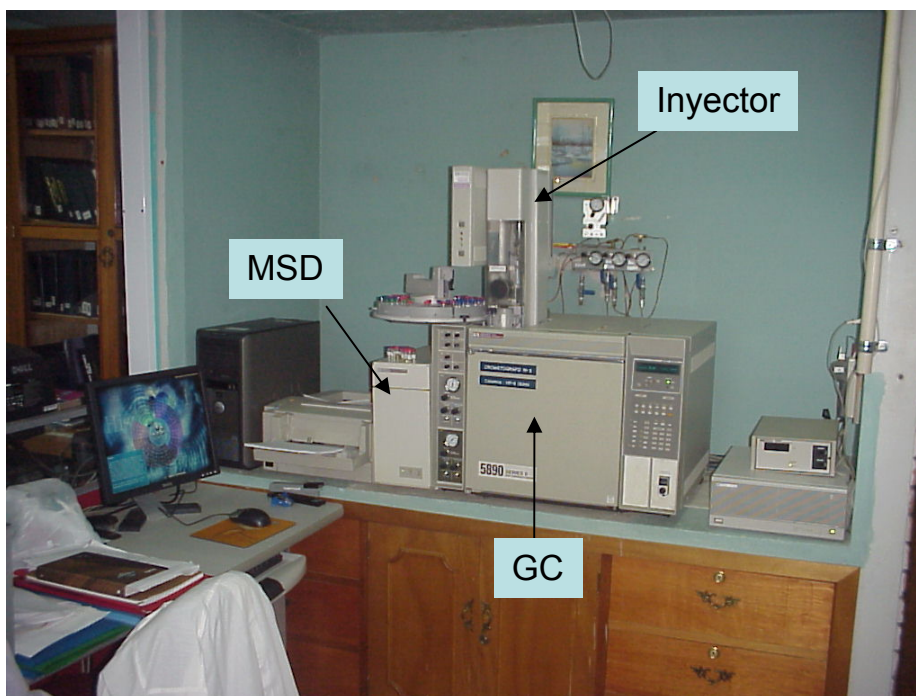


Figura 15. Cromatógrafo de gases *Hewlett-Packard 5890 Series II*, equipado con un *MSD Hewlett-Packard 5972*.

Para este análisis se empleó una columna cromatográfica *HP-5MS* (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 30 m x 0.25 mm (D.I.), recubierta con una fase estacionaria 5%-fenil-poli(metilsiloxano) de 0.25 μm de espesor. Como gas de arrastre se usó helio (99.995 %, Aga Fano S.A.), con un flujo de 1 mL min^{-1} . La temperatura del horno del cromatógrafo de gases fue programada así: 45°C (2 min) hasta 150°C (5 min) @ 6°C min^{-1} , seguidamente, se aumentó hasta 275°C (10 min) @ 8°C min^{-1} . La relación de *split* empleada fue 1:10.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones con una energía promedio de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron constantes en 180 y 285 °C, respectivamente. El *MSD* fue operado en el modo de barrido automático de radiofrecuencia (*full scan*), en un rango de masas de *m/z* 40-350 Daltons. Los datos fueron procesados a través de un sistema de datos *HP-ChemStation* (Versión D.02.00.275).

2.7.4 Caracterización de las muestras. La identificación de los componentes de los AE y extractos, se realizó por comparación de los patrones de fragmentación representados en los espectros de masas, con los encontrados en las bases de datos (*NIST, Adams, Wiley*), administradas en el *software Data Analysis Chemstation* de *Agilent Technologies*. Así como por comparación de los índices de Kovàts calculados, con los reportados. Los índices de Kovàts experimentales se calcularon mediante la **Ecuación 2**:

$$I_K = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

I_K : Índice de retención del compuesto de interés;

- n : Número de átomos de carbono del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés;
- t_{Rx} : Tiempo de retención del compuesto de interés, min;
- t_{Rn} : Tiempo de retención del n -alcano que eluye antes del compuesto de interés, min;
- t_{RN} : Tiempo de retención del n -alcano que eluye después del compuesto de interés, min.

2.8 DETERMINACIÓN DE LOS AAI Y AAI EN *A. RINGENS*

2.8.1 Preparación de las muestras. La determinación de los AA I y II presentes en la planta *A. ringens*, se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en [Jinbin, 2007]. Se estudiaron por separado diferentes partes de la planta, a saber: hojas, tallos y flores. Se empleó material vegetal seco, previamente seleccionado, pulverizado y pesado.

Aproximadamente 0.1 g de material vegetal pulverizado, se pesaron en tubos de ensayo tapa rosca, posteriormente, se les adicionó metanol grado *HPLC* (5 mL). La mezcla se sometió a extracción en un equipo generador de ultrasonido por 15 min; después, se centrifugó por 10 min y el extracto se transfirió a otro tubo de ensayo. Las extracciones con metanol fueron repetidas siete veces. Los extractos se combinaron y se concentraron a un volumen de 10 mL. Todos los extractos se filtraron antes de su análisis por *HPLC*. Cada procedimiento se realizó por triplicado, para determinar la reproducibilidad del método extractivo.

2.8.2 Análisis por *HPLC/UV-DAD*. Los AA I y II se analizaron en un cromatógrafo líquido *Agilent Technologies 1200 Series*, equipado con un detector ultravioleta-visible con arreglo de diodos (*UV-VIS-DAD*) y una columna cromatográfica apolar *Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical* (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m) operada a 30°C (**Figura 16**).

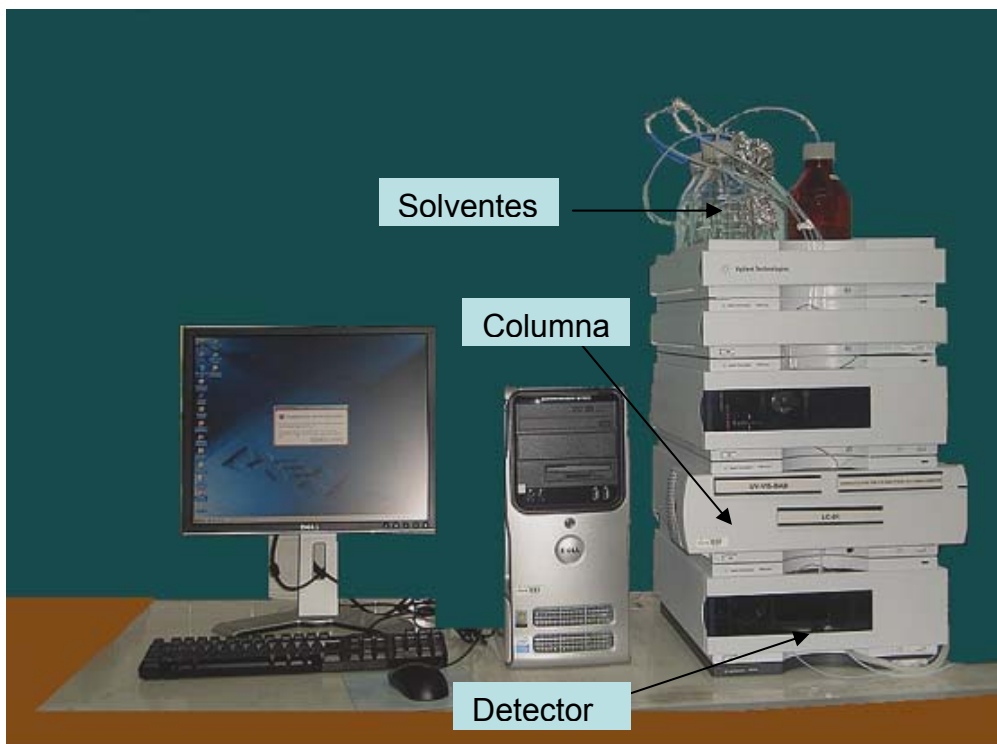


Figura 16. Cromatógrafo de líquidos *Agilent Technologies 1200 Series*, equipado con un detector ultravioleta visible con arreglo de diodos (*UV-VIS-DAD*) y una columna cromatográfica apolar *Zorbax Eclipse XDB-C18 Analytical* (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m).

Como fase móvil se usó una mezcla de metanol con una solución acuosa de ácido acético (0,1 % v/v) 60-40%, a un flujo de 1 mL min⁻¹. Se operó en modo isocrático. El volumen de inyección de las muestras fue de 20 μ L. Se usó un barrido UV de 200-400 nm. La longitud de onda de detección fue de 252 nm. Todas las muestras se filtraron, usando membranas (fritas) de 0,45 μ m, antes de ser inyectadas. Los datos se procesaron a través de un sistema de datos *ChemStation Agilent for LC 3D 2004-2005*. La identificación de los AA se hizo, por comparación de los tiempos de retención (t_R) y espectros UV de la muestra, con los t_R y espectros UV obtenidos de patrones certificados de AAI y AAll, sometidos para su análisis a las mismas condiciones cromatográficas operacionales.

A. Determinación de las figuras analíticas de mérito. Se inyectaron por triplicado al cromatógrafo líquido bajo las condiciones descritas en la **Sección 2.8.2**, las soluciones de la sustancia de referencia certificada de AA, empleadas para la curva de calibración, así como muestras de los extractos de las diferentes partes de la planta *A. ringens*. Se realizó el estudio estadístico, para evaluar: la repetibilidad, la reproducibilidad, la linealidad de la curva de calibración y los niveles mínimos de detección y cuantificación (*LOD* y *LOQ*) para los AA.

A continuación, se muestran algunas de las fórmulas empleadas para calcular las diferentes figuras analíticas de mérito (**Ecuación 3**) [Miller, 1993]:

Ecuación 3.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} ; \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} ; \% CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} * 100$$

$$S_{y/x} = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2} \right]^{\frac{1}{2}} ; S_b = \left[\frac{S_{y/x}}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \right]^{\frac{1}{2}}$$

Donde:

-
- \bar{X} = Valor promedio de la variable X (t_R , áreas);
- X_i = Valor "iésimo", para la variable X;
- % CV = Coeficiente de variación;
- σ = Desviación estándar;

$S_{y/x}$ = Raíz principal de los errores al cuadrado;

Y_i = Valor "iésimo", para la variable Y (Área en mAU*s);

\hat{Y}_i = Valor "iésimo", para la variable Y (Área en mAU*s), calculado con la ecuación de la curva de calibración

S_b = Desviación estándar de la pendiente

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El pliego testigo de la especie identificada, fue archivado como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, con el número de *voucher* registrado en la **Tabla 8**. El doctor Fabio Gonzáles hizo la clasificación botánica de la planta estudiada.

Tabla 8. Número de *voucher* COL de la especie estudiada.

ESPECIE	AUTOR	FAMILIA	No. COL
<i>Aristolochia ringens</i>	Vahl	<i>Aristolochiaceae</i>	519052

El porcentaje de germinación calculado, con base en un total de 300 semillas sembradas y 184 germinadas corresponde al 61% (**Figura 17**).



Figura 17. Germinación de las semillas de *A. ringens*.

3.1 AISLAMIENTO Y ANÁLISIS POR GC-MS DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS CON FLUIDO SUPERCRÍTICO

Los resultados de las caracterizaciones químicas de los AEs y extractos (*SFE*) de hojas y tallos de *A. ringens*, se presentan a continuación.

3.1.1 Análisis del AE y extracto de hojas de *A. ringens*. El AE obtenido mediante *MWHD* presentó un olor penetrante, y un color translúcido, ligeramente amarillo. El rendimiento de extracción (en base fresca) fue de 0.008 ± 0.0022 % (p/p) (n=3), el cual es un rendimiento bajo, teniendo en cuenta que los rendimientos reportados para la mayoría de las especies vegetales aromáticas comerciales superan el 0.1 %.

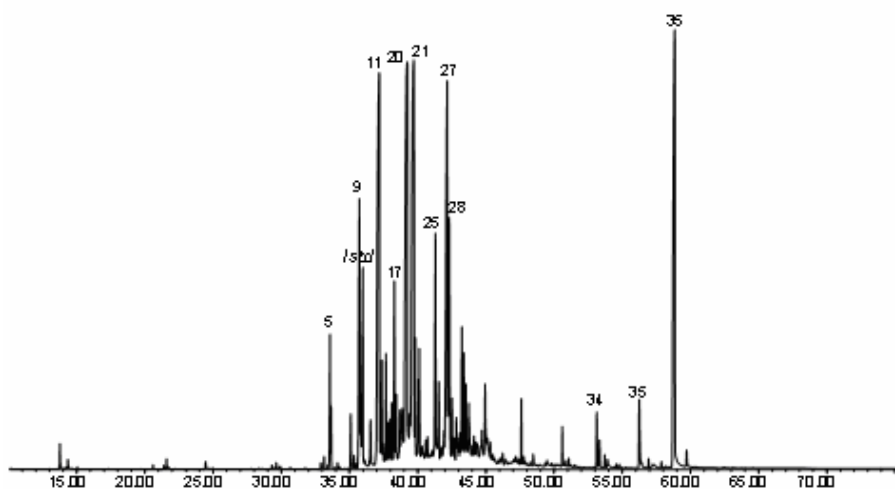
Para la obtención del extracto con fluido supercrítico se utilizó material vegetal seco, ya que el agua presente en la planta actúa como solvente, aumentando la polaridad del sistema, lo cual interfiere en este proceso extractivo. El rendimiento de esta extracción fue de 4 ± 1.8 % (p/p) (n=3), sin embargo, esta técnica fue poco reproducible, ya que fue difícil controlar variables tales como: la cantidad exacta de CO₂ y la velocidad de despresurización, las cuales tienen incidencia sobre la cantidad de extracto recuperado.

En la **Figura 18**, se presentan los perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios de hojas de *A. ringens*, aislados por *MWHD* y *SFE*, y analizados por *GC-MS*, usando una columna cromatográfica apolar DB-5, de 60 m de longitud.

En la **Tabla 9** se relacionan los componentes mayoritarios aislados e identificados, según su orden de elución en la columna apolar, con sus respectivos índices de retención, cantidades relativas, y concentraciones (solo para el AE aislado por *MWHD*) determinadas por el método de

estandarización interna. En la fracción aislada por *MWHD* fueron identificados 36 componentes (cantidad relativa, $\geq 0.08\%$), que representan el 84 % de la corriente iónica total reconstruida (*TIC*) del AE, bajo los parámetros de integración aplicados (umbral de integración, *Thshd*=18 y área de rechazo del pico en la base=0.1).

A



B

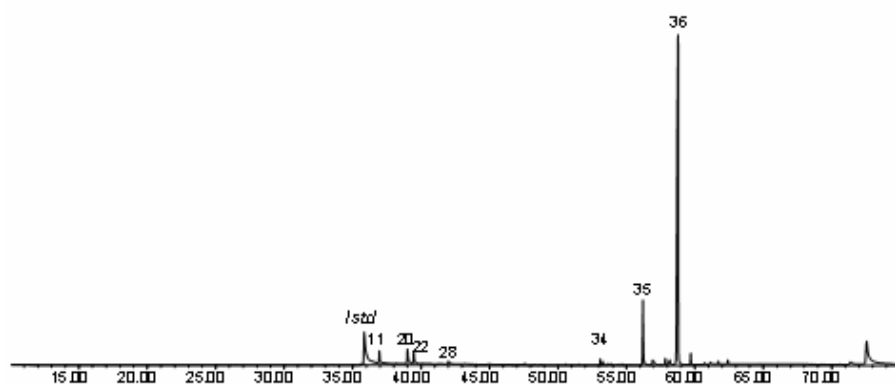


Figura 18. Perfiles cromatográfico típicos del AE y extracto de hojas de *A. ringens*, aislados por: **A.** *MWHD* y **B.** *SFE*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, *MSD* (EI, 70 eV). En la **Tabla 9** se reporta la identificación de los picos cromatográficos.

Como se puede observar en la **Figura 18**, los extractos aislados por *SFE*, presentaron un perfil cromatográfico con menos picos, que el obtenido para

el AE aislado por *MWHD*. En este caso, se identificaron positivamente 7 componentes (cantidad relativa, $\geq 0.3\%$), los cuales representan el 81 % de la *TIC*, bajo los parámetros de integración escogidos (umbral de integración, *Thshd*=17 y área de rechazo del pico en la base=0.05).

Los cuatro componentes mayoritarios en el AE de hojas, aislado por *MWHD*, fueron: *trans*-4(14),5-muurola-dieno (13%), biciclogermacreno (12.8%), *trans*- β -cariofileno (11.4%) y el éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico (10.3%). Cabe destacar, que de estos cuatro compuestos, el *trans*- β -cariofileno ya ha sido reportado entre los compuestos mayoritarios de las especies *A. acutifolia*, *A. argentina*, *A. brevipes*, *A. chilensis*, *A. debilis*, *A. elegans*, *A. gibertii*, *A. indica*, *A. longa* y *A. melanoglossa*, así como el biciclogermacreno en *A. argentina*, *A. elegans*, *A. gibertii*, *A. heterophylla*, *A. kaempferi*, *A. manshuriensis* y *A. mollissima* [Wu, 2004].

Por otra parte, se pudo determinar que la extracción con fluido supercrítico no dió buenos resultados para las hojas de *A. ringens*; como se puede observar en la **Tabla 9**. Por este método fueron aislados e identificados positivamente, siete compuestos, de los cuales, aparentemente, solo el germacreno D no se logró aislar por *MWHD*, los otros seis, fueron identificados también en el AE. Sin embargo, se puede observar, que la *SFE* permite una alta selectividad para aislar el éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico, el cual constituye el 67 % del extracto de hojas de *A. ringens*.

Tabla 9. Cantidad relativa (%), concentración (mg/L de AE) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por MWHD y SFE de hojas de *A. ringens*.

N° Pico ^a	Compuesto	I _K ^b		Cantidad relativa, % ^c		Concentración [mg/L] ^c
		DB-5	DB-WAX	MWHD	SFE	MWHD
1	(Z)-3-Hexenol	-	1382	0,245±0,000	-	3000±34
2	<i>n</i> -Hexanol	-	1352	0,092±0,0071	-	1120±98
3	Limoneno	1032	1194	0,081±0,0049	-	990±73
4	Linalool	1100	1547	0,080±0,0092	-	1000±120
5	1-Etenil-1-metil-2-(1-metiletenil)- 4-(1-metiletiliden)ciclohexano	1333	1485	1,39±0,064	-	17000±960
6	δ-Elemeno	1335	1473	0,54±0,011	-	6700±210
7	α-Ylangeno	1374	1490	0,58±0,036	-	7100±520
8	α-Copaeno	1380	1498	0,139±0,0092	-	1700±130
9	β-Bourboneno + β-Elemeno	1391	1528-1598	4,3±0,32	-	52000±4500
10	α -Gurjuneno	1414	1538	0,56±0,033	-	6900±480
11	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1433	1613	11,4±0,17	1,2±0,32	139300±600
12	β-Copaeno	1439	1688	1,05±0,048	-	12900±720
13	β-Gurjuneno	1441	1599	0,230±0,0064	-	2810±42
14	6,9-Guaiadieno	1448	1615	1,24±0,047	-	15200±730
15	<i>cis</i> -3,5- Muurola-dieno	1453	1606	0,45±0,023	-	5500±340
16	<i>allo</i> -Aromadendreno	1457	1658	0,54±0,024	-	6600±360
17	α-Humuleno	1467	1682	2,01±0,073	-	25000±1200
18	γ-Gurjuneno	1471	1619	0,76±0,033	-	9400±500
19	γ-Muuroleno	1479	1700	0,74±0,029	-	9100±450
20	Germacreno-D	1491	1717	-	2,2±0,5	-
21	<i>trans</i> -4(14),5-Muurooladieno	1495	1728	13,0±0,22	-	159000±1100
22	Biciclogermacreno	1510	1753	12,8±0,28	1,5±0,30	157000±1700
23	γ-Cadineno	1522	1772	0,78±0,081	-	9600±880
24	δ-Cadineno	1524	1767	1,09±0,041	-	13400±650
25	(E)-Nerolidol	1564	2039	3,05±0,078	-	37000±1400

Tabla 9, continuación.

26	Germacreno B	1572	1846	1,01±0,036	-	12400±580
27	Benzoato de (Z)-3-hexenilo + N.I.	1578		0,17±0,045	-	2100±520
28	Espatulenol	1593	2142	8,03±0,081	0,42±0,051	98000±2000
29	Óxido de cariofileno + N.I.	1598	2008	4,07±0,037	-	49820±73
30	Salvial-4(14)-en-1-ona + N.I.	1606	2032	0,74±0,031	-	9100±470
31	β-Biotol	1612		0,25±0,016	-	3100±220
32	Epóxido II de humuleno	1624		0,20±0,010	-	2500±150
33	Esclareno	1948		0,27±0,034	-	3300±450
34	Manool	2075		0,53±0,022	0,66±0,033	6500±200
35	Esclareol	2223		0,82±0,035	8,4±0,32	10100±320
36	Éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico	2331	2142	10,3±0,81	67±2,6	126000±8600

^a Número de pico en la **Figura 12**.

^b Índices de Kováts experimentales (Columna DB-5, 60m).

^c Promedio de tres extracciones, n=3.

N.I. No identificado.

Se pudo determinar que el 66% de los metabolitos identificados, en el AE aislado por *MWHD*, corresponde a hidrocarburos sesquiterpénicos, dentro de los cuales se destaca la presencia de *trans*-4(14),5-muuro-la-dieno, *trans*- β -cariofileno y biciclogermacreno. El 19% pertenece a la familia de los sesquiterpenos oxigenados, destacándose la presencia de espatulenol y (E)-nerolidol. También se detectó la presencia de diterpenoides, que alcanzaron el 14% de los compuestos identificados, siendo el éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico, el componente mayoritario en este grupo de compuestos (**Figura 19**).

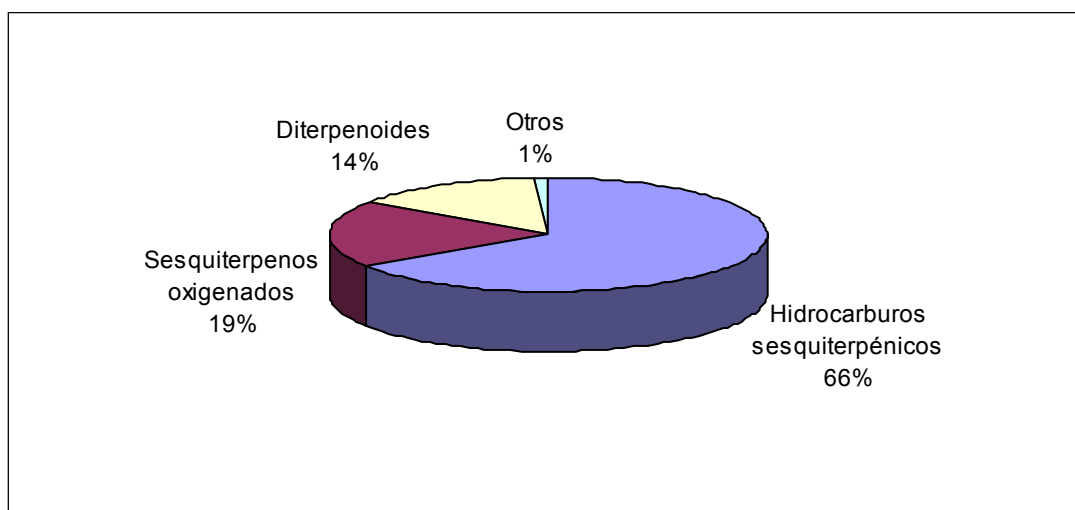


Figura 19. Clasificación de los metabolitos identificados en el AE de hojas aislado por *MWHD*, según la familia de compuestos a la que pertenecen.

3.1.2 Análisis del AE y extracto de tallos de *A. ringens*. El AE de tallos de *A. ringens*, obtenido mediante *MWHD* presentó un olor intenso y penetrante, ligeramente cítrico, y un color amarillo translúcido. El rendimiento de extracción (en base fresca) fue de 0.047 ± 0.0026 % (p/p) (n=3). A pesar de que este rendimiento fue casi seis veces más alto, que el rendimiento del AE en hojas, sigue siendo un rendimiento bajo comparado con los reportados para la mayoría de las especies vegetales aromáticas comerciales. El rendimiento de la *SFE* de tallos de *A. ringens* alcanzó el 1.2 ± 0.25 % (p/p) (n=3).

Los perfiles cromatográficos típicos de los metabolitos secundarios aislados de tallos de *A. ringens*, por *MWHD* y *SFE*, y obtenidos por *GC-MS* y la columna cromatográfica apolar DB-5, de 60m de longitud, se presentan en la **Figura 20**.

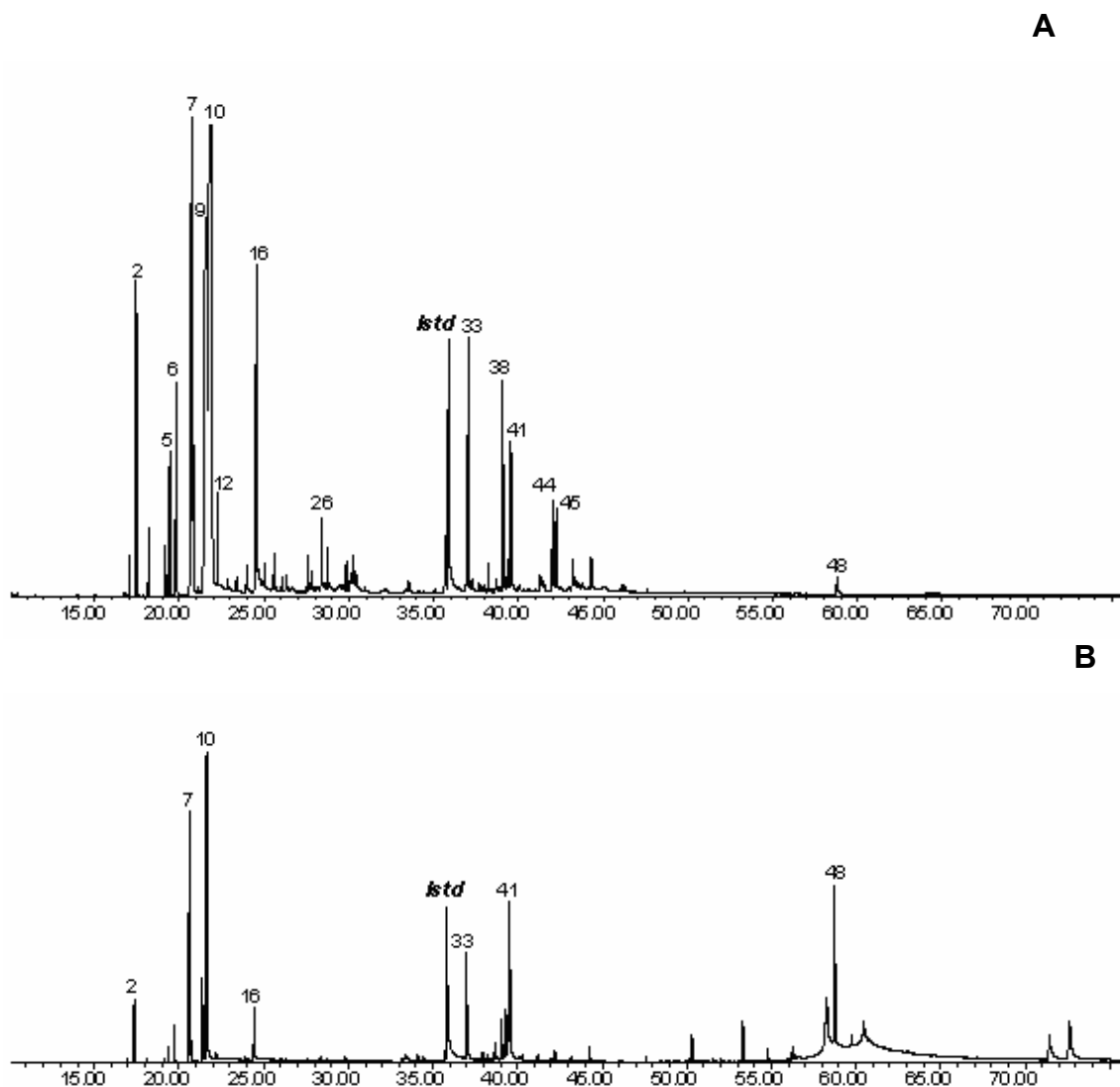


Figura 20. Perfiles cromatográficos típicos del AE y extracto aislados de tallos de *A. ringens*, por: **A.** *MWHD* y **B.** *SFE*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, *MSD* (EI, 70 eV). En la **Tabla 10** se reporta la identificación de los picos cromatográficos.

En la **Tabla 10** se reportan los componentes mayoritarios aislados e identificados, según su orden de elución en esta columna, junto con sus

respectivos índices de retención, cantidades relativas (%), y concentraciones (mg/L de AE) determinadas por el método de estandarización interna. En el AE de tallos de *A. ringens*, aislado por *MWHD*, se identificaron positivamente 46 componentes ($\geq 0.06\%$), que representan el 98% de la *TIC*. Los siguientes fueron los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, *Thshd*=17 y área de rechazo del pico en la base=0.05. En el extracto aislado mediante *SFE*, se identificaron positivamente 20 componentes ($\geq 0.4\%$), los cuales representan el 86 % de la *TIC*; se usaron los siguientes parámetros de integración: umbral de integración, *Thshd*=17 y área de rechazo del pico en la base=0.1.

Los siguientes fueron los compuestos mayoritarios presentes en el AE aislado por *MWHD* de tallos de *A. ringens*: limoneno (20%), *p*-cimeno (17.8%) y α -felandreno (16.1%), de ellos el limoneno ya fue reportado dentro de los compuestos mayoritarios de las especies *A. argentina*, *A. asclepiadifolia*, *A. brevipes*, *A. debilis*, *A. elegans*, *A. gibertii* y *A. gigantea*. El α -felandreno, fue reportado en la especie *A. argentina* [Wu, 2004].

En la **Figura 20** se puede observar, que la extracción con fluido supercrítico fue más eficiente para tallos de *A. ringens*, que para las hojas. Sin embargo, mediante este proceso extractivo se aisló una cantidad significativamente menor de metabolitos, que la obtenida por el método de *MWHD*. Los siguientes fueron componentes mayoritarios: limoneno (19.8%), α -felandreno (12.21%) y el éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico, el cual alcanzó el 11 % del extracto (*SFE*) de tallos de *A. ringens*.

Tabla 10. Cantidad relativa (%), concentración (mg/L de AE) e identificación de los metabolitos secundarios aislados por *MWHD* y *SFE* de tallos de *A. ringens*.

No. Pico ^a	Compuesto	I _k ^b		Cantidad relativa, % ^c		Concentración,
		DB-5	DB-WAX	<i>MWHD</i>	<i>SFE</i>	[mg/L] ^c
						<i>MWHD</i>
1	α-Tujeno	928	1022	0,47±0,032	-	2600±210
2	α-Pineno	937	1019	4,9±0,11	2,3±0,28	27000±1100
3	Canfeno	954	1060	0,99±0,057	-	5500±210
4	Sabineno	976	1116	0,60±0,035	-	3300±240
5	β-Pineno	982	1102	1,89±0,065	0,60±0,072	10400±550
6	β-Mirceno	991		3,62±0,063	1,4±0,16	20000±850
7	α-Felandreno	1014	1164	16,1±0,35	12,21±0,081	89000±2000
8	Δ ³ -Careno	1015		1,09±0,040	0,9±0,20	6000±380
9	p-Cimeno	1034	1270	17,8±0,66	4,0±0,30	98000±6400
10	Limoneno	1040	1202	20±1,3	19,8±0,87	113000±6500
11	β-Felandreno + eucaliptol	1042	1208+1210	3,1±0,23	3,0±0,61	17000±1300
12	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1049	1250	1,04±0,012	-	5700±180
13	γ-Terpineno	1063	1243	0,128±0,0032	-	700±28
14	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno + <i>cis</i> -óxido de linalool (Furanoide)	1076	1466	0,081±0,0071	-	440±44
15	Terpinoleno + <i>trans</i> -óxido de linalool (Furanoide)	1090	1449	0,322±0,0095	-	1770±52
16	Linalool	1104	1547	6,5±0,10	2,4±0,29	36000±1800
17	Isovalerato de isopentilo *	1106	1293	0,4±0,12	-	2200±760

Tabla 10, continuación.

18	C ₁₁ H ₁₈ (N.I.)	1113	1303	0,06±0,044	-	320±250
19	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	1124	1580	0,16±0,019	-	900±110
20	<i>cis-p</i> -Menta-2-en-1-ol	1127		0,30±0,018	-	1630±96
21	<i>trans</i> -Óxido de limoneno + <i>cis-p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1137	1447	0,22±0,025	-	1200±150
22	<i>trans-p</i> -Ment-2-en 1-ol + N.I.	1143	1415	0,22±0,019	-	1230±93
23	Alcanfor + N.I.	1151	1521	0,11±0,021	-	580±130
24	Borneol	1171	1708	0,49±0,012	-	2680±57
25	Terminen-4-ol	1176		0,159±0,0084	-	880±53
26	α-Terpineol	1188		0,69±0,065	-	3800±260
27	Metil timol éter	1227		0,31±0,013	-	1680±20
28	1-Etenil-1-metil-2-(1-metiletenil)-4-(1-metiletilideno)ciclohexano	1330	1485	0,22±0,013	-	1220±70
29	δ-Elemeno	1332	1473	0,250±0,0067	-	1380±60
30	β-Bourboneno	1387	1526	0,493±0,0085	-	2720±76
31	β-Elemeno	1388	1591	0,26±0,022	0,46±0,078	1410±74
32	C ₁₅ H ₂₄ (N.I.)	1423		0,090±0,0047	-	500±15
33	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1426	1609	3,8±0,12	6,4±0,29	20700±700
34	γ-Elemeno	1430		0,128±0,0061	-	700±33
35	6,9-Guaiadieno	1444	1615	0,092±0,0038	-	510±38
36	α-Humuleno	1463	1676	0,309±0,0038	-	1710±57
37	β-Chamigreno + 7,9(11)-dieno-drima	1484		<i>tr</i>	1,25±0,086	-
38	Germacreno D	1488	1717	3,1±0,10	2,2±0,19	17000±1100
39	Valenceno	1493		0,140±0,0030	0,68±0,049	770±15
40	β-Selineno	1496		0,42±0,015	2,8±0,26	2310±80
41	α-Selineno + biciclogermacreno	1502	1746	3,41±0,085	12±1,7	18800±870
42	<i>trans</i> -Nerolidol	1562		0,37±0,059		2100±400
43	Germacreno B	1569	1844	0,152±0,0036		840±53
44	Espatulenol + germacreno D-4-ol	1587	2138	1,1±0,22		6000±1400
45	Óxido de cariofileno	1594	2008	1,2±0,18	0,86±0,076	7000±1200
46	Selin-11-en-4-α-ol	1673	2271	0,270±0,0075	0,84±0,071	1490±77

Tabla 10, continuación.

47	Esclareol	2228		<i>tr</i>	0,72±0,084	-
48	Éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico	2325	2142	0,25±0,050	11±1,2	1400±330

^a Número de pico en la **Figura 14**.

^b Índices de Kovàts experimentales (Columna DB-5, 60m).

^c Promedio de tres extracciones, n=3.

N.I. No identificado.

tr Trazas.

* Identificado tentativamente.

A diferencia del AE de hojas, el AE de tallos aislado mediante *MWHD*, presenta un elevado porcentaje de hidrocarburos monoterpénicos (73%), entre ellos figuran los tres componentes mayoritarios del aceite esencial. El siguiente grupo de compuestos, fueron los hidrocarburos sesquiterpénicos (13%), seguido de los monoterpenos oxigenados (10%), entre los últimos se destaca la presencia de linalool, que constituyó el 65% en este grupo. Por último, se observó una reducida cantidad de sesquiterpenos oxigenados, que representaron sólo el 3% de los componentes identificados en el AE (**Figura 21**).

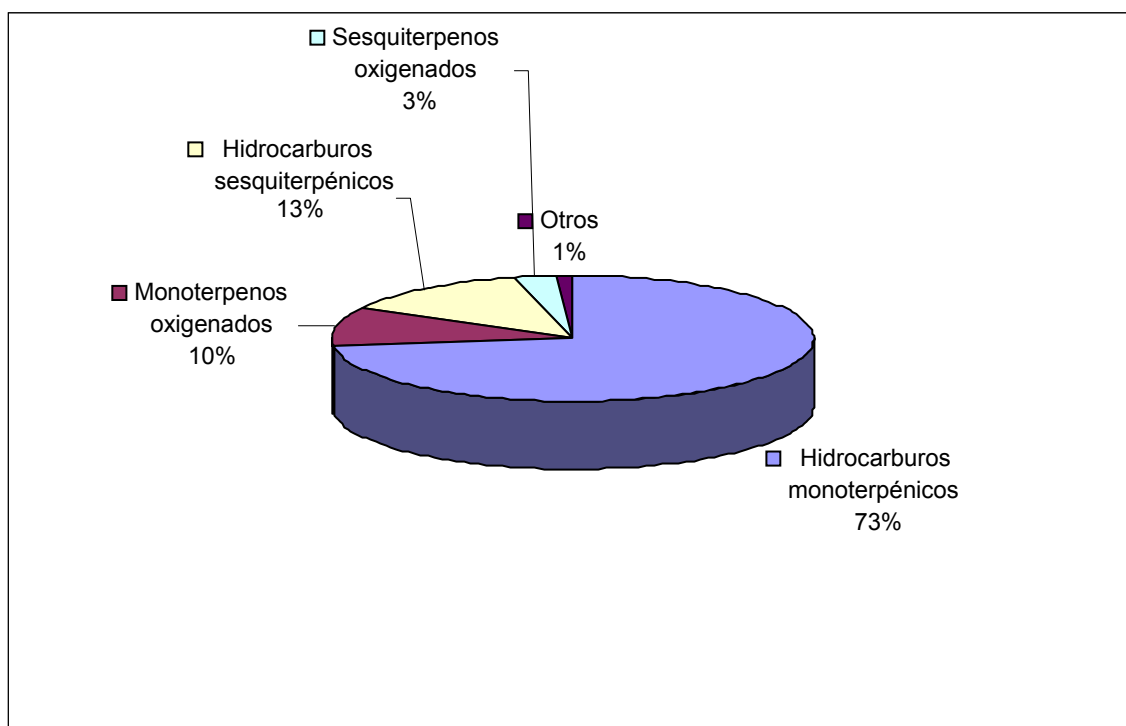


Figura 21. Clasificación de los metabolitos identificados en el AE aislado por *MWHD* de tallos de *A. ringens*, según la familia de compuestos a la que pertenecen.

3.1.3 Análisis del extracto de flores de *A. ringens*. El rendimiento de la *SFE* (en base seca) de flores de *A. ringens* fue de 4 ± 1.8 % (p/p) (n=3). El perfil cromatográfico típico del extracto obtenido por *SFE* de flores de *A. ringens*, analizado por *GC-MS*, en la columna apolar DB-5, de 60m de

longitud, se presenta en la **Figura 22**. Como se puede observar, en el cromatograma sólo aparece un pico diferente al del estándar interno (*Istd*), y éste corresponde al éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico (**Figura 23**). Ello muestra que podría tratarse de un compuesto de importancia en el metabolismo de esta especie; además, es el componente mayoritario en el extracto *SFE* de hojas y también se detectó en los tallos de *A. ringens*. En la **Tabla 11** se reporta la concentración de este compuesto en (mg/kg de flor seca) determinada por el método de estandarización interna.

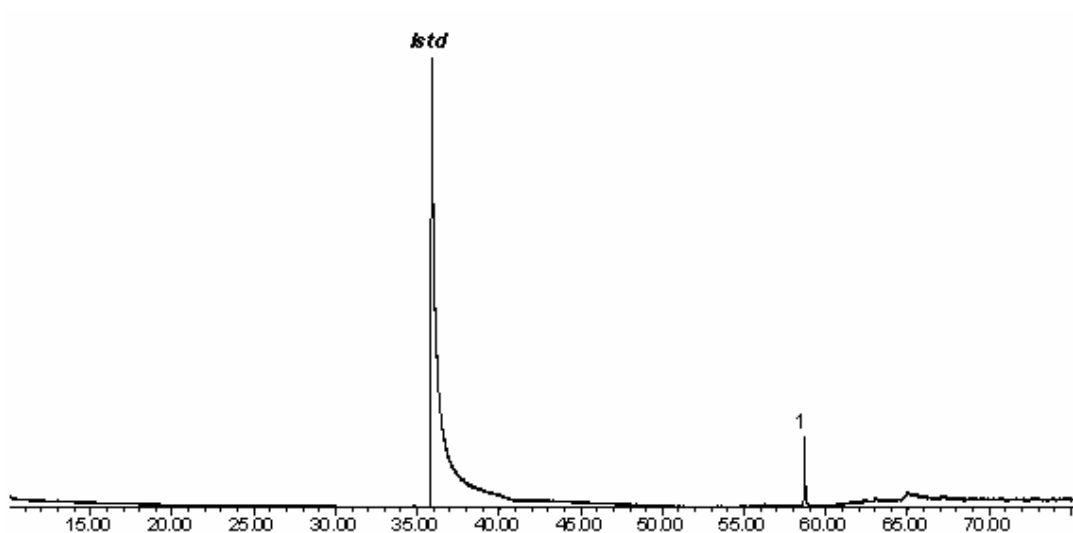


Figura 22. Perfil cromatográfico típico del extracto (*SFE*) de flores de *A. ringens*. Columna DB-5 (60 m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

Tabla 11. Concentración (mg/kg de flores secas) del único componente aislado por *SFE*, en las flores de *A. ringens*.

Pico No.	Compuesto	I_K^a		Concentración, [mg/kg] ^b
		DB-5	DB-WAX	
1	Éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico	2325	2142	9,1±0,66

^a Índices de Kovàts experimentales (Columna DB-5, 60m).

^b Promedio de dos extracciones, n=2.

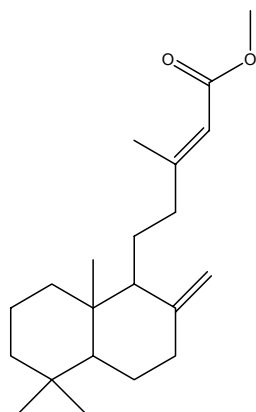


Figura 23. Estructura del éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico.

Las flores de *A. ringens* fueron sometidas a *MWHD*, pero no se obtuvo AE, debido a esto, no se reportan perfiles cromatográficos correspondientes al AE de flores.

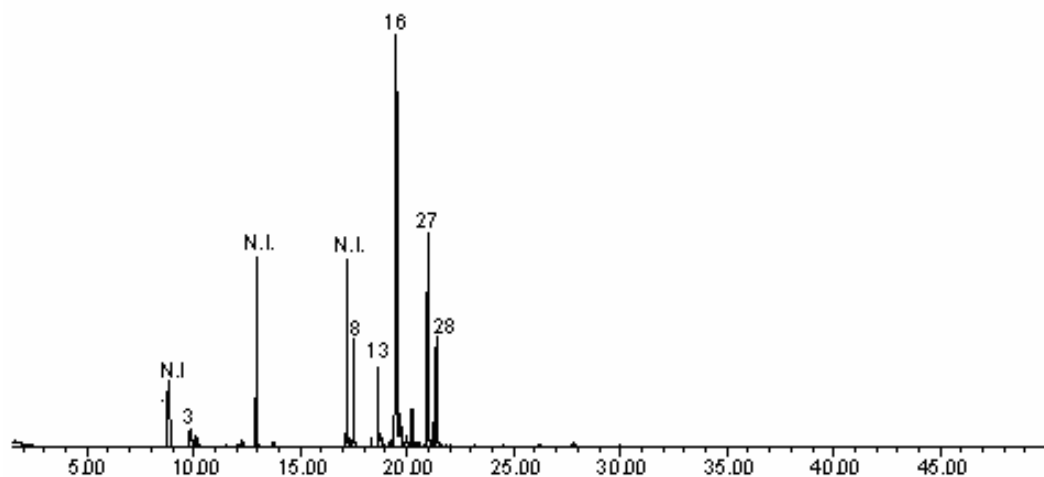
3.2 DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE FLORES DE *A. RINGENS* POR *HS-SPME*

Las flores de *A. ringens* presentan un olor fétido, muy desagradable al olfato humano, el cual les sirve para atraer insectos saprófagos como las moscas, los cuales facilitan el proceso reproductivo de la planta. Debido a esta característica, se implementó el análisis *HS-SPME* con el fin de identificar los componentes volátiles causantes del olor característico de las flores de esta especie. La determinación se llevó a cabo *in-vivo* e *in-vitro*, siguiendo las metodologías descritas en las Secciones 2.5.y 2.6.

3.2.1 Determinación *in-vitro* de los compuestos volátiles de flores de *A. ringens* por *HS-SPME*. En la determinación *in-vitro* de los componentes volátiles de las flores se usaron dos tipos de fibras para *SPME*, con diferentes recubrimientos poliméricos, a saber: poli(dimetilsiloxano) (*PDMS*, 100 μm) y poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (*PDMS/DVB*, 65 μm).

En la **Figura 24**, se presentan los perfiles cromatográficos de los componentes volátiles de flores de *A. ringens*, aislados por *HS-SPME*, empleando los dos tipos de fibras, y analizados por *GC-MS*, en la columna cromatográfica apolar HP-5MS, de 30 m de longitud.

A



B

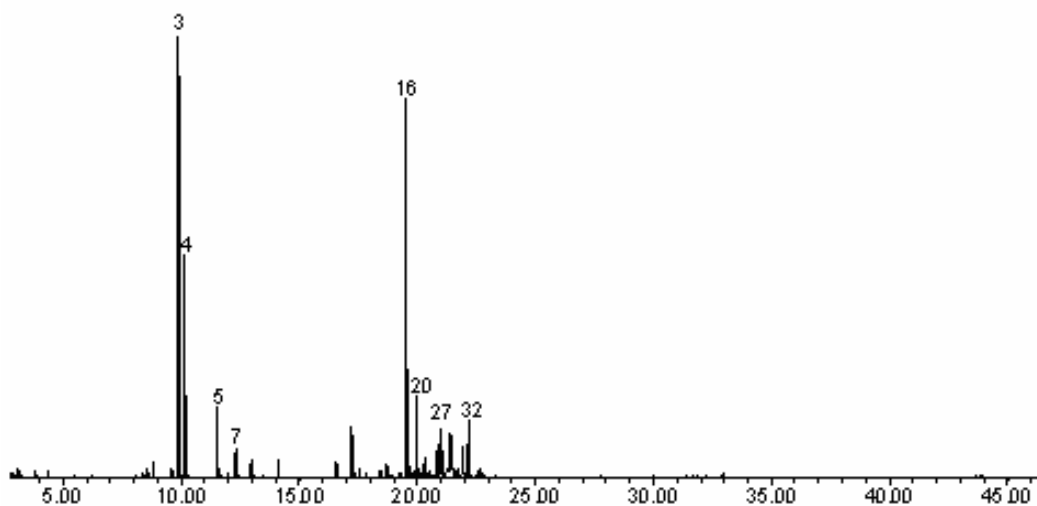


Figura 24. Perfiles cromatográficos típicos de los componentes volátiles aislados por *HS-SPME*, de flores de *A. ringens*: **A.** *PDMS*, 100 μm y **B.** *PDMS/DVB*, 65 μm . Columna HP-5MS (30 m), *split* 1:10, *MSD* (EI, 70 eV). En la **Tabla 12** se reporta la identificación de los componentes.

En la **Tabla 12** se reportan los componentes mayoritarios aislados e identificados, según su orden de elución en esta columna, con sus respectivos índices de retención y cantidades relativas. Como se puede observar, al usar el recubrimiento polimérico de *PDMS*, se pudieron identificar positivamente 17 componentes ($\geq 0.1\%$), los cuales representan el 82 % de la *TIC*. Los siguientes fueron los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, *Thshd*=17 y área de rechazo del pico en la base=0.1.

Tabla 12. Identificación de los componentes aislados por *HS-SPME* de flores de *A. ringens*.

No. Pico ^a	Compuesto	I _k ^b Cantidad relativa % ^c		
		DB-5	PDMS/DVB	PDMS
1	Mirceno	990	0,40±0,042	-
2	Limoneno	1040	0,3±0,25	-
3	<i>cis</i> -β-Ocimeno	1035	22±2,2	1,4±0,45
4	<i>trans</i> -β-Ocimeno	1046	11,22±0,039	0,8±0,24
5	Linalool	1096	3,1±0,46	<i>tr</i>
6	3-Metilbutanoato de 3-metil-3-Butenilo	1116	0,23±0,065	-
7	<i>allo</i> -Ocimeno	1125	1,7±0,24	0,4±0,12
8	Bicicloelemeno	1333	0,25±0,011	6,18±0,685
9	δ-Elemeno	1335	0,51±0,041	-
10	α-Cubeneno	1347	0,230±0,0014	-
11	α-Ylangeno	1368	0,57±0,093	0,43±0,022
12	α-Copaeno	1380	0,428±0,0035	-
13	β-Bourboneno	1383	1,2±0,77	4±1,3
14	β-Elemeno	1388	-	0,70±0,092
15	α-Gurjuneno	1406	0,40±0,035	0,32±0,010
16	<i>trans</i> -β-Cariofileno	1419	23±2,0	33,3±0,12
17	β-Copaeno	1425	1,0±0,16	1,81±0,049
18	γ-Elemeno	1427	0,36±0,056	1,9±0,21
19	α-Maaileno	1437	0,40±0,055	-
20	Aromadendreno	1441	5,5±0,26	-
21	α- <i>neo</i> -Cloveno	1443	-	0,38±0,040
22	α-Humuleno	1450	1,5±0,30	2,5±0,17
23	Dihidro aromadendreno + <i>cis</i> -1(6),4-cadinadieno + 9- <i>epi</i> -Cariofileno	1458	0,6±0,16	-
24	<i>allo</i> -Aromadendreno	1459	-	0,27±0,020
25	<i>trans</i> -1(6),4-Cadinadieno	1478	0,18±0,040	-
26	γ-Muuroleno	1479	2,3±0,14	-
27	Germacreno D	1481	3,2±0,27	18±2,5
28	Viridifloreno + Biciclogermacreno	1497	5,3±0,20	8,7±0,72
29	α-Muuroleno	1506	0,93±0,033	-

Tabla 12, continuación.

30	δ-Amorfenol	1512	0,67±0,069	-
31	γ-Cadineno	1524	2,4±0,24	-
32	δ-Cadineno	1525	4,4±0,37	-
33	<i>trans</i> -1(2),4-Cadinadieno	1533	0,24±0,079	-
34	α-Cadineno	1537	0,9±0,13	-
35	3,7(11)-dieno-Selina	1547	0,19±0,046	-

^a Número de pico en la **Figura 18**.

^b Índices de Kovàts experimentales (Columna DB-5, 60m).

^c Promedio de tres extracciones, n=3.

tr Trazas.

El recubrimiento polimérico de *PDMS/DVB*, presentó una mayor cantidad de compuestos retenidos, por lo cual, éste luego fue escogido para la determinación *in-vivo*. Con la fibra *PDMS/DVB* se hizo la identificación de 33 componentes ($\geq 0.1\%$), que correspondieron al 96 % de la *TIC*. Se usaron los siguientes parámetros de integración: umbral de integración, *Thshd*=17 y área de rechazo del pico en la base=0.1.

3.2.2 Determinación *in-vivo* de los compuestos volátiles de flores de *A. ringens* por *HS-SPME*. Para la determinación *in-vivo* de los componentes volátiles de las flores se escogió la fibra con recubrimiento polimérico de poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (*PDMS/DVB*, 65 μm), debido a que esta fibra fue más eficiente para extraer los volátiles *in-vitro*.

En la **Figura 25**, se presenta el perfil cromatográfico de los componentes volátiles de flores de *A. ringens*, aislados *in-vivo* por *HS-SPME*, con la fibra de *PDMS/DVB*, y analizados por *GC-MS*, usando una columna cromatográfica HP-5MS, de 30 m de longitud.

En la **Tabla 13** se reportan los componentes mayoritarios aislados e identificados, según su orden de elución en la columna apolar, con sus respectivos índices de retención y cantidades relativas. Con esta metodología, sólo se pudieron identificar 5 componentes ($\geq 0.5\%$), los cuales

representaron el 74 % de la *TIC*. Los siguientes fueron los parámetros de integración aplicados: umbral de integración, *Thshd*=13 y área de rechazo del pico en la base=0.1.

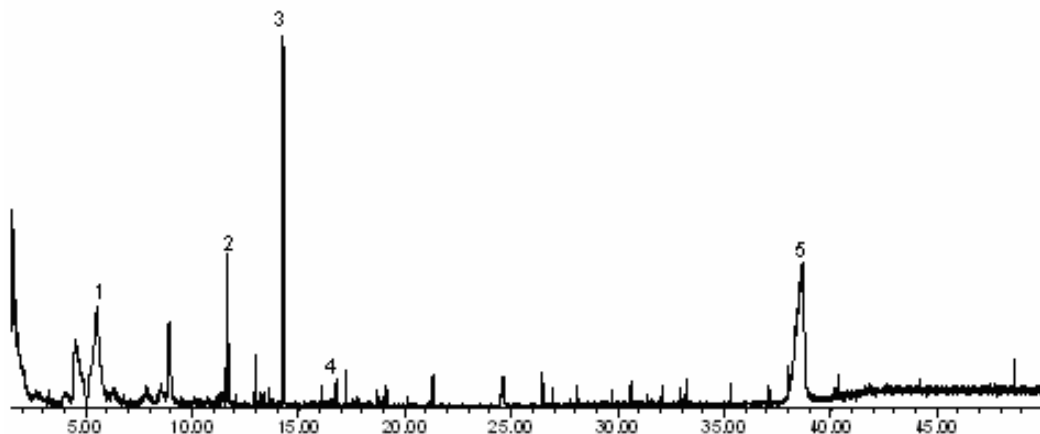


Figura 25. Perfil cromatográfico de los componentes volátiles aislados *in-vivo* por *HS-SPME*, de flores de *A. ringens*. Fibra *PDMS/DVB*, 65 μm . Columna *HP-5MS* (30 m), *split* 1:10, *MSD* (EI, 70 eV). En la **Tabla 13** se reporta la identificación de los picos cromatográficos.

Tabla 13. Cantidad relativa (%) e identificación de los componentes de flores de *A. ringens*, aislados *in-vivo* por *HS-SPME*, empleando una fibra con recubrimiento de *PDMS/DVB*, 65 μm .

No. Pico ^a	Compuesto	I_K^b DB-5	Cantidad Relativa %
1	Ácido 2-metilbutanoico		21,074
2	Nonanal	1105	6,217
3	Decanal	1207	9,489
4	Undecanal	1306	0,607
5	2,2'-bismetilen[6-(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol]	2417	36,240

^a Número de pico en la **Figura 19**.

^b Índices de Kovàts experimentales.

Es importante mencionar, que por *HS-SPME in-vivo*, se aislaron compuestos que han sido reportados como causantes de malos olores [Cervantes, 2006], entre ellos, figuran ácidos carboxílicos de cadena corta y aldehídos volátiles como el nonanal, decanal y undecanal. Usando el procedimiento *HS-SPME*

in-vitro se obtuvieron los perfiles cromatográficos similares a los de los AE y extractos (*SFE*) de hojas y tallos.

3.3 RUTAS DE FRAGMENTACIÓN DE ALGUNOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS

A continuación, se muestran las rutas de fragmentación de 3 compuestos mayoritarios en los AE y extractos de la planta *A ringens*. Los dos, *trans*- β -cariofileno y limoneno, son muy comunes para muchas plantas, y el otro, el éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico, es característico de *Aristolochias*.

3.3.1 Rutas de fragmentación del limoneno. El limoneno es un monoterpeno cíclico, que se encuentra como componente mayoritario en los AE de cítricos, y en muchos otros aceites de plantas aromáticas. Su espectro de masas aparece en la **Figura 26**. Las rutas de ionización disociativa se presentan en el **Esquema 1**, estas ya fueron reportada por múltiples tesis desarrolladas en CENIVAM [Celis, 2007; Gómez, 2007; Monsalve, 2007].

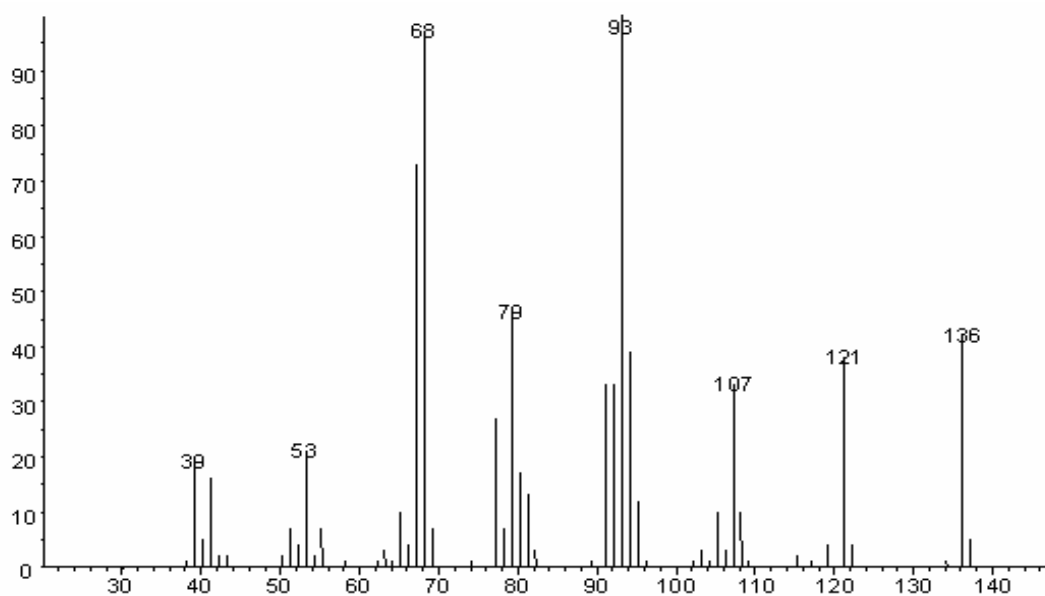
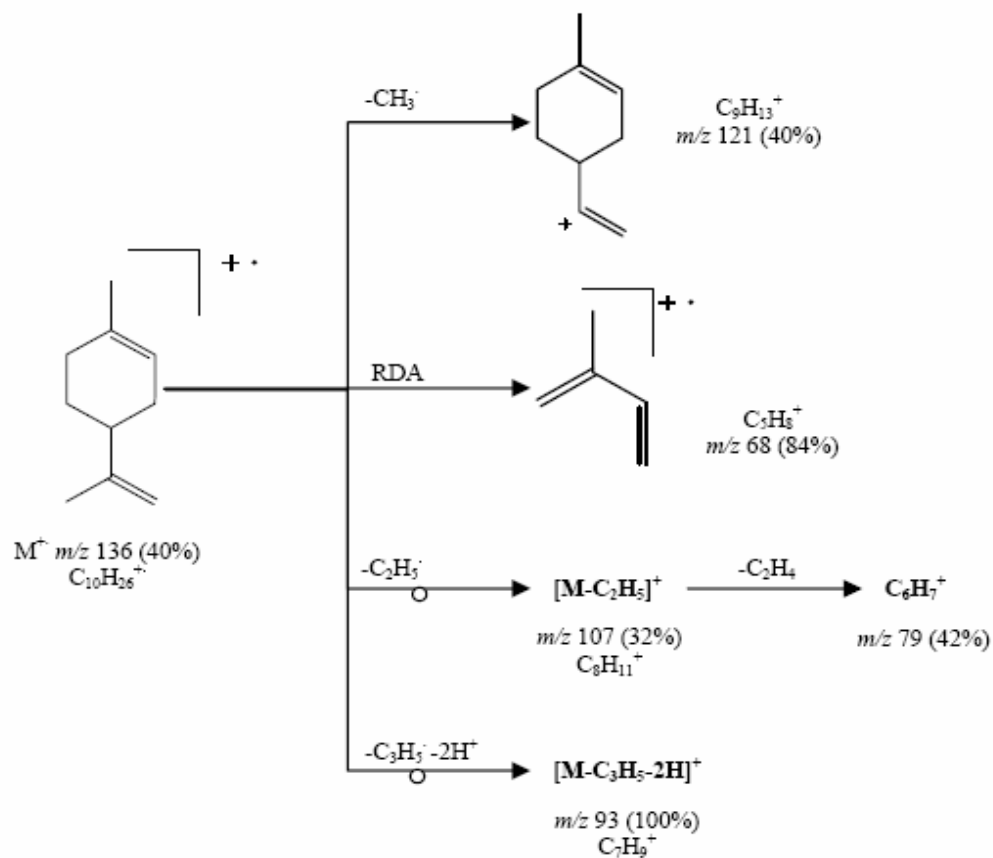


Figura 26. Espectro de masas del limoneno (EI, 70 eV).

Esquema 1. Rutas de fragmentación del limoneno.



Se observa el ion molecular M^+ (m/z 136) con una intensidad media (40%). Su fragmentación se caracteriza por una ruptura tipo retro-*Diels-Alder* (RDA), acompañada de la formación de un fragmento en m/z 68. Los iones $(M-CH_3)^+$ y $(M-C_3H_5-2H)^+$ en m/z 121 (40%) y m/z 93 (100%), respectivamente, se producen a partir del ion M^+ , por pérdida del radical CH_3 y del grupo isopropenílico, seguido de la eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los iones de intensidad media en m/z 107 y 79 provienen de la pérdida del radical C_2H_5 y de una molécula de etileno, respectivamente, a partir del ion molecular.

3.3.2 Posibles rutas de fragmentación del *trans*- β -cariofileno. El cariofileno es un sesquiterpeno, $C_{15}H_{24}$, que tiene olor a madera y es uno de los constituyentes mayoritarios en los AE y extractos de la planta *A. ringens*. Su espectro de masas aparece en la **Figura 27**. Las posibles rutas de ionización disociativa se presentan en el **Esquema 2**.

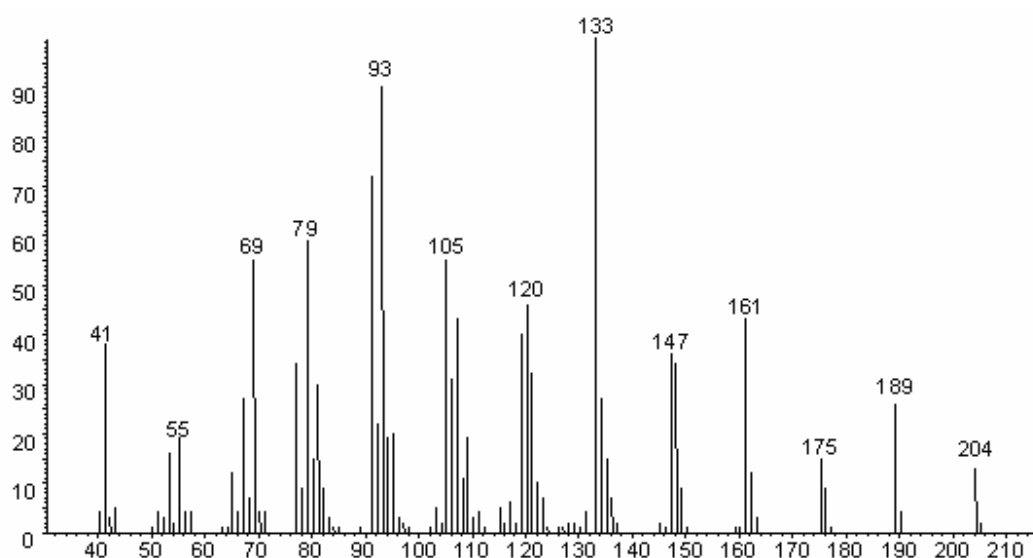
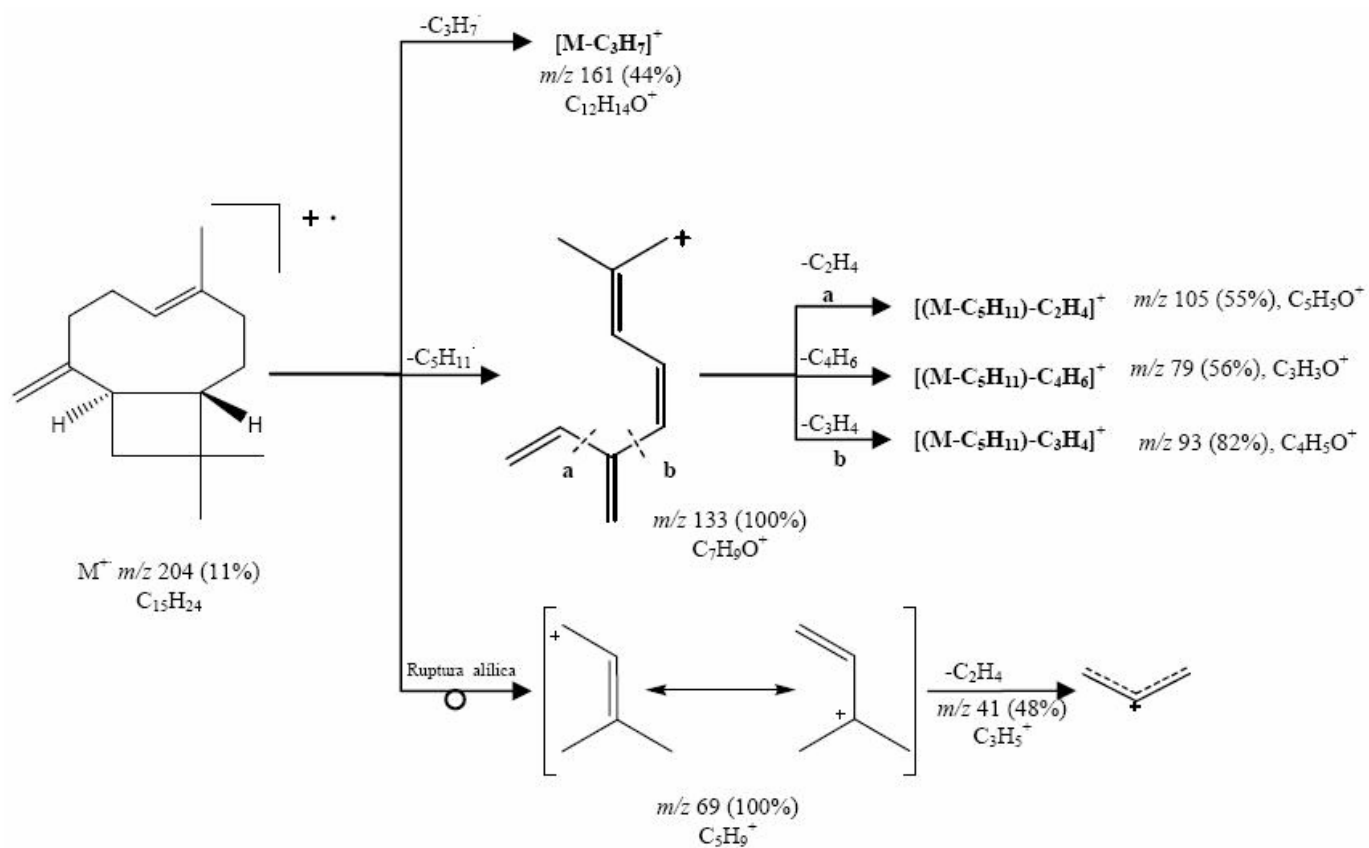


Figura 27. Espectro de masas del *trans*- β -cariofileno (EI, 70 eV).

El ion molecular del *trans*- β -cariofileno en m/z 204 presenta una intensidad media (11%), y se caracteriza por una abundante fragmentación. El ion M^{+} sufre reordenamientos del esqueleto y transposiciones del hidrógeno, que conducen a la formación del ion, pico de base, en m/z 133 (100%). La sucesiva eliminación de moléculas neutras a partir de este fragmento, produce los iones en m/z 79 (56%), 93 (82%) y 105 (55%). La ruptura alílica del ion molecular genera iones en m/z 69 (46%) y $C_3H_5^+$ en m/z 41 (38%).

Esquema 2. Posibles rutas de fragmentación del *trans*- β -cariofileno.



3.3.3 Posibles rutas de fragmentación del éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico.

El espectro de masas del éster, aparece en la **Figura 28**. Las rutas de ionización disociativa se presentan en el **Esquema 3**.

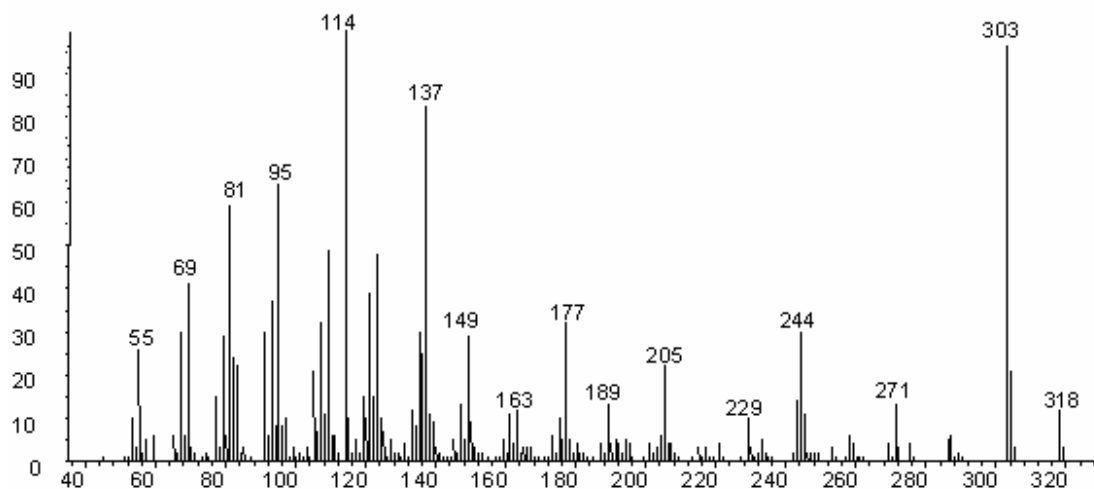
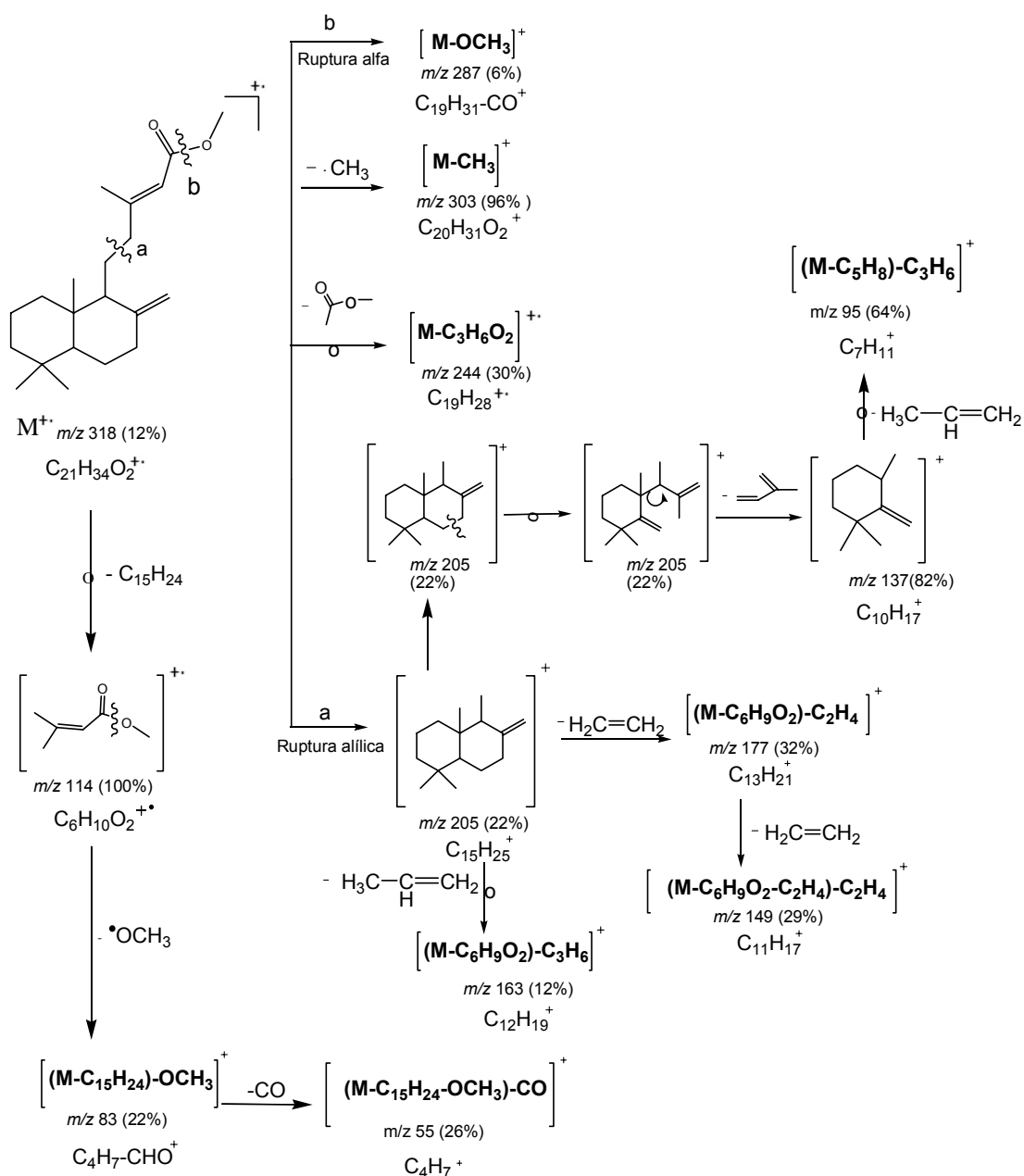


Figura 28. Espectro de masas del éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico (EI, 70 eV).

En el espectro de masas se observa el catión-radical $M^{+\bullet}$ en m/z 318 con una intensidad media de (12%). Producto de una ruptura alílica de $M^{+\bullet}$, se forma el fragmento en m/z 205 con una abundancia de 22%. Seguidamente, y a través de un reordenamiento de hidrógeno, se elimina una molécula de propeno, para generar el ion de m/z 163 con abundancia 12%. El ion en m/z 137 (82%), proveniente del fragmento en m/z 205, es resultado de la apertura del anillo (ruptura homolítica) acompañada del reordenamiento de hidrógeno y la eliminación de la molécula neutra (C_5H_7). Posteriormente, mediante otro reordenamiento, se desprende otra molécula de propeno, para dar origen al catión en m/z 95 con abundancia de 64%.

Por razón de la pérdida sucesiva de dos moléculas de eteno a partir del ion en m/z 205, se obtienen las señales en m/z 177 (32%) y m/z 149 (29%). La señal en m/z 163 (12%), surge de la pérdida de una molécula de propeno (por reordenamiento de hidrógenos) del ion m/z 205.

Esquema 3. Posibles rutas de fragmentación del éster metílico del ácido 5-(decahidro-5,5,8a-trimetil-2-metileno-1-naftalenil)-3-metil-2-pentenoico.



Otras fragmentaciones que sufre el M^{+} son: ruptura α , con pérdida de un radical metoxi dando origen al catión en m/z 287 (6%), pérdida de un radical metilo para formar el fragmento en m/z 303 (96%), y la eliminación de una molécula neutra ($C_3H_6O_2$) que genera el ion en m/z 244 (30%).

La transposición de un hidrógeno a un carbono metilénico en el M^{+} , origina la pérdida de una molécula neutra ($C_{15}H_{24}$), generando el ion pico de base en m/z 114 (100%). La ruptura α del ion pico de base genera el catión en m/z 83 (22%), el cual por eliminación de una molécula de CO, produce el fragmento en m/z 55 (26%).

3.4. DESARROLLO DEL MÉTODO PARA EL ANÁLISIS POR HPLC-UV/DAD DE LOS AAI Y AAI EN A. RINGENS.

3.4.1 Pruebas preliminares. Con base en la metodología propuesta por Hashimoto para la separación de los AA, se empleó una fase móvil metanol-agua, y la longitud de onda (λ) del detector de arreglo de diodos se fijó en 254 nm. La temperatura de la columna se mantuvo en 25°C. Una vez separados los AAI y AAI, se examinó su absorbancia en un rango de 200-500 nm.

A. Selección de la fase móvil, separación de los AA. En cromatografía líquida de fase reversa, las fases móviles muy polares, como el agua, logran mayor retención de los analitos con carácter hidrofóbico cuando se operan en modo isocrático. Por lo tanto, las pruebas preliminares iniciaron con un cierto porcentaje de metanol en el eluyente.

Los cromatogramas correspondientes a diferentes proporciones de agua-metanol, se muestran en el **Anexo 1**. Con la adición del ácido acético, como modificador orgánico, a la fase móvil, se logró una mayor selectividad y, por lo tanto, una mejor separación entre las señales de los AA. La adición del

ácido acético permite desplazar el equilibrio hacia la forma no disociada (más retenida) de los AA.

Finalmente, se eligió la fase móvil MeOH:H₂O:CH₃COOH en proporción 60:40:0.1 v/v/v, para el análisis de los AA.

B Selección de la longitud de onda. Los espectros de absorción de los AA, en una solución de AAII (120 ppm) y AA I (51 ppm) en el rango de 200-500 nm, se muestran en el **Anexo 2**. Para brindar mayor sensibilidad al análisis, se seleccionó la longitud de onda de máxima absorbancia en los dos espectros UV-VIS, según lo reportado en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Longitud de onda de máxima absorbancia de los AA.

Compuesto	λ de máxima absorbancia (nm)
AA II	252
AA I	225

C Selección de la temperatura. Los valores máximos de las viscosidades de las mezclas metanol-agua, se encontraron en el rango correspondiente a 50:50 y 60:40 entre componentes. Con el aumento en la temperatura de la columna hasta 30°C, y conservando los parámetros de separación de los AA descritos en la **Sección 3.4.1**, Parte A, se logró disminuir la viscosidad de la fase móvil metanol-agua empleada en la separación de los AA [Thompson, 2006], factor importante en la preservación del equipo cromatográfico.

La resolución, R_s , de los AA y la eficiencia cromatográfica, representada por el número de platos teóricos (N), no tuvieron cambios significativos con el cambio de temperatura del horno, como lo muestra la **Tabla 15**.

Tabla 15. Resolución y eficiencia cromatográfica para separar los AA, a diferentes temperaturas.

Ácido aristolóquico	<i>N</i>		<i>Rs</i>	
	25°C	30°C	25°C	30°C
AAlI	15798	16739	11	10
AAI	17488	16505		

N: Eficiencia cromatográfica, representada por el número de platos teóricos, donde W_b es el ancho de pico y t_R , el tiempo de retención.

$$N = 16 \left[\frac{t_R}{W_b} \right]^2$$

Rs: Resolución, calculada como:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{1/2(W_{b2} - W_{b1})}$$

3.4.2 Condiciones cromatográficas para el análisis de los AA presentes en *A. ringens*. Con base en los resultados de las pruebas preliminares, las condiciones del método cromatográfico se fijaron así:

Longitud de onda : 225nm y 252 nm.

Fase móvil : MeOH:H₂O:CH₃COOH 60:40:0.1 v/v/v.

Flujo de la fase móvil: 1 mL min⁻¹.

Temperatura de la columna: 30°C.

El cromatograma de patrones certificados de los AA, obtenido bajo estas condiciones se muestra en la **Figura 29**.

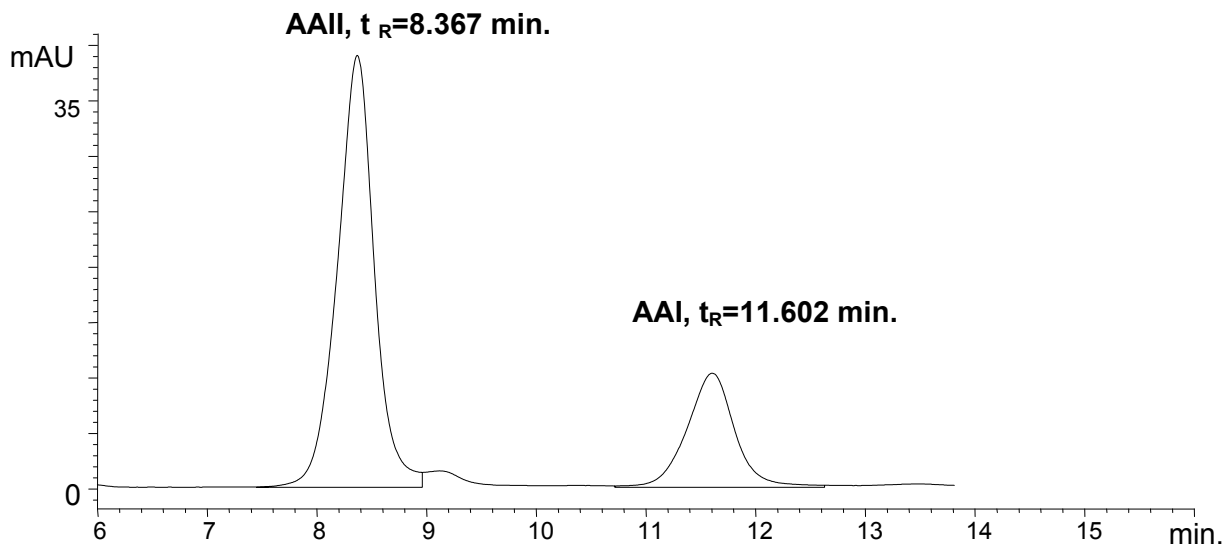


Figura 29. Perfil cromatográfico de los patrones certificados de los AA.

3.4.3. Determinación por HPLC-UV/DAD de los AA I y II en la especie *A. ringens*. Para determinar los AA en *A. ringens*, se analizaron los extractos metanólicos de hojas, tallos y flores de la planta, preparados según la metodología descrita en la **Sección 2.8.1**. La identificación de los AA en los extractos, se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención y espectros UV, bajo las condiciones cromatográficas ya establecidas (**Sección 3.4.2**). Las **Figuras 30-32** muestran los perfiles cromatográficos de los extractos de flores, hojas y tallos de *A. ringens*, así como los espectros UV-Visible obtenidos en la señales de interés.

De acuerdo con los criterios de identificación, el análisis cualitativo demostró solo el contenido del AAII en el extracto de flores. Los resultados obtenidos permiten señalar que no se detectaron los AAI y AAII en los extractos de hojas y tallos. Por lo tanto, el presente estudio se orientó a cuantificar, empleando el método de estandarización externa, el AAII en las flores de *Aristolochia ringens*.

Figura 30. Perfiles cromatográficos obtenidos por *HPLC-DAD* del extracto de flores de *A. ringens*: **A.** $\lambda=252$ nm y **B.** $\lambda=225$ nm. Columna cromatográfica apolar *Zorbax Eclipse XDB-C18 analytical* (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m).

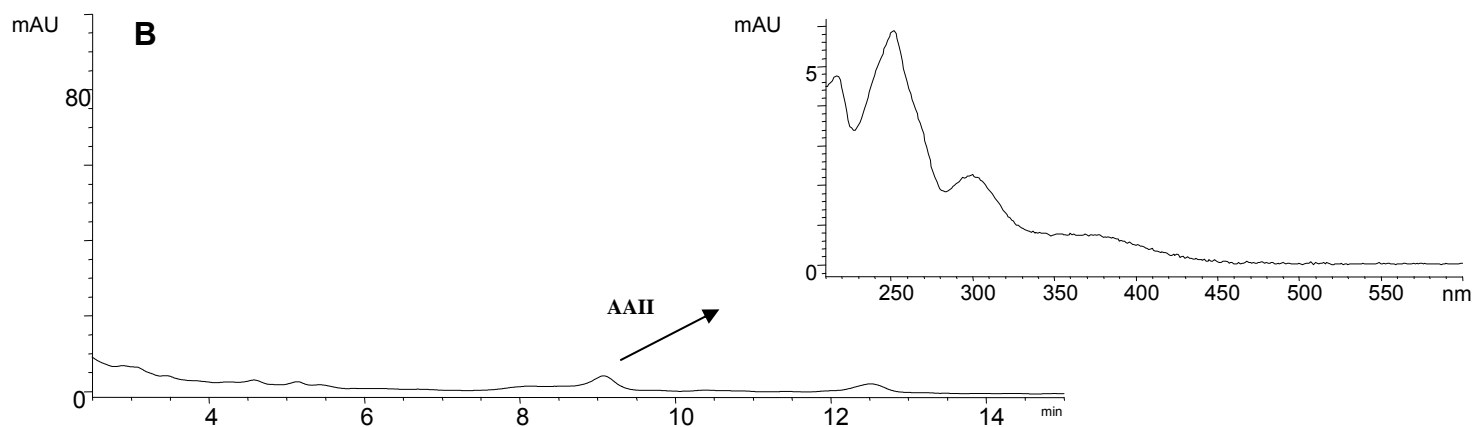
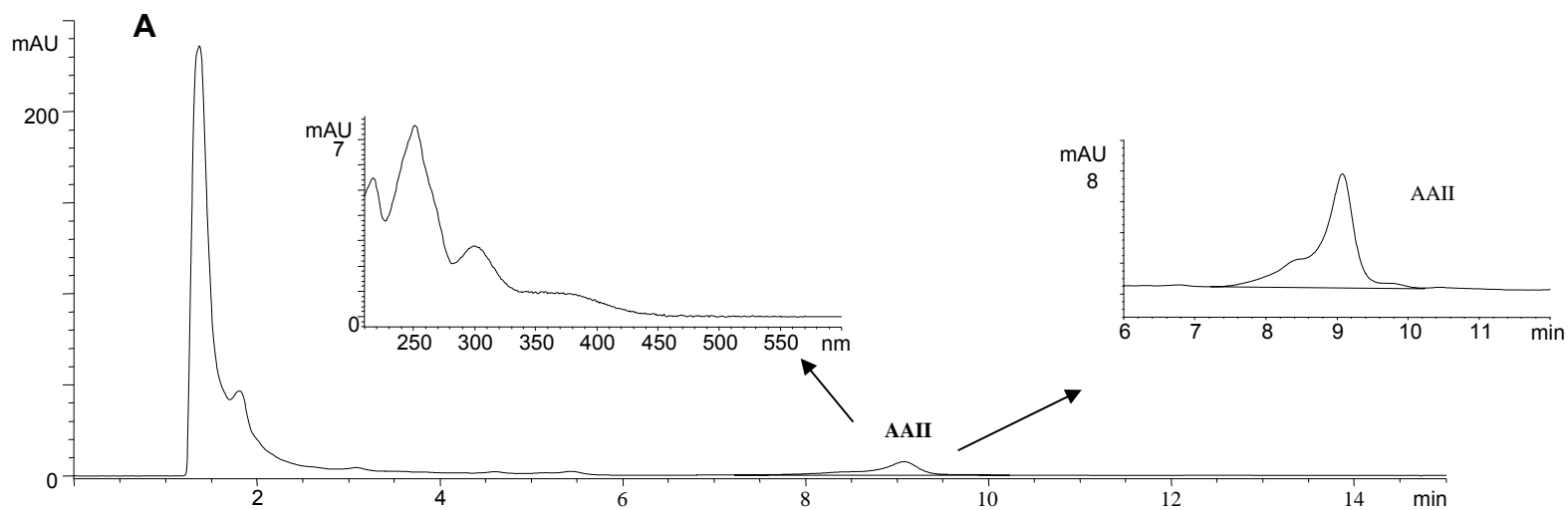


Figura 31. Perfiles cromatográficos obtenidos por *HPLC-DAD* de los extractos de hojas de *A. ringens*: **A.** $\lambda=252$ nm y **B.** $\lambda=225$ nm. Columna cromatográfica apolar *Zorbax Eclipse XDB-C18 analytical* (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m).

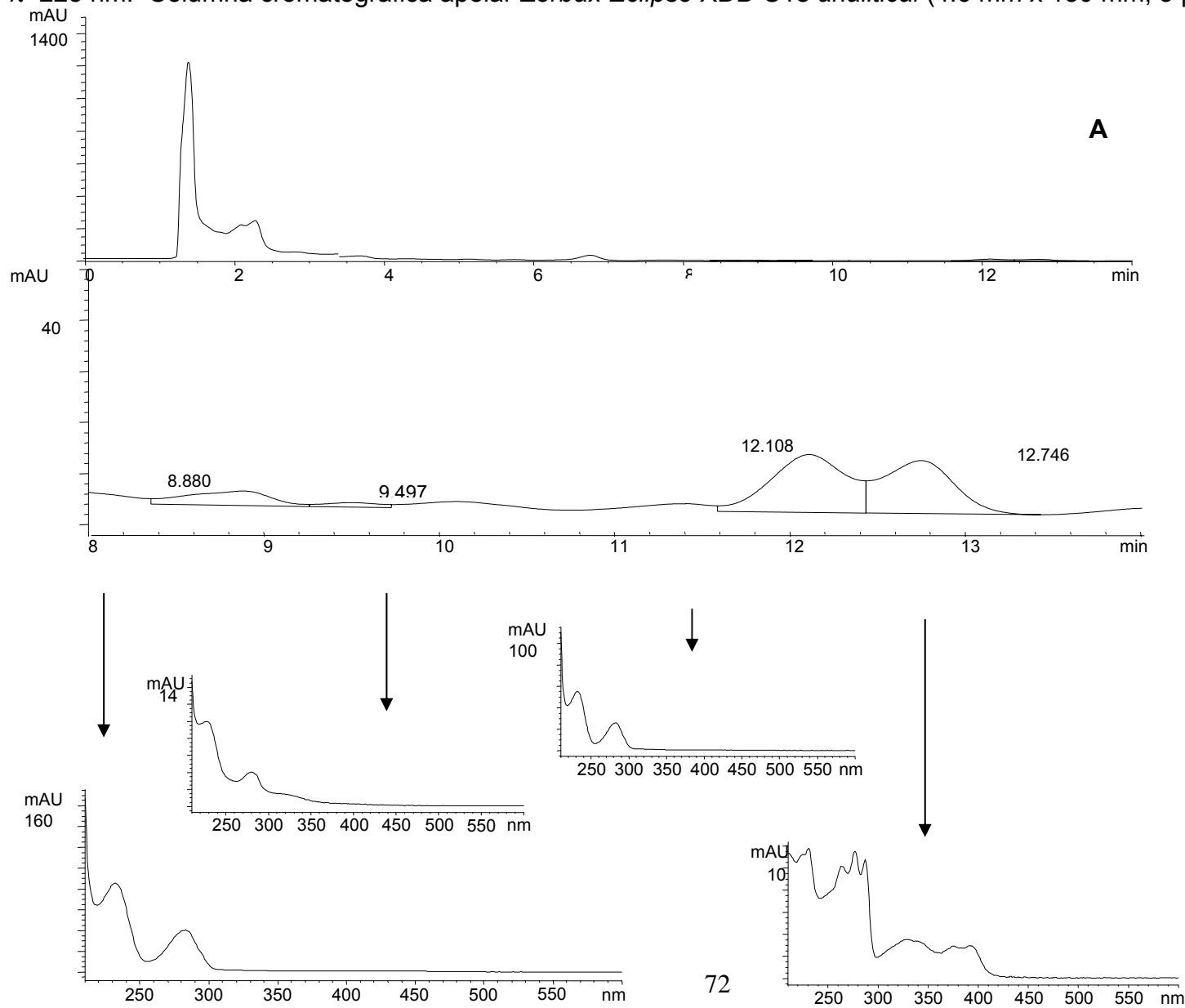
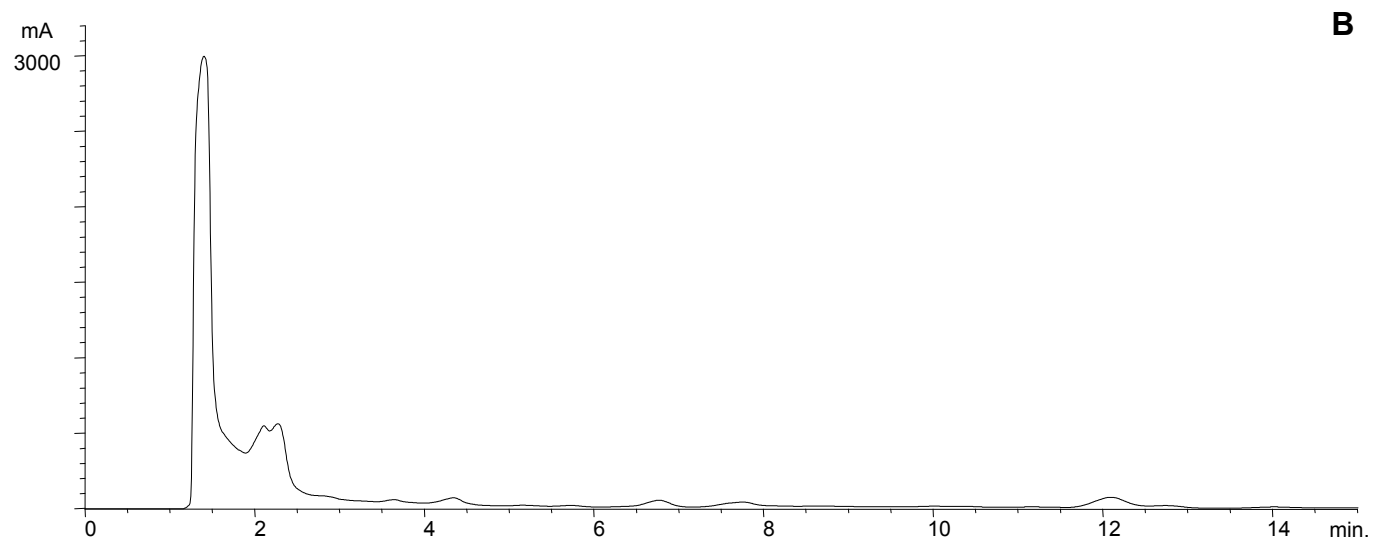
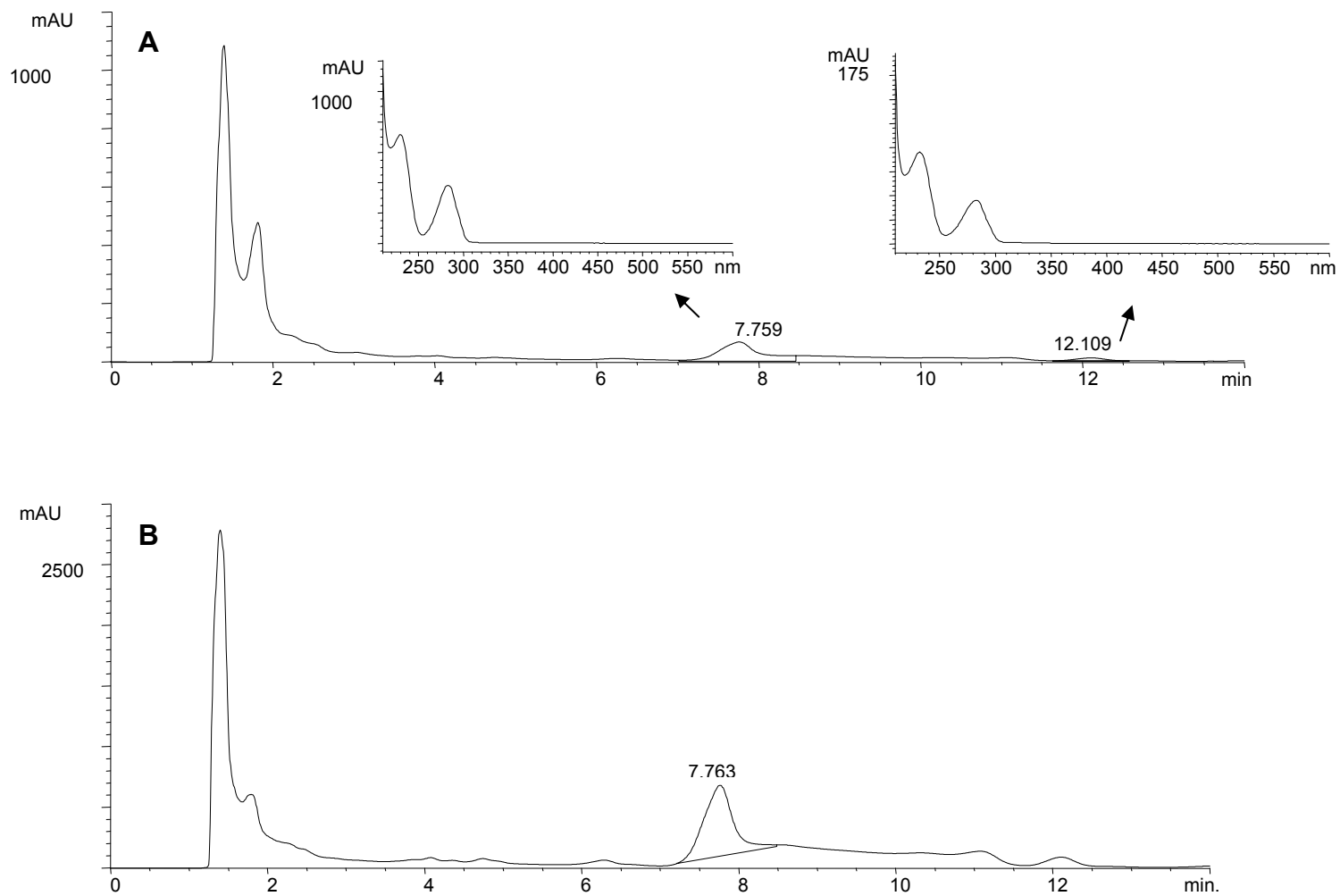


Figura 31, Continuación.



B

Figura 32. Perfiles cromatográficos obtenidos por *HPLC-DAD* de los extractos de tallos de *A. ringens*: **A.** $\lambda=252$ nm y **B.** $\lambda=225$ nm. Columna cromatográfica apolar *Zorbax Eclipse XDB-C18 analytical* (4.6 mm x 150 mm, 5 μ m).



3.4.4 Determinación de las figuras analíticas de mérito.

- **Repetibilidad (R) del método para tiempos de retención y áreas, de los ácidos AAI y AII.** Los valores correspondientes a los tiempos de retención (t_R) y áreas de los ácidos AAI y AII, con su respectiva desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV) en los niveles bajo, medio, y alto de concentraciones de los AA, en la curva de calibración, se muestran en las **Tablas 16-19.**

Tabla 16. Evaluación de la repetibilidad en los tiempos de retención del ácido AII.

Concentración, ppm	Tiempos de retención, min				S	CV, %
	t_{R1}	t_{R2}	t_{R3}	\bar{X}		
1,13	8,925	8,92	8,908	8,918	0,0087	0,098
9,03	8,905	8,91	8,905	8,907	0,0029	0,032
75,24	8,875	8,878	8,883	8,879	0,0040	0,046

Tabla 17. Evaluación de la repetibilidad en los tiempos de retención del ácido AAI.

Concentración, ppm	Tiempos de retención, min				S	CV, %
	t_{R1}	t_{R2}	t_{R3}	\bar{X}		
0,479	12,418	12,429	12,410	12,419	0,0095	0,077
3,831	12,40	12,42	12,41	12,41	0,0085	0,069
31,92	12,38	12,39	12,40	12,39	0,011	0,089

Tabla 18. Evaluación de la repetibilidad en las áreas de picos cromatográficos del ácido AAlI.

Concentración, ppm	Áreas, mAU*s				S	CV, %
	A1	A2	A3	\bar{X}		
1,13	56	58	56	57	1,4	2,4
9,03	480	483	477	480	2,9	0,61
75,24	3446	3455	3533	3478	48	1,4

Tabla 19. Evaluación de la repetibilidad en las áreas de picos cromatográficos del ácido AAl.

Concentración, ppm	Áreas, mAU*s				S	CV, %
	A1	A2	A3	\bar{X}		
0,479	18,6	19,3	18,8	18,9	0,36	1,9
3,831	159	165	157	160	4,0	2,5
31,92	1160	1160	1190	1170	20	1,7

Los CV (%) menores del 1% y del 10%, para los tiempos de retención y áreas de picos de los AA, respectivamente, muestran, que la precisión del método, según las Buenas Prácticas del Laboratorio (GLP), para las condiciones cromatográficas establecidas, fue alta.

3.4.5 Evaluación de la linealidad y la sensibilidad del método. Los resultados obtenidos a partir de la curva de calibración de los AA, se muestran en la **Tabla 20**.

Tabla 20. Estimación de la linealidad y la sensibilidad del método.

Ácido aristolóquico	Ecuación	Rango lineal, ppm	r	Pendiente b	Sb	$b \pm t \cdot Sb$
AAII	$y=50.6 \cdot X$	0,28-376,2	0,9997	50,57	0,44	$50,6 \pm 0,99$
AAI	$y=40 \cdot A$	0,48-159,6	0,9997	40,3	0,44	$40 \pm 1,0$

La desviación estándar de la pendiente (Sb) se calculó de acuerdo con la **Ecuación 3** de la Sección 2.8.2. La t de *Student* es la correspondiente para un nivel de confianza del 95% y n=2 grados de libertad.

Los coeficientes de correlación de las curvas de calibración para los AA fueron superiores a 0.999, y los coeficientes de variación de los factores de respuesta menores que el máximo permisible, *i.e.* 10% (**Tablas 21 y 22**), lo que indica que los datos fueron linealmente relacionados en el rango de concentraciones bajo estudio. Así mismo, las desviaciones de las pendientes en las curvas de calibración permiten apreciar una buena sensibilidad. Las curvas de calibración se muestran en el **Anexo 3**.

Tabla 21. Linealidad del método evaluada en función de los CV % de los factores de respuesta, en la curva de calibración del ácido AAII.

Concentración (C, ppm)	Área del pico (A)	R_f
0,28	14	50
0,56	27	48
1,13	57	50
2,26	119	53
4,51	234	52
9,03	480	53
18,1	968	54
37,62	1633	43
75,24	3478	46
150,48	7454	50
376,2	19177	51

Tabla 21, continuación.		
	Media	50
	S	3,1
	CV,%	6,3

Tabla 22. Linealidad del método evaluada en función de los CV % de los factores de respuesta, en la curva de calibración del ácido AAI.

Concentración, (C, ppm)	Área del pico (A)	R_f
0,48	18,9	40
0,96	42	44
1,91	77	41
3,83	160	42
7,68	326	43
15,96	553	35
31,92	1170	37
63,84	2513	39
159,60	6494	41
	Media	41
	S	2,8
	CV,%	7,0

3.4.6 Determinación de los límites de detección y de cuantificación de los AA. Los *LOD* y *LOQ* se calcularon utilizando la calibración para cada AA en la zona cercana al origen (**Anexo 4**). Los valores para los *LOD* y *LOQ*, se presentan en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Límites de detección y cuantificación de los AA.

Ácido aristolóquico	Rango lineal, ppm	<i>r</i>	<i>LOD</i>, ppm	<i>LOQ</i>, ppm
AAlI	0,14-9,02	0,9999	0,16	0,33
AAI	0,24-7,68	0,9999	0,18	0,36

La concentración de los ácidos AA correspondiente al límite de detección, indica la alta sensibilidad del detector *UV/DAD* empleado, considerando que

en estudios realizados sobre plantas del género *Aristolochia*, los LOD que se obtenían, no bajaban de 1 ppm de ácidos AA.

3.4.7 Cuantificación y determinación de la reproducibilidad del método según los tiempos de retención y las áreas de los picos cromatográficos. La reproducibilidad del método se evaluó en función de los CV % de tiempos de retención y áreas de picos del ácido AAll, en 3 muestras de extractos de flores, preparadas de acuerdo con lo descrito en la **Sección 2.8.1**. Los resultados se muestran en las **Tablas 24 y 25**.

Tabla 24. Reproducibilidad en los tiempos de retención del AAll en extractos de flores.

Flores de <i>A. ringens</i>	t_R , min			t_R promedio	\bar{X}	S	CV,%
	t_{R1}	t_{R2}	t_{R3}				
Muestra 1	9,075	9,054	9,054	9,061			
Muestra 2	9,044	9,048	9,055	9,049	9,054	0,0061	0,068
Muestra 3	9,053	9,055	9,050	9,053			

Tabla 25. Reproducibilidad en las áreas de picos del AAll en extractos de flores.

Flores de <i>A. ringens</i>	Área, mAU*s			Área promedio	\bar{X}	S	CV,%
	A1	A2	A3				
Muestra 1	270	270	307	280			
Muestra 2	300	290	298	300	310	31	10
Muestra 3	310	360	364	340			

Los CV no superaron el 10%, lo que revalida la alta reproducibilidad del método, que es idóneo para el análisis del AAll en extractos de flores. La

cantidad del AAll (ppm) en el extracto de flores de *A. ringens*, así como su contenido en el material vegetal, se muestran en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Concentración del AAll y su contenido en las flores de *A. ringens*.

Flores de <i>A. ringens</i>	Extracto Met-OH, ppm	Concentración, (mg de AAll/kg)^a
AAll	6,1±0,50	610±47

^a mg de AAll por kg de flores secas.

Con base en la concentración estimada del AAll en las flores de *A. ringens*, es importante señalar, que esta parte de la planta tiene una toxicidad alta, si se considera que las dosis orales de 25 mg/kg de AAll en ratas producen lesiones necróticas [Chen, 2006]. El contenido del AAll determinado es alto con respecto a otras especies del mismo género, tales como, *A debilis* y *A fangchi* [Hashimoto, 1999], luego, hay que tener precauciones para no incorporar las flores de *A. ringens* en preparados fitomedicinales.

4. CONCLUSIONES

1. El rendimiento del AE obtenido, de diferentes partes de la planta *A. ringens*, varía significativamente: en hojas fue de 0.008%, en tallos alcanzó 0.047%. Estos rendimientos son muy bajos comparados con los reportados para la mayoría de las plantas aromáticas comerciales. Las flores de *A. ringens* no contienen AE en cantidades extraíbles por métodos convencionales.
2. Las composiciones químicas de los AE obtenidos de hojas y tallos de *A. ringens* difieren notablemente. El AE de hojas está compuesto principalmente por hidrocarburos sesquiterpénicos (66%); mientras que en el AE de tallos se destacan hidrocarburos monoterpénicos (73%), lo que se refleja en los rendimientos de los AE, puesto que la fracción monoterpénica se obtiene más eficientemente, por *MWHD*, que la sesquiterpénica.
3. Los compuestos volátiles de flores de *A. ringens* se aislaron por *HS-SPME*, tanto *in-vivo*, como *in-vitro*. El análisis *in-vivo*, descubrió la presencia de compuestos con notas odoríficas desagradables, debido a la presencia de aldehídos volátiles y ácidos grasos de cadena corta. Los compuestos aislados por *HS-SPME in-vitro*, presentaron un perfil similar al obtenido por *MWHD*.
4. La metodología analítica desarrollada en el presente estudio, para la detección y cuantificación de los ácidos aristolóquicos AA I y AII, es idónea, lo que confirman las figuras analíticas de mérito encontradas.
5. Los análisis cualitativo y cuantitativo de los ácidos AA en diferentes partes de la planta *A. ringens*, realizados con la metodología analítica

desarrollada, permitieron detectar sólo la presencia del ácido AAll, exclusivamente, en las flores (610 ± 47 mg de AAll/kg de flores secas). Es importante señalar, que las flores son tóxicas, y no pueden formar parte de los preparados fitomedicinales.

5. RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer un estudio de cadaverina y putrescina en las flores de *A. ringens*, usando *HPLC* como técnica analítica, con el fin de poder determinar si son éstos dos compuestos que atraen insectos saprófagos a la planta, tal como se observó para muchas otras especies.
- Se recomienda evaluar la actividad antioxidante de los AE de hojas y tallos de *A. ringens*, así como otro tipo de actividades biológicas tales como antibacteriana, antiespasmódica, antiviral, antimicótica, entre otras, que permitan ampliar el perfil de actividad biológica de los AE estudiados en CENIVAM.
- Por su contenido del ácido AAll, debe evitarse la manipulación de las flores de la planta *A. ringens*. Además, se recomienda abstenerse de consumir productos que formulen el uso de esta especie, ya que no se descarta la presencia en ella de otros ácidos AA.
- Se recomienda ampliar la investigación fitoquímica de especies de este género que estén presentes en Colombia, en la búsqueda de otros compuestos que tengan afinidad estructural con los ácidos aristolóquicos.

BIBLIOGRAFÍA

Balbachas, A.; Rodriguez, R., Las plantas que curan, Reformation Herald Publishing Association, 6ª Edición, *New Jersey*, pp. 184-187.

Bandoni, A., Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores, Red de Editoriales Universitarias, (2000), La Plata, pp. 156-158, 162-166, 168-172.

Carr, A.; Cassidy, C.; Cohen, E.; Decenzo, A.; Hunt, M.; Hurley, I.; Hylton, W.; Kowalchik, C.; Milius, S.; Wilson, K., Rodalés, *Illustrated encyclopedia of herbs*, Rodale Press, (1987), 1a Edición, *Pennsylvania*, pp. 500-501.

Carreras, M., Bases cuaternarias y nitrofenantrenos en *Aristolochia baetica*, *Anal. Inst. Bot., Canavilles*, (1973), 30, pp. 253-265.

Celis, C., Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides* y *Phyla (Lippia) dulcis*, especies de la familia *Verbenaceae*. Bucaramanga: Tesis de Pregrado en Química, Universidad Industrial de Santander, (2007), pp. 80-81.

Cervantes, M., Determinación por HS-SPME/GC-ECD, de los componentes carbonílicos y carboxílicos volátiles presentes en el sudor humano. Bucaramanga: Tesis de Maestría en Química, Universidad Industrial de Santander, (2006), pp. 1-30.

Chan, Y-Y.; Leu, Y-L.; Wu, T-S., Three sesquiterpenes from the roots and stems of *Aristolochia heterophylla Hemsl* with novel skeletons, *Tetrahedron Lett*, (1998), 39, pp. 8145-8148.

Chen, L.; Mei, N.; Yao, L.; Chen, T., Mutations induced by carcinogenic doses of aristolochic acid in kidney of Big Blue transgenic rats, *Toxicol. Lett*, (2006), 165, pp. 250–256.

Denny, E.F.K., Hidrodestillation of oils from aromatic herbs, *Perfumer & Flavorist*, (1989), 14, p. 57.

De Oliveira, C.; Silva, M.; Kato, L.; Da Silva, C.; Ferreira, H.; Souza, L., Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia Benth.* (Lamiaceae), *J. Braz. Chem. So.*, (2004), 15, (5), pp. 756-759.

Dean, R, J; Extraction Methods for Enviromental Analysis. John Wiley & Sons Ltd., *London*, (1998), p 301.

De Pascual, J.; Urones, J.; Fernandez, A., Monoterpene derivates from the essential oil of *Aristolochia longa*, *Phytochemistry*, (1983), 22, (12), pp. 2153-2154.

Feldmeyer, N.; Schmeiser, H.; Muehlbauer, K-R.; Belharazem, D.; Knyazev. Y.; Nedelko, T.; Hollstein, M., Further studies with a cell immortalization assay to investigate the mutation signature of aristolochic acid in human *p53* sequences, *Mutation Research*, (2006), 608, pp. 163–168.

García, B., Flora medicinal de Colombia, Tomo I, Tercer Mundo Editores, Bogotá, (1992), 2ª Edición, pp. 280-284.

Gómez, G., Análisis de la composición química y de la actividad biológica de los aceites esenciales de dos quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., en función de las condiciones de extracción y secado de la planta.

Bucaramanga: Tesis de Pregrado en Química, Universidad Industrial de Santander, (2007), pp. 135-136.

González, F., Hacia una filogenia de *Aristolochia* y sus congéneres neotropicales, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, *Caldasia*, (1997), 19 (1-2), pp. 115-130.

Güenther, E., The essential oils Vol I-IV, Ed. Van Nostrand, (1955), *New York*, 427 p.

Hashimoto, K; Higuchi, M; Makino, B; Sakakibara I; Kubo, M; Komatsu, Y; Maruno, M; Okada, M. Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, container in some medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, (1999), 64, pp. 185-189.

Hill, A.F., Botánica económica, plantas útiles y productos vegetales, Ed. Omega, Barcelona, (1965), pp. 461-475.

INVIMA, Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos. Alerta sobre el uso de productos herbales que contengan derivados de las especies *Aristolochia*, www.invima.gov.co. Consulta: Noviembre 30 de 2007.

loset, J.R.; Raelison, G.; Hostettmann, K., Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens, *Food Chem. Toxicol*, (2003), 41, pp. 29–36.

Jinbin, Y.; Lihua, N.; Deyu, Z.; Xubiao, L.; Fei, T.; Li, D.; Qian, L.; Manli, G.; Shouzhuo, Y., Simultaneous determination of nine aristolochic acid analogues in medicinal plants and preparations by high-performance liquid chromatography, *Talanta*, (2007), 73, (4), pp. 644-650.

Jennings, W.; Rapp, A., Sample preparation for gas chromatographic analysis, Ed. Huethig Verlag, (1983), Heidelberg, p. 103.

Jou, J-H; Chen, S; Wu, T-S. Facile reversed-phase *HPLC* resolution and quantitative determination of aristolochic acid and aristolactam analogues in traditional chinese medicine, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* (2003), 26, (18), pp. 3057-3068.

Jong, T-T; Lee, M-R; Hsiao, S-S; Hsai, J-L; Wu, T-S; Chiang, S-T; Caid, S-Q. Analysis of aristolochic acid in nine sources of xinxin, a traditional chinese medicine by liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization / tandem mass espectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal*, (2003), 33, pp.831-837.

Júnior, S.; Conserva, L.; Corre[^]a, M.; Guilhon, G., Constituents of *Artistolochia* species (*Aristolochiaceae*), *Biochem. Syst. Ecol*, (2002), 30, pp. 701–703.

Kingston, H.; Jassie, L., Introduction to microwave sample preparation, theory and practice. *Washington: ACS*, (1988), pp. 7-31.

Koh, H.; Wang, H.; Zhou, S.; Chan, E.; Woo, S., Detection of aristolochic acid I, tetrandrine and fangchinoline in medicinal plants by high performance liquid chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal*, (2006), 40, pp. 653–661.

Kumar, V.; Poonam; Prasad, A.; Parmar, S., Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities, *Nat. Prod. Rep*, (2003), 20, (6), pp. 565-583.

Larrahondo, J. E.; Acevedo, C., *An. Asoc. Quim. Argent.*, (1990), 78, p. 355.
Citado por: Wu, 2004.

Linares, E. Aproximación al conocimiento de los bejucos de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, *Caldasia*, (2000), 23, pp.169-179.

Lopes, L; Bolzani V; Trevisan L. Clerodane diterpenes from *Aristolochia* species. *Phytochemistry*, (1987), 26, (10), pp 2781-2784.

Lopes, L; Humpfer E. 8-Benzylberbine and *N*-oxide alkaloid from *Aristolochia gigantea*. *Phytochemistry*, (1997), 45, (2), pp 431-435.

Lopes, L; Nascimento I. Diterpene esters of aristolochic acid from *Aristolochia pubescens*. *Phytochemistry*, (2003), 63, pp 953-957.

Mathews, K., Christopher; Holde, K. Bioquímica. Addison Wesley, Madrid, (2000), pp. 524-526.

McNair, H.; Miller, J., Basic Gas Chromatography, *A Wiley Interscience Publication, New York*, (1998), p. 4.

Mester, Zoltan; Sturgeon, Ralph; Pawliszyn, Janusz. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochim. Acta, Part B* 56 (2001), 56, pp.233-260.

Miller, J,C; Miller, J,N. Estadística para química analítica. 2 edición. Delaware, Addison-Wesley Iberoamericana, (1993), pp.96-107.

Mitra, Somenath. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. VOLUME 162. John Wiley, (2003), *New Jersey*, pp. 113-114, 201-203.

Monsalve, L., Comparación de la composición química de los aceites esenciales de las plantas de *Lippia alba* (Mill) N.E Brown, provenientes de diferentes regiones de Colombia. Bucaramanga: Tesis de Pregrado en Química, Universidad Industrial de Santander, (2007), pp. 113-114.

Muñoz, F., Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado, Ed. Mundi Prensa, (1987), Madrid, pp. 8-31.

Muñoz, O., Química de la flora Chilena, Universidad de Chile, (1992), 1^a edición, Santiago de Chile, pp 141-150.

Musteata, Marcel, F; Pawliszyn. *In vivo* sampling with solid phase microextraction. *J. Biochem. Biophys. Methods.* (2007), 70, pp. 181–193.

Musteata, Marcel, F; Pawliszyn. Janusz; Bioanalytical applications of solid phase microextraction. *Trends Anal. Chem*, (2007), 26, (1), pp. 36-45.

Nan M.; Volker, M.; David, H.; Robert, H; Tao, C., DNA adduct formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver, *Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, (2006) 602, (1-2), pp. 83-91.

Nortier, J.; Vanherweghem, J., Renal interstitial fibrosis and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*), *Toxicology*, (2002), 181-182, pp. 577- 580.

Otero, R.; Núñez, V.; Barona, J.; Fonnegra, R.; Jiménez, S.; Osorio, R.; Saldarriaga, M.; Díaz, A., Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia. Part III: Neutralization of the haemorrhagic effect of *Bothrops atrox* venom, *J. Ethnopharmacol*, (2000), 73, pp. 233-241.

Paré, J.; Sigamin, M.; Lapointe, J., *US Patent*. 5.002.784, (1991).

Paré, J., *European Patent Application* 0485668A1, (1992).

Pio, F.Q., *Plantas Medicinales, el Discóridos renovado*, Editorial Labor, (1983), 8ª Edición, Barcelona, pp. 193-197.

Priestap H.; Baren, C.; Lira, P.; Coussio, J.; Bandoni, A., Volatile constituents of *Aristolochia argentina*, *Phytochemistry*, (2003), 63, pp. 221–225.

Roa, S.; Roa, E.; Araya, O., Gen supresor de tumores p53 en neoplasias digestivas, *Rev. Méd. Chile*, Nov. (2000), 128, (11), pp. 1269-1278.

Rubinson, K.; Rubinson, J., *Análisis instrumental*, Prentice Hall, (2000), Madrid, pp. 636, 704-705.

Sánchez-Lamar; Ángel, Utilización de la línea celular *CHO* en los ensayos de genotoxicidad, *Rev. Cubana Invest Bioméd*, (1999), 18, (1), pp. 19-21.

Sánchez-Lamar; Ángel; Manuel, F., Genotoxicidad de *Phyllanthus orbicularis* evaluada mediante el ensayo de micro-núcleos en células de ovario de hámster Chino, *Rev Cubana Invest Bioméd*, (1999), 18, (1), pp. 22-23.

Sandra, P.; Bichhi C.; Capillary gas chromatographic in essential oil analysis, Ed. Huethig Verlag, (1987), *Heidelberg*, pp. 20-23.

Schreier, P., Chromatographic studies of biogenesis of plant volatiles, Ed. Hüthig-Verlag, (1984), *Heidelberg*, pp. 35,171.

Setkova, Lucie; Risticovic, Sanja; Pawliszyn, Janusz. Rapid headspace solid-phase microextraction–gas chromatographic–time-of-flight mass

spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction I. Method development and optimization, *J. Chromatogr. A*, (2007), 1147, pp. 213–223.

Snyder, L.; Kirkland, J.; Glajch, J., Practical HPLC Method Development, Ed. Wiley, New York, (1997), p. 3.

Stashenko, E.E.; Cervantes, M.; Cobariza, M.Y.; Fuentes, H.; Martínez, J.R., HRGC/FID and HRGC/MSD analysis of the secondary metabolites obtained by different extraction methods from *Lepechinia scheideana*, and in vitro evaluation of its antioxidant activity, *J. High. Resolut. Chromatogr*, (1999), 22, pp. 343-349.

Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martínez, J. R., Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in-vitro* antioxidant activity, *J. Chromatogr. A*, (2004), 1025, pp. 93-103.

Stashenko, E.E.; Blanco, C.; Cobariza, M.Y.; and Martínez, J.R., Comparative study of Colombian citrus oil by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr*, (1995), 697, pp. 501-513.

Stashenko, E.; Quiroz, N.; Martinez, J.R., HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD Study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extractions techniques, *J. High. Resolut. Chromatogr*, (1996), 19, pp. 353-358.

Stiborova, M.; Sopko, B.; Hodek, P.; Frei, E.; Schmeiserb, H.; Hudeček, J., The binding of aristolochic acid I to the active site of human cytochromes

P450 1A1 and 1A2 explains their potential to reductively activate this human carcinogen, *Cancer Lett*, (2005), 229, pp. 193–204.

Thompson, J; Kaiser, T; Jorgenson, J. Viscosity measurements of methano-water and acetonitrile-water mixtures at ppressure up to 3500 bar using a novel capillary time-of-flight viscometer. *J. Chromatogr. A*, (2006), 1134, pp. 201-209.

Uribe-Uribe, L., Aristoloquiáceas nuevas de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, *Caldasia*, (1955), VII, (31), pp. 33-37.

Vanherweghem, J.L., Nephropathy and herbal medicine, *Am. J. Kidney Dis.*, (2000), 35, pp. 330-332.

Vila, R.; Mundina, M.; Muschietti, L.; Priestap, H.; Bandoni, A.; Adzet, T.; Canigueral, S., Volatile constituents of leaves, roots and stems from *Aristolochia elegans*, *Phytochemistry*, (1997), 46, (6), pp. 1127 -1129.

Wu, T-S.; Chan, Y-Y.; Leu, Y-L., Constituents of the roots and stems of *Aristolochia mollissima*, *J. Nat. Prod.*, (2001), 64, pp. 71-74.

Wu, T.; Damu, A.; Su, C.; Kuo, P., Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities, *Nat. Prod. Rep, Review* , (2004), 21, pp. 594-624.

Yu, J.; Liao, Z.; Cai, X.; Lei, J.; Zou, G., Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*, *Environ. Toxicol. Pharmacol*, (2007), 23, (2), pp. 162-167.

Zhang, H.; Cifone, M.; Murli, H.; Erexson, G.; Mecchi, M.; Lawlor, T., Application of simplified *in vitro* screening tests to detect genotoxicity of aristolochic acid, *Food Chem. Toxicol.*, (**2004**), 42, pp. 2021–2028.

Zhang, Z.; Yang, M.; Pawliszyn, J., Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation, *Anal. Chem.*, (**1994**), 66 (17), pp. 844A-854A.

ANEXO 1.

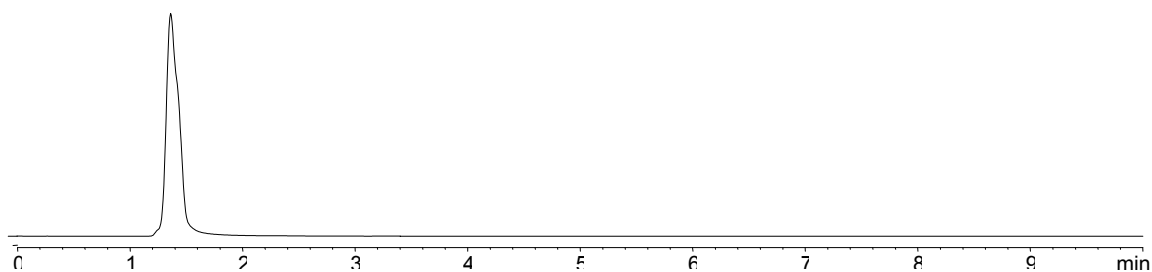
Cromatogramas obtenidos en las pruebas preliminares para seleccionar la fase móvil. Modo isocrático, $\lambda=254$ nm.

Figura 1. Cromatogramas obtenidos en las pruebas preliminares para seleccionar la fase móvil. Modo isocrático, $\lambda=254$ nm.

Fase móvil: Metanol-Agua, 80:20 v/v

Temperatura de la columna: 25°C.

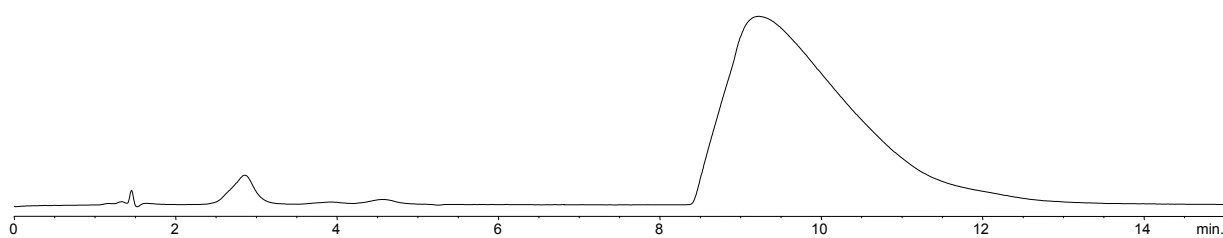
Flujo de la fase móvil: 1mL/min.



Fase móvil: Metanol-Agua, 40:60 v/v

Temperatura de la columna: 25°C

Flujo de la fase móvil: 1mL/min.

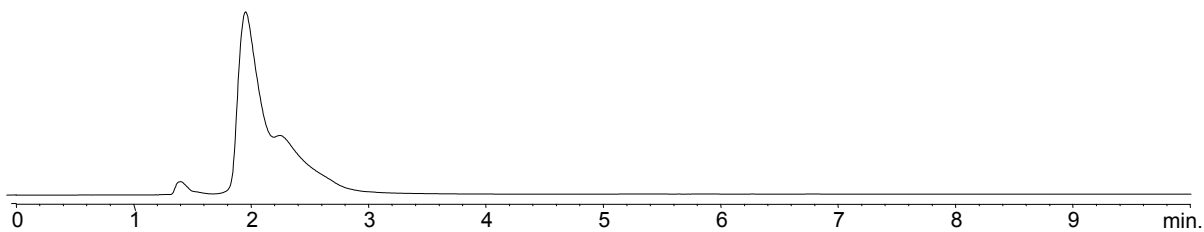


Fase móvil: Metanol-Agua, 60:40 v/v

Temperatura de la columna: 25°C

Flujo de la fase móvil: 1mL/min

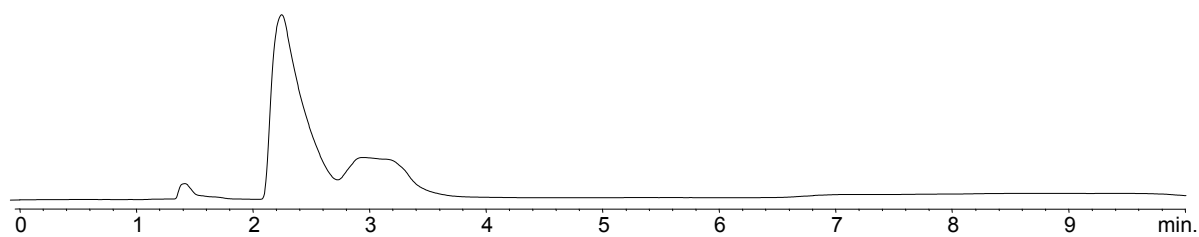
Figura 1, continuación.



Fase móvil: Metanol-Agua, 55:45 v/v

Temperatura de la columna: 25°C

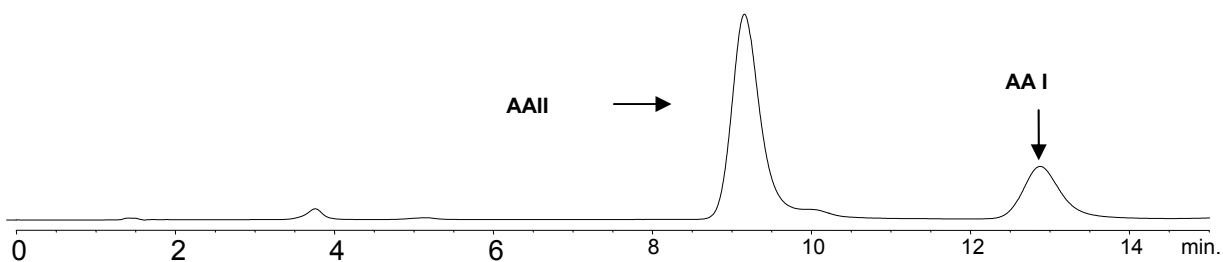
Flujo de la fase móvil: 1mL/min



Fase móvil: Metanol-Agua (0.1% Ácido acético): 60:40:0.1 v/v/v

Temperatura de la columna: 25°C

Flujo de la fase móvil: 1mL/min

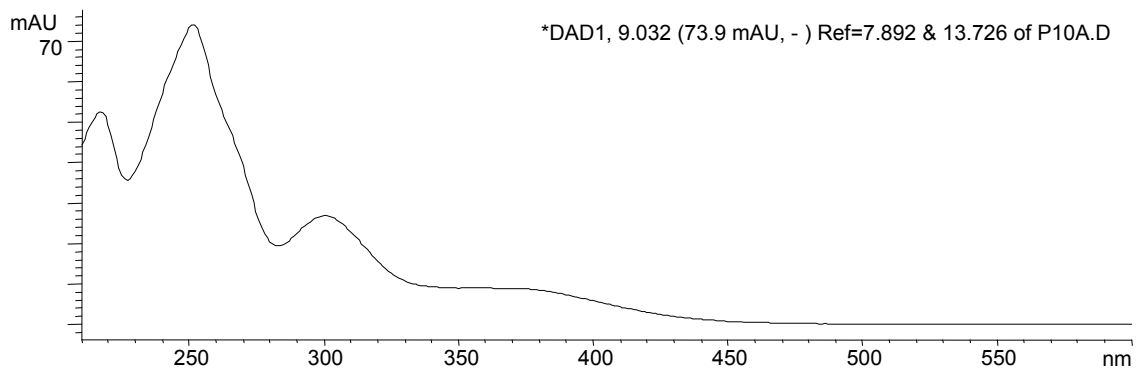


ANEXO 2.

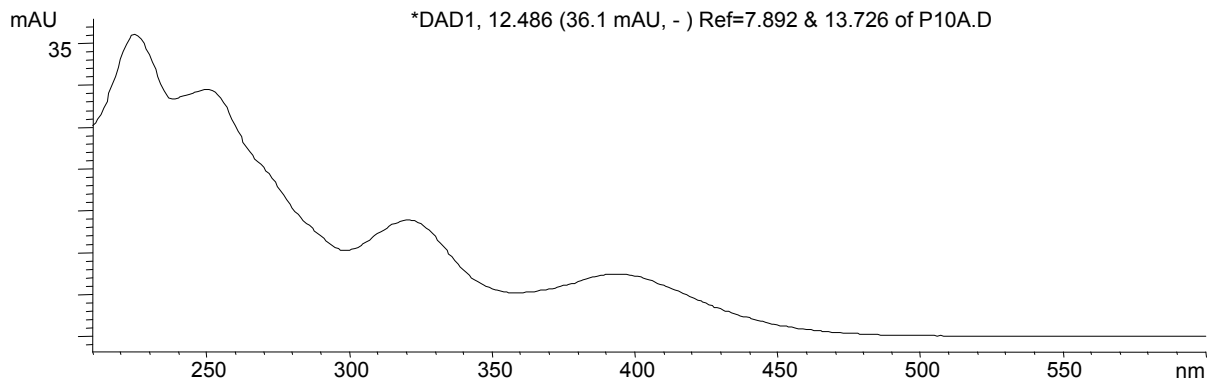
**Espectros UV-Vis de los ácidos AA, obtenidos empleando *DAD*.
Selección de la longitud de onda de máxima absorbancia de los AA.**

Figura 2. Espectros UV-VIS de los AA, obtenidos empleando DAD. Selección de la longitud de onda con máximos de absorbancia de los AA.

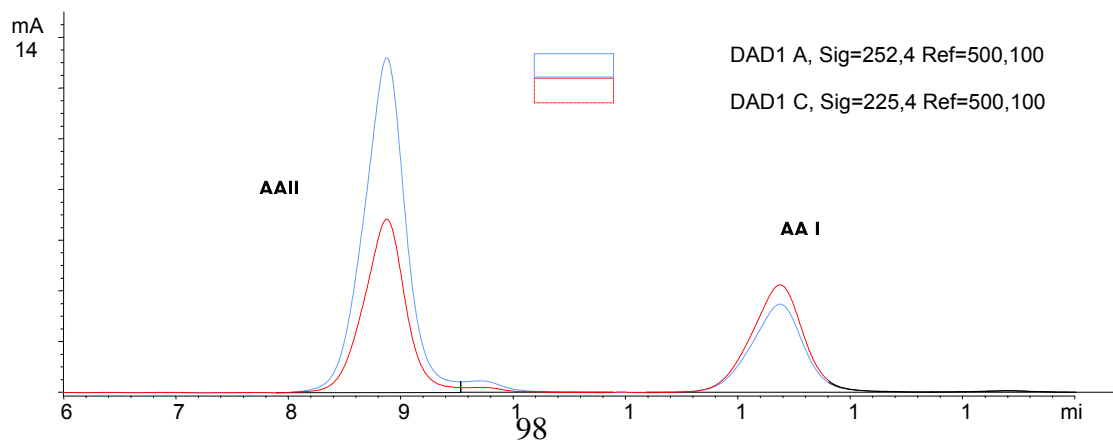
Ácido aristolóquico II



Ácido aristolóquico I



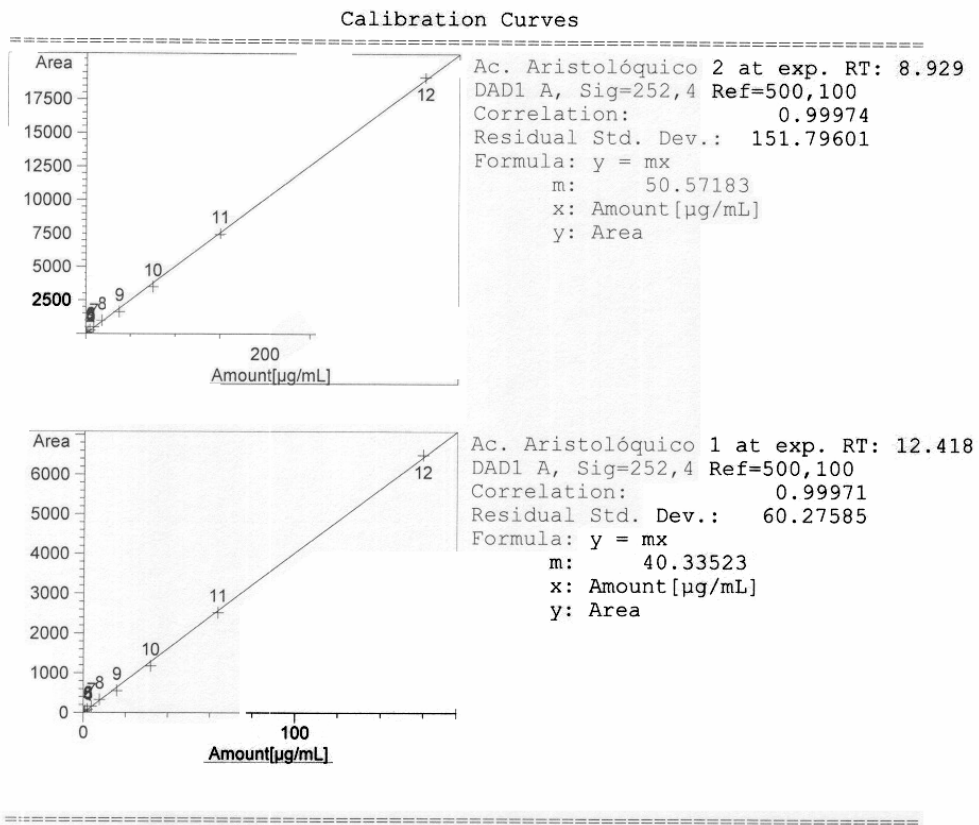
Comparación de los perfiles cromatográficos de los AA a dos longitudes de onda.



ANEXO 3.

Curvas de calibración de los AA, en altas concentraciones.

Figura 3. Curvas de calibración de los AA, en altas concentraciones.



ANEXO 4.

Curvas de calibración de los AA, en la zona cercana al origen.

Figura 4. Curvas de calibración de los AA, en bajas concentraciones.

