



## TÍTULO DE PATENTE NO. 304074

**Titular(es):** INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.; COMISION NACIONAL FORESTAL

**Domicilio:** Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4a Sección, 78126, San Luis Potosí, San Luis Potosí, MÉXICO

**Denominación:** PREPARACION DE PSITTACANTHUS CALYCVLATUS CON PROPIEDADES ANTIHIPERTENSIVAS, METODOS PARA SU PRODUCCION Y USO DE LA MISMA.

**Clasificación:** Int.Cl.8: A61K36/00

**Inventor(es):** MAYTÉ GUADALUPE CERVANTES BADILLO; LUIS ANTONIO SALAZAR OLIVO; JUAN ROBERTO VALLE AGUILERA

<b>Número:</b> MX/a/2010/004628	<b>Fecha de presentación:</b> 27 de abril de 2010	<b>Hora:</b> 15:19
<b>País:</b> M	<b>PRIORIDAD</b>	<b>Número:</b>
<b>Vigencia:</b> Veinte años	<b>Fecha:</b>	
<b>Fecha de Vencimiento:</b> 27 de abril de 2030		

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

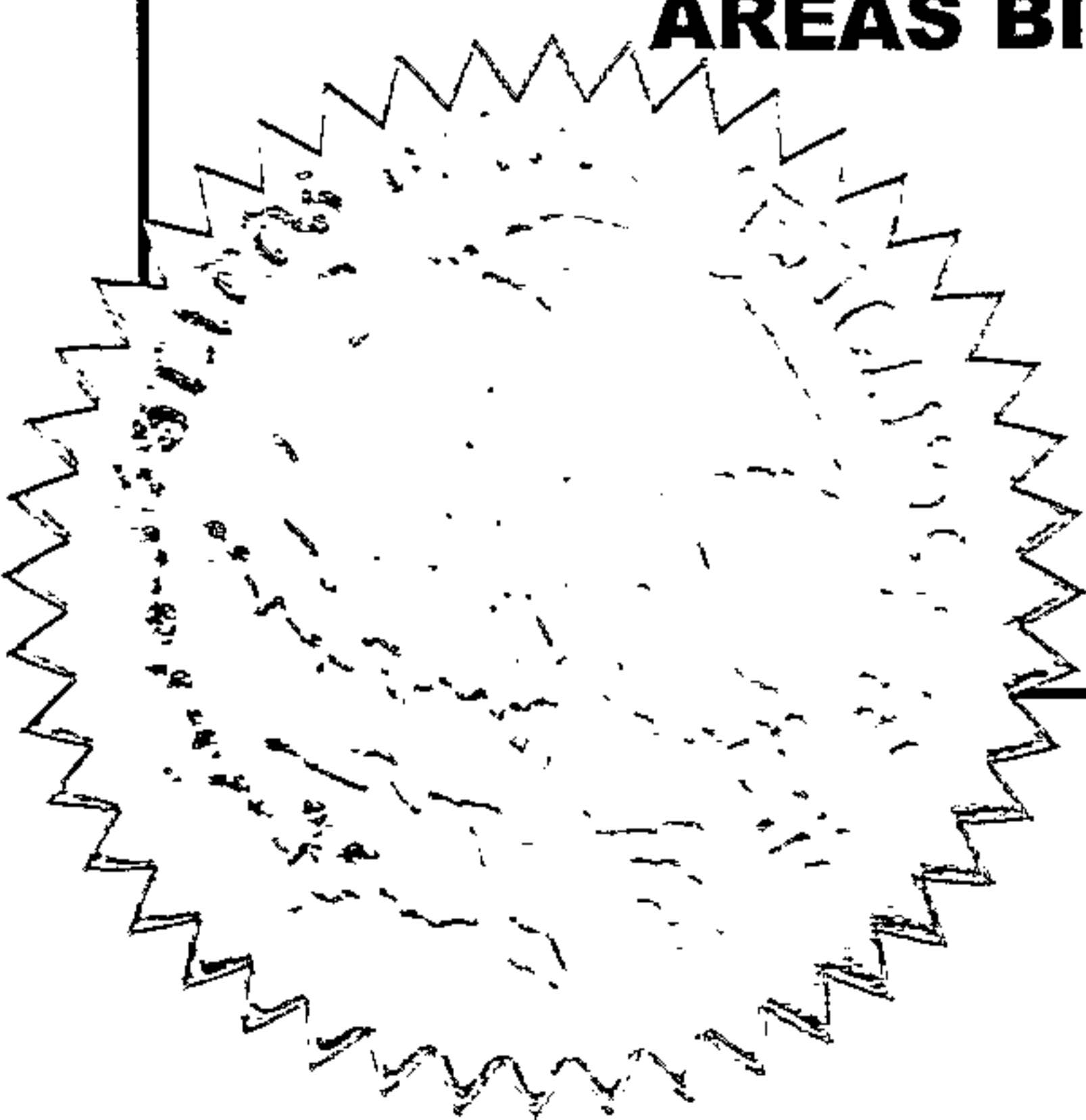
De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005 y 25/01/2006); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso ii) 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), sub inciso ii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 30 de agosto de 2012

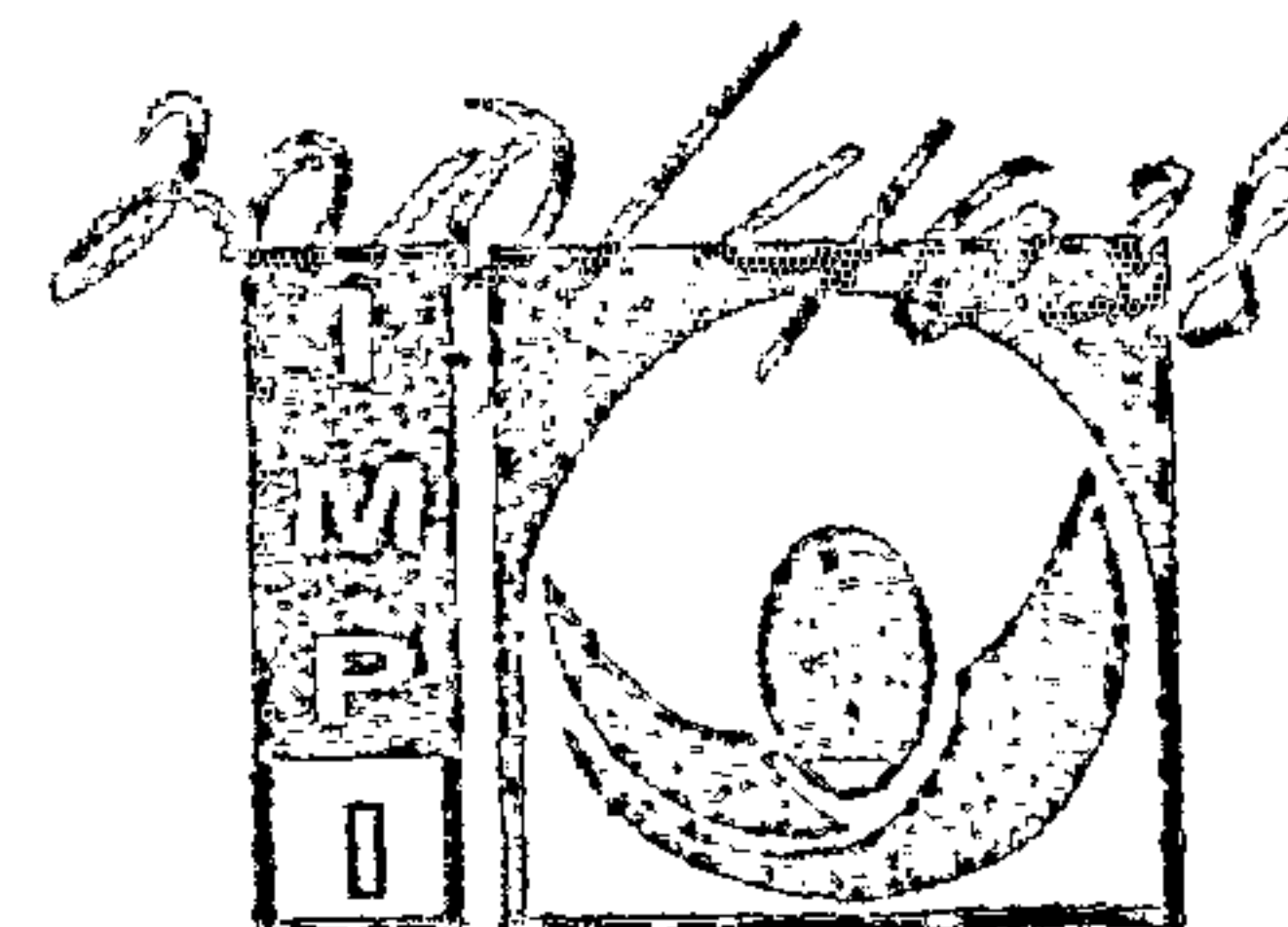
**LA SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES,  
ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA**

**M. EN C. INGRID MACIEL PEDROTE**



304074  
30-VIII-2012

1



PREPARACIÓN DE *Psittacanthus calyculatus* CON PROPIEDADES ANTIHIPERTENSIVAS, MÉTODOS PARA SU PRODUCCIÓN Y USO DE LA MISMA

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

### CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

5 La presente invención está relacionada con la producción de medicamentos a partir de extractos vegetales para el tratamiento de la hipertensión arterial; particularmente, la presente invención se refiere a un extracto hidrosoluble, semipuro, de muérdago americano *Psittacanthus calyculatus*, enriquecido con moléculas de tamaño mayor a 1000 daltones, adsorbible en carbón activado y

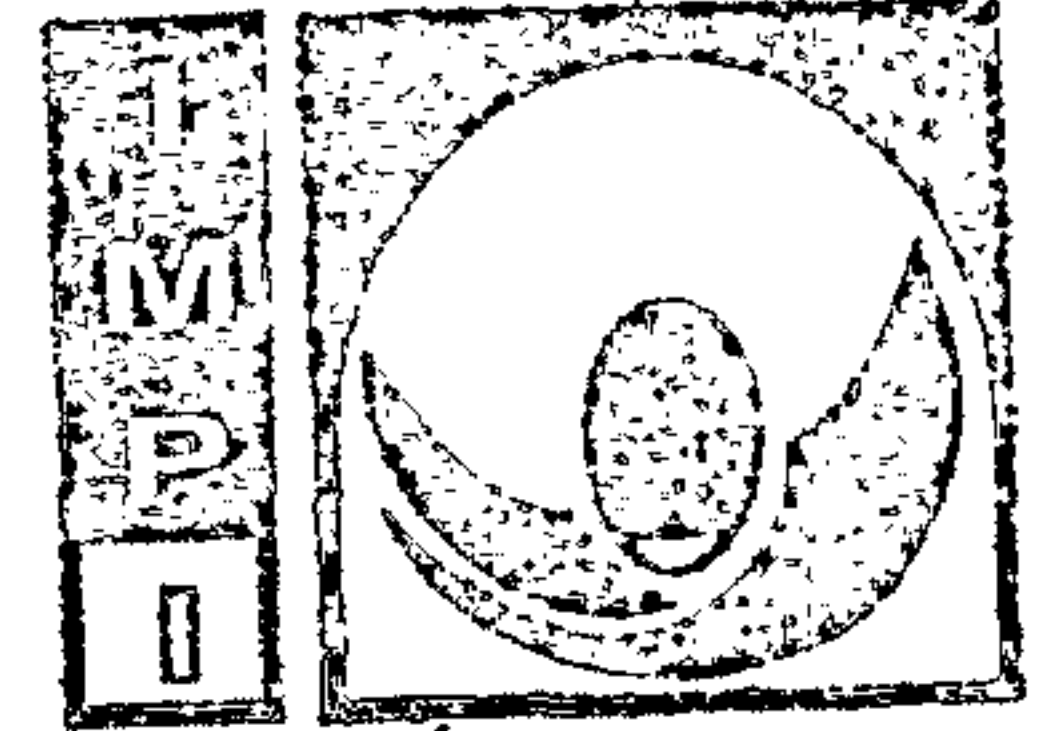
10 termoestable. Se proporciona el método para su producción y evidencia de que dicha preparación posee propiedades vasorelajantes, carece de efectos citotóxicos y cardiotrópicos, y por tanto puede aplicarse al tratamiento de la hipertensión arterial en mamíferos y humanos.

### 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hipertensión arterial es una condición orgánica caracterizada por presiones arteriales sistólicas/diastólicas mayores de 140/90 mmHg. El mantenimiento sostenido de esta condición en la persona que la padece puede ocasionar daños vasculares, derrames cerebrales, ataques cardiacos, insuficiencia

20 renal y ceguera.

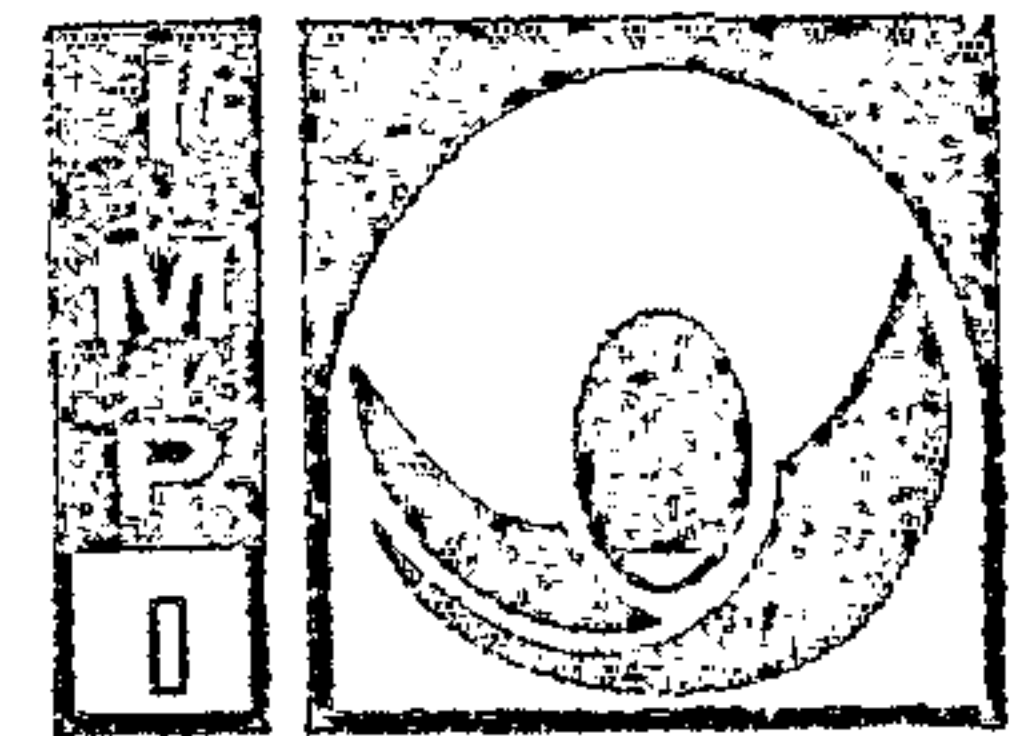
La hipertensión arterial es una de las afecciones de mayor prevalencia hoy en día. Se estima que a escala mundial existen al menos 970 millones de



personas afectadas de hipertensión, dos tercios de los cuales se ubican en países en desarrollo (Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. 2005. Lancet 365:217-223). La Organización Mundial de la Salud considera a la hipertensión como uno de los principales factores de riesgo de muerte prematura (Mackay J, Mensah G. 2004. World Health Organization. Geneva). La hipertensión es además un problema creciente; se estima que para el año 2025 habrá en el mundo 1,560 millones de adultos hipertensos (Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. 2005. Lancet 365:217-223).

Consecuentemente con la alta prevalencia y la creciente incidencia de la hipertensión, los costos económicos de su atención son muy elevados y consumen parte de los presupuestos de atención a la salud tanto públicos como privados. Un estudio reciente muestra que en Estados Unidos de América el 17% de todos los gastos médicos anuales, equivalentes a 149,000 millones USD, se destinan a la atención de enfermedades cardiovasculares crónicas, entre las que la hipertensión arterial ocupa el primer lugar (Trogon JG, Finkelstein EA, Nwaise IA, Tangka FK, Orenstein D. 2007. Health Promotion Practice 8:234-242).

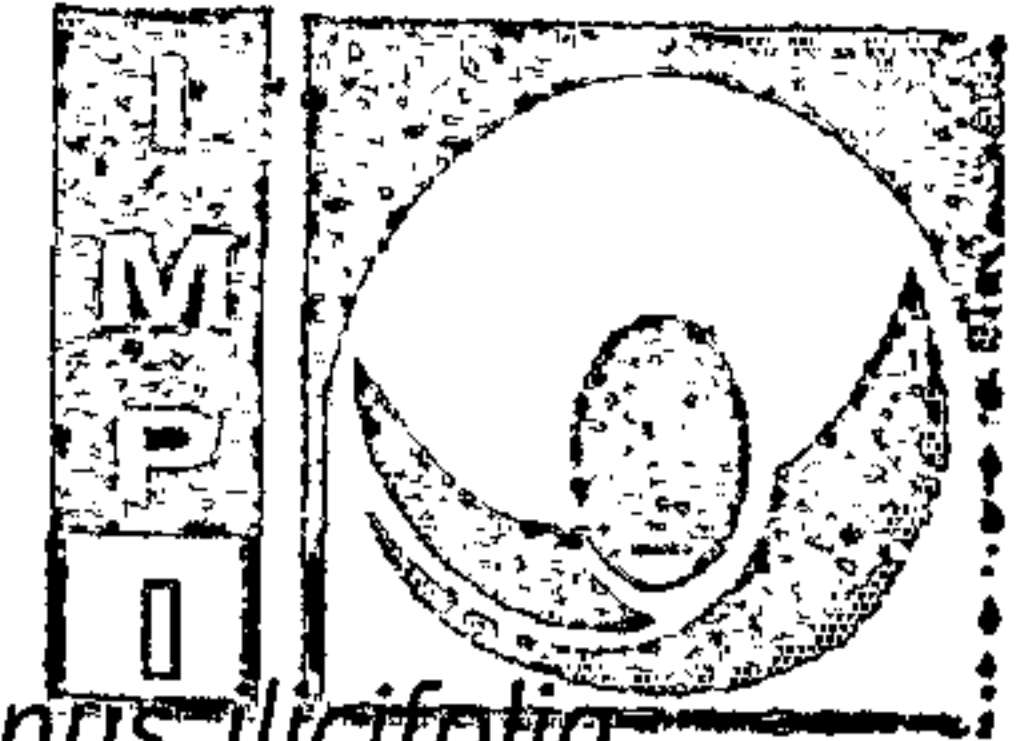
Dada la importancia de la hipertensión arterial, se han desarrollado múltiples tipos de fármacos para su tratamiento. Por ejemplo, los antagonistas alfa-adrenérgicos reducen la resistencia periférica total bloqueando la activación simpática de los receptores  $\alpha_1$  de los vasos sanguíneos. Los bloqueadores de canales de calcio inducen vasodilatación al bloquear la entrada de calcio en las células musculares lisas de los vasos. Por su parte, los bloqueadores beta-adrenérgicos



reducen el gasto cardíaco mediante acciones negativas inotrópicas y cronotrópicas. Además, bloquean la liberación de renina estimulada por el sistema nervioso simpático. Los diuréticos tiazídicos inhiben la reabsorción de cloruro de sodio en el túbulo distal renal. Los antagonistas del sistema renina/angiotensina bloquean al receptor de la angiotensina o impiden la producción de este potente vasoconstrictor (Ashley EA, Niebauer J. 2004. Cardiology Explained. Remedica).

No obstante, al igual que muchos otros medicamentos, los fármacos antihipertensivos tienen diversos efectos secundarios potenciales. De acuerdo a la Agencia de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América (FDA), los antihipertensivos pueden ejercer efectos secundarios comunes pero no graves, como fatiga leve, dolor de cabeza y tos seca, efectos secundarios graves, que incluyen dificultad para respirar, insomnio, depresión y disminución del deseo sexual, y efectos secundarios severos, que incluyen arritmias cardíacas, desmayos, dolor pecho y reacciones alérgicas; estas últimas son potencialmente mortales si no se tratan inmediatamente.

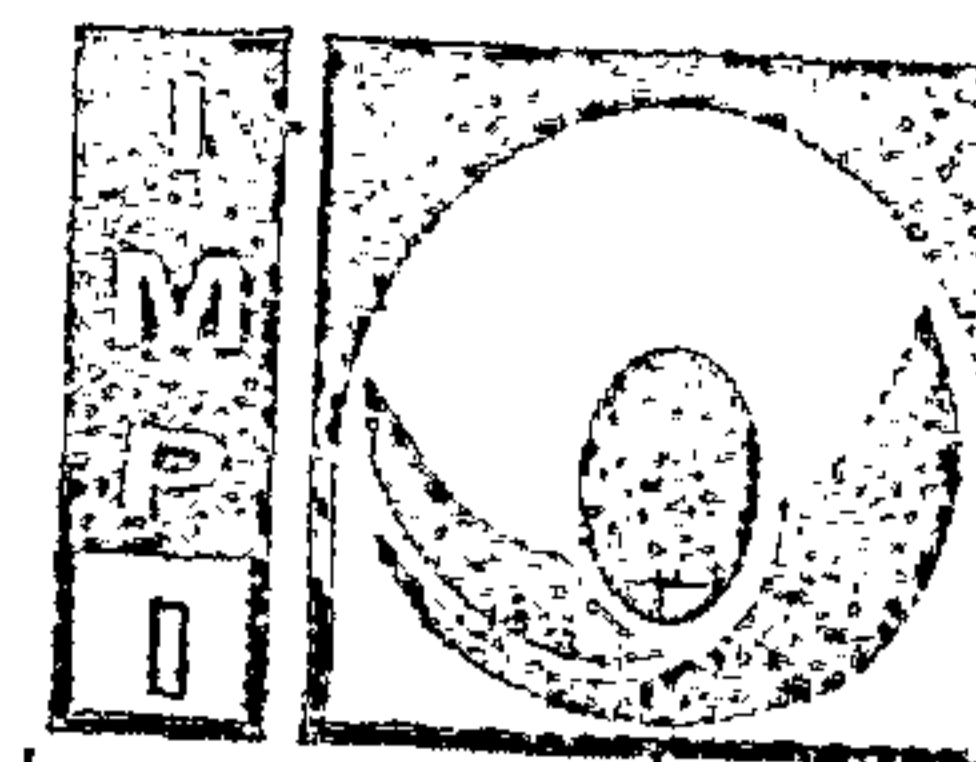
La alta prevalencia y la creciente incidencia de la hipertensión arterial, aunadas a los efectos colaterales de los fármacos actualmente empleados en su tratamiento, ha estimulado la búsqueda de nuevos fármacos sintéticos o naturales para el tratamiento de esta enfermedad. Numerosos grupos de investigación han explorado las propiedades antihipertensivas de preparaciones naturales de origen vegetal. Se ha reportado que polifenoles de vino tinto (Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. 1997. British Journal of



Pharmacology 120:1053-1058), extractos de hojas de las plantas *Maytenus ilicifolia* (Rattmann YD, Cipriani TR, Sasaki GL, Iacomini M, Rieck L, Marques MCA, da Silva Santos JE. 2006. *Journal of Ethnopharmacology* 104:328-335), *Flos chrysanthemum*

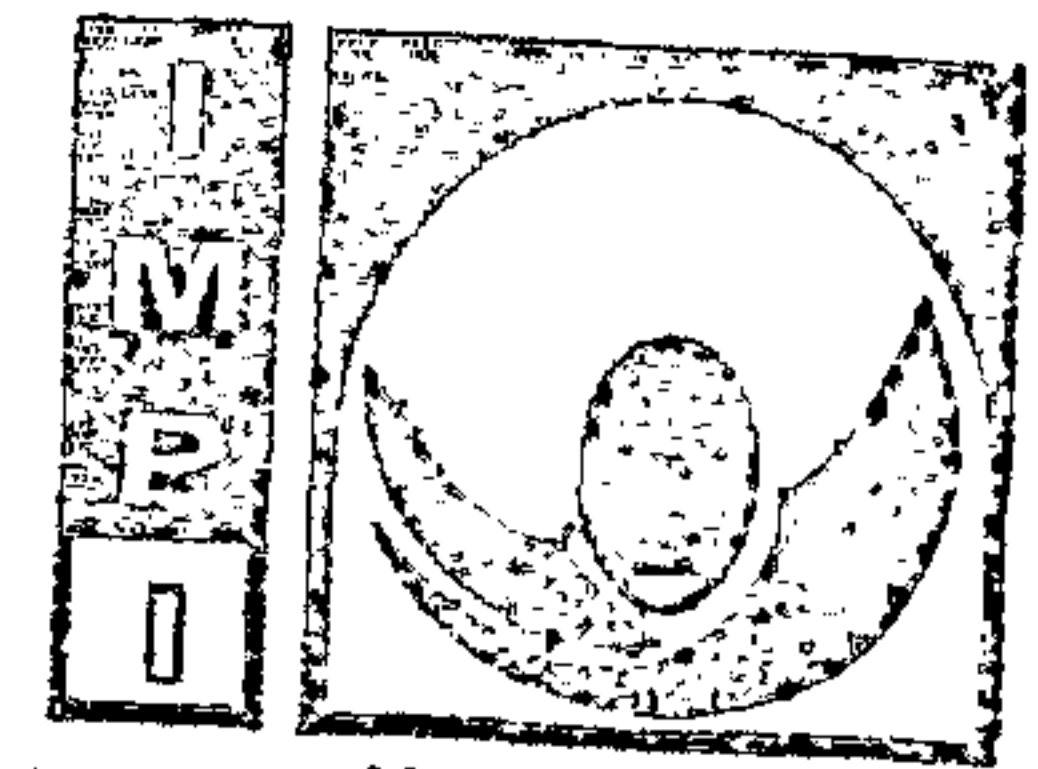
(Jiang HD, Cai J, Xu JH, Zhou XM, Xia Q. 2005. *Journal of Ethnopharmacology* 103:221-226), *Persea americana* o aguacate (Owolabi MA, Jaja SI, Coker HAB. 2005. *Fitoterapia* 76:567-573) y *Eleutherococcus senticosus* (Kwan CY, Zhang WB, Sim SM, Deyama T, Nishibe S. 2004. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369:473-480), entre otras, tienen un efecto vasodilatador que depende del endotelio y actúa a través de la vía del óxido nítrico.

10                   Aprovechando avances en esta área del conocimiento, diversas composiciones de extractos vegetales han sido patentadas para el tratamiento de desordenes vasculares. La patente US 7,682,617 reivindica el empleo de preparaciones vegetales (*Phytoceutical composition*) de diversas plantas como *Rhaponticum carthamoides*, *Rhodiola rosea*, *Szchisandra chinensis*, *Angelica sinensis*,  
15 *Astragalus membranaceus*, *Echinacea angustifolia*, entre otras, para el tratamiento de desordenes vasculares. Por otra parte, la patente US 7,132,446 reivindica el empleo de preparaciones derivadas de extractos de semillas de uva para el tratamiento de desordenes vasculares, por su alto contenido de actividades vasorelajantes. Igualmente, la patente US 7,122,574 reivindica el uso de extractos de  
20 granos de cacao, ricos en polifenoles y con apreciable actividad vasorelajante, para el tratamiento de la hipertensión arterial.



La medicina tradicional emplea preparaciones de muérdago para el tratamiento de diversas afecciones. Los muérdagos son plantas hemiparásitas de distribución mundial, que crecen sobre diversas especies arbóreas (Mathiasen RL, Nickrent DL, David C, Watson DM. 2008. *Plant Disease* 92:988-1006). El muérdago europeo, *Viscum album*, se ha empleado desde la antigüedad (ca. s IX AC) para el tratamiento de diversas enfermedades como hipertensión, cáncer, epilepsia, afecciones cardíacas y artritis (Mengs U, Göthel D, Leng-Peschlow E. 2002. *Anticancer Research* 22:1399-1408; Ríos MY, Salinas D, Villarreal ML. 2001. *Planta Medica* 67:443-446). Esta especie de muérdago es hasta hoy la más estudiada, y hoy en día diversas preparaciones de *Viscum album* son comercializadas en Europa como auxiliares en el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Ernst E. 2002. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* 2:3-5; Johansson S, Gullbo J, Lindholm P, Ek B, Thunberg E, Samuelsson G, Larsson R, Bohlin L, Claeson P. 2003. *Cellular and Molecular Life Science* 60:165-175; Kienle GS, Berrino F, Büssing A, Portalupi E, Rosenzweig S, Kiene H. 2003. *European Journal of Medical Research* 8:109-119).

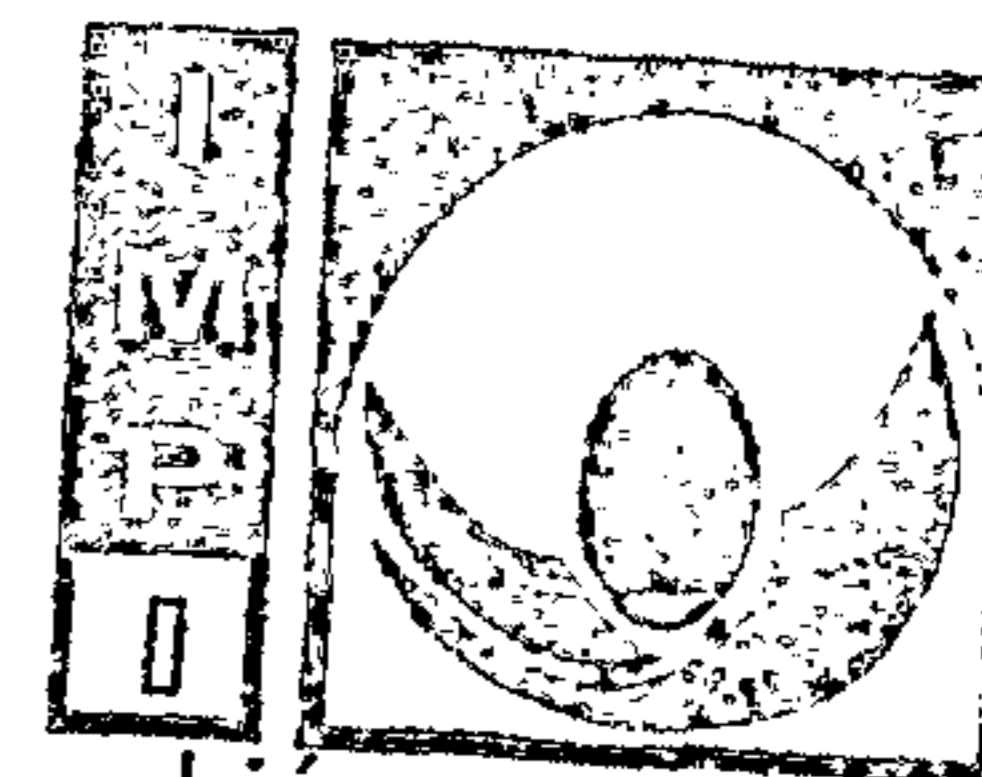
La medicina tradicional usa también preparaciones de muérdago para el tratamiento de la hipertensión, empleando infusiones o preparaciones fermentadas de extractos alcohólicos-acuosos. Aunque los estudios farmacológicos en este campo son escasos, se han reportado extractos etanólicos o butanólicos de hojas del muérdago europeo, *Viscum album*, con un efecto vasorelajante sobre el sistema vascular (Deliorman D, Calis I, Ergun F, Dogan BS, Buharalioglu CK, Kanzik I. 2000. *Journal of Ethnopharmacology* 72:323-329; Tenorio FA, del Valle L, González A,



Pastelín G. 2005. *Fitoterapia* 76:204-209). El efecto de un extracto butanólico de *Viscum album*, ensayado sobre anillos aórticos de rata, produjo una respuesta vasoconstrictora en éstos; sin embargo, algunas fracciones derivadas del extracto indujeron una débil relajación del órgano. Por tal motivo, Deliorman y colaboradores sugirieron que el mecanismo de acción de las fracciones era inhibiendo la actividad de la fosfodiesterasa (PDE) del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) en músculo liso vascular. Sin embargo, los resultados no fueron claros, ya que no se encontró una correlación entre el efecto de las fracciones del extracto y un efecto inhibitorio sobre la PDE (Deliorman D, Calis I, Ergun F, Dogan BS, Buharalioglu CK, Kanzik I. 2000. *Journal of Ethnopharmacology* 72:323-329).

Por otra parte, el efecto vasodilatador del extracto etanólico de hojas de *Viscum album* se estudió sobre el modelo de corazón aislado y perfundido de Langendorff. El extracto causó una disminución del ~37% en la presión de perfusión, la cual se abatió en presencia de inhibidores de la sintetasa del óxido nítrico (NOS), como *N*-nitro-*L*-arginina metil éster (L-NAME) o tricloruro de gadolinio. Conjuntamente, la producción de óxido nítrico aumentó en presencia del extracto y disminuyó en presencia del extracto e inhibidores de la NOS. Estos datos sugieren que el extracto de *Viscum album* contiene moléculas con actividad vasodilatadora que pueden actuar como inductores de la vía del óxido nítrico (Tenorio FA, del Valle L, González A, Pastelín G. 2005. *Fitoterapia* 76:204-209).

Cabe señalar que las especies americanas de muérdago han sido empleadas en la medicina tradicional pero han sido poco estudiadas hasta ahora.

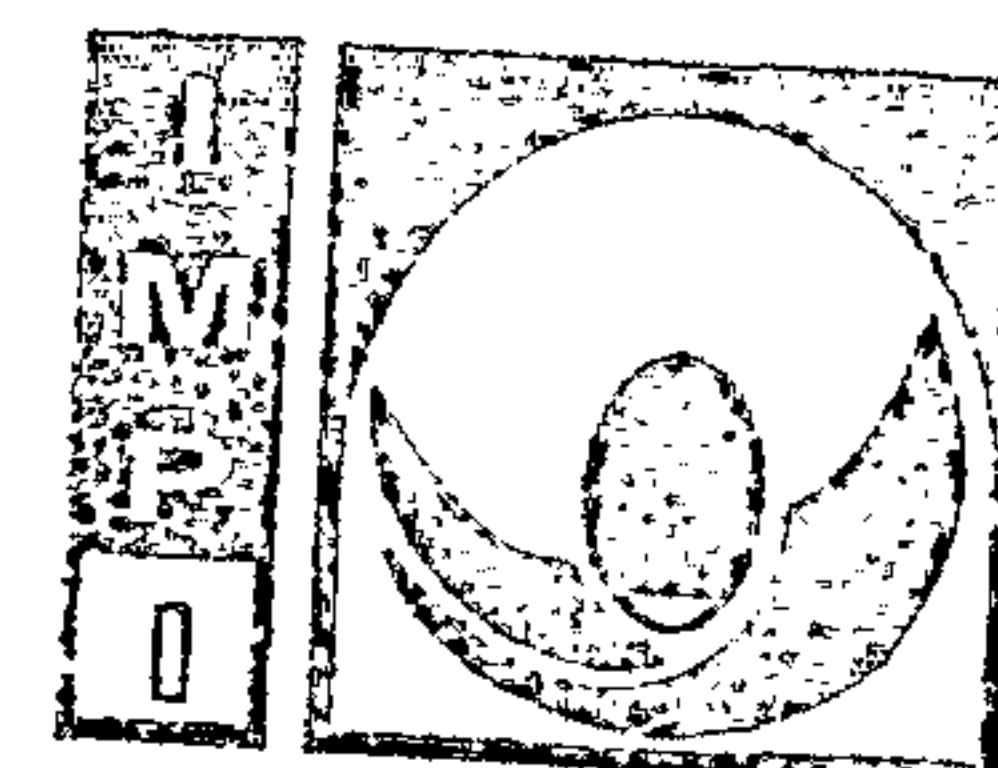


Estudios recientes sugieren que los muérdagos americanos podría ser también una importante fuente de compuestos bioactivos (Johansson S, Gullbo J, Lindholm P, Thunberg E, Samuelsson G, Larsson R, Bohlin L, Claeson P. 2003. Cellular and Molecular Life Science 60:165-175).

5                   En relación al arte previo en torno a *Psittacanthus calyculatus* específicamente, dentro de los bancos de patentes espacenet y USPTO solo se encontró la patente japonesa JP2001261523, la cual reclama una preparación de *Psittacanthus calyculatus* para el cuidado de la piel que tiene una acción inhibidora de la producción de melanina, la cual no implica arte previo para la invención reclamada en este documento.

10                   Dentro de la literatura académica, encontramos diversos estudios realizados con extractos etanólicos del muérdago americano *Psittacanthus calyculatus*. Resalta el trabajo de Rodríguez-Cruz ME, Pérez-Ordaz L, Serrato-Barajas BE, Juárez-Oropeza MA, Mascher D, Paredes-Carbajal. 2003. Journal of Ethnopharmacology 86:213-218; en el cual reporta un extracto etanólico que posee efectos vasorelajantes sobre anillos aórticos de rata. Cabe mencionar que las preparaciones utilizadas son bastante crudas y poco caracterizadas respecto a sus posibles efectos citotóxicos y cardiotrópicos. Asimismo, es necesario mencionar que el extracto que presentamos en esta solicitud es diferente a la presentada por Rodríguez-Cruz et.al., ya que el extracto con efectos vasorelajantes que estamos presentando es un extracto acuoso que difiere en el método de extracción y que no presenta efectos citotóxicos ni cardiotrópicos.





Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

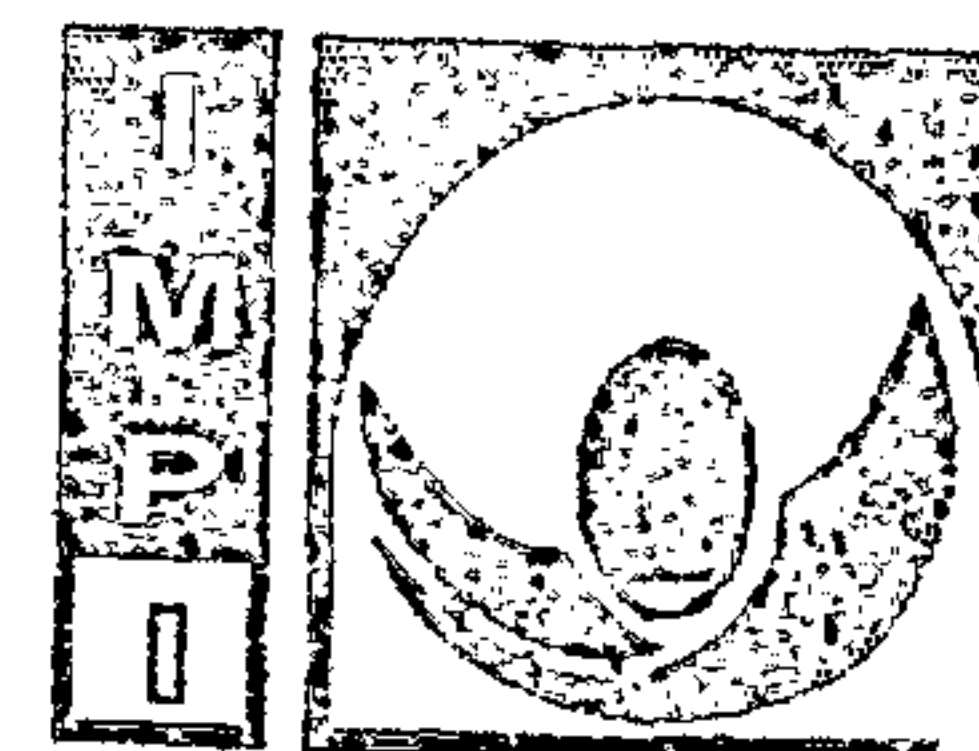
## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Perfil cromatográfico de extracto dializado de muérdago (EPcd). La muestra se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 y una columna Synergy Hydro RP (250 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 4  $\mu$ M), y es el perfil de elución detectado a 254 nm.

**Figura 2:** Perfil cromatográfico de sobrenadante del tratamiento del extracto dializado de muérdago con carbón activado (SN-EPcd/CA). La muestra se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 y una columna Synergy Hydro RP (250 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 4  $\mu$ M), y es el perfil de elución detectado a 254 nm.

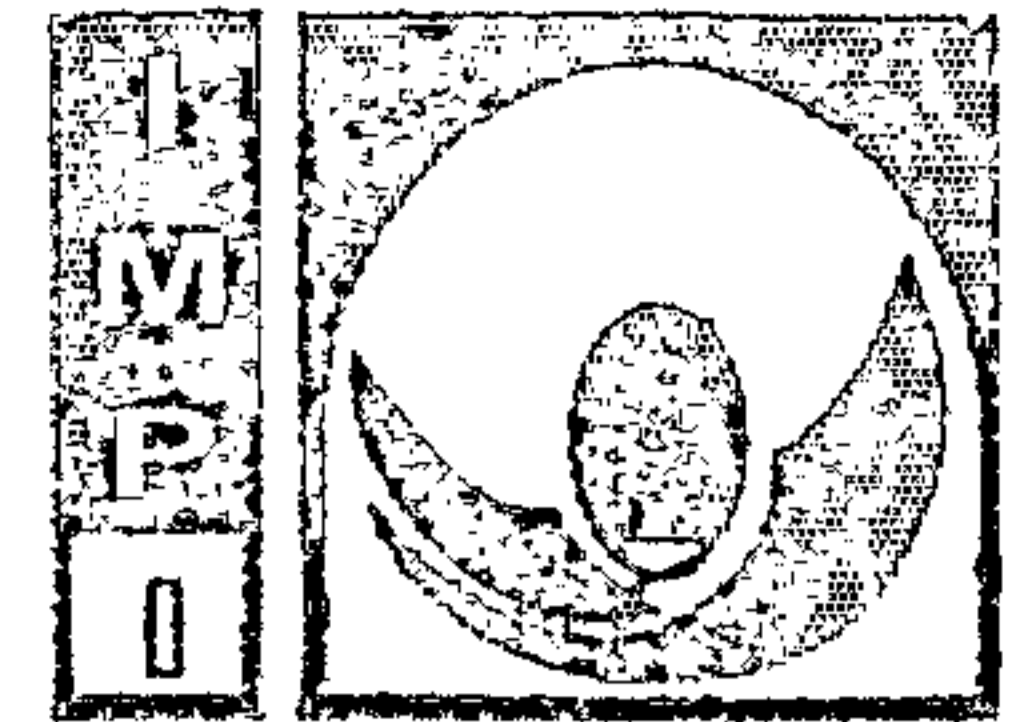
**Figura 3:** Cromatograma de la fracción vasorelajante del extracto de muérdago, obtenida por ebullición del carbón activado recuperado del tratamiento del extracto dializado de muérdago (FVRM). La muestra se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 y una columna Synergy Hydro RP (250 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 4  $\mu$ M), y es el perfil de elución detectado a 254 nm.

**Figura 4:** Muestra una gráfica que prueba la ausencia de efectos citotóxicos del extracto acuoso del muérdago americano *Psittacanthus calyculatus* (EPc) sobre cultivos de células epiteliales humanas de la línea celular HeLa. El extracto acuoso se aplicó a los cultivos celulares a partir del segundo día de cultivo y la



supervivencia celular se determinó mediante recuentos celulares en un hematímetro por triplicado para cada tratamiento. -O- Medio basal (MB); -▼- MB + EPC 1%; -□- MB + EPC 3%; -◇- MB + EPC 5%; -△- MB + EPC 10%. Los resultados, que se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes, muestran que ninguna de las concentraciones de EPC aplicadas a las células afectó significativamente su viabilidad, comparadas con el tratamiento control (MB). En el eje de las ordenadas se muestran los días de cultivo, en el eje de las abcisas se muestran las células por caja por  $10^4$ .

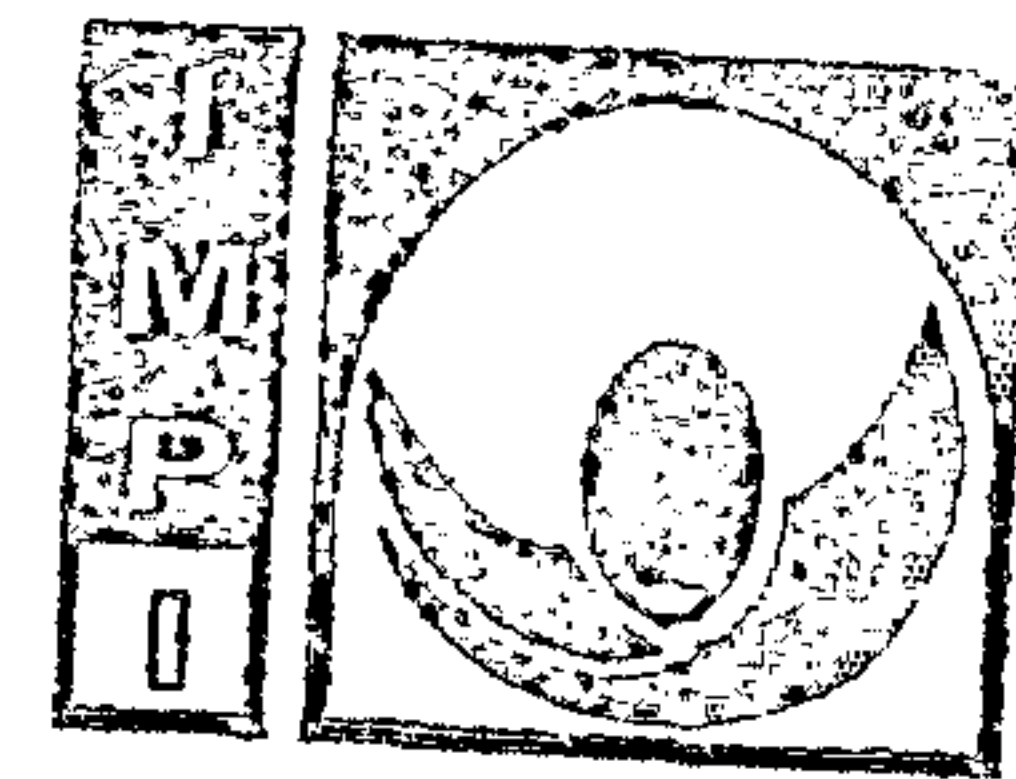
**Figura 5:** Muestra una gráfica que documenta el efecto vasorelajante del extracto acuoso del muérdago americano *Psittacanthus calyculatus* (EPC) sobre anillos aórticos de cobayo, previamente contraídos con noradrenalina. Los anillos aórticos (2 mm de espesor) de cobayo macho adulto (600 a 700 g de peso) se montaron en un vaso de órgano completo con 5 ml de solución de Krebs (NaCl 128 mM, KCl 4.7 mM,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.17 mM,  $NaHCO_3$  14.9 mM,  $KH_2PO_4$  1.11 mM,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  1.1 mM, 5 g/L dextrosa) y se conectaron a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo (Grass 7D, Grass Instruments Co. Quincy, Mass, U.S.A.) con una tensión inicial de 625 mg. Luego de 30 min de estabilización en la solución de Krebs, los anillos aórticos se contrajeron con 5  $\mu M$  de noradrenalina. Cuando se alcanzó la contracción total, se aplicaron a distintos anillos aórticos concentraciones crecientes del extracto. La figura 5 A 3A muestra que EPC a la concentración de 1.25% indujo un 40% de relajación en los anillos aórticos. La figura 5B 3B muestra que EPC aplicado al 2.5% indujo un 60% de relajación. La figura 5C 3C muestra que EPC



aplicado al 5% indujo un 70% de relajación, y la figura 5D 3D muestra que aplicado al 10% indujo un 80% de relajación en los anillos aórticos. Las figuras son representativas de seis ensayos independientes para cada concentración de EPc probada.

5 **Figura 6:** Muestra una gráfica que confirma el efecto vasorelajante del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* (EPc). En estos experimentos, un mismo anillo aórtico de cobayo, procesado como se describió en la figura 5 3, se trató con aplicaciones sucesivas del EPc. Como se observa en la figura, el órgano se relajó en forma creciente en respuesta al incremento en la concentración del EPc. La aplicación de EPc a la concentración de 1.25% indujo un 33 % de relajación en los anillos aórticos. La elevación de la concentración de EPc al 2.5% indujo un 66% de relajación. La elevación de la concentración de EPc al 5% indujo un 83% de relajación, y la elevación en la concentración de EPc al 10% indujo un 92% de relajación en los anillos aórticos. La gráfica es representativa de seis experimentos independientes.

15 **Figura 7:** Muestra una gráfica que documenta el incremento en la potencia vasorelajante del extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* (EPc) luego de que éste se dializó contra agua destilada (50 volúmenes) a través de una membrana Spectra/Por 6 con tamaño de poro de 1,000 daltones. La diálisis incrementó en 8 veces la potencia vasorelajante de la preparación, puesto que la vasorelajación alcanzada con 10% del extracto no dializado EPc (92%), se alcanzó con tan solo 1.25% de la fracción dializada EPcd. La gráfica es representativa de seis experimentos independientes.



**Figura 8:** Muestra una gráfica que documenta la ausencia total de efectos vasorelajantes de la fracción EPcd sobre anillos aórticos de cobayo caudales de endotelio. Este resultado sugiere que la capacidad vasorelajante de la fracción EPcd es mediada por el tejido endotelial y por tanto muy probablemente depende de la síntesis y liberación de óxido nítrico. La gráfica es representativa de seis experimentos independientes.

**Figura 9:** Muestra experimentos con anillos aórticos de cobayo con endotelio íntegro, procesados como se describió en la figura 5, los cuales se trataron con el inhibidor de la síntesis del óxido nítrico L-N-nitro-arginina metil-ester (L-NAME) y luego con la fracción EPcd. La ausencia de relajación en el órgano prueba que los efectos vasorelajantes de la fracción EPcd están mediados por el óxido nítrico producido por el endotelio vascular. La figura 9 A: Muestra una gráfica que confirma la capacidad vasorelajante de bajas concentraciones de la fracción EPcd. En ausencia del inhibidor de la síntesis del óxido nítrico L-N-nitro-arginina metil-ester (L-NAME), 1.25% de la fracción EPcd indujo un 90% de relajación en anillos aórticos precontraídos con norepinefrina, y la figura 9B: Muestra una gráfica que confirma la participación del óxido nítrico el efecto vasorelajante de la fracción EPcd.

**Figura 10:** Muestra una gráfica que confirma la mediación del óxido nítrico en capacidad vasorelajante de la fracción EPcd. En estos experimentos, anillos aórticos de cobayo a los que previamente se removió el endotelio, no mostraron vasorelajación significativa por la aplicación de la fracción EPcd, pero sí por la aplicación de nitroprusiato de sodio 1  $\mu$ M, un reconocido donador de óxido nítrico, el



cual indujo una relajación del 100%. La figura es representativa de tres ensayos independientes.

**Figura 11:** Muestra una gráfica que prueba que la actividad vasorelajante presente en la fracción EPcd puede retenerse en adsorbentes comerciales como el carbón activado. Para estos ensayos, la fracción EPcd se incubó durante 12 h con 2% de carbón activado a 4 °C con agitación constante. Al cabo de la incubación, la muestra se sedimentó por centrifugación (13,000g, 20 min) y el sobrenadante (SN-EPcd/CA) se ensayó sobre anillos aórticos precontraídos con noradrenalina. La aplicación del sobrenadante SN-EPcd/CA, no indujo en absoluto la vasorelajación del órgano. El registro es representativo de tres ensayos independientes.

**Figura 12:** Muestra gráficas que prueban que la actividad vasorelajante de la fracción EPcd retenida sobre adsorbentes comerciales puede recuperarse por métodos físicos o químicos. Para estos ensayos, el carbón activado del tratamiento del la fracción EPcd se resuspendió en agua destilada y se incubó en baño maría a 100°C por 10 min. El ebullición se sedimentó para eliminar el carbón activado y su sobrenadante, la fracción vasorelajante del muérdago (FVRM), se aplicó, a temperatura ambiente, a anillos aórticos de cobayo macho precontraídos con noradrenalina. En ensayos paralelos, anillos aórticos de cobayo macho, precontraídos con noradrenalina, se trataron con el sobrenadante del tratamiento con carbón activado (SN-EPcd/CA). Los órganos tratados con la fracción FVRM mostraron una relajación mayor del 90% (Figura 12C) en tanto que los órganos tratados con la



fracción SN-EPcd/CA no mostraron relajación apreciable (Figura 12A) sino después del lavado con solución de Krebs para retirar el efecto de la noradrenalina. Los anillos no relajados por el tratamiento con SN-EPcd/CA y lavados con solución de Krebs, mostraron una relajación mayor del 90% cuando se volvieron a contraer con noradrenalina y luego se trataron con la fracción FVRM (Figura 12B). Por el contrario, los anillos inicialmente relajados con FVRM no pudieron ser relajados con SN-EPcd/CA (Figura 12D). Estos resultados muestran que la fracción FVRM contiene la actividad vasorelajante y que dicha actividad está ausente de la fracción SN-EPcd/CA. El registro es representativo de tres ensayos independientes.

**Figura 13:** Muestra gráficas que prueban que la actividad vasorelajante de la fracción EPcd retenida sobre adsorbentes comerciales es recuperada solo de manera parcial por tratamientos con temperaturas menores a 100°C. La figura 13A muestra que la fracción vasorelajante recuperada por tratamiento del carbón activado con 50°C induce solo un 28% de relajación en los anillos aórticos contraídos con norepinefrina. La figura 13B, por su parte, muestra que fracciones vasorelajantes recuperadas por tratamiento del carbón activado con 75°C inducen una relajación del 40% en los organos contraídos con norepinefrina.

**Figura 14:** Muestra un registro de polígrafo que prueba la ausencia de efectos cardiotrópicos de la fracción vasorelajante de muérdago (FVRM). Tanto la presión cardíaca (trazo superior) como la frecuencia cardíaca (trazo inferior) se mantuvieron constantes en el órgano luego de la aplicación de la fracción FVRM. La

primera flecha indica el tiempo de inicio de aplicación y la segunda flecha muestra el tiempo de termino de aplicación de FVRM.



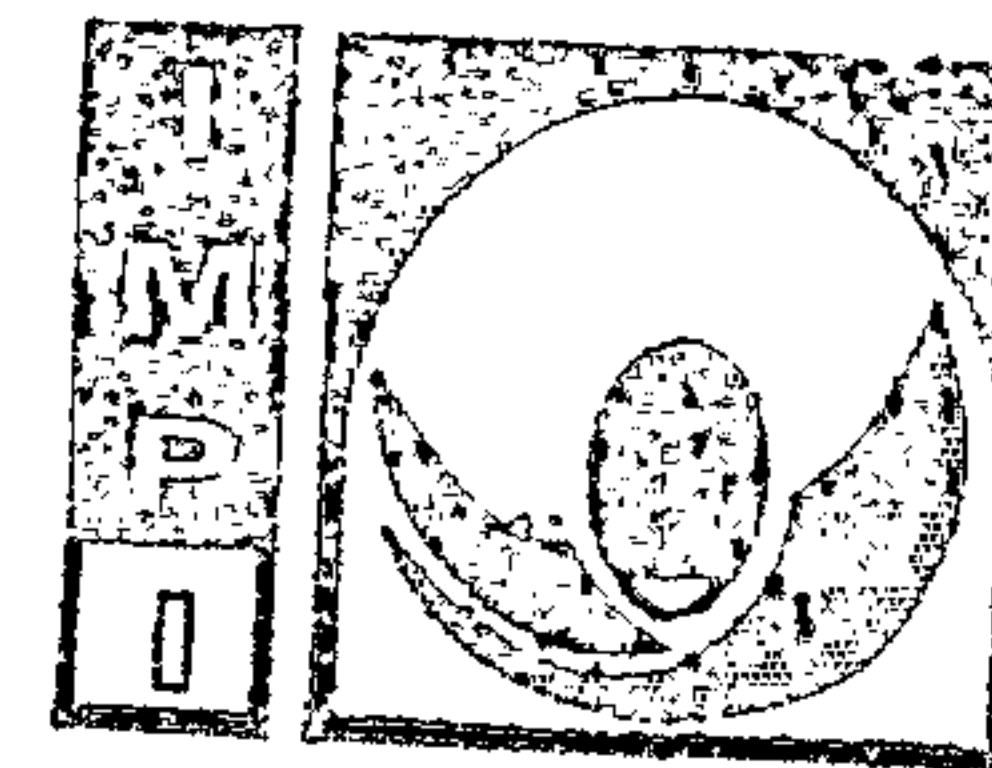
### BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

5 La presente invención es un extracto de hojas de *Psittacanthus calyculatus* con propiedades vasorelajantes que tiene un perfil de elución a 254 nm como se muestra en la Figura 3. Este extracto es una fracción semipura, hidrosoluble, termoestable, enriquecida en compuestos con peso molecular mayor a 1,000 daltones, adsorbibles sobre carbón activado y recuperables de este adsorbente por  
10 métodos físicos y químicos simples como la ebullición o el uso de soluciones de pH definido.

Otro objeto de esta invención es el método para elaborar un extracto de *Psittacanthus calyculatus* con propiedades vasorelajantes que comprende:

- a. Recolectar hojas de *Psittacanthus calyculatus* de un hospedero
- 15 b. Secar las hojas, molerlas y almacenar el polvo de hoja seca.
- c. Solubilizar el polvo de hojas secas en amortiguador de fosfatos con agitación constante y centrifugar
- d. Recuperar y dializar el sobrenadante
- e. Tratar la solución dializada con un adsorbente,
- 20 f. Centrifugar y recuperar el sedimento con el adsorbente
- g. Recuperar el extracto del adsorbente por métodos físicos y

químicos simples como la ebullición o el uso de soluciones de pH definido.

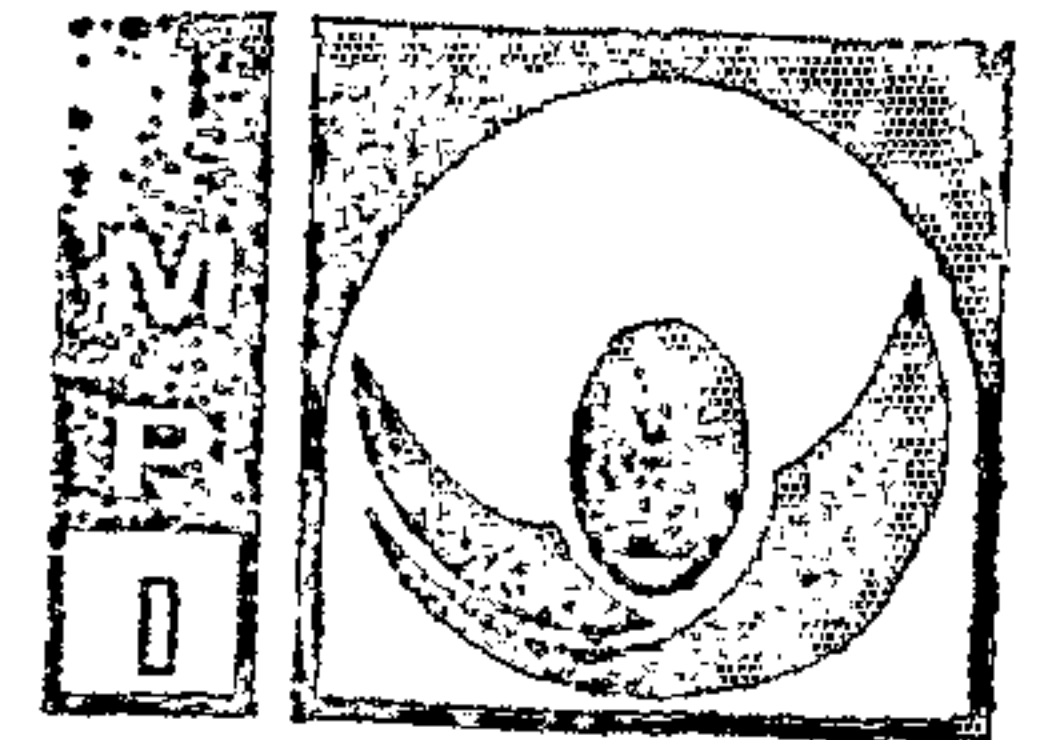


El mejor método conocido para realizar el extracto de hojas de *Psittacanthus calyculatus* con propiedades vasorelajantes detallado en los ejemplos 1 y 2, señalamos que a partir de las hojas pulverizadas del muérdago americano

*Psittacanthus calyculatus* se prepara un extracto acuoso empleando 100 g de hojas secas y pulverizadas y 500 ml de solución salina amortiguada con fosfatos de fórmula KCl 2.7 mM, NaCl 0.14 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3 mM como extrayente. La extracción se realiza a 4°C, durante 12 h con agitación constante.

Luego de la extracción, la preparación se centrifuga, preferentemente a 12,000 rpm, por 30 min, a 4°C y el sobrenadante recuperado se filtra a través de papel filtro con tamaños de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar material particulado y obtener el extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* (EPc). Posteriormente, el extracto se dializa a través de una membrana con tamaño de poro de 1,000 daltones contra agua destilada (50 volúmenes) a 4°C y con agitación constante, donde se busca eliminar sales y otros compuestos de bajo peso molecular que pudieran tener efecto vasoconstrictor. Posteriormente el extracto dializado (EPcd) se trató con carbón activado para purificar adicionalmente la actividad vasorelajante. Para ello, 50 ml del extracto dializado EPcd se incuban por 12 h con 2% de carbón activado a 4°C con agitación constante. Al cabo de la incubación, la muestra se sedimentó por centrifugación (13,000g, 20 min) y se recuperaron por separado el sobrenadante (SN-EPcd/CA) y el carbón activado. El carbón activado recuperado del paso previo se resuspendió en agua destilada estéril y se incubó a baño maría por 15 min. con





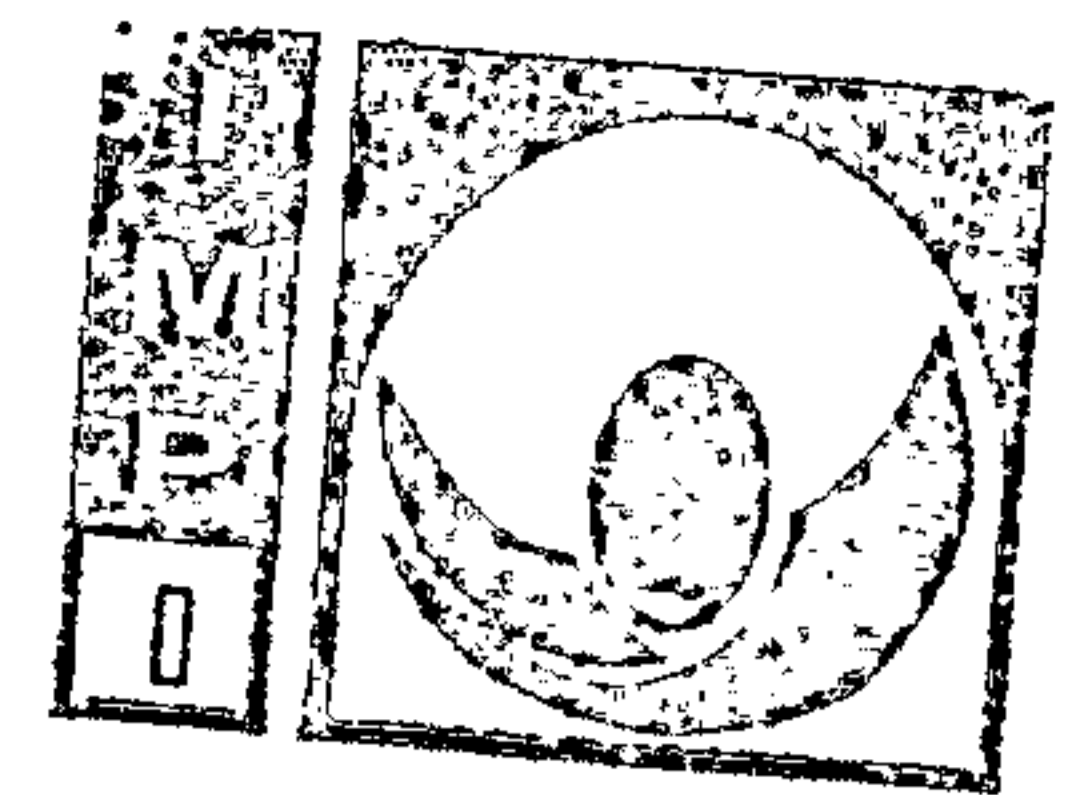
temperaturas en el intervalo de 50 a 100°C, o bien con solución de Krebs con valores de pH entre 3 y 12, para recuperar la fracción vasorelajante del muérdago (FVRM).

Además, en los ejemplos tres a siete se presentan evidencias experimentales de las propiedades vasorelajantes de la fracción hidrosoluble semipura de la planta *Psittacanthus calyculatus* objeto de la presente invención, de los mecanismos por los que dicha preparación ejerce sus propiedades vasorelajantes, y de su carencia de efectos citotóxicos sobre células humanas en cultivo, así como de la ausencia de efectos negativos de la preparación sobre el funcionamiento cardiaco.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un extracto de hojas de *Psittacanthus calyculatus* con propiedades vasorelajantes que tiene un perfil de elución a 254 nm como se muestra en las Figuras 1 a 3. Este extracto es una fracción semipura, hidrosoluble, enriquecida en compuestos con peso molecular mayor a 1,000 daltones, adsorbibles sobre carbón activado y recuperables de este adsorbente por métodos físicos y químicos simples como la ebullición o el uso de soluciones de pH definido. Asimismo, la presente invención describe método para elaborar un extracto de *Psittacanthus calyculatus* con propiedades vasorelajantes como se detalla en los ejemplos 1 y 2.

En los ejemplos tres a siete se presentan evidencias experimentales de las propiedades vasorelajantes de la fracción hidrosoluble semipura de la planta *Psittacanthus calyculatus* objeto de la presente invención, de los mecanismos por los

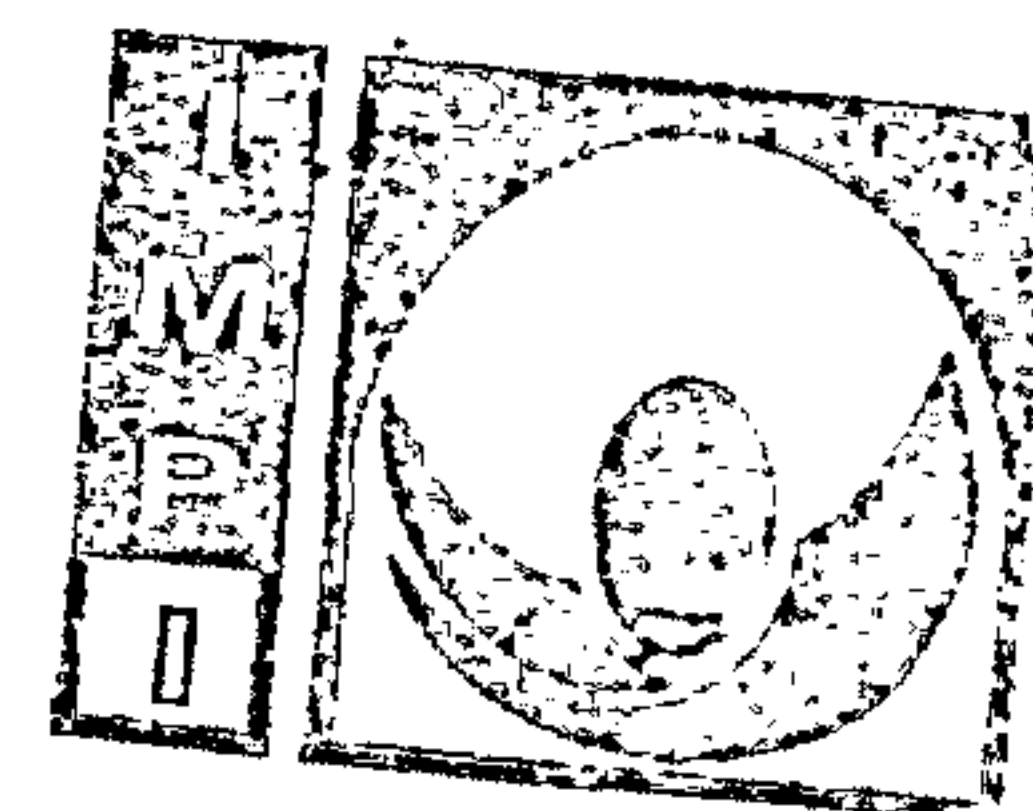


que dicha preparación ejerce sus propiedades vasorelajantes, y de su carencia de efectos citotóxicos sobre células humanas en cultivo, así como de la ausencia de efectos negativos de la preparación sobre el funcionamiento cardiaco.

Adicionalmente, el extracto de *Psittacanthus calyculatus* con propiedades vasorelajantes de la presente invención constituye una base activa para la preparación de composiciones, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por lo que es posible utilizar el extracto para la preparación de composiciones para el tratamiento de hipertensión arterial en mamíferos.

#### 10 **Ejemplo 1. Colecta y Preparación del Material Vegetal de *Psittacanthus calyculatus*.**

Ejemplares del muérdago americano *Psittacanthus calyculatus* se colectaron de árboles de mezquite de la especie *Prosopis laevigata* (Wild) M.C. Johnst., ubicados en jardines públicos en la ciudad de Querétaro, Qro., México, en diferentes épocas del año a fin de cubrir los principales estadios fenológicos de la planta (crecimiento vegetativo, floración y fructificación). La identidad del material botánico colectado, tanto del muérdago como de su hospedero, fue confirmada por especialistas en taxonomía vegetal. Las plantas de muérdago colectadas se limpiaron de polvo y se revisaron para eliminar los ejemplares parasitados por insectos u hongos y se secaron a temperatura ambiente (20°C a 30°C) sobre charolas de papel, al abrigo de luz directa, durante cinco a siete días.



Posteriormente se recuperaron las hojas del material vegetal seco y se pulverizaron en un procesador de alimentos doméstico (alternativamente se puede usar una licuadora doméstica). El polvo obtenido se almacenó en contenedores de vidrio ámbar con sello hermético hasta su extracción.

5

### **Ejemplo 2. Preparación de una Fracción Vasorelajante de *Psittacanthus calyculatus*.**

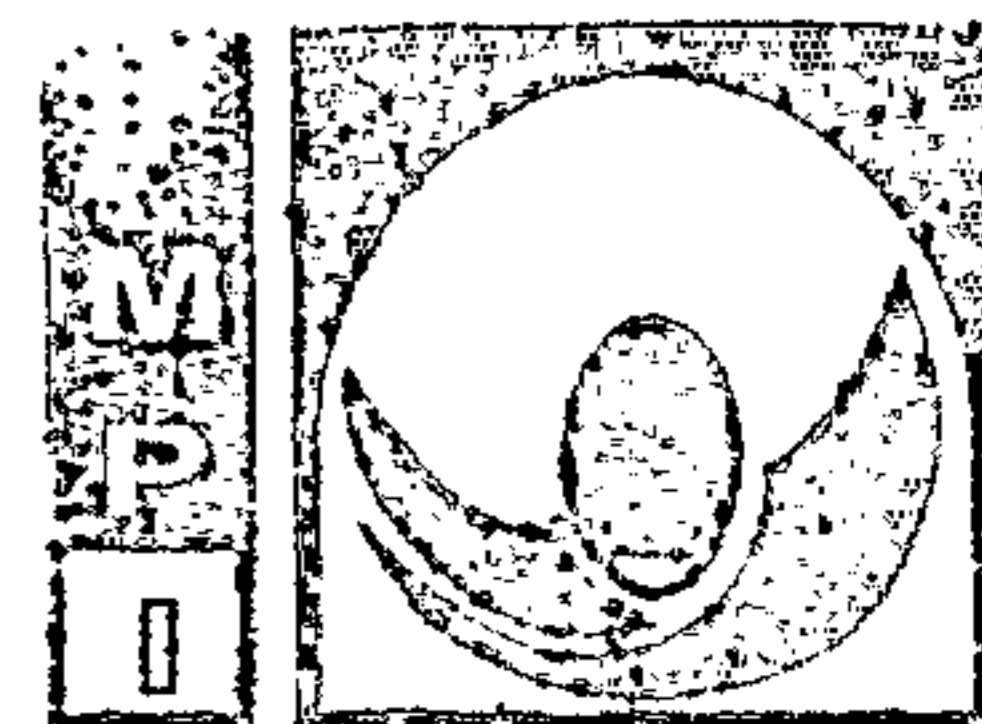
A partir de las hojas pulverizadas del muérdago americano *Psittacanthus calyculatus* se preparó un extracto acuoso empleando 100 g de hojas secas y pulverizadas y 500 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (KCl 2.7 mM, NaCl 0.14 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3 mM) como extrayente, todo ello colocado en un vaso de precipitados de vidrio tipo Pyrex. La extracción se realizó a 4°C, durante 12 h y con agitación constante sobre una placa de agitación Corning (Corning, NY, U.S.A.)

15

Luego de la extracción, la preparación se centrifugó a 12,000 rpm, por 30 min, a 4°C, en una centrífuga Sorvall RC5C Plus (Kendro Laboratory Products; Asheville, NC, U.S.A.) y el sobrenadante recuperado se filtró a través de papel Whatman (Whatman Internacional Ltd., Maidstone, England) y filtros Millipore con tamaños de poro de 0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Ireland) para eliminar los restos de material particulado y obtener el extracto acuoso de *Psittacanthus calyculatus* (EPc).

20

Posteriormente, el extracto EPc se dializó a través de una membrana Spectra/Por 6 (SPECTRUM; Gardena, CA, U.S.A.) con tamaño de poro de 1,000

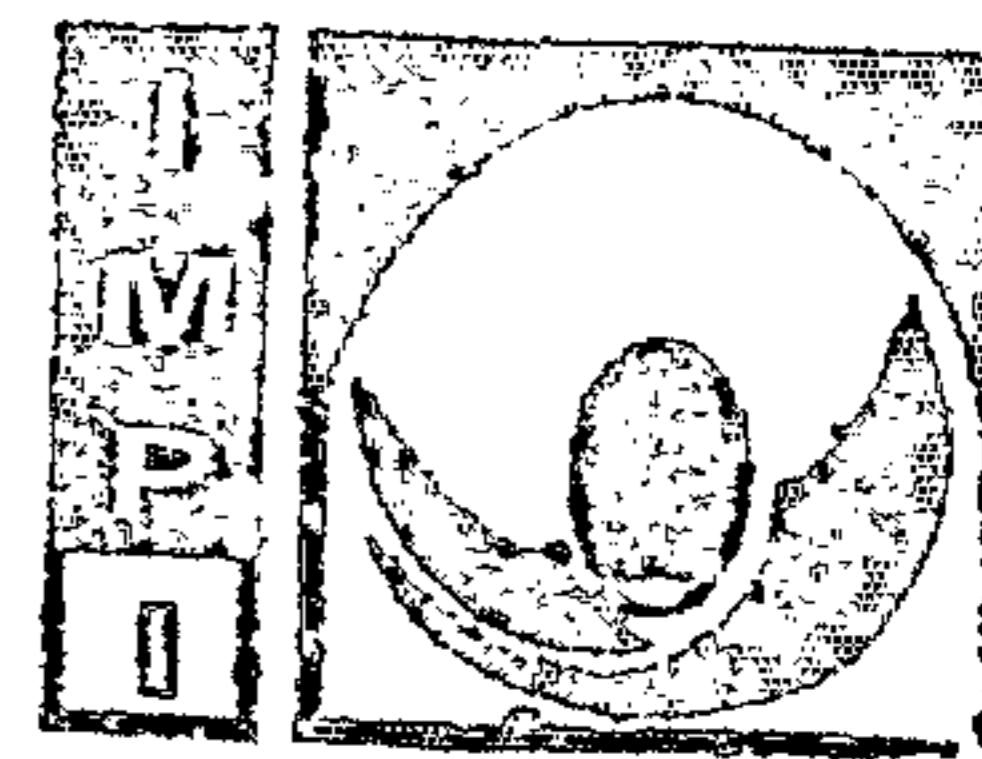


daltones contra agua destilada (50 volúmenes) para eliminar sales y otros compuestos de bajo peso molecular que pudieran tener efecto vasoconstrictor. Para ello, el extracto EPc se colocó dentro de un tubo de diálisis de la membrana antes

indicada y el tubo de diálisis conteniendo el extracto se incluyó en un vaso de precipitados conteniendo agua destilada a 4°C, montado sobre una placa de agitación Corning (Corning, NY, U.S.A.). El agua destilada del vaso de precipitados se cambió regularmente por agua destilada fresca hasta alcanzar el equivalente a 50 volúmenes del extracto para promover la salida de sales y otros compuestos de bajo peso molecular del tubo de diálisis.

Posteriormente el extracto dializado (EPcd) se trató con carbón activado para purificar adicionalmente la actividad vasorelajante. Para ello, 50 ml del extracto dializado EPcd se incubaron por 12 h con 2% de carbón activado (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, U.S.A.) a 4°C con agitación constante sobre una placa de agitación Corning (Corning, NY, U.S.A.). Al cabo de la incubación, la muestra se sedimentó por centrifugación (13,000g, 20 min) en una centrífuga Sorvall RC5C Plus (Kendro Laboratory Products; Asheville, NC, U.S.A.) y se recuperaron por separado el sobrenadante (SN-EPcd/CA) y el carbón activado.

El carbón activado recuperado del paso previo se resuspendió en agua destilada estéril y se incubó a baño maría por 15 min. con temperaturas en el intervalo de 50 a 100°C, o bien con solución de Krebs con valores de pH entre 3 y 12, para recuperar la fracción vasorelajante del muérdago (FVRM).



Las distintas preparaciones de *Psittacanthus calyculatus* (EPc, EPcd, SN-EPcd/CA y FVRM) se esterilizaron por filtración a través de membranas con tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Ireland) previamente a su uso en los ensayos experimentales de citotoxicidad, vasorelajación y efectos cardiotrópicos.

5                   Asimismo, las principales etapas de elaboración de la fracción vasorelajante del muérdago se monitorearon mediante análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) empleando un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 y una columna Synergy Hydro RP (250 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 4  $\mu\text{M}$ ). De estos análisis se obtuvieron los perfiles cromatográficos de los diferentes

10    pasos de obtención del fitofármaco antihipertensivo derivado de muérdago detectados a 254 nm. Las figuras 1 a 3 muestran los perfiles cromatográficos de los principales pasos de obtención de la Fracción Vasorelajante de Muérdago, registrados a una longitud de onda de 254 nm a fin de visualizar la mayor parte de los compuestos presentes en las preparaciones. La figura 1 muestra que EPcd contiene

15    compuestos (picos) con bajos tiempos de retención en la columna, indicativos de compuestos con pesos moleculares mayores de 1,000 Da, lo que se explica por la diálisis a que se sometió la preparación. Dichos compuestos son retenidos casi en su totalidad en el carbón activado pues no se observan en la fracción sobrenadante de éste (SN-EPcd/CA) (Ver figura 2). Estos compuestos se recuperaron casi en su

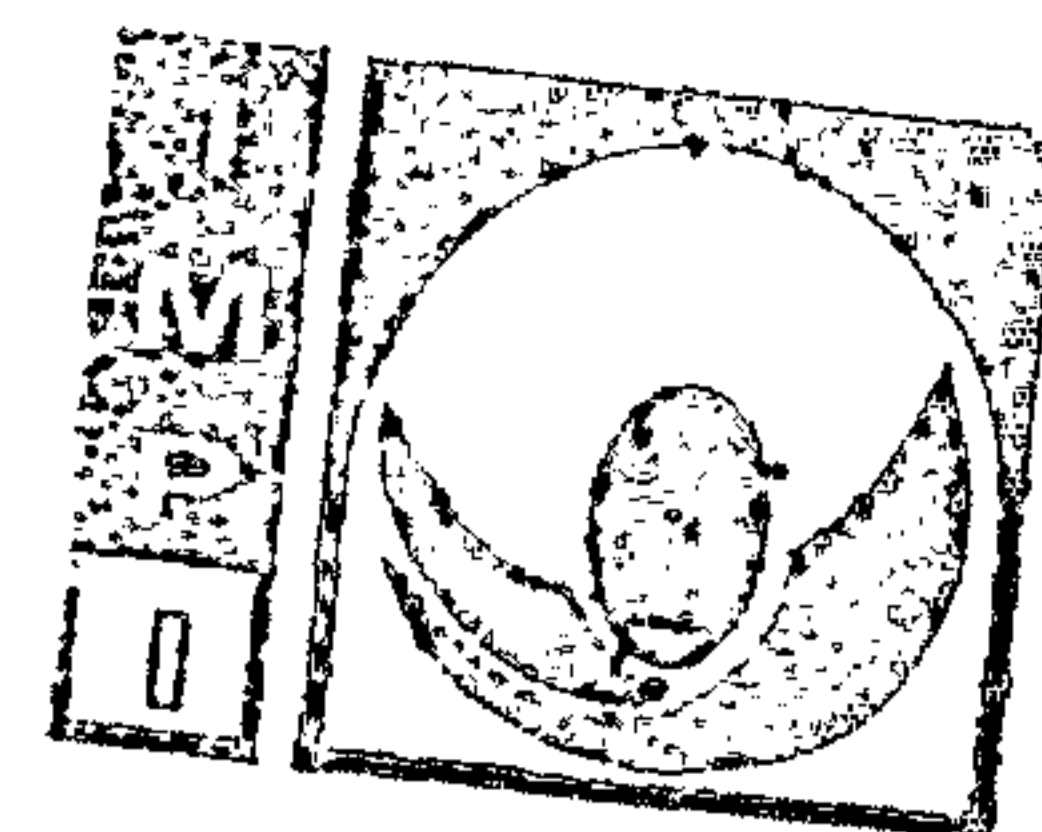
20    totalidad por ebullición del carbón activado pues reaparecen en el perfil de la fracción vasorelajante del extracto de muérdago (FVRM) (ver figura 3).



**Ejemplo 3. El Extracto Hidrosoluble Crudo de *Psittacanthus calyculatus* carece de Efectos Citotóxicos sobre Células Humanas en Cultivo**

Previamente a la evaluación de los posibles efectos vasorelajantes de las preparaciones de *Psittacanthus calyculatus*, nosotros evaluamos los efectos citotóxicos del extracto acuoso crudo EPC. Para ello, células HeLa (epiteliales humanas) se inocularon en placas de 24 pozos (Costar; Corning, NY, USA) a una densidad de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco BRL, Grand Island, NY, U.S.A.) adicionado con 7% de suero de ternera (HyClone; Logan, UT, U.S.A.) (medio basal; MB) y se incubaron a 37°C y en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 48 h, los cultivos se trataron con diferentes concentraciones del extracto acuoso crudo de *Psittacanthus calyculatus* (EPC) adicionadas al MB, y la supervivencia celular se evaluó mediante recuentos celulares en hematímetro, realizados en los días señalados en la figura 4 Como se muestra en esta figura (Los resultados se presentan como los valores medios  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes), ninguna de las concentraciones de EPC ensayadas afectó la densidad celular final, comparadas con el tratamiento control (MB), lo que prueba que dicha preparación carece de efectos citotóxicos sobre este linaje de células humanas.

**Ejemplo 4. Preparaciones Hidrosolubles de *Psittacanthus calyculatus* poseen Efectos Vasorelajantes**

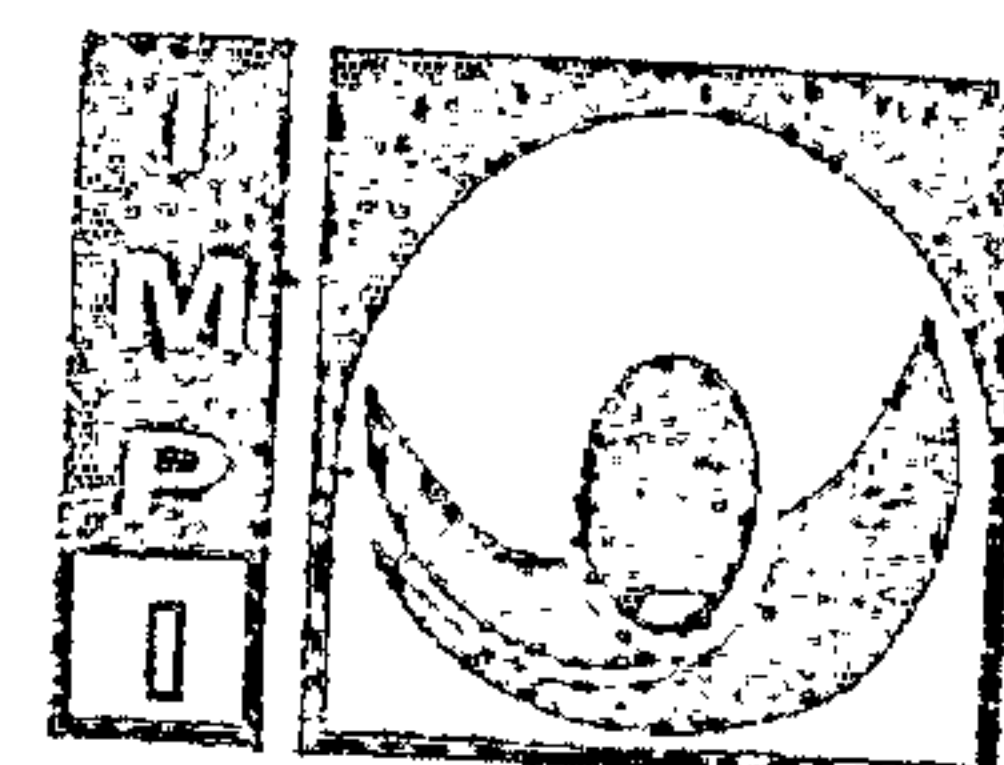


Las pruebas de vasorelajación de las distintas preparaciones de *Psittacanthus calyculatus* se realizaron sobre anillos aórticos de cobayo macho adulto de la cepa Hartley, con peso de 600 a 700 g.

5 Previamente a su uso experimental, los animales se mantuvieron con libre acceso a comida y agua, expuestos a ciclos de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Para su uso experimental, los animales se sacrificaron con una dosis letal de 0.063g/kg de peso de pentobarbital sódico (Pfizer). Luego de que los animales perdieron el reflejo ocular, se disecó la arteria aorta, la cual se limpió de tejido adiposo y conectivo. La aorta se cortó transversalmente en anillos de 2 mm de longitud, evitando dañar el endotelio.

10 Los anillos aórticos de cobayo se montaron en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs (NaCl 128 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.17 mM, NaHCO<sub>3</sub> 14.9 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.11 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.1 mM, 5 g/L dextrosa) conectados a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo Grass 7D (Grass Instruments Co.; Quincy, Mass, USA). A los órganos se les aplicó una tensión inicial de 625 mg y luego de 30 min. de estabilización, se indujo su contracción aplicando a la solución de Krebs 5 μM de noradrenalina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, U.S.A.).

20 Sobre estos órganos precontraídos se ensayaron las propiedades vasorelajantes de las preparaciones de *Psittacanthus calyculatus* EPC, EPcd, SN-EPcd/CA y FVRM. En algunos experimentos se adicionó al ensayo NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, U.S.A), un inhibidor de la sintetasa del óxido nítrico, o nitroprusiato de sodio (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, U.S.A.), un



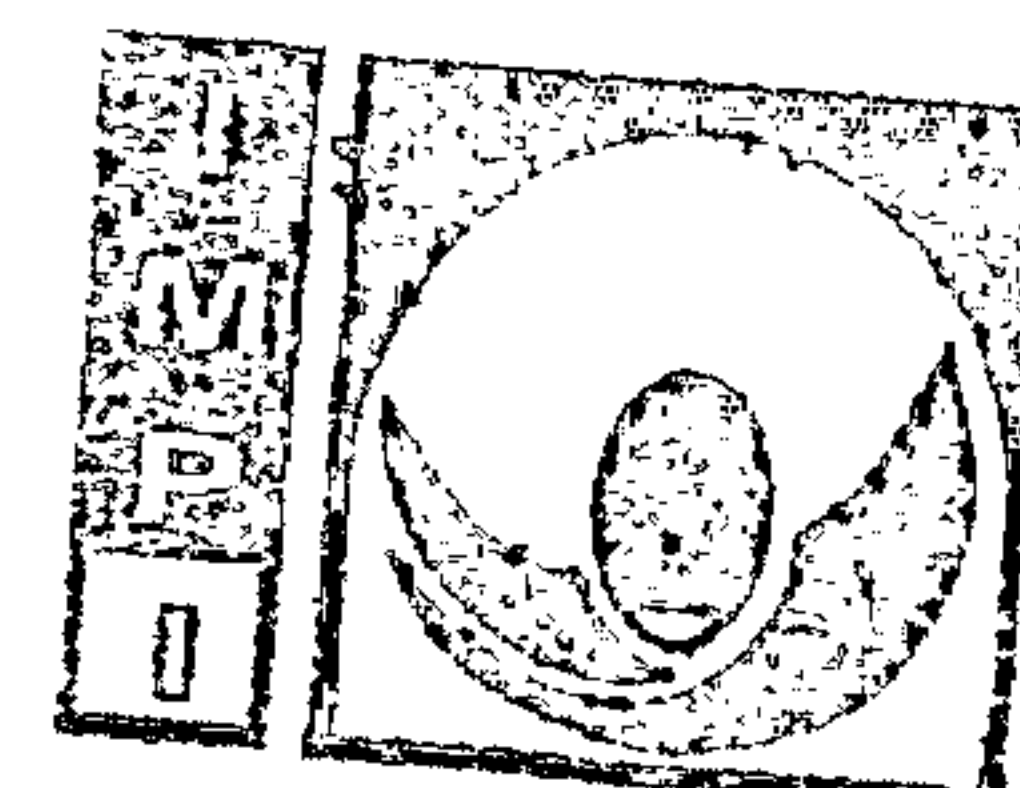
donador de óxido nítrico. En otros experimentos el endotelio se removió frotando el interior del anillo aórtico con un palillo de madera para analizar su papel en el efecto

vasorelajante de las preparaciones de *Psittacanthus calyculatus*. La señal poligráfica producida por la contracción y relajación de los anillos aórticos se procesó a través de un sistema de adquisición de datos consistente del convertidor analógico/digital PolyVIEW versión 2.5 (Grass Product Group; West Warwick, RI, U.S.A.) y los datos se almacenaron en una computadora para su análisis.

Como se muestra en la figura 5, el extracto acuoso de la *Psittacanthus calyculatus* (EPc) ejerció un claro efecto vasorelajante, dependiente de la concentración, sobre los anillos aórticos de cobayo previamente contraídos con noradrenalina (5  $\mu$ M). La figura 5 A muestra que EPc a la concentración de 1.25% indujo un 40% de relajación en los anillos aórticos. La figura 5 B muestra que EPc aplicado al 2.5% indujo un 60% de relajación. La figura 5 C muestra que EPc aplicado al 5% indujo un 70% de relajación, y la figura 5 D muestra que EPc aplicado al 10% indujo un 80% de relajación en los anillos aórticos. Las figuras son representativas de seis ensayos independientes para cada concentración de EPc probada.

El efecto vasorelajante del extracto EPc se probó también a diferentes concentraciones sobre una misma preparación de anillo aórtico de cobayo. Como se muestra en la figura 6, el anillo aórtico precontraído con noradrenalina 5  $\mu$ M se relajó en forma creciente en respuesta al incremento en la concentración del EPc. La aplicación de EPc a la concentración de 1.25% indujo un 33 % de relajación en los anillos aórticos. La elevación de la concentración de EPc al 2.5% indujo un 66% de

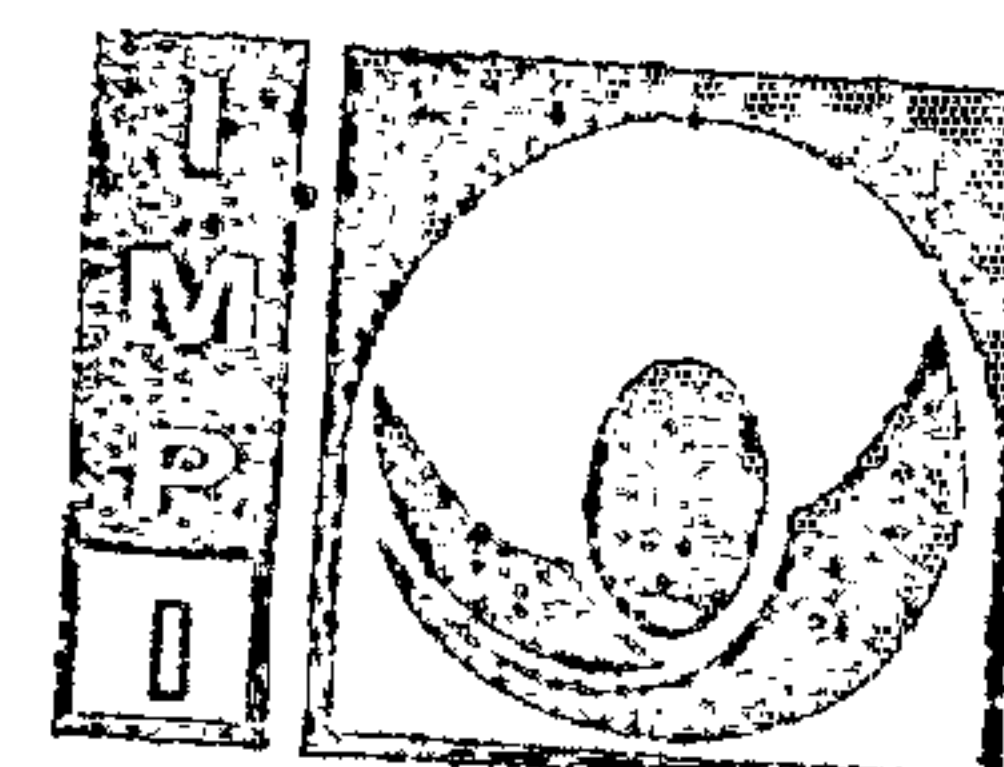




relajación. La elevación de la concentración de EPc al 5% indujo un 83% de relajación y la elevación en la concentración de EPc al 10% indujo un 92% de relajación en los anillos aórticos. La gráfica es representativa de seis experimentos independientes.

Tanto en este experimento como en el anterior, los anillos aórticos tratados con el extracto EPc se lavaron con solución de Krebs y luego de esto se les aplicó nuevamente noradrenalina para comprobar el estado del anillo; la respuesta contráctil se mantuvo en todos los casos, lo cual evidenció la ausencia de daño en el tejido aórtico por la aplicación de EPc.

En los ensayos anteriores se observó un incremento variable y transitorio de la contracción en los anillos aórticos inducida por la aplicación del EPc. Dado que tal contracción puede deberse a la presencia de iones potasio en el extracto, dializamos el extracto EPc contra agua destilada a través de una membrana con tamaño de poro de 1,000 daltones, con lo que la concentración de potasio en el extracto dializado (EPcd) pasó de 122 mEq/L a 0.5 mEq/L. Tras la eliminación del potasio, así como de otros componentes de bajo peso molecular del EPc, el efecto vasorelajante del EPcd mejoró notablemente. En la curva de respuesta mostrada en la Figura 7, una concentración tan baja como 0.16% (v/v) del EPcd ocasionó una relajación del órgano del 27%, aunque con una caída lenta pero significativa. Con el 0.31% (v/v) obtuvimos una relajación del 67%, cuya caída fue más rápida y definida. Con 0.63% (v/v) y 1.25% (v/v) de EPcd el tejido se relajó en 86% y 90% respectivamente. Así, la diálisis del extracto de muérdago elevó su potencia vasorelajante en 8 veces respecto al extracto no dializado.

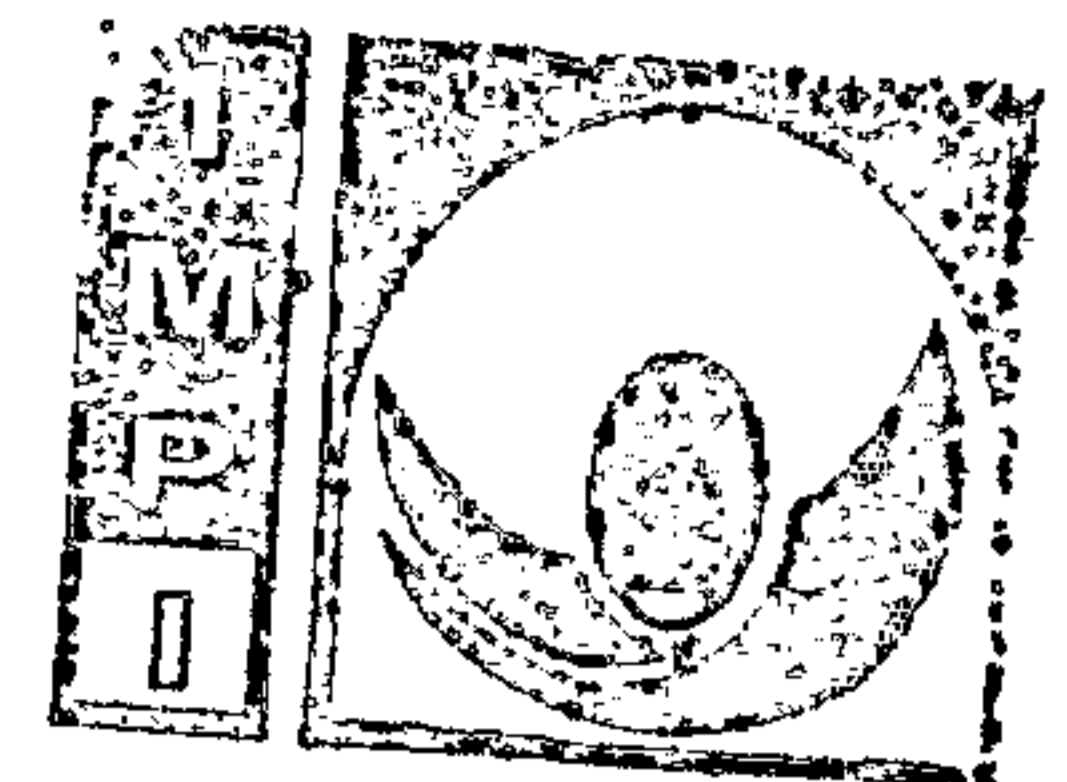


### Ejemplo 5. Mecanismos del Efecto Vasorelajante de Preparaciones

#### Hidrosolubles de *Psittacanthus calyculatus*

Un compuesto antihipertensivo puede ejercer sus efectos vasorelajantes actuando a través del endotelio o bien directamente sobre el músculo liso vascular. Por ello, para caracterizar los mecanismos de la acción vasorelajante de las preparaciones de *Psittacanthus calyculatus*, ensayamos sus efectos sobre anillos aórticos sin endotelio. La remoción del endotelio del anillo aórtico abolió el efecto vasorelajante del EPcd, como lo muestra la ausencia de relajación del anillo aórtico tratado con EPcd al 1.25% (Figura 8). Este resultado indica que el extracto dializado EPcd ejerce sus efectos vasorelajantes actuando sobre el endotelio vascular.

Una de las principales vías vasorelajantes que trabajan a través del endotelio involucra la sintetasa del óxido nítrico. En esta vía, el óxido nítrico producido por la sintetasa del óxido nítrico de las células endoteliales difunde a las células de músculo liso y estimula la síntesis de GMPc, dando como resultado la relajación del vaso sanguíneo. A fin de determinar si el EPcd actúa a través de la sintetasa del óxido nítrico, indujimos la contracción de los anillos aórticos de cobayo en ausencia y en presencia de 600  $\mu$ M de NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor competitivo de la sintetasa del óxido nítrico. La aplicación de 1.25% del EPcd a anillos aórticos precontraídos en ausencia de L-NAME indujo una relajación de los órganos de aproximadamente el 90%, (Figuras 9 A ), confirmando los resultados



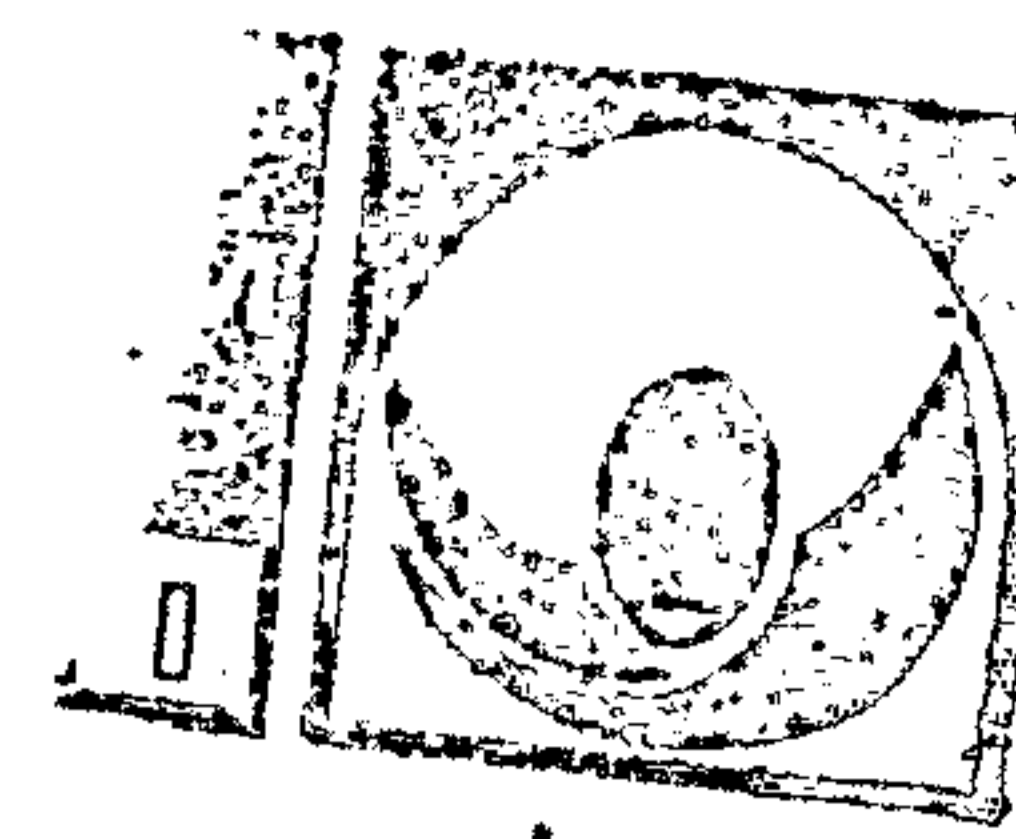
anteriormente obtenidos (Figuras 6 y 7). Por el contrario, la presencia del inhibidor sintético del óxido nítrico canceló el efecto vasorelajante del EPcd (figura 9B).

Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

La participación del óxido nítrico en el efecto vasorelajante del EPcd se evaluó adicionalmente comparando los efectos de esta preparación y los del nitroprusiato de sodio, un compuesto donador de óxido nítrico (Moncada S, Palmer R, Higgs EA. 1988. Hypertension 12:365-372), sobre anillos aórticos carentes de endotelio. En estos experimentos, anillos aórticos carentes de endotelio, precontraídos con noradrenalina, no mostraron relajación apreciable cuando se trataron con 10% de EPcd, pero sí mostraron una relajación total (100%) cuando se les aplicó 0.1  $\mu$ M de nitroprusiato de sodio (Figura 10).

**Ejemplo 6. Purificación Adicional de los Extractos Hidrosolubles de *Psittacanthus calyculatus* con Efectos Vasorelajantes para obtener una Fracción Vasorelajante de Muérdago (FVRM)**

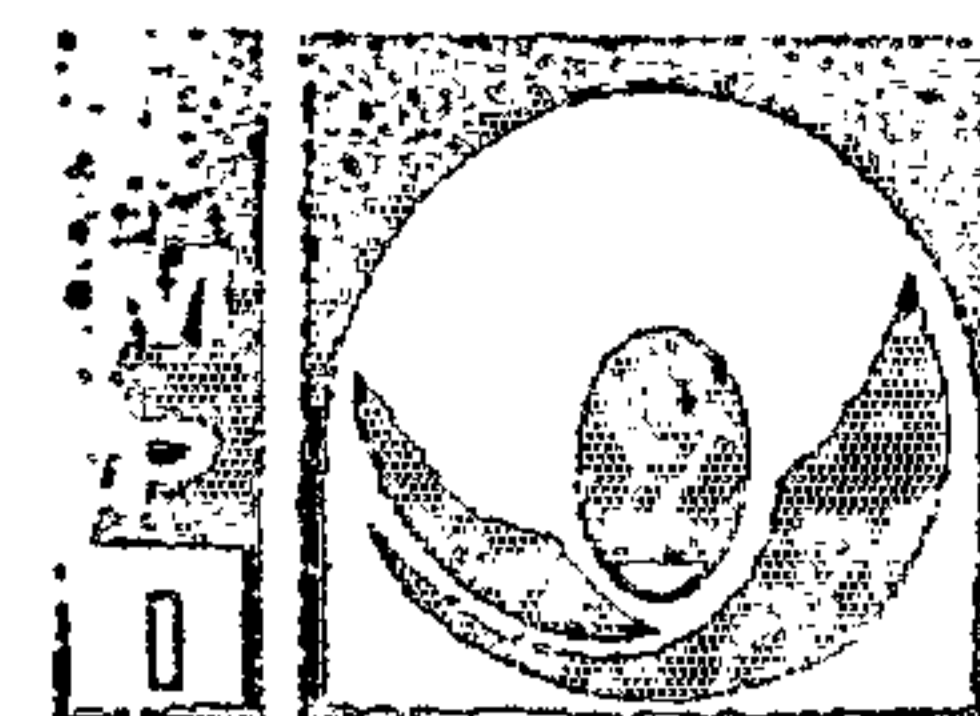
Para purificar adicionalmente la actividad vasorelajante presente en EPcd, este extracto se incubó durante 12 h con 2% de carbón activado a 4 °C con agitación constante. Al cabo de la incubación, la muestra se sedimentó por centrifugación (13,000g, 20 min) y el sobrenadante (SN-EPcd/CA) se ensayó sobre anillos aórticos de cobayo precontraídos con noradrenalina 5  $\mu$ M. La aplicación del sobrenadante del EPcd tratado con carbón activado (SN-EPcd/CA) a los anillos aórticos no indujo relajación alguna de estos órganos (Figura 11), lo que indicó que la actividad vasorelajante del extracto EPcd fue retenida por el adsorbente.



El adsorbente recuperado del tratamiento del extracto EPcd se resuspendió en agua destilada estéril y se incubó en baño maría a 100°C por 10 min.

El ebullición se sedimentó y el sobrenadante, la fracción vasorelajante del muérdago (FVRM), a temperatura ambiente, se aplicó a anillos aórticos precontraídos con noradrenalina 5  $\mu$ M. Los órganos así tratados mostraron un claro grado de relajación (Figura 12), no observado con el sobrenadante del tratamiento con carbón activado (SN-EPcd/CA). Como se muestra en la figura 12 A anillos aórticos precontraídos con noradrenalina no mostraron relajación al tratarse con SN-EPcd/CA, el sobrenadante del EPcd tratado con carbón activado. No obstante, cuando estos anillos aórticos se lavaron para eliminar el SN-EPcd/CA y se contrajeron con una nueva dosis de noradrenalina, pudieron relajarse totalmente por la aplicación de el ebullición del carbón activado, la fracción vasorelajante del muérdago, (FVRM) (Figura 12B). La recuperación de la actividad vasorelajante se confirmó en experimentos adicionales en los que anillos aórticos precontraídos con noradrenalina y relajados con la fracción FVRM (Figura 12C), fueron incapaces de relajarse por el tratamiento adicional con SN-EPcd/CA posterior a la contracción con noradrenalina (Figura 12D).

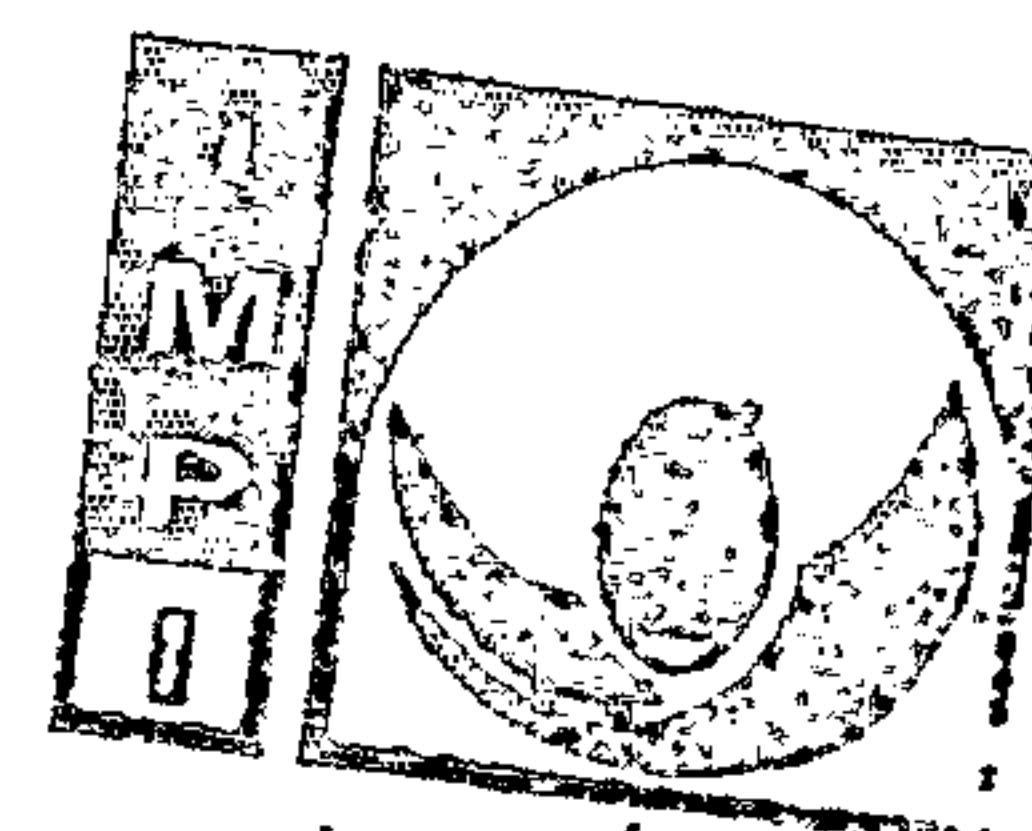
En otra serie de experimentos ensayamos la posibilidad de recuperar la actividad vasorelajante tratando el carbón activado con temperaturas de 50°C y 75°C. Las fracciones recuperadas por los tratamientos a estas temperaturas mostraron una capacidad vasorelajante menor, 28% y 40% respectivamente, en comparación a la actividad de la fracción recuperada por el tratamiento del carbón activado a 100°C (Figuras 13A y 13B).



**Ejemplo 7. Ausencia de Efectos Cardiotrópicos en la Fracción Vasorelajante de *Psittacanthus calyculatus***

La posibilidad de que las preparaciones de *Psittacanthus calyculatus* EPcd, SN-EPcd/CA y FVRM pudieran afectar el funcionamiento cardiaco se evaluó mediante ensayos de Langendorff. En estos experimentos, corazones de cobayo macho adulto (500 g de peso) se aislaron y se perfundieron por el método de Langendorff, montados en un vaso de órgano aislado con 5 ml de solución de Krebs (NaCl 128 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.17 mM, NaHCO<sub>3</sub> 14.9 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.11 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.1 mM, 5 g/L dextrosa). Los órganos se conectaron a un transductor de fuerza acoplado a un polígrafo Grass 7D (Grass Instruments Co.; Quincy, Mass, USA). Sobre estos órganos se probaron los efectos cardiotrópicos (presión y frecuencia cardiaca) del extracto dializado (EPcd), el sobrenadante del tratamiento de EPcd con carbón activado (SN-EPc/CA) y la fracción vasorelajante del muérdago (FVRM).

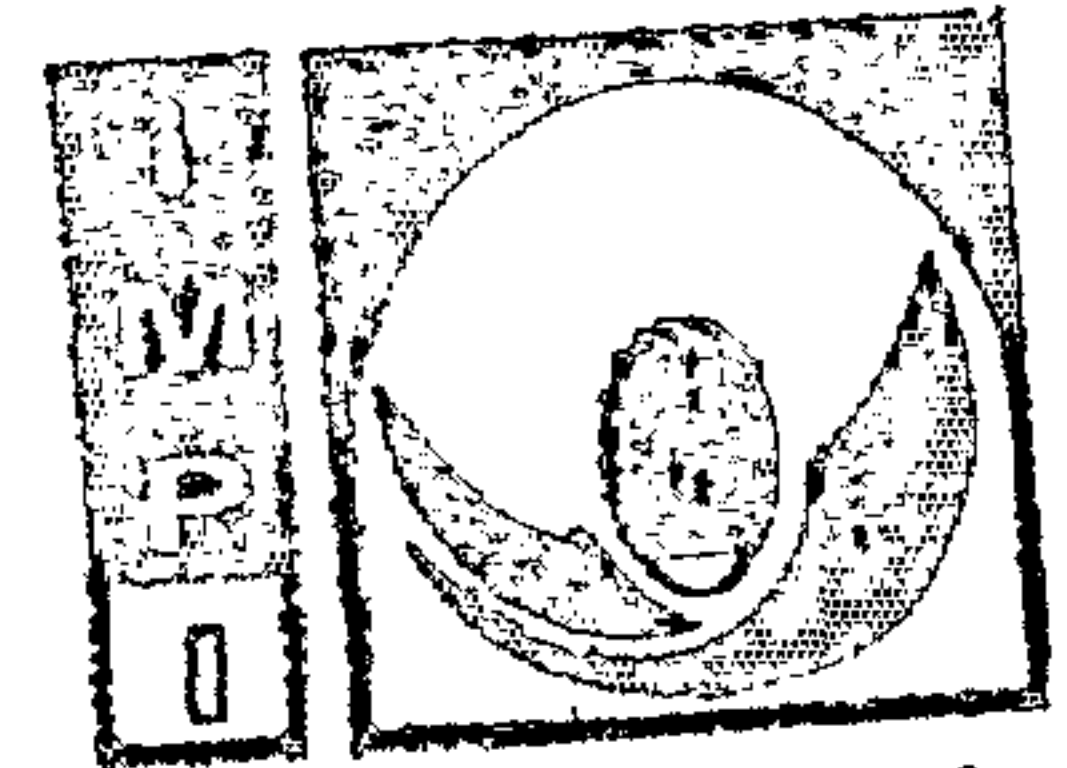
El extracto crudo de muérdago (EPcd) indujo una disminución del 51.72% en la presión cardiaca; la frecuencia cardiaca se mantuvo en 180 latidos por minuto (lpm) antes y después de la aplicación del extracto. Aplicaciones adicionales del EPc al órgano indujeron disminuciones en presión cardiaca de leves (6.7%) a moderadas (21.43% o 21.21%), sin afectar la frecuencia cardíaca. La actividad cardiodepresora no pudo ser retirada del extracto EPcd por el tratamiento con carbón activado. El sobrenadante del tratamiento de EPcd con el adsorbente (SN-EPcd/CA) retuvo la actividad cardiodepresora pues indujo fuertes disminuciones en la presión



cardiaca (51.72% o 40%) sin afectar la frecuencia cardíaca (180 lpm antes y después de la aplicación del SN-EPc/CA. Por el contrario la fracción vasorelajante del muérdago FVRM no afectó ni la presión cardíaca ni la frecuencia cardíaca cuando se aplicó a los órganos perfundidos. La figura 14 muestra un trazo representativo de uno de estos experimentos. En ella se observa que la presión cardíaca (trazo superior) y la frecuencia cardíaca (trazo inferior) se mantuvieron constantes en el órgano luego de la aplicación de la fracción FVRM. Este resultado prueba que el tratamiento del extracto EPcd con carbón activado elimina la actividad vasorelajante pero no la actividad cardiodepresora, lo que permite separar las dos actividades referidas del extracto acuoso de muérdago *Psittacanthus calyculatus* y recuperar posteriormente la actividad vasorelajante del carbón activado, como se muestra en la figura 12.

## NOVEDAD DE LA INVENCION

## REIVINDICACIONES



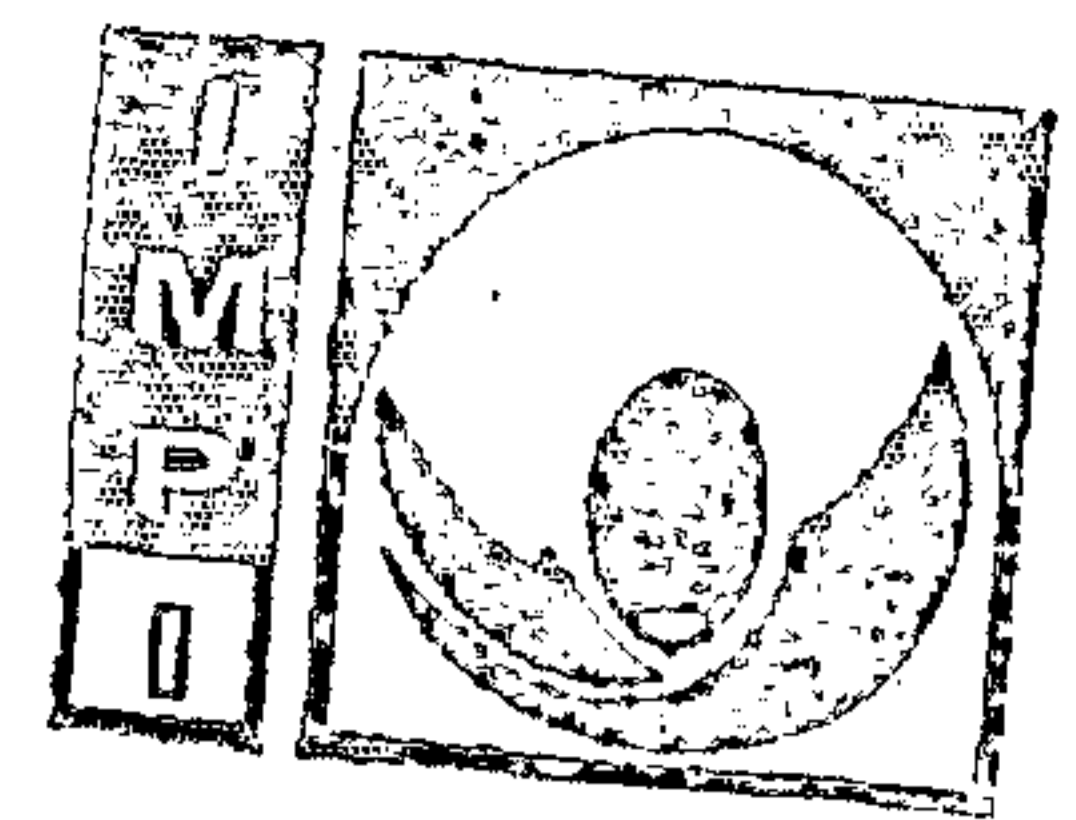
Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

1. Un Extracto de hojas de *Psittacanthus calyculatus* con  
5 propiedades vasorelajantes caracterizado porque tiene un perfil de elución a 254 nm  
como se muestra en la figura 1.

2. El extracto de hojas de *Psittacanthus calyculatus* de  
conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque es un extracto  
hidrosoluble, enriquecido en compuestos con peso molecular mayor a 1000 daltones,  
10 adsorbible en carbón activado y termoestable.

3. Un método para elaborar un extracto de *Psittacanthus  
calyculatus* con propiedades vasorelajantes, dicho método estando caracterizado  
porque comprende los pasos de:

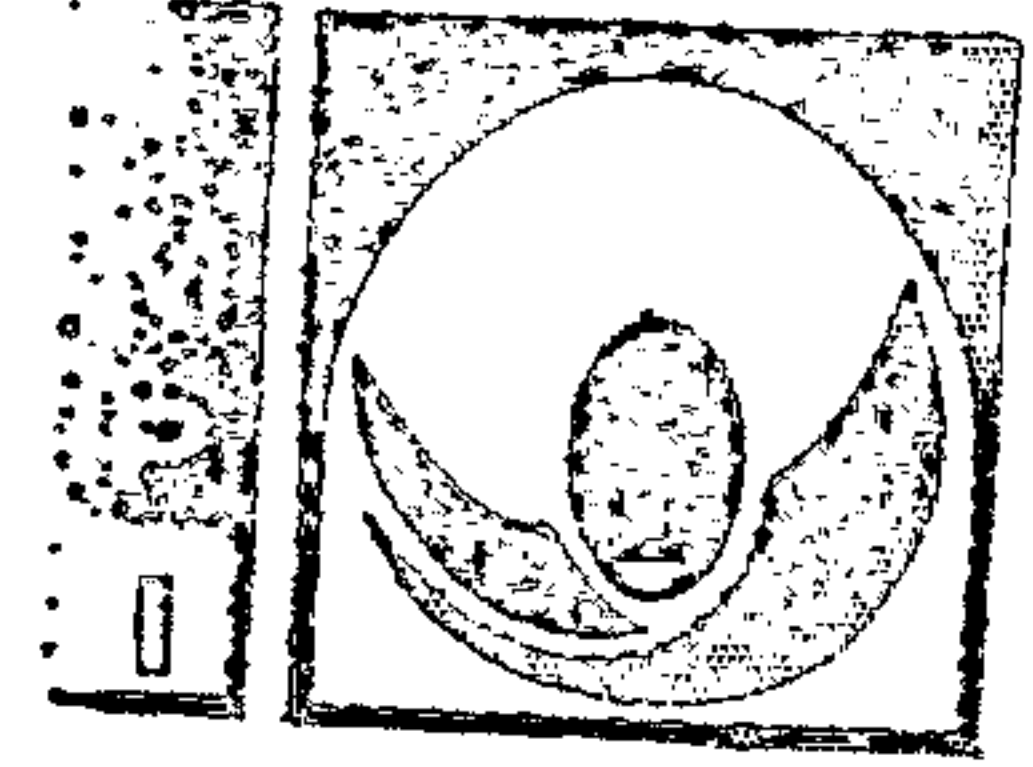
- a. Recolectar hojas de *Psittacanthus calyculatus* de un hospedero
- 15 b. Secar las hojas, molerlas y almacenar el polvo de hoja seca.
- c. Solubilizar el polvo de hojas secas en amortiguador de fosfatos  
con agitación constante y centrifugar
- d. Recuperar y dializar el sobrenadante
- e. Tratar la solución dializada con un adsorbente,
- 20 f. Centrifugar y recuperar el sedimento con el adsorbente
- g. Recuperar el extracto del adsorbente por métodos físicos y  
químicos simples como la ebullición o el uso de soluciones de pH definido.



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

4. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque el amortiguador de fosfatos usado como extrayente es una solución de KCl 2.7 mM, NaCl 0.14 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  4.3 mM.
5. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque la diálisis se realiza a través de una membrana con un tamaño de poro que permita el paso de moléculas de alrededor de 1,000 daltones.
6. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque el adsorbente es carbón activado
7. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque el extracto se separa del adsorbente en solución acuosa al calentarlo a una temperatura entre 50 y 100°C.
8. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque el extracto se separa del adsorbente con solución de Krebs con valores de pH de alrededor de 3 o 12.
9. El uso de un extracto de hojas de *Psittacanthus calyculatus* cómo el que se reclama en la reivindicación 1, para preparar una composición para el tratamiento de la hipertensión en mamíferos.



**RESUMEN DE LA INVENCION**

Instituto

Mexicano

de la Propiedad

Industrial

La presente invención está relacionada con extractos vegetales para el tratamiento de la hipertensión arterial; particularmente, la presente invención se

refiere a un extracto hidrosoluble, semipuro, de muérdago americano *Psittacanthus*

5 *calyculatus*, conformado por moléculas de tamaño mayor a 1000 daltones, adsorbible

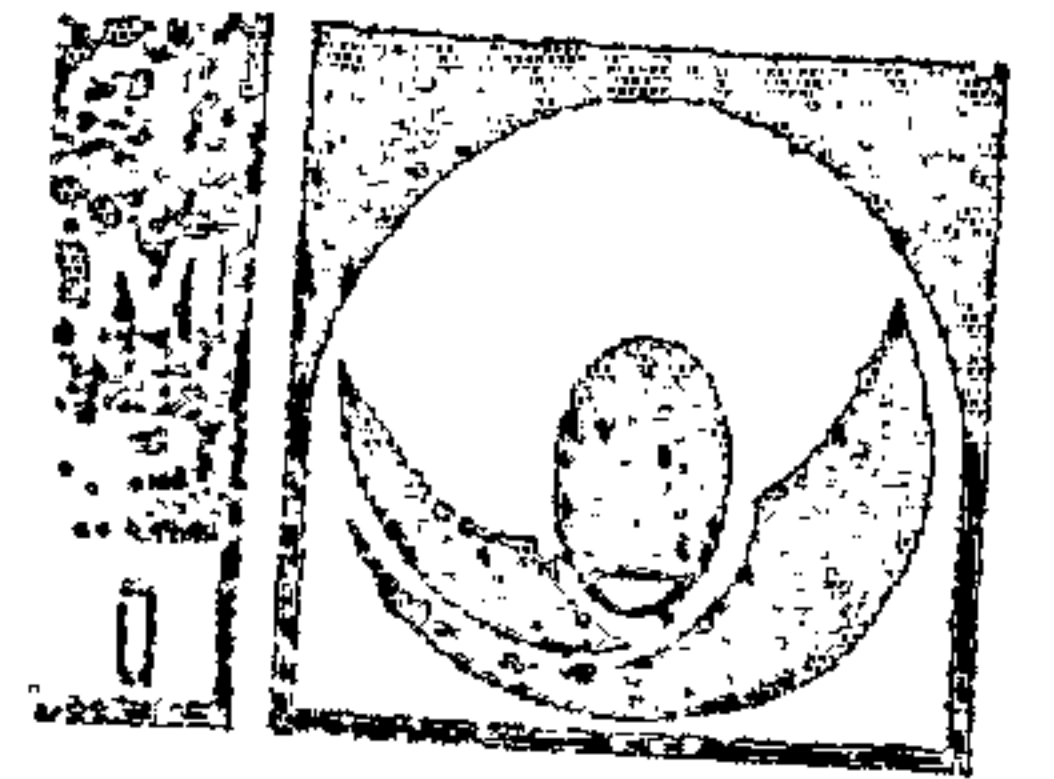
en carbón activado y termoestable. Se proporciona el método para su producción y

evidencia de que dicha preparación posee propiedades vasorelajantes, carece de

efectos citotóxicos y cardiotrópicos, y por tanto puede usarse en la preparación de

composiciones para el tratamiento de la hipertensión arterial en mamíferos.

10



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

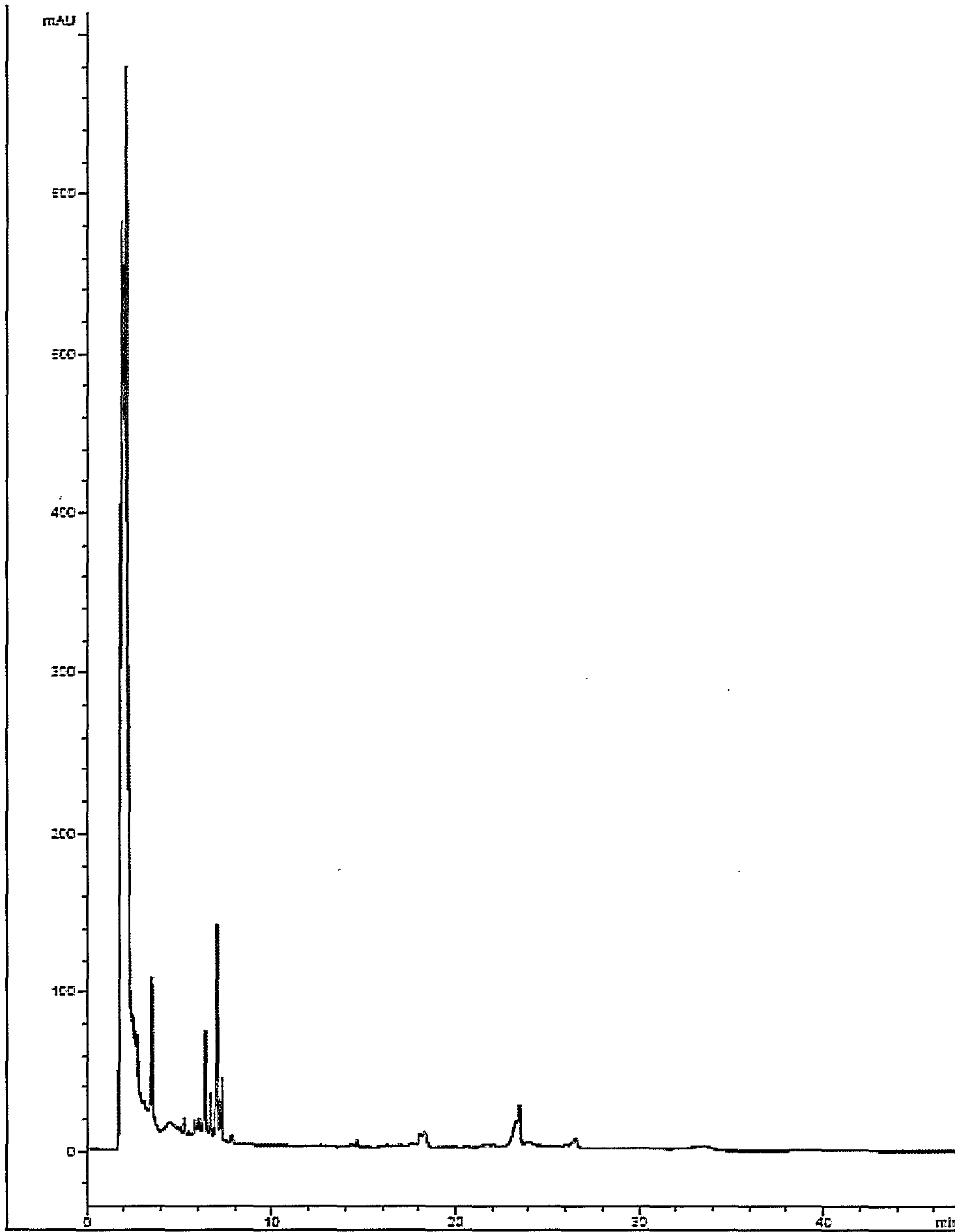


Figura 1

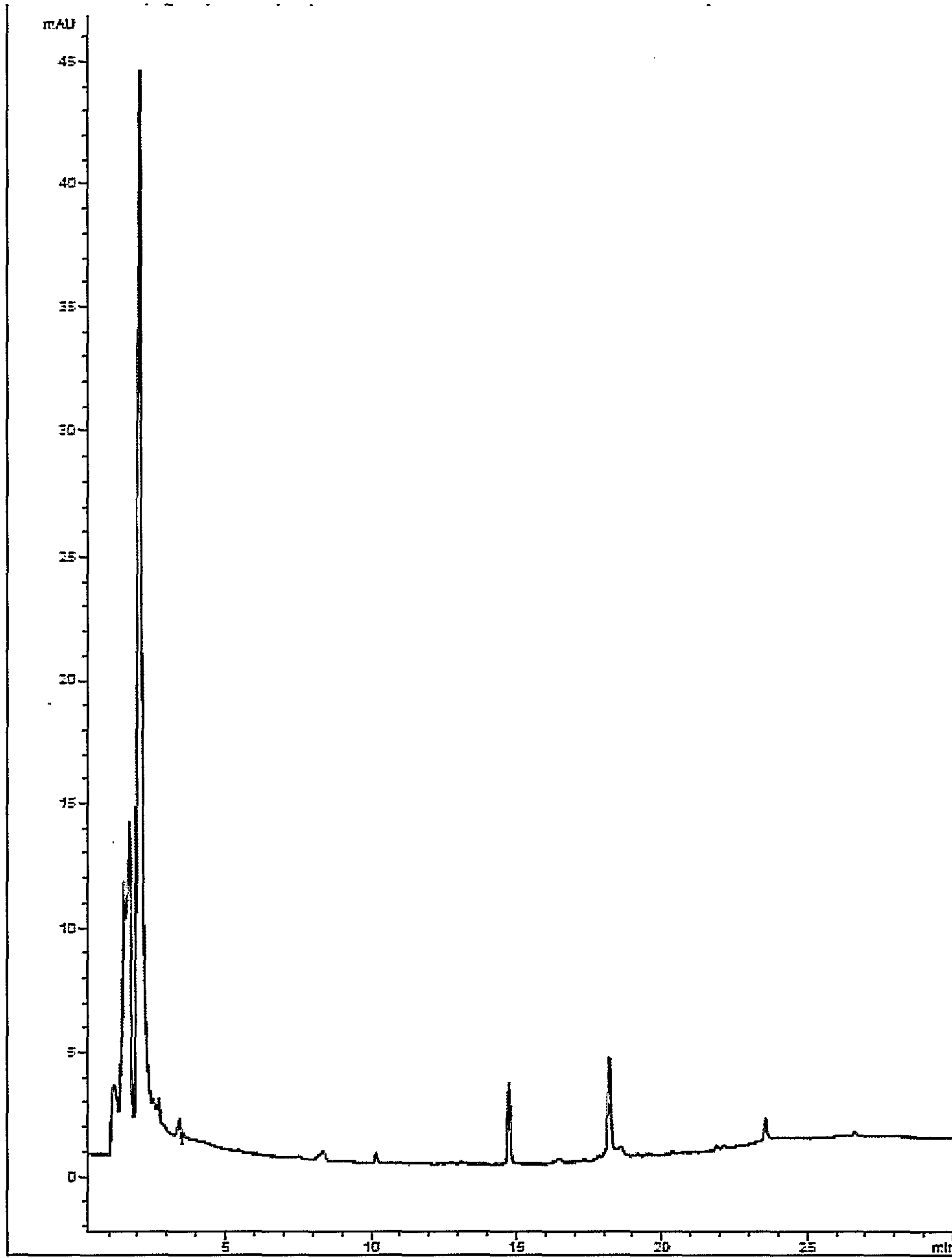


FIGURA 2

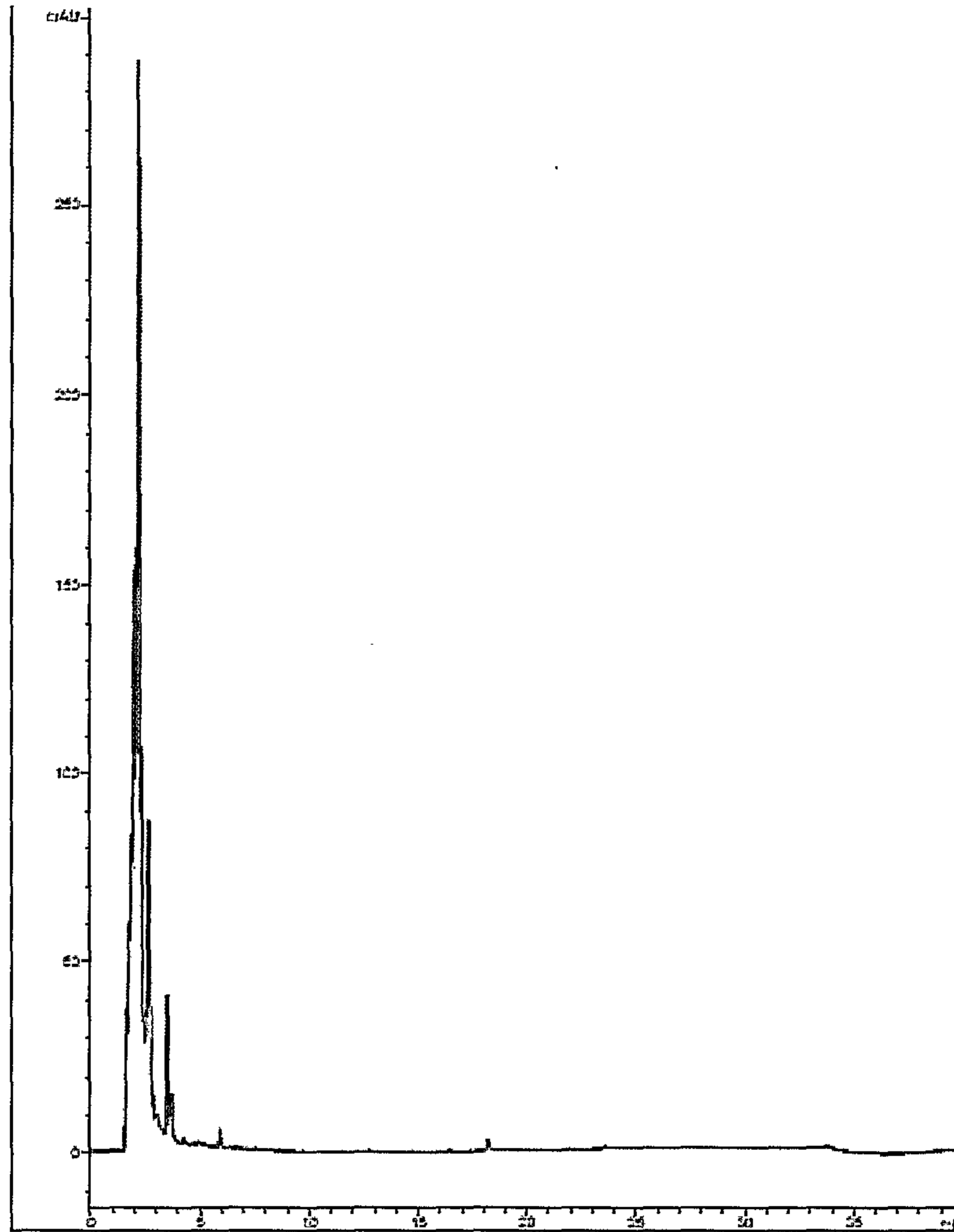


FIGURA 3

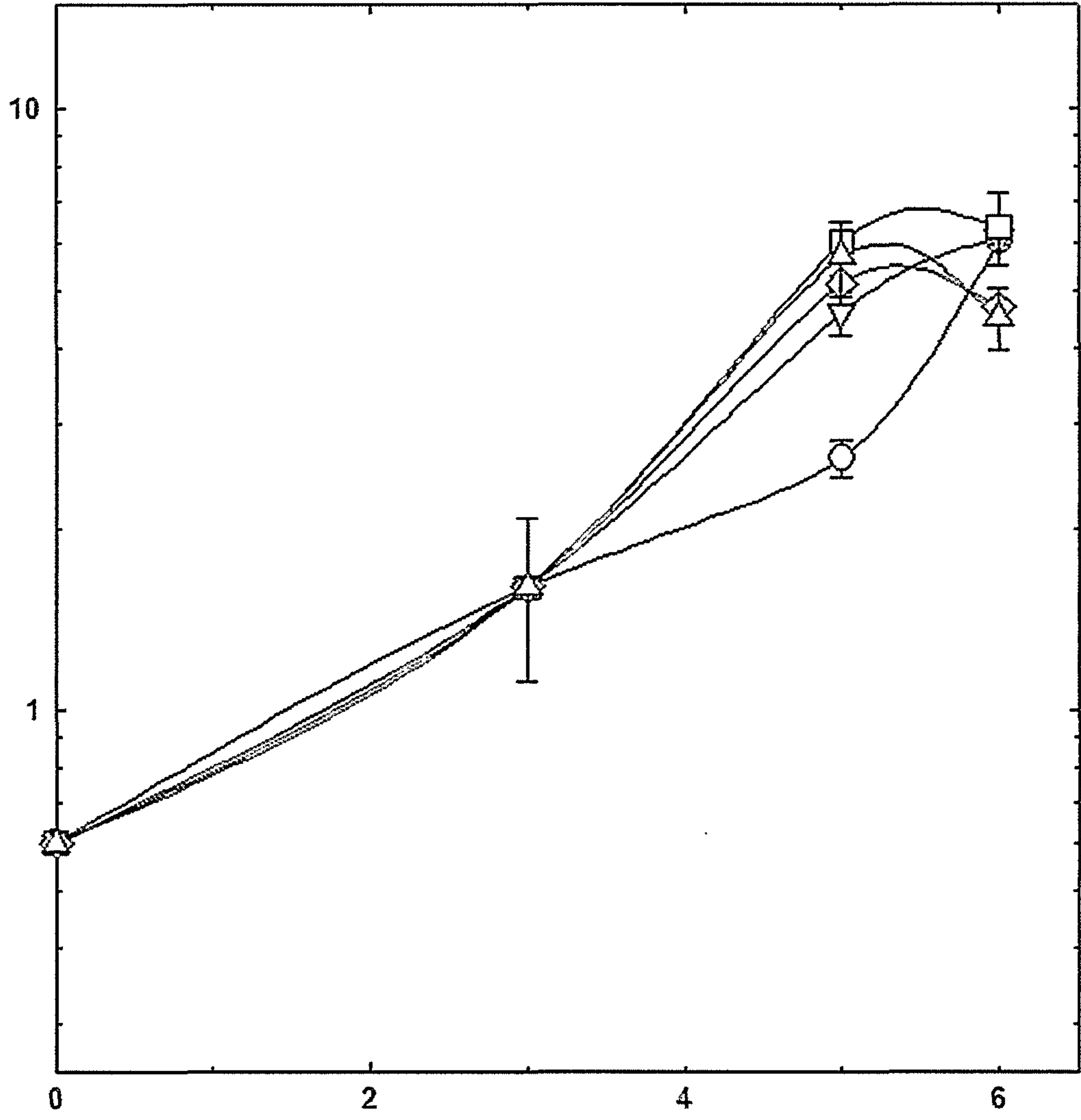
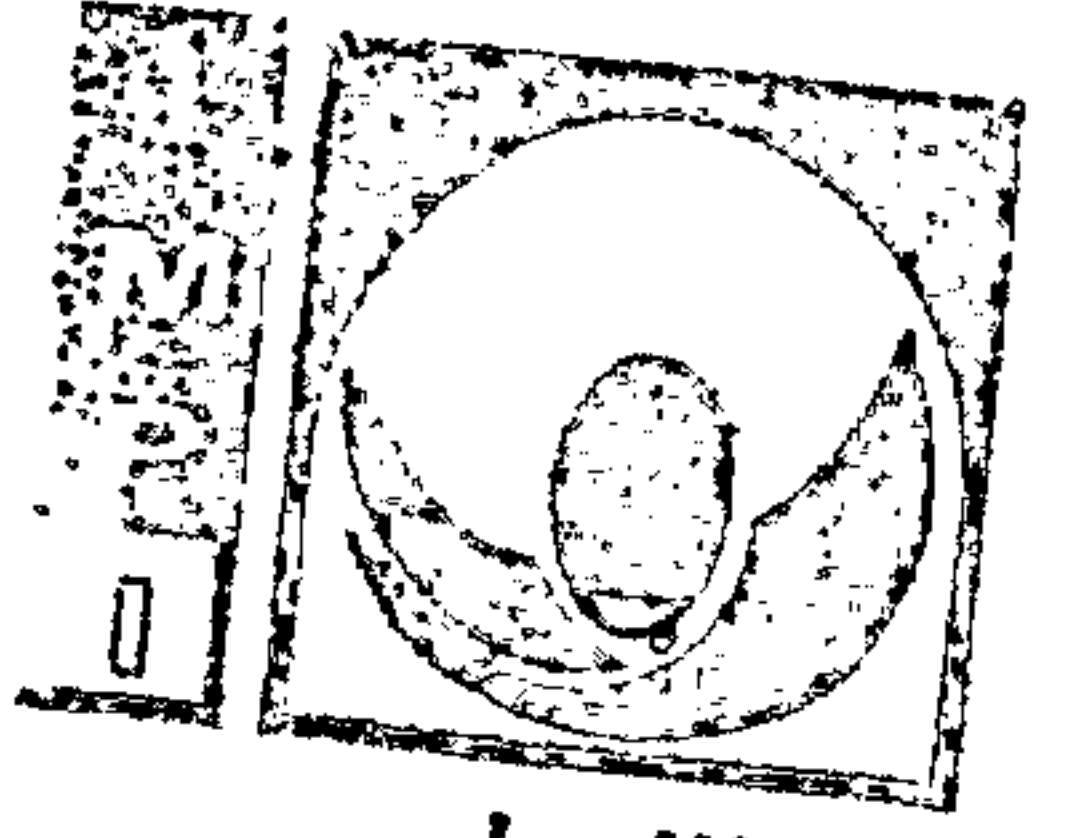


Figura 4



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

5/11

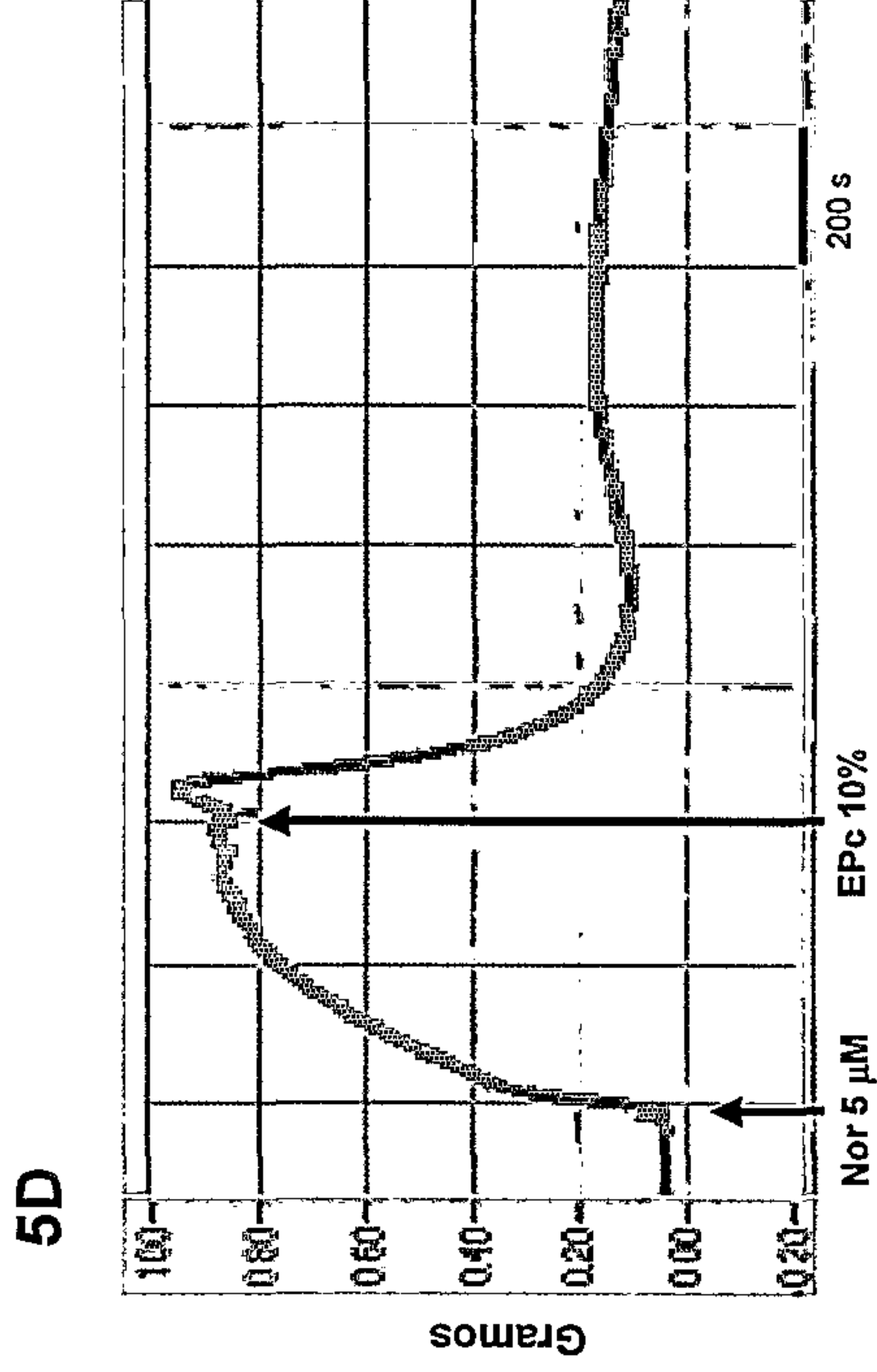
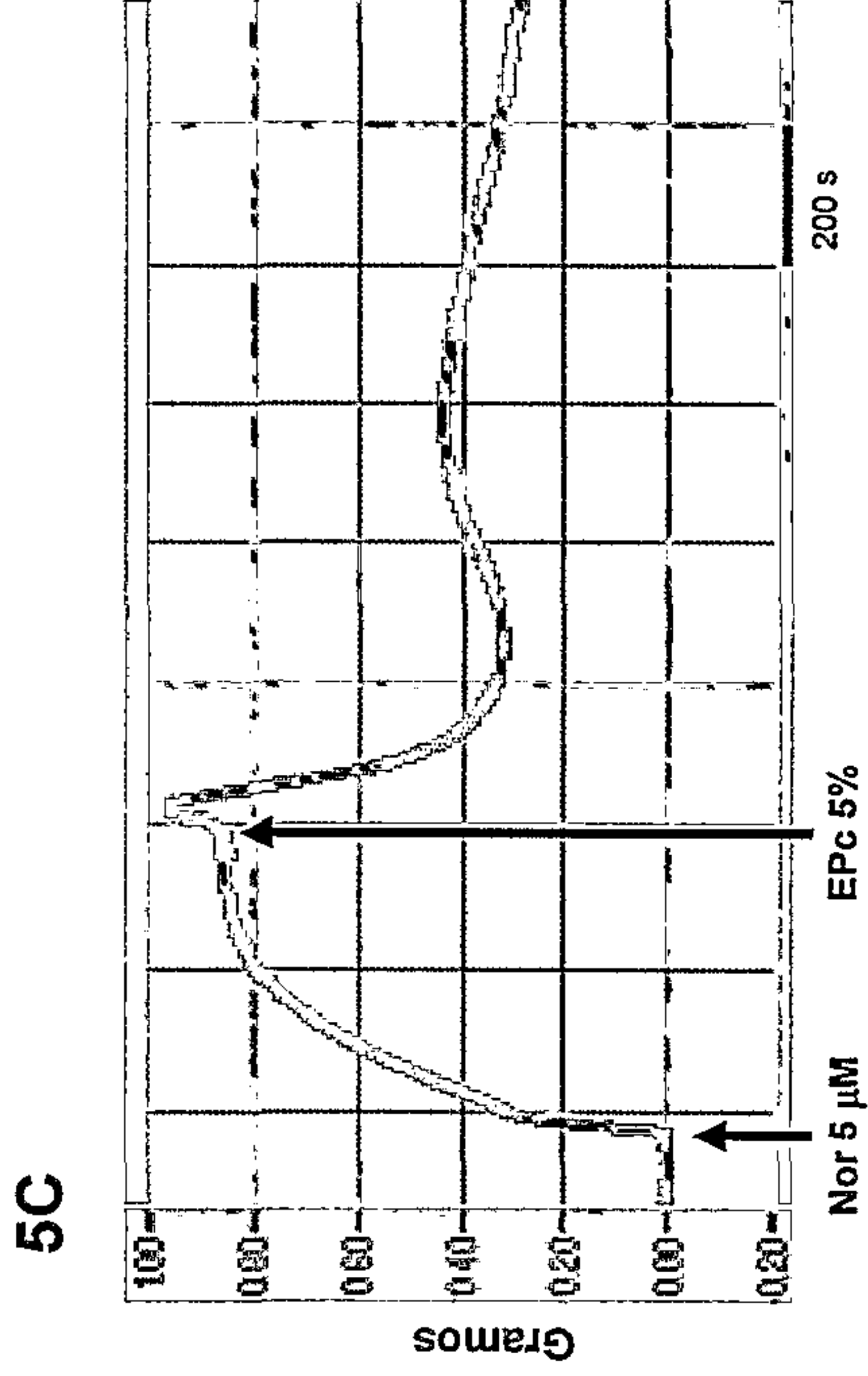
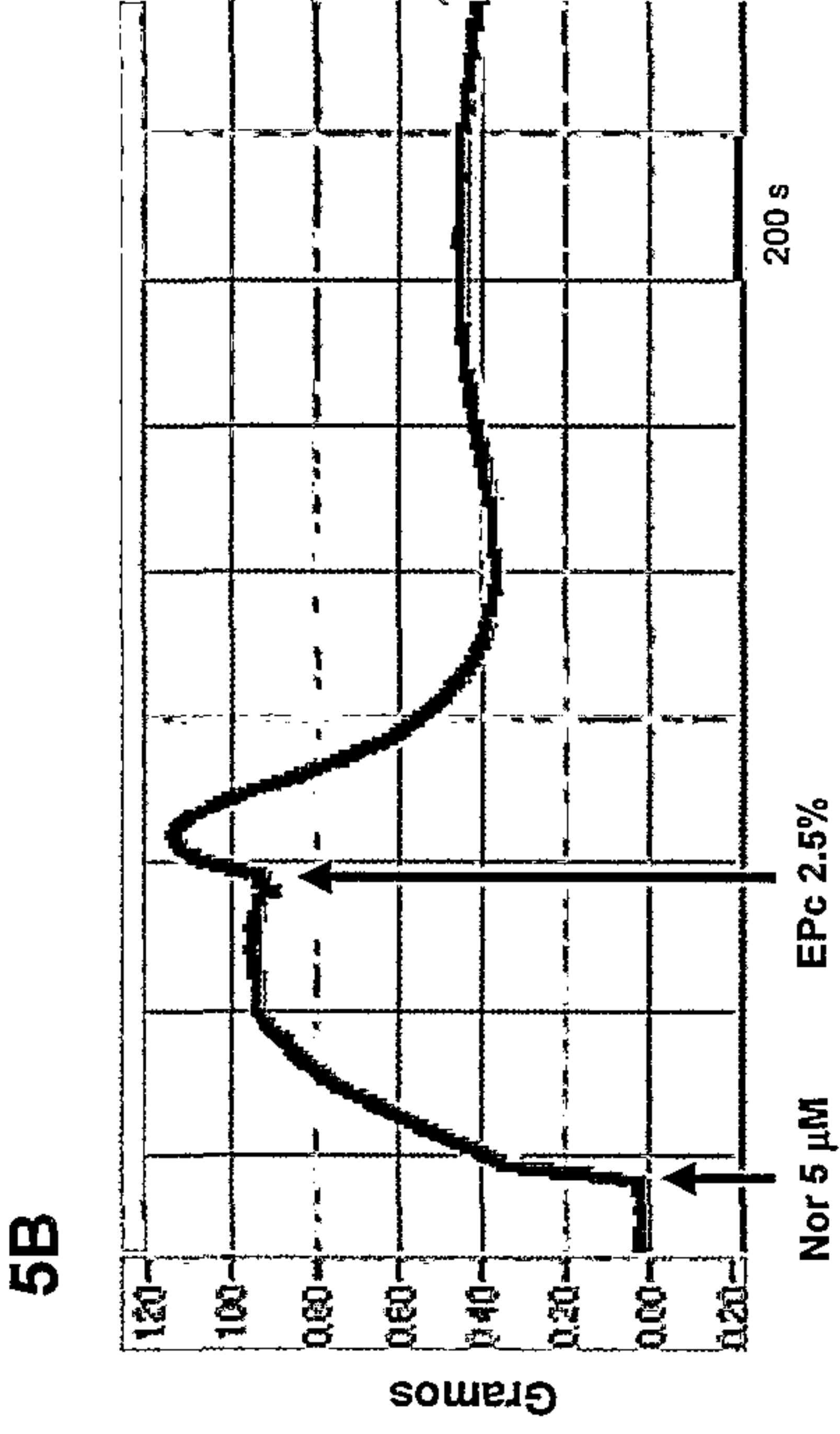
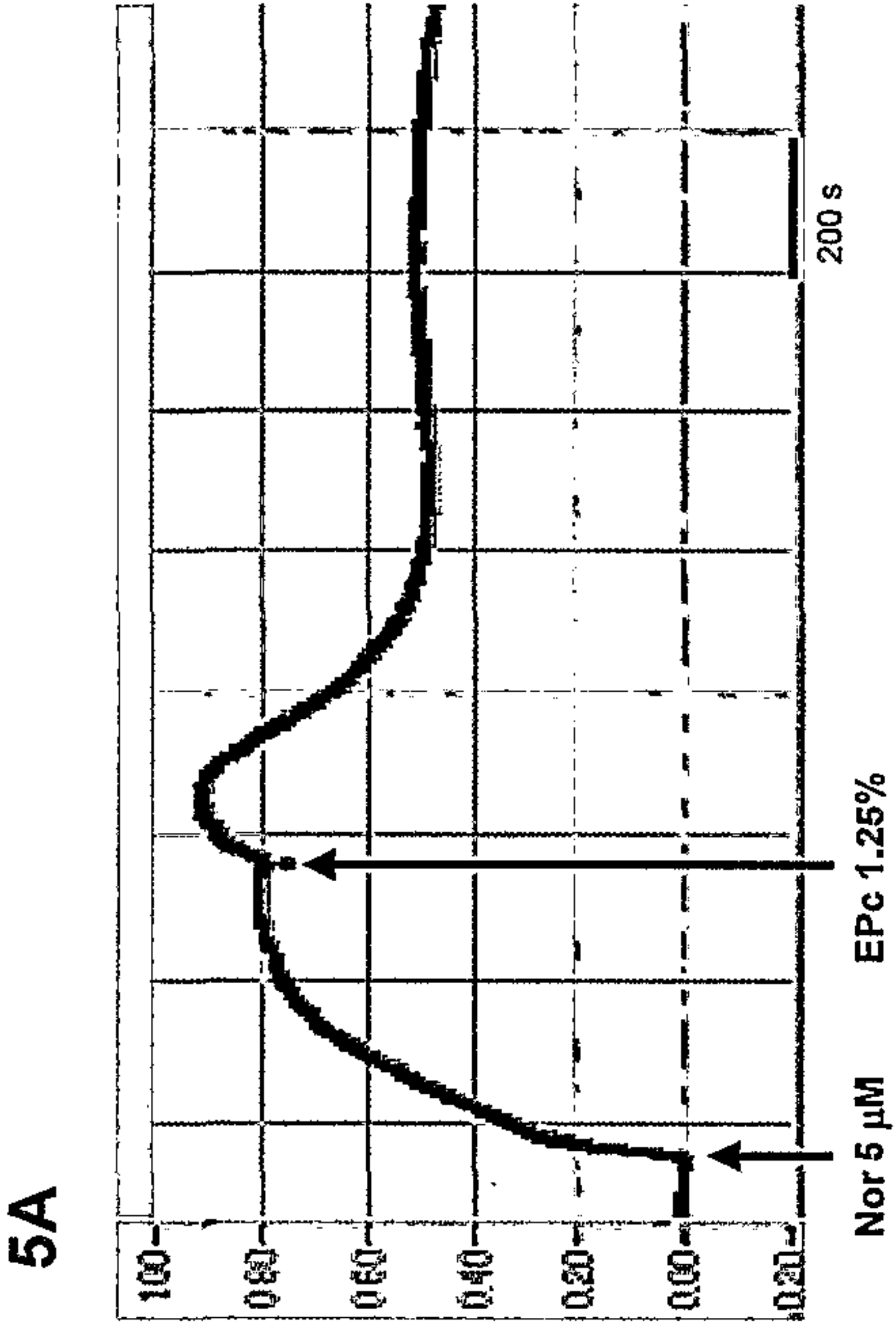
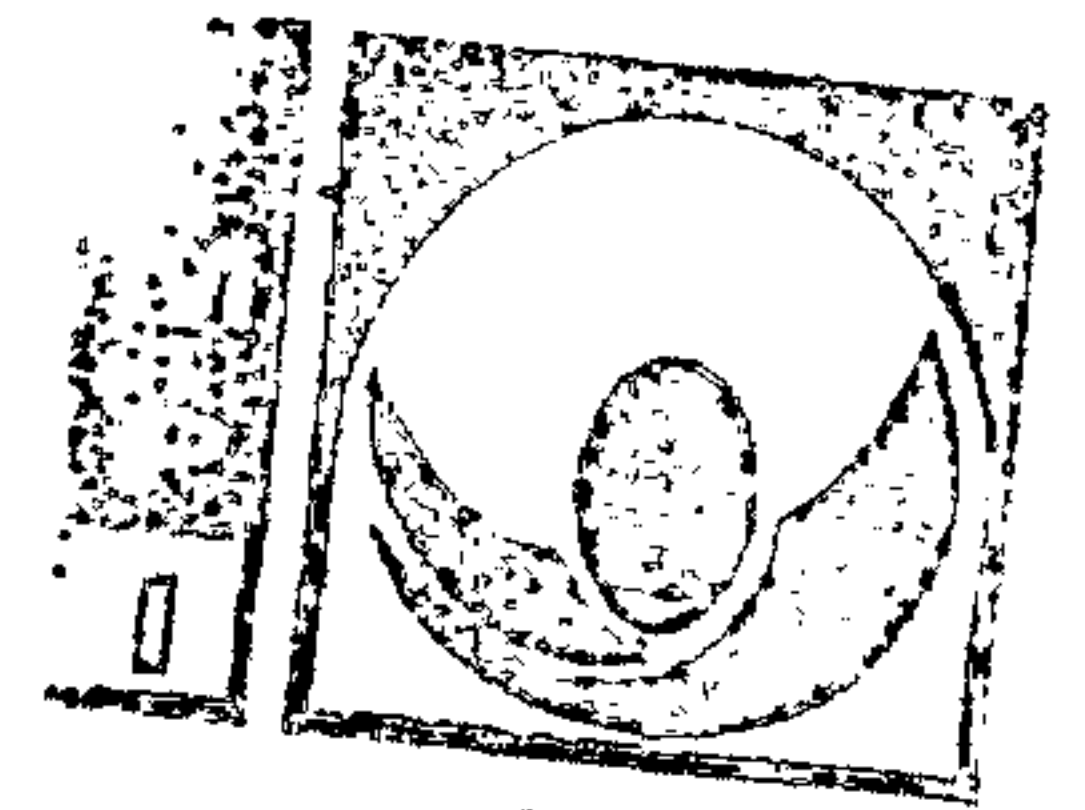


Figura 5



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

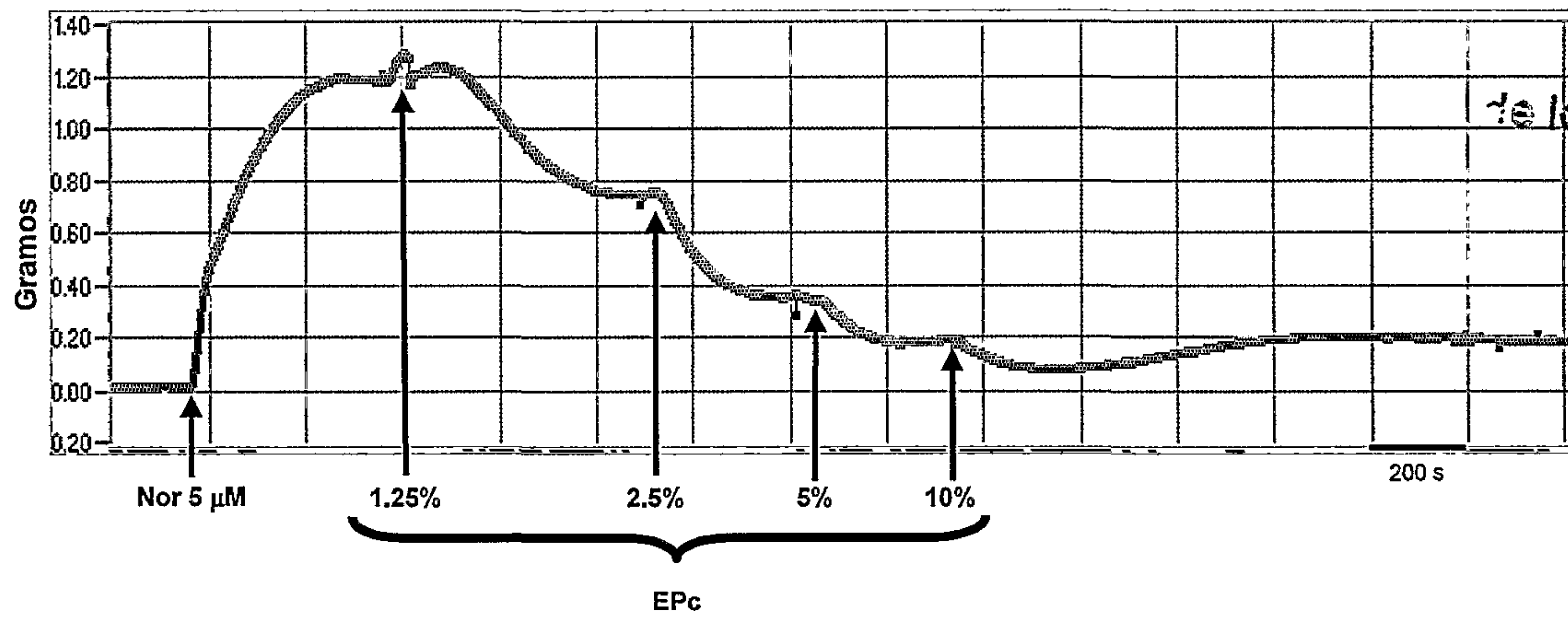


Figura 6

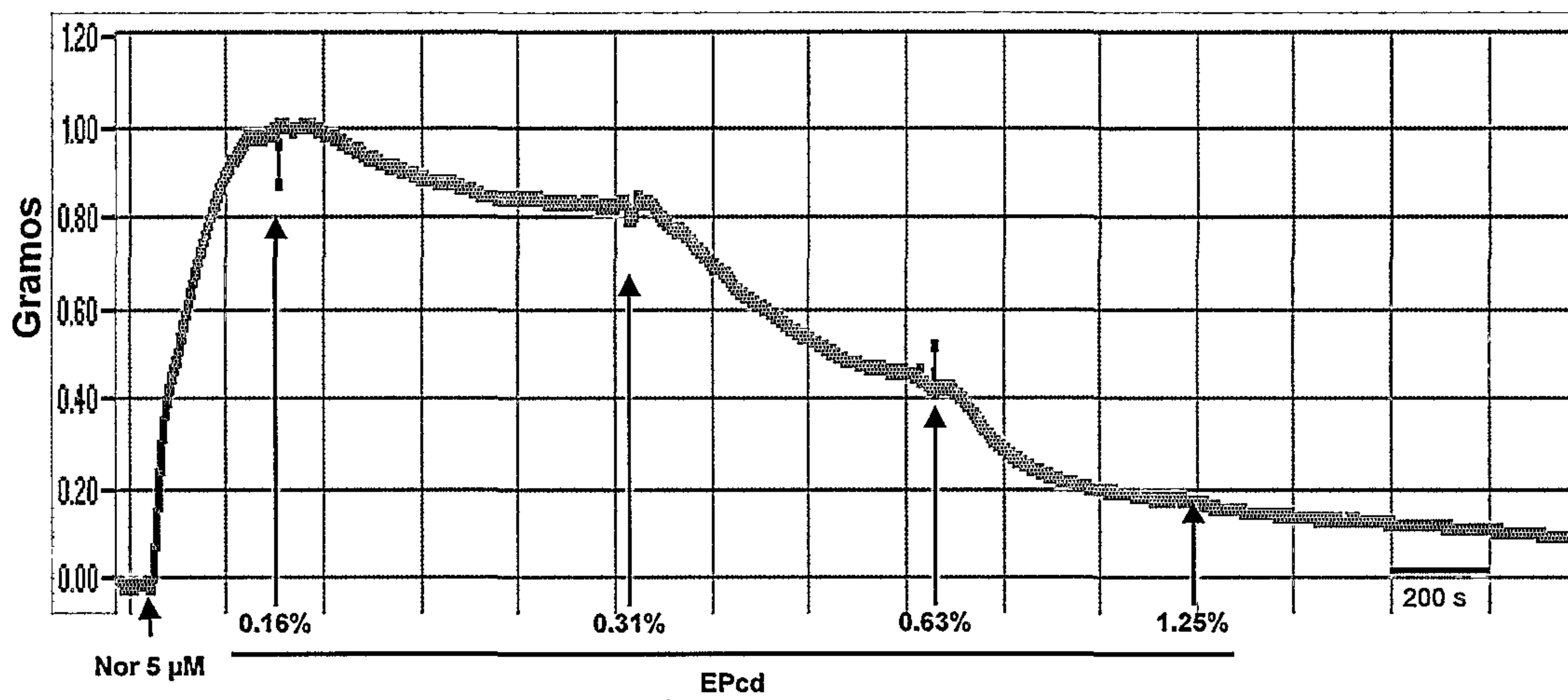
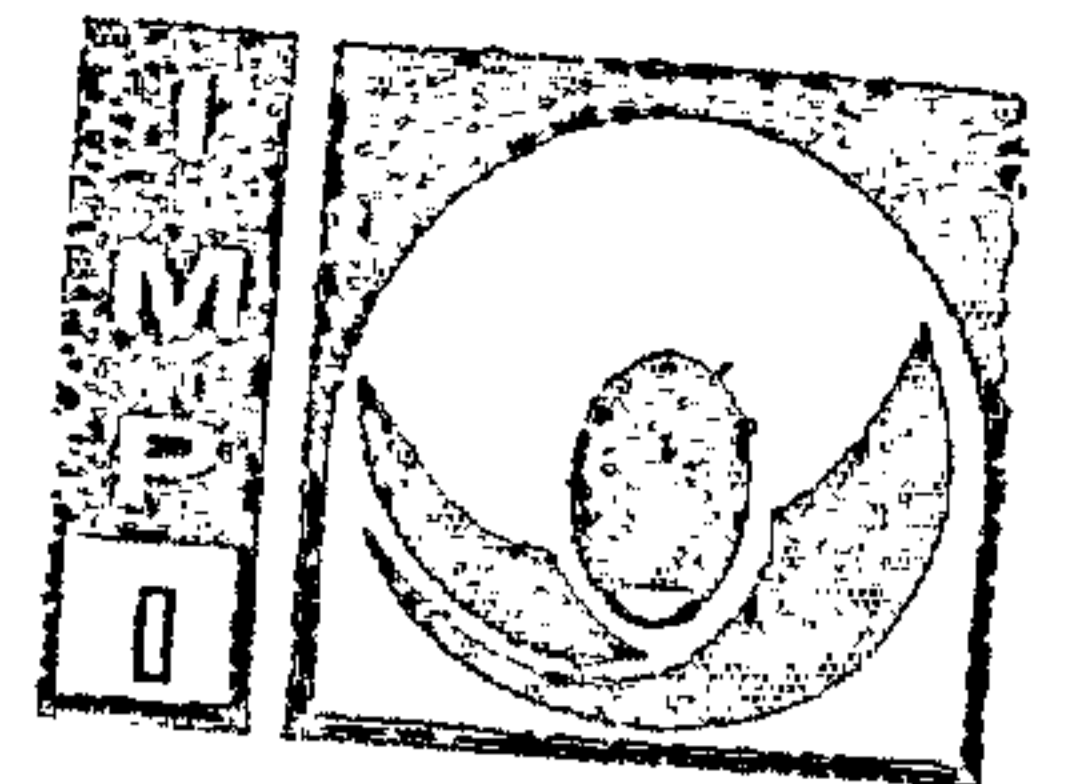


FIGURA 7



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

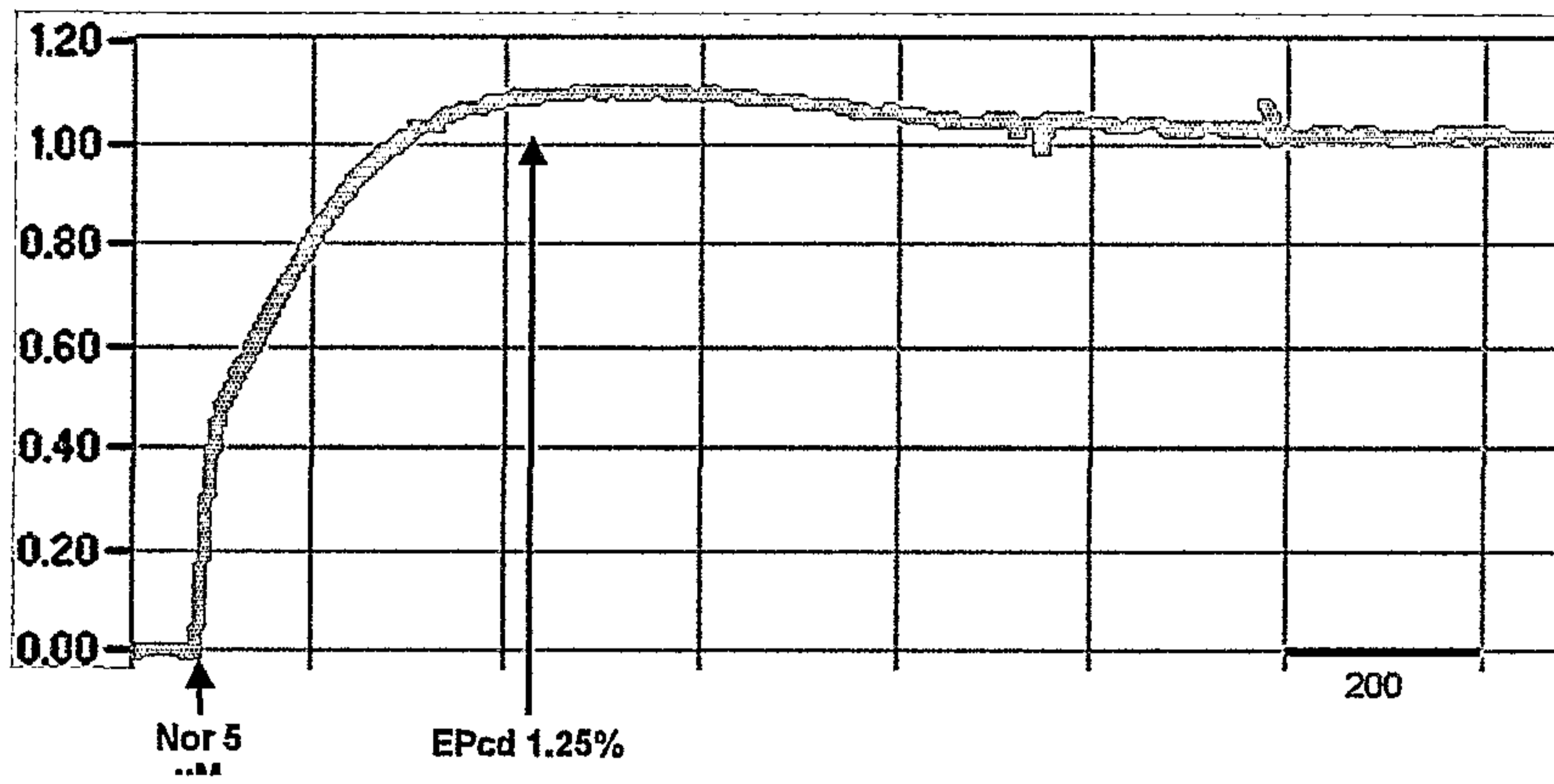
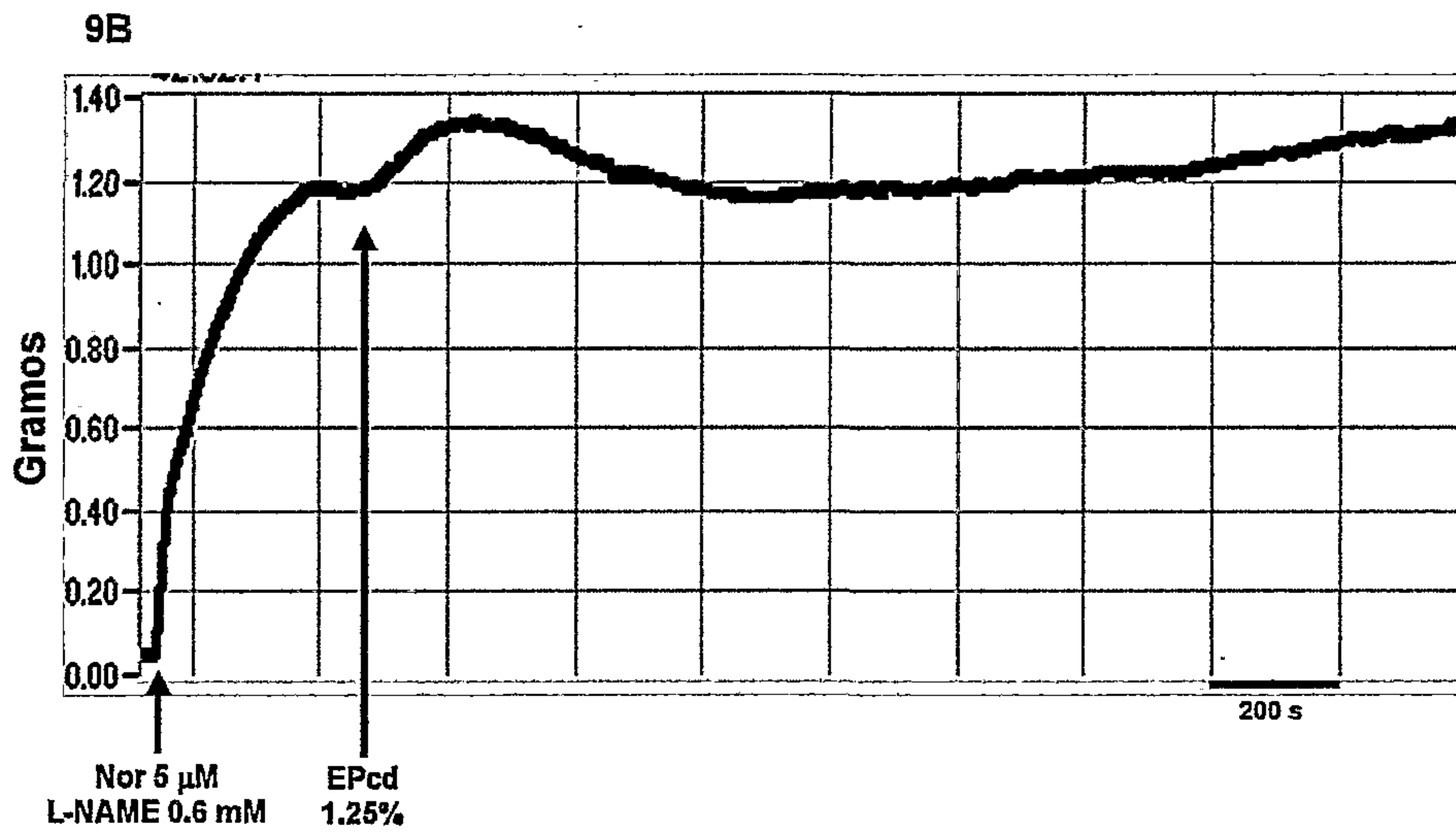
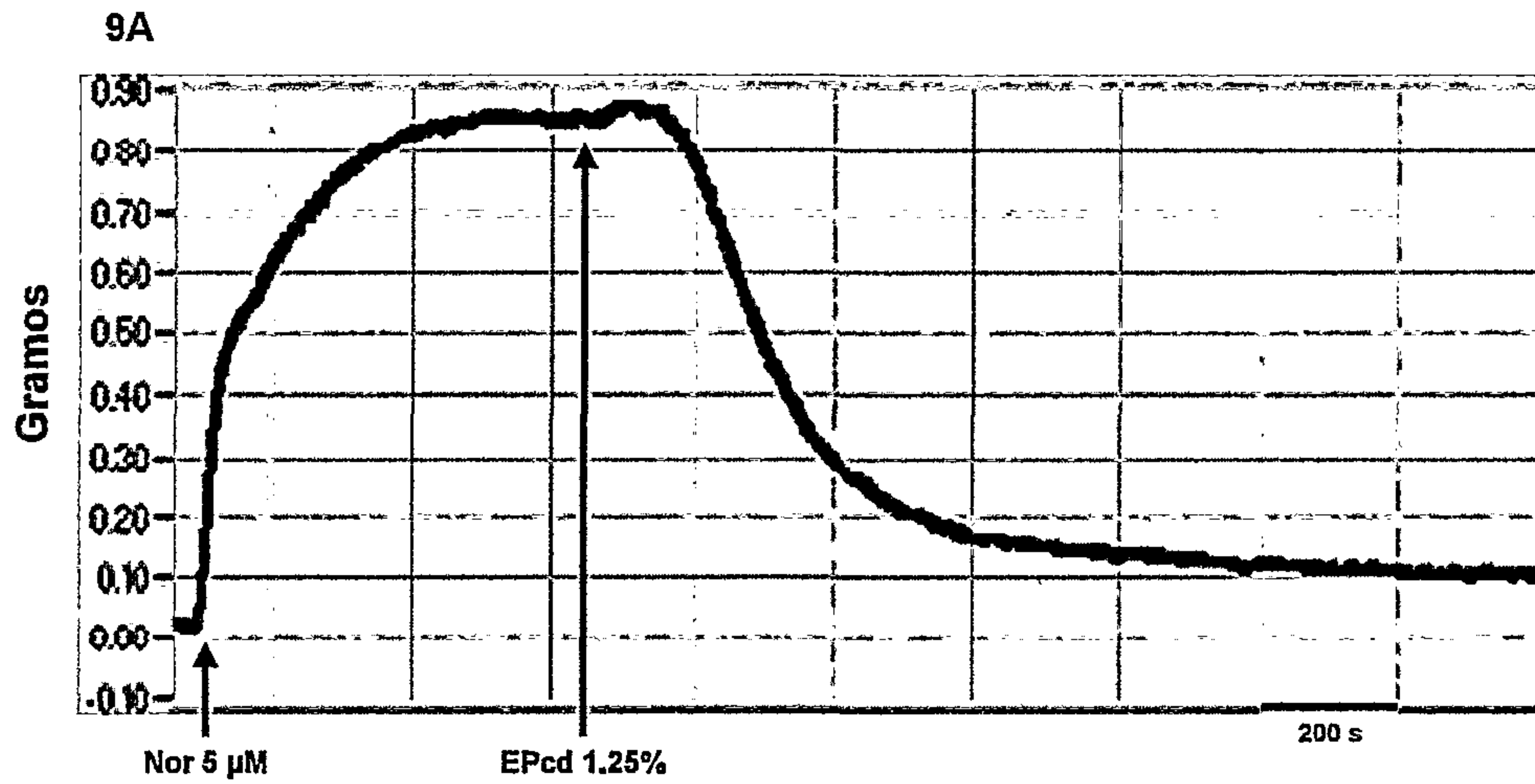


Figura 8





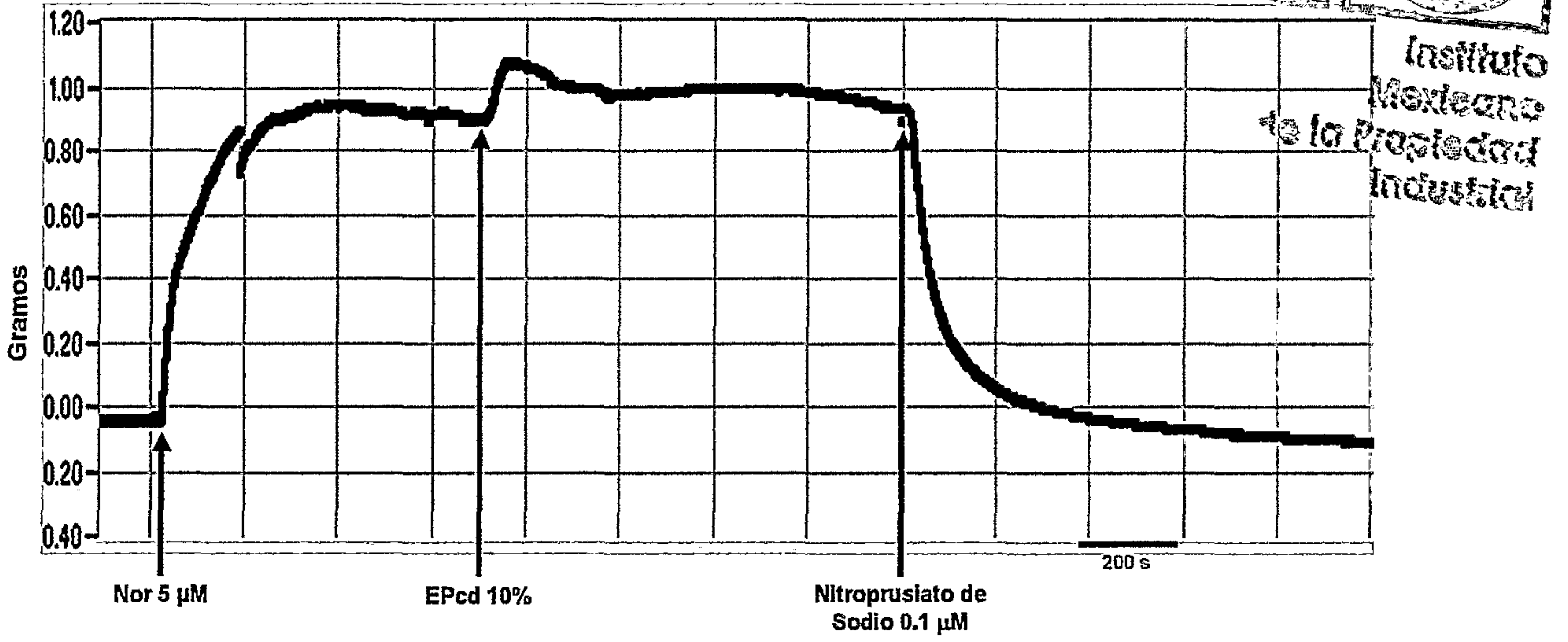
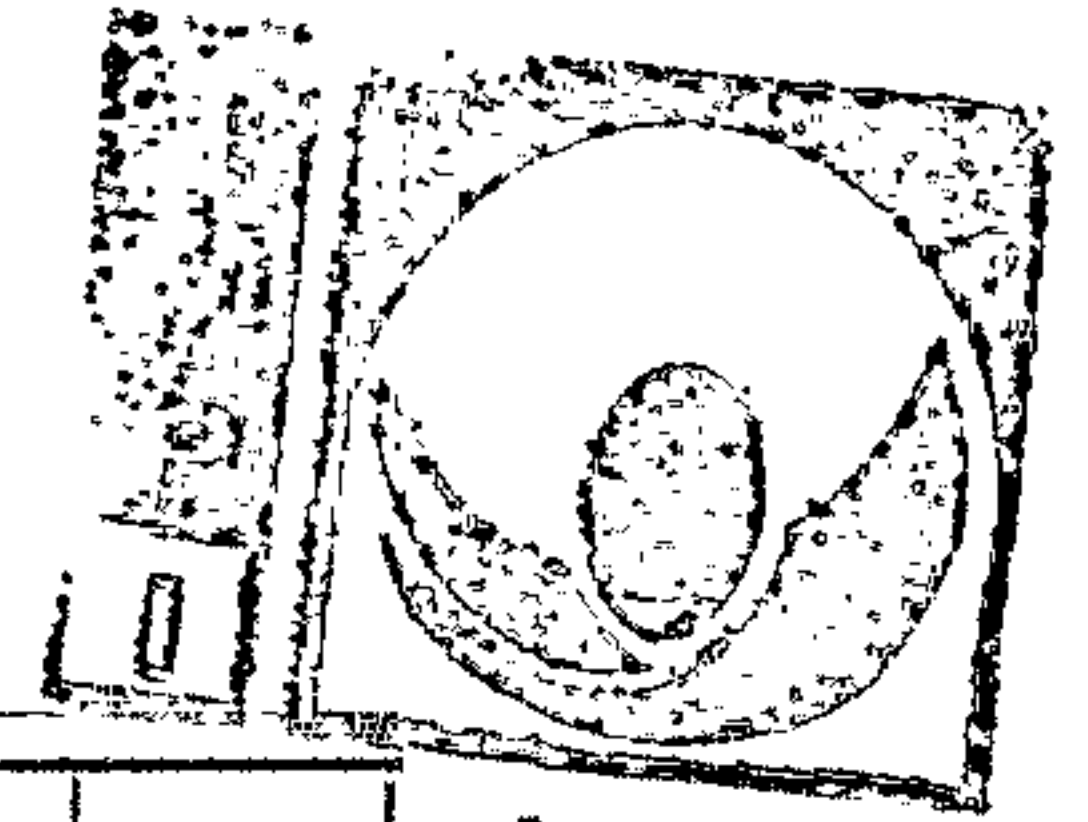


Figura 10

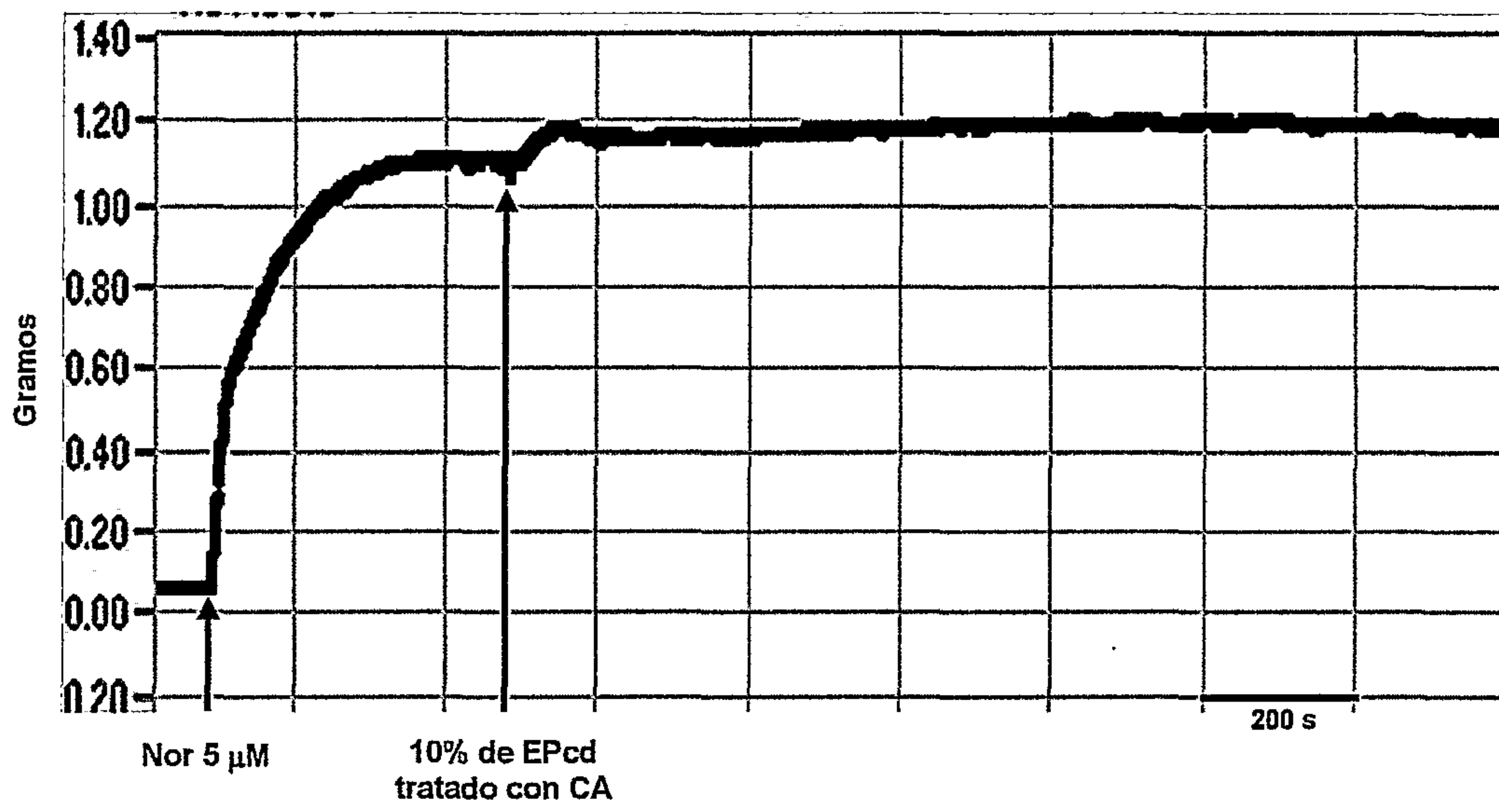
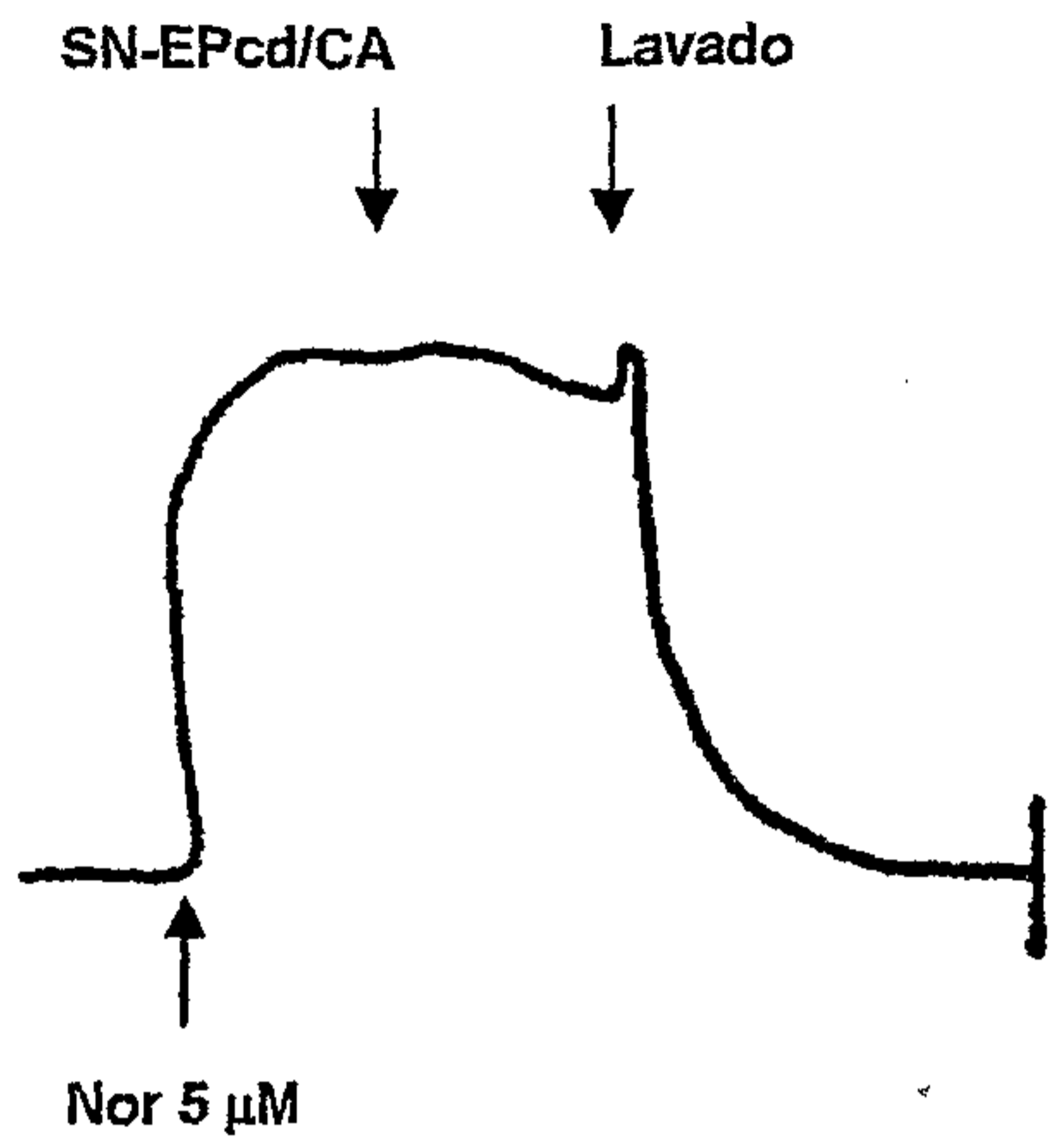


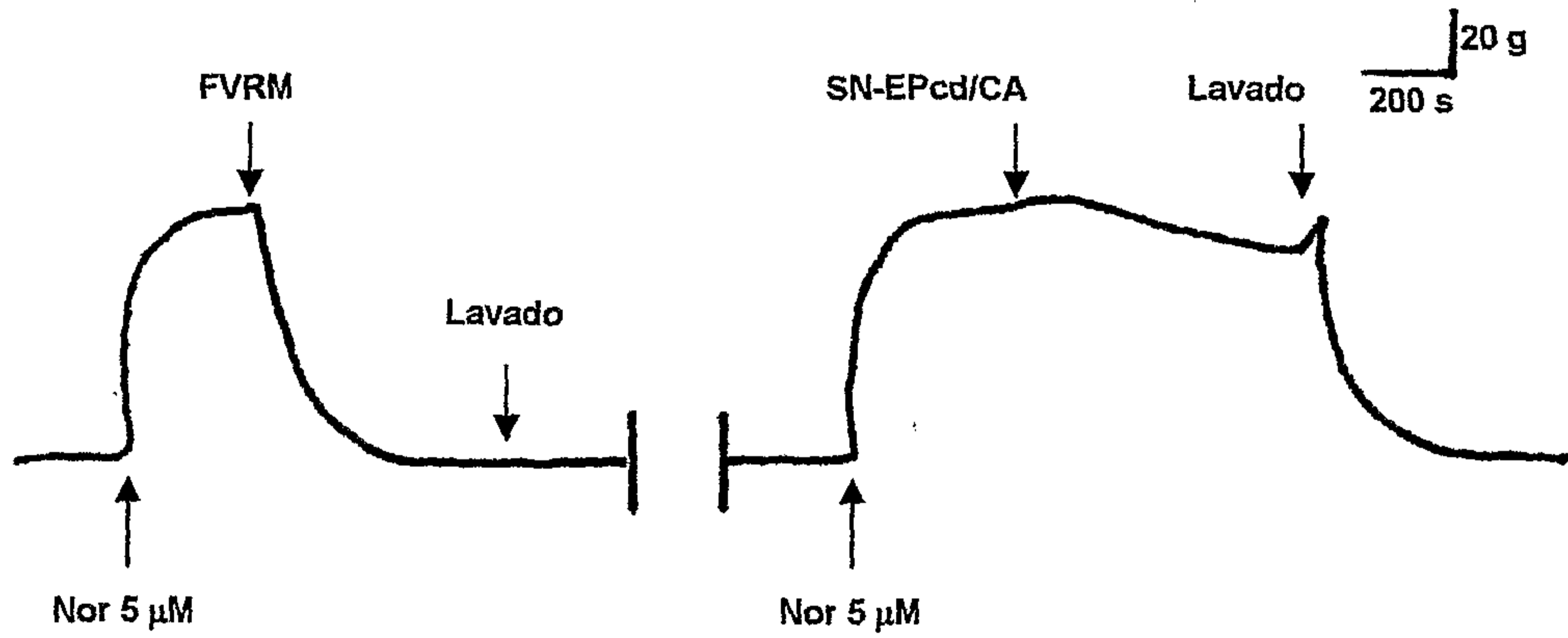
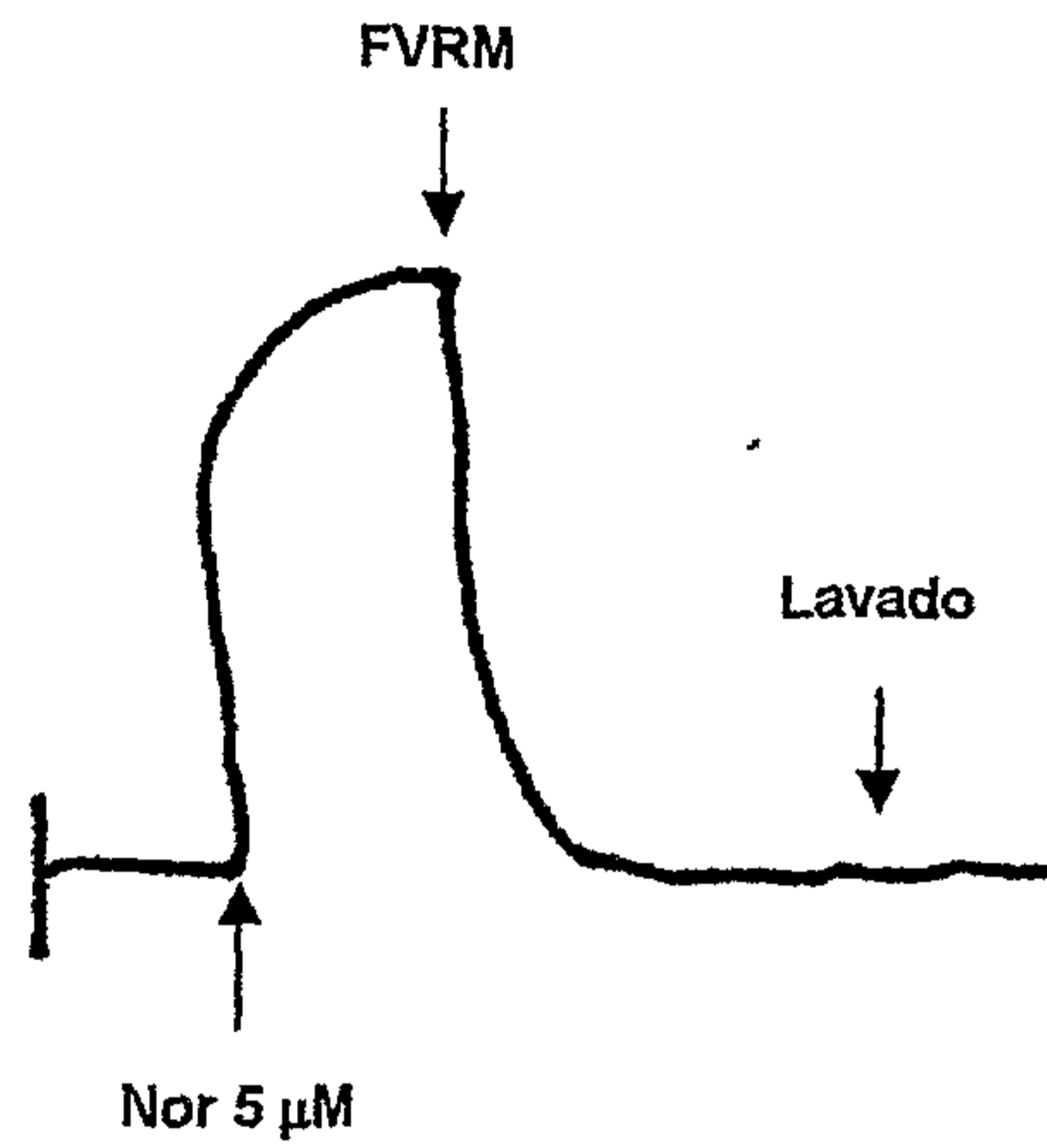
Figura 11



12A



12B



12C

12D

Figura 12

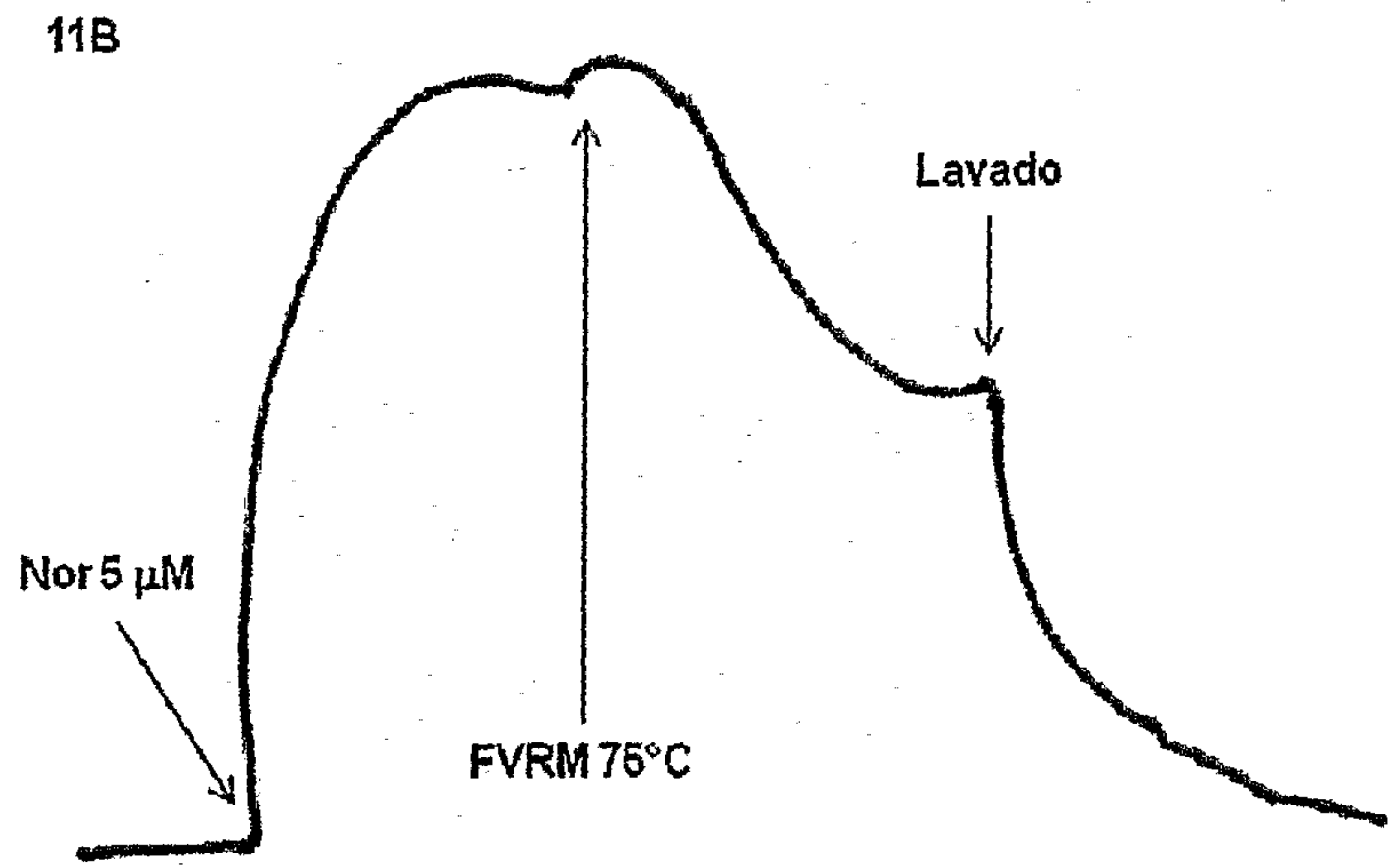
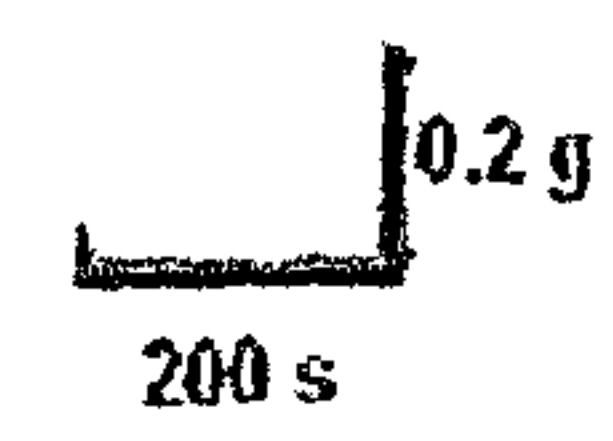
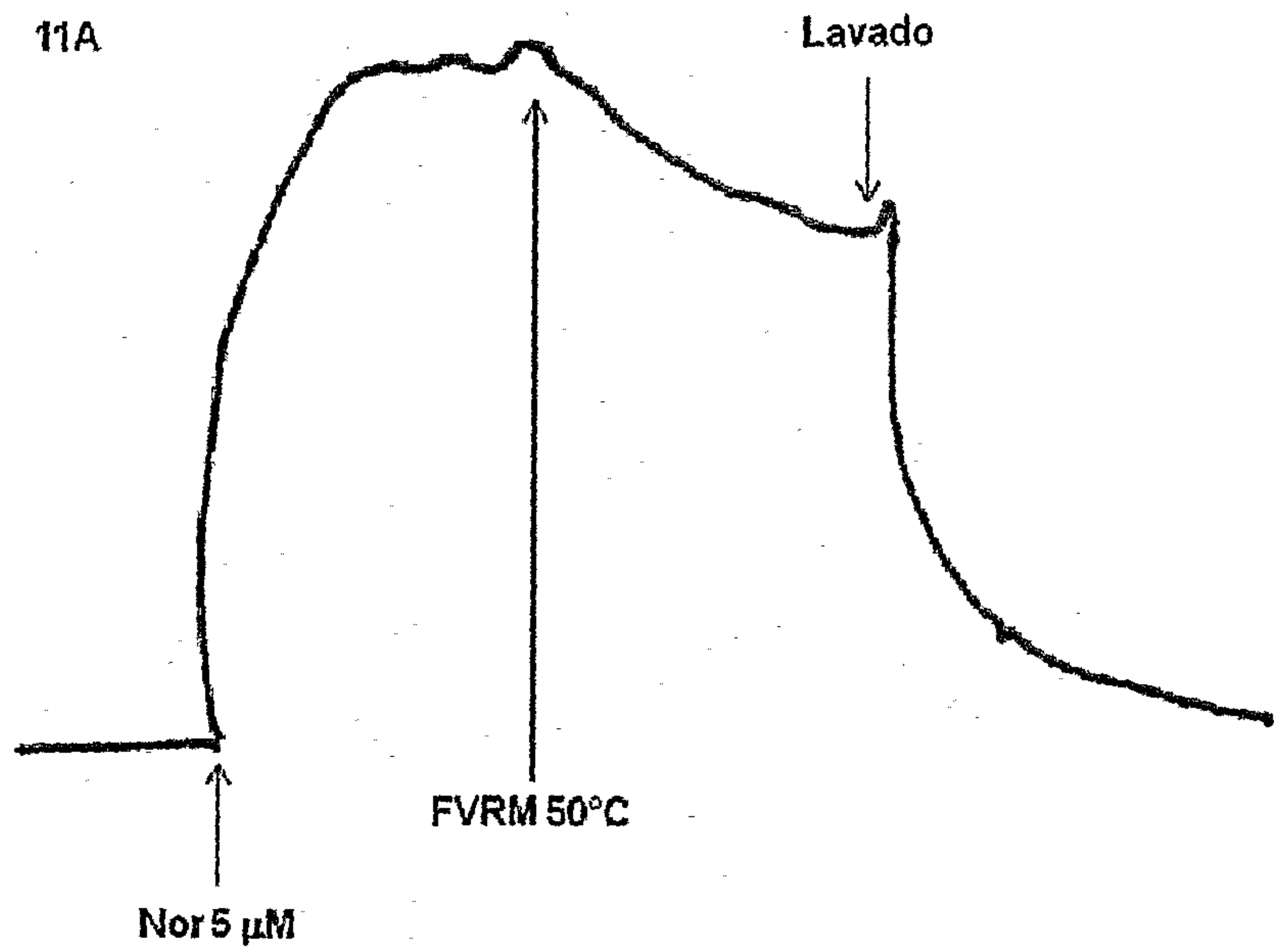
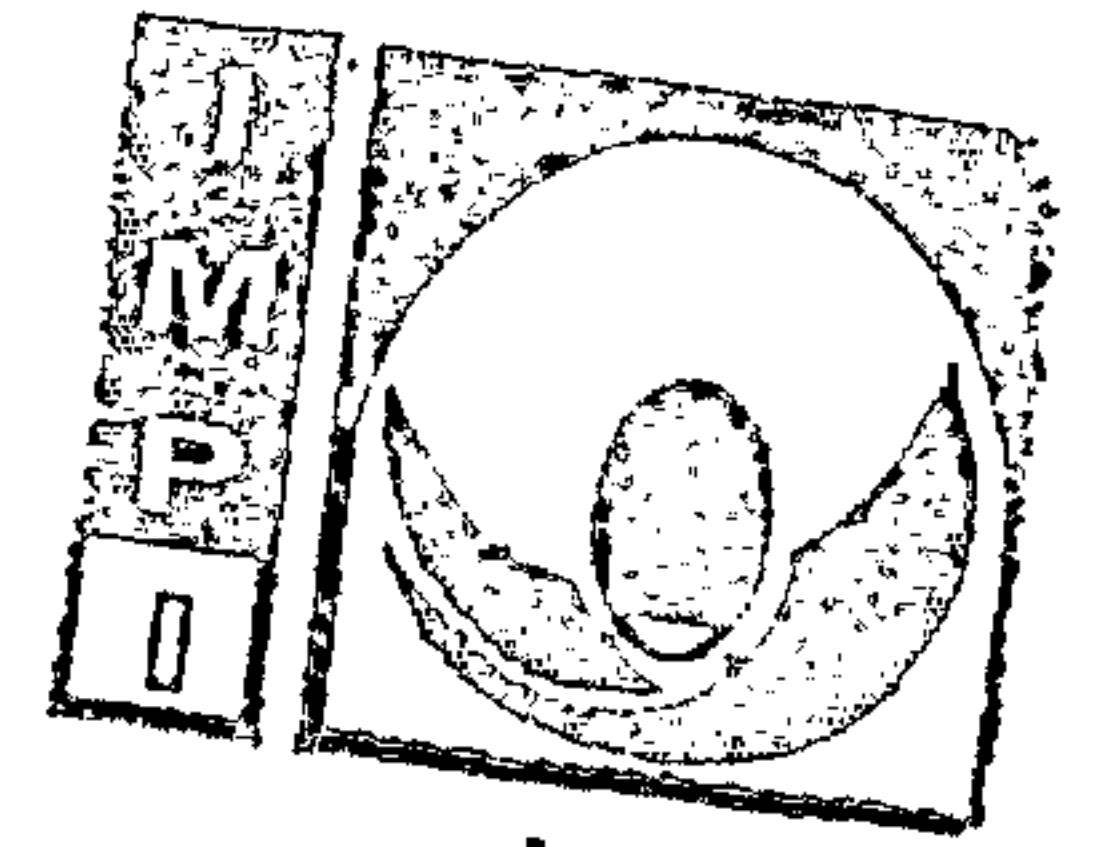


FIGURA 13



Instituto  
Mexicano  
de la Propiedad  
Industrial

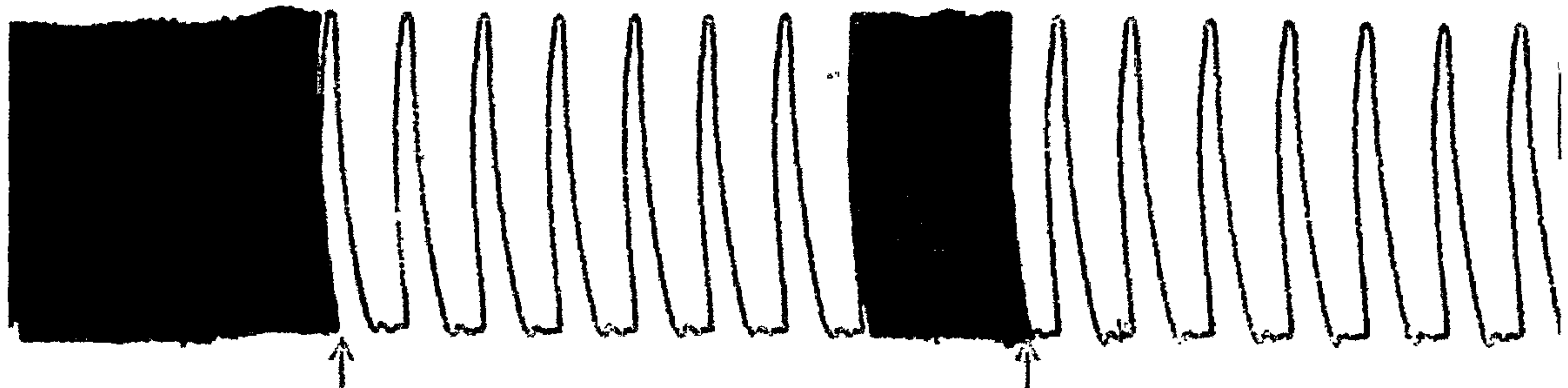
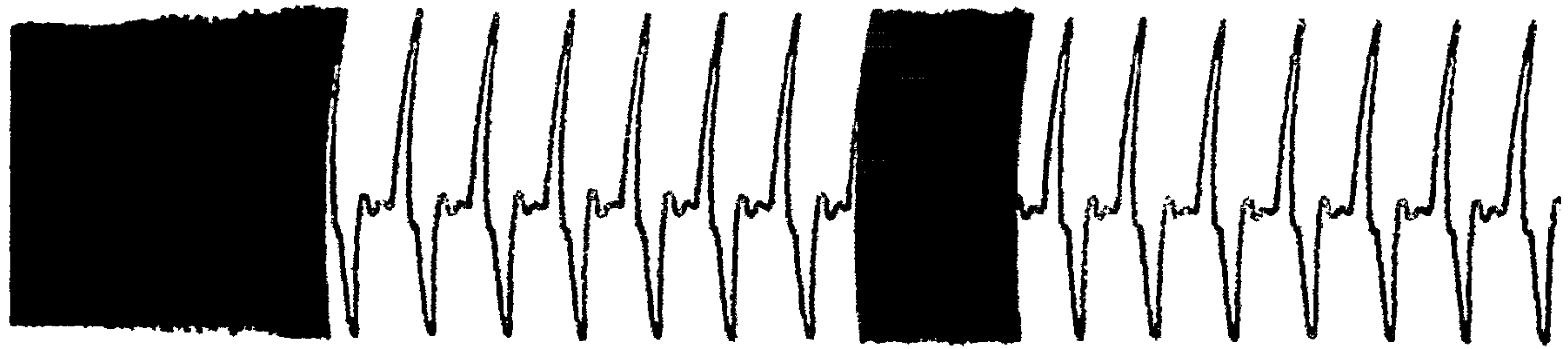


Figura 14