



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

2ej.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

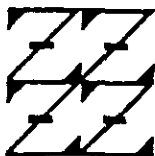
ZARAGOZA

Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad amebicida y giardicida de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* (Colopahtle).

T E S I S
Que para obtener el título
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
S U S T E N T A
JESUS ARRIETA VALENCIA

ASESOR M.C. BENITO REYES TREJO
DIRECTOR DR. ANDRES NAVARRETE CASTRO

U N A M
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES
DE BUENA RESOLUCION

MEXICO, D.F.
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998

257389



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

ARRIETA VALENCIA JESUS

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad amebicida y giardicida de las hojas de Zanthoxylum liebmannianum (Colopahtle).

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE Q.F.B. JOSE LUIS ALFREDO MORA GUEVARA

VOCAL DR. ANDRES NAVARRETE CASTRO

SECRETARIO M. en C. BENITO REYES TREJO

SUPLENTE Q.F.B. VALENTIN ISLAS PEREZ

SUPLENTE Q. MARTHA J. OLIVEROS GARCIA

Handwritten signatures of the members of the exam board, including the President, Vocal, Secretary, and two substitutes.

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÉ DEL ESPIRITU"
México, D.F. a, 13 de Octubre de 1997.

Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de la **Facultad de estudios de Estudios Superiores "Zaragoza"** que han contribuido en mi formación profesional.

A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales: **Javier, Jesús, Mónica, Mario, Jonas, Daniel, Clemente y Eva** por sus valiosos consejos y por los ratos tan agradables que hemos pasado juntos.

Agradezco enormemente al M. en C. **Fernando Calzada** por permitirme realizar en su laboratorio los ensayos de actividad antiprotozoaria..

Así mismo deseo expresar mi más profundo agradecimiento al M. en C. **Benito Reyes trejo** y al **Dr. Andrés Navarrete Castro**, quienes con su gran calidad científica y humana supieron guiar acertadamente la presente investigación con consejos y enseñanzas invaluable, cumpliendo así con la labor del verdadero maestro.

DEDICATORIA

A mis padres.

Maria y Carlos

A quienes debo todo lo que soy.

A mis hermanos.

Eduardo

Maria Luisa

Clara

Gonzalo

Isidra

Maria de la Luz

Maria del Carmen

Joaquín

Por que siempre exista un espiritu solidario entre hermanós.

*No debe avergonzarnos el
tomar del pueblo todo
aquello que puede ser útil
para el arte de curar.*

Hipócrates

Este trabajo de tesis fue realizado en las instalaciones del **Laboratorio de Productos Naturales** del Area de Química del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, bajo la asesoría del M. en C. **Benito Reyes Trejo** y la dirección del Dr. **Andrés Navarrete Castro**.

ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN. _____ 1

2. FUNDAMENTO TEÓRICO. _____ 4

2.1. AMIBIASIS. _____ 4

 2.1.1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la amibiasis. _____ 4

 2.1.2. Amebicidas lumbinales. _____ 5

 2.1.3. Amebicidas de acción sistémica. _____ 5

 2.1.4. Amebicidas de acción múltiple. _____ 6

2.2. Giardiasis. _____ 7

 2.2.1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis. _____ 8

2.3. Plantas amebicidas y/o giardicidas. _____ 8

2.4. Antecedentes del género *Zanthoxylum*. _____ 12

 2.4.1. Taxonomía. _____ 12

 2.4.2. Distribución. _____ 12

 2.4.3. Fitoquímica. _____ 12

 2.4.4. Actividad biológica de plantas del género *Zanthoxylum*. _____ 14

2.5. Generalidades de *Zanthoxylum liebmannianum*. _____ 14

 2.5.1. Descripción. _____ 14

 2.5.2. Distribución. _____ 15

 2.5.3. Fitoquímica. _____ 15

 2.5.4. Actividad biológica. _____ 15

3. OBJETIVOS. _____ 16

3.1. Objetivo general. _____ 16

3.2. Objetivos específicos. _____ 16

4. HIPÓTESIS. _____ 16

5. MATERIAL Y MÉTODOS. _____ 17

5.1. Material de vidrio. _____ 17

5.2. Reactivos. _____ 18

5.3. Equipo. _____ 19

5.4. Material vegetal. _____ 19

5.5. Métodos de extracción. _____ 19

5.6. Fraccionamiento. _____ 20

5.7. Análisis de las fracciones. _____ 20

5.8. Identificación de los compuestos. _____ 22

5.9. Preparación de derivados acetilados. _____ 22

5.10. Ensayo biológico <i>in vitro</i>.	22
5.10.1. Parásitos.	22
5.10.2. Ensayo antiprotozoario.	23
5.10.3. Método colorimétrico.	23
6. RESULTADOS.	24
6.1. Fraccionamiento cromatográfico.	24
6.2. Evaluación de la actividad biológica.	28
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	29
7.1. Caracterización de los compuestos aislados.	29
7.1.1. β -sitosterol.	29
7.1.2. β -(D)-glucósido de β -sitosterol.	32
7.1.3. Acetilación del β -(D)-glucósido de β -sitosterol.	36
7.1.4. Asarinina.	38
7.1.5. 3-O- β -galactopiranosil quercetina.	45
7.1-6. Sacarosa.	53
7.2. Ensayo biológico	58
8. CONCLUSIONES.	59
9. BIBLIOGRAFÍA.	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas con actividad amebicida y/o giardicida. _____	9
Tabla 2. Metabolitos aislados del género <i>Zanthoxylum</i> . _____	13
Tabla 3. Actividad biológica que presenta el genero <i>Zanthoxylum</i> . _____	14
Tabla 4. Resumen de la cromatografía en columna del extracto etanólico obtenido por maceración de las hojas de <i>Zanthoxylum liebmannianum</i> . _____	25
Tabla 5. Resumen del fraccionamiento de la cromatografía en columna del extracto metanólico obtenido por maceración <i>Zanthoxylum liebmannianum</i> . _____	26
Tabla 6. Resumen de la cromatografía en columna del extracto etanólico obtenido por reflujo de las hojas de <i>Zanthoxylum liebmannianum</i> . _____	27
Tabla 7. Resultados de la actividad biocida de extractos y compuestos evaluados por triplicado, tomando como referencia al metronidazol. _____	28
Tabla 8. Constantes físicas y espectroscópicas de la asarinina. _____	43
Tabla 9. Constantes físicas y espectroscópicas de 3-O-β-galactopiranosil quercetina. _____	52

ÍNDICE DE ESPECTROS.

ESPECTRO 1. Espectro de infrarrojo del β -sitosterol. _____	30
ESPECTRO 2. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) del β -sitosterol _____	31
ESPECTRO 3. Espectro de infrarrojo del β -(D)-glucósido de β -sitosterol. _____	33
ESPECTRO 4. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) del β -(D)-glucósido de β -sitosterol. _____	34
ESPECTRO 5. Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, DMSO-d ₆) del β -(D)-glucósido de β -sitosterol. _____	35
ESPECTRO 6. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) del tetraacetato de β -(D)-glucósido de β -sitosterol. _____	37
ESPECTRO 7. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de asarinina. _____	39
ESPECTRO 8. Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, CDCl ₃) de asarinina. _____	40
ESPECTRO 9. Espectro DEPT (300 MHz, CDCl ₃) de asarinina. _____	42
ESPECTRO 10. Espectro COSY (300 MHz, CDCl ₃) de asarinina. _____	44
ESPECTRO 11. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) de 3-O- β - galactopiranosil quercetina. _____	46
ESPECTRO 12. Espectro de RMN- ¹ H de intercambio con agua pesada (300 MHz, DMSO-d ₆ + D ₂ O) de 3-O-B-galactopiranosil quercetina. _____	47
ESPECTRO 13. Espectro COSY (300 MHz, DMSO-d ₆) de 3-O- β -galactopiranosil quercetina. _____	48
ESPECTRO 14. Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, DMSO-d ₆) de 3-O- β - galactopiranosil quercetina. _____	50
ESPECTRO 15. Espectro DEPT (300MHz, DMSO-d ₆) de 3-O- β -galactopiranosil quercetina. _____	51
ESPECTRO 16. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, DMSO-d ₆) de sacarosa. _____	54
ESPECTRO 17. Espectro de RMN- ¹³ C (300 MHz, DMSO-d ₆) de sacarosa. _____	55
ESPECTRO 18. Espectro DEPT (300 MHz, DMSO-d ₆) de sacarosa. _____	56
ESPECTRO 19. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz, D ₂ O) de sacarosa. _____	57

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. Estructuras de furoato de diloxanida, diiodohidroxiquinolina ($R_5, R_7 = I$) y clioquinol ($R_5 = Cl, R_7 = I$).	5
FIGURA 2. Estructuras de la emetina y cloroquina.	6
FIGURA 3. Estructuras del metronidazol y ordinazol.	7
FIGURA 4. Estructura de la quinacrina.	8
FIGURA 5. Esquema de la preparación de los extractos de las hojas de <i>Zanthoxylum liebmannianum</i> (colopahtle).	21
FIGURA 6. Estructura del β-sitosterol.	29
FIGURA 7. Datos de RMN-^{13}C β-glucosa.	32
FIGURA 8. Estructura del β-(D)-glucósido de β-sitosterol.	32
FIGURA 9. Estructura del tetraacetato del β-(D)-glucósido de β-sitosterol.	36
FIGURA 10. Estructura del piperonal.	38
FIGURA 11. Fragmentos que contribuyen con la fórmula estructural propuesta para el producto natural aromático.	38
FIGURA 12. Arreglo de tipo $C_6-C_3-C_3-C_6$.	41
FIGURA 13. Fórmula estructural de la asarinina.	43
FIGURA 14. Fórmula parcial representando a la β-enona quelatado con hidroxilo.	45
FIGURA 15. Fórmula parcial para un sistema tetrásustituído.	49
FIGURA 16. Estructura del 3-O-β-galactopiranosil quercetina.	49
FIGURA 17. Estructura de la sacarosa.	53

Glosario de abreviaturas

RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
MHz	mega Hertz
IR	<i>Espectroscopia de infrarrojo</i>
COSY	Correlación espectroscopica (RMN-¹H) homonuclear bidimensional
DEPT	Distorsión aumentada por una transferencia de polarización
p.f.	Punto de fusión
CHCl₃	Cloroformo
S	Singulete
d	Doblete
t	Triplete
EMIE_{m/z}	Relación masa carga
CDCl₃	Cloroformo deuterado
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido
CL₅₀	Concentración letal media
I. C.	Intervalo de confianza
AcOEt	Acetato de etilo
D₂O	Agua deuterada
ppm	Partes por millón
m	Multiplete
Hz	Hertz
cm	Centímetro

RESUMEN.

Como parte de un estudio sistemático sobre las plantas mexicanas usadas en la medicina tradicional, se realizó el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad amebicida y giardicida de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* (Colopahtle).

Del extracto etanólico obtenido por maceración de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* se aislaron y caracterizaron al β -sitosterol y 3-O- β -galactopiranosil quercetina. Con respecto al extracto metanólico obtenido por maceración se aislaron y caracterizaron además de los compuestos anteriormente mencionados al β -(D)-glucósido de β -sitosterol. Del extracto etanólico obtenido por reflujo se aislaron y caracterizaron al β -sitosterol, 3-O- β -galactopiranosil quercetina, asarinina y sacarosa.

Los extractos y compuestos aislados de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* presentaron actividad biológica antiprotozoaria. El extracto etanólico obtenido por maceración fue el que presentó la mayor actividad biológica con una CL_{50} de 3.48 $\mu\text{g/ml}$ y 57.99 $\mu\text{g/ml}$ en contra de *E. histolytica* y *G. lamblia* respectivamente. De los compuestos aislados la asarinina presentó la mayor actividad antiprotozoaria con una CL_{50} de 19.86 $\mu\text{g/ml}$ y 35.45 $\mu\text{g/ml}$ en contra de *E. histolytica* y *G. lamblia* respectivamente. En todos los experimentos se utilizó al metronidazol como referencia. En forma adicional es la primera vez que se describe la actividad antiprotozoaria para la asarinina y de igual forma para β -sitosterol y β -(D)-glucósido de β -sitosterol.

1. INTRODUCCIÓN

Los problemas de salud en México son los propios de los países en vías de desarrollo, generados principalmente por enfermedades infecciosas y/o parasitarias, la desnutrición, la falta de higiene y la limitación de los servicios de salud a un porcentaje mínimo de la población. Si sumamos a esto el elevado costo de los medicamentos, entre otras causas, por la falta de una industria farmoquímica propia y el uso inadecuado de los recursos existentes, en conjunto se forma un panorama crítico de la salud en México. Tomando en cuenta lo anterior, se hace evidente la necesidad de encontrar alternativas, en varias direcciones para mejorar los problemas de salud en México. En este sentido la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1978) en su tratado de Alma-Ata 1978 propone:

1). Que los países en vías de desarrollo como el nuestro, hagan uso de los recursos naturales, y de su medicina tradicional, para resolver algunos de sus problemas de salud.

2). Impulsar la investigación multidisciplinaria de la medicina tradicional de los recursos terapéuticos que utilizan, haciendo partícipes a los practicantes de tal medicina (curanderos, hierberos, etc.) y establecer lineamientos de investigación y estudio.

Se estima que aproximadamente un 75-80% de la población mundial hace uso de la medicina tradicional para resolver sus problemas de salud. Los practicantes de esta medicina hacen uso de los recursos a su alcance; plantas, animales y minerales de la región y con mucha frecuencia va acompañada de prácticas mágicas y rituales.

La medicina tradicional podría ser una de las alternativas más importantes para resolver algunos de los problemas de salud, pero debe señalarse que su adaptación requiere de grandes esfuerzos de investigación sistemática y multidisciplinaria. El estudio multidisciplinario de la medicina tradicional comprende varios aspectos, a) Antropológico; b) Botánico y/o Etnobotánico; c) Agronómico; d) Químico; e) Farmacológico; f) Clínico; g) Económico y h) Histórico.

La gran riqueza y variedad de la flora mexicana, la gran tradición sobre el uso de vegetales con fines curativos la carencia de una industria farmoquímica propia, la crisis económica actual, las condiciones de los servicios de salud y en general las características socioeconómicas de los países en vías desarrollo, como el nuestro, entre otros hacen necesarios los estudios sistemáticos y multidisciplinarios sobre las plantas

medicinales mexicanas para proporcionar una alternativa viable que resuelva algunos de los problemas de salud en México (Jiménez, 1989).

Se ha encontrado que en los huertos familiares de México hay coincidencia entre las plantas más frecuentemente cultivadas o conservadas, las cuales están relacionadas con los principales padecimientos de la región: en la mayor parte del país, estos padecimientos son las enfermedades gastrointestinales (cólicos estomacales, diarreas infecciosas o metabólicas, parasitosis diversas, padecimientos hepáticos, etc.), enfermedades respiratorias y cardiovasculares (Estrada, 1985).

Actualmente los medicamentos de elección para el tratamiento de la amibiasis disentérica que es una enfermedad parasitaria son los derivados imidazólicos (metronidazol, tinidazol, iodoquin y quinolina entre otros). En los últimos años se ha informado de los efectos carcinogénicos para el metronidazol. Pruebas en ratas demostraron que este fármaco inducía la formación de tumores, esto ha provocado una corriente de opiniones que motivaron a la "Food and Drug Administration" (FDA) de los Estados Unidos de Norteamérica para que este medicamento sea retirado del mercado, sin embargo para la amibiasis hepática, la alternativa terapéutica es prácticamente inexistente por el momento (Ramírez, 1985). Por lo tanto una de las alternativas en la terapia de la amibiasis han sido compuestos nitrados (imidazoles). Otros compuestos que también contienen nitrógeno son los alcaloides los cuales poseen actividades biológicas diversas, por ejemplo en el tratamiento de la malaria se ha utilizado a la quinina y no es remoto que otros alcaloides puedan tener actividad amebicida.

Por otro lado, se sabe el conocimiento de que ciertas plantas tienen actividad antiparasitaria, tal es el caso de *Castela tortuosa* (chaparro amargoso), (Cántaro, 1982), *Chenopodium graveolens* (Epazote del zorrillo), (Mata *et al.*, 1987), *Artemisia mexicana* (Estafiate), (Martínez, 1969) y *Zanthoxylum liebmannianum* (Colopahtle), (Reyes, 1991), el género de este último contiene gran cantidad de alcaloides por lo que se hace interesante su estudio.

En la actualidad, las plantas medicinales son utilizadas para la preparación de tinturas y extractos, o particularmente como materia prima para obtener principios activos puros. Los medicamentos han ofrecido resultados satisfactorios solamente cuando son química y farmacológicamente dosificables.

Ciertamente, el logro alcanzado con el aislamiento y caracterización de los principios activos puros, definidos y dosificables, asegura y garantiza el uso terapéutico de los productos obtenidos de las plantas medicinales, y es a la vez aceptado por las organizaciones sobre control de fármacos tanto en Europa como de América.

El plan de la UNIDO (United Nations for Industrial Development Organization) ha diseñado estrategias para la producción de fármacos a partir de plantas medicinales, considera que no siempre es útil desarrollar una tecnología para el uso de plantas medicinales en sustitución de los fármacos occidentales, sino se hace previamente un estudio inicial cuali-cuantitativo de los principios activos contenidos en las plantas medicinales. En otras palabras no resulta satisfactorio sustituir los medicamentos actuales por simples extractos o tinturas que aunque hechos de acuerdo a la tecnología moderna carecen de estudios que fundamenten su utilización y respuestas terapéuticas constantes, lo cual está en relación directa con el conocimiento de los principios activos contenidos en las plantas (Pesce, 1996).

2.1.2 Amebicidas luminales.

Los fármacos más importantes de este tipo son: furoato de diloxanida y hidroxiquinolinas halogenadas (figura 1). El furoato de diloxanida es útil para tratar a personas asintomáticas que excretan quistes es mucho mas potente que la emetina, es poco lo que se sabe de su mecanismo de acción. El furoato de diloxanida es utilizado en combinación con un amebicida sistémico o mixto apropiado para obtener curación de amibiasis invasora o extraintestinal. Dentro de sus efectos adversos este es tolerado adecuadamente y sus efectos colaterales son leves; el más común es la flatulencia y en ocasiones se detecta vómito, prurito y urticaria (Tracy y Webster, 1996).

Hidroxiquinolinas halogenadas son un conjunto de fármacos derivados de la 8-hidroxiquinolína obtenidos por síntesis, las principales son diiodohidroxiquinolína y clíoquinol. En la amibiasis humana estas sustancias actúan favorablemente en los padecimientos intestinales agudos como crónicos, su efecto se ejerce únicamente en la luz del intestino debido a la pobre adsorción que poseen. Las hidroxiquinolinas halogenadas son en general poco tóxicas, sin embargo son capaces de provocar trastornos digestivos, neurológicos y de iodismo (Litter, 1986).

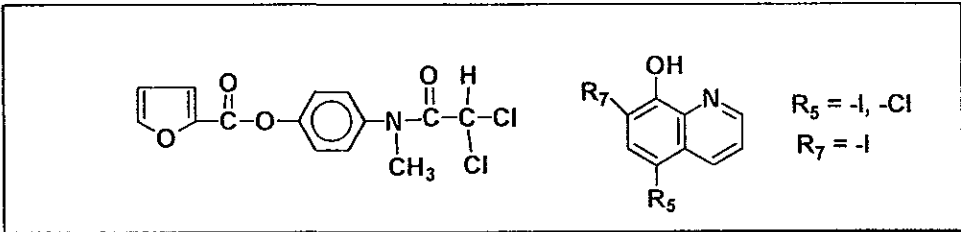


FIGURA 1. Estructuras de furoato de diloxanida, diiodohidroxiquinolína (R₅, R₇ = I) y clíoquinol (R₅ = Cl y R₇ = I).

2.1.3. Amebicidas de acción sistémica.

Los fármacos más importantes en este grupo son: emetina y cloroquina (figura 2). La emetina es un alcaloide que se extrae del *Cephaelis ipecacuan*. En la amibiasis humana provoca rápidamente la desaparición de los síntomas agudos de la disentería amibiana. Produce la curación solamente en 10 a 15% de los casos por lo que se hace necesario su uso combinado con otros fármacos. Actúa preponderantemente sobre las amibas existentes sobre los tejidos es decir sobre la mucosa y no sobre las que se

encuentran en la luz del intestino, en cuanto a su mecanismo de acción amebicida no se ha dilucidado. No es una sustancia inocua sino que es capaz de provocar cuadros de intoxicación que pueden ser graves y que se deben a dosis altas o a acumulación de dosis pequeñas suministradas durante un período prolongado. Las reacciones adversas afectan el tracto gastrointestinal, músculo esquelético y el sistema cardiovascular las cuales son las más severas (Litter, 1986)

La cloroquina corresponden a un grupo químico sintético de las 4-aminoquinolinas, la utilidad terapéutica única de este fármaco se advierte en la amibiasis extraintestinal en seres humanos y depende de su acción tóxica directa contra trofozoítos de *E. histolytica* junto con el hecho de que se concentra fuertemente en el hígado, el fármaco se utiliza sólo cuando el metronidazol es ineficaz o esta contraindicado. La cloroquina es ineficaz contra la amibiasis intestinal debido a que esta se absorbe casi completamente en el intestino delgado y en la pared alcanza sólo bajas concentraciones. Las manifestaciones tóxicas están relacionadas primeramente con el sistema cardiovascular; esto incluye hipotensión, vasodilatación, supresión de la función miocárdica, anomalías electrocardiográficas y eventualmente paro cardíaco. Dosis mayores a 5 g usualmente son fatales (Tracy y Webster, 1996).

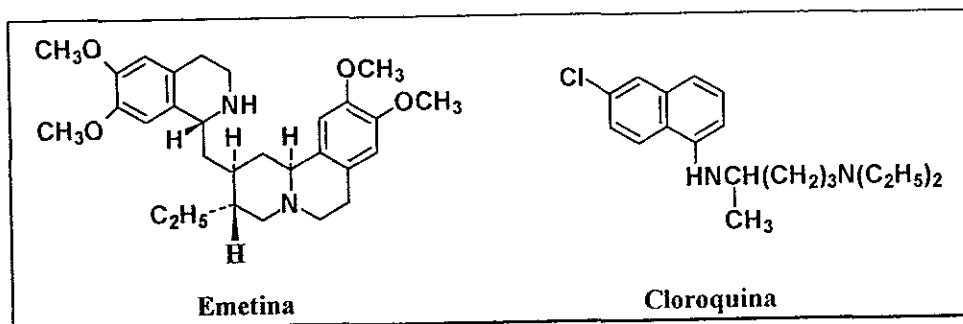


FIGURA 2. Estructuras de la emetina y cloroquina.

2.1.4. Amebicidas de acción múltiple.

Metronidazol y ordinazol (figura 3). Estos fármacos constituyen los únicos que son amebicidas de acción sistémica e intestinal, es decir que son eficaces en todas las localizaciones de la amibiasis. El metronidazol se puede considerar como un profármaco debido a que necesita de una activación metabólica por parte de los microorganismos sensibles. Una vez que se difunde en el interior de ellos y de las células, el grupo nitro capta electrones de las proteínas transportadoras de electrones con potenciales redox negativos suficientemente pequeños. Los efectos adversos sólo

en contadas ocasiones alcanzan intensidad suficiente para interrumpir el uso del fármaco, las más comunes son cefaleas, náuseas, xerostomía, y un regusto metabólico. En ocasiones surgen vómitos, diarrea, y molestias abdominales. El metronidazol a dosis altas y por largos períodos a mostrado ser carcinógeno en roedores y bacterias es mutágeno (Tracy y Webster, 1996).

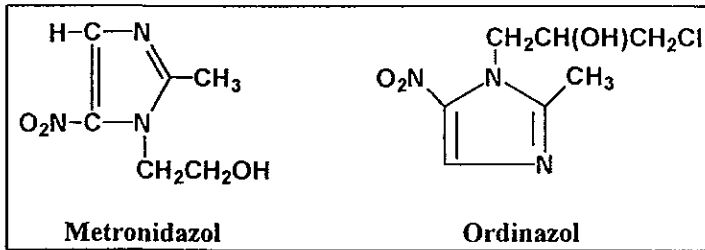


FIGURA 3. Estructuras del metronidazol y ordinazol.

2.2. Giardiasis.

La giardiasis, es causada por el protozoo flagelado *Giarda lamblia*, es la infección intestinal por protozoo señalada con mayor frecuencia en países desarrollados y subdesarrollados. Muchos sujetos infectados se hallan asintomáticos, no obstante, los microorganismos en cuestión pueden producir casos aislados o epidemias de diarrea que puede ser transitoria o persistente. A veces, se detecta mal absorción que se manifiesta por esteatorrea y pérdida ponderal. La infección es una consecuencia de la ingestión de quistes, muy frecuentemente por contaminación fecal del agua o de los alimentos, en individuos que viajan a zonas endémicas. Los andariegos y otras personas similares se infectan al beber agua de los lagos y corrientes contaminados, en tanto que los brotes comunitarios son consecuencia de la contaminación de los abastos centrales de agua. No se necesita la intervención de un huésped intermediario, pero algunas especies de mamíferos sirven como reservorios de la infección. La transmisión de un ser humano a otro es particularmente frecuente en niños, centro de cuidados diurnos y salas de cunas, y también entre otros sujetos internados en diversas instituciones y varones homosexuales. Los quistes ingeridos se transforma en trofozoitos en el contenido duodenal (Tracy y Webster, 1996). Estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad en México, registraron 30648 casos hasta semana 37 de 1996 (DGE, 1996).

2.2.1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la giardiasis.

Los fármacos utilizados para el tratamiento de la *G. lamblia* son la quinacrina y el metronidazol.

Quinacrina (figura 4). Es un derivado ancridinico que se utilizó ampliamente como antipalúdico, pero ha sido sustituido por fármacos nuevos y más inocuos. Este compuesto es muy eficaz contra la *G. lamblia*, con este fármaco se logra hasta un 90% de curación como mínimo en toda las personas que padecen la infestación. La quinacrina se absorbe en forma muy fácil por el tracto intestinal aun en presencia de diarrea muy intensa, se distribuye ampliamente en todos los tejidos y se elimina muy lentamente por lo que el fármaco se acumula en forma progresiva. Los efectos tóxicos de la quinacrina son con frecuencia cefaleas, mareos y vómitos, así como también discrasias sanguíneas, urticaria y dermatitis exfoliativa (Webster, 1991). Otro de los fármacos utilizados en contra de *G. lamblia* es el metronidazol.

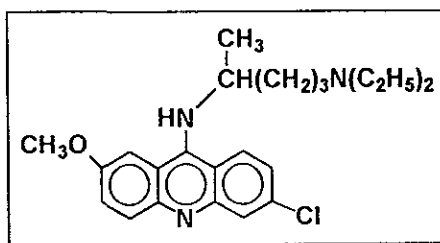


FIGURA 4. Estructura de la quinacrina.

2.3. Plantas amebicidas y/o giardicidas.

Dentro de la medicina tradicional existen algunas plantas que son utilizadas en el tratamiento de la parositosis por *E. histolytica* y *G. lamblia*. En la tabla 1 se mencionan algunas de estas plantas.

Tabla 1. Plantas con actividad amebicida y/o giardicida.

ESPECIE VEGETAL.	EXTRACTO, GRUPO QUÍMICO O PRINCIPIO ACTIVO.	PROTOZOARIO DE PRUEBA.	REFERENCIA.
<i>Berberis arista</i>	Etanólico	<i>Entamoeba histolytica</i>	Sohni <i>et al</i> , 1995
<i>Brucea javanica</i>	Extractos sucesivos con varios disolventes, quasinoides	<i>E. histolytica</i>	Wright <i>et al</i> , 1998
<i>Castela tortuosa</i>	Extracto total	<i>Giardia lamblia</i>	Ponce-Macotela <i>et al</i> , 1994
<i>Cupressus sempervirens</i>	Extracto total	<i>G. lamblia</i>	Ponce-Macotela <i>et al</i> , 1994
<i>Justicia spicigera</i>	Extracto total	<i>G. lamblia</i>	Ponce-Macotela <i>et al</i> , 1994
<i>Hematoxilon campechanum</i>	Extracto total	<i>G. lamblia</i>	Ponce-Macotela <i>et al</i> , 1994
<i>Lipia beriandieri</i>	Extracto total	<i>G. lamblia</i>	Ponce-Macotela <i>et al</i> , 1994
<i>Magnifera indica</i>	Extracto total	<i>G. lamblia</i>	Ponce-Macotela <i>et al</i> , 1994
<i>Parthenium hysterophorus</i>	Partenia (sesquiterpeno)	<i>E. histolytica</i>	Sharma and Bhutani, 1998
<i>Piper longum</i>	Extracto etanólico, fraccionamiento con varios disolventes	<i>E. histolytica</i>	Ghoshal <i>et al</i> , 1996
<i>Psidium guajava</i>	Extracto total	<i>G. lamblia</i>	Ponce-Macotela <i>et al</i> , 1994

Tabla 1. Plantas con actividad amebicida y/o giardicida (continuación).

ESPECIE VEGETAL	EXTRACTO, GRUPO QUÍMICO O PRINCIPIO ACTIVO	PROTOZOARIO DE PRUEBA	REFERENCIA
<i>Punica granatus</i>	Extracto total	<i>G. lamblia</i>	Ponce-Macotela <i>et al</i> , 1994
<i>Simaruba amara</i>	Extracto total	<i>E. histolytica</i>	Wright <i>et al</i> , 1988
<i>Strychnos usambarensis</i>	Alcaloides indólicos	<i>E. histolytica</i>	Wright <i>et al</i> , 1991
<i>Tabemaemontana contorta</i>	Extractos etanolicos	<i>E. histolytica</i>	Van Beek <i>et al</i> , 1984
<i>Tabemaemontana psorocarpa</i>	Extractos etanolicos	<i>E. histolytica</i>	Van Beek <i>et al</i> , 1984
<i>Tinospora cordifolia</i>	Extractos etanolicos	<i>E. histolytica</i>	Sohni <i>et al</i> , 1995
<i>Tylophora indica</i>	Fracción alcohólica y de alcaloides	<i>E. histolytica</i>	Bhutani <i>et al</i> , 1987
<i>Tylophora hirsuta</i>	Fracción alcohólica y de alcaloides	<i>E. histolytica</i>	Bhutani <i>et al</i> , 1987
<i>Acalypha phleoides</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997
<i>Castela texana</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997

Tabla 1. Plantas con actividad amebicida y/o giardicida (continuación).

ESPECIE VEGETAL	EXTRACTO, GRUPO QUÍMICO O PRINCIPIO ACTIVO	PROTOZOARIO DE PRUEBA	REFERENCIA
<i>Cnidocolus tehuacanensis</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997
<i>Dyssodia papposa</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997
<i>Geranium niveum</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997
<i>Hellianthella quinquenervis</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997
<i>Kohleria deppeana</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997
<i>Lepidium virginicum</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997
<i>Ratibida latipaliaris</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997
<i>Teloxys graveolens</i>	Extracto metanólico	<i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	Calzada <i>et al</i> , 1997

2.4. Antecedentes del género *Zanthoxylum*.

2.4.1. Taxonomía.

El género *Zanthoxylum* comprende alrededor de 900 especies. Este género pertenece a la familia de las *Rutaceas* la cual está relacionada con cuatro familias: *Rutoideae*, *Todaidae*, *Rhabdoideae* y *Aureniloideae* (Heywood, 1979).

Las especies del género *Zanthoxylum* más comunes son las siguientes: *Z. arborescens*, *Z. fagara*, *Z. limoncello* y *Z. caribeaum* (Heywood, 1979).

Una descripción general de *Zanthoxylum* la hace Maximino Martínez como sigue:

Hay variedad en la forma en la que se presenta este género, se puede encontrar como arbusto o como árbol, el arbusto llega a tener hasta 3 m, el árbol va desde 3-4.5 m. Los arbustos presentan espinas; hojas imparidas, algunos con flores pequeñas y frutos foliculados (Martínez, 1969).

2.4.2. Distribución.

El género *Zanthoxylum* se encuentra ampliamente distribuido, al sur de América; México, E.U.A., África y Australia (Heywood, 1970).

2.4.3. Fitoquímica.

Del género *Zanthoxylum* se tienen muchos antecedentes fitoquímicos, en los que se describen una gran variedad de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, lignanos, amidas ácidas insaturadas y flavonoides. En la tabla 2 se presentan algunos metabolitos aislados de este género y su referencia correspondiente.

Tabla 2. Metabolitos aislados del género *Zanthoxylum*.

COMPUESTO.	REFERENCIA.
Zanthoximulina.	Shuwu-Jen, 1993.
Huajioasimulina.	Shuwu-Jen, 1993.
Simulaquinolina.	Shuwu-Jen, 1993.
Acutifolina.	Aruuda <i>et al</i> , 1992.
Acutifolidina.	Aruuda <i>et al</i> , 1992.
O-metilacutifolina.	Aruuda <i>et al</i> , 1992.
Palmitato de acutifolina	Aruuda <i>et al</i> , 1992.
4-(2-N-metiltiraminil)-(Z)-1,2-epoxi-2-metilbutil-3-eno.	Marcos <i>et al</i> , 1990.
N,N'-dimetilculantramina.	Marcos <i>et al</i> , 1990.
O-metilafilramina.	Marcos <i>et al</i> , 1990.
6-metoxi-5,6-dihidronitidina.	Monroe <i>et al</i> , 1987.
Dioxamin.	Adesina y Reichs, 1989.
Dioxamida.	Adesina y Reichs, 1989
Quercetin-3', 4'-dimetil-7-O- β -glucopiranosido.	Xion <i>et al</i> , 1995.
Tamarixetin-3,7-bis-O- β -glucopiranosido.	Xion <i>et al</i> , 1995.
Meso-2,3-bis(3,4,5-trimetoxibenzil)-1,4-butanodio.	Noguera <i>et al</i> , 1994.
4-acetoxi-2,3-bis(3,4,5-trimetoxibenzil)-butanol.	Noguera <i>et al</i> , 1994
Meridinol.	Amaro-Luis <i>et al</i> , 1988
3-oxo-skimiarepina.	Arruda <i>et al</i> , 1994.
Lignano de tipo furano.	Arruda <i>et al</i> , 1994.
5-hidroxi-7-metoxi-2-pentilcromona.	Jiménez <i>et al</i> , 1989.
Fenil propanol alantoidol.	Wine-show <i>et al</i> , 1994.
Alantoidol.	Wine-show <i>et al</i> , 1994.

2.4.4. Actividad biológica de plantas del género *Zanthoxylum*.

Las plantas medicinales, tienen actividad biológica localizada en determinadas partes de su estructura, en la raíz, tallo, hojas fruto o corteza. El género *Zanthoxylum* presenta actividad biológica en hojas, corteza y raíz en la tabla 3 se presentan algunos de los usos terapéuticos que este género presenta.

Tabla 3. Actividad biológica que presentan algunas plantas del género *Zanthoxylum* (Jiménez, 1989).

ESPECIE	USO
<i>Z. zanthoxyloide</i>	Se ha reportado que en las raíces existen compuestos con actividad pungente.
<i>Z. setulosum</i>	Repelente de insectos.
<i>Z. fagara</i>	Del extracto de raíces, se encontró propiedades antimicrobianas. Además devuelve el color al agar sangre.
<i>Z. avicennae</i>	En Hong Kong, lo usan como desinflamatorio de la garganta y para la ictericia.
<i>Z. caribaeum</i>	Astringente, cáustico, dolor de cabeza, diarrea, entumecimiento de labios y lengua, para tratar la lepra, reumatismo, dolor y sarna.
<i>Z. Plerota</i>	Anticonvulsivo, antipirético, eripsela, incordios.

2.5. Generalidades de *Zanthoxylum liebmannianum*.

2.5.1. Descripción.

La descripción encontrada en la literatura para *Z. liebmannianum* señala las siguientes características (Stanley, 1920).

Es un arbusto o árbol pequeño de 3-4.5 m de altura, y es con espinas esparcidas, folíolos de 1.3 cm de largo, verde amarillento y granulados, con dientes muy pequeños, semillas negras lustrosas brillantes, originalmente fue descrita de San Juan municipio del estado de Oaxaca.

2.5.2. Distribución.

En México se localiza al norte y centro de la república hasta llegar al sur de Oaxaca, Michoacán, Hidalgo, Puebla y Chiapas (Stanley, 1920).

2.5.3. Fitoquímica.

De la corteza y hojas del *Zanthoxylum liebmannianum* (Colopahtle) se tienen trabajos previos que describen el aislamiento de los siguientes metabolitos: un lignano (sesamina), dos esteroides (β -sitosterol, β -(D)-glucósido de β -sitosterol) (Jiménez, 1989), un sesquiterpeno (β -hidroxijunennol) y una isobutilamida (α -sanshool) (Navarrete y Hong, 1996, Navarrete, *et al*, 1987)

2.5.4. Actividad biológica.

Los extractos de *Zanthoxylum liebmannianum* se han sometido a ensayos para evaluar su actividad amebicida. En este estudio se determinó que existe un efecto sobre las enzimas hexosinasa y fosfoglucomutasa de *Entamoeba histolytica* (Jiménez, 1989). También el cocimiento de la corteza de *Zanthoxylum liebmannianum* disminuye la cuenta de huevecillos de nemátodos en borregos y se ha logrado identificar al α -sanshool como el principio activo nematocida de esta planta en contra del *Ascaris suum* (Navarrete y Hong, 1996).

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Realizar el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad amebicida y giardicida del extracto alcohólico de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* (Colopahtle), y de los compuestos aislados y caracterizados del mismo.

3.2. Objetivos específicos.

- a). Colecta de la planta de *Zanthoxylum liebmannianum*.
- b). Preparación de los extractos alcohólicos.
- c). Separación cromatográfica de los extractos y purificación de los compuestos.
- d). Evaluación de la actividad amebicida de los extractos y sustancias.
- e). Identificación de los compuestos aislados por medio de las constantes físicas y espectroscópicas.

4. HIPÓTESIS.

Los extractos alcohólicos de las hojas de *Z. liebmannianum* presentarán actividad amebicida y giardicida así como las fracciones y compuestos aislados del mismo.

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Realizar el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad amebicida y giardicida del extracto alcohólico de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* (Colopahtle), y de los compuestos aislados y caracterizados del mismo.

3.2. Objetivos específicos.

- a). Colecta de la planta de *Zanthoxylum liebmannianum*.
- b). Preparación de los extractos alcohólicos.
- c). Separación cromatográfica de los extractos y purificación de los compuestos.
- d). Evaluación de la actividad amebicida de los extractos y sustancias.
- e). Identificación de los compuestos aislados por medio de las constantes físicas y espectroscópicas.

4. HIPÓTESIS.

Los extractos alcohólicos de las hojas de *Z. liebmannianum* presentarán actividad amebicida y giardicida así como las fracciones y compuestos aislados del mismo.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1. Material de vidrio.

- 1.- Placas para cromatografía en capa fina de 3x5 cm.
- 2.- Columnas de vidrio para cromatografía en columna de diferentes tamaños.
- 3.- Vasos de precipitado de 1000, 250, 100 y 50 mL.
- 4.- Matraces bola de boca esmerilada de 1000, 500, 250 y 100 mL.
- 5.- Matraces erlenmeyer de 500, 250, 125, 50 y mL.
- 6.- Matraces kitazato de 500, 250 y 125 mL.
- 7.- Embudos de separación de 1000, 500, 250 y 100 mL.
- 8.- Espátulas de diferentes tamaños.
- 9.- Probetas de 1000, 500, 100 y 50 mL.
- 10.- Barra magnética para agitación.
- 11.- Embudos buchner de diferentes tamaños.
- 12.- Embudos de vidrio de tallo corto y largo.
- 13.- Embudo girsch de talle corto.
- 14.- Soportes universales.
- 15.- Refrigerantes de diferentes tamaños.
- 16.- Pinzas de tres dedos con nuez.
- 17.- Trampa para vacío.
- 18.- Anillos de fierro de diferentes tamaños.
- 19.- Tubos capilares

5.2.Reactivos.

- 1.- Sílice 70-230 (tamaño de partícula de 0.063-0.20 mm) para cromatografía en columna.
- 2.- Placas de gel sílice para cromatografía en capa fina.
- 3.- Disolventes orgánicos: hexano, cloroformo, acetona, acetato de etilo, metanol, etanol y cloruro de metileno.
- 4.- Carbonato de sodio.
- 5.- Cloruro de sodio.
- 6.- Hidróxido de sodio.
- 7.- Sulfato de sodio anhídrido.
- 8.- Ácido clorhídrico.
- 9.- Ácido sulfúrico.
- 10.- Hidróxido de amonio.
- 11.- Permanganato de potasio.
- 12.- Sulfato cérico amoniacal.
- 13.- Reactivos para identificación de alcaloides.
- 14.- Ácido acético.
- 15.- Sephadex G-25 para filtración sobre gel (Aldrich).
- 16.- Nitrato de bismuto.
- 17.- Ácido nítrico.
- 18.- Yoduro de potasio.
- 19.- Cloruro de plata.
- 20.- Agua destilada.

5.3. Equipo.

- 1.- Evaporador rotatorio Büchi RE 111.
- 2.- Parrilla de calentamiento.
- 3.- Bomba para vacío.
- 4.- Lámpara de luz ultravioleta.
- 5.- Balanza analítica.
- 6.- Balanza semianalítica.
- 7.- Aparato Fisher -Jones para punto de fusión Modelo II 684
- 8.- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear, Varian XL-300Gs.
- 9.- Espectrofotómetro de infrarrojo modelo Perkin Elmer 16 F PC FT.
- 10.- Espectrómetro de masas modelo Hewlett Packard 5989A.

5.4. Material vegetal.

La planta utilizada para este estudio fue colectada en San Andrés Cacaloapan, municipio de Tehuacán Puebla, la recolección se hizo en septiembre de 1995, una muestra se depositó en el "Herbario de plantas útiles, Efraín Hernández X", de la Universidad Autónoma Chapingo (xolo-198126) y fue identificada por el M. en C. Erik Estrada del departamento de Fitotecnia de la misma universidad.

El material se secó a la sombra a temperatura ambiente, posteriormente se pulverizó en un molino manual.

5.5. Método de extracción.

a) Un lote de 2.403 kg. de hojas secas y molidas, se extrajeron tres veces por maceración en forma sucesiva con 7 litros de hexano, 7 litros de etanol y con 7 litros de metanol, manteniéndose a temperatura ambiente por tres días con cada disolvente según se muestra en figura 5. Al evaporar dichos disolventes se obtuvieron 104 g de extracto hexánico, 39 g de extracto etanólico y 260 g de extracto metanólico.

b) Otro lote de 3.290 kg. de hojas secas y molidas, se extrajeron en forma sucesiva y con calentamiento a reflujo durante 4 horas con 8 litros de hexano y 8 litros de etanol tres veces con cada disolvente y de manera similar al esquema mencionado anteriormente. Obteniéndose 150 g de extracto hexánico y 373 g de extracto etanólico.

5.6. Fraccionamiento.

Los 39 g del extracto etanólico obtenido por maceración se preadsorbieron en 40 g de sílica gel 60 de 70 a 230 mallas. Posteriormente se procedió a separarlo por cromatografía en columna empacada con 400 g de gel de sílice. La columna se eluyó primero con hexano y se incrementando gradualmente la polaridad con acetato de etilo y finalmente acetona. Se colectaron un total de 270 fracciones de 250 mL.

De los 264 g del extracto metanólico obtenido por maceración, sólo fueron utilizados 188.3 g los cuales se preadsorbieron en 188.3 g de sílica gel 60 de 70 a 230 mallas. Posteriormente se procedió a separar por cromatografía en columna empacada con 1883.0 g de gel de sílice. La columna se eluyó primero con hexano incrementando gradualmente la polaridad con acetato de etilo y finalmente acetona. Se colectaron un total de 310 fracciones de 500 mL cada una.

Los 373 g. del extracto etanólico obtenidos por reflujo de las hojas del segundo lote, se preadsorbieron con 373 g de gel de sílice, posteriormente se procedió a separar por cromatografía en columna empacada con 3730 g de gel de sílice. La columna se eluyó primero con hexano, mezclas de acetato de etilo hexano en diferentes proporciones, acetato de etilo y acetona. Se colectaron un total de 280 fracciones de 500 mL cada una. En esta columna se realizaron cambios rápidos de polaridad.

5.7. Análisis de las fracciones.

Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina, utilizando placas de aluminio recubiertas con sílica gel. Dichas placas fueron analizadas con una lámpara de luz ultravioleta y posteriormente reveladas con sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico 2N. El color fue desarrollado utilizando una placa de calentamiento a 110 °C. En el desarrollo de las placas se utilizaron mezclas de varios disolventes y en distintas proporciones. Las fracciones semejantes fueron reunidas de acuerdo al patrón que desarrollaron las cromatoplacas.

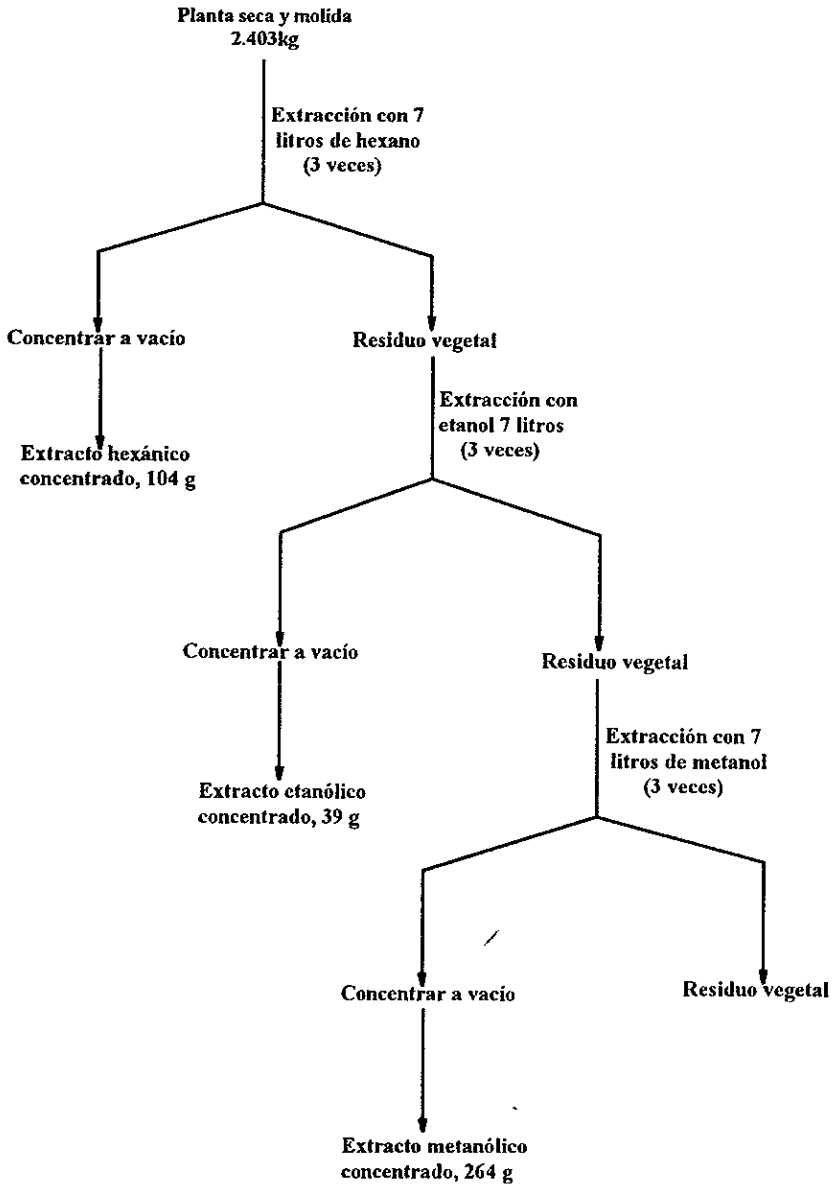


FIGURA 5. Esquema de la preparación de los extractos de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* (Colopahtle).

5.8. Identificación de los compuestos.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher -Jones Modelo II 684 y no están corregidos. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , a 300 Mhz, se realizaron en un espectrómetro Varian Associates XL-300Gs, utilizando CDCl_3 y $\text{DMSO}-d_6$ como disolventes y utilizando TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en partes por millón (ppm) respecto al TMS. Los espectros de infrarrojo se determinaron en un Espectrofotómetro Perkin Elmer 16 F PC FT en celdas de cloruro de sodio, utilizando cloroformo como disolvente y pastillas de bromuro de potasio. Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro Hewlett Packard 5989A por impacto electrónico

5.9. Preparación de derivados acetilados.

Para formar los derivados acetilados de los productos aislados se empleo 1 mL anhídrido acético y 1 mL piridina por cada 100 mg de producto. En todos los casos la mezcla de reacción se dejo 12 horas a temperatura ambiente. Cuando en el medio de la reacción se formaron productos sólidos, éstos fueron separados por filtración y posteriormente lavados con éter etílico; en los otros casos, a la reacción se le agregó hielo, y se realizaron extracciones con acetato de etilo (tres veces) , la fase orgánica fue lavada con solución de HCl al 10 % (tres veces), después con solución saturada de NaHCO_3 (tres veces). Finalmente la fase orgánica fue lavada tres veces con agua y secada con Na_2SO_4 anhidro. El disolvente se filtró y se evaporó (Dominguez, 1985).

5.10. Ensayo biológico *in vitro*.

5.10.1. Parásitos.

Los microorganismos empleados en el ensayo fueron *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. La *E. histolytica* se mantuvo en el medio TYI-S-33, enriquecido con 10% de suero de bovino (Diamond y Bartgis, 1971) y la *G. lamblia* se mantuvo en el medio de cultivo TYI-S-33 modificado y suplementado con 10% de suero de ternero (Cedillo *et al.*, 1991), estos se mantuvieron en condiciones axénicas para tener un crecimiento en fase logarítmica.

5.10.2. Ensayo antiprotozoario.

El ensayo de prueba *in vitro* en contra de *E. histolytica* y *G. lamblia* se realizó usando el método que a continuación se describe (Cedillo-Rivera *et al.*, 1992, Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992): Cada extracto testigo y metabolito secundario aislado (100 mg) se disolvió en 1 mL DMSO y 19 mL de medio de cultivo, los cuales se depositaron en tubos de ensaye, de esta solución se tomaron alícuotas y se llevaron a un volumen final de 4 mL con medio de cultivo, estas alícuotas fueron tomadas de tal forma que la concentración final estuviera en el rango de 25-200 $\mu\text{g/mL}$. Los tubos que contenían incorporado al extracto y al medio, fueron inoculados con *E. histolytica* o *G. lamblia*. Cada inoculación realizada contenía 6×10^3 y 5×10^4 trofozoítos/mL respectivamente. En cada ensayo se incluyó al metronidazol, que es un fármaco estándar amebicida y giardicida, así como un control (medio de cultivo mas trofozoítos y DMSO) y un blanco (medio de cultivo). Posteriormente fueron incubados a 37 °C por 48 hrs. Posteriormente los trofozoítos fueron separados enfriando el medio de cultivo y se tomaron alícuotas de 50 μL de cada tubo, las que se subcultivaron en medio fresco. Finalmente se determinó el número de parásitos con un hemocitómetro y el porcentaje de inhibición del crecimiento de los trofozoítos fue calculado por comparación con el medio de cultivo control. Los resultados fueron confirmados por un método colorimétrico el cual se describe en el párrafo siguiente.

5.10.3. Método colorimétrico.

Los trofozoítos fueron lavados por centrifugación e incubados por 45 min. a 37° C en solución buffer de fosfatos que contenía 0.075% de MMT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) y 250 mg de metasulfato de fenacina. El exceso de colorante fue eliminado por medio de lavados y la sustancia responsable del color desarrollado (formazan) en los trofozoítos fue extraída con una solución de ácido clorhídrico-isopropanol; determinándose las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. En cada caso el porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración, los cuales se transformaron en unidades de probabilidad. Y se determinó la concentración letal 50 (CL₅₀). Los experimentos se realizaron por duplicado y se repitieron tres veces.

6. RESULTADOS.

6.1. Fraccionamiento cromatográfico.

a) fraccionamiento del extracto etanólico obtenido por maceración. Se colectaron un total de 250 fracciones las cuales se resumen en la tabla 4. De las fracciones 23-25 se obtuvo un polvo cristalino el cual fue lavado con acetato de etilo, obteniéndose 0.5 g de compuesto puro presentando este un punto de fusión de 136-139°C el cual fue identificado como β -sitosterol.

De las fracciones 175-182 se obtuvo un polvo amarillo como mezcla de flavonoides (0.5 g), la cual fue purificada por recromatografía en una columna empacada con 52.4 g de gel de sílice, la elución se realizó con cloroformo-metanol (9:1), (8-2), (7-3), (6-4) y 100% de metanol recolectándose un total de 220 fracciones de 30 mL cada una. De las fracciones 131-139, de esta segunda columna eluidas con cloroformo- metanol (8:2) se obtuvieron 0.3 g de un compuesto cromatográficamente homogéneo de punto de fusión 180-186°C, el cual fue identificado como 3-O- β -galactopiranosil quercetina.

b). Del fraccionamiento del extracto metanólico obtenido por maceración se colectaron un total de 310 fracciones, las cuales se resumen en la tabla 5. De las fracciones 21-23 se obtuvo un polvo cristalino que fue lavado con acetato de etilo, resultando 1.5 g de compuesto puro. El punto de fusión de este compuesto fue de 132-134°C, y fue identificado como β -sitosterol.

De la fracción 191 se obtuvo un polvo cristalino el que fue lavado con acetato de etilo, resultando 1.0g de un producto puro, con un punto de fusión de 264-268°C

De la fracción 234 se obtuvo un polvo amarillo como mezcla de flavonoides (2.3 g), que fue purificada por medio de una recromatografía en columna empacada con 200 g de gel de sílice. La elución se realizó con cloroformo-metanol (95:5), (90-10) y 100% de metanol, recolectándose un total de 200 fracciones de 30 mL cada una.

De las fracciones 106-117, eluidas con cloformo-metanol (9:1) se obtuvieron 0.3 g de un compuesto homogéneo cromatográficamente, de punto de fusión 180-186°C el cual se identificó como 3-O- β -galactopiranosil quercetina.

Tabla 4. Resumen de la cromatografía en columna del extracto etanólico obtenido por maceración de hojas de *Zanthoxylum liebmannianum*.

Proporción	Eluyente	No. de fracciones	Fracciones Combinadas	Observaciones
100 %	Hexano	1-4	1-4	Descartadas
9:1	Hexano:AcOEt	5-37	5-15 16-22 23-25 26-37	Descartadas Descartadas β-sitosterol Descartadas
8:2	Hexano:AcOEt	38-141	38-46 47-56 56-66 67-71 72-77 77-86 87-98 99-112 113-120 121-141	Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas
7:3	Hexano:AcOEt	142-150	142-150	Descartadas
6:4	Hexano:AcOEt	151-158	151-158	Descartadas
5:5	Hexano:AcOEt	159-162	159-162	Descartadas
100 %	AcOEt	163-248	163-174 175-181 182-200 201-248	Descartadas Mezcla de flavonoides Descartadas Descartadas
100 %	Acetona	248-270	248-270	Descartadas

Tabla 5. Resumen del fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto metanólico obtenido por maceración de *Zanthoxylum liebmannianum*.

Eluyente	Proporción	No. de Fracciones	Fracciones Combinadas	Observaciones
Hexano	100 %	1-7	1-7	Descartadas
Hexano:AcOEt	9:1	8-141	8-20 21-23 24-32 33-44 45-49 50-67 68-88 89-106 107-141	Descartadas β-sitosterol Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas
Hexano:AcOEt	8:2	142-172	142-148 149-167 168-172	Descartadas Descartadas Descartadas
Hexano:AcOEt	7:3	173-181	173-181	Descartadas
Hexano:AcOEt	5:5	182-190	182-190	Descartadas
AcOEt	100 %	191-266	191 192-195 196-208 209-217 218-233 234 235-266	β-(D)-glucósido de β-sitosterol Descartadas Descartadas Descartadas Descartadas Mezcla de flavonoides Descartadas
Acetona	100 %	267-310	267-290 291-310	Descartadas Descartadas

c). Fraccionamiento del extracto etanólico obtenido por reflujo. Se colectaron un total de 280 fracciones las cuales se resumen en la tabla 6. De la fracción 2 se obtuvo cristales blancos los cuales fueron lavados con acetato de etilo, obteniéndose 0.0712g de compuesto puro, cuyo punto de fusión resulto ser de 113-116⁰C, el cual fue identificado como asarinina.

De las fracciones 5-7, se obtuvo un polvo cristalino blanco, el cual fue lavado con acetato de etilo, resultando 1.5 g de compuesto puro, el cual presentó un punto de fusión de 134-136⁰C, identificándose como β -sitosterol.

De las fracciones 24-28 se obtuvo un polvo amarillo (1.4165 g), el cual fue lavado con metanol y posteriormente con acetona. Del tratamiento anterior se obtuvo 1.0 g de una sustancia cuyo punto de fusión resulto ser de 180-186⁰C, el cual fue identificado como 3-O- β -galactopiranosil quercetina.

De la fracción 260 eluida con acetona se obtuvo un polvo cristalino blanco, el cual fue lavado con etanol, obteniéndose 0.2 g de compuesto puro, el cual se identificó como sacarosa.

Tabla 6. Resumen de la cromatografía en columna del extracto etanólico obtenido por reflujo de *Zanthoxylum liebmannianum*.

Eluyente	Proporción	No. de Fracciones	Fracciones Combinadas	Observaciones
Hexano	100%	1-28	1	Descartada
			2	Asarinina
			3-4	Descartadas
			5-7	β -sitosterol
			8-23	Descartadas
			24-28	3-O- β -galactopiranosil quercetina
Hexano: AcOEt	9 : 1	29-50	29-50	Descartadas
Hexano: AcOEt	8 : 2	51-80	51-80	Descartadas
Hexano: AcOEt	7 : 3	81-120	81-120	Descartadas
Hexano: AcOEt	6 : 4	121-160	121-160	Descartadas
Hexano: AcOEt	5 : 5	161-190	161-190	Descartadas
AcOEt	100%	191-230	191-230	Descartadas
Acetona	100%	231-270	231-259	Descartadas
			260	Sacarosa
			261-270	Descartadas

6.2. Evaluación de la actividad biológica.

La actividad biocida de los extractos alcohólicos de las hojas de *Z. liebmannianum* y los compuesto obtenidos de ellos se evaluó en cultivos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de la actividad biocida de extractos y compuestos evaluados por triplicado, tomando como referencia al metronidazol.

COMPUESTO	<i>Entamoeba histolytica</i>		<i>Giardia lamblia</i>	
	CL ₅₀ µg/mL	I. C.	CL ₅₀ µg/mL	I. C.
Extracto etanólico (maceración)	3.48	3.68-3.28	57.99	58.08-5790
Extracto metanólico (maceración)	63.11	63.4-62.82	184.84	185.26-184.44
Extracto etanólico (reflujo)	41.45	41.68-41.23	156.53	156.85-156.23
β-sitosterol	52.28	52.08-52.68	71.01	71.01-71.30
β-(D)-glucósido de β-sitosterol	82.16	82.00-82.26	61.50	61.10-61.70
Asarinina	19.86	19.76-20.01	35.45	35.15-35.70
3-O-β-galactopiranosil quercetina	96.10	96.57-95.64	85.91	86.01-85.81
Metronidazol	0.22		0.22	

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

7.1. Caracterización de los compuestos aislados.

7.1.1. β -Sitosterol.

En la separación cromatográfica del extracto etanólico, se obtuvieron de las fracciones 23, 24, 25 eluidas con hexano 0.5 g de un compuesto cristalino blanco, con un punto de fusión 132-133°C. En el espectro de infrarrojo (espectro 1) se observan bandas de absorción 3414 cm^{-1} y 1642 cm^{-1} típicos para las vibraciones de hidroxido y alquenos respectivamente. Lo anterior permitió sugerir que este producto natural posee la estructura de un alcohol. Estas observaciones fueron corroboradas con su espectro de RMN-¹H (espectro 2) donde se observaron señales para un hidrógeno vinílico en δ 5.3 (H, dd, J = 0.0145, J = 0.0104) así como un señal ancha en δ 3.5 (H, m) que se asigno a un hidrógeno base de hidroxido. Otro conjunto de señales simples e intensas a campo alto el mismo espectro, sugirieron que esta sustancia correspondía al esqueleto de un esteroil. Al comparar esta sustancia por medio de una cromatografía de capa fina con una muestra autentica de β -sitosterol, se obtuvo un R_f igual para ambas sustancias. Con la información anterior y el punto de fusión descrito en la literatura de 127-128°C se concluyó que se trataba del β -Sitosterol, esteroil muy conocido y ampliamente distribuido en la naturaleza (figura 6).

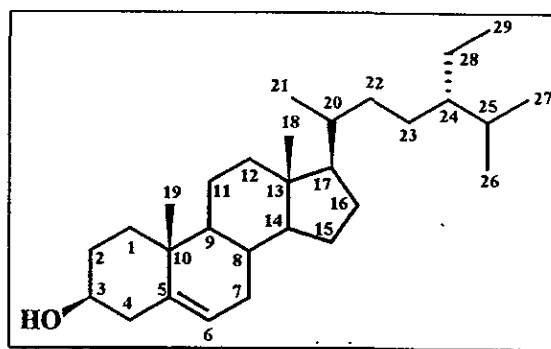
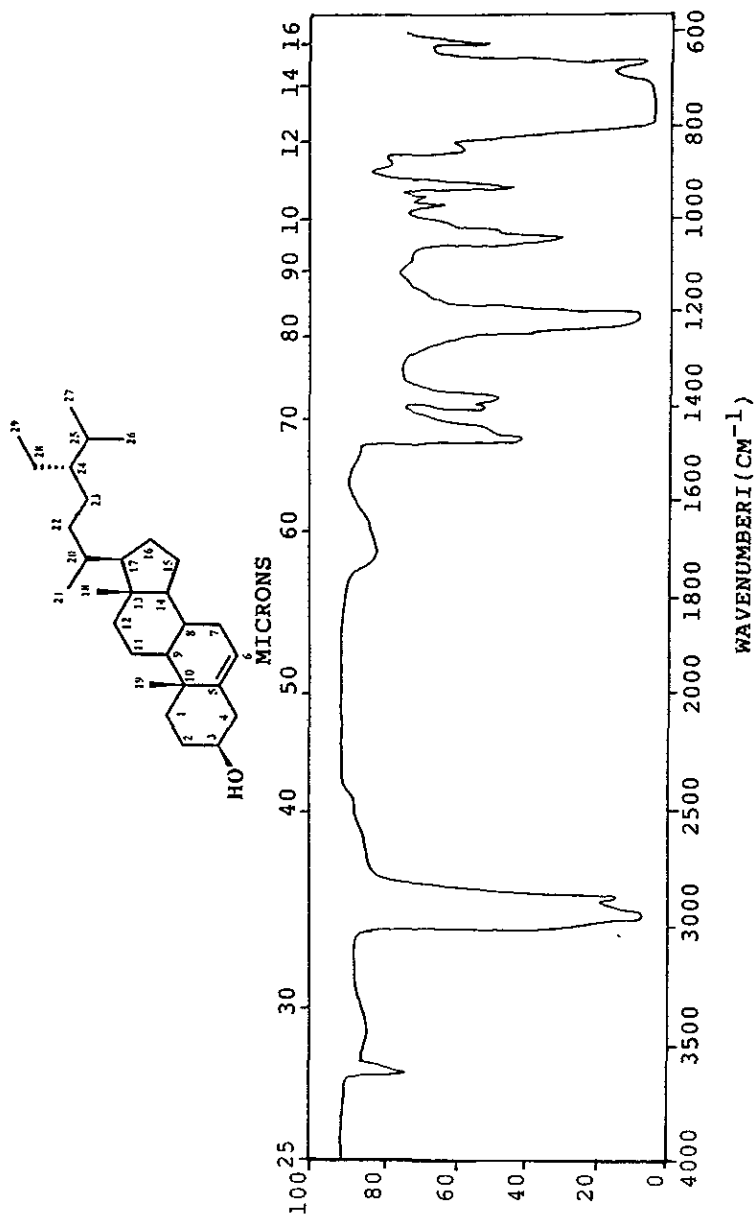
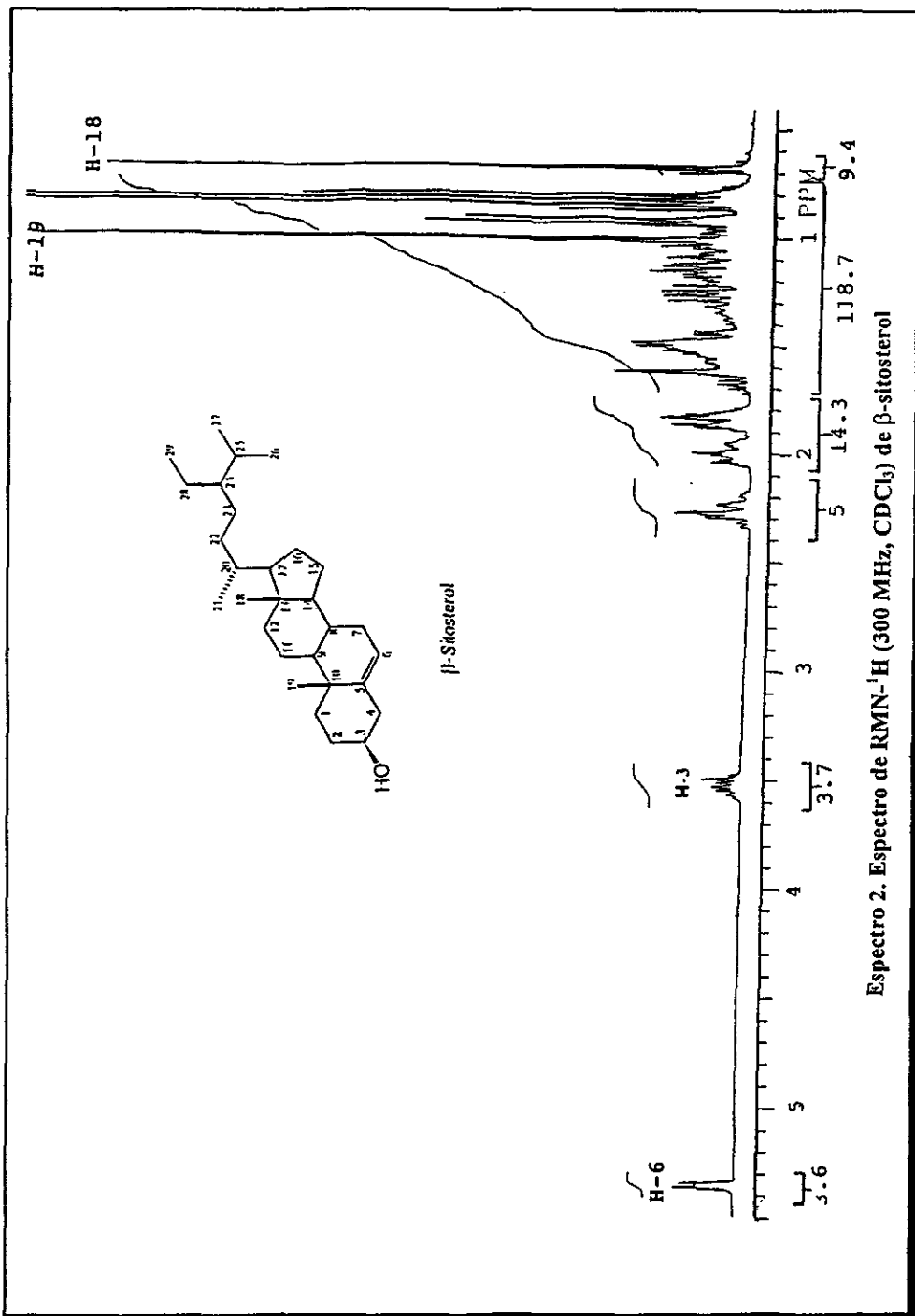


FIGURA 6. Estructura del β -sitosterol



Espectro I. Espectro de infrarrojo del β -sitosterol.



7.1.2. β -(D)-Glucósido de β -sitosterol.

Al eluir la columna del extracto etanólico, con acetato de etilo en las fracciones 164-165 se obtuvo 1 g de un compuesto cristalino blanco de punto de fusión 264°C con descomposición. En el espectro de IR (espectro 3) se observaron bandas de absorción en 3306 y 1642 cm^{-1} típicas de grupos hidroxilo y enlace doble carbono-carbono respectivamente (Dyer, 1978). Lo anterior fue confirmado en el espectro de RMN- ^1H (espectro 4) en el que se observa señales característica en el grupo hidroxido entre δ 3.8 y δ 4.9 además de una señal para hidrógeno vinílico en un δ 5.3 la información anterior permitió inferir que esta molécula esta constituida de dos fragmentos, uno de ellos es β -sitosterol y el otro es un azúcar ya que en el espectro de RMN- ^{13}C (espectro5) se observaron siete señales para carbonos base de oxígeno, uno de ellos correspondió al carbono anomérico típico de la mayoría de los derivados β -glucídicos en 101 ppm (Wehrli y Nishida, 1979). Las otras cinco resonancias de RMN- ^{13}C fueron asignadas al esqueleto de la glucosa por la comparación con los descritos en la literatura (Chang *et al*, 1979) (figura 7).

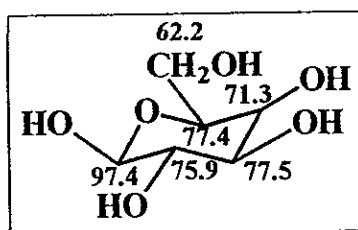


FIGURA 7. Datos de RMN- ^{13}C de la β -glucosa.

El resto de las señales de RMN- ^{13}C (29 resonancias) se asignaron al esqueleto del β -sitosterol en el que las señales del doble enlace (δ 140.4 y δ 121.1) son muy características (figura 8).

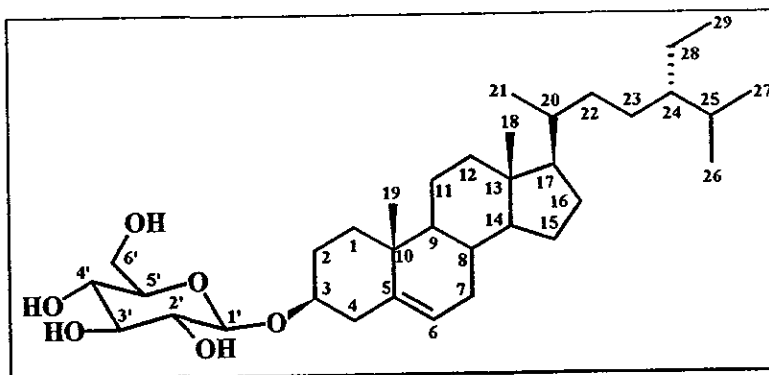
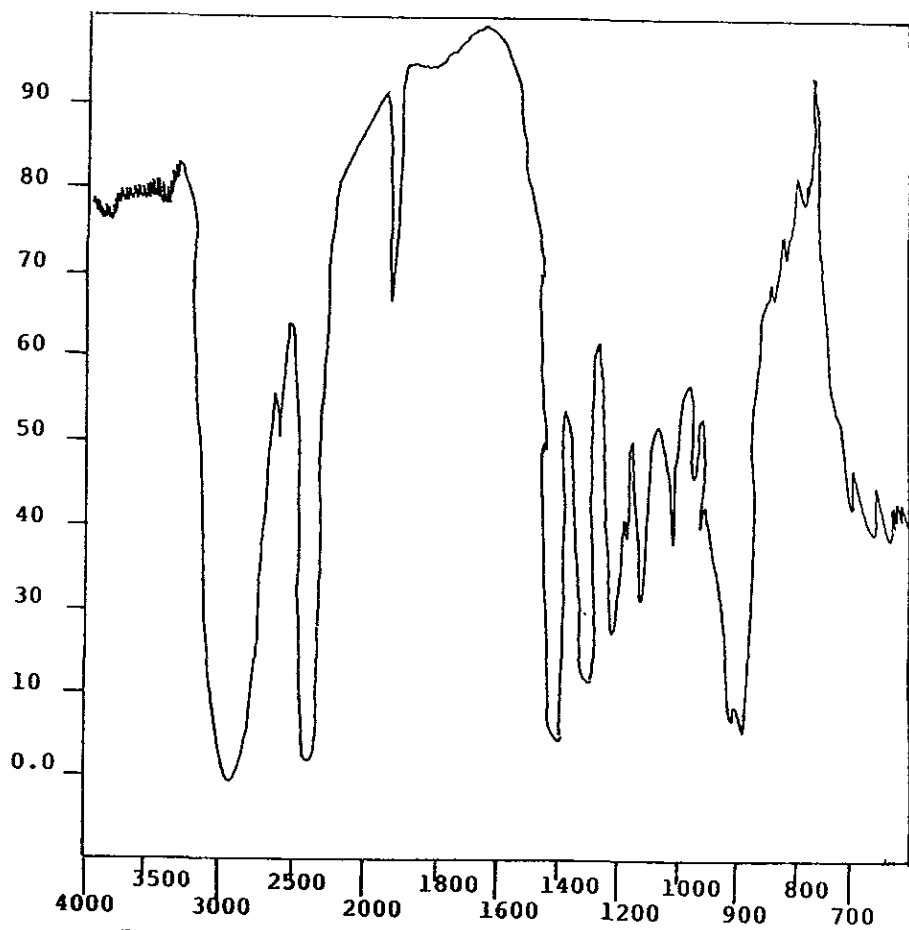
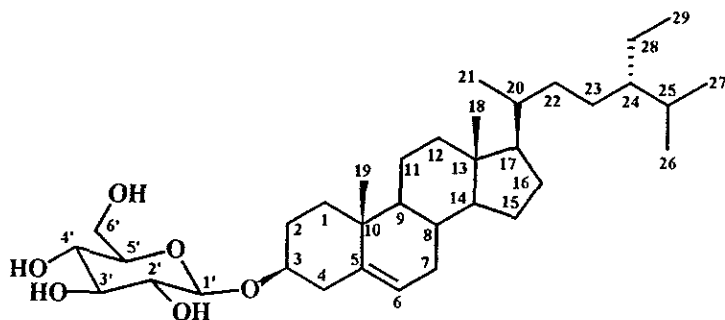
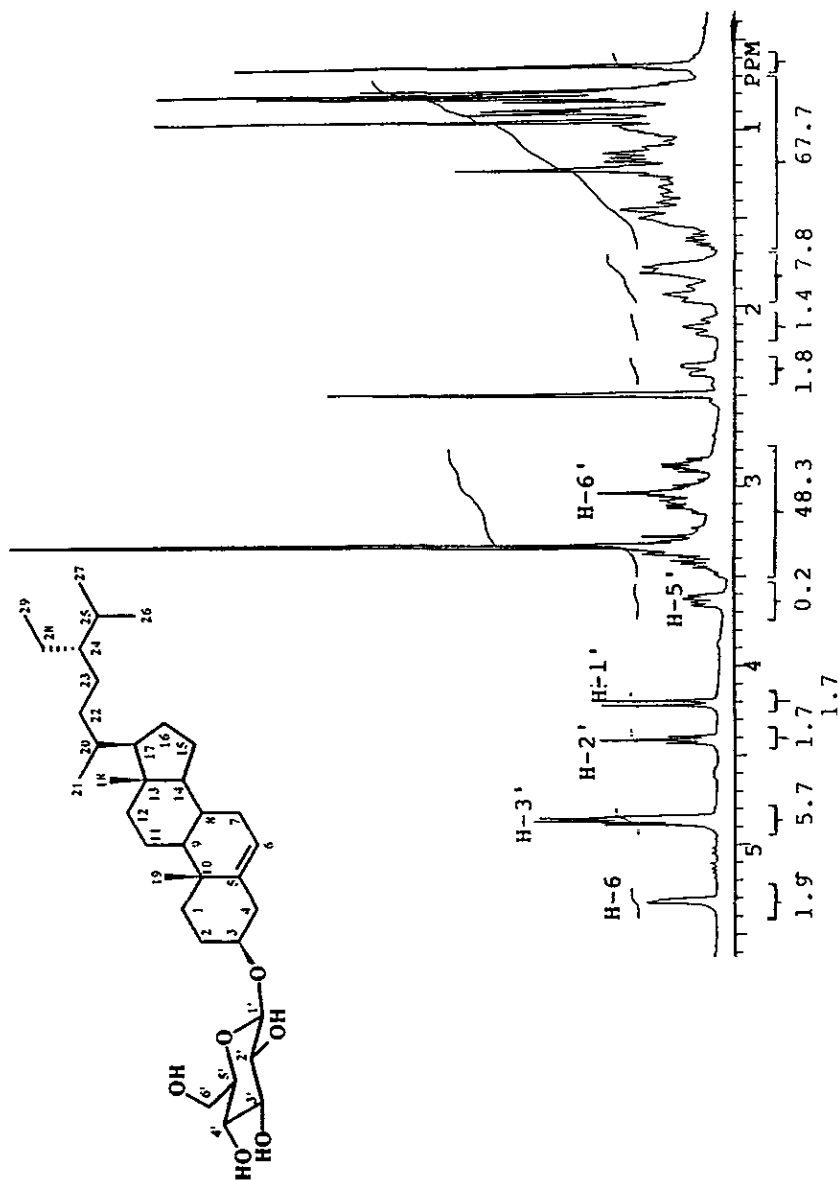


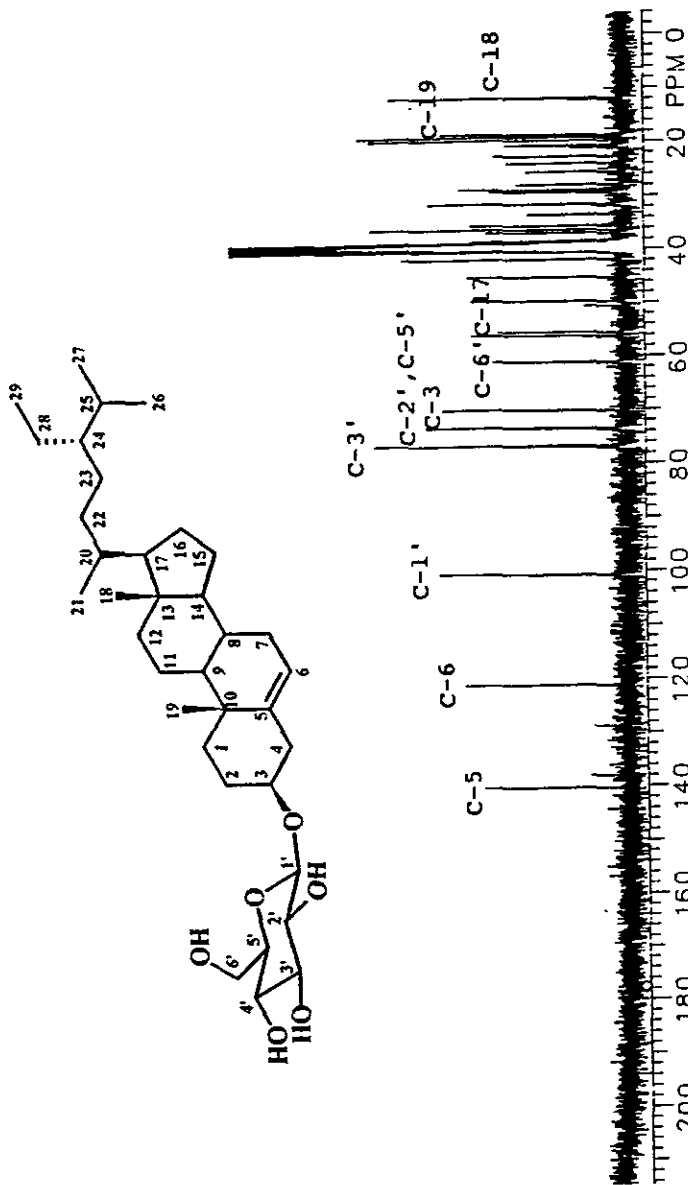
FIGURA 8. Estructura del β -(D)-glucósido de β -sitosterol.



Espectro 3. Espectro de infrarrojo del β -(D)-glucosido de β -sitosterol.



Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) del β -(D)-glucosido de β -sitosterol



Espectro S. Espectro de RMN- ^{13}C (300 MHz, DMSO- d_6) del β -(D)-glucósido de β -sitosterol

7.1.3. Acetilación del β -(D)-glucósido de β -sitosterol.

Esta reacción permitió establecer la identidad de esta sustancia. En el espectro RMN- ^1H (espectro 6) se observan cuatro señales simples entre $\delta 2.0$ y $\delta 2.1$ que corresponden a cuatro metilos de acetato. Lo anterior hizo suponer que la molécula posee cuatro grupos hidroxilo, dichos grupos se asignaron a un fragmento de glucosa ya que en la región de $\delta 3.6$ y $\delta 5.5$ del mismo espectro de RMN- ^1H se observan un conjunto de señales características para la glucosa acetilada. La molécula de glucosa anterior se supuso estar insertada en la posición C-3 como en la mayoría de los glicosidos naturales. El punto de fusión del derivado resulto semejante al descrito en la literatura (pf = 155-157°C). Finalmente la comparación con una muestra de referencia condujo a la identificación inequívoca de esta sustancia como el tetraacetato de β -(D)-glucósido de β -sitosterol (figura 9).

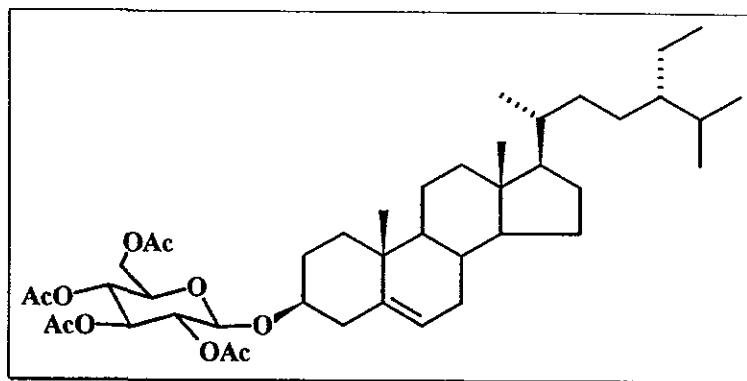
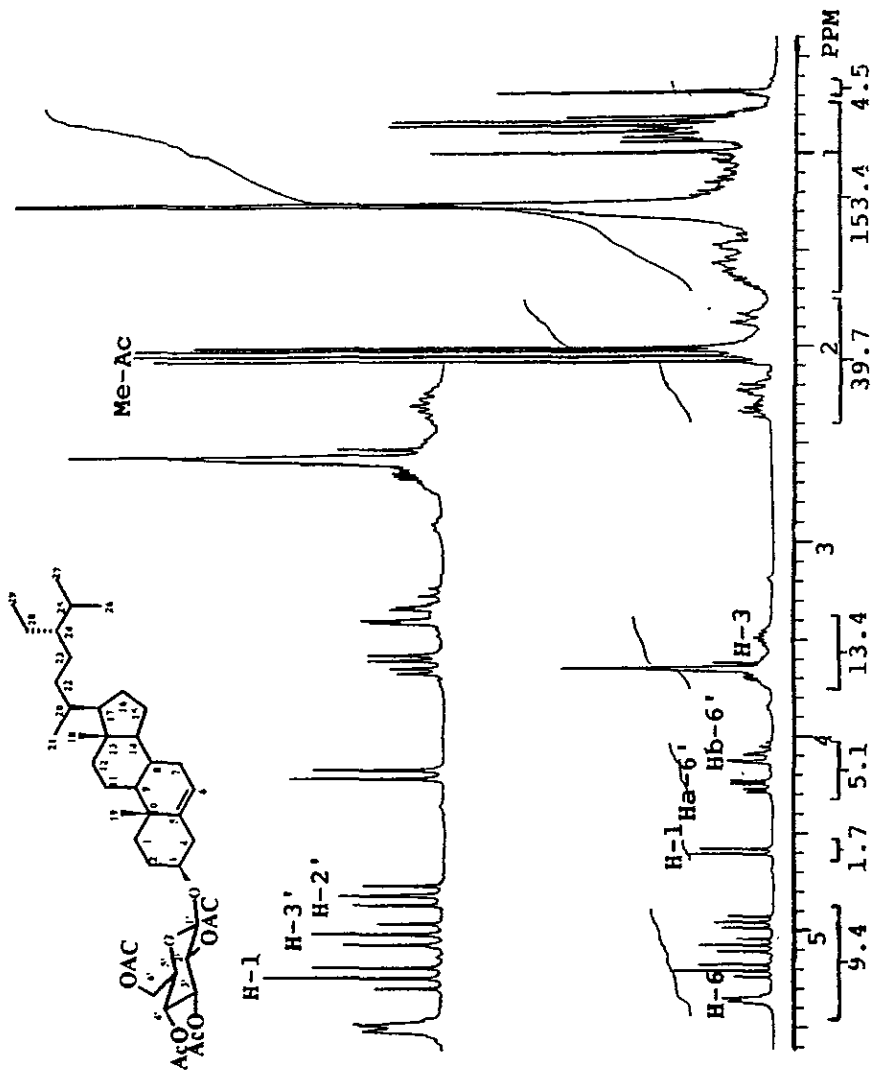


FIGURA 9. Estructura del tetraacetato del β -(D)-glucósido de β -sitosterol.



Espectro 6. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, CDCl_3) del tetraacetato de β -(D)-glucosido de β -sitosterol.

7.1.4. Asarinina.

En el espectro de masas se observó un ion molecular M^+ 354 que calcula para $C_{20}H_{18}O_6$, por otro lado en el espectro de IR. se observa una vibración débil a 1720 cm^{-1} típica de un anillo aromático, además de una banda de fuerte intensidad a 1030 cm^{-1} característica de vibración carbono enlazado a oxígeno (C-O). El mismo espectro de IR muestra una banda a 790 cm^{-1} y 925 cm^{-1} que son señales congruentes con un sistema aromático trisustituido, 1,2,4 (Dyer, 1978).

Lo anterior se confirmó en el espectro de RMN- ^1H (espectro 7), donde se observaron señales para protones aromáticos entre $\delta 6.7$ y $\delta 6.9$ y en el espectro de RMN- ^{13}C (espectro 8) en donde se observaron 20 señales de resonancia. En el experimento de resonancia conocido como DEPT (Espectro 9) se distinguieron además 4 señales para grupos metileno (CH_2), 10 señales para metinos (CH) y se calcularon el resto de las señales para 6 carbonos cuaternarios. En el mismo espectro de RMN- ^1H de esta molécula, se observaron dos señales simples en $\delta 5.94$ y $\delta 5.95$ que integraron para dos protones cada una. Estas señales son típicas de grupos dioximetileno aromático como el del piperonal (Bhacca *et al*, 1962), (figura 10).

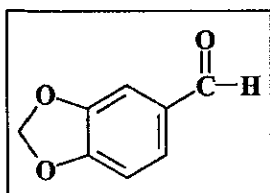


FIGURA 10. Estructura del piperonal.

Por otro lado, se puede inferir que los grupos dioximetileno están ubicados en anillos aromáticos de distinto ambiente magnético, de acuerdo con esta diferencia en sus desplazamientos químicos. Con los datos anteriores, se postularon tres fragmentos que contribuyen a la fórmula estructural de este compuesto (figura 11).

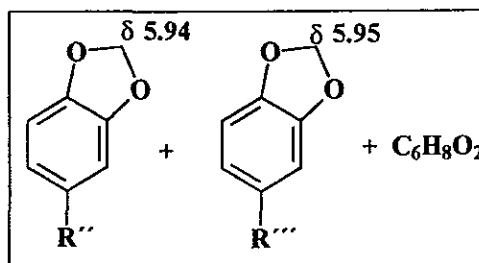
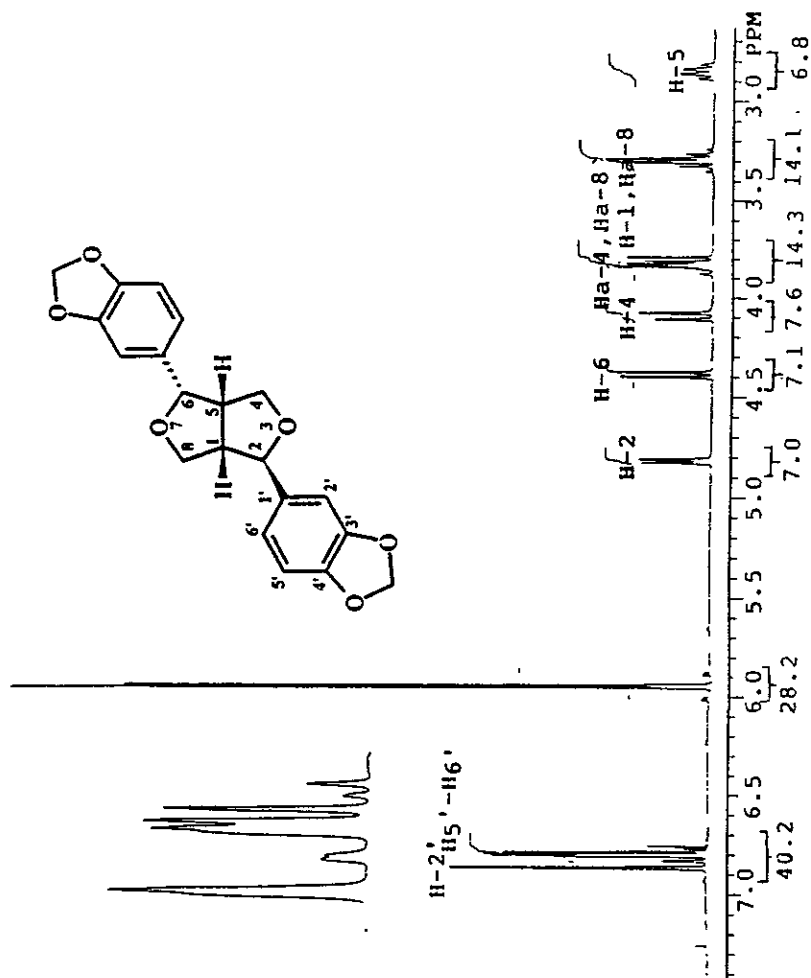
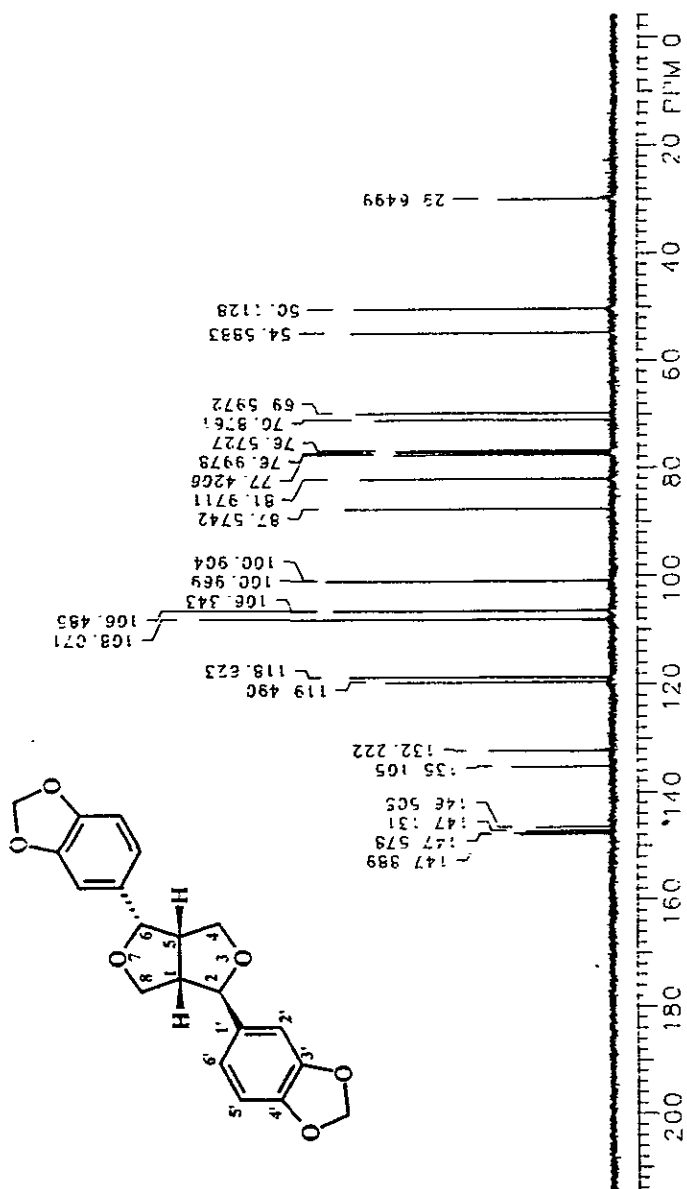


FIGURA 11. Fragmentos que contribuyen con la fórmula estructural propuesta para el producto natural aromático.



Espectro 7. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (300 MHz, CDCl_3) de asarinina



Espectro 8. Espectro RMN-¹³C (300 MHz, CDCl₃) de asarinina

De acuerdo con la composición en metabolitos secundarios de las plantas del género *Zanthoxylum*, se han encontrado metabolitos conocidos como lignanos y todos ellos poseen un arreglo de tipo C₆-C₃-C₃-C₆ (figura 12) como en los casos de la sesamina, asarinina, etc. (Donald y Towers, 1984). Revisando la literatura al respecto, se encontró que esta sustancia coincide en sus datos físicos y espectroscópicos con la asarinina (tabla 8) lignano conocido y aislado previamente del género *Zanthoxylum liebmannianum* (Reyes *et al*, 1991).

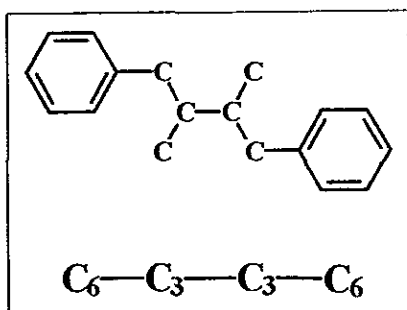
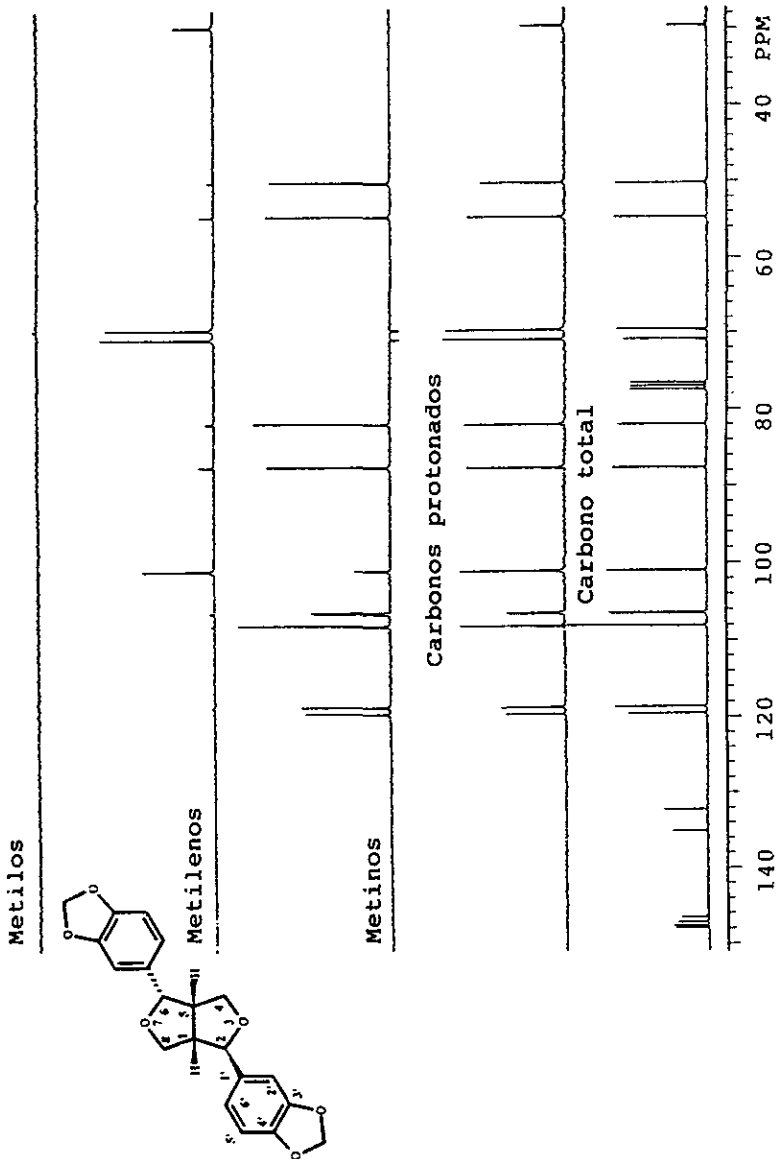


FIGURA 12. Arreglo de tipo C₆-C₃-C₃-C₆

Para confirmar la estructura se determinaron otras constantes mediante la espectroscopia homonuclear COSY (espectro 10), cuyo espectro fue más informativo en cuanto a la disposición estereoquímica de los grupos aromáticos sobre el sistema fusionado de dos anillos de tetrahydrofurano.

En dicho espectro de COSY se observa una señal doble centrada en 4.81 ppm con una J= 5.43 Hz, que corresponde a un hidrógeno base de oxígeno y de anillo aromático dispuesto de manera cis con respecto a otro protón en un anillo heterocíclico de cinco miembros. Por otro lado se observa otra señal doble centrada en 4.38 ppm con una J=7.08, acoplada de manera trans con otro hidrógeno perteneciente a otro anillo heterocíclico de cinco miembros.

Existiendo otra señal doble en 4.1 ppm con una J=9.52 la cual fue asignada a un protón ecuatorial base de oxígeno acoplado con otro protón axial e insaturado sobre el mismo carbono base de oxígeno. Uno de los hidrógenos de la fusión de los anillos aparece en 3.8 ppm como señal múltiple y el otro aparece en 3.3 ppm también como señal múltiple, en la tabla 8 se da un resume de las constantes físicas y espectroscópicas. Quedando plenamente identificada esta sustancia como asarinina (figura 13).



Espectro 9. Espectro DEPT (300 MHz, CDCl₃) de asarinina

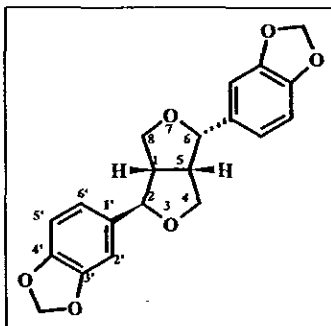
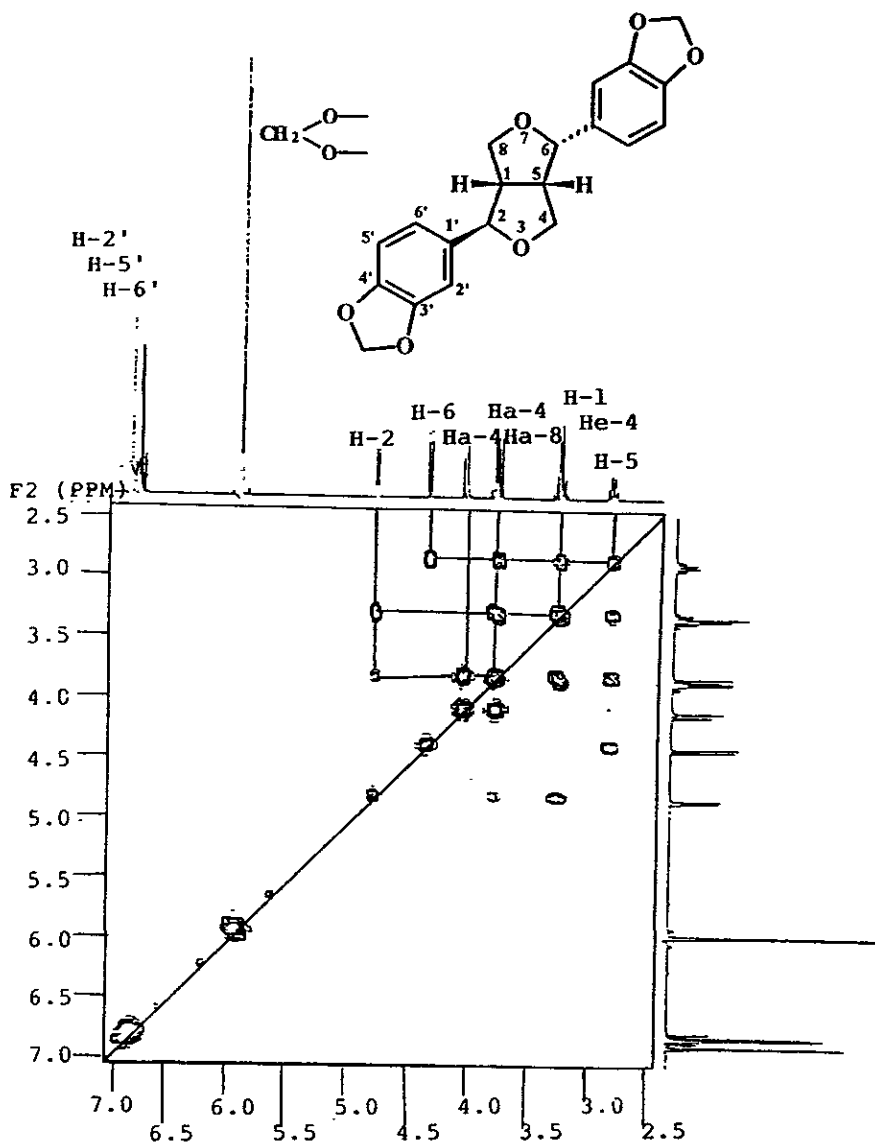


FIGURA 13. Fórmula estructural de la asarinina.

Tabla 8. Constantes físicas y espectroscópicas de la Asarinina

PROPIEDAD	RESULTADOS
p.f.	117 -118 °C
EMIE m / z (100 %)	354 (M ⁺ , 25), 203 (15), 179 (10), 150 (26), 149 (100), 135 (49), 121 (15).
IR (CHCl ₃ , cm ⁻¹)	3010, 2985, 1500, 1475, 1435, 1250, 1030, 925, 790, 630.
RMN- ¹ H (300MHz CDCl ₃ , ppm)	2.85 (1H, m, H-5), 3.3 (1H, m, H-1), 3.85 (2H, m, H-4a y H-8a), 4.08 (1H, d, J = 6.9Hz, H-4 _a), 4.38(1H, d, J = 7.1Hz, H-6), 4.81(1H, d, J = 6.43Hz, H-2), 5.93 (2H, s, -O-CH ₂ -O), 5.95 (2H, s, -O-CH ₂ -O), 6.75-7.05 (3H, m, H-5', H-6' y H-2').
RMN- ¹³ C (300MHz CDCl ₃ , ppm)	29.6 (t, C-), 50.10 (d, C-8), 54.6 (d, C-1), 69.6 (t, C-8), 70.9 (t, C-4), 82.0 (d, C-2), 87.6 (d, C-6), 100.9 (t, -O-CH ₂ -O), 101.0 (t, -O-CH ₂ -O), 106.3 (d, C-2'), 106.5 (d, C-2''), 108.1 (d, C-5'), 118.6 (d, C-6'), 119.5 (d, C-6''), 132.2 (s, C-1'), 135.1 (s, C-1''), 146.5 (s, C-3'), 147.1 (s, C-3''), 147.6 (s, C-4'), 147.9 (s, C-4'').



Espectro 10. Espectro COSY (300 MHz, CDCl₃) de asarinina.

7.1.5. 3-O- β -galactopiranosil quercetina.

De las fracciones 174 a 185 eluidas con acetato de etilo, se aislaron 240 mg de un polvo amarillo que resultó ser una mezcla de flavonoides. La mezcla anterior se sometió a una serie de recromatografías sucesivas, resultando 30 mg de una sustancia de $pf = 180-186^{\circ}C$ con descomposición. En su espectro de infrarrojo se observaron bandas de absorción en 3418 cm^{-1} para grupo hidroxilo de alcohol y en 1608 cm^{-1} para enlace C-C de un sistema aromático, además de otras vibraciones intensas en 1608 y 1200 cm^{-1} típicas de enlaces C-O. En su espectro de RMN- 1H (espectro 11) se observó una señal ancha a campo bajo en 12.60 ppm que se intercambiaba rápidamente con D_2O , infiriéndose que se trataba de un hidrógeno de grupo hidroxilo quelatado con un grupo carbonilo de una β -enona como en la mayoría de los flavonoides, lo anterior se apoyó en la vibración en 1648 cm^{-1} del espectro de infrarrojo para dicho sistema, postulándose la estructura parcial siguiente (figura 14).

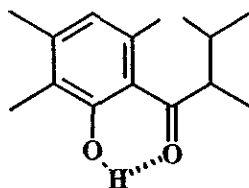
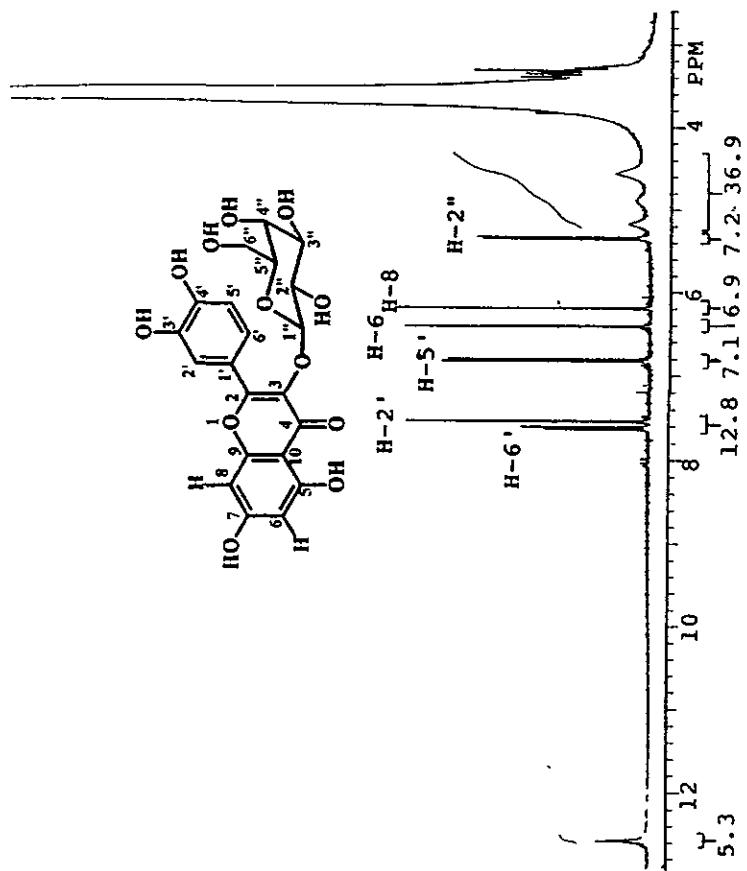
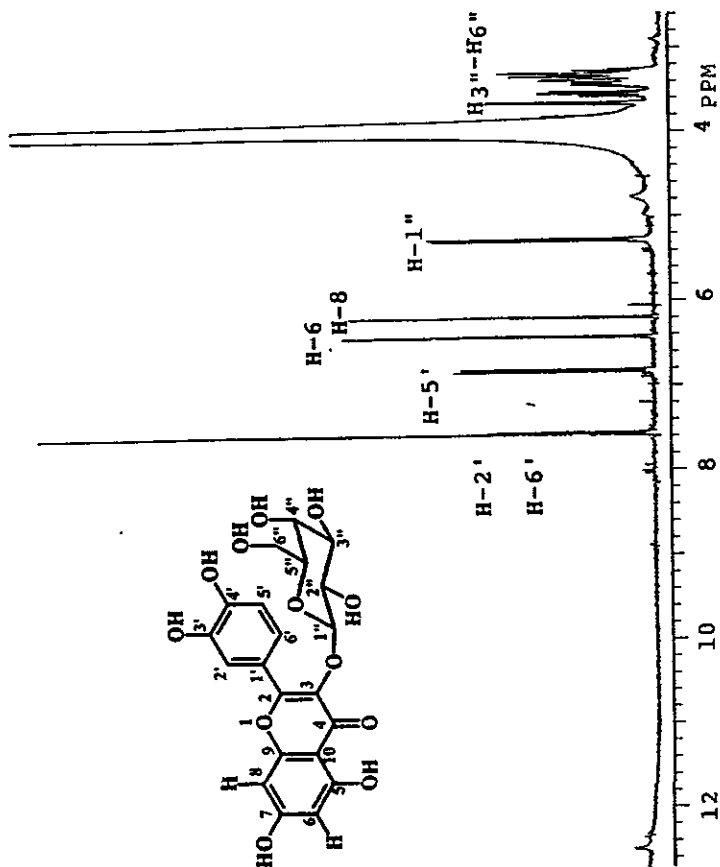


FIGURA 14. Fórmula parcial representando a la β -enona quelatada con hidroxilo.

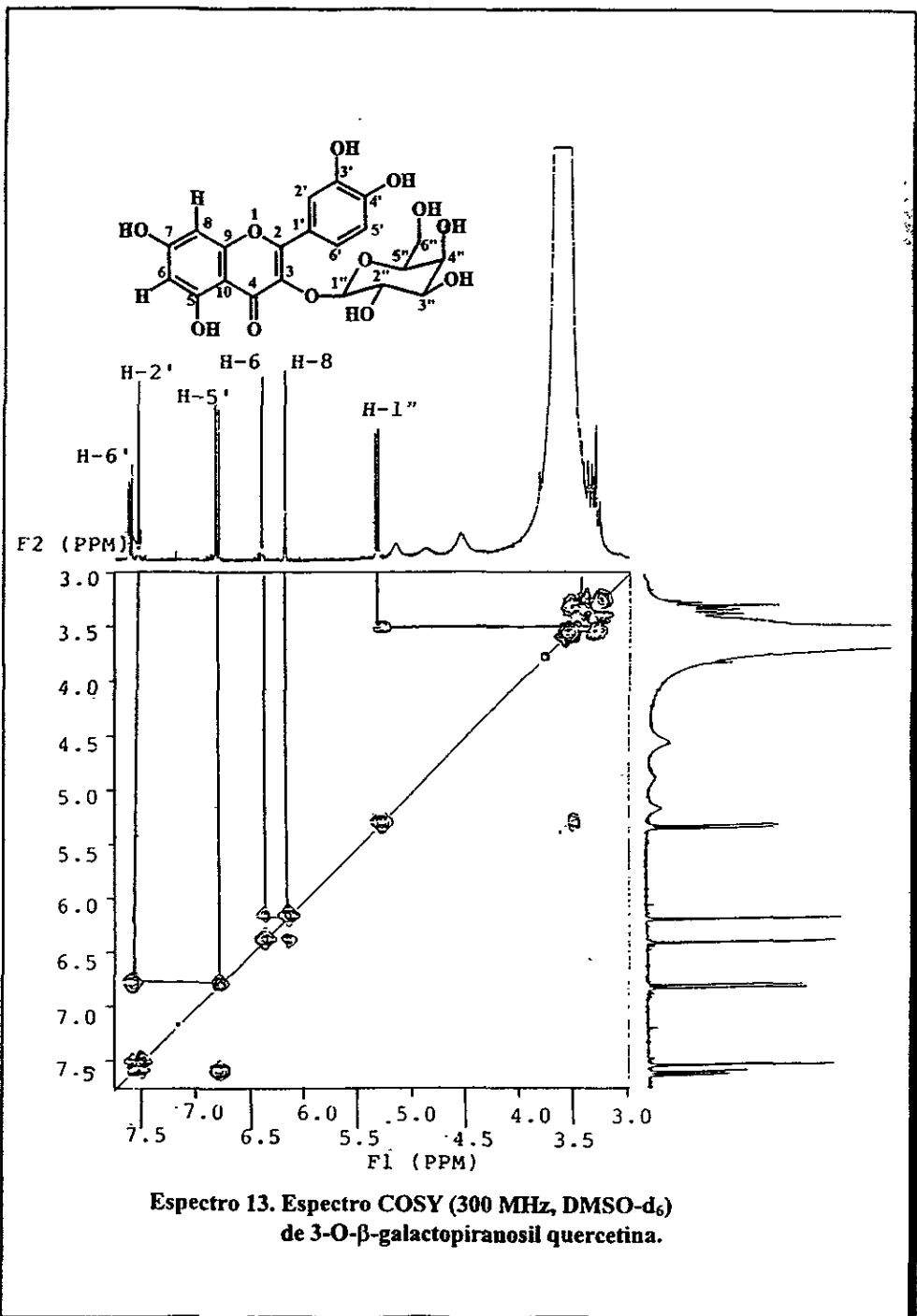
Lo anterior se corroboró en su espectro de RMN- 1H (espectro 11) donde se detectaron señales para cinco protones aromáticos entre $\delta 6.0$ y $\delta 7.9$. Además en el espectro de RMN- 1H de intercambio con agua pesada (espectro 12), se detectaron intercambios en tres señales finas $\delta 7.53$, $\delta 7.62$ y $\delta 7.63$, que fueron asignadas a tres protones de hidroxilos fenólicos. Por otro lado, en el espectro de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones COSY (espectro 13), se observó claramente la señal para un anillo aromático 1,2,3,5-tetrasustituido, cuyos protones en $\delta 6.43$ y $\delta 6.20$ se encuentran acoplados en disposición meta con $J=2\text{Hz}$.



Espectro 11. Espectro de RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆) de 3-O-β-galactopiranosil quercetina.



Espectro 12. Espectro de RMN-¹H de intercambio con agua pesada (300 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) de 3-O-β-galactopiranosil quercetina.



Por análisis tanto de espectro COSY como del espectro por intercambio con D_2O , se pudo inferir además que existe otro sistema aromático 1',3',4'-trisustituído, así como un azúcar unido en la posición 3 de un flavonoide. Con la información anterior se puede postular la fórmula parcial siguiente (figura 15).

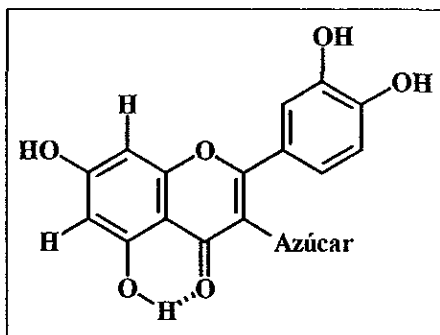


FIGURA 15. Fórmula parcial para un sistema tetrasustituído.

Al determinar el espectro de RMN- ^{13}C (espectro 14) se observaron 21 resonancias de las cuales seis se asignaron a carbonos base de oxígeno, las cuales presentaron un perfil de desplazamientos análogos con un fragmento de monosacárido. El resto de las señales (15 carbonos) correspondieron con un esqueleto de flavonoide, lo que se corroboró en el espectro de DEPT (espectro 15) donde se observaron los siguientes carbonos base de oxígeno 4CH, 1CH $_2$ y un carbono anomérico. Al comparar estos datos espectroscópicos con los descritos en la literatura (Agrawal, 1989), se dedujo que esta sustancia corresponde a la estructura del 3-O- β -galactósido de quercetina (figura 16). En la tabla 9 se resumen las propiedades físicas y espectroscópicas del 3-O- β -galactopiranosil quercetina.

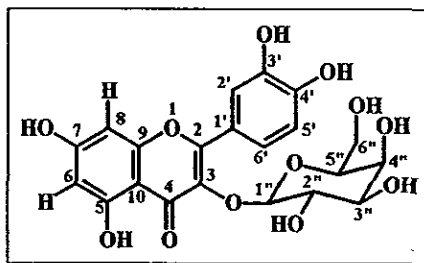
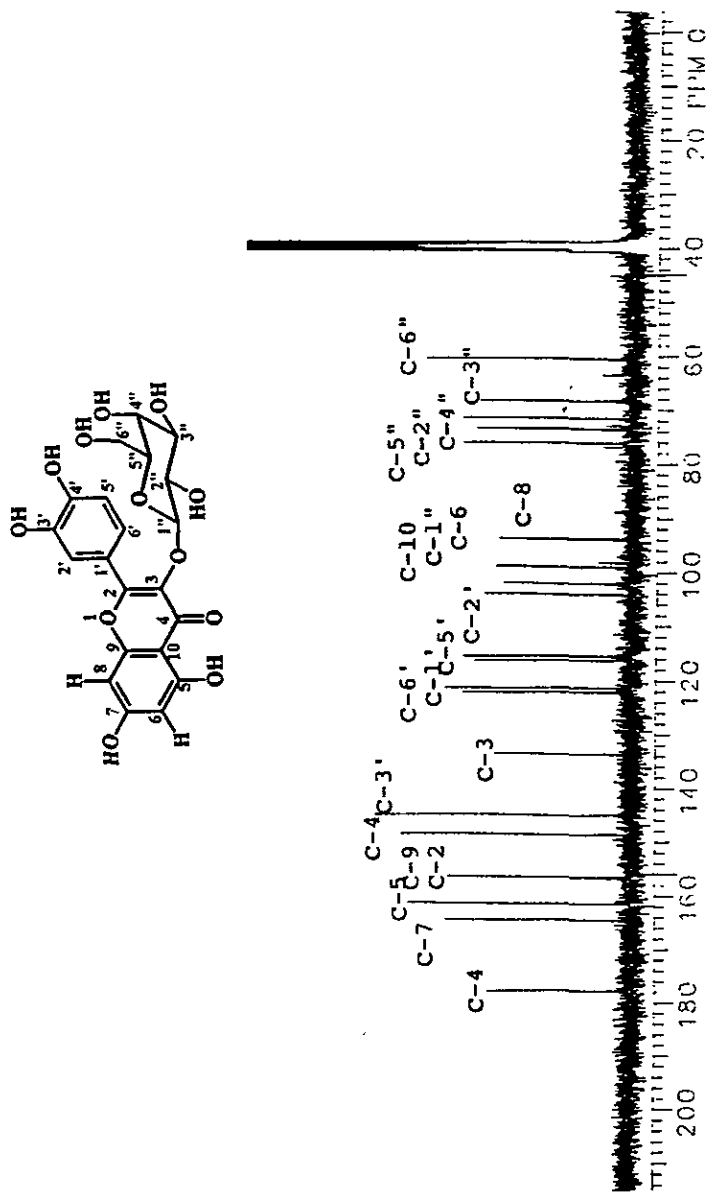
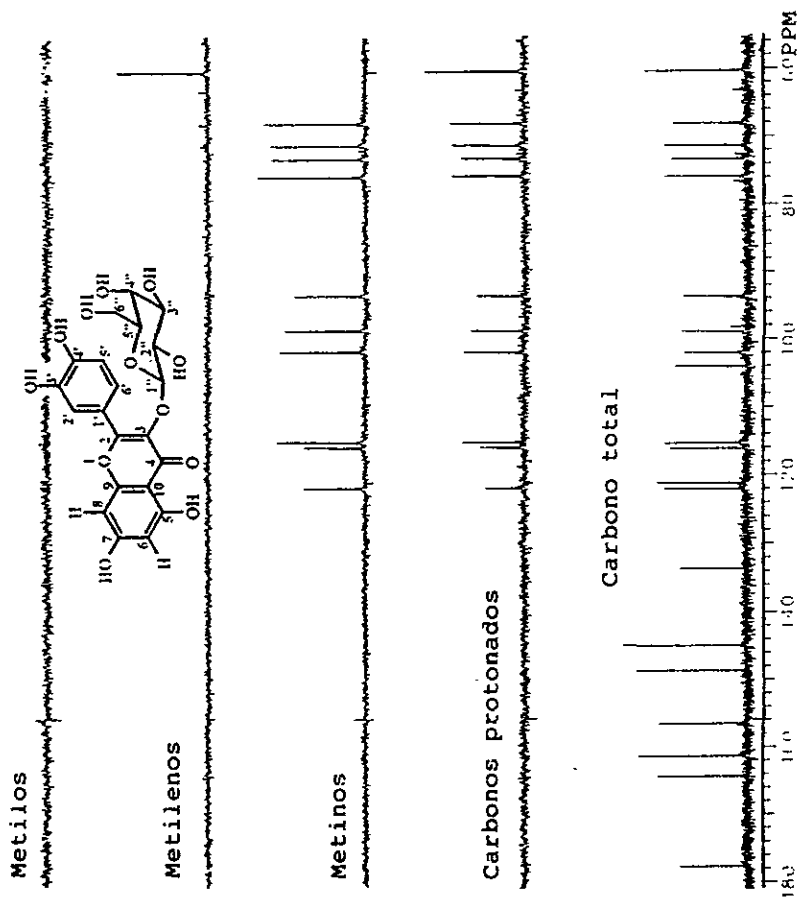


FIGURA 16. Estructura del 3-O- β -galactopiranosil quercetina.



Espectro 14. Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, DMSO-d₆) de 3-O-β-galactopiranosil quercetina



Espectro 15. Espectro DEPT (300 MHz, DMSO-d₆) de 3-O-β-galactopiranosil quercetina

Tabla 9. Constantes físicas y espectroscópicas 3-O-β- galactopiranosil quercetina

PROPIEDAD	RESULTADOS
p.f.	180-186°C
IR (KBr, cm ⁻¹)	3418, 2932, 1648, 1608, 1448, 1382, 1200, 934.
RMN- ¹ H (300 MHz DMSO, ppm)	3.2-3.8 (6H, m, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'), 5.26 (1H, d, J = 7.57Hz, H-1'), 6.18 (1H, d, J = 1.96Hz, H-8), 6.41 (1H, d, J = 1.96Hz, H-6), 6.82 (1H, d, J = 9.23Hz, H-5'), 7.53 (1H, s, OH), 7.55 (1H, dd, J = 9.23, 2.39Hz, H-6'), 7.57 (1H, d, J = 2.39Hz, H-2'), 7.62 (1H, s, OH), 7.63 (1H, s, OH), 12.6 (1H, sa, OH).
RMN- ¹³ C (300 MHz, DMSO-d ₆ , ppm)	177.6 (s, C-4), 164.4 (s, C-7), 161.4 (s, C-5), 156.5 (s, C-2), 156.5 (s, C-9), 148.7 (s, C-4'), 145.0 (s, C-3'), 133.7 (s, C-3), 122.1 (d, C-6'), 121.3 (s, C-1'), 166.2 (d, C-5'), 115.4 (d, C-2'), 104.1 (s, C-10), 102.1 (d, C-1''), 98.9 (d, C-6), 93.8 (d, C-8), 76.0 (d, C-5''), 73.4 (d, C-2''), 71.4 (d, C-4''), 68.13 (d, C-3''), 60.33 (t, C-6'').

7.1.6. Sacarosa.

De la fracción 260 de la cromatografía en columna del extracto etanólico, eluida con acetona, precipitó 1.0 g de una sustancia cuyo punto de fusión fue de 170-172 °C con descomposición. En su espectro de infrarrojo se observaron una serie de vibraciones intensas entre 3268 y 3560 cm^{-1} típicas para grupos hidroxilo de alcohol. Lo anterior fue corroborado en su espectro de RMN- ^1H en DMSO- d_6 (espectro 16) donde se observaron señales para protones base de hidroxilo entre 3.0 y 5.7 ppm. Por otro lado en su espectro de RMN- ^{13}C (espectro 17) se observan 12 señales de resonancia, que implican la presencia de 12 carbonos en esta molécula. Así mismo en el espectro DEPT (espectro 18) se deduce que todos los carbonos están enlazados por lo menos a un átomo de oxígeno, de los cuales 3 son de tipo $-\text{CH}_2\text{-OH}$, 5 son de tipo $-\text{CH-OH}$, 2 son de tipo CH-O- y uno es de tipo $-\text{O-CH-O-}$ (δ 91.76) y uno de ellos se asignó a un carbono anomérico de tipo $-\text{O-C-O-}$ (δ 104.05) como en los disacáridos. Los datos anteriores condujeron para proponer que esta sustancia debe tener una fórmula condensada de $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. Por otro lado se determinó su espectro de RMN- ^1H (espectro 19) en agua deuterada y se comparó con el descrito en la literatura para sacarosa (Aldrich, 1993), resultando muy semejantes. Finalmente al comparar esta sustancia con un patrón de referencia de sacarosa por medio de una cromatografía en placa fina, resultaron con un mismo R_f Identificándose inequívocamente a esta sustancia como sacarosa (figura 17)

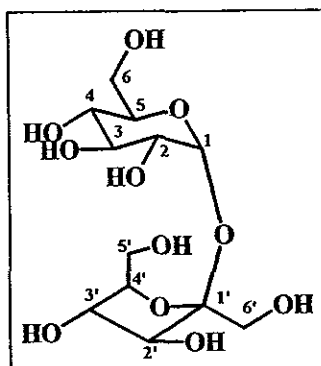
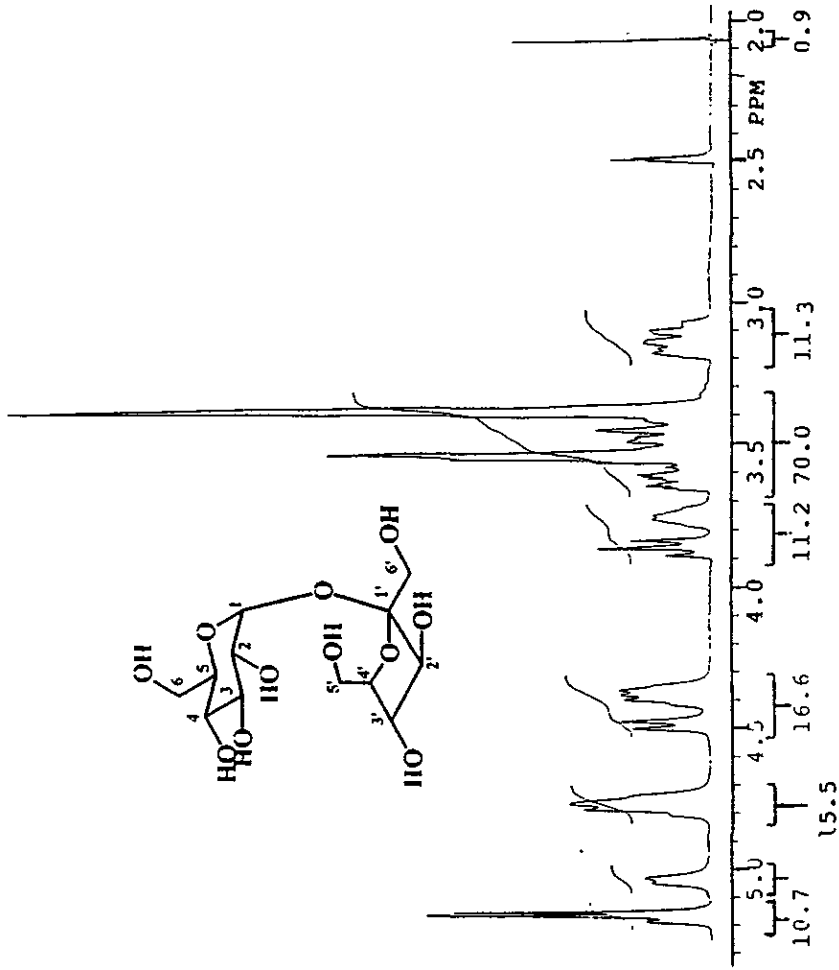
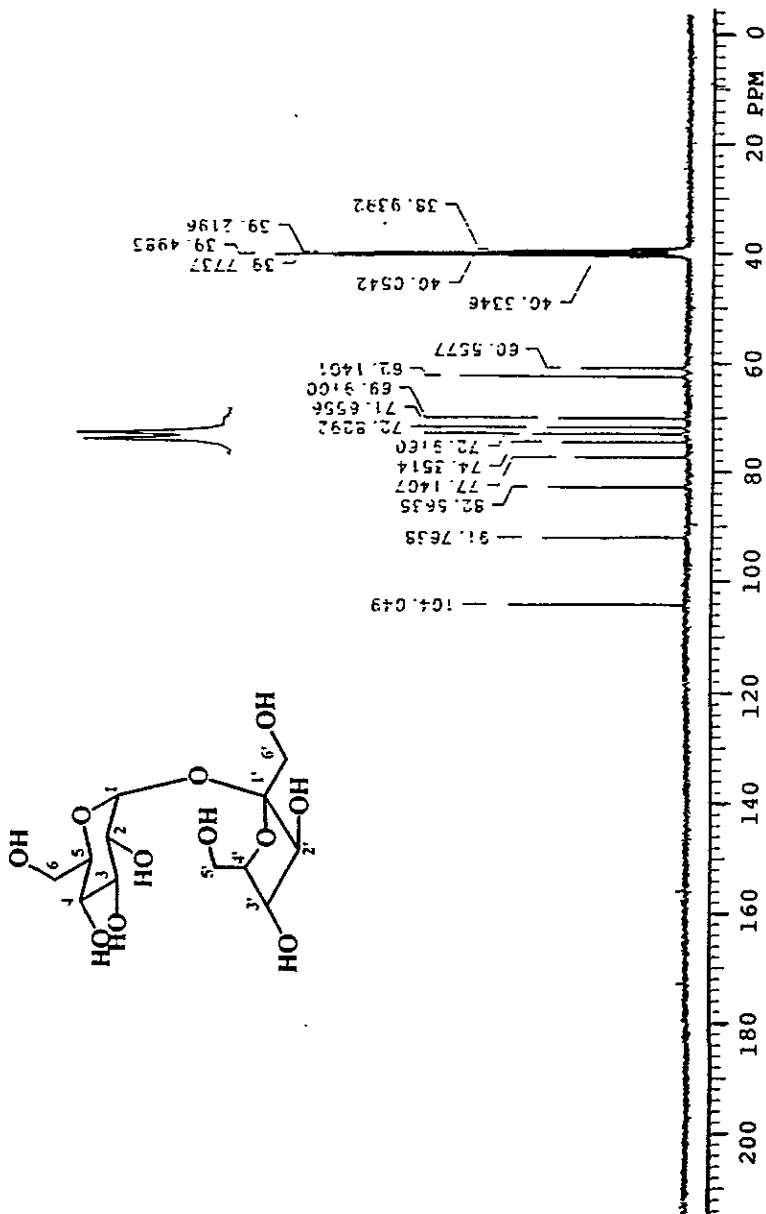


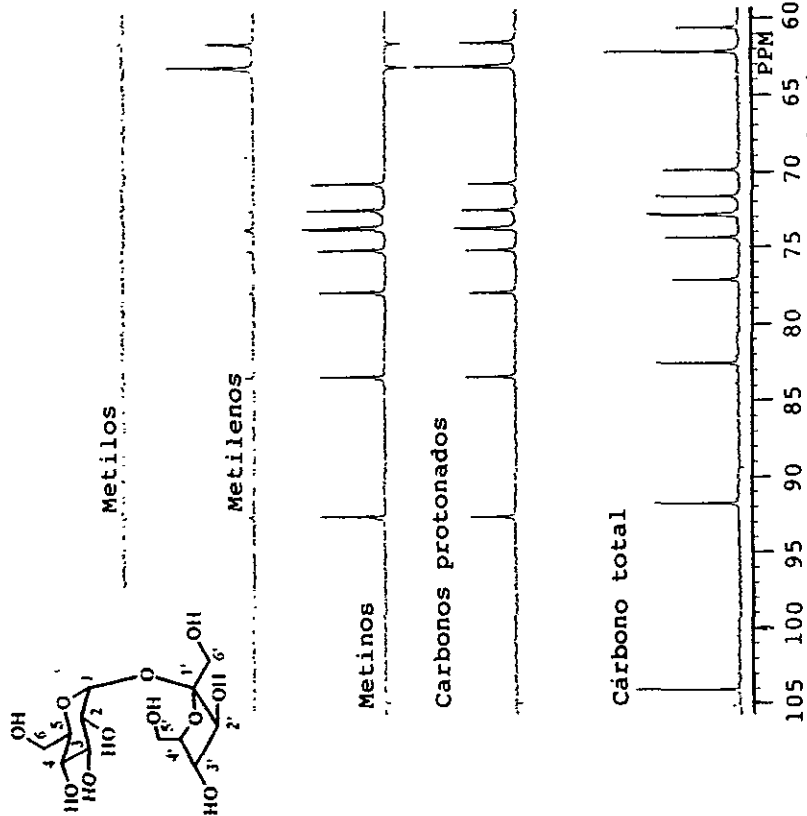
FIGURA 17. Estructura de la sacarosa.



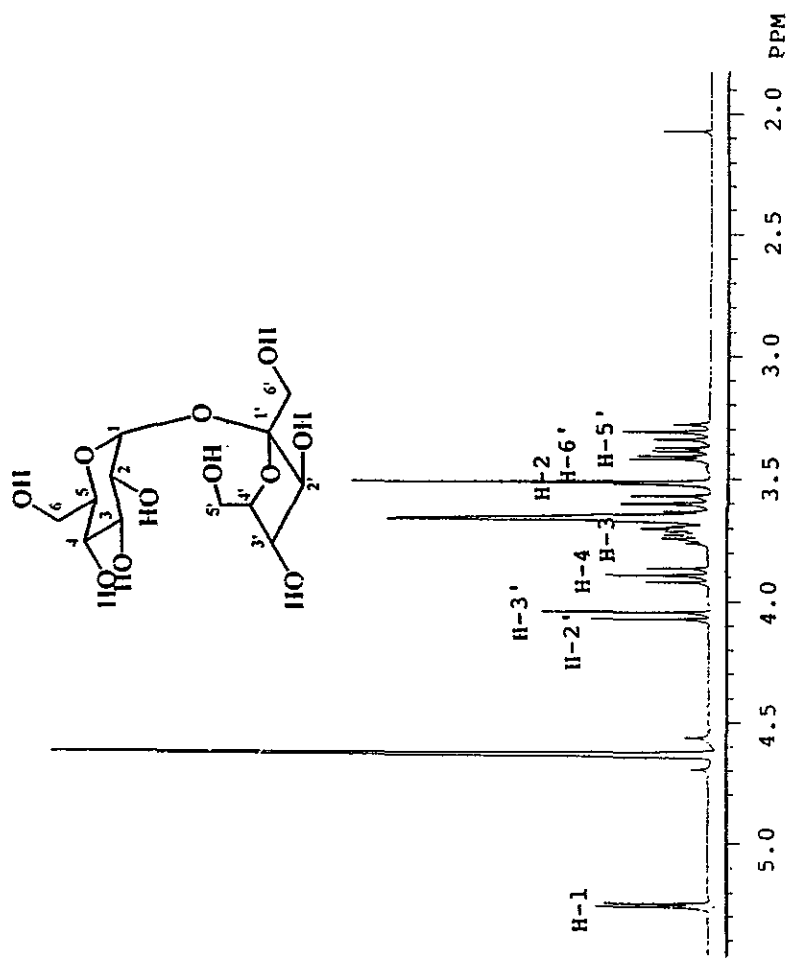
Espectro 16. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, DMSO-d_6) de sacarosa



Espectro 17. Espectro de RMN-¹³C (300 MHz, DMSO-d₆) de sacarosa



Espectro 18. Espectro DEPT (300 MHz, DMSO-d₆) de sacarosa



Espectro 19. Espectro de $\text{RMN-}^1\text{H}$ (300 MHz, D_2O) de sacarosa

7.2. Ensayo biológico.

Tanto los extractos como los compuestos aislados de las hojas de *Z. liebmannianum* presentaron actividad antiprotozoaria *in vitro* contra los protozoarios utilizados: *E. histolytica* y *G. lamblia* (tabla 7).

El extracto etanólico obtenido por reflujo presentó actividad antiprotozoaria de 41.45 $\mu\text{g/mL}$ y 156.53 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. histolytica* y *G. lamblia* respectivamente. De los compuestos aislados de este extracto, la asarinina presentó la mayor actividad antiprotozoaria con una de CL_{50} 19.86 $\mu\text{g/mL}$ y de 35.45 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente tanto en *E. histolytica* como *G. lamblia*. Siendo mayor la actividad contra *E. histolytica*, esta es una nueva actividad biológica para la asarinina a la cual se le han descrito otras actividades como antitumoral, antimicótica, efectos sobre ácidos nucleicos, inhibición enzimática y efectos fisiológicos varios (Donald y Towers, 1984). Además se ha escrito que particularmente la asarinina posee actividad antituberculosa (Windholz, 1983). Así mismo, en todos los casos se utilizó al metronidazol como referencia, teniendo éste una actividad antiprotozoaria de 0.22 $\mu\text{g/mL}$. Al comparar la actividad del extracto anterior con dicha referencia, resultó con una potencia de 188.40 y 711.5 veces menos activa que el metronidazol contra *E. histolytica* y *G. lamblia* respectivamente. En el mismo sentido, la asarinina tiene una potencia de 90.27 y 161.13 veces menos activa que la referencia.

El extracto etanólico obtenido por maceración presentó actividad antiprotozoaria de 3.48 $\mu\text{g/mL}$ y 57.99 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. histolytica* y *G. lamblia* respectivamente. Al realizar la comparación con el fármaco de referencia, este resultó tener una potencia de 15.81 y 263.59 veces menor al metronidazol. La actividad biológica fue mayor que la del extracto etanólico obtenido por reflujo. Lo anterior puede explicarse por una posible descomposición térmica del extracto y/o sus metabolitos secundarios como ocurre en los procesos de extracción de otras plantas como en el *Marrubium vulgare* conocido como marrubio (Romo de Vivar, 1985).

La actividad antiprotozoaria moderada para β -sitosterol y β -(D)-glucósido de β -sitosterol se describe por primera vez para el 3-O- β -galactopiranosil quercetina es la segunda vez que se describe el efecto antiprotozoario contra *E. histolytica* y *G. lamblia* (Calzada et al.). Es posible que cada uno de los compuestos presentes de *Z. liebmannianum* contribuyan a la actividad antiprotozoaria atribuida a esta planta en la medicina tradicional mexicana, sin embargo el hecho de que el extracto etanólico haya presentado mayor actividad que los compuestos aislados permite pensar que en dicho extracto se encuentra el principio activo antiprotozoario de la planta o bien que se presenta un fenómeno de sinérgismo entre los diferentes compuestos aislados.

ESTA TESIS NO DEBE
VALER DE LA BIBLIOTECA

8. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se desprenden del presente estudio son las siguientes:

1.- Del extracto etanólico obtenido por maceración de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* se aislaron y caracterizaron al β -sitosterol y 3-O- β -galactopiranosil quercetina.

2.- Del extracto metanólico de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* se aislaron y caracterizaron al β -sitosterol, 3-O- β -galactopiranosil quercetina. y al β -(D)-glucósido de β -sitosterol.

3.- Del extracto etanólico obtenido por reflujo de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* se aislaron y caracterizaron el β -sitosterol, 3-O- β -galactopiranosil quercetina, asarinina y sacarosa.

4.- Los extractos y compuestos aislados de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* presentaron actividad antiprotozoaria *in vitro* en contra de *Entamoeba histolytica* y de *Giardia lamblia*, siendo en todos los casos mayor la actividad contra *Entamoeba histolytica*.

5.- El extracto etanólico obtenido por maceración presentó la mayor actividad antiprotozoaria seguida por la asarinina.

6.- Se describe por primera vez la actividad antiprotozoaria de asarinina, β -sitosterol y β -(D)-glucósido de β -sitosterol.

7.- La actividad antiprotozoaria *in vitro* de extracto y compuestos aislados de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* pueden estar relacionados con el uso en la medicina tradicional mexicana como un agente antiprotozoario.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Adesina, S. y Reisch, J. (1989). Amides from *Zanthoxylum rubescens*. *Phytochemistry*. 28, (3), 839-842.
- Agrawal, P. (1989). Carbon-13 NMR of flavonoids. Ed Elsevier. New York. USA. 336.
- Aldrich library of ^{13}C and ^1H FTNMR spectra (1993). Charles J. pouchert, Jacqly Behnke, Edition I, U.S.A., Aldrich Chemical company, Inc. 305
- Amaro-Luis, J. Fronczek, F., Massanet, G., Pando, E., Rodriguez-Luis, F., Watkis, S. y Zuvia, E. (1988). Meridinol, a lignan from *Zanthoxylum fagara*. *Phytochemistry*. 27, (12), 3933-3935.
- Arruda, M., Fernadez, J., Silva, F., Viera, P. y Pirani, J. (1992). Quinolone alkaloids from *Zanthoxylum acutifolium*. *Phytochemistry*. 31,(10), 3617-3619.
- Arruda, M., Fernades, J.,Vieira, P., Silva, F. y Pirani, J. (1994) Protolimonoid and lignans from *Zanthoxylum petiolare*. *Phytochemistry*. 36, (5), 1303-1306.
- Bhacca, N., Johnson, F. y Shooley, J. (1962). NMR Spectra catalog. National Press. USA. Espectro 187.
- Buthani, K., Sharma, G. and Ali, M. (1987). Plant based drugs; part I. Antiamoebic activity of phenanthroindolizidine alkaloids, common structural determinants of activity with emetine. *Planta med.* 53(6), 532-6.
- Calderón, J. y Velasquez, C. (1995). Las defensas inmunes en la infección amibiana. *Avance y perspectiva*. 14, 97-101.
- Cántaro. (1982). Como aliviarse de la panza. Arbol Editorial. México. 63-71.
- Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A. and Mata, R. (1997). Screening of mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *International Journal of Pharmacognosy*. En prensa.
- Cedillo, R., Enciso, M., Martinez, A. y Ortega, G. (1991). Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic patients in Mexico. *Arch. Invest. Med. (Méx.)* 22, 79-85.

- Cedillo, R. y Muñoz, O. (1992). A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenasine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolítica*. *Arch. Med. Res.* 23, 79-85.
- Cedillo, R. y Muñoz, O. (1992). *In-vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazol, mebendazol and other chemotherapeutic agents. *J. Med. Microbiol.* 37, 221- 224.
- Chang, C., Flament, I., Matson, J., Nishida, T., Ohloff, G., Wehrli, F. y Weinheimer, A. (1979). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Ed Wine Springer- New York U.S. A. Vol. 326,177
- Diamomd, S. y Bartgis, L. (1971). Axenic cultures *in-vitro* testing of drug against *Entamoeba histolítica*. *Arch. Invest. Med.* (Méx.). 2 (Suppl.1). 339-343.
- Dirección General de Epimediología (DGE, 1996). Sistema nacional de vigilancia epimediológica. *Epimediología*. Sistema unico de información. Vol.13, No.13.
- Domínguez, X. (1985). Métodos de investigación fitoquímica. Limusa, México 145.
- Donald MacRae, W. y Neil Tower, G. (1984). Review Article Number 2. Biological activities of lignans. *Phytochemistry*. 23: 1207- 1220.
- Dyer John, R. (1978). Aplicaciones de espectroscopía de absorción de compuestos orgánicos. Trad. (Juan A. Garbarino), De. Prentice/hall international 165-169.
- Estrada, E. (1985). Jardín Botánico de Plantas Medicinales. Maximino Martínez. Universidad Autónoma Chapingo 11.
- Ghoshall, S., Krishna-Prasad, N. and Lakshimi (1996). Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.* 50(3), 167-70.
- Heywood, V. H.,. (1978-1979). *Floring plants of the world*. University press London 200.
- Ih-Sheng, Shwu-Jen, Yuh-Chwen, Ian-Lih, Hiroko, S., Feng-Nien y Che-Ming. (1994). Dimeric 2-quinolone alkaloid and antiplatelet aggregation constituents of *Zanthoxylum simulans* *Phytochemistry*. 36, (1) 237-239

- Jiménez, C., Marcos, M., Villaverde, M. C., Riguera, R., Castedo, L. y Stermitz. (1989). Acromone from *Zanthoxylum* species. *Phytochemistry* 28 (7), 1992-1993.
- Jiménez, H. S. (1989). Estudio químico de plantas medicinales mexicanas constituyentes de *Cecropia obtusifolia* (Guarumbo) y *Zanthoxylum liebmannianum* (colpahtle). Tesis profesional Químico Farmacéutico Biólogo. ENEP "ZARAGOZA" UNAM. México, 4-6
- León, G., Moreno, M., Tovar, R., Baylon, L., Das, P. y Muñoz, M. L. (1995) Los gránulos electrodensos y patogenicidad en *Entamoeba histolytica*. *Avance y Perspectiva*. 14, 121-126.
- Liter, M. (1986). Quimioterapia de la amibiasis, tricomoniasis y leishmaniasis. Amebecidas de acción sistémica e intestinal. Tricomonicidas. Leishmanicidas. En: *Farmacología experimental y clínica*. Ateneo, Buenos Aires. Argentina, 1674-1696.
- Marcos, M., Villaverde, M.C., Riguera R, Castedo, L. (1990). A new bishordeninyl terpene alkaloid from *Zanthoxylum chiriquinum*. *Journal of Natural Products*. 53, (2), 459-461
- Marcos, M., Villaverde, M.C., Riguera R, Castedo, L. y Stermitz F. (1990). *Zanthoxylum coriaceum* alkaloids related tobishordeninyl terpenes. *Phytochemistry*. 29,(7), 2315-2319.
- Martínez, M. (1969). *Las Plantas Medicinales de México*. Ediciones Botas México, 28.
- Mata, R., Navarrete, A., Alvares, L., Pereda, R., Delgado, G. y Romo, A (1987) Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium Graveolens*. *Phytochemistry* 26 (1), 191-193.
- Monroe, W., Wani, M.C. y Taylor, H. (1987). Plant antitumor agents, 27. Isolation, structure, and structure activity relationships of alkaloids from *Fagara macrophylla*. *Journal Natural Products*. 50, (6), 1095-1099.
- Navarrete, A., Hong, E. (1996). Anthelmintic properties of α -sanshool from *Zanthoxylum liebmannianum*. *Planta Medica*. 62, 250-251.
- Navarrete, A., Reyes, B., Aguirre, E. y Estrada, E. (1987), Estudio químico de *Zanthoxylum liebmannianum* (Colopahtle)), XVI simposium internacional de química de productos naturales Monterrey N. León México, 28-30 abril 3-7.

- Nogouela, S., Tsamo, E. y Connolly, J (1994). Lignans and other constituents of *Zanthoxylum heitzii*. *Phytochemistry*. 37, (3), 867-869
- Organización mundial de la salud (OMS). (1978). Informe de la conferencia internacional sobre atención primaria de salud. Alma-Ata, URSS, 6-12 de septiembre de 1978, 1-7.
- Pesce, E. (1996). Productos farmacéuticos de plantas medicinales. En Erick Estrada (Editor) En Plantas medicinales de México. 2ª Ed. Universidad Autónoma Chapingo, 279-289.
- Ponce-Macotela, M., Navarro-Alegria, I., Martínez-Gordillo, N. y Alvarez-Chacón, R. (1994). Efecto anti-giardiasico *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Rev. invest. Clin.* 46(5) 343-7.
- Ramírez, Z. y Montesinos, J. (1985). Estudio Químico y Pruebas Farmacológicas de *Zanthoxylum liebmannianum* (colopahtle). Tesis Profesional Químico Farmacéutico Biólogo ENEP ZARAGOZA UNAM. México.
- Reyes, B., Navarrete, A., Sixtos, C., Aguirre, E., Jiménez, S. y Estrada, E.. (1991). Constituyentes químicos de *Zanthoxylum liebmannianum* (engl.) p. Wilson Colopahtle, una planta medicinal mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 24,(11), 30-34
- Romo de Vivar, A. (1985). Productos naturales de la flora mexicana. Ed Limusa México D.F. 143.
- Sohni, R., Kaimal, P. and Bhatt, M. (1995). The antiamebic effect of a crude drug formulation of heebal extracts against *Entamoeba histolytica in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.* 45(1), 43-52.
- Shuwu-Jen, Ih-Sheng, (1993). Alkaloids from *Zanthoxylum simulans*. *Phytochemistry*. 34, (6), 1659-1661.
- Stanley, P.C. (1920). Trees and shrubs of México. Washington government Printing Office, 503.
- Sharma, L., and Bhutani, K. (1988). Plant based antiamebic drugs; part II amoebicidal activity of parthenin isolated from *Parthenium hysterophorus*. *Planta Medica*. 54(2), 120-2.

- Tracy, J. y Webster, L. (1996). Tripanosomiasis, leishmaniasis, amebiasis, giardiasis, trichonomiasis, and other protozoal infections. In Hardman, J, Limbird, L., Molinoff, P., Ruddon, R. and Gilman, A. editores. *The pharmacological basis of therapeutics*. ed 9ª. Ed. McGraw-Hill. 987-1008.
- Van beek, A., Deeler, M., Verpoorte, R. and Baerheim-Svendsen, A. (1984). Antimicrobial, antiamoebic and antiviral screening of some *Tabernaemontana* species. *Planta medica*. 50(2), 180-5.
- Webster, T.(1991). Fármacos usados en la quimioterapia de las infecciones por protozoarios amebiasis, giardiasis y tricomoniasis. En Goodman, A, Rall, T., Nies, A. Taylor, P. Las bases farmacológicas de la terapéutica. ed. 8ª Ed Panamericana. 972-980.
- Wehrli, F., Nishida, T. (1979). The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry en. Progress in the chemistry of organic natural products. Chang, J., Flament, J. Matson, A. Nishida, T., Ohloff, G., Wehrli, W. y Weinheimer, J. Ed Springer-verlag, vol. 36. Austria, 69-72.
- Wine-Show, Ian-Lih, Chen-Ming y Ih-Sheng. (1994). Nor-neolignan and phenyl propanoid from *Zanthoxylum ailanthoides*. *Phytochemistry*. 36, (1), 213-215.
- Winholz, M. (1983). The Merck Index. An encyclopedia of chemical and drugs. 10th edition. Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., USA. 119.
- Wright, W., Bray, H. O'Neill, J. Warhurst, C. Phillipson, J., Quentin-Leclercq, J. and Angenot, L. (1988). Use of microdilution to asses *in vitro* antiamoebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* stem and a number of quassinoids. *Antimicrob. Agents Chemother*. 32(11), 1725-9.
- Wright, W., Bray, H. O'Neill, J. Warhurst, C. Phillipson, J., Quentin-Leclercq, J. and Angenot, L. (1991). Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolate from *Strychnos usambarensis*. *Planta Medica*. 57(4). 337-40
- Xiong, Q., Shi, D. y Mizuno, M. (1995). Flavonol glucosides in pericarps of *Zanthoxylum bungeanum*. *Phytochemistry*. 39, (3), 723-725