

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"PROANTOCIANIDINAS DE TIPO A Y FLAVONOLES CON ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE *Geranium niveum* S. WATSON (GERANIACEAE) Y *Conyza filaginoides* (D.C.) HIERON (ASTERACEAE)."



T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS (F A R M A C I A) PRESENTA M. EN C. FERNANDO CALZADA BERMEJO



MEXICO, D.F.

277775

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.


JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Alfredo Ortega Hernández
Primer vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro
Segundo vocal: Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Tercer vocal: Dr. Roberto Cedillo Rivera
Secretario: Dr. Rogelio Pereda Miranda
Primer suplente: Dr. Robert Bye Buttler
Segundo suplente: Dr. Javier Torres López

Sustentante:

M. en C.  Fernando Calzada Bermejo

Asesor:


Dra. Rachel Mata Essayag

RESUMEN

La primera parte de la tesis doctoral describe la investigación química y la evaluación del potencial antiprotozoario de los metabolitos aislados de las especies *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Conyza filaginoides* (D. C.) Hieron (Asteraceae). El fraccionamiento biodirigido del extracto de las raíces de *G. niveum*, empleando como bioensayo la actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* y *G. lamblia* condujo al aislamiento del galato de metilo, del ácido 3- β -cafeoiloxi-12-oleanen-28-oico, la reinoutrina, la hiperina, la mahuanina B y las geraninas A-D. La geranina B fue el compuesto más activo contra ambos protozoarios, con CI_{50} de 13.6 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y de 6.0 $\mu\text{g/mL}$ para *G. lamblia*. La geranina A mostró una actividad selectiva contra *G. lamblia* (CI_{50} de 2.4 $\mu\text{g/mL}$). El estudio biodirigido del extracto de las partes aéreas de *C. filaginoides* permitió el aislamiento del eritrodiol, las yaksininas A-C, la astragalina, la isoquercitrina, la nicotinflorina, la narcisina y la rutina. El eritrodiol y la nicotinflorina fueron los más activos contra ambos protozoarios (CI_{50} *E. histolytica* de 12.66 y 30.93 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; CI_{50} *G. lamblia* de 29.94 y 22.49 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). La segunda parte de la tesis describe un estudio de relación estructura química y la actividad antiprotozoaria de 19 flavonoides de origen natural y algunos derivados. Los resultados obtenidos permitieron establecer que los *cis*-flavan-3-oles como la (-)-epigallocatequina, la (-)-epicatequina y la tetrametoxiepicatequina constituyen candidatos idóneos para el desarrollo de nuevos agentes de aplicación terapéutica para el tratamiento de la amibiasis intestinal y la giardiosis. La potencia de la tetrametoxiepicatequina como agente anti-giardia *in vitro* supero a la del metronidazol. Los resultados de este estudio permitieron establecer también que la actividad antiprotozoaria de los flavan-3-oles y los flavonoles no se debe a los productos de degradación metabólica de este tipo de compuestos.

M. en C. Fernando Calzada Bermejo

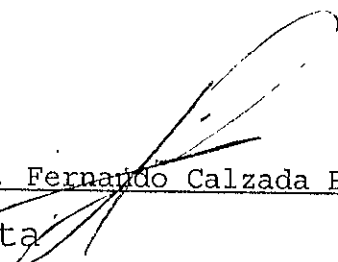
Tesista

Dra. Rachel Mata de Espindola

Asesor

ABSTRACT

As a part of our effort to discover natural products with potential use as antiprotozoal agents, 19 Mexican medicinal plants were screened for their ability to inhibit the growth of trophozoites of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Accordingly, after the initial observation of the significant activity displayed by some species, *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Conyza filaginoides* (D. C.) Hieron (Asteraceae) were selected for activity-guided fractionation. Four new A-type proanthocyanidins, geranins A-D, were isolated from antiprotozoal CHCl₃-MeOH extract of the roots of *G. niveum*. In addition, five known compounds, mahuannin B, reynoutrin, hyperin, methyl gallate and 3- β -caffeoyl-12-oleanen-28-oic acid, were obtained. Geranin B was the most active compound against both protozoa IC₅₀ = 13.6 μ g/mL for *E. histolytica* and 6.0 μ g/mL for *G. lamblia*. However, geranin A showed selectivity against *G. lamblia* (IC₅₀ from 2.4 μ g/mL). Investigation on the aerial parts of *C. filaginoides* led to the isolation of three new acylated flavonol glycosides. The new compounds were given the trivial names of yaksinins A-C. In addition, six known compounds, erythrodiol, astragalin, isoquercitrin, nicotiflorin, narcissin, and rutin were obtained. Erythrodiol and nicotiflorin were the most potent compounds against both protozoa with IC₅₀ values ranging from 12.66 to 30.93 μ g/mL for *E. histolytica* and from 22.49 to 29.94 μ g/mL for *G. lamblia*. The antiprotozoal activity of 19 plant flavonoids and some derivatives was evaluated. Among those, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, kaempferol, tetramethoxy-epicatechin, and tetramethoxy-kaempferol were the most potent flavonoids against both protozoa with IC₅₀ values ranging from 1.92 to 7.93 μ g/mL for *E. histolytica* and from 0.043 to 8.73 μ g/mL in the case of *G. lamblia*.


M. en C. Fernando Calzada Bermejo Dra. Rachel Mata de Espindola
Tesista Asesor

Sitios de realización de la tesis

Unidad de Investigación Médica de Farmacología de Productos Naturales, Hospital de Pediatría, CMN S XXI, IMSS.

Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, CMN S XXI, IMSS.

Laboratorio 124 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo a través de los siguientes proyectos: DGPA (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN205197; CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) 27978N; PADEP (Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado) Nos. 005320, 005356 y 005377.

Al Dr. Roberto Cedillo Rivera, Investigador de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, del Hospital Pediatría CMN S XXI, IMSS, agradezco de manera especial su valiosa dirección para la determinación de la actividad antiprotozoaria de los extractos, fracciones y compuestos puros obtenidos durante la presente investigación.

A la Q. Mariana Meckes Fischer Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos

Naturales por las facilidades otorgadas para la realización del presente estudio.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz (Instituto de Química de la UNAM) y al Q.F.B. Oscar S. Yañez Muñoz (Facultad de Química de la UNAM, USAI), por el registro de los espectros de RMN de los compuestos obtenidos.

A las Q.F.B. Rocío Patiño (Instituto de Química de la UNAM), Graciela Chávez y Marisela Gutiérrez (Facultad de Química de la UNAM, USAI) por el registro de los espectros UV, IR, dicroísmo circular y rotación óptica.

Al I.Q Luis Velasco Ibarra y el M. en C. Javier Pérez Flores del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de masas.

Al M. en C. Atilano Gutiérrez de la UAM-Iztapalapa por el registro de los espectros de RMN (500 MHz) de los ésteres de Mosher de las geraninas A-D y de las yaksininas A-C.

Al Dr. Carlos Cerda del CINVESTAV por su asesoría para la realización del análisis conformacional de la geranina A y algunos de sus derivados.

A la B. Amparo Tapia Contreras y a las Q.F.B. Alma Delia Alanís Ríos y Mónica Reynoso Espinal por su valiosa asistencia técnica.

A los miembros de mi comité tutelar integrado por los doctores Rafael Castillo Bocanegra y Roberto Cedillo Rivera por el apoyo brindado durante la realización del presente proyecto de tesis.

A los miembros del jurado designado para la revisión del manuscrito de tesis, por sus valiosos comentarios y observaciones.

Por último, quiero agradecer a la Dra. Rachel Mata Essayag, quien en su calidad de maestro me ha guiado y transmitido los conocimientos que han sido de mi formación profesional. Su ejemplo es un modelo a seguir para las generaciones venideras.

DEDICATORIAS

A mis hijos: Estefania, Ulises y María Fernanda con cariño y amor.

A todas las personas que de alguna manera contribuyeron a la culminación de esta meta.

Con respeto y admiración a mi gran maestra Dra Rachel Mata Essayag.

A mi gran compañero Julio Hernández Salgado* y a todos aquellos amigos que no están para celebrar este triunfo (Othón, Federico, José Luis, Enrique, Saúl, Moisés y ojos rojos corazón contento)*

Amé al Señor, seguro de que oirá la voz de mi oración.

Porque se dignó inclinar hacia mí sus oídos y así lo invocaré en todos los días de mi vida.

Cercáronme mortales angustias, me embistieron los horrores del infierno, o sepulcro, me hallé en medio de la tribulación y el dolor;

E invoqué el Nombre del Señor. Libra, ¡oh Señor!, El alma mía.

Misericordioso es el Señor y justo; compasivo es nuestro Dios.

El Señor guarda a los pequeñuelos; yo me humillé, y el me sacó a paz y a salvo.

Vuelve, ¡oh alma mía!, a tu sosiego; ya que el Señor me ha favorecido tanto.

Pues él ha librado de la muerte a mi alma, ha enjuagado mis lágrimas, y apartado mis pies del precipicio.

Acepto seré yo al Señor en la región de los vivos.

INDICE

Lista de Espectros.....	vii
Lista de Esquemas.....	xvii
Lista de Figuras.....	xviii
Lista de Cuadros.....	xxi
Resumen.....	xxvi
Abstract.....	xxxii
Lista de abreviaturas.....	xxxiv
I ANTECEDENTES.....	1
I.1 Generalidades de la diarrea infecciosa.....	1
I.2 Generalidades de la amibiasis y la giardiosis.....	4
I.3 Agentes quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de la amibiais y la giardiosis.....	16
I.4 Compuestos con actividad anti-amibiana y antigiardia de origen natural.....	23
I.5 Proantocianidinas de tipo A.....	31
I.6 Flavonoides con propiedades antiprotozoarias.....	51

I.7 Generalidades acerca de <i>Geranium niveum</i> S.	
Watson.....	65
I.8 Antecedentes acerca de <i>Conyza filaginoides</i>	
(D. C.) Hieron.....	75
II OBJETIVO GENERAL.....	82
II.1 Objetivos particulares.....	82
III HIPOTESIS.....	85
IV EXPERIMENTAL.....	86
IV.1 Material vegetal.....	86
IV.2 Preparación de los extractos vegetales en pequeña escala para realizar el proceso de selección.....	87
IV.3 Ensayo biológico.....	89
IV.3.1 Protozoarios.....	89
IV.3.2 Determinación de la actividad antiprotozoaria.....	90
IV.4 Determinación de la actividad citotóxica.....	91
IV.5 Análisis cromatográficos.....	92
IV.6 Obtención de las proantocianidinas antiprotozoarias de las raíces de <i>G. niveum</i>	94

IV.6.1 Extracción y fraccionamiento.....	94
IV.6.1.1 Separación del galato de metilo (165), el ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico (166), la reinoutrina (167) y la hiperina (168), a partir de las fracciones terciarias F3-5(1)- F3-5(4).....	99
IV.6.1.2 Purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de las geraninas A-D (169-172) y la mahuanina B (47) a partir de la fracción terciaria F3-5(5).....	100
IV.7 Obtención de los flavonoles de las partes aéreas de <i>Conyza filaginoides</i>	101
IV.7.1 Extracción y fraccionamiento.....	101
IV.7.1.1 Separación mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) del eritrodíol (151) a partir de la fracción activa F1.....	104
IV.7.1.2 Aislamiento mediante CCFP de las yaksininas A-C (173-175), la astragalina (176) y la isoquercitrina (177) a partir de la fracción	

activa F3.....	104
IV.7.1.3 Aislamiento de la nicotiflorina (178), la narcisina (179) y la rutina (97) mediante CCFP a partir de la fracción activa F4.....	105
IV.8 Caracterización de los compuestos aislados.....	106
IV.8.1 Equipos utilizados.....	106
IV.8.2 Obtención de los derivados metilados de los compuestos 30, 47, 78, 80, 92-94, 165 y 169-172.....	107
IV.8.3 Obtención de los derivados acetilados de los compuestos 30, 47, 78, 80, 92-94, 165 y 169 y 172.....	109
IV.8.4 Obtención de los ésteres de Mosher de los compuestos 47 y 169-172.....	110
IV.8.5 Hidrólisis ácida de los compuestos 173-175.....	111
IV.8.6 Modelos moleculares.....	111
IV.9 Flavonoides utilizados para el estudio de relación estructura química-actividad antiprotozoaria	112

V RESULTADOS Y DISCUSION.....	113
V.1 Estudio fitoquímico de las raíces de <i>G.</i> <i>niveum</i>	120
V.1.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados de <i>Geranium niveum</i>	120
V.1.1.1 Caracterización estructural de la geranina A (169).....	122
V.1.1.2 Caracterización estructural de la geranina B (170) y la geranina C (171).....	151
V.1.1.3 Caracterización estructural de la geranina D (172).....	172
V.1.1.4 Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados de las raíces de <i>G. niveum</i> ...	192
V.2 Resultados y discusión en la investigación de las partes aéreas de <i>C. filaginoides</i>	194
V.2.1 Caracterización estructural de las yaksininas A-C (173-175).....	195
V.2.2 Resultados de la determinación de la	

actividad antiprotozoaria de los compuestos 97, 151 y 173-179 aislados de <i>C. filaginoides</i>	207
V.3 Estudio relación estructura química	
actividad antiprotozoaria de flavonoides selectos de origen natural.....	209
VI CONCLUSIONES.....	228
VII PERSPECTIVAS.....	233
VIII BIBLIOGRAFIA.....	235
APENDICE A. Espectros de compuestos novedosos.....	275
APENDICE B. Espectros de compuestos conocidos.....	297
APENDICE C. Artículos generados de la presente investigación.....	313
Manuscritos en preparación.....	326
APENDICE D. Actividad antiprotozoaria (CI ₅₀) en µM de los compuestos puros aislados de <i>G. niveum</i> y <i>C.</i> <i>filaginoides</i> y de los flavonoides del estudio de relación estructura química actividad antiprotozoaria.....	327

Lista de Espectros

Espectro 1. Espectro en el IR de la geranina A (169).....	125
Espectro 2. Espectro de UV de la geranina A (169).....	125
Espectro 3. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la geranina A (169).....	126
Espectro 4. Espectro de RMN ¹ H de la geranina A (169).....	129
Espectro 5. Espectro de RMN ¹³ C de la geranina A (169).....	130
Espectro 6. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMQC de la geranina A (169).....	139
Espectro 7. Espectro de RMN ¹ H-NOESY de la geranina A (169).....	140
Espectro 8. Espectro de RMN ¹ H-COSY de la geranina A (169).....	141
Espectro 9. Espectro de RMN ¹ H-NOESY de	

169a.....	142
Espectro 10. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la geranina A (169).....	143
Espectro 11. Espectro de DC de la geranina A (169)...	144
Espectro 12. Espectro de RMN ^1H del derivado di-(S) éster de Mosher de la geranina A (169S).....	146
Espectro 13. Espectro de RMN ^1H del derivado di-(R) éster de Mosher de la geranina A (169R).....	146
Espectro 14. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la geranina B (170).....	161
Espectro 15. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la geranina C (171).....	162
Espectro 16. Espectro de DC de la geranina B (170).....	163
Espectro 17. Espectro de DC de la geranina C (171).....	163
Espectro 18. Espectro de RMN ^1H de la geranina B (170).....	164
Espectro 19. Espectro de RMN ^1H de la geranina C	

(171).....	164
Espectro 20. Espectro de RMN ¹³ C de la geranina B	
(170).....	165
Espectro 21. Espectro de RMN ¹³ C de la geranina C	
(171).....	165
Espectro 22. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMQC de la	
geranina B (170).....	166
Espectro 23. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMQC de la	
geranina C (171).....	167
Espectro 24. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMBC de la	
geranina B (170).....	168
Espectro 25. Espectro de RMN ¹ H- ¹³ C-HMQC de la	
geranina C (171).....	169
Espectro 26. Espectro de RMN ¹ H del derivado di-(R)	
éster de Mosher de la geranina B (170S).....	170
Espectro 27. Espectro de RMN ¹ H del derivado di-(S)	
éster de Mosher de la geranina B (170S).....	170
Espectro 28. Espectro de RMN ¹ H del derivado di-(R)	
éster de Mosher de la geranina C (171R).....	171

Espectro 29. Espectro de RMN ^1H del derivado di-(S) éster de Mosher de la geranina C (171S).....	171
Espectro 30. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la geranina D (172).....	181
Espectro 31. Espectro en el IR de la geranina D (172).....	182
Espectro 32. Espectro de UV de la geranina D (172).....	183
Espectro 33. Espectro de DC de la geranina D (172).....	184
Espectro 34. Espectro de RMN ^1H de la geranina D (172).....	185
Espectro 35. Espectro de RMN ^{13}C de la geranina D (172).....	186
Espectro 36. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMQC de la geranina D (172).....	187
Espectro 37. Espectro de RMN ^1H - ^{13}C -HMBC de la geranina C (172).....	188
Espectro 38. Espectro de RMN ^1H de la	

heptametoxigeranina D (172a).....	189
Espectro 39. Espectro de RMN ¹ H de la decaacetoiloxigeranina D (172b).....	190
Espectro 40. Espectro de RMN ¹ H del derivado tri-(R) éster de Mosher de la geranina D (172R).....	191
Espectro 41. Espectro de RMN ¹ H del derivado tri-(S) éster de Mosher de la geranina D (172S).....	191
Espectro 42. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la yaksinina A (173).....	197
Espectro 43. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la yaksinina B (174).....	197
Espectro 44. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la yaksinina C (175).....	197
Espectro 45. Espectro de RMN ¹ H de la yaksinina A (173).....	199
Espectro 46. Espectro de RMN ¹ H de la yaksinina B (174).....	199
Espectro 47. Espectro de RMN ¹ H de la yaksinina C (175).....	199

Espectro 48. Espectro de RMN ^{13}C de la yaksinina A (173).....	200
Espectro 49. Espectro de RMN ^{13}C de la yaksinina B (174).....	200
Espectro 50. Espectro de RMN ^{13}C de la yaksinina C (175).....	200
Espectro 51. Espectro de RMN ^1H -NOESY de la yaksinina B (174).....	206
Espectro A-1. Espectro de RMN ^1H de la heptaacetoxigeranina A.....	276
Espectro A-2. Espectro en el IR de la heptaacetoxigeranina A.....	277
Espectro A-3. Espectro de masas modalidad FAB $^+$ de la heptaacetoxigeranina A.....	278
Espectro A-4. Espectro de RMN ^1H de la pentametoxigeranina A.....	279
Espectro A-5. Espectro en el IR de la pentametoxigeranina A.....	280
Espectro A-6. Espectro de masas modalidad FAB $^+$ de	

la pentametoxigeranina A.....	281
Espectro A-7. Espectro en el IR de la geranina B.....	282
Espectro A-8. Espectro de UV de la geranina B.....	283
Espectro A-9. Espectro en el IR de la geranina C.....	284
Espectro A-10. Espectro de UV de la geranina C.....	285
Espectro A-11. Espectro de RMN ¹ H de la hexametoxigeranina B.....	286
Espectro A-12. Espectro de RMN ¹ H de la heptametoxigeranina C.....	287
Espectro A-13. Espectro de RMN ¹ H-COSY de la geranina B.....	288
Espectro A-14. Espectro de RMN ¹ H-NOESY de la geranina B.....	289
Espectro A-15. Espectro de RMN ¹ H-COSY de la geranina C.....	290
Espectro A-16. Espectro de RMN ¹ H-NOESY de la geranina C.....	291
Espectro A-17. Espectro de UV de la yaksinina A.....	292
Espectro A-18. Espectro de UV de la yaksinina B.....	292

Espectro A-19. Espectro de UV de la yaksinina C.....	292
Espectro A-20. Espectro en el IR de la yaksinina A.....	293
Espectro A-21. Espectro en el IR de la yaksinina B.....	293
Espectro A-22. Espectro en el IR de la yaksinina C.....	293
Espectro A-23. Espectro de RMN ^1H del camperol.....	294
Espectro A-24. Espectro de RMN ^1H de la isoramnetina.	294
Espectro A-25. Espectro de RMN ^1H de la quercetina....	294
Espectro A-26. Espectro de RMN ^{13}C del camperol.....	295
Espectro A-27. Espectro de RMN ^{13}C de la quercetina....	295
Espectro A-28. Espectro de RMN ^1H del ácido cafeico..	296
Espectro A-29. Espectro de RMN ^{13}C del ácido cafeico.	296
Espectro B-1. Espectro en el IR de la hiperina.....	298
Espectro B-2. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la hiperina	298
Espectro B-3. Espectro de RMN ^1H de la hiperina.....	299
Espectro B-4. Espectro de RMN ^{13}C de la hiperina.....	299
Espectro B-5. Espectro en el IR de la reinoutrina.....	300
Espectro B-6. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la reinoutrina	300

Espectro B-7. Espectro de RMN ^1H de la reinoutrina.....	301
Espectro B-8. Espectro de RMN ^{13}C de la reinoutrina...	301
Espectro B-9. Espectro en el IR del	
ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico.....	302
Espectro B-10. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de	
ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico.....	302
Espectro B-11. Espectro de RMN ^1H del	
ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico.....	303
Espectro B-12. Espectro de RMN ^{13}C del	
ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico.....	303
Espectro B-13. Espectro en el IR del galato	
de metilo.....	304
Espectro B-14. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de	
galato de metilo.....	304
Espectro B-15. Espectro de RMN ^1H del galato de	
metilo.....	305
Espectro B-16. Espectro de RMN ^{13}C del galato de	
metilo.....	305
Espectro B-17. Espectro en el IR de la mahuanina B.....	306

Espectro B-18. Espectro de masas modalidad FAB ⁺ de la mahuanina B.....	306
Espectro B-19 Espectro DC de la mahuanina B.....	307
Espectro B-20. Espectro de RMN ¹ H de la mahuanina B...	307
Espectro B-21. Espectro de RMN ¹ H de la astragalina...	308
Espectro B-22. Espectro de RMN ¹³ C de la astragalina	308
Espectro B-23. Espectro de RMN ¹ H de la isoquercitrina.....	309
Espectro B-24. Espectro de RMN ¹³ C de la isoquercitrina	309
Espectro B-25. Espectro de RMN ¹ H de la nicotinflorina.....	310
Espectro B-26. Espectro de RMN ¹ H de la narcisina.....	310
Espectro B-27. Espectro de RMN ¹ H de la rutina.....	311
Espectro B-28. Espectro de RMN ¹³ C de la nicotinflorina.....	311
Espectro B-29. Espectro de RMN ¹³ C de la	

narcisina.....	311
Espectro B-30. Espectro de RMN ¹³ C de la rutina.....	311
Espectro B-31. Espectro de RMN ¹ H del eritrodiol.....	312
Espectro B-32. Espectro de RMN ¹³ C del eritrodiol.....	312

Lista de Esquemas

Esquema 1. Ciclo de vida de la <i>E. histolytica</i>	10
Esquema 2. Ciclo de vida de la <i>G. lamblia</i>	15
Esquema 3. Extracción y fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico de las raíces de <i>G. niveum</i>	96
Esquema 4. Obtención del extracto cloroformo- metanólico (1:1) de las partes aéreas de <i>C. filaginoides</i>	102
Esquema 5. Fraccionamiento del extracto cloroformo- metanólico (1:1) de las partes aéreas de <i>C. filaginoides</i>	103

narcisina.....	311
Espectro B-30. Espectro de RMN ¹³ C de la rutina.....	311
Espectro B-31. Espectro de RMN ¹ H del eritrodiol.....	312
Espectro B-32. Espectro de RMN ¹³ C del eritrodiol.....	312

Lista de Esquemas

Esquema 1. Ciclo de vida de la <i>E. histolytica</i>	10
Esquema 2. Ciclo de vida de la <i>G. lamblia</i>	15
Esquema 3. Extracción y fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico de las raíces de <i>G. niveum</i>	96
Esquema 4. Obtención del extracto cloroformo- metanólico (1:1) de las partes aéreas de <i>C. filaginoides</i>	102
Esquema 5. Fraccionamiento del extracto cloroformo- metanólico (1:1) de las partes aéreas de <i>C. filaginoides</i>	103

Lista de Figuras

- Figura 1. Reacción de las proantocianidinas de tipo A con ácidos minerales.....32
- Figura 2. Estructuras generales de las proantocianidinas del grupo A-1 (41), del grupo A-2 (42) y del grupo A-3 (43).....34
- Figura 3. Estructuras generales de las proantocianidinas del grupo A de acuerdo a la orientación de los enlaces interflavonoide α (44) o β (45).....36
- Figura 4. Unidades flavan-3-ol más comunes que constituyen a las proantocianidinas de tipo A.....37
- Figura 5. Ruta biogenética propuesta para la formación de las proantocianidinas de tipo A.....41
- Figura 6. Flavonoides selectos con actividad biológica relevante descritos en la

literatura.....	59
Figura 7. Requerimientos estructurales necesarios que determinan las propiedades de captación de radicales libres y capacidad antioxidante.....	63
Figura 8. Compuestos derivados del metabolismo de flavonoides por la microflora intestinal humana o cepas de bacteria.....	64
Figura 9. <i>Geranium niveum</i>	66
Figura 10. Compuestos aislados de las especies <i>G. robertanum</i> . <i>G. thunbergii</i> , <i>G. macrohizum</i> y <i>G. sp</i>	68
Figura 11. Compuestos aislados de las especies <i>G. sanguineum</i> , <i>G. bourbon</i> y <i>G. phaeum</i>	73
Figura 12. <i>Conyza filaginoides</i>	76
Figura 13. Compuestos aislados de <i>C. filaginoides</i>	79
Figura 14. Estructura general de la geranina A.....	134
Figura 15. A) Conformación de máxima estabilidad y plano del MTPA propuesto para los	

ésteres (R)- y (S)- de Mosher. B) Modelo para determinar la estereoquímica absoluta en los alcoholes secundarios.....	137
Figura 16. Estructura de la geranina A (169).....	138
Figura 17. Equilibrio conformacional de 169	149
Figura 18. Equilibrio conformacional de 169a	149
Figura 19. Equilibrio conformacional de 169R y 169S	150
Figura 20. Estructura de la geranina B.....	158
Figura 21. Estructura de la geranina C.....	159
Figura 22. Estructura general de la geranina D.....	176
Figura 23. Estructura de la geranina D.....	180
Figura 24. Estructuras de las yaksininas A-C (173-175).....	205
Figura 25. Flavonoides de origen natural evaluados contra <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	211
Figura 26. Estructuras de los derivados metilados o acetilados de los flavonoides evaluados.....	218
Figura 27. Estructuras de los compuestos 126 y	

188-192.....	221
Figura 28. Modelos propuestos para la interacción de flavonoles y flavan-3-oles con el sitio receptor en los protozoarios <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	224
Figura 29. Interacción flavonoide receptor de los compuestos 30a y 78a.....	226
Figura 30. Interacción flavonoide receptor: (A)= <i>G. lamblia</i> y (B)= <i>E. histolytica</i>	227

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Agentes etiológicos de la diarrea infecciosa.....	3
Cuadro 2. Fármacos empleados en el tratamiento de la amibiasis y la giardiosis.....	20
Cuadro 3. Fármacos y compuestos antiprotozoarios de origen natural.....	27

188-192.....	221
Figura 28. Modelos propuestos para la interacción de flavonoles y flavan-3-oles con el sitio receptor en los protozoarios <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	224
Figura 29. Interacción flavonoide receptor de los compuestos 30a y 78a.....	226
Figura 30. Interacción flavonoide receptor: (A)= <i>G. lamblia</i> y (B)= <i>E. histolytica</i>	227

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Agentes etiológicos de la diarrea infecciosa.....	3
Cuadro 2. Fármacos empleados en el tratamiento de la amibiasis y la giardiosis.....	20
Cuadro 3. Fármacos y compuestos antiprotozoarios de origen natural.....	27

Cuadro 4. Clasificación de las proantocianidinas de tipo A con base al patrón de hidroxilación.....	33
Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural.....	43
Cuadro 6. Especies selectas de la flora medicinal mexicana que fueron recolectadas para determinar su potencial antiprotozoario.....	88
Cuadro 7. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	93
Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F3.....	97
Cuadro 9. Fraccionamiento terciario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F3-5.....	98
Cuadro 10. Obtención de los derivados metilados de los compuestos 30, 47, 78, 80, 92-94, 165 y 169-172.....	108

Cuadro 11. Obtención de los derivados acetilados de los compuestos 30, 78, 80, 94, 169 y 172	109
Cuadro 12. Obtención de los ésteres de Mosher de los compuestos 47 y 169-172	110
Cuadro 13. Efecto antiprotozoario de los extractos de las 19 plantas medicinales seleccionadas.	116
Cuadro 14. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la geranina A (169).....	123
Cuadro 15. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C de la geranina A (169).....	133
Cuadro 16. Desplazamientos químicos (RMN ¹ H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la geranina A 169R y 169S	145
Cuadro 17. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la geranina B (170).....	152
Cuadro 18. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la geranina C (171).....	153
Cuadro 19. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C de, las geraninas B y C (170 y 171).....	157

Cuadro 20. Desplazamientos químicos (RMN ^1H) para señales de los ésteres de Mosher de la geranina B 170R y 170S	160
Cuadro 21. Desplazamientos químicos (RMN ^1H) para señales de los ésteres de Mosher de la geranina C 171R y 171S	160
Cuadro 22. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la geranina D (172).....	173
Cuadro 23. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de, la geranina D (172).....	177
Cuadro 24. Desplazamientos químicos (RMN ^1H) para señales de los ésteres de Mosher de la geranina D 172R y 172S	180
Cuadro 25. Actividad antiprotozoaria de los compuestos obtenidos a partir de la fracción secundaria F3-5 derivada de la fracción primaria F3 de <i>G. niveum</i>	193
Cuadro 26. Desplazamientos químicos de RMN ^1H de las yaksininas A-C (173-175).....	198

Cuadro 27. Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C de las yaksininas A-C (173-175).....	201
Cuadro 28. Actividad antiprotozoaria de los compuestos obtenidos de <i>C. filaginoides</i>	208
Cuadro 29. Actividad antiprotozoaria de los flavonoides contra <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	215
Cuadro 30. Actividad antiprotozoaria de los flavonoides 30, 78 92-94 y 186, así como de los derivados metilados (30a, 78a, 92a-94a y 186a) y peracetilados (30b, 78b, 94b y 186b).....	219
Cuadro 31. Actividad antiprotozoaria de los compuestos 30, 78, 126, 186 y 188-192.....	222

RESUMEN

Como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas utilizadas para tratar trastornos gastrointestinales, la primera parte del presente proyecto de tesis doctoral describe la investigación química y la evaluación del potencial antiprotozoario de los metabolitos secundarios aislados de las especies *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Conyza filaginoides* (D. C.) Hieron (Asteraceae).

La selección de las especies vegetales, objeto de estudio, se realizó con base en los resultados obtenidos en la determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro*, contra trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, a partir de una serie de extractos orgánicos que fueron elaborados utilizando plantas mexicanas seleccionadas mediante el criterio etnomédico.

El fraccionamiento biodirigido del extracto obtenido de las raíces de *G. niveum*, empleando como bioensayo de seguimiento la actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* y *G. lamblia* y como técnicas de separación y purificación, la cromatografía en columna abierta y la cromatografía de líquidos de alta resolución, condujo al aislamiento de un fenol [el galato de metilo (165)], un terpenoide [el ácido 3- β -cafeoiloxi-12-oleanen-28-oico (166)], dos glicósidos de flavonoide [la reinoutrina (167) y la hiperina (168)] y cinco proantocianidinas del subtipo A-1 [mahuanina B (47) y geraninas A-D (169-172)]. Las geraninas A-D son análogos novedosos de la mahuanina B. La geranina D, es la tercera proantocianidina del subtipo A-1 de naturaleza trimérica.

De los ocho compuestos aislados de *G. niveum*, la geranina B fue el compuesto más activo contra ambos protozoarios. Los valores de CI_{50} calculados a partir de los resultados encontrados fueron 13.6 $\mu\text{g/mL}$ para *E.*

histolytica y de 6.0 $\mu\text{g/mL}$ para *G. lamblia*. La geranina A demostró una actividad relevante y selectiva contra *G. lamblia* (CI_{50} de 2.4 $\mu\text{g/mL}$). Resulta importante señalar que las geraninas A-C no desarrollaron una actividad citotóxica en ensayos *in vitro*.

Las propiedades antiprotozoarias descritas en la presente investigación para las proantocianidinas de tipo A resultan sin precedente. En consecuencia, estos productos constituyen nuevos prototipos estructurales para el desarrollo de agentes antiprotozoarios de utilidad terapéutica.

El estudio biodirigido del extracto activo de las partes aéreas de *C. filaginoides*, empleando como técnica de purificación la cromatografía en capa fina preparativa, permitió el aislamiento de un terpenoide [el eritrodiol (151)] y ocho flavonoles glicosídicos [las yaksininas A-C (173-175)], la astragalina (176), la isoquercitrina (177), la nicotinflorina (178), la narcisina (179) y la rutina (97). Los compuestos 173-

175 son flavonoides con estructuras novedosas. De los nueve compuestos aislados el eritrodiol y la nicotiflorina fueron los más activos contra ambos protozoarios (CI_{50} *E. histolytica* de 12.66 y 30.93 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; CI_{50} *G. lamblia* de 29.94 y 22.49 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). La yaksinina C, la isoquercitrina y la narcisina demostraron una actividad significativa contra *E. histolytica*. Los valores de CI_{50} oscilan entre 14.02 y 17.19 $\mu\text{g/mL}$.

De manera general, la elucidación estructural de los productos naturales aislados de las especies *G. niveum* y *C. filaginoides* se realizó mediante la aplicación de métodos químicos, espectrocópicos y espectrométricos. De manera adicional, en el caso particular de las proantocianidinas, se utilizaron métodos quirópticos y la metodología química de Mosher.

La segunda parte de la tesis describe un estudio de relación entre la estructura química y la actividad antiprotozoaria de 19 flavonoides selectos de origen

natural y algunos derivados. Los compuestos analizados incluyen flavan-3-oles, flavonoles, flavonas y flavanonas. Los resultados obtenidos permitieron establecer que compuestos de los tipos *cis*-flavan-3-oles como la (-)-epigallocatequina (186), la (-)-epicatequina (78) y la tetrametoxiepicatequina constituyen candidatos idóneos para el desarrollo de nuevos agentes de aplicación terapéutica para el tratamiento de la amibiasis intestinal y la giardiosis. La potencia de la tetrametoxiepicatequina como agente anti-giardia *in vitro* supero a la del metronidazol. Los resultados de este estudio permitieron establecer también que la actividad antiprotozoaria de los flavan-3-oles y los flavonoles no se debe a los productos de degradación metabólica de este tipo de compuestos.

ABSTRACT

As a part of our effort to discover natural products with potential use as antiprotozoal agents, 19 Mexican medicinal plants were screened for their ability to inhibit the growth of trophozoites of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Accordingly, after the initial observation of the significant activity displayed by some species, *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Conyza filaginoides* (D. C.) Hieron (Asteraceae) were selected for activity-guided fractionation.

Four new A-type proanthocyanidins, geranins A-D, were isolated from the antiprotozoal CHCl₃-MeOH extract of the roots of *G. niveum*. In addition, five known compounds, mahuannin B, reynoutrin, hyperin, methyl gallate and 3- β -caffeoyl-12-oleanen-28-oic acid, were obtained. Geranin B was the most active compound against both protozoa (IC₅₀= 13.6 μ g/mL for *E.*

histolytica and 6.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *G. lamblia*). However, geranin A showed selectivity against *G. lamblia* (IC_{50} from 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). It is important to point out that geranins A-C did not displayed cytotoxic activity against three different cell lines (MCF-7 breast carcinoma, HT-29 colon adenocarcinoma, and A-549 lung carcinoma).

Investigation on the aerial parts of *C. filaginoides* led to the isolation of three new acylated flavonol glycosides. The new compounds were given the trivial names of yaksinins A-C. In addition, six known compounds, erythrodiol, astragalin, isoquercitrin, nicotinflorin, narcissin, and rutin were obtained.

Erythrodiol and nicotinflorin were the most potent compounds against both protozoa with IC_{50} values ranging from 12.66 to 30.93 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *E. histolytica* and from 22.49 to 29.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *G. lamblia*.

The isolated compounds were identified by a combination of chemical and spectral methods including

MS and NMR measurements. The absolute configuration of the novel proanthocyanidins were determined using Mosher ester methodology and by CD measurements.

A number of biological properties, including anticancer, antiviral, and antiinflammatory activities, have been described for flavonoids. However, their antiprotozoal activity against axenically grown trophozoites of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* remains unexplored. Therefore, in order to contribute to the knowledge of the biological properties of this important group of secondary metabolites, the antiprotozoal activity of 19 plant flavonoids and some derivatives was evaluated. Among those, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, kaempferol, tetramethoxy-epicatechin, and tetramethoxy-kaempferol were the most potent flavonoids against both protozoa with IC_{50} values ranging from 1.92 to 7.93 $\mu\text{g/mL}$ for *E. histolytica* and from 0.043 to 8.73 $\mu\text{g/mL}$ in the case of *G. lamblia*.

Lista de abreviaturas

A Apéndice A

AcOEt Acetato de etilo

AMP Adenosina monofosfato

A-549 Línea celular de carcinoma de pulmón

B Apéndice B

C Apéndice C

c Concentrado

c/u Cada una

°C Grado centígrado

CCF Cromatografía en capa fina

CCFP Cromatografía en capa fina preparativa

CHCl₃ Cloroformo

CDCl₃ Cloroformo deuterado

CD₃OD Metanol deuterado

CI₅₀ Concentración inhibitoria cincuenta

CIM Concentración inhibitoria mínima

CL₅₀ Concentración letal cincuenta

CLAR Cromatografía de líquidos de alta resolución

cm Centímetro

d Doblete

dd Doble de doble

ddd Doble de doble de doble

DMSO Dimetil sulfóxido

DMSO- d_6 Dimetil sulfóxido deuterado

DC Dicroísmo circular

DCC diciclohexilcarbodiimida

E. Entamoeba

et al Colaboradores

FAB⁺ Bombardeo rápido de átomos, positivo

FMA Fase móvil A

FMB Fase móvil B

G. Giardia

g gramo

h Hora

HT-29 Línea celular de adenocarcinoma de colon

IC 95% intervalo de confianza al 95 %

IR Infrarojo

inter alia Varios autores

J Constante de acoplamiento

Kg Kilogramo

L Litro

M Molar

m multiplete

mg Miligramo

mm Milímetro

MeOH Metanol

μg Microgramo

μL Microlitro

MCF-7 Línea celular de carcinoma de mama

MHz Megahertz

mL Mililitro

NBA Alcohol nitrobencílico

ppm Partes por millón

pf Punto de fusión

RMN Resonancia magnética nuclear

RMN ^{13}C Resonancia magnética nuclear de carbono 13

RMN ^1H Resonancia magnética nuclear protónica

RMN $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMBC Espectroscopía bidimensional de
correlación heteronuclear múltiple (^1H - ^{13}C)

RMN $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -HMQC Espectroscopía bidimensional de
correlación heteronuclear (^1H - ^{13}C)

RMN ^1H -COSY Espectroscopía bidimensional de
correlación homonuclear (^1H - ^1H)

RMN ^1H -NOESY Espectroscopía bidimensional por efecto
nuclear Overhauser (^1H - ^1H)

SSA Secretaría de Salud

s Singulete

T Triplete

TMS Tetrametilsilano

t_{R} Tiempo de retención

UV Ultravioleta

VHI Virus de inmunodeficiencia humana

I ANTECEDENTES

I.1 Generalidades de la diarrea infecciosa

Las enfermedades diarreicas constituyen un gran problema de salud pública en los países en vía de desarrollo. Estos padecimientos son los responsables de una elevada tasa de morbilidad y mortalidad. En México hasta 1990 era la séptima causa de muerte. Las enfermedades diarreicas afectan a individuos de todas las edades, en especial a la población infantil, siendo una de las principales causas de mortalidad en menores de cinco años de edad (Olarte, 1992; SSA, 1993; Torres et al., 1995; Mayoral y Torres, 1996; Arredondo y Hernández, 1998; Braga et al., 1998).

De acuerdo a estadísticas recientes, anualmente en América Latina, de 120 a 170 millones de niños menores de 5 años se ven afectados por enfermedades diarreicas, y de éstas del 1 al 5% son causadas por protozoarios (SSA, 1993; Arredondo y Hernández, 1998).

En el caso particular de México, en 1990 se registraron 14,011 muertes por diarreas infecciosas (Mayoral y Torres, 1996). La frecuencia de la enteritis infecciosa es mayor en grupos de bajo nivel socioeconómico y comunidades en las que la diseminación fecal esta favorecida (SSA, 1993).

La diarrea es el resultado de un proceso inflamatorio del tubo gastrointestinal y puede deberse tanto a agentes no infecciosos (dietéticos, tóxicos, inmunológicos, hormonales) como infecciosos (bacterias, virus y parásitos de diferente naturaleza) (Cuadro 1). La diarrea constituye un mecanismo de respuesta del organismo ante un agente agresor. Por medio de las evacuaciones, el intestino enfermo elimina las bacterias, virus o parásitos que lo agreden (SSA, 1993; Arredondo y Hernández, 1998).

La diarrea infecciosa se caracteriza por la presencia de heces líquidas o acuosas, que se observan generalmente en un número mayor de tres veces en 24

horas y la manifestación clínica depende de factores propios del hospedero, de la capacidad infectante y patogenicidad de cada agente en particular, así como de las condiciones ambientales en que ambos coexistan.

Cuadro 1. Agentes etiológicos de la diarrea infecciosa.

VIRUS	BACTERIAS ENTEROTOXIGENICAS
<i>Rotavirus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Parvovirus (Norwalk, Hawaii, Colorado, Ditchilling)</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Adenovirus entericos</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Coronavirus calicivirus</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>Astrovirus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
PARASITOS	BACTERIAS ENTEROINVASIVAS
<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Salmonella thyphi</i>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
<i>Isospora belli</i>	<i>Shigella sp</i>
<i>Sarcocystis sp</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Ciclospora cayetanensis</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Blastosistis hominis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Microsporidia</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>

I.2 Generalidades de la amibiasis y la giardiosis

Las dos especies de protozoarios responsables de las enfermedades diarreicas más importantes de las regiones trópicas y subtropicales del mundo son la *Entamoeba histolytica* Schudinn, organismo responsable de la amibiasis, y la *Giardia lamblia* Stiles, parásito causante de la giardiosis (Cedillo-Rivera, 1989; Olarte, 1992; Wright et al., 1994; Kumate et al., 1998).

La amibiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud " como la presencia de *E. histolytica* en el ser humano, acompañada o no de manifestaciones clínicas" (Padilla et al., 1997). La infección con *E. histolytica* tiene una distribución universal (Gómez et al., 1996).

A nivel mundial, la amibiasis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad (Keene et al., 1986; González-Ruiz et al., 1992; WHO, 1992; Sohni et al., 1995; Gómez et al., 1996). Se estima que

alrededor de 500 millones de seres humanos en el mundo, cada año, son portadores asintomáticos de *E. histolytica*. Cerca del 10% de esta población desarrolla la enfermedad de manera sintomática en las formas de disentería, absceso hepático, ameboma, colitis fulminante, y con menor frecuencia como infección cutánea y pulmonar. La amibiasis intestinal es más frecuente, y letal en los extremos de la vida, mientras que el absceso hepático es más frecuente en varones entre 30 y 45 años y se asocia con una alta mortalidad (Keene et al., 1986). La amibiasis sintomática provoca entre 40 y 110 mil muertes por año y es la tercera causa de muerte provocada por protozoarios después del paludismo y la esquistosomiasis (Keene et al., 1986; Braga et al., 1998; Shukla y Das, 1988; Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992; WHO, 1992; González-Ruíz et al., 1992; Carrero y Laclette, 1996; Gómez et al., 1996; Haque et al., 1998).

En las regiones trópicas y subtropicales mal saneadas, la amibiasis alcanza prevalencias de 30 a 40%. Así, en Colombia y Brasil, se calculan prevalencias de hasta un 40%, y en Costa Rica del 27 al 55%. En otras regiones como en Bangladesh se han registrado prevalencias del 3.2%, en Arabia de 30% y es endémica en la India (Keene et al., 1986). En México, se considera que alrededor del 27% de la población puede estar parasitada y sólo el 10% llega a presentar alguna forma clínica de la enfermedad (Arellano et al., 1992; Olarte, 1992; Carrero y Laclette, 1996; Padilla et al., 1997). Cabe destacar que aunque se dice que en los últimos 20 años la enfermedad se ha incrementado en un 2.5% (Carrero y Laclette, 1996) estos datos epidemiológicos deben de tomarse con reserva debido a que se tomó como criterio de inclusión el análisis coproparasitológico el cual no distingue entre *E. histolytica* y *E. dispar*.

La amibiasis, como otras parasitosis, es el resultado de la pobreza y de condiciones sanitarias extremas en donde priva el hacinamiento y el mal manejo de aguas y de heces (Keene et al., 1986; Gómez et al., 1996).

El espectro de las manifestaciones clínicas observadas en los individuos infectados puede ser de dos tipos. En el primer tipo, infección asintomática intestinal, el parásito puede permanecer como comensal en el intestino sin provocar ninguna perturbación del bienestar del huésped; en el segundo, sintomático, el parásito causa daños en el huésped y se manifiesta principalmente como disentería y absceso hepático (Olarate, 1992).

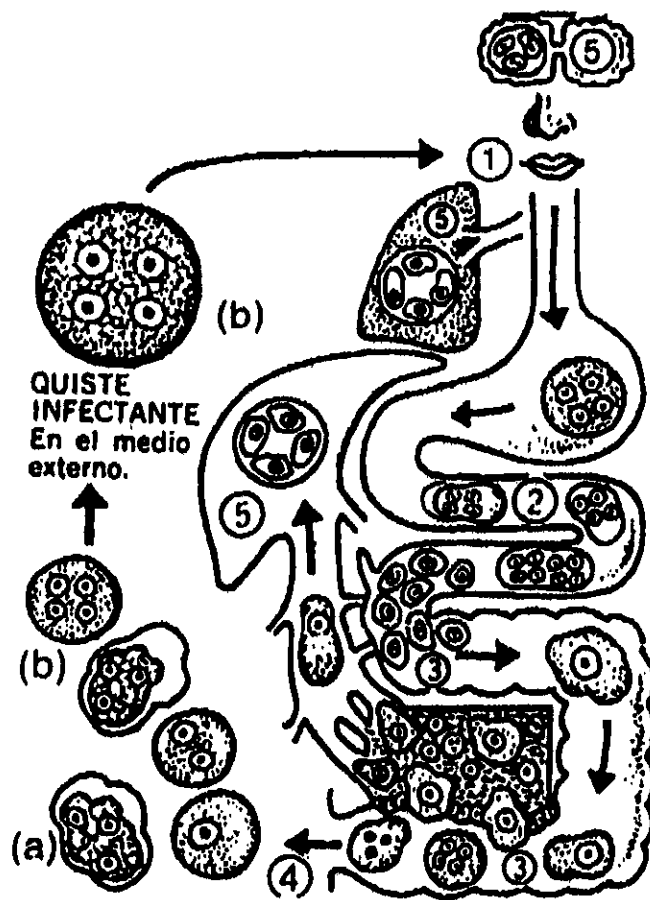
La amibiasis intestinal (disentería amibiana) es un problema de salud que afecta a niños y adultos; es un padecimiento endémico en grandes áreas del planeta, especialmente en los países en desarrollo (Searle, 1999), donde existen múltiples factores de tipo social,

económico, político y ecológico que son adversos para el control y la disminución de la frecuencia de esta parasitosis. Es necesario seguir insistiendo en el mejoramiento de las condiciones higiénicas personales y ambientales, manejo adecuado de los alimentos y adoptar medidas profilácticas en individuos asintomáticos, así como dar tratamiento a los pacientes con síntomas (Padilla *et al.*, 1997).

El agente causal de la amibiasis, *E. histolytica*, es un protozoario cosmopolita que parasita el intestino del hombre. Puede existir como trofozoito o como quiste. Los quistes son usualmente de 5-20 μm de diámetro, con uno a cuatro núcleos, y se pueden encontrar en la parte baja del intestino. El protozoario usualmente vive y se multiplica en el lumen del colon, vive en simbiosis con la flora bacteriana o como comensal del huésped quien puede o no manifestar los síntomas de la enfermedad. Los quistes maduros tetranucleados infectantes se diseminan por la heces

(Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992; WHO, 1992). Los trofozoitos son capaces de invadir hígado, cerebro y riñones provocando necrosis locales conocidas como abscesos (Keene et al., 1986). *E. histolytica* es un germen invasor del intestino que causa la amibiasis luminal y una variedad de síntomas de diversa intensidad. El protozoario es capaz de invadir y destruir células epiteliales del intestino grueso, causando ulceraciones y presencia de sangre en heces (Benítez et al., 1991; Arredondo y Hernández, 1998). En el Esquema 1 se ilustra el ciclo de vida de la *E. histolytica*.

Los parásitos como *E. histolytica* desarrollan su virulencia siempre como trofozoito, mediante la secreción de enzimas que facilitan la invasión de la mucosa colónica (Arredondo y Hernández, 1998).



- 1 - Ingestión de quistes infectantes (b).
- 2 - Formación Intestinal de amebas nucleadas.
- 3 - Formación de pequeñas amebas que se dirigen hacia el colon donde producen ulceraciones de la mucosa.
- 4 - Eliminación de trofozoitos no infectantes (a) y quistes infectantes (b).
- 5 - Localizaciones extraintestinales: hepática, pulmonar y cerebral.

Esquema 1. Ciclo de vida de la *E. histolytica*.

Los trofozoitos de *E. histolytica* se adhieren al epitelio intestinal provocando lesiones ulcerativas, o penetran al hígado y otros órganos causando grandes daños. La adhesión a las células blanco es mediada por las lectinas de superficie de *E. histolytica*. La destrucción celular ocurre por la liberación de mediadores líticos que incluyen proteínasas y lipasas (Carrero y Laclette, 1996; Kumate et al., 1998). La colonización del intestino por microorganismos capaces de invadir y multiplicarse en las células epiteliales se manifiesta generalmente por la presencia de sangre y moco en las evacuaciones. Además de estos signos, se observan manifestaciones clínicas de endotoxemia tales como fiebre y malestar general (Benítez et al., 1991). El hombre no es el único pero sí el principal reservorio del parásito. Como portador sano o convalesciente, es la principal fuente de quistes infectantes patógenos. El período en el que el hombre puede ser portador varía desde meses hasta dos años. La

forma básica de infección es la ingestión de quistes maduros, que se da en medios contaminados, mal saneados y con malos hábitos de higiene que propician el cierre del ciclo ano-mano-boca a través de aguas o alimentos contaminados (Conde-Bonfil y Mora Zerpa, 1992; Kumate et al., 1998). La mayoría de las infecciones provocadas por *E. histolytica* son asintomáticas, observándose únicamente quistes en las evacuaciones. En la enfermedad intestinal aguda necesariamente deben encontrarse trofozoítos en las evacuaciones frescas que confirmen el diagnóstico. En algunas regiones como México, por razones que se desconocen, los trofozoítos se presentan con cierta frecuencia en localizaciones extraintestinales, siendo la principal el hígado, ocasionando absceso hepático (Kumate et al., 1998).

Además, de la microscopía directa y del cultivo del parásito, se cuenta con diversos tipos de reacciones serológicas que ayudan al diagnóstico de la amibiasis.

La giardiosis es la protozoosis intestinal causada por *G. lamblia* (Cedillo-Rivera, 1989; Olarte, 1992; Devera et al., 1998), que afecta con mayor frecuencia a la población infantil en edad preescolar y escolar.

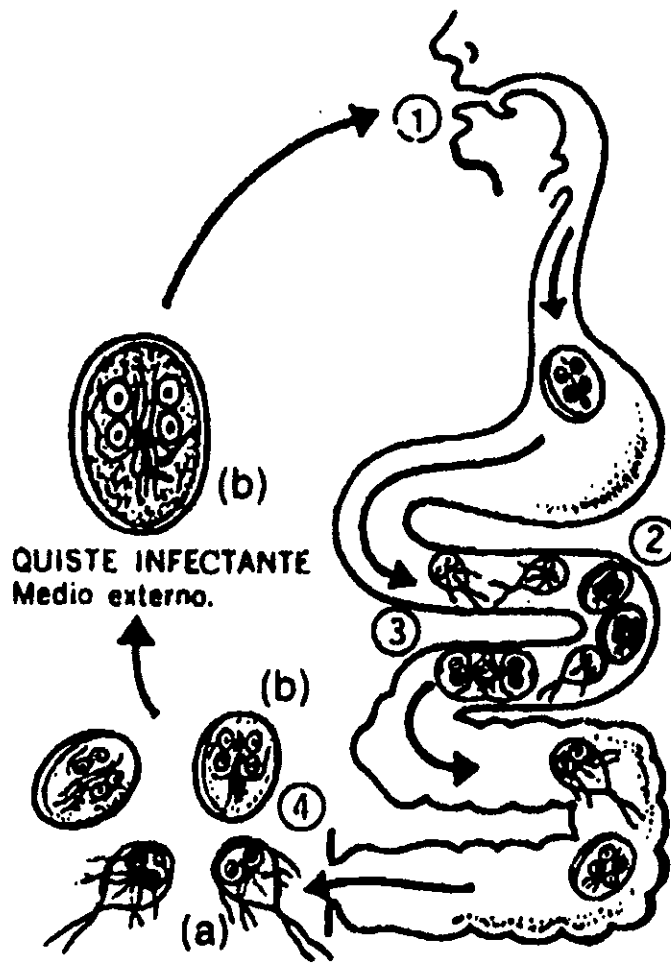
En el mundo es la enfermedad más común causada por parásitos (Arredondo y Hernández, 1998). Sus tasas de prevalencia varían entre el 1 y el 50%, y dependen de la localización geográfica, disponibilidad de servicios sanitarios y hábitos higiénicos de la población. En algunas regiones, particularmente en América Latina, esta parasitosis se ubica entre las primeras 20 causas de enfermedad infecciosa. Sin embargo, también se le encuentra con frecuencia en países industrializados como Estados Unidos de América del Norte (Cedillo-Rivera, 1989; Katelaris et al., 1994; Romero-Cabello et al., 1995; Rodríguez-García et al., 1996).

En México, la distribución de esta parasitosis muestra variaciones importantes de una región a otra, con prevalencias de entre 3 al 60% (Cedillo-Rivera,

1989, Katelaris et al., 1994; Romero-Cabello et al., 1995).

G. lamblia es un protozoario flagelado que infecta al hombre y a diversas especies animales; probablemente, es el protozoario más común que parásita el intestino delgado del hombre. *G. lamblia* habita en el duodeno y en la porción proximal del yeyuno a nivel de las criptas intestinales (Olarte, 1992; Katelaris et al., 1994; Devera et al., 1998). En el Esquema 2 se ilustra el ciclo de vida de la *G. lamblia*.

Clínicamente, la giardiosis tiene una gran variedad de manifestaciones, que pueden ir desde casos asintomáticos, que son la mayoría, hasta manifestaciones sintomáticas de duodenitis y eventualmente alteraciones evidentes de absorción intestinal. En el paciente pediátrico las manifestaciones más comunes son dolor abdominal, flatulencia, náusea, vómito, hiporexia, diarrea moderada y que en ocasiones puede ser aguda.



- 1 - Ingestión de quistes infectantes (b).**
- 2 - Localización en el intestino**
- 3 - División de trofozoitos**
- 4 - Eliminación de trofozoitos (a) y quistes (b).**

Esquema 2 Ciclo de vida de la *G. lamblia*.

La giardiosis se transmite por fecalismo de modo directo o a través del agua y los alimentos. Su diagnóstico se realiza por microscopía directa de las evacuaciones o del líquido duodenal.

I.3 Agentes quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de la amibiasis y la giardiosis.

Los agentes terapéuticos más utilizados para el tratamiento de la amibiasis (Cuadro 2) se clasifican, de acuerdo a su sitio de acción, en tres grupos: a) los que actúan en el lumen intestinal, como la diloxanida (1), el sulfato de paromomicina (2), la eritromicina (3), las 8-hidroxiquinolinas (4), la quinfamida (5) y la etofamida (6); b) los amebicidas tisulares, como la emetina (7), la deshidroemetina (8) y la cloroquina (9); y c) los que actúan en ambos niveles, como la nitazoxanida (10e), el metronidazol (10) y sus derivados [el tinidazol (10a), el nimorazol (10b), el ornidazol (10c) y el secnidazol (10d)]. Para el

tratamiento de la giardiosis se usa la furazolidona (11), la quinacrina (12), el albendazol (12a), el metronidazol y recientemente la nitazoxanida. Cabe destacar que tanto para la amibiasis como para la giardiosis el fármaco de elección es el metronidazol (Noori et al., 1988; Meloni et al., 1990; Goodman et.al., 1988; 1990; Guarner, 1991; Phillipson, 1991; Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992; Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992; Chávez et al., 1992; SSA, 1993; Romero-Cabello et al., 1995; Sohni et al., 1995).

El empleo de la emetina para el tratamiento de la disentería tiene sus orígenes en el uso tradicional de la raíz de ipecacuana (*Cephaelis ipecacuhana*, Rubiaceae) por ciertas etnias de las selvas amazónicas del Brasil. Los indígenas de estas áreas usaban la infusión de la raíz de la planta para tratar la disentería, mucho antes de la llegada de los europeos en América. En 1912 se aisló la emetina (7) de la ipecacuana y se demostró su actividad anti-amibiana in

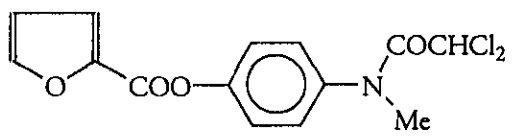
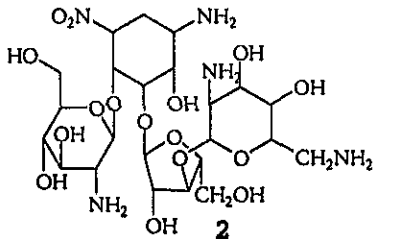
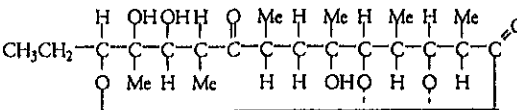
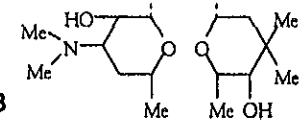
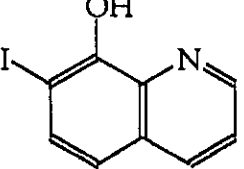
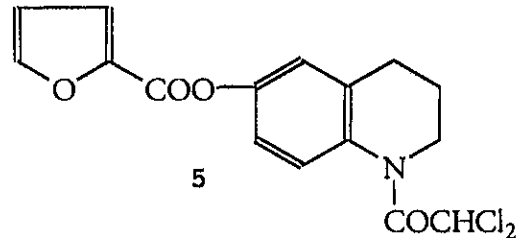
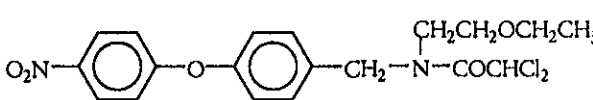
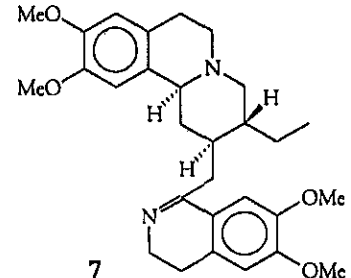
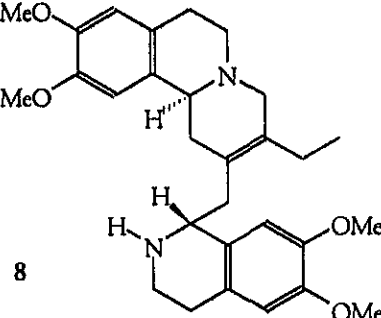
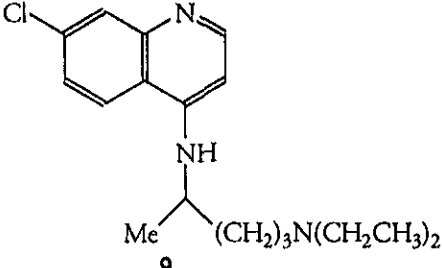
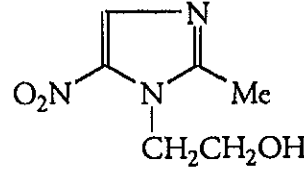
vivo (Kretschmer, 1990). Aunque por más de 300 años la ipecacuana constituyó el único remedio para el tratamiento de la disentería, en la actualidad el uso de la emetina se encuentra restringido debido a sus efectos indeseables como son dolor, cardiotoxicidad y necrosis en el sitio de inyección (Goodman et. al., 1998; 1990; Phillipson, 1991). Los efectos colaterales observados en pacientes tratados con emetina dieron origen a la búsqueda de nuevos sustitutos sintéticos y naturales.

Los fármacos empleados actualmente para el tratamiento de la amibiasis y la giardiosis en su mayoría son eficaces, pero no siempre son bien aceptados ya que los tratamientos son largos y a menudo es necesario prescribir terapias de combinación con dos o más compuestos para obtener el efecto deseado. Así mismo, la administración de estos fármacos causa diversos efectos colaterales indeseables (intolerancia, náusea, mal sabor de boca, efecto antabuse, reacciones

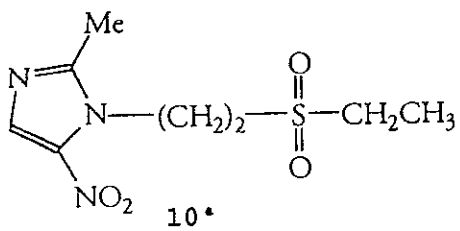
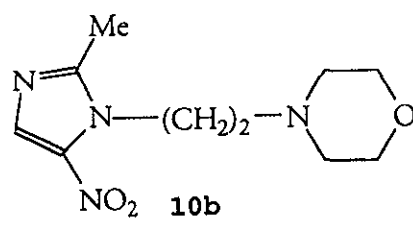
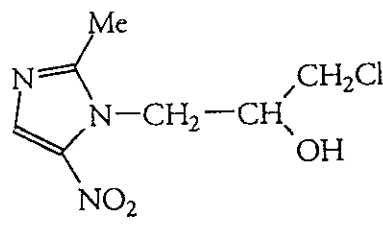
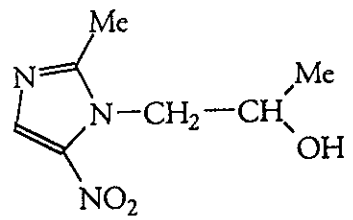
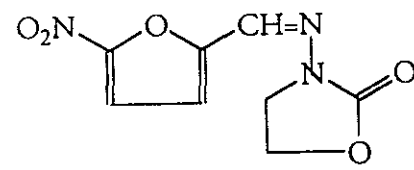
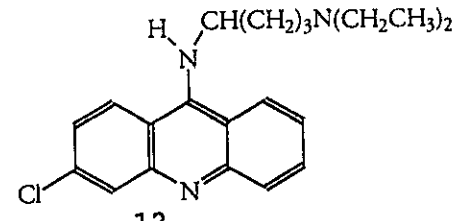
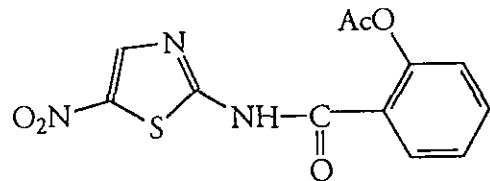
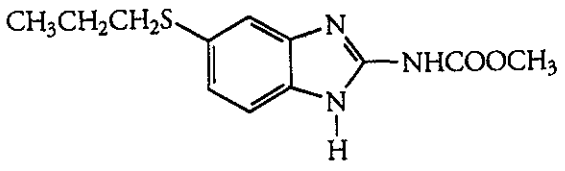
de hipersensibilidad, dolor abdominal, vértigo y discracias sanguíneas, entre otros), lo que en ocasiones provoca el abandono del tratamiento con el consecuente fracaso terapéutico (Noori et al., 1988; Wright et al., 1988; Shukla y Das, 1988; Meloni et al., 1990; Phillipson, 1991; Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992; Chávez et al., 1992; Katelaris et al., 1994; Romero-Cabello et al., 1995; Padilla et al., 1997).

De manera adicional, el metronidazol es carcinogénico en roedores y mutagénico en bacterias (Keene et al., 1986; Shukla y Das, 1988; Gómez et al., 1996). También se han descrito casos de diferencia en la susceptibilidad en cepas de *E. histolytica* y *G. lamblia*, lo cual podría ser un indicio del desarrollo de resistencia de estos parásitos al metronidazol (Noori et al., 1988; Meloni et al., 1990; Phillipson, 1991; Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992; Chávez et al., 1992; Gómez et al., 1996; Lindquist, 1996).

Cuadro 2. Fármacos empleados en el tratamiento de la amebiasis y la giardiasis.

 <p style="text-align: center;">1</p>	 <p style="text-align: center;">2</p>
  <p style="text-align: center;">3</p>	 <p style="text-align: center;">4 R = Cl, I</p>
 <p style="text-align: center;">5</p>	 <p style="text-align: center;">6</p>
 <p style="text-align: center;">7</p>	 <p style="text-align: center;">8</p>
 <p style="text-align: center;">9</p>	 <p style="text-align: center;">10</p>

Cuadro 2. Fármacos empleados en el tratamiento de la amibiasis y la giardiosis (continuación).

 <p>10a</p>	 <p>10b</p>
 <p>10c</p>	 <p>10d</p>
 <p>11</p>	 <p>12</p>
 <p>10e</p>	 <p>12a</p>

Por otra parte, las 8-hidroxiquinolinas producen neuropatía mielóptica subaguda (Koch-Weser y Goldman, 1980; Biagi, 1981; Goodman *et al.*, 1988; 1990; González-Garza *et al.*, 1992).

Por último, cabe destacar que en la actualidad no hay un medicamento para tratar la amibiasis y la giardiosis que no presente efectos colaterales indeseables. Con base en lo antes expuesto, sin lugar a duda, es importante continuar con la búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios alternativos con una mayor potencia y de menor toxicidad (Keene *et al.*, 1986; Wright *et al.*, 1988; González-Garza *et al.*, 1992). En este sentido las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, incluyendo las diarreas, pueden constituir un punto de partida para el hallazgo de nuevos antiprotozoarios de origen natural, útiles contra *E. histolytica* y *G. lamblia* (Sohni *et al.*, 1995).

I.4 Compuestos con actividad antiamebiana y antigiardia de origen natural

Aún cuando no se han realizado suficientes investigaciones referentes a la obtención de agentes antiprotozoarios de origen natural, es posible constatar en la literatura que además de la emetina, la berberina (13), la glaucarubina (14) y la aesculetina (15) (Cordell, 1993), existen otros compuestos naturales con propiedades antiprotozoarias. La mayoría de estos metabolitos se han aislado de plantas utilizadas para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, incluyendo la disentería, en varias regiones del mundo. En el Cuadro 3 se ilustran algunos ejemplos importantes de fármacos y compuestos antiprotozoarios de origen natural, mismos que pertenecen a numerosas categorías de metabolitos secundarios incluyendo alcaloides diversos, cumarinas, xantonas y terpenoides.

Entre los alcaloides destacan la triptamina (16), la borrerina (17), la conesina (18), la carpaina (19) y la tiloforina (20). Los terpenoides que han demostrado actividad antiprotozoaria *in vitro* son las bruceinas A-C (21-23), la ailantona (24), la chaparrina (25), la glaucarubinona (26) y la holacantona (27). Otros compuestos importantes incluyen a la furanocumarina marmelosina (28), la xantona mangostina (29), los flavonoles camperol (30) y tilirósido (31), las isoflavonas formononetina (32) y calicosina (33), la acetogenina anemonina (34) y el sesquiterpenoide gossipol (35). En el caso particular de México, la extensa bibliografía que compila la herbolaria nacional indica que existen un gran número de especies que gozan de reputación como remedios para tratar trastornos gastrointestinales, incluyendo diarreas.

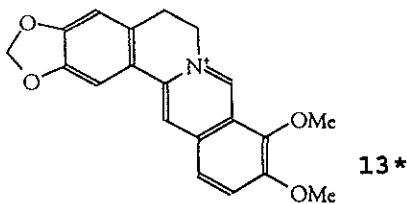
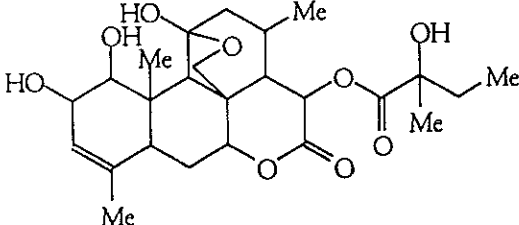
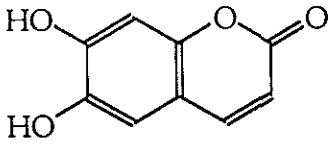
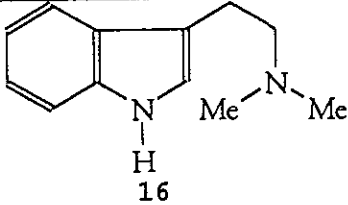
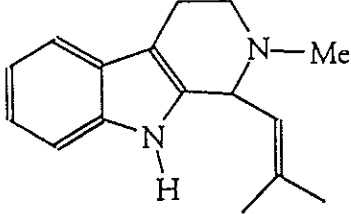
Sin embargo, resulta evidente que en la actualidad sólo se tiene un conocimiento empírico de estas plantas, ya que a la fecha, únicamente hay dos estudios

aislados, en uno de ellos se demuestra la actividad anti-giardia de algunas plantas (Ponce-Macotella *et al.*, 1994); en el segundo estudio, se comprobó la actividad de la chaparrina (25), compuesto aislado de *Castela texana* (Calzado-Flores *et al.*, 1986). En ninguno de los casos se realizó un estudio biodirigido y los autores se limitaron al aislamiento y la evaluación de los productos mayoritarios presentes en las plantas.

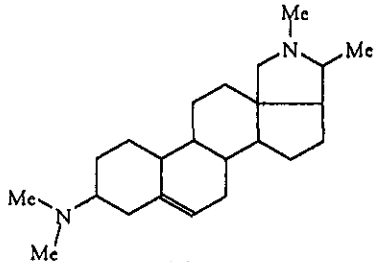
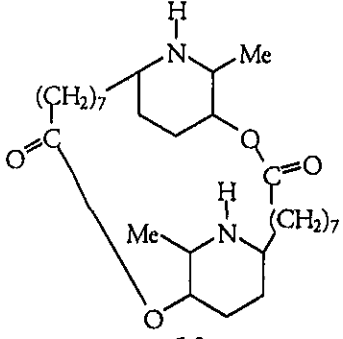
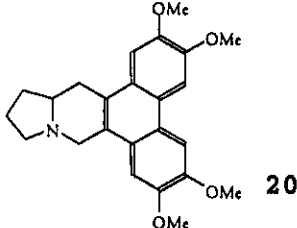
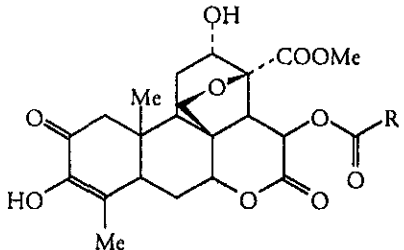
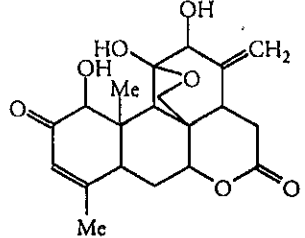
La estrategia de obtener nuevos compuestos con propiedades antiprotozoarias contra *E. histolytica* y *G. lamblia* a partir de plantas medicinales usadas para tratar trastornos gastrointestinales constituye una alternativa viable que debe continuar siendo abordada, aún más, si se considera que México es un país con una amplia variedad de flora medicinal y donde las diarreas infecciosas ocupan un importante lugar como problema de salud pública. En este contexto surgió la presente disertación doctoral la cual describe en primer lugar el aislamiento y la caracterización estructural de una

serie de proantocianidinas del tipo "A" y flavonoles con propiedades antiprotozoarias de la especies *Geranium niveum* y *Conyza filaginoides*. Así mismo, tomando en cuenta que recientemente algunos flavonoles de especies vegetales mexicanas presentan una actividad antiprotozoaria significativa (Calzada et al., 1995; 1998), se consideró pertinente realizar un estudio de relación estructura química-actividad antiprotozoaria de flavonoles selectos con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades antiprotozoarias de este importante grupo de compuestos.

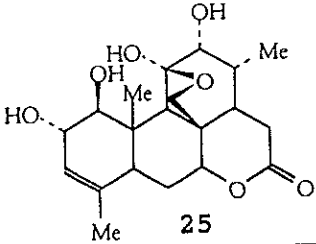
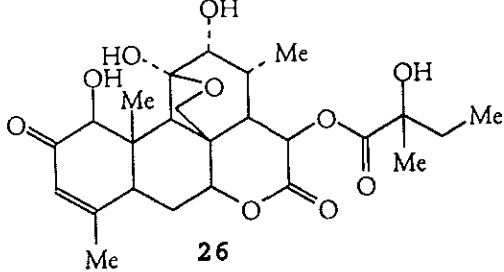
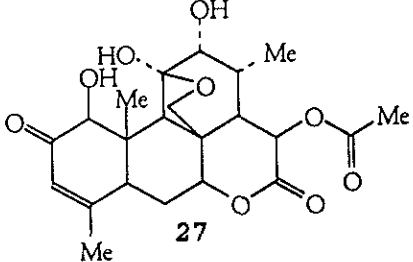
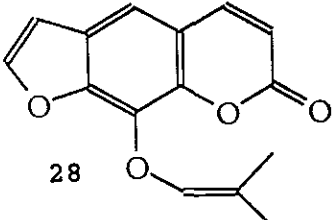
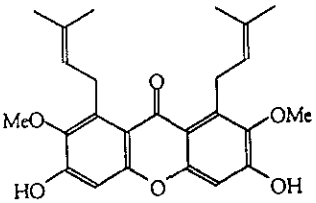
Cuadro 3. Fármacos (*) y compuestos antiprotozoarios de origen natural.

Estructura química	Referencia
 <p style="text-align: center;">13*</p>	Ekong et al., 1991
 <p style="text-align: center;">14*</p>	Ekong et al., 1991
 <p style="text-align: center;">15*</p>	Cordel, 1993
 <p style="text-align: center;">16</p>	Oliver-Bever, 1986
 <p style="text-align: center;">17</p>	Oliver-Bever, 1986

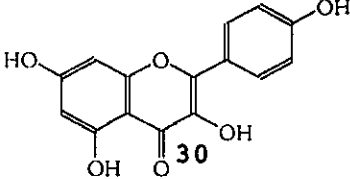
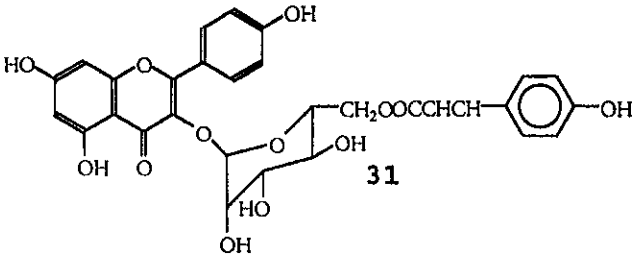
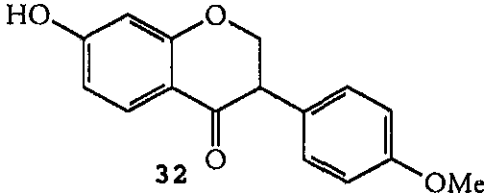
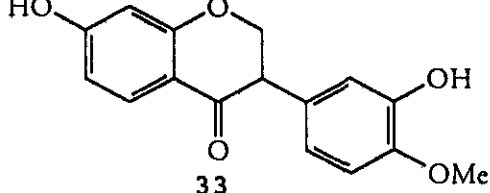
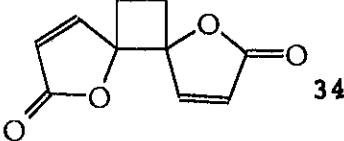
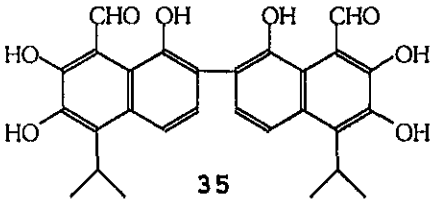
Cuadro 3. Fármacos y compuestos antiprotozoarios de origen natural (continuación).

 <p style="text-align: center;">18</p>	<p>Ekong et al., 1991</p>
 <p style="text-align: center;">19</p>	<p>Oliver-Bever, 1986</p>
 <p style="text-align: center;">20</p>	<p>Bhutani et al., 1987</p>
 <p style="text-align: center;">21=R=CH₂CH(Me)₂ 22=R=Me 23=R=CH=(Me)C(OH)(Me)₂</p>	<p>Wright et al., 1988</p>
 <p style="text-align: center;">24</p>	<p>Ekong et al., 1991</p>

Cuadro 3. Fármacos y compuestos antiprotozoarios de origen natural (continuación).

 <p>25</p>	Keene et al., 1986
 <p>26</p>	Phillipson y O'Neill, 1987
 <p>27</p>	Phillipson y O'Neill, 1987.
 <p>28</p>	Ekong et al., 1991
 <p>29</p>	Ekong et al., 1991

Cuadro 3. Fármacos y compuestos antiprotozoarios de origen natural (continuación).

 <p style="text-align: center;">30</p>	Calzada et al., 1995
 <p style="text-align: center;">31</p>	Calzada et al., 1995
 <p style="text-align: center;">32</p>	Elsohly et al., 1999
 <p style="text-align: center;">33</p>	Elsohly et al., 1999
 <p style="text-align: center;">34</p>	Ekong et al., 1991
 <p style="text-align: center;">35</p>	González-Garza et al., 1992.

I.5 Generalidades de las proantocianidinas de tipo A

Debido a que algunos de los metabolitos novedosos encontrados en este estudio fueron proantocianidinas de tipo A se realizó una investigación bibliográfica sobre estos compuestos.

Las proantocianidinas de tipo A son metabolitos secundarios constituidos por dos unidades flavan-3-ol que se unen entre sí a través de dos enlaces interflavonoide, el primero del tipo carbono-carbono y el segundo del tipo carbono-oxígeno-carbono (tipo éter). Los enlaces interflavonoide se establecen entre los anillos C y D e invariablemente generan un anillo de tipo pirano (Morimoto et al., 1987; Nonaka et al., 1987; Lewis y Yamamoto, 1988; Haslam, 1989; Ferreira et al., 1992). El tratamiento con ácidos minerales de las proantocianidinas de tipo A genera una antocianidina (53a) (Figura 1)

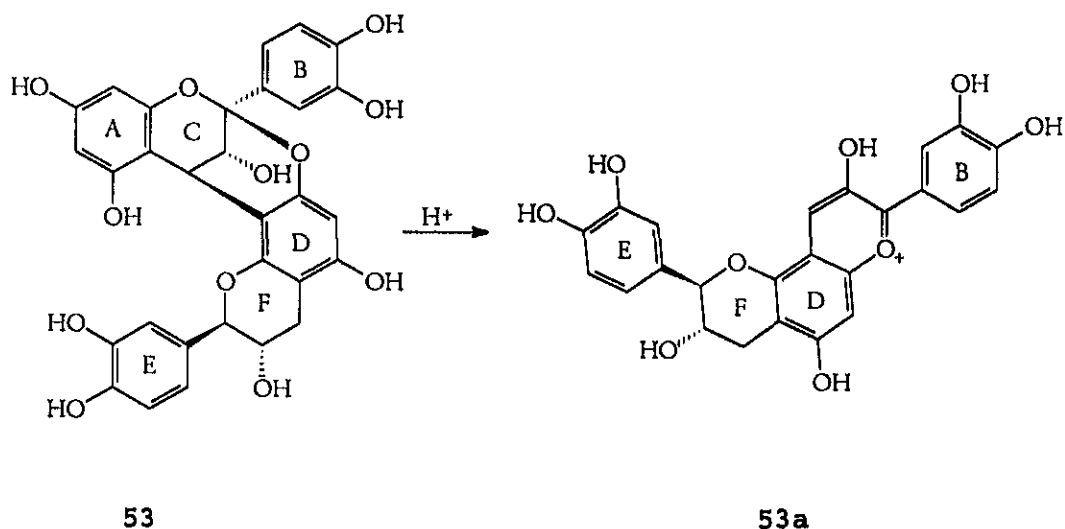
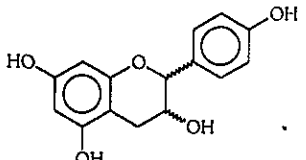
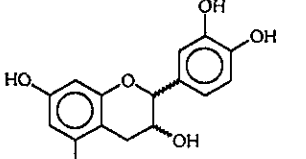
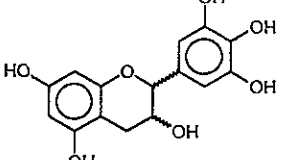
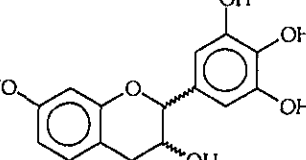
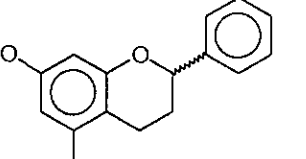


Figura 1. Reacción de las proantocianidinas de tipo A con ácidos minerales

Inicialmente las proantocianidinas se clasificaron con base en el grado de hidroxilación de la estructura monomérica (Cuadro 4) (Ohigashi *et al.*, 1982; Hemingway, 1992; Kolodziej *et al.*, 1993; Ferreira y Bekker, 1996). Así, las proantocianidinas se clasificaron en cinco grupos: las propelargonidinas (36), las procianidinas (37), las prodelfinidinas (38), las prorobinetidinas (39) y las prodracoflavanidinas (40). Esta clasificación resultó apropiada para

aquellos compuestos cuyas unidades flavan-3-ol eran idénticas. Conforme se descubrieron nuevas proantocianidinas con unidades monoméricas distintas, esta clasificación perdió vigencia.

Cuadro 4. Clasificación de las proantocianidinas de tipo A con base al patrón de hidroxilación.

Clase	Tipo de hidroxilación	Flavan-3-ol
Propelargonidinas (36). (Epi-afzelequina, ent-epiafzelequina, afzelequina, ent-afzelequina)	3, 5, 7, 4'	
Procianidinas (37) (Catequina, ent-catequina, epi-catequina, ent-epicatequina)	3, 5, 7, 3', 4'	
Prodelfinidinas (38) (Epi-galocatequina)	3, 5, 7, 3', 4', 5'	
Prorobinetidinas (39) (Robinetinidol)	3, 7, 3', 4', 5'	
Prodracoflavanidinas (40) (Dracorubina)	5, 7	

En la actualidad las proantocianidinas de tipo A se clasifican en tres grupos, A-1, A-2 y A-3 (Figura 2), considerando la naturaleza de los enlaces interflavonoide. En las proantocianidinas del grupo A-1 los dos monómeros se unen, por una parte, a través del carbono de la posición dos del anillo C (2C) y el hidroxilo ubicado en la posición siete del anillo D (7D) y, por la otra, entre el carbono cuatro del anillo C (4C) y el carbono ocho del anillo D (8D).

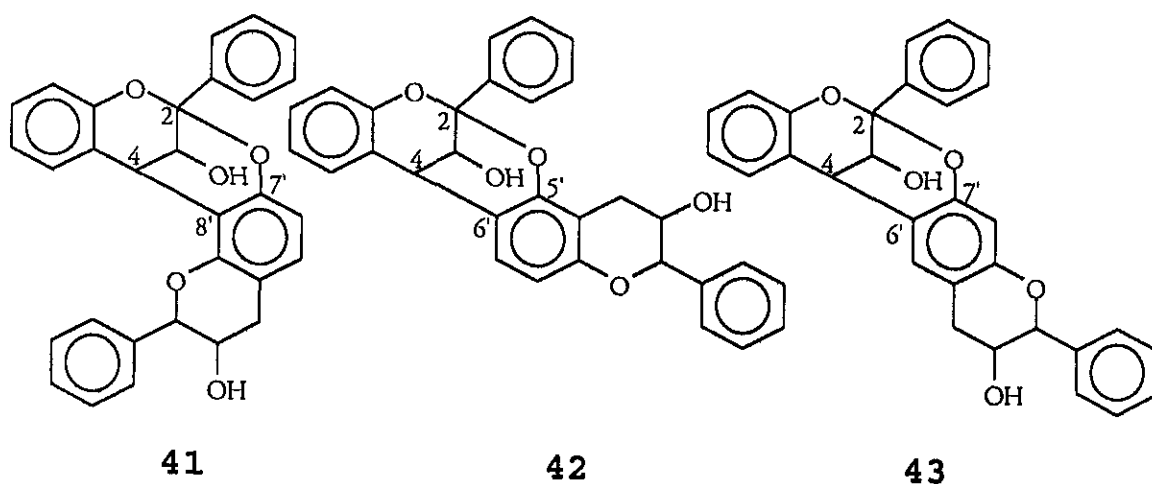


Figura 2. Estructuras generales de las proantocianidinas del grupo A-1 (41), del grupo A-2 (42) y del grupo A-3 (43).

Las uniones recién descritas se expresan de la siguiente forma: $2C \rightarrow O \rightarrow 7D$ y $4C \rightarrow 8D$ (41), respectivamente. En las proantocianidinas del grupo A-2, la unión de las dos unidades flavan-3-ol es del tipo $2C \rightarrow O \rightarrow 5D$ y $4C \rightarrow 6D$ (42). Por último, en las del grupo A-3, la unión de las dos moléculas es del tipo $2C \rightarrow O \rightarrow 7D$ y $4C \rightarrow 6D$ (43). Las proantocianidinas de los grupos A-1, A-2 y A-3, a su vez se clasifican en dos clases dependiendo de la orientación de los enlaces interflavonoide: las de la serie α (44) y las de la serie β (45) (Figura 3).

Para designar a las proantocianidinas de tipo A, primero se nombra a la unidad flavan-3-ol superior seguida entre paréntesis de la ubicación y orientación de los enlaces interflavonoide y, por último, se menciona a la unidad flavan-3-ol terminal. En la Cuadro 5 se resumen las 31 proantocianidinas de tipo A y las dos proantocianidinas triméricas descritas en la

literatura, incluyéndose los nombres triviales, los nombres químicos y las fuentes naturales.

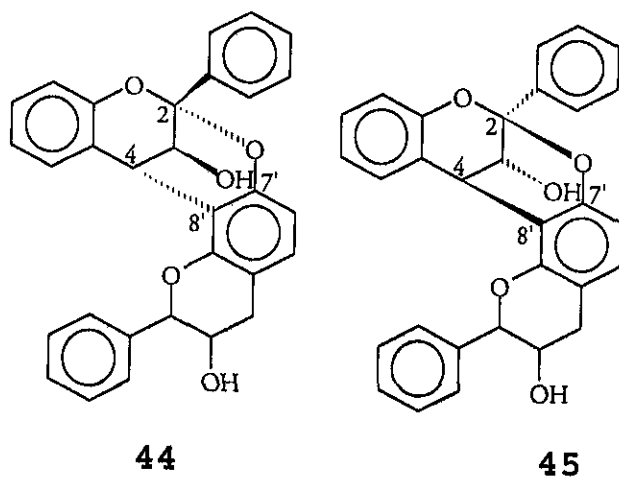


Figura 3. Estructuras generales de las proantocianidinas de tipo A de acuerdo a la orientación de los enlaces interflavonoide α (44) o β (45).

De acuerdo con las estructuras ilustradas en la Cuadro 5, las proantocianidinas más abundantes son las del grupo A-1. A la fecha se han aislado 28 de estos compuestos, 18 de los cuales presentan el enlace interflavonoide β orientado (47 y 48, 54-56, 67, 70-75a) y diez α orientado (46, 57, 60-63, 65-66, 68-69).

Cabe destacar que en el caso de las proantocianidinas de los grupos A-2 (48 y 58) y A-3 (59 y 64), sólo se han aislado dos compuestos de cada categoría y en los cuatro casos la unión interflavonoide es β .

En relación a la unidad flavan-3-ol que presentan las proantocianidinas (Figura 4) los monómeros más comunes de acuerdo a la frecuencia en la que aparecen en los compuestos son: la epicatequina (78), la ent-epicatequina (79), la catequina (80), la epi-afzelequina (81), la afzelequina (82) y la ent-afzelequina (83).

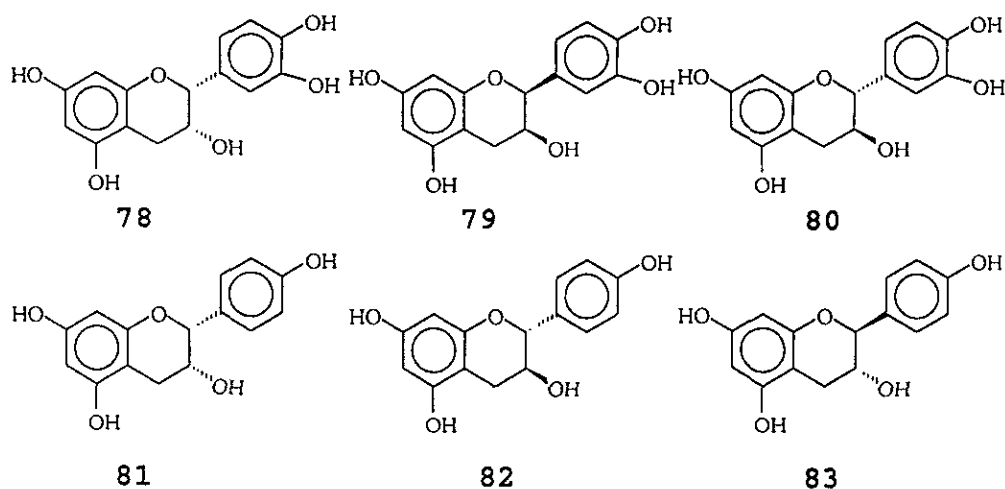


Figura 4. Unidades flavan-3-ol más comunes que constituyen a las proantocianidinas de tipo A.

Con respecto al grado de hidroxilación de las unidades flavan-3-ol en las dos unidades componentes, 14 de los compuestos descritos (53-66) presentan el patrón de hidroxilación de una procianidina; seis (72-75a) conservan la hidroxilación de una prodracoflavanidina, cinco (48-52) recuerdan la hidroxilación de una propelargonidina y uno (67) presenta el mismo grado de hidroxilación de la prodelfinidina. Las cuatro restantes presentan monómeros distintos y el grado de hidroxilación en los mismos corresponde a una combinación de propelargonidina-procianidina (68-70) o de prorobinetidina-procianidina (71).

Es importante destacar que algunas proantocianidinas de tipo A sufren modificaciones, por lo que merecen un comentario adicional. Así los compuestos 51 y 52 son metoxilados en la posición 7a. Las proantocianidinas 62 y 63 se encuentran bajo la forma de O-glicósidos; el azúcar, galactosa en 62 y

arabinosa en **63**, se encuentra unida al hidroxilo de la posición 3C. En los compuestos **72-75a**, las posiciones 5A y 6A están metoxiladas y en la posición 3C y 3F no se observan grupos hidroxilos. En el compuesto **67** el hidróxilo de la posición 3F se encuentra esterificado con el ácido gálico. Por último, los compuestos **76** y **77** incorporan una unidad adicional de flavan-3-ol para formar una estructura trimérica doblemente unida. Cabe destacar que a la fecha sólo se han descrito dos de estos productos (Balde *et al.*, 1995).

La hipótesis aceptada (Figura 5) para la biosíntesis de las proantocianidinas propone que estos productos son de biogénesis mixta generándose a través de las rutas acetato-malonato y ácido siquímico (Lewis y Yamamoto, 1988, Hergert, 1988). Tres moléculas de malonil coenzima A (**84**) y una molécula de *p*-cumaroil coenzima A (**85**) se condensan en presencia de una chalcona sintetasa para dar origen al intermediario (**86**) que se cicla al eriodictiol (**87**) por catálisis de

una enzima de tipo chalcona isomerasa. Posteriormente laa flavanona (87) se oxida en la posición 3C para dar origen a la 3-hidroxi-flavanona (88). Las 3-hidroxi-flavanonas en la naturaleza invariablemente poseen una estereoquímica 2, 3-trans que se retiene después de la reducción que da origen al flavan-3, 4-diol (89); una segunda reducción de 89 permite obtener el carbocatión flavanil-3-ol (90) que se condensa con otra unidad flavanil-3-ol, para generar los dímeros 91 y 91a; estos últimos intermediarios se ciclan de distintas formas para así generar los tres subtipos de proantocianidinas de tipo A (41-43).

Las proantocianidinas de tipo A son compuestos poco comunes en la naturaleza y se han aislado de algunas especies de las familias *Ericaceae*, *Ephedraceae*, *Hippocastanaceae*, *Lauraceae*, *Leguminaceae*, *Palmae*, *Polypodiaceae*, *Rhizophoraceae*, *Rosaceae*, *Rubiaceae*, *Sterculiaceae* (Kasahara et al., 1983; Morimoto et al., 1987; Porter et al., 1991; Baldé et al., 1991; Drewes

et al., 1992; Baek et al., 1994; Stobiecki y Popenda, 1994; Arnone et al 1997).

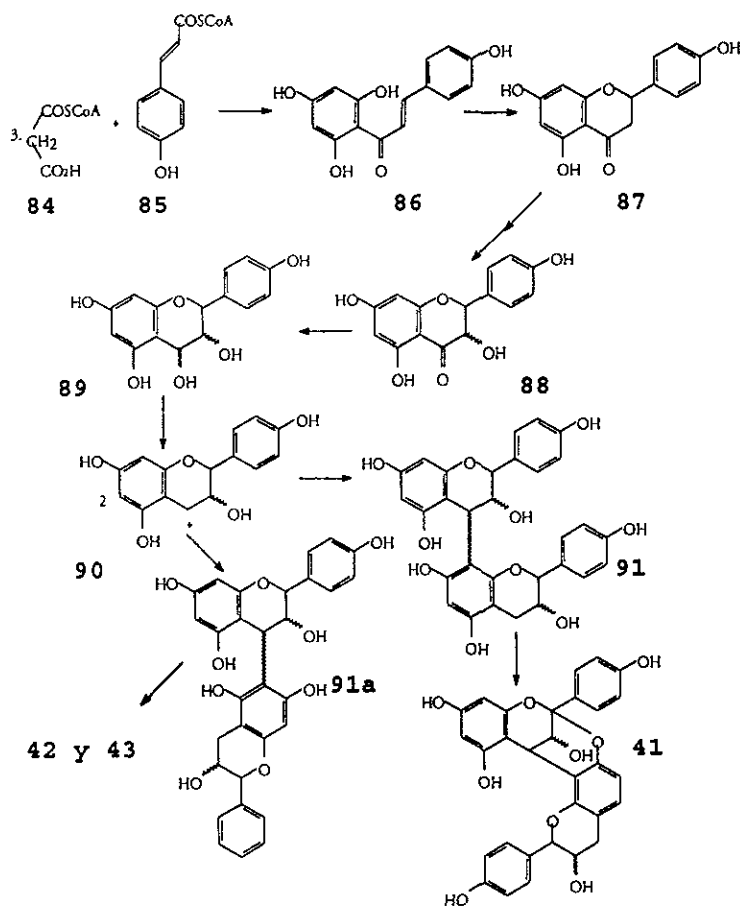


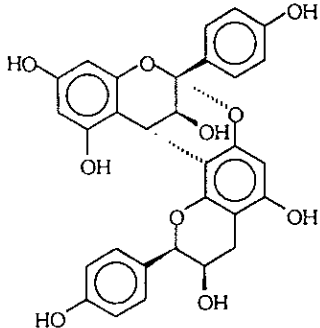
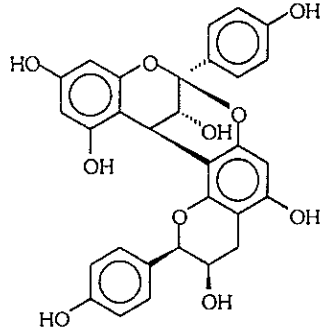
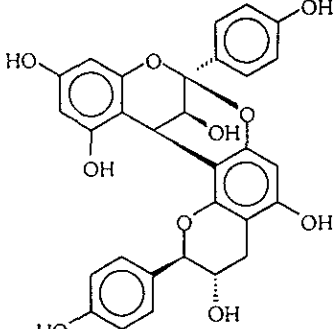
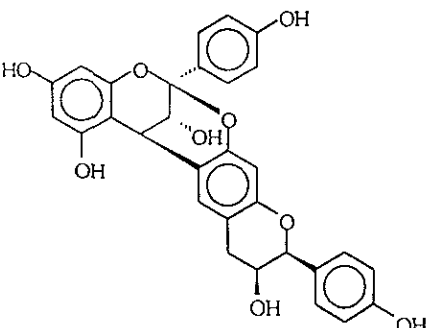
Figura 5. Ruta biogénica propuesta para la formación de las proantocianidinas de tipo A.

El potencial medicinal y plaguicida de las proantocianidinas de tipo A ha sido poco investigado. Los escasos estudios realizados han demostrado que las

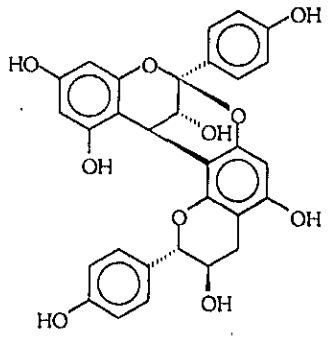
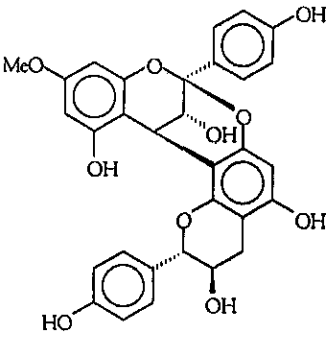
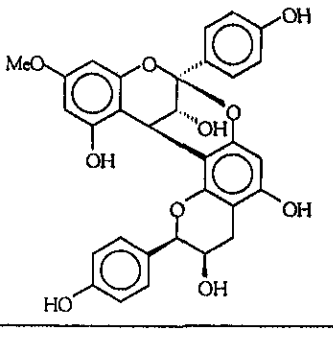
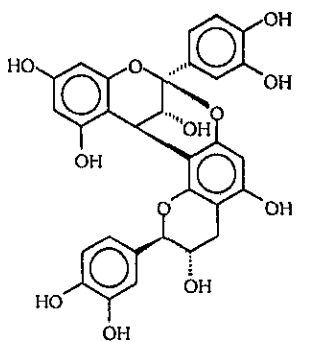
mahuninas " A-C" (46, 47 y 49) poseen propiedades hipotensivas (Hikino *et al.*, 1982; Kasahara *et al.*, 1983). Por otra parte, el compuesto PIa (48) inhibe el crecimiento radicular de las semillas de arroz (Ohigashi *et al.*, 1982). Por último, la mezcla de dracoflanos B₁ y B₂ (72 y 73) demostraron un efecto antiinflamatorio significativo *in vivo* (Arnone *et al.*, 1997).

Para la elucidación estructural de las proantocianidinas de tipo A se utilizan métodos químicos, quirópticos y espectroscópicos principalmente de resonancia magnética nuclear (RMN) (Hiquino *et al.*, 1982; Baldé *et al.*, 1991; Kolodziej *et al.*, 1991; Pant *et al.*, 1992; Drewes *et al.*, 1992; 1994). Resulta importante destacar que sólo en el caso de la procianidina A-2 (54) la confirmación estructural se basó en estudios de difracción de rayos X (Cronjé *et al.*, 1993).

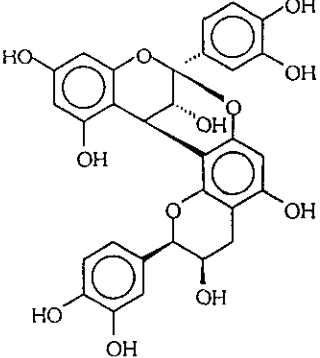
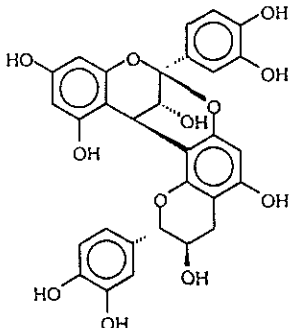
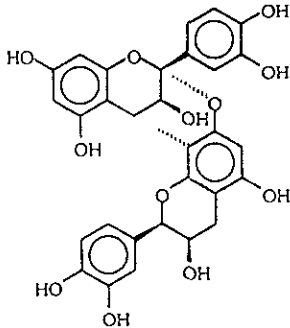
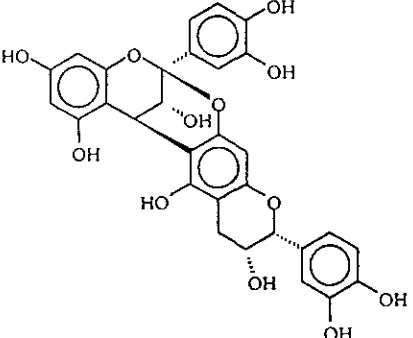
Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural.

Estructura	Nombre/fuente natural y referencia
 <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">46</p>	<p><i>Ent</i>-epiafzelequina-(4 α->8, 2 α->0->7)-epiafzelequina (mahuanina A). F.N.: <i>Ephedra</i> sp., <i>Prunus espinosa</i>. Hikino et al., 1982 Kolodziej et al., 1991</p>
 <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">47</p>	<p><i>Ent</i>-epiafzelequina-(4 β->8, 2 β->0->7)-epiafzelequina (mahuanina B). F.N.: <i>Ephedra</i> sp. Hikino et al., 1982</p>
 <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">48</p>	<p>Afzelequina-(4 β->8, 2 β->0->7)-afzelequina (PIa). F.N.: <i>Prunus persica</i> Ohigashi et al., 1982</p>
 <p style="text-align: right; margin-right: 20px;">49</p>	<p>Epiafzelequina-(4 β->6, 2 β->0->7)-<i>ent</i>-epiafzelequina (mahuanina C). F.N.: <i>Ephedra</i> sp Kasahara et al., 1983</p>

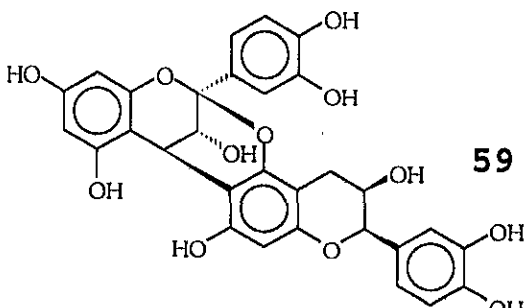
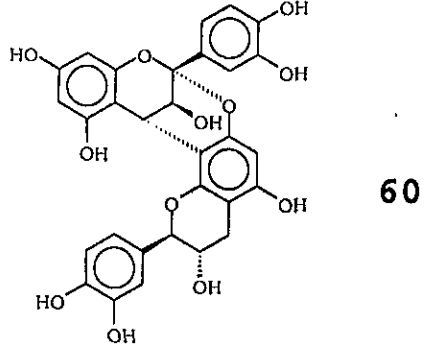
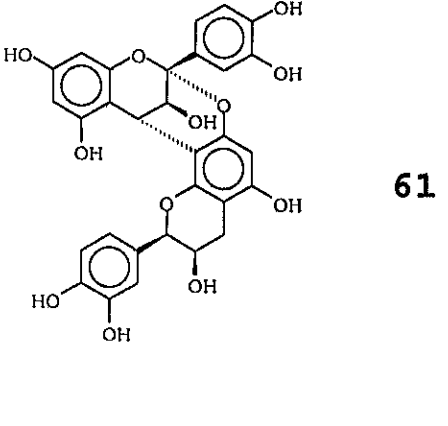
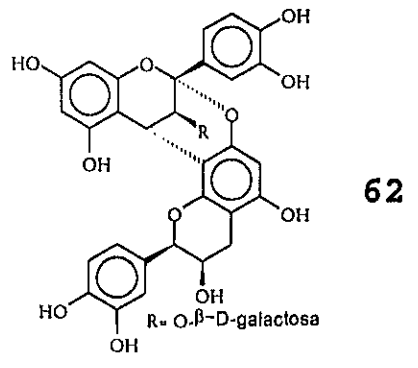
Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural (continuación).

Estructura	Nombre/fuente natural y referencia
	<p>50</p> <p>Epiafzelequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-ent-afzelequina. F.N.: <i>Cassipourea gerrardii</i> Drewes et al., 1992</p>
	<p>51</p> <p>7-OMe-epiafzelequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-ent-afzelequina. F.N.: <i>Cassipourea gummiflua</i> Drewes y Taylor, 1994</p>
	<p>52</p> <p>7-OMe-epiafzelequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-epiafzelequina. F.N.: <i>Cassipourea gummiflua</i> Drewes y Taylor, 1994</p>
	<p>53</p> <p>Epicatequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-catequina (proantocianidina A-1). F.N.: <i>Aesculus hippocastanum</i>, <i>Lupinus angustifolius</i>, <i>Vaccinium vitis-idaea</i> Nonaka et al., 1987; Morimoto et al., 1988; Stobiecki y Popenda, 1994.</p>

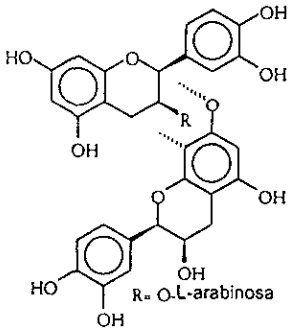
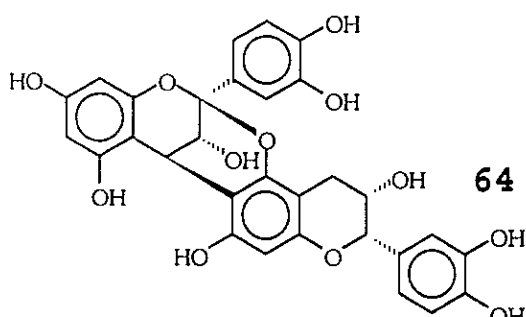
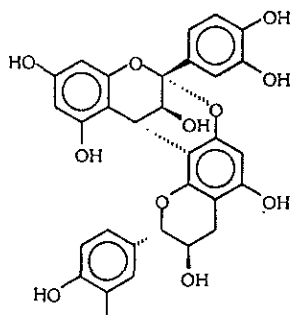
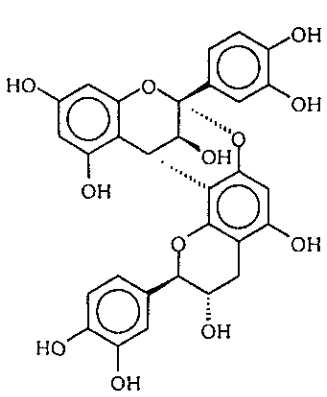
Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural (continuación)

Estructura	Nombre/fuente natural y referencia
	<p>54</p> <p>Epicatequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-epicatequina (proantocianidina A-2). F.N.: <i>Aesculus hippocastanum</i>, <i>Pavetta owariensis</i>, <i>Vaccinium vitis-idaea</i> Nonaka et al., 1987; Morimoto et al., 1988; Balde et al., 1991(a); 1991(b).</p>
	<p>56</p> <p>Epicatequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-ent-catequina (proantocianidina A-4). F.N.: <i>Aesculus hippocastanum</i>, <i>Pavetta owariensis</i>. Nonaka et al., 1987; Balde et al., 1991(a).</p>
	<p>57</p> <p>Ent-epicatequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-epicatequina (proantocianidina A-5). F.N.: <i>Ephedra</i> sp. Nonaka et al., 1987.</p>
	<p>58</p> <p>Epicatequina-(4 β->6, 2 β->O->7)-epicatequina (proantocianidina A-6). F.N.: <i>Aesculus hippocastanum</i> Morimoto et al., 1987.</p>

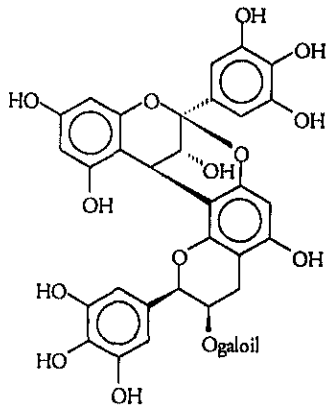
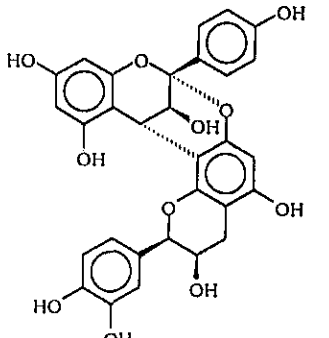
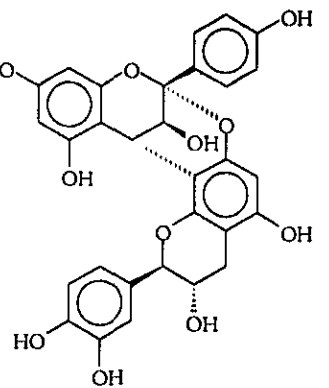
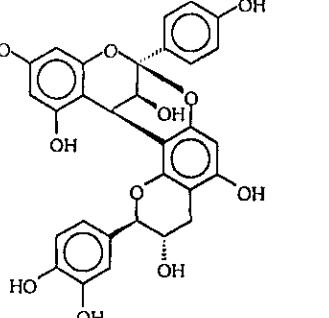
Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural (continuación)

 <p style="text-align: right;">59</p>	<p>Epicatequina-(4 β->6, 2 β->O->5)-epicatequina (proantocianidina A-7). F.N.: <i>Aesculus hippocastanum</i> Morimoto et al., 1987.</p>
 <p style="text-align: right;">60</p>	<p>Ent-epicatequina-(4 α->8, 2 α->O->7)-catequina. F.N.: <i>Prunus espinosa</i> Kolodziej et al., 1991.</p>
 <p style="text-align: right;">61</p>	<p>Ent-epicatequina-(4 α->8, 2 α->O->7)-epicatequina. F.N.: <i>Prunus espinosa</i> Kolodziej et al., 1991.</p>
 <p style="text-align: right;">62</p> <p style="text-align: center;">R = O-β-D-galactosa</p>	<p>3-O-β-D-galactopiranosil-ent-epicatequina-(4 α->8, 2 α->O->7)-epicatequina. F.N.: <i>Theobroma cacao</i> Porter et al., 1991</p>

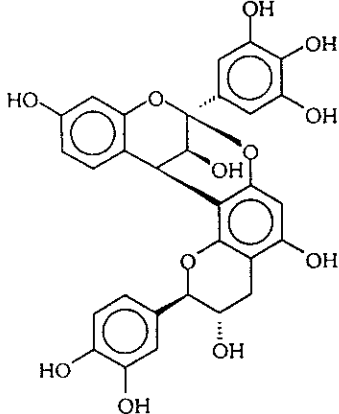
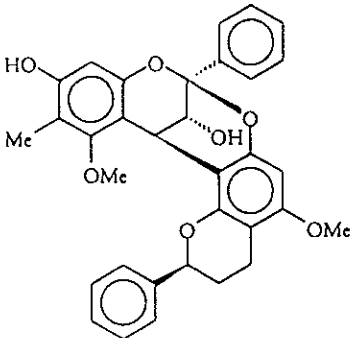
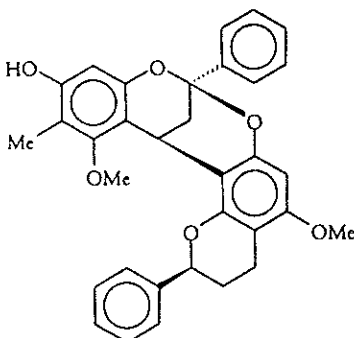
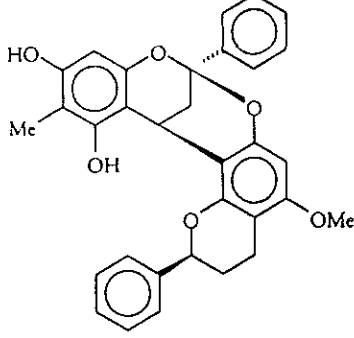
Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural (continuación)

 <p style="text-align: center;">63</p>	<p>3-O-L-arabinopiranosil-<i>ent</i>-epicatequina-(4 α->8, 2 α->O->7)-epicatequina. F.N.: <i>Theobroma cacao</i> Porter et al., 1991</p>
 <p style="text-align: center;">64</p>	<p>Epicatequina-(4 β->6, 2 β->O->5)-<i>ent</i>-epicatequina. F.N.: <i>Theobroma cacao</i> Porter et al., 1991</p>
 <p style="text-align: center;">65</p>	<p><i>Ent</i>-epicatequina-(4 α->8, 2 α->O->7)-<i>ent</i>-catequina (pavetanina A-1). F.N.: <i>Pavetta owariensis</i> Baldé et al., 1991(b)</p>
 <p style="text-align: center;">66</p>	<p><i>Ent</i>-epicatequina-(4 α->8, 2 α->O->7)-catequina (pavetanina A-2). F.N.: <i>Pavetta owariensis</i> Baldé et al., 1991(b)</p>

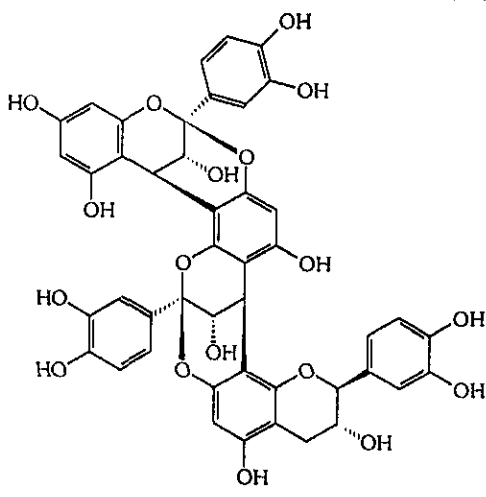
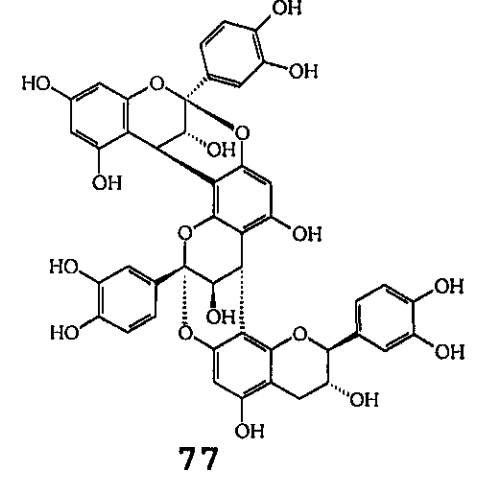
Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural (continuación).

	<p>67</p> <p>3'-O-galoil-epigallocatequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-epigallocatequina (prodelfinidina A-2). F.N.: Oolong tea Hashimoto et al., 1989</p>
	<p>68</p> <p>Ent-epiafzelequina-(4 α->8, 2 α->O->7)-epicatequina. F.N.: <i>Prunus espinosa</i> Kolodziej et al., 1991</p>
	<p>69</p> <p>Ent-epiafzelequina-(4 α->8, 2 α->O->7)-catequina. F.N.: <i>Prunus espinosa</i> Kolodziej et al., 1991</p>
	<p>70</p> <p>Afzelequina-(4 β->8, 2 β->O->7)-catequina (Pib). F.N.: <i>Prunus persica</i> Ohigashi et al., 1982.</p>

Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural (continuación)

 <p style="text-align: right;">71</p>	<p>Robinetinidol- (4 β->8, 2 β->O->7)-catequina. F.N.: <i>Acacia mearnsii</i>. Cronjé et al., 1993.</p>
 <p style="text-align: right;">72 (+) 73 (-)</p>	<p>Dracoflavan B₁ (+), dracoflavan B₂ (-) F.N.: <i>Daemonorops</i> sp Arnon et al., 1997.</p>
 <p style="text-align: right;">74 (+) 74a (-)</p>	<p>Dracoflavan C₁ (+), Dracoflavan C₂ (-) F.N.: <i>Daemonorops</i> sp Arnone et al., 1997.</p>
 <p style="text-align: right;">75 (+) 75a (-)</p>	<p>Dracoflavan D₁ (+), Dracoflavan D₂ (-) F.N.: <i>Daemonorops</i> sp Arnone et al., 1997</p>

Cuadro 5. Proantocianidinas de tipo A de origen natural (continuación).

 <p style="text-align: center;">76</p>	<p>Epicatequina-(4 β->8, 2 β->0->7)-entepicatequina-(4 α->8, 2 α->0->7)-entcatequina (pavetanina B7) F.N.: <i>Pavetta owariensis</i> Balde et al., 1995</p>
 <p style="text-align: center;">77</p>	<p>Epicatequina-(4 β->8, 2 β->0->7)-epicatequina-(4 β->8, 2 β->0->7)-entcatequina (pavetanina B8) F.N.: <i>Pavetta owariensis</i> Balde et al., 1995</p>

I.6 Flavonoides con propiedades antiprotozoarias.

Los flavonoides son un grupo de compuestos que han sido ampliamente investigados, tanto desde el punto de vista químico, como farmacológico, tal como lo demuestra la extensa bibliografía científica existente en artículos de revistas y libros especializados. Los aspectos relacionados con el aislamiento, elucidación estructural y biosíntesis de estos metabolitos, han sido objeto de excelentes revisiones (Domínguez, 1973; 1990; Harborne *et al.*, 1975; 1982; Pelter *et al.*, 1976; Markham y Ternai, 1976; Markham *et al.*, 1978; Markham, 1982; Middleton, 1988; *inter alia*) por lo que en la presente sección sólo se enfatizará sobre algunos aspectos relacionados con el potencial terapéutico de este importante grupo de compuestos.

Los flavonoides son metabolitos secundarios de naturaleza aromática con un esqueleto base de quince átomos de carbono ordenados en la forma $C_6-C_3-C_6$. Los flavonoides son compuestos de biogénesis mixta,

generados por las rutas del ácido siquímico y del acetato-malonato.

En la naturaleza se les puede encontrar en forma libre o combinada, generalmente en este último caso bajo la forma de glicósidos. Los grupos fenólicos comúnmente encontrados en estos compuestos pueden estar metilados, acilados, alquilados o como sales inorgánicas de sulfatos (Markham, 1982; Harborne, 1995). A la fecha se han descrito alrededor de 4,000 flavonoides (Middleton, 1996; *inter alia*).

Los flavonoides son constituyentes característicos de las plantas verdes; están presentes en todas las partes de la planta. En pocos casos los flavonoides se han encontrado en animales, hongos, y líquenes (Markham, 1982; Liu et al., 1989; Middleton, 1996; *iter alia*).

En el campo biológico, cabe destacar que el potencial de los flavonoides de origen natural como agentes preventivos y promotores de la salud, ha sido

extensamente investigado (Nishino et al., 1987; Mori et al., 1987; Middleton, 1988; Abu-Niaaj et al., 1993; Bashir et al., 1994; Phillipson et al., 1995; Calzada et al., 1995; 1998; Middleton, 1996; Gadow et al., 1997; Benavente-García et al., 1997; Hammad y Abdalla, 1997; Saturnino et al., 1997; Capasso et al., 1998; Cos et al., 1998; Mata et al., 1998; Limasset et al., 1999, *inter alia*). Estos estudios han permitido establecer que los flavonoides ofrecen una gran alternativa para el desarrollo de nuevos agentes antiprotozoarios, antivirales, antibacterianos, anticancerígenos, anticarcinogénicos (antimutagénicos, antiproliferativos y antiinvasivos), cardiovasculares-antitrombóticos (efectos sobre las enfermedades coronaria, disminuyen la fragilidad capilar e inhiben la agregación de plaquetas), antialérgicos, antiinflamatorios, analgésicos, antiespasmódicos y antioxidantes, entre otros.

Con relación a las propiedades antibacterianas los diferentes estudios conducidos a la fecha han permitido concluir que estos compuestos son antibióticos débiles. Entre los metabolitos que han demostrado mejor actividad se encuentran los flavonoles galangina (92), activo contra *Staphylococcus epidermidis* con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 6.3 $\mu\text{g/mL}$ (Nishino et al., 1987) y miricetina (93) activo, contra *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus* (Mori et al., 1987).

En cuanto a las propiedades antivirales la quercetina (94) y la hesperetina (95) inhiben la capacidad de infectar o de replicación de los virus herpes simple tipo 1, polio tipo 1, parainfluenza tipo 3 y respiratorio sincicial tipo 1 (Kaul et al., 1985). Algunos derivados de la 3-O-metilquercetina son activos contra el virus de la polio tipo 1 y el virus coxsackie B₄ a concentraciones de 40 $\mu\text{g/mL}$ (Middleton, 1988). Otros 3-O-metil flavonoles derivados del camperol y la

quercetina, han demostrado también actividad significativa contra picornavirus; todos estos compuestos tienen como característica común la presencia de un grupo metoxilo en el carbono 3C (Vlietinck, 1987)

Con relación a las propiedades anticarcinogénicas, la naringenina (96) y la rutina (97) ejercen efectos protectores sobre el DNA contra los daños inducidos por las radiaciones UV (Koostra, 1994); la galangina (92) tanto *in vivo* como *in vitro*, suprime las alteraciones cromosómicas provocadas por la bleomicina (Heo et al., 1994). Los flavonoles quercetina (94) y luteolina (98), disminuyen *in vivo* la incidencia de tumores en colon de ratas, al igual que el fibrosarcoma en ratones (Deschener et al., 1993; Elangovan et al., 1994). La nobiletina (99) y la tangeretina (100) inhiben el crecimiento de células escamosas de carcinoma a concentraciones de 8 µg/mL. En pruebas *in vitro* los flavonoides inhiben la proliferación de células

derivadas de varios tipos de tumores humanos (células de leucemia mieloide, linfoide, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer de próstata y células escamosas de carcinoma) (Larocca et al., 1990; Scambia et al., 1990; Kandaswami et al., 1991).

Con respecto a las propiedades cardiovasculares los flavonoides han demostrado efecto en células de las paredes de los vasos sanguíneos, en la función de plaquetas y leucocitos, coagulación y reología sanguínea, trombosis y enfermedades coronarias (Benavente-García et al., 1997). Así, la rutina (97) se usa en la terapéutica para tratar problemas de fragilidad capilar, actuando principalmente sobre el endotelio microvascular reduciendo la hiperpermeabilidad y el edema (Waldworth y Faulds, 1992). Los metoxiflavonoides nobiletina (99) y tangeretina (100) presentan acción antiadhesiva e inhiben la agregación de células rojas y plaquetas a concentraciones de 30 $\mu\text{g/mL}$, su efectividad es similar

a la del ácido acetilsalicílico (Beret y Cazenave, 1988). Los flavonoles, fisetina (101), camperol (30) y quercetina (94) a concentraciones de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhiben la agregación de plaquetas inducida por el ácido araquidónico (Manach et al., 1996).

Con respecto a la actividad antialérgica y antiinflamatoria, los flavonoides del tipo de la quercetina (94) inhiben el estímulo de liberación de células cebadas proinflamatorias, basófilos, eosinófilos y neutrófilos, mediadores en la patogénesis de enfermedades como el asma, la rinoconjuntivitis alérgica, la urticaria y del proceso de inflamación (Middleton, 1996).

En cuanto a las propiedades antiespasmódicas numerosos estudios han demostrado que los flavonoides inhiben la contracción espontánea y las contracciones inducidas, con agonistas o eléctricamente del íleon, tanto de cobayo como de rata (Abdalla et al., 1988; 1994; Capasso et al., 1991; 1998; Mustafa et al., 1992;

Saturnino et al., 1997; Meckes et al., 1998; Rojas et al., 1996; Mata et al., 1998; *inter alia*).

Recientemente, se han demostrado las propiedades antiprotozoarias de diez flavonoides en contra de tres protozoarios causantes de enfermedades en seres humanos. Los flavonoles camperol (30) y tilirósido (31), principios activos de las especies *Cuphea pinetorum* y *Helianthemum glomeratum* (Calzada et al., 1995; 1998), demostraron actividad contra los trofozoitos de *E. histolytica* con valores CI_{50} de 7.93 y 17.45 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, y contra trofozoitos de *G. lamblia* con valores CI_{50} de 8.73 y 17.36 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Cabe destacar que las cepas de los parásitos empleados para la conducción de estos estudios fueron obtenidas de muestras hospitalarias. Las isoflavonas formononetina (32) y calicosina (33), metabolitos aislados de *Machaerium aristulatum* (Elsohly et al., 1999), demostraron actividad contra los trofozoitos de una cepa tipo de *G. lamblia* (CI_{50} de 0.28

y 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). Los flavonoides artemetina (102), casticina (103), crisoplenetina (104), crisoplenol D (105), circilinelol (106) y eupatorina (107), principios activos de *Artemisia annua*, presentaron actividad relevante contra *Plasmodium falciparum* con valores de CI_{50} que oscilan entre 2.3 y 6.5×10^{-5} M (Phillipson et al., 1995).

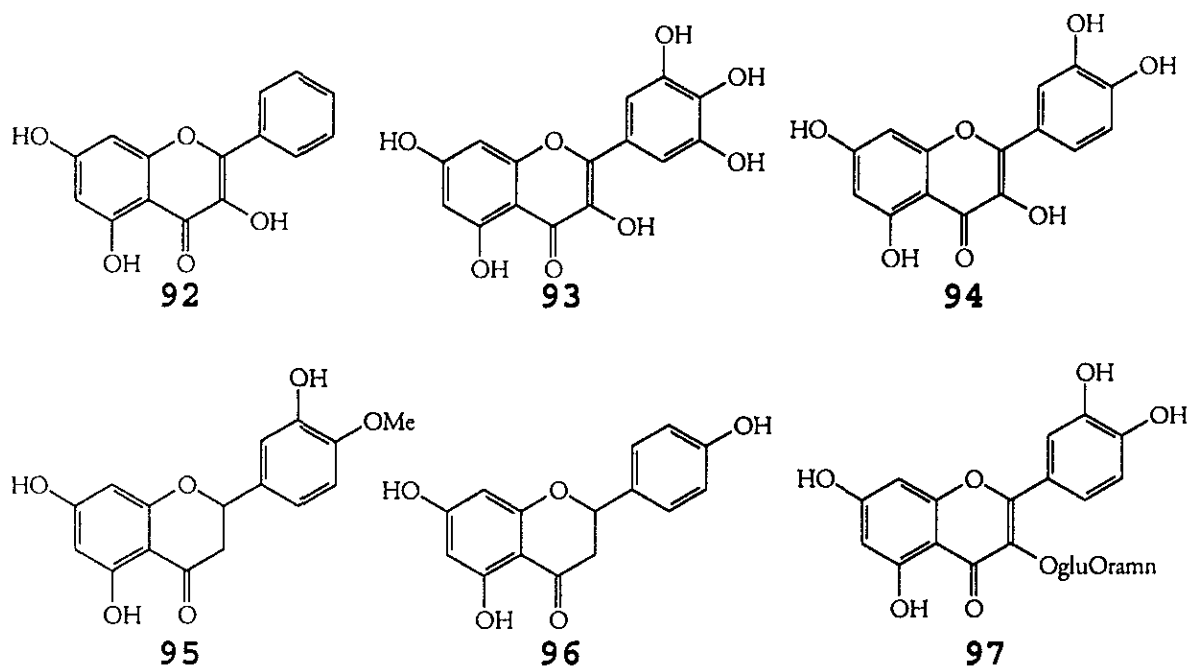


Figura 6. Flavonoides selectos con actividad biológica relevante descritos en la literatura.

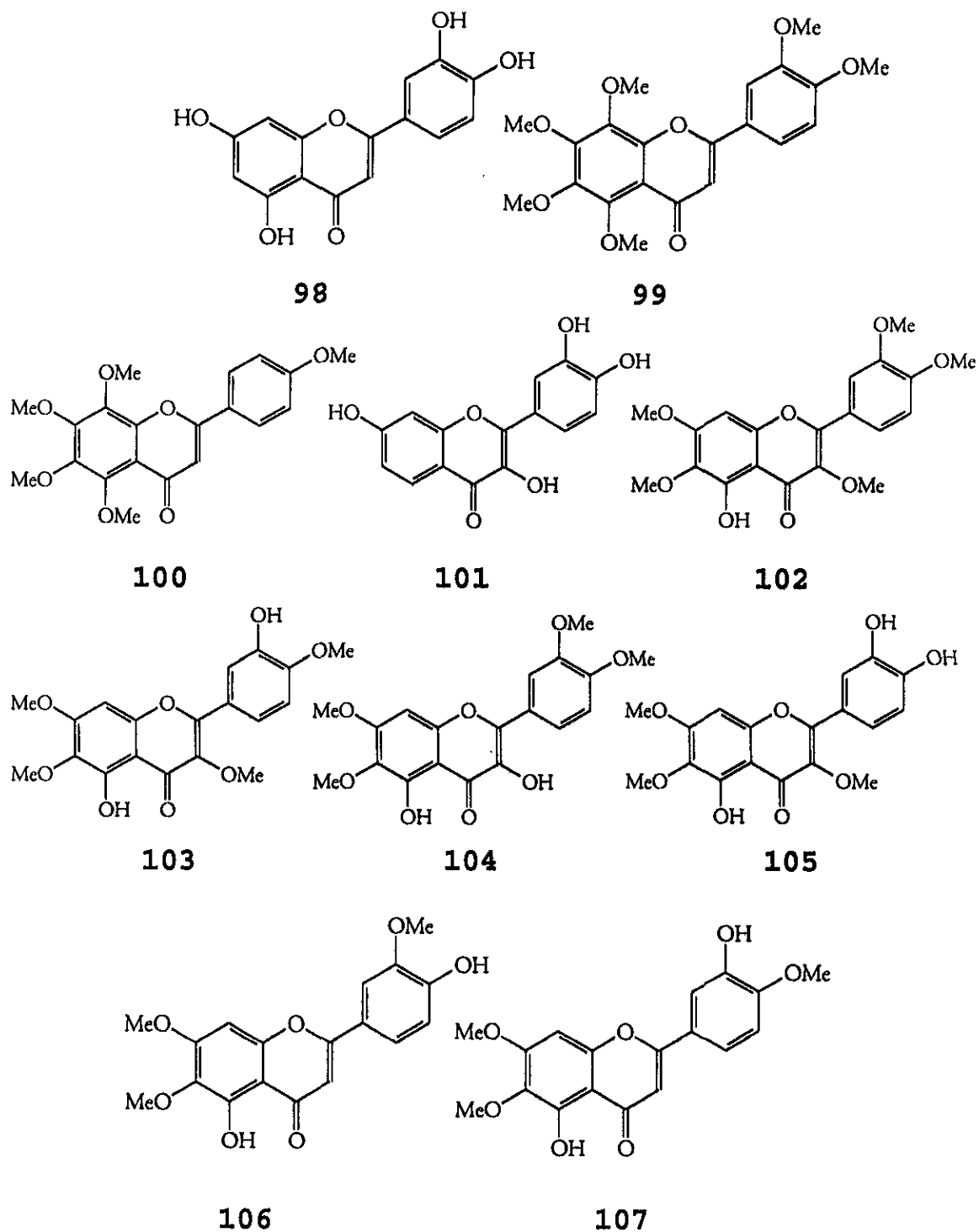


Figura 6. Flavonoides selectos con actividad biológica relevante descritos en la literatura (continuación).

Los flavonoides tienen la propiedad de capturar radicales libres de oxígeno (peróxido, hidroperóxido, superóxido, hidroxilo y peróxidos lipoides), que reaccionan con moléculas esenciales para la vida celular como los ácidos nucleicos y las proteínas. La reacción con los sistemas biológicos es generalmente de manera citotóxica, mutagénica y carcinogénica.

La mayoría de las propiedades biológicas de los flavonoides se basan en sus actividades antioxidante y captadora de radicales libres así como en sus efectos moduladores de las más diversas actividades enzimáticas (Polya y Foo, 1994; Lee *et al.*, 1995; Cos *et al.*, 1998; Limasset *et al.*, 1999; *inter alia*).

En lo que se refiere a su potencial modulador de diversas actividades enzimáticas, los flavonoides han demostrado efectos tanto inhibitorios como activadores de numerosas enzimas. La mayoría de éstas desempeñan un papel importante en los procesos de transducción de señales involucrados en los procesos metabólicos y

biológicos del hombre. Entre las enzimas inhibidas por los flavonoides se encuentran la fosfolipasa de neutrófilo A2, la proteína cinasa C activada por fosfolípidos, la proteína cinasa independiente de AMP-cíclico, la proteína tirosina cinasa pp60, la fosfolipasa C, la miosina cinasa dependiente de calmodulina-Ca²⁺, la lipoxigenasa, la ciclo-oxigenasa, la fosfodiesterasa, la topoisomerasa, la VHI transcriptasa reversa, la integrasa y la proteasa. Por otro lado, las enzimas que son activadas por algunos flavonoides son la NADPH oxidasa y la fosfolipasa A2 (Polya y Foo, 1994; Middleton, 1988; 1996; Benavente-García et al., 1997).

Tres son los requerimientos estructurales necesarios que determinan las propiedades de captación de radicales libres y su capacidad antioxidante (Figura 7): (A) la función O-3',4' dihidroxi en el anillo B (catecol), (B) el doble enlace en los carbonos 2C y 3C, conjugado con el grupo 4-oxo; (C) la presencia de

hidroxilos en los carbonos 3C y 5A. Las características estructurales antes mencionadas son importantes debido a que confieren un gran poder de dislocación electrónica que previene la propagación de reacciones en cadena y la formación de radicales libres de oxígeno. Es importante destacar que la propiedad captadora de radicales estará determinada por la combinación de los elementos estructurales mencionados.

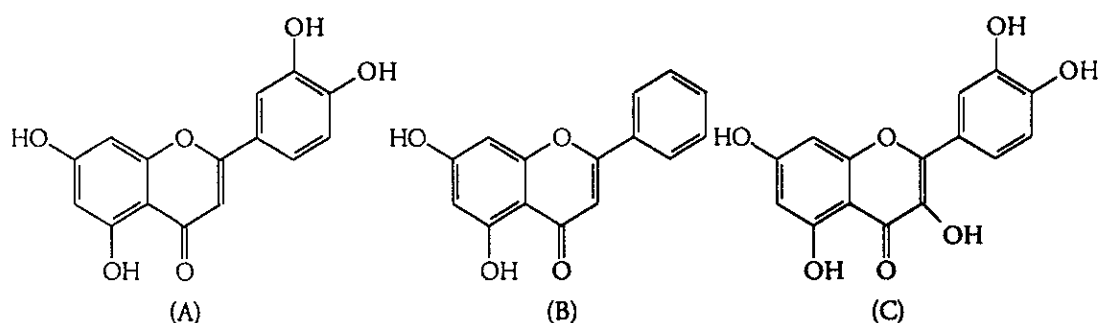


Figura 7. Requerimientos estructurales necesarios que determinan las propiedades de captación de radicales libres y su capacidad antioxidante.

También se considera, la posibilidad de que los ácidos fenólicos derivados del metabolismo (Figura 8) sean en parte los responsables de la actividad biológica de estos compuestos ya que se ha demostrado que estos ácidos poseen propiedades antioxidantes (Limasset et al., 1999).

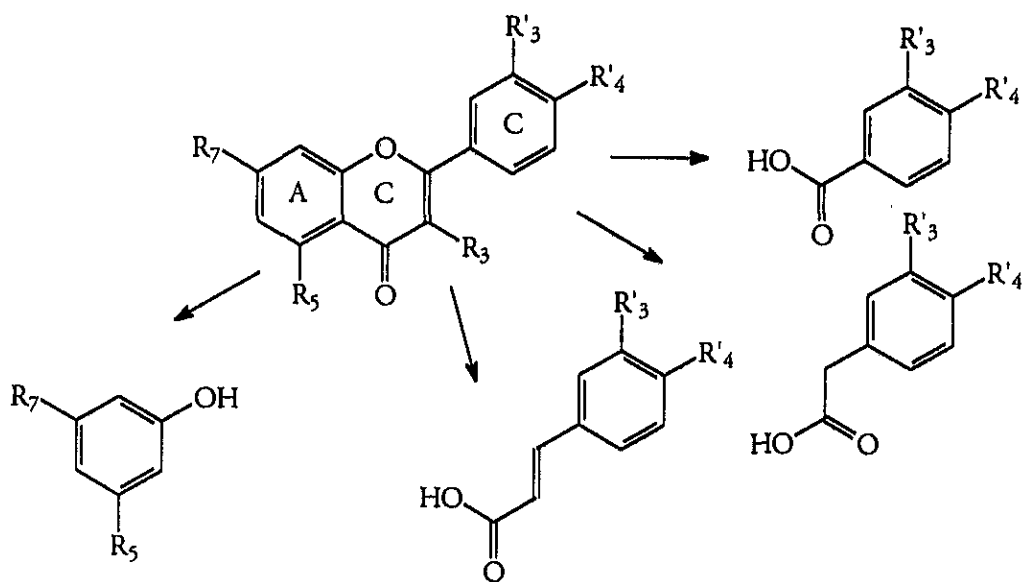


Figura 8. Compuestos derivados del metabolismo de los flavonoides por la microflora intestinal humana o cepas de bacterias.

I.7 Generalidades acerca de *Geranium niveum* S. Watson.

Geranium niveum S Watson (Figura 9) es una hierba de la familia Geraniaceae que crece a lo largo de las orillas secas de los arroyos y en pastos de bosques de pinos y robles en las montañas de la parte occidental de Chihuahua, México. Los indígenas tarahumaras reconocen a la planta con el nombre de "makiki" y emplean la decocción de la raíz para el tratamiento de fiebres, problemas gastrointestinales y dolor de riñones. Para ello se toma una taza de té por la mañana y otra en la tarde (Gentry, 1942; Bye, 1985; Rascon-Torres et al., 1994). De manera adicional, a esta especie se le atribuyen propiedades laxantes.

Desde el punto de vista fitoquímico, la especie *G. niveum* no ha sido objeto de investigaciones previas. Sin embargo, el estudio de especies relacionadas ha permitido el aislamiento y caracterización de galotaninos, flavonoides, esteroles y terpenoides.



Figura 9. *Geranium niveum*.

Así de *Geranium* sp se aisló e identificó el galotanino, geranina (108). De *G. robertanium* se aisló el metabolito β -penta-O-galoil-D-glucosa (109) (Haslam, 1989). De *G. thunbergii* se aislaron tres galotaninos [la geranina, la elaeocarpusina (110) y el ácido geránico (111)] y siete fenoles simples [la brevifolina (112), la corilagina (113), la elagitanina (114), pirogalol (115), el ácido gálico y el ácido elágico] (Glasby, 1991; Heminway y Laks, 1992). De *G. macrorrhizum* se aislaron seis flavonoides [la retusina (116), la ermanina (117), la ramnosina (118), la cumataquenina (119), la quercetina (94), el 3-metoxicamperol (120)], una γ -pirona [el maltol (121)], una acetobenzofenona [el acetovanilón (122)], dos esteroides [el β -D-glucositolsterol (123) y el β -sitosterol (124)], dos fenoles [la glucogalina (125) y el ácido gálico (126)] y dos terpenoides [la germacrona (128) y la germazona (129)] (Glasby, 1991; Heminway y Laks, 1992).

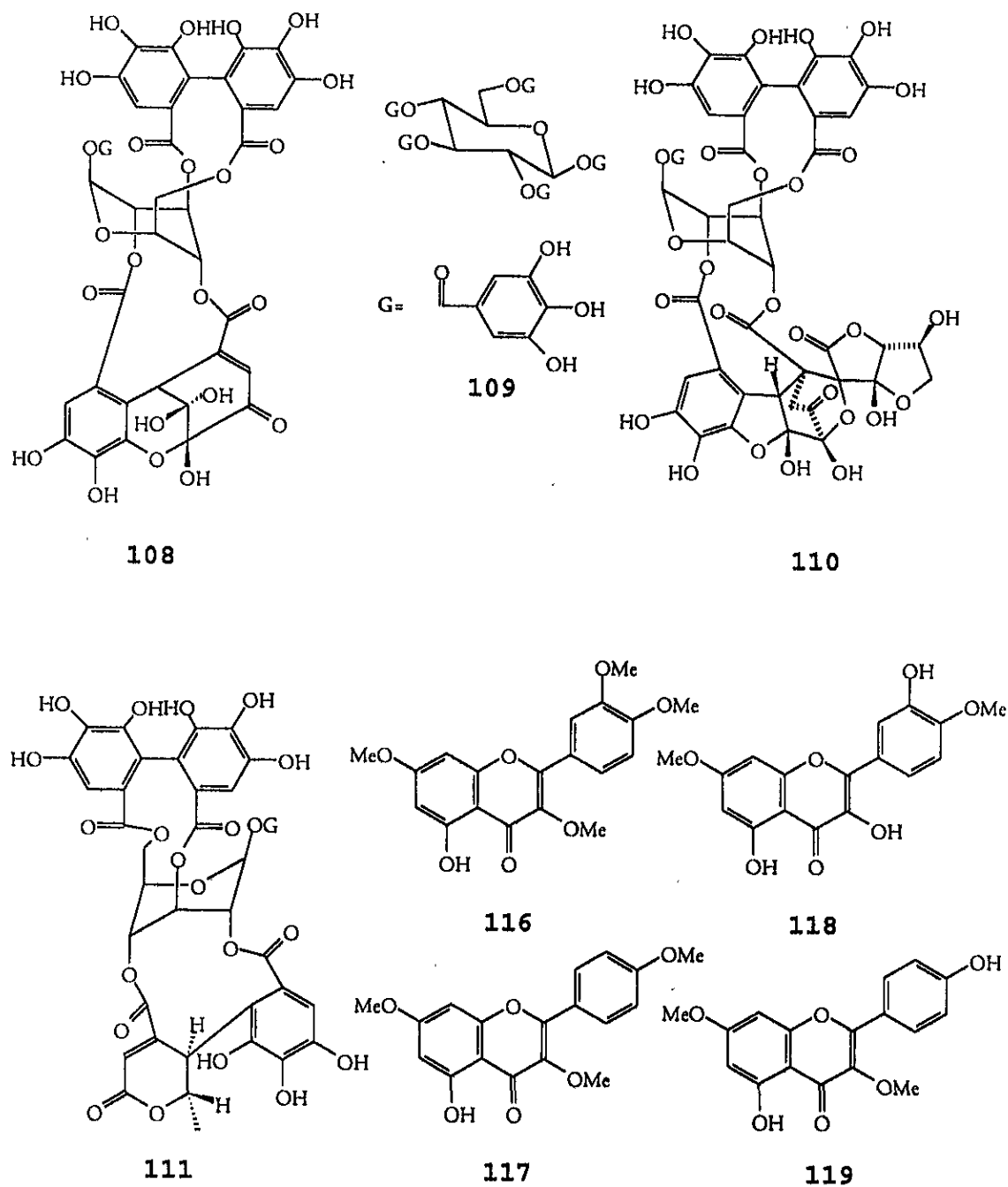


Figura 10. Compuestos aislados de las especies *G. robertanum*, *G. thunbergii*, *G. macrohizum* y *G. sp.*

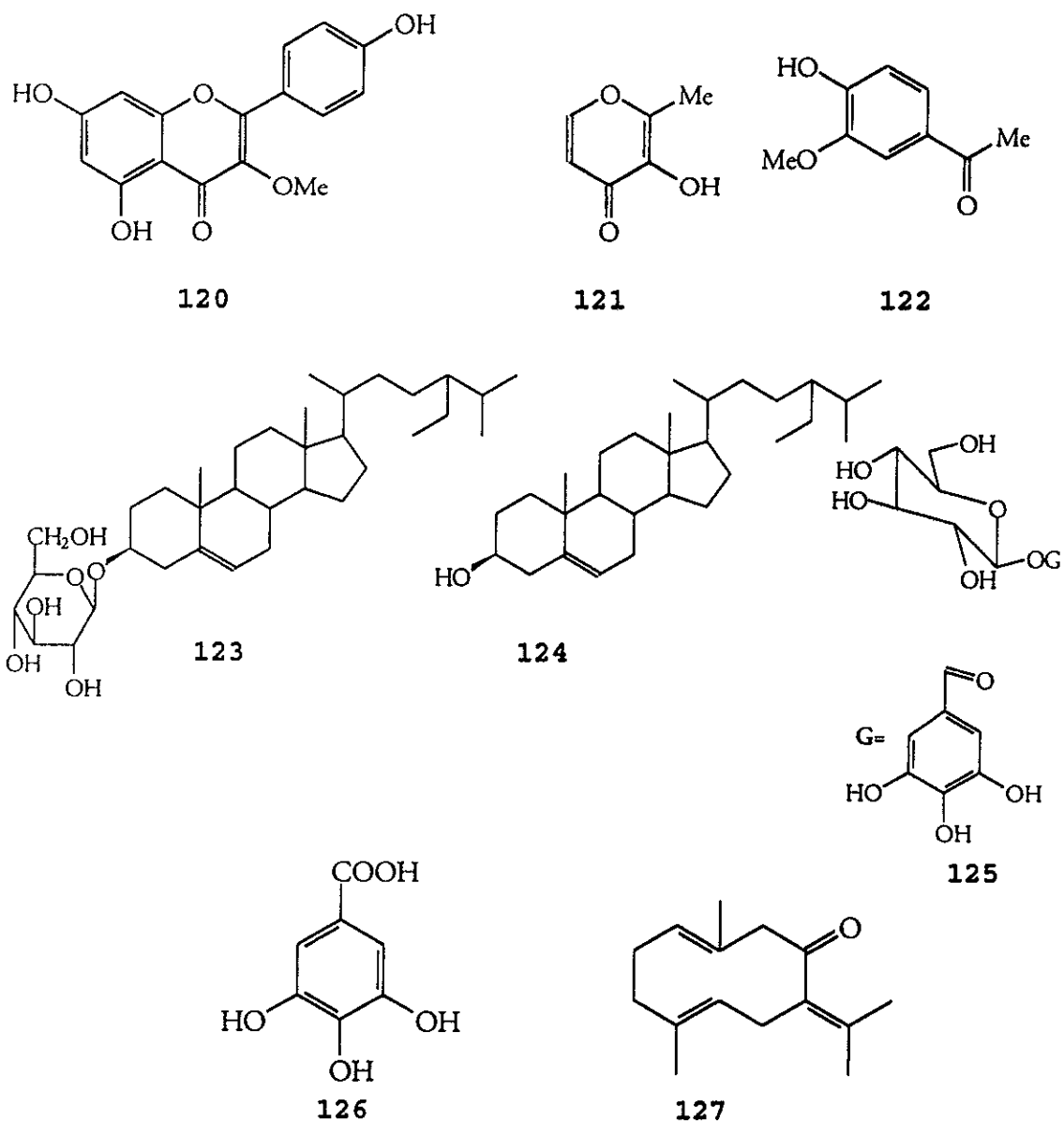


Figura 10. Compuestos aislados de las especies *G. robertanum*, *G. thunbergii*, *G. macrohizum* y *G. sp.* (continuación).

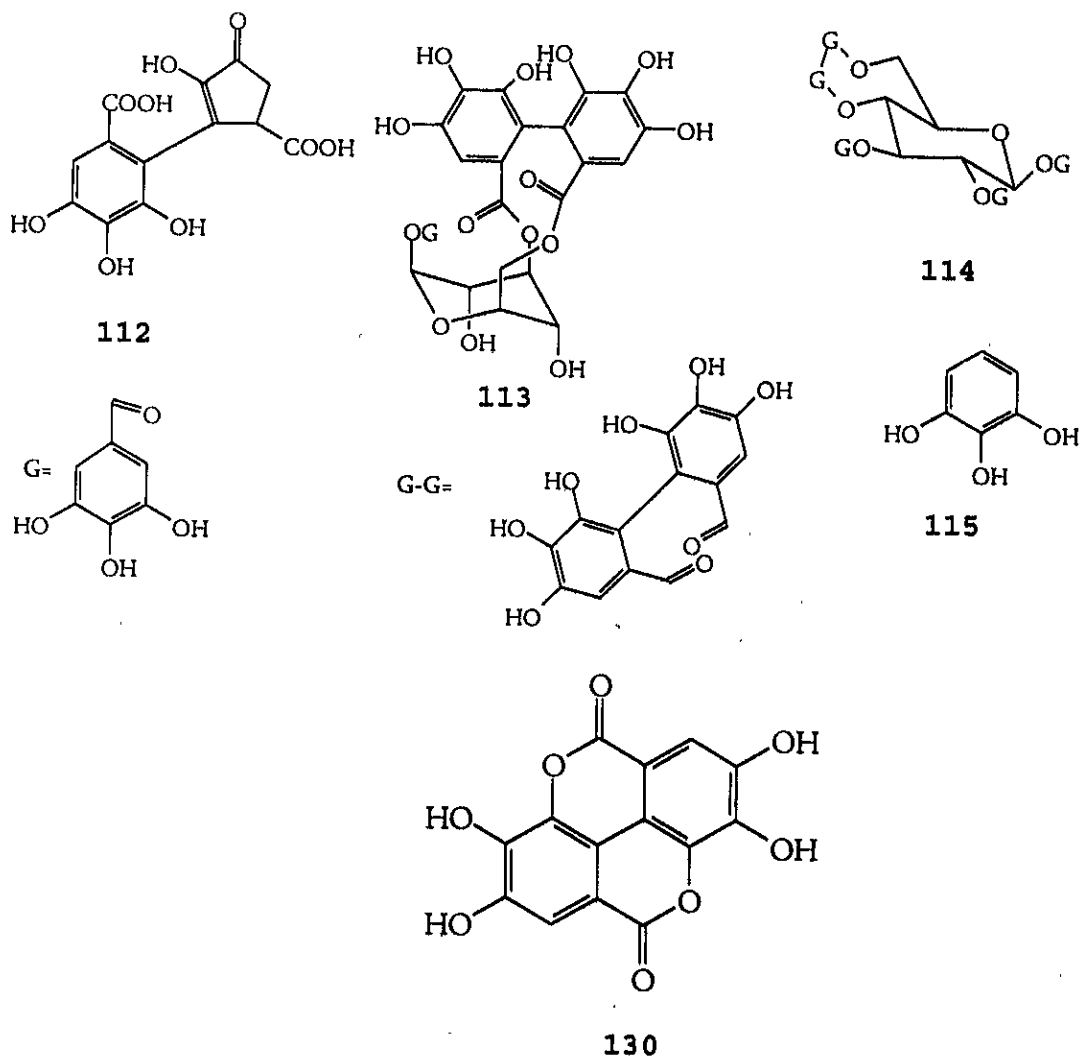


Figura 10. Compuestos aislados de las especies *G. robertanum*, *G. thunbergii*, *G. macrohizum* y *G. sp.* (continuación).

De *G. sanguineum* se aislaron tres flavonoides [el camperol (30), la miricetina (93) y la morina (131)] y el ácido quínico (132) (Heminway y Laks, 1992).

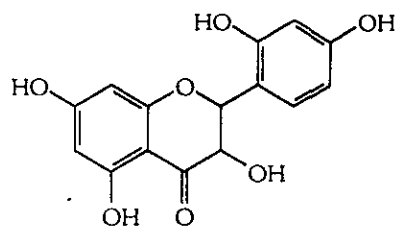
De *G. bourbon* se aislaron once terpenoides [el (+)- β -citronelol (133), el (-)- β -citronelol (133a), el α -bourboneno (134), el β -bourboneno (134a), las furopelargonas A (135), B (136), C (137) y D (138), la guaia-6,9-diona (139), la 11-norbourbonan-1-ona (140) y la norbourbonona (141)] (Glasby, 1991).

De *G. phaeum* se han aislado cinco fenoles [el ácido cafeico (142), el ácido quebulágico (143), el ácido clorogénico (144), el ácido elágico (130) y el ácido gálico] y un flavonoide [la quercetina] (Glasby, 1991).

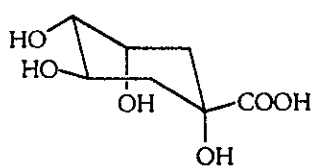
En lo que respecta a la actividad biológica del género *Geranium*, en la literatura se ha descrito que el extracto metanólico de la raíz de *G. niveum* es letal para la *Artemia salina* ($LC_{50} = 88.46 \mu\text{g/mL}$); posee actividad citotóxica muy pobre contra las líneas celulares de adenocarcinoma de colon (HT-29, $DE_{50} = 29.33$

$\mu\text{g/mL}$), carcinoma de pecho (MCF-7, $\text{DE}_{50} = 84.65 \mu\text{g/mL}$) y carcinoma de pulmón (A-549, $\text{DE}_{50} = 49.89 \mu\text{g/mL}$); y una actividad moderada contra el hongo *Trichophyton mentagrophytes*. En el mismo estudio se demostró que el extracto íntegro de la planta carece de actividad antibacteriana contra cuatro cepas de bacterias tipo (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) (Barrientos y Gutiérrez, 1994; Gutiérrez et al., 1995).

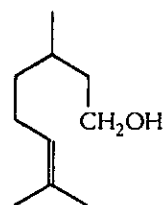
A las especies relacionadas *G. macrorrhizum*, *G. thunbergii*, *G. sanguineum* y *G. robertanum* se les atribuyen propiedades astringentes, antiinflamatorias, antiulcéricas, sedantes, antituberculosas, hipotensoras y cardiotónicas. Cabe destacar que las tres últimas especies se emplean para el tratamiento de trastornos gastrointestinales (Heminway y Laks, 1992).



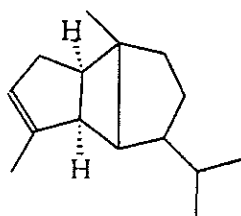
131



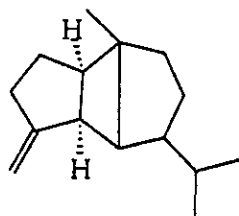
132



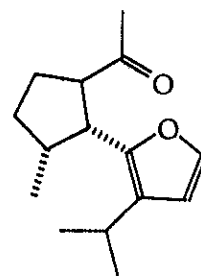
133(+); 133a(-)



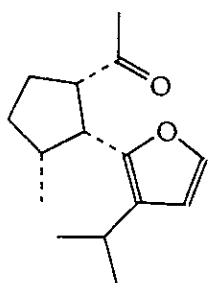
134



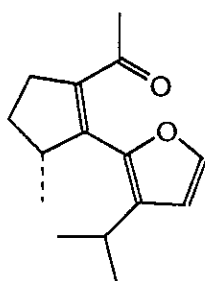
134a



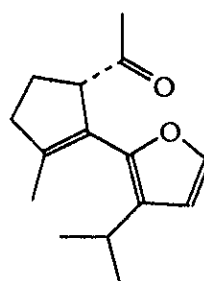
135



136

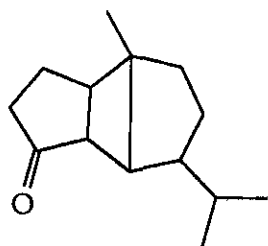


137

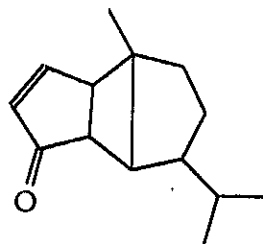


138

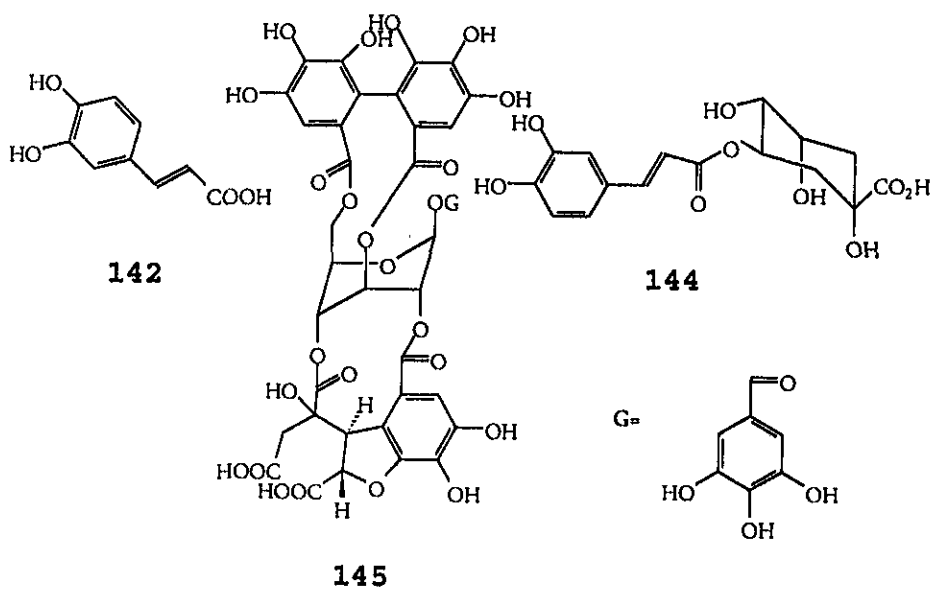
Figura 11. Compuestos aislados de las especies *G. sanguineum*, *G. bourbon* y *G. phaeum*.



140

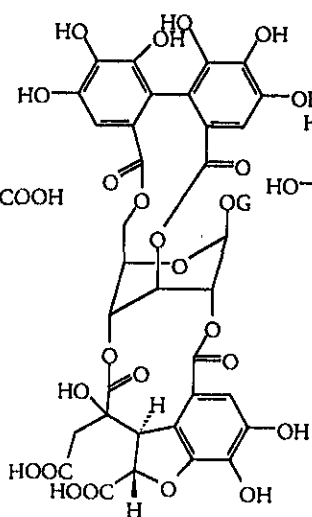


141



142

144



145

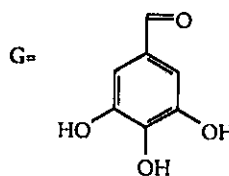


Figura 11. Compuestos aislados de las especies *G. sanguineum*, *G. bourbon* y *G. phaeum* (continuación).

I.8 Antecedentes acerca de *Conyza filaginoides* (D. C.)

Hieron

Conyza filaginoides es una planta de la familia Asteraceae, popularmente conocida con los nombres de simonillo, " sacachichic" y prodigiosa.

C. filaginoides es una hierba anual de sabor dulce, de color verde grisáceo, de tallo simple dentado, de hasta 40 cm de altura, sus hojas miden de 3 a 4 cm de longitud y son alternas, dentadas y lanosas. Sus inflorescencias son terminales, aisladas de 2 a 3 capítulos; las flores tienen forma de cazuela (Martínez, 1989) (Figura 12).

En México, la especie se encuentra distribuida en los estados de Guanajuato, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Valle de México y Chihuahua; en este último *C. filaginoides* crece en las praderas de los bosques de pino y roble del norte del estado (Sanz, et al., 1991; Aguilar, et al., 1994; Acevedo y Estrada, 1995; Mata et.al., 1997).



PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO
JARDINERO IMSS

PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO
JARDINERO IMSS
CALLE ALVARO OBREGON No. 64
MEXICO D.F. 06702
TEL. 562 4111
FAX 562 4111
E-MAIL: jrdn@imss.gob.mx
WWW: www.imss.gob.mx

Figura 12. *Conyza filaginoides*

En las prácticas médicas populares de México el simonillo se emplea para tratar problemas gastrointestinales. También con menos frecuencia se ha utilizado como emético, antiséptico ocular, antitusivo, expectorante y estimulante del apetito (Hernández, 1959; Navarro, 1992). En la actualidad el té de la planta se toma como un aperitivo, estimulante de la función digestiva y para tratar los cólicos estomacales y hepáticos, las náuseas, la diabetes y los trastornos biliares (Aguilar et al., 1994; Mata et al., 1997). Cabe hacer mención que *C. filaginoides* es una de las especies más utilizadas en México para el tratamiento de problemas gastrointestinales.

Desde el punto de vista fitoquímico la especie *C. filaginoides* ha sido objeto de dos investigaciones químicas previas. En la primera realizada por Domínguez y colaboradores (Domínguez et al., 1972), se aislaron e identificaron el α -espinasterol (145), la β -amirina (146) y el triacontano (147). La segunda fue conducida

de manera biodirigida sobre un extracto de las partes aéreas de la planta y demostró las propiedades relajantes de la musculatura lisa de la especie (Acevedo y Estrada, 1995; Mata et al., 1997). Esta investigación permitió el aislamiento e identificación de los tres compuestos obtenidos en el primer estudio y varios compuestos espasmolíticos, incluyendo, tres flavonoides [la quercetina-3-O-glucósido (148), la rutina (97) y la pinostrobina (149)], un sesquiterpeno [el β -cariofileno-4,5- α -epóxido (154)], dos triterpenos [el eritrodiol (151) y el 3- β -tridecanoiloxi-28-hidroxi-olean-12-ene (152)] y doce ácidos grasos [los ácidos nonanodioico (153), tetradecanoico (154), pentadecanoico (155), hexadecanoico (156), heptadecanoico (157), 6-octadecanoico (158), 14-metilheptadecanoico (159), eicosanoico (160), docosanoico (161), tricosanoico (162), tetracosanoico (163) y hexacosanoico (164)] (Acevedo y Estrada, 1995).

En un estudio biológico previo se demostró que los extractos obtenidos a partir de la planta entera carece de actividad contra los microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*. Sin embargo, el extracto CHCl₃: MeOH de la especie resultó tóxico contra el crustáceo *Artemia salina*; la concentración letal cincuenta (CL₅₀) fue de 31.6 µg/mL (Gutiérrez et al, 1995).

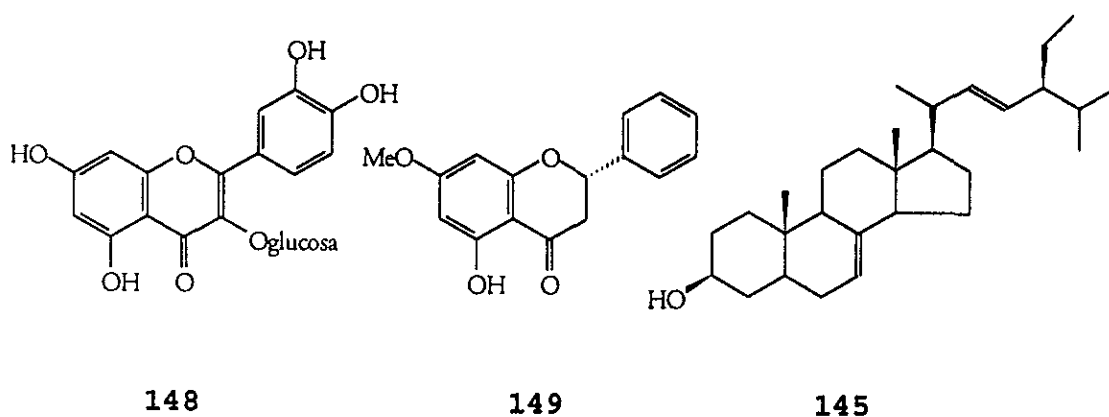


Figura 13. Compuestos aislados de *Conyza filaginoides*

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

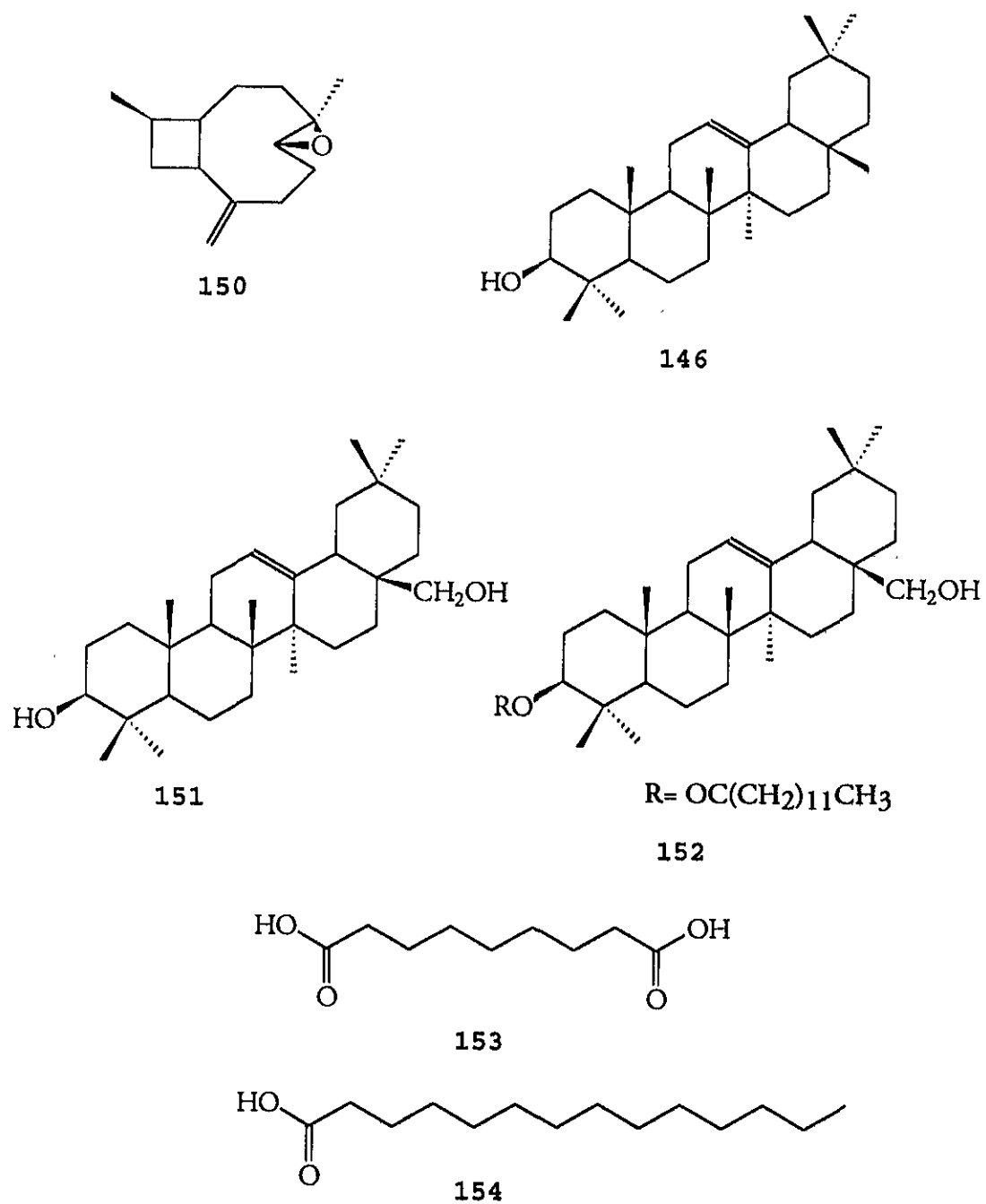


Figura 13. Compuestos aislados de *Conyza filaginoides* (continuación).

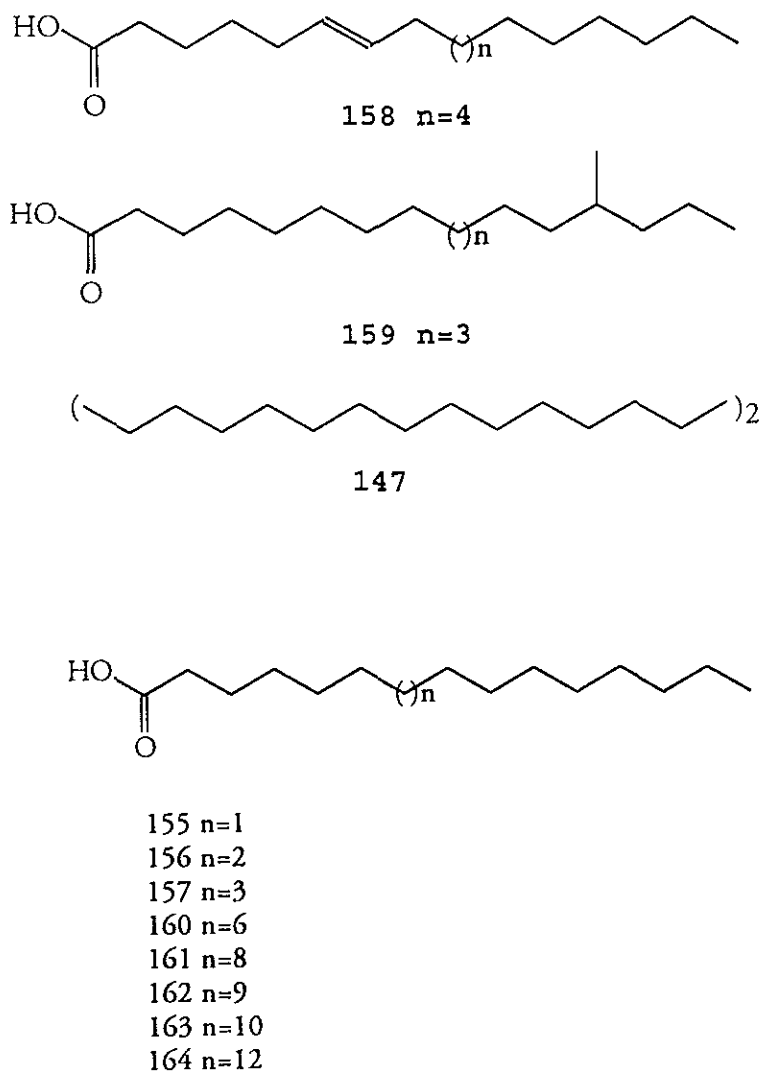


Figura 13. Compuestos aislados de *Conyza filaginoides* (continuación).

II OBJETIVO GENERAL

Obtener nuevos agentes antiprotozoarios de origen natural de utilidad para el desarrollo de nuevos productos con una aplicación terapéutica en el tratamiento de la disentería amibiana y la giardiosis, a partir de plantas mexicanas utilizadas para tratar trastornos gastrointestinales en las prácticas médicas populares.

II.1. Objetivos particulares

Con la finalidad de dar cumplimiento al objetivo general se proponen los siguientes objetivos particulares.

II.1.1 Realizar una investigación bibliográfica sobre las plantas usadas en la medicina tradicional para tratar trastornos gastrointestinales con la finalidad de seleccionar las candidatas apropiadas para la determinación de su potencial antiprotozoario.

II.1.2 Recolectar el material vegetal seleccionado en cantidades apropiadas para la realización de los estudios de actividad antiprotozoaria.

IV.1.3. Determinar el potencial antiprotozoario *in vitro* de los extractos orgánicos preparados a partir de las especies seleccionadas, utilizando trofozoitos de *E. histolytica* y *G. lamblia*.

II.1.4 Realizar la investigación fitoquímica biodirigida de dos de las especies vegetales que hayan mostrado una actividad antiprotozoaria significativa. Como prueba de monitoreo, se utilizará de nueva cuenta la determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

IV.1.5 Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios antiprotozoarios, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas, así como el empleo de métodos químicos y quirópticos.

II.1.6 Evaluar el potencial citotóxico de los compuestos novedosos aislados utilizando algunas líneas celulares derivadas de tumores humanos.

II.1.7 Diseñar y realizar un estudio de relación estructura química-actividad antiprotozoaria de flavonoides selectos, con la finalidad de obtener información de tipo estructural de utilidad para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos antiprotozoarios.

III HIPOTESIS

La información etnomédica referente a plantas usadas en las prácticas médicas populares para el tratamiento de transtornos gastrointestinales, así como los resultados derivados de su actividad antiprotozoaria constituyen indicadores apropiados para la obtención de nuevos compuestos antiprotozoarios que puedan servir para el desarrollo de fármacos nuevos de utilidad en el tratamiento de la disentería amibiana y la giardiosis.

IV EXPERIMENTAL

IV.1 Material vegetal.

Para realizar el proceso de selección, se recolectó el material vegetal fresco de las 19 especies preseleccionadas, en cantidades suficientes para obtener el material seco. La recolección de los vegetales se realizó en diferentes partes de la República Mexicana. En todos los casos, la parte del vegetal recolectada corresponde a la utilizada en las prácticas médicas populares. Los ejemplares de referencia se depositaron en alguno de los siguientes herbarios: Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM; Herbario del Instituto de Ecología (XAL), Xalapa, Veracruz; y Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSSM). El proceso de recolección estuvo a cargo de los Doctores Robert Bye y Ana Luisa Anaya, del B. Gustavo Carmona y del autor de la presente disertación. En el Cuadro 6 se incluyen las

19 especies recolectadas indicándose, familia, nombre científico, parte recolectada y voucher de herbario.

Cabe destacar que de las especies *Geranium niveum* y *Conyza filaginoides* fue posible desde un principio obtener cantidades suficientes para realizar un estudio fitoquímico biodirigido, en caso de detectar actividad antiprotozoaria.

IV.2 Preparación de los extractos vegetales en pequeña escala para realizar el proceso de selección.

Para la selección de las especies con un potencial antiprotozoario, se prepararon los extractos metanólicos a partir de 100 gramos de material vegetal seco y molido de cada una de las 19 especies preseleccionadas. A los extractos resultantes se les determinó su potencial antiprotozoario mediante la evaluación de su efecto *in vitro* sobre los trofozoitos de *E. histolytica* y *G. lamblia*, cultivados de forma axénica.

Cuadro 6. Especies selectas de la flora medicinal mexicana que fueron recolectadas para determinar su potencial antiprotozoario.

Espece botánica	Parte recolectada	Voucher de herbario
<i>Acalypha phleoides</i> (Euphorbiaceae)	Planta entera	Bye y Linares 18780
<i>Castela texana</i> (Simaroubaceae)	Corteza y madera	-
<i>Castela tortuosa</i> (Simaroubaceae)	Corteza y madera	-
<i>Cigarrilla mexicana</i> (Rubiaceae)	Hojas	Bye y Linares 19782
<i>Cnidoscylus tehuacanensis</i> (Euphorbiaceae)	Planta entera	J. A. Zavala 63 Xal
<i>Commelina erecta</i> (Commelinaceae)	Planta entera	Bye y Linares 17847
<i>Conyza filaginoides</i> (Asteraceae)	Planta entera	Calzada, 1999-1
<i>Dyssodia papposa</i> (Asteraceae)	Planta entera	Bye y Linares 18238
<i>Geranium niveum</i> (Geraniaceae)	Raíces	Bye y Linares 18054
<i>Hellianthella quinquenervis</i> (Asteraceae)	Raíces	Bye y Linares 18058
<i>Heliopsis longipes</i> (Asteraceae)	Raíces	Bye y Linares 18938
<i>Kohleria deppeana</i> (Gesneriaceae)	Hojas	Bye y Linares 17743
<i>Lepidium virginicum</i> (Cruciferaeae)	Planta entera	Calzada, IMSSM-12608
<i>Malmea depressa</i> (Annonaceae)	Corteza y madera	Anaya 1993-2
<i>Plumbago scandens</i> (Plumbaginaceae)	Corteza	Bye y Linares 18013
<i>Ptelea trifoliata</i> (Rutaceae)	Corteza y madera	Bye y Linares 18029
<i>Ratibida latipaliaris</i> (Asteraceae)	Raíces	Bye y Linares 18335
<i>Switenia humillís</i> (Meliaceae)	Semillas	Bye y Linares 18824
<i>Teloxys graveolens</i> (Chenopodiaceae)	Planta entera	IMSSM/colección V.II, 133

IV.3 Ensayo biológico.

El ensayo biológico utilizado para la determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los diferentes extractos, fracciones y compuestos puros se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Cedillo-Rivera y colaboradores (Cedillo-Rivera y Muñoz 1992; Cedillo-Rivera *et al.*, 1997). A continuación se describen los aspectos más importantes de esta prueba biológica.

IV.3.1 Protozoarios.

Los microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antiprotozoaria fueron *E. histolytica* (HM1-IMSS) y *G. lamblia* (IMSS:O989:1). La cepa de *E. histolytica* se mantuvo en el medio TYI-S-33 suplementado con suero de bovino al 10%. La cepa de *G. lamblia* se cultivo en el medio TYI-S-33 modificado y enriquecido con suero de ternera al 10%. Ambas cepas se mantuvieron axénicamente y para el bioensayo se

utilizaron los parásitos en fase logarítmica de crecimiento.

IV.3.2 Determinación de la actividad antiprotozoaria.

Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma. El extracto, la fracción o el compuesto puro se disolvió en 1 mL de DMSO y 19 mL medio cultivo TYI-S-33. De la solución resultante, se transfirieron 20, 40, 80, 120 y 160 μL a cinco tubos de manera independiente y c/u se aforó a un volumen de 4 mL con medio de cultivo, para obtener así una concentración final de 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. De manera adicional, cuando fue necesario, se realizaron diluciones subsecuentes para obtener concentraciones de 2.5, 0.25 y 0.025 $\mu\text{g/mL}$. Cada concentración se ensayó por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces. Los tubos con la muestra incorporada se inocularon con *E. histolytica* o *G. lamblia* para obtener un inóculo de 6×10^3

trofozoitos/mL y 5×10^4 trofozoitos/mL, respectivamente. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Cada prueba incluyó metronidazol (Sigma) y emetina (Sigma) como controles positivos, un control (medio de cultivo, DMSO y trofozoitos) y un blanco (medio de cultivo). Transcurrido el tiempo de incubación, 50 μ L de cada tubo de cultivo se subcultivaron en medio fresco y el número final de parásitos sobrevivientes se determinó por cuenta directa al microscopio. Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se utilizó un programa de análisis probit.

IV.4 Determinación de la actividad citotóxica.

El potencial citotóxico se determinó de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos (E.U.A.) en el laboratorio del Purdue Cancer Center,

Universidad de Purdue, Indiana, EE.UU. (Anderson et al., 1991).

Las líneas celulares empleadas fueron las siguientes: A-549 (carcinoma de pulmón), MCF-7 (carcinoma de mama) y HT-29 (adenocarcinoma de colon). Los resultados se expresan como concentración efectiva media (CE_{50}). La adriamicina se utilizó como un control positivo. El criterio de actividad considera a una muestra activa aquella que presenta una $CE_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$.

IV.5 Análisis cromatográficos.

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice, Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula, 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). La cromatografía de filtración por gel en columna abierta se realizó sobre Sephadex LH-20 (Pharmacia). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF), tanto analíticos como preparativos se efectuaron siguiendo

las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio o aluminio recubiertas con gel de sílice (Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) y varios eluyentes. Los agentes cromógenos se incluyen en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente cromógeno	Composición	Referencia
Sulfato cérico-H ₂ SO ₄	Sulfato cérico 12g Acido sulfúrico (c) 22.5 mL Hielo 350 g	Stahl, 1969
Reactivo de Dragendorff	Carbonato de bismuto 2.6g Yoduro de sodio 7.0 g Acido acético 25 mL Acetato de etilo 80 mL Agua 0.5 mL	Stahl, 1969
Vainillina	Vainillina 5 g Etanol 100 mL Acido clorhídrico (c)	Markham, 1982
Tricloruro de aluminio	Tricloruro de aluminio 5 g Agua 100 mL	Markham, 1982

Para el desarrollo de color es necesario calentar durante dos minutos a 110 °C.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo marca Perkin-Elmer, equipado con un detector de UV con arreglo de diodos. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se

realizaron utilizando el programa Omega (Perkin-Elmer). La purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna semipreparativa fase reversa (Waters, Spherisorb, S50DS2) de 10 x 250 mm. La detección se realizó a 280 nm.

IV.6 Obtención de las proantocianidinas antiprotozoarias de las raíces de *Geranium niveum*.

IV.6.1 Extracción y fraccionamiento.

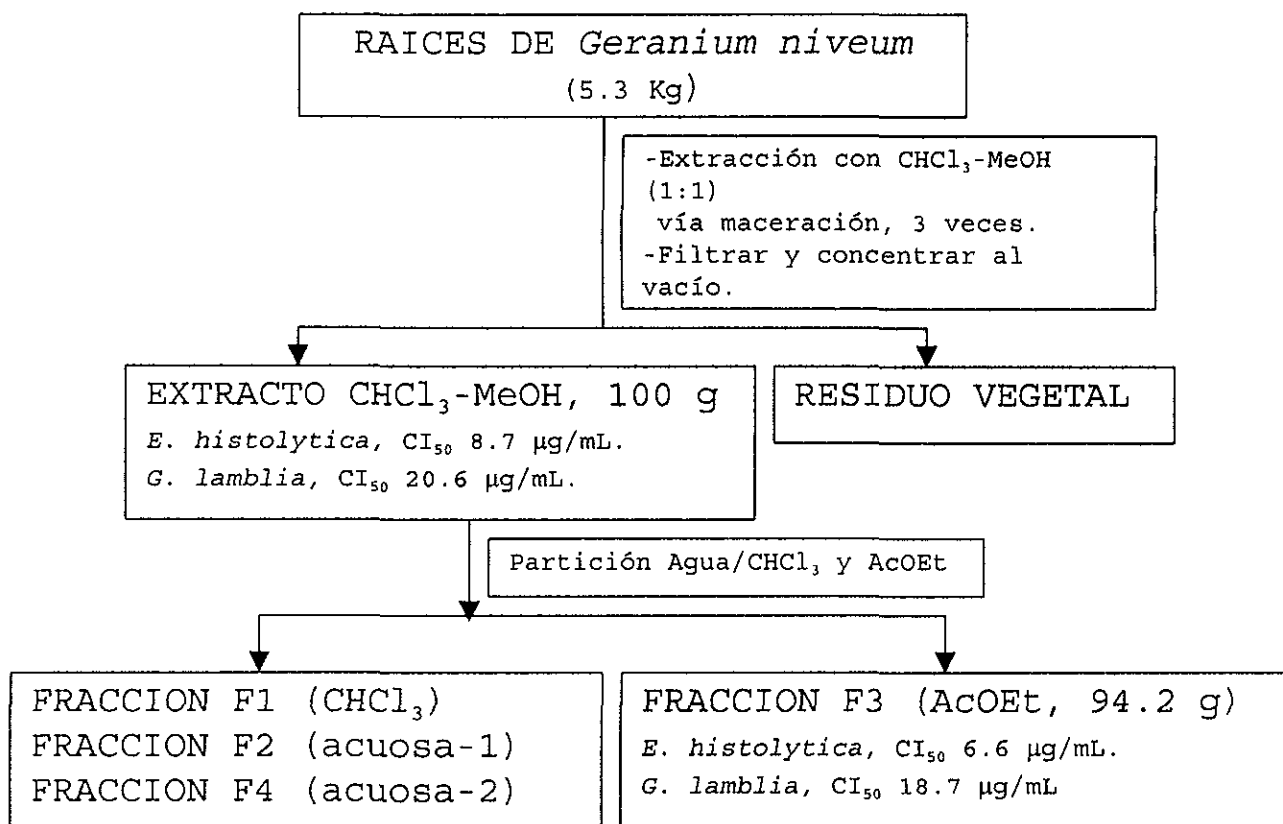
El proceso de desecación de las raíces de *G. niveum* se realizó a temperatura ambiente y a la sombra. El material vegetal seco (5.3 Kg) se molió en un molino de cuchillas modelo Wiley 4. El material vegetal molido se extrajo vía maceración con una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1) (14.5 L x 3). El extracto resultante se concentró *in vacuo*, obteniéndose 173 g de un residuo de color rojo.

Una parte (100g) del extracto activo [*E. histolytica*, $CI_{50} = 8.70 \mu\text{g/mL}$ y *G. lamblia*, $CI_{50} = 20.64 \mu\text{g/mL}$] se suspendió en agua (500 mL) y se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante repartos sucesivos con CHCl_3 y AcOEt. Como resultado de este proceso se obtuvieron cuatro fracciones: F1 [CHCl_3 , 2g, 500 mL X 3], F3 [AcOEt, 94.2 g, 500 mL X 3, *E. histolytica*, $CI_{50} = 6.6 \mu\text{g/mL}$ y *G. lamblia*, $CI_{50} = 18.7 \mu\text{g/mL}$], F2 [acuosa-1] y F4 [acuosa-2, 3.5 g].

La fracción más activa F3 (94 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria gel de sílice (950 g). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de disolventes con incrementos de polaridad: CHCl_3 -AcOEt (1:0, 1:1 y 0:1), AcOEt-acetona (1:1) y acetona-MeOH (1:1). Se obtuvieron un total de 125 fracciones (500 mL c/u) reuniéndose aquellas que mostraron una similitud cromatográfica y así obtener ocho fracciones secundarias [F3-1/F3-8]. En el Esquema

3 se resumen los procesos de extracción y fraccionamiento primario.

En el Cuadro 8 se resume el fraccionamiento secundario de la fracción primaria (F3) y se incluyen los eluyentes empleados, el número de eluatos, fracciones combinadas y la actividad antiprotozoaria de estas últimas.



Esquema 3. Extracción y fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico de las raíces de *G. niveum*.

Cuadro 8. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F3.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas	CI ₅₀ (µg/mL) <i>E.h</i> y <i>G. l</i>	
CHCl ₃	100	1-15	1-3, F3-1	91.26	87.57
			4-15, F3-2	103.2	219.7
CHCl ₃ :AcOEt	50:50	16-56	16-42, F3-3	41.64	140.1
			43-56, F3-4	71.61	21.69
AcOEt	100	57-79	57-59, F3-5	4.90	3.60
			60-61, F3-6	110.5	120.4
AcoEt: Acetona	50:50	80-100	62-85, F3-7	103.7	128.9
Acetona	100	101-118	86-125, F3-8	31.89	83.56
Acetona: MeOH	50:50	119-125			

E. h: *Entamoeba histolytica*, *G. l*: *Giardia lamblia*

Una parte (2.2 g) de la fracción secundaria más activa F3-5 [8.4 g, *E. histolytica*, CI₅₀= 4.9 µg/mL y *G. lamblia*, CI₅₀= 3.6 µg/mL] se sometió a una cromatografía de filtración por gel en columna empleando como fase estacionaria Sephadex LH-20 (50 g) y como eluyente EtOH. Se obtuvieron un total de 94 fracciones (10 mL

c/u) reuniéndose aquellas que mostraron una similitud cromatográfica y así obtener cinco fracciones terciarias: F3-5(1)/F3-5(5). En la Cuadro 9 se resume el fraccionamiento terciario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F3-5; se incluyen además las fracciones combinadas y los compuestos obtenidos a partir de las distintas fracciones terciarias.

Cuadro 9. Fraccionamiento terciario mediante cromatografía en columna abierta de la fracción F3-5.

Número de fracciones	Fracción terciaria	Compuesto obtenido
1-10	F3-5(1)	165
11-14	F3-5(2)	166
15-18	F3-5(3)	167
19-22	F3-5(4)	168
23-94	F3-5(5)	169-172

IV.6.1.1 *Separación del galato de metilo (165), el ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico (166), la reinoutrina (167) y la hiperina (168), a partir de la fracciones terciarias F3-5(1)-F3-5(4).*

El galato de metilo cristalizó de la fracción F3-5(1) como un sólido de color café (25 mg), con punto de fusión de 176-178 °C; el ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico precipitó de manera espontánea de la fracción F3-5(2) como un sólido de color crema (23 mg), con un punto de fusión de 230 °C (desc); la reinoutrina se aisló de la fracción F3-5(3), después de una recristalización con acetona, como un sólido de color amarillo canario (15 mg), con un punto de fusión de 200-202 °C; la hiperina se cristalizó de la fracción F3-5(4) como un sólido de color amarillo limón (276 mg), con un punto de fusión de 234-236 °C.

IV.6.1.2 *Purificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) de las geraninas A-D (169-172) y la mahuanina "B" (47) a partir de la fracción terciaria F3-5(5)*

La separación de las proantocianidinas mediante CLAR a partir de la fracción F3-5(5) (900 mg) se realizó en una columna de fase reversa utilizando un flujo de 3.2 mL/min. La fase móvil consistió de una mezcla de acetonitrilo (FMA) y ácido fórmico al 5% (FMB), en una proporción 27:73. El método empleado fue isocrático y el tiempo de elución fue de 30 min.

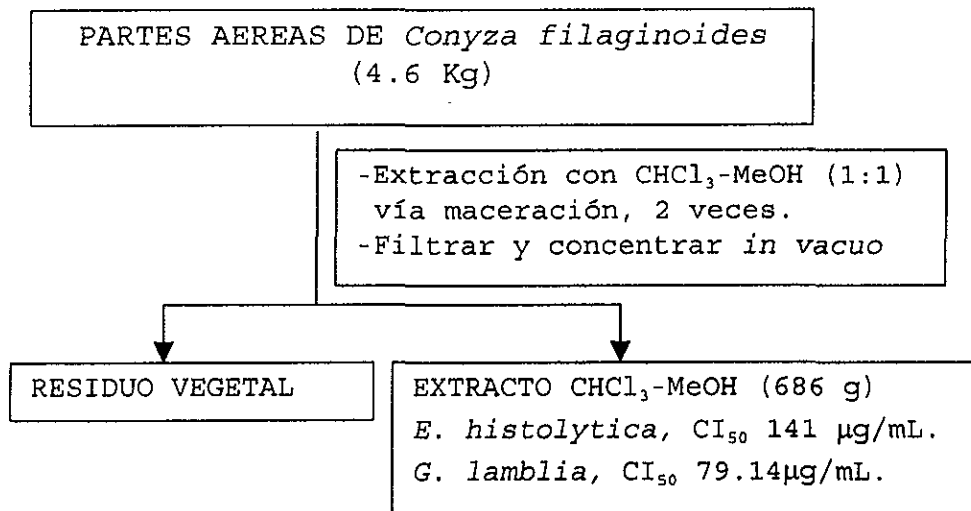
La geranina A (169) se aisló como un sólido de color rojo (485 mg) con un pf de 245-248 °C y un t_R de 7.1 min; la geranina B (170) se aisló como un sólido de color marrón (16 mg) con un pf de 230-232 °C y un t_R de 6.50 min; la geranina C (171) se aisló como un sólido amorfo de color crema (6 mg) con un t_R de 6.83 min; la geranina D (172) se obtuvo como un sólido amorfo de color rojo (55 mg) con un t_R de 26.5 min; por último la

mahunina B (47) se aisló como un sólido amorfo de color crema (7 mg) con un t_R de 8.8 min. Las cinco proantocianidinas aisladas revelaron de color rojo intenso en los análisis de CCF al revelar las cromatoplasmas con vainillina.

IV.7 Obtención de los flavonoles de las partes aéreas de *Conyza filaginoides*.

IV.7.1 Extracción y fraccionamiento.

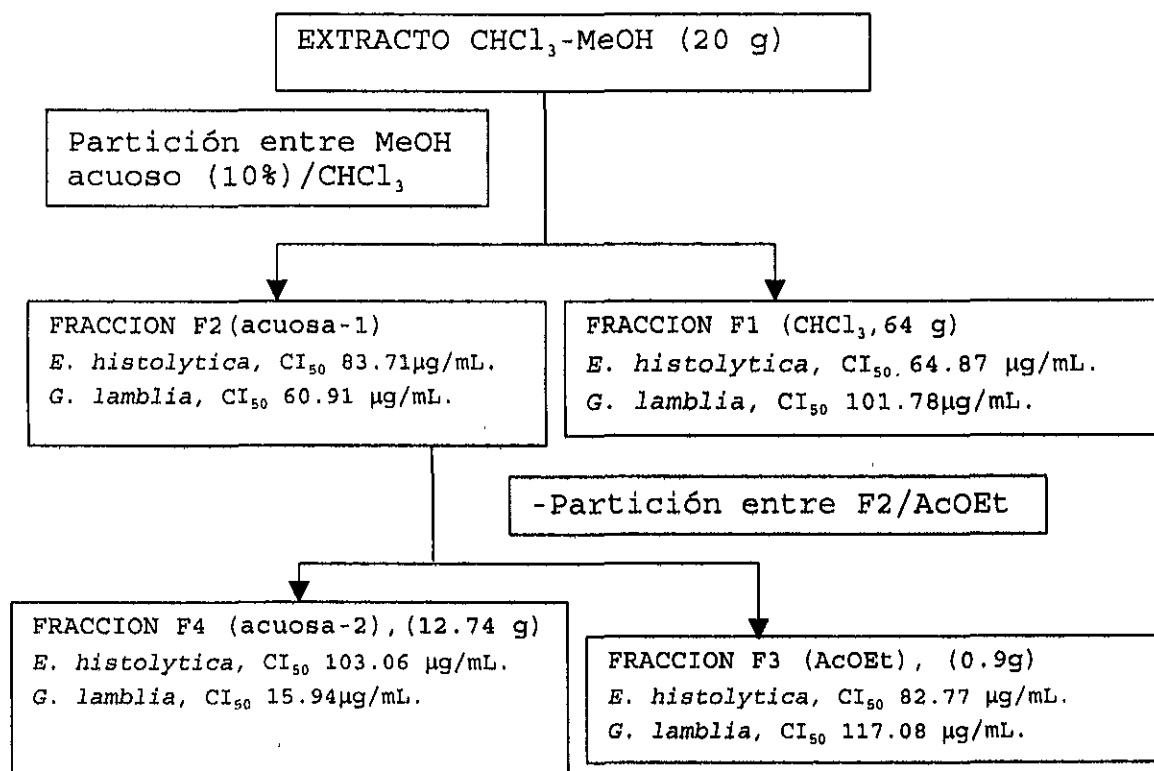
El proceso de secado de las partes aéreas de *C. filaginoides* se llevó a cabo a temperatura ambiente. El material vegetal seco se pulverizó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4. Las partes aéreas fragmentadas (4.6 Kg) se extrajeron con una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1) (16 L x 2 (72 h c/u)). El extracto resultante se concentró *in vacuo*, para obtener 686 g de un residuo de color verde oscuro (Esquema 4).



Esquema 4. Obtención del extracto cloroformo-metanólico (1:1) de las partes aéreas de *C. filaginoides*.

Una parte (20g) del extracto cloroformo-metanólico activo [*E. histolytica*, $CI_{50} = 141 \mu\text{g/mL}$ y *G. lamblia*, $CI_{50} = 79.14 \mu\text{g/mL}$] se suspendió en MeOH acuoso al 10% (200 mL) y sometió a una serie de particiones sucesivas con CHCl_3 y AcOEt (Esquema 5), obteniéndose cuatro fracciones primarias: F1 [CHCl_3 , 5.64 g, 200 mL X 2, *E. histolytica*, $CI_{50} = 64.87 \mu\text{g/mL}$ y *G. lamblia*, $CI_{50} = 101.78 \mu\text{g/mL}$], F3 [AcOEt, 0.900 g, 200 mL X 2, *E. histolytica*, $CI_{50} = 82.77 \mu\text{g/mL}$ y *G. lamblia*, $CI_{50} = 117.08 \mu\text{g/mL}$], F2

[acuosa-1, *E. histolytica*, CI_{50} = 83.71 $\mu\text{g/mL}$ y *G. lamblia*, CI_{50} = 60.91 $\mu\text{g/mL}$] y F4 [acuosa-2, 12.74 g, *E. histolytica*, CI_{50} = 103.06 $\mu\text{g/mL}$ y *G. lamblia*, CI_{50} = 15.94 $\mu\text{g/mL}$].



Esquema 5. Fraccionamiento del extracto cloroformo-metanólico (1:1) de las partes aéreas de *C. filaginoides*.

IV.7.1.1 Separación mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) del eritrodiol (151) a partir de la fracción activa F1.

Para la separación mediante CCFP del compuesto 151 de la fracción F1 (5 mg x placa) se utilizó como fase estacionaria gel de sílice sobre placas de vidrio (20 x 20 cm, Sílica gel 60, Merck F₂₅₄) y como fase móvil una mezcla ternaria de disolventes; AcOEt:MeOH:Agua (100:4.125:3.375). El eritrodiol se obtuvo como un sólido de color blanco de aspecto ceroso (8.12 mg).

IV.7.1.2 Aislamiento mediante CCFP de las yaksininas A-C (173-175), la astragalina (176) y la isoquercitrina (177) a partir de la fracción activa F3.

Para la separación mediante CCFP de los compuestos presentes en la fracción F3 (5 mg x placa) se utilizó como fase estacionaria gel de sílice sobre placas de vidrio (20 x 20 cm, Sílica gel 60 ,Merck F₂₅₄) y como

fase móvil una mezcla ternaria de disolventes: AcOEt:MeOH:Agua (100:4.125:3.375).

Las yaksininas A-C se aislaron como sólidos de color amarillo intenso (4.62; 15.82 y 11.22 mg, respectivamente) con puntos de pf de 233-235 °C (desc), 196-197 °C (desc) y 237-239 °C (desc), respectivamente. La astragalina (176) se aisló como un sólido de color amarillo (10.88 mg) con un pf de 166-168 °C. La isoquercitrina (177) se aisló como un sólido amorfo de color amarillo (10.96 mg).

IV.7.1.3 Aislamiento de la nicotiflorina (178), la narcisina (179) y la rutina (97) mediante CCFP a partir de la fracción activa F4.

Para la separación mediante CCFP de los compuestos presentes en la fracción F4 (5 mg x placa) se utilizó como fase estacionaria gel de sílice sobre placas de vidrio y como fase móvil una mezcla ternaria de disolventes: AcOEt:MeOH:Agua (100: 16.5:13.5).

La nicotinflorina se aisló como un sólido de color amarillo (15 mg) con un pf de 175-177 °C. La narcisina se aisló como un sólido de color amarillo (12.36 mg) con un pf de 177-179 °C. La rutina se aisló como un sólido de color amarillo claro con un pf de 187-189 °C.

IV.8 Caracterización de los compuestos aislados.

IV.8.1 Equipos utilizados.

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros en el UV se obtuvieron en un espectrómetro Shimadzu 160 en MeOH.

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se determinaron en un espectropolarímetro JASCO 720 a 25 °C en MeOH.

Los espectros en el IR (pastilla) se midieron en un espectrómetro Perkin Elmer 599.

Los espectros de RMN se obtuvieron en los siguientes equipos: Varian 300, Varian UNITY PLUS 500 y Bruker DMX500, utilizando CDCl_3 , CD_3OD o $\text{DMSO}-d_6$ como disolventes y TMS como referencia interna. RMN- ^1H (500 MHz) y RMN- ^{13}C (125 MHz).

Los espectros de masas modalidad FAB⁺ se registraron en un espectrómetro de masas JEOL DX300 utilizando una matriz de glicerol.

IV.8.2 Obtención de los derivados metilados de los compuestos 30, 47, 78, 80, 92-94, 165 y 169-172.

Por cada 25 mg de producto a metilar se utilizaron 65 μl de sulfato de dimetilo $[(\text{Me})_2\text{SO}_4]$ y 1.4 mg de K_2CO_3 . En todos los casos el producto a metilar se suspendió o disolvió en 2 mL de acetona.

La mezcla de reacción resultante se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 12 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se adicionaron 5 mL de agua; la mezcla resultante se extrajo con tres

porciones de 5 mL de CHCl_3 ; la fase orgánica obtenida se lavó con dos porciones de agua destilada de 5 mL c/u. Por último, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró *in vacuo*. En los casos en los que fue necesario los productos se purificaron por cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice.

En el Cuadro 10 se indican los compuestos que se metilaron y el rendimiento de los productos obtenidos.

Cuadro 10. Obtención de los derivados metilados de los compuestos 30, 47, 78, 80, 92-94, 165 y 169-172.

Compuesto	Peso del compuesto (mg)	Producto	Peso del producto (mg)
30	10.0	30a	7.5
47	6.0	47a	5.5
78	10.0	78a	6.0
80	10.0	80a	8.8
92	5.0	92a	7.4
93	7.0	93a	5.72
94	10.0	94a	11.9
165	47.0	165a	32.0
169	10.0	169a	8.9
170	11.5	170a	14.6
171	3.0	171a	3.0
172	10.5	172a	7.8

IV.8.3 Obtención de los derivados acetilados de los compuestos 30, 78, 80, 92-94, 169 y 172.

Para formar los derivados acetilados se empleó 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de piridina por cada 100 mg de muestra. En todos los casos la mezcla de reacción se dejó durante 12 h a temperatura ambiente y, al cabo del tiempo señalado, se procesó de acuerdo a los procesos convencionales (Markham, 1982). En el Cuadro 11 se incluyen los compuestos que se acetilaron y el rendimiento de los productos obtenidos.

Cuadro 11. Obtención de los derivados acetilados de los compuestos 30, 78, 80, 94, 169 y 172.

Compuesto	Peso del compuesto (mg)	Producto	Peso del producto (mg)
30	10	30b	12
78	10	78b	13
80	10	80b	14.5
94	10	94b	6
169	50	169b	61
172	10	172b	13

IV.8.4 Obtención de los ésteres de Mosher de los compuestos 47 y 169-172.

A una solución de las geraninas A-D obtenidas en el presente estudio (1.5 mg en 0.5 mL de CH₂Cl₂) se agregó DCC (5.2 mg), 4-dimetilaminopiridina (1.9 mg) y el ácido *R* o *S*- α -metoxi- α -(trifluorometil) fenilacético (5.9 mg). La mezcla resultante se dejó durante 12 h a temperatura ambiente para obtener el éster de Mosher correspondiente (Yoshiukawa et al., 1998).

En el Cuadro 12 se incluyen los compuestos que se esterificaron con los ácidos de Mosher.

Cuadro 12. Obtención de los ésteres de Mosher de los compuestos 47 y 169-172.

Compuesto	Peso del compuesto (mg)	Producto	Peso del producto (mg)
47	1.5	47R	2
45	1.5	47S	1.4
169	1.5	169R	1.5
169	1.5	169S	1.5
170	1.5	170R	1
170	1.5	170S	1.3
171	1	171R	1
171	1	171S	1.3
172	1.5	172R	1.7
172	1.5	172S	1.3

IV.8.5 Hidrólisis ácida de los compuestos 173-175.

Por cada 3 mg de producto a hidrolizar se utilizaron 0.5 mL de una solución al 5% de MeOH-HCl. La mezcla de reacción resultante se sometió a reflujo por 3 hrs y al cabo del tiempo señalado, se procesó de acuerdo a los procedimientos convencionales (Sen et al., 1992).

IV.8.6 Modelos moleculares.

El análisis conformacional de la geranina A y sus derivados se realizó mediante el estudio de las gráficas de energía rotacional en combinación con el criterio de convergencia E_{MMX} . El cálculo de sistemas π se realizó mediante la opción de campo Hartree-Fock. La adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizó utilizando el programa de software PCMODEL V 6.00.

IV.9 Flavonoides utilizados para el estudio de relación estructura química-actividad antiprotozoaria.

Los flavonoides seleccionados para el estudio de relación estructura química-actividad antiprotozoaria fueron adquiridos comercialmente (Sigma), sintetizados a partir de productos comerciales o aislados de diferentes especies vegetales. Así el camperol, la quercetina y el tilirósido se aislaron de *Helianthemum glomeratum* y *Cuphea pinetorum* (Calzada et al., 1995; Calzada et al., 1998); la pinocembrina y la pinostrobrina de *Teloxys graveolens* (Camacho et al., 1991); y el xantomicrol de *Brickellia paniculata* (Meckes et al., 1997). En el caso de los ácidos fenólicos, éstos también se adquirieron comercialmente (Sigma, Merck o Aldrich).

V RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la presente disertación se dividen en tres partes. La primera, comprende los resultados obtenidos de la investigación química y actividad antiprotozoaria de las proantocianidinas del tipo A obtenidas de las raíces de *Geranium niveum*. La segunda, incluye la obtención y la evaluación de la actividad antiprotozoaria de los flavonoles presentes en las partes aéreas de *Conyza filaginoides*. Por último, la tercera parte se refiere al estudio de la relación estructura química-actividad antiprotozoaria de flavonoides selectos y de los derivados acetilados y metilados de los productos con mayor actividad.

La selección de las especies medicinales *Geranium niveum* y *Conyza filaginoides* como una fuente de nuevos agentes antiprotozoarios se realizó siguiendo los procedimientos convencionales (Cordell, 1993; 1995; Hostettmann et al., 1997; Cragg et al., 1997).

En la primera fase de la investigación se efectuó una selección primaria de 19 especies medicinales mexicanas, utilizando como criterio de selección, el etnomédico. La estrategia se fundamenta en que las plantas utilizadas en las prácticas médicas populares de varias regiones del mundo constituyen materias primas valiosas para el descubrimiento de fármacos con una aplicación terapéutica (Farnsworth et al., 1989; Phillipson, 1991a; Cordell, 1993; Cragg et al., 1997). Así, por ejemplo, dos agentes antiprotozoarios de uso terapéutico, la emetina y la artemisina, se descubrieron de especies de reconocido uso popular para el tratamiento de la disentería y el paludismo, respectivamente.

En la etapa inicial del proceso de selección primario se analizó la información derivada de estudios de campo realizados por especialistas etnobotánicos y de una exhaustiva revisión bibliográfica sobre algunas especies vegetales medicinales usadas para tratar

padecimientos gastrointestinales, incluyendo las diarreas, en las prácticas médicas populares de México. Con base en este análisis se seleccionaron las 19 especies indicadas en el Cuadro 13.

Una vez realizado el proceso de selección, se procedió a la recolección de los vegetales para determinar sus propiedades antiprotozoarias y, así, seleccionar las especies más apropiadas para su estudio posterior.

A partir del material vegetal desecado y fragmentado, se prepararon los extractos orgánicos en pequeña escala, empleando MeOH o una mezcla CHCl₃-MeOH (1:1) como disolvente de extracción. Los extractos resultantes se valoraron para determinar su efecto antiprotozoario contra los trofozoitos de *E. histolytica* y *G. lamblia* (Cuadro 13).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la determinación del potencial antiprotozoario, las 19 especies seleccionadas se dividieron en tres grupos.

Cuadro 13. Efecto antiprotozoario de los extractos de las 19 plantas medicinales seleccionadas.

Especie botanica	CI ₅₀ µg/mL (IC 95%)	
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
<i>Acalypha phleoides</i> (Euphorbiaceae)	7.23 (7.39-7.07)	9.45 (9.48-9.42)
<i>Castela texana</i> (Simaroubaceae)	46.84 (47.16-46.51)	189.90 (190.1-189.6)
<i>Castela tortuosa</i> (Simaroubaceae)	41.00 (41.61-40.79)	180.80 (181.5-180.1)
<i>Cigarrilla mexicana</i> (Rubiaceae)	45.13 (46.39-43.36)	41.15 (41.28-41.01)
<i>Cnidoscopus tehuacanensis</i> (Euphorbiaceae)	13.70 (14.26-13.14)	18.90 (18.92-18.86)
<i>Commelina erecta</i> (Commelinaceae)	29.53 (29.97-29.09)	32.92 (33.09-32.75)
<i>Conyza filaginoides*</i> (Asteraceae)	141.00 (142.22-141.05)	79.14 (79.22-79.04)
<i>Dyssodia pappossa</i> (Asteraceae)	144.60 (145.04-144.16)	30.20 (30.32-30.07)
<i>Geranium niveum*</i> (Geraniaceae)	8.70 (8.94-8.45)	20.64 (20.7-20.5)
<i>Hellianthella quinquenervis</i> (Asteraceae)	4.61 (4.84-4.37)	2.60 (2.62-2.57)
<i>Heliopsis longipes</i> (Asteraceae)	53.12 (53.68-52.54)	16.20 (16.23-16.16)
<i>Kohleria deppeana</i> (Gesneriaceae)	120.92 (121.38-120.47)	65.72 (65.8-65.62)
<i>Lepidium virginicum</i> (Cruciferaceae)	105.00 (106.14-103.88)	61.30 (61.43-61.17)
<i>Malmea depressa</i> (Annonaceae)	453.41 (453.52-453.30)	82.20 (82.34-82.05)
<i>Plumbago scandens</i> (Plumbaginaceae)	117.90 (118.45-117.33)	61.70 (61.77-61.62)
<i>Ptelea trifoliata</i> (Rutaceae)	18.94 (19.24-18.63)	28.14 (28.19-28.08)
<i>Ratibida latipaliaris</i> (Asteraceae)	91.72 (92.04-91.40)	33.35 (33.37-33.32)
<i>Switenia humillis</i> (Meliaceae)	178.10 (178.50-177.68)	38.63 (38.68-38.57)
<i>Teloxys graveolens</i> (Chenopodiaceae)	9.13 (9.29-8.97)	8.13 (8.16-8.09)
Metronidazol**	0.04 (0.10-0.03)	0.21 (0.27-0.14)
Emetina**	134.94 (135.81-134.11)	71.10 (71.24-70.93)

*extractos CHCl₃-MeOH (1:1); **Control positivo; (IC)= intervalo de confianza al 95%.

En el primer grupo se incluyen las especies que presentaron actividad relevante contra ambos protozoarios; el segundo grupo está constituido por las especies que presentaron actividad específica contra los trofozoitos de *G. lamblia*; el último incluye a los vegetales que resultaron activos contra los trofozoitos de *E. histolytica*.

En el primer grupo se encuentran los extractos de *Acalypha phleoides*, *Cigarrilla mexicana*, *Cnidoscolus tehuacanensis*, *Commelina erecta*, *Geranium niveum*, *Hellianthella quinquenervis*, *Heliopsis longipes*, *Ptelea trifoliata* y *Teloxys graveolens* cuyos valores de CI_{50} oscilan entre 2.6 y 41.15 $\mu\text{g/mL}$ para *G. lamblia* y de 4.6 a 53.12 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica*. El segundo grupo incluye a los extractos de las especies *Conyza filaginoides*, *Dyssodia papposa*, *Kohleria deppeana*, *Lepidium virginicum*, *Malmea depressa*, *Plumbago scandens*, *Ratibida latipaliaris* y *Switenia humillis*; para estas especies los valores de CI_{50} están en el

intervalo de 30.2 a 82.2 $\mu\text{g/mL}$. El tercer grupo esta constituido por las especies *Castela texana* y *Castela tortuosa*, (CI_{50} = 46.84 y 41 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

Los 19 extractos evaluados resultaron menos potentes que el metronidazol. Sin embargo, las especies del primer grupo son más potentes que la emetina lo que apoyaría la hipótesis de encontrar nuevos agentes antiprotozoarios en estas especies.

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación antiprotozoaria, se seleccionó del primer grupo de plantas a la especie *G. niveum* para realizar un fraccionamiento biodirigido. Cabe destacar que las especies *Cigarrilla mexicana*, *Cnidosculus tehuacanensis*, *Commelina erecta*, *Heliopsis longipes*, *Teloxys graveolens* y *Lepidium virginicum* son actualmente objeto de estudios biodirigidos para obtener sus principios antiprotozoarios.

La selección de *Conyza filaginoides* se hizo con base en las siguientes consideraciones: i) la especie

mostró un efecto antiprotozoario específico contra los trofozoitos de *G. lamblia*; ii) completar el estudio farmacognóstico integral de la especie *Conyza filaginoides*, la cual se utiliza ampliamente en las prácticas medicas populares de México para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. Como se indicó en la sección de antecedentes, en un estudio previo se demostró que el extracto de la planta y algunos de sus metabolitos poseen propiedades relajantes de la musculatura lisa intestinal, efecto que sin duda alguna justifica el empleo de la especie en la medicina tradicional. También, se demostró que el extracto carece de efecto sobre las bacterias enteropatógenas más comunes. De tal forma que restaba aislar los principios antiprotozoarios presentes en la especie.

V.1 Estudio fitoquímico de las raíces de *G. niveum*

El estudio biodirigido, mediante la determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. lamblia*, del extracto cloroformo-metanólico de las raíces de *G. niveum* condujo al aislamiento de un fenol [el galato de metilo (165)], un terpenoide [el ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico (166)], dos glicósidos de flavonoides [la reinoutrina (167) y la hiperina (168)] y cinco proantocianidinas del tipo A [la mahuanina B (47) y las geraninas A-D (169-172)]. Las geraninas A-D (169-172) son análogos de la mahuanina B con estructuras novedosas.

V.1.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados de *Geranium niveum*.

De manera general, la elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos y quirópticos.

El análisis detallado de la información proporcionada por los espectros de RMN, IR, EM y DC, tanto de los productos naturales como de sus derivados químicos (derivado metilado y ésteres de Mosher), permitió comprobar que la estructura de los compuestos 165-168 y 47, corresponden al galato de metilo (Hatano *et al.*, 1990), al ácido cafeiloxi-3- β -12-oleanen-28-oico (DPN, 1994), a la reinoutrina (Devon y Scott, 1975), a la hiperina (Bennini *et al.*, 1992), y a la mahuanina B, respectivamente (Hikino *et al.*, 1982). En el Apéndice B se incluyen los espectros de IR, RMN y EM de los compuestos 165-168 y 47.

Los compuestos novedosos 169-172 pertenecen a la clase de proantocianidinas del grupo A-1, es decir las dos unidades flavan-3-ol se encuentran unidas a través de enlaces interflavonoide de los tipos 2C->O->7D y 4C->8D. En todos los casos, los enlaces interflavonoide son β .

Cabe destacar que el producto 172 representa la tercera proantocianidina trimérica aislada de una fuente natural. El compuesto está constituido por una molécula de geranina A (169) unida a una unidad de flavan-3-ol, a través de enlaces interflavonoide, α orientados, de los tipos 2F- \rightarrow O- \rightarrow 7G y 4F- \rightarrow 8G.

La principal diferencia entre las tres proantocianidinas diméricas radica en el grado de hidroxilación de los anillos aromáticos B y E.

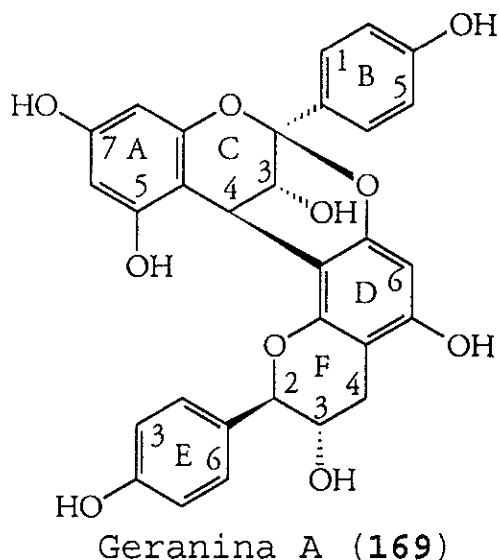
La elucidación de las estructuras moleculares de los cuatro compuestos novedosos, denominados como geraninas A-D (169-172), se describirá en forma detallada en las siguientes secciones.

V.1.1.1 Caracterización estructural de la geranina A (169).

La geranina A se aisló como un sólido rojo, soluble en MeOH. Los datos físicos, espectroscópicos y

espectrométricos del compuesto **169** se resumen en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la geranina A (**169**).



p.f. = 245-248 °C

P.M. = 544 uma EM-FAB⁺ (NBA)

F.M. = C₃₀H₂₄O₁₀ calculada por análisis elemental

[α]_D = +40° (c = 0.3 mg/ml, MeOH)

IR ν_{max} (KBr) = 3396, 1614, 1516, 1454, 1234, 962 cm⁻¹
 (Espectro 1)

UV (ε) (MeOH) λ_{max} = 204.5, 258, 274 nm..... (Espectro 2)

EM-FAB⁺ m/z (int.rel) = [M+H] 545 (10), 409 (12), 271 (27), 154 (100)..... (Espectro 3)

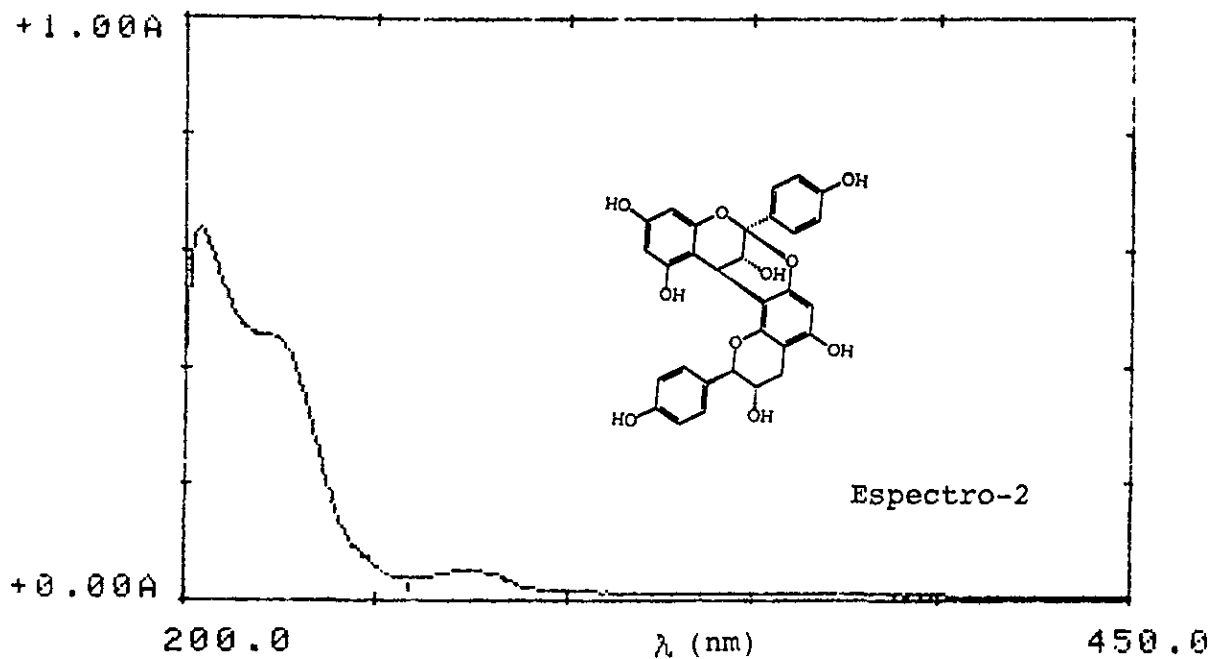
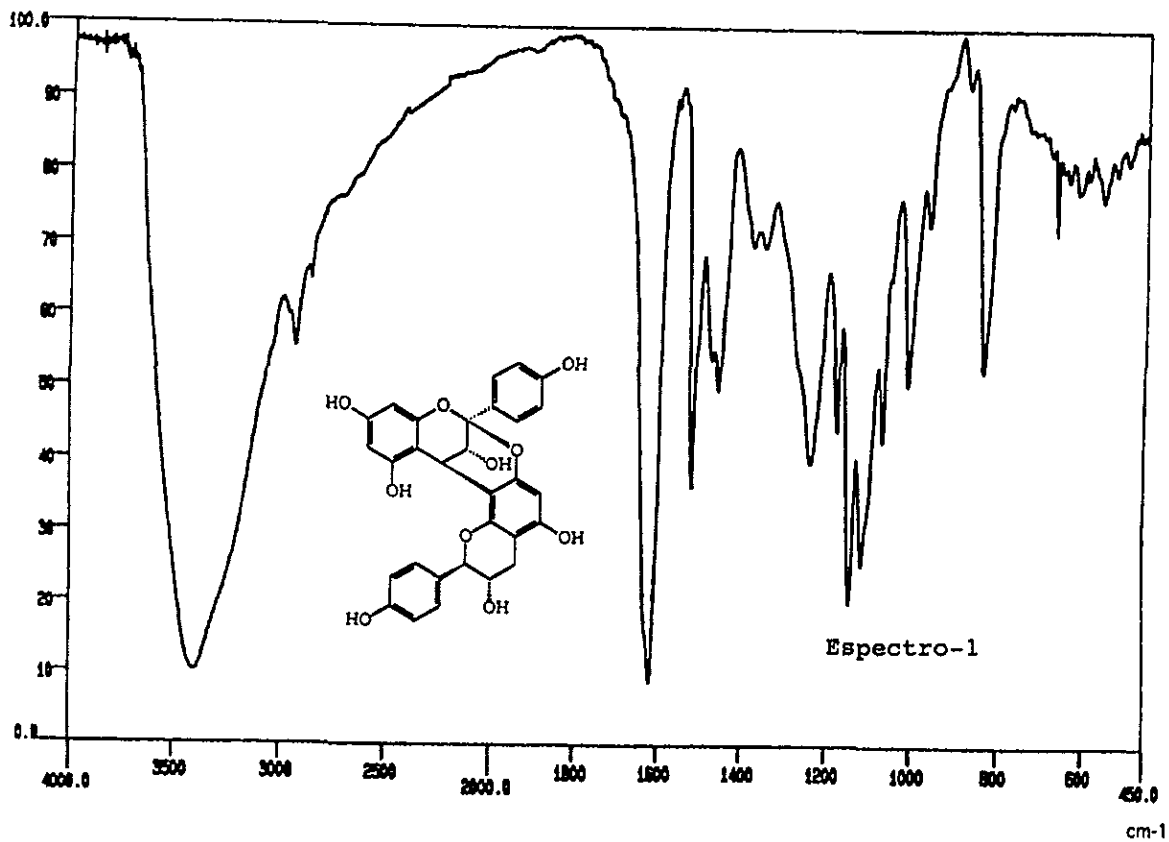
DC (MeOH) Δε (nm) = -1.35 x 10³ (271.5), 2.21 x 10³ (238), 3.26 x 10³ (220), -4.82 x 10³ (204)..... (Espectro 11)

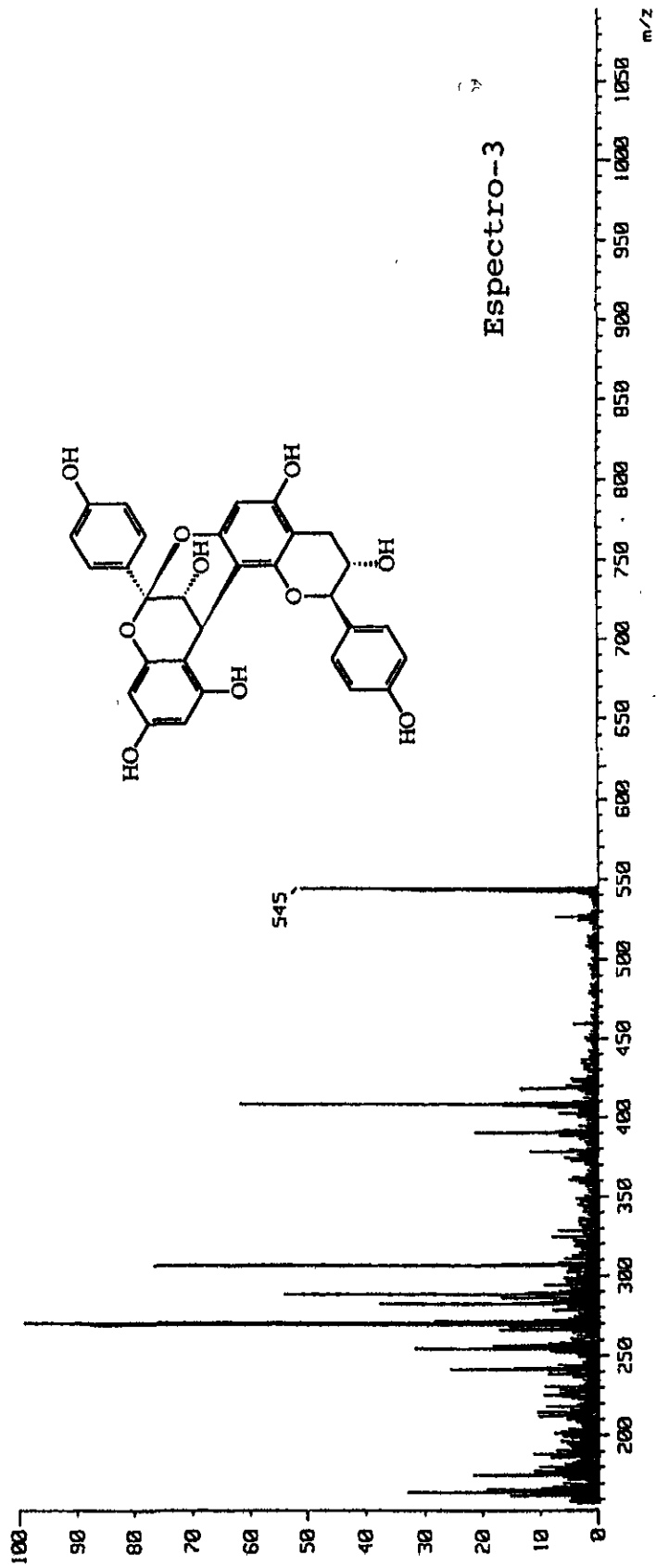
RMN ¹H y ¹³C = Cuadro 15..... (Espectros 4 y 5)

El espectro en el IR (Espectro 1) generado por la geranina A presentó bandas de absorción para grupos hidróxilo (3396 cm^{-1}) y para anillos aromáticos (1614 y 1514 cm^{-1}). En el espectro en el UV (Espectro 2) se observa un máximo de absorción a 274 nm consistente con la presencia de cromóforos fenólicos del tipo floroglucinol y fenol (Baldé et al., 1991).

La fórmula molecular de la geranina A se estableció como $\text{C}_{30}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$ por espectrometría de masas modalidad FAB⁺ (Espectro 3). El ion cuasimolecular se observó en una relación de $m/z\ 545\ [\text{M}+\text{H}]^+$.

La obtención de un derivado heptaacetilado (**169b**) [Espectros A-1/A-3] al tratar el compuesto **169** con anhídrido acético/piridina, demostró la naturaleza heptahidroxilada del producto natural. Por otro lado, la obtención del derivado pentametilado (**169a**) [Espectros A-4/A-6] al tratar el compuesto con sulfato de dimetilo, confirmó la presencia de cinco hidróxilos fenólicos.





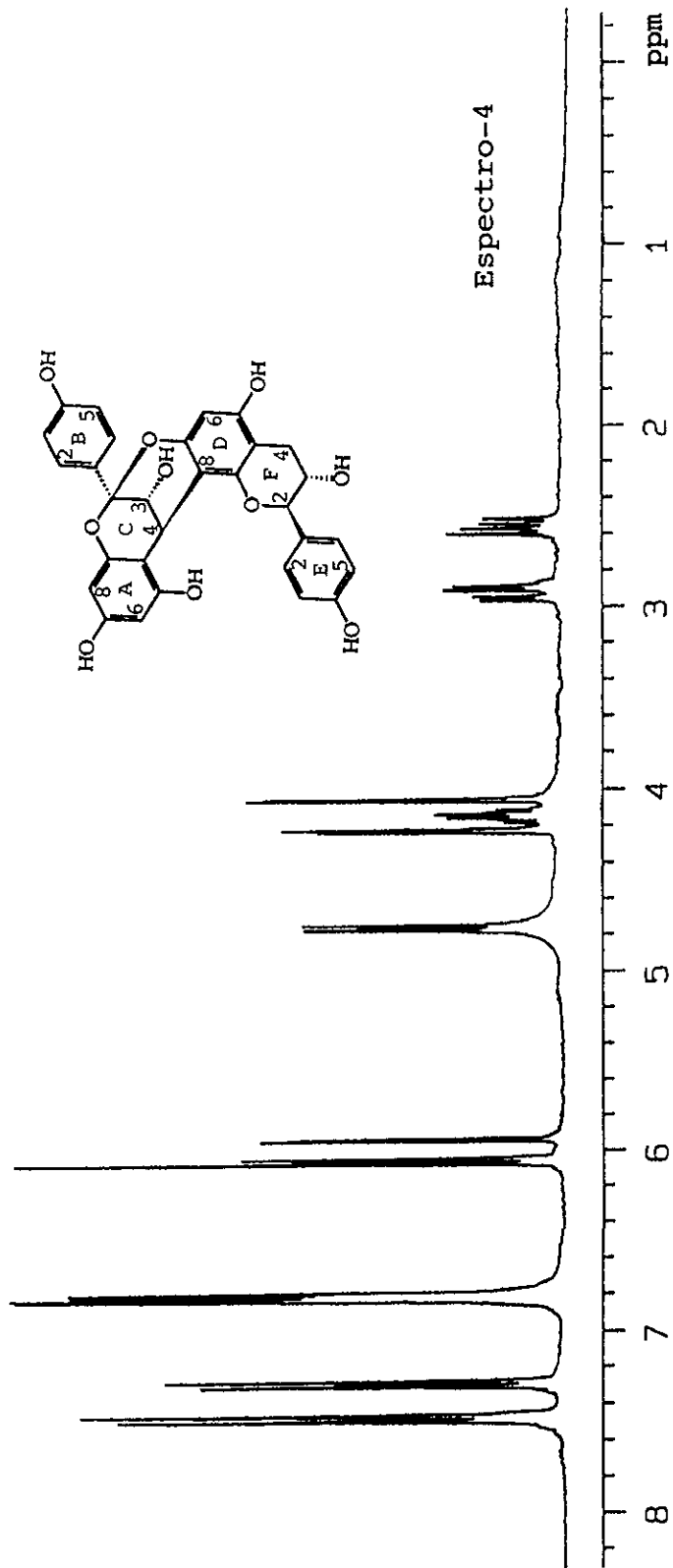
Los espectros de RMN unidimensionales (Espectros 4 y 5; Cuadro 15), en conjunto con la información anterior, permitieron determinar que el compuesto 169 era una proantocianidina del tipo A, constituida por dos unidades 5,7,4'-trihidroxi-flavan-3-ol (Hikino et al., 1982; Ohigashi et al., 1982; Drewes et al., 1992; Drewes y Tylor 1994), ya que se observaron señales para dos anillos aromáticos *p*-disustituídos, uno tetrasustituído, uno pentasustituído y las señales diagnósticas de los anillos C y F de una proantocianidina del grupo A-1 (Cronjé et al., 1993; Baldé et al., 1991; 1995; Kolodziej et al., 1991). A continuación se describen las características relevantes de los espectros de RMN:

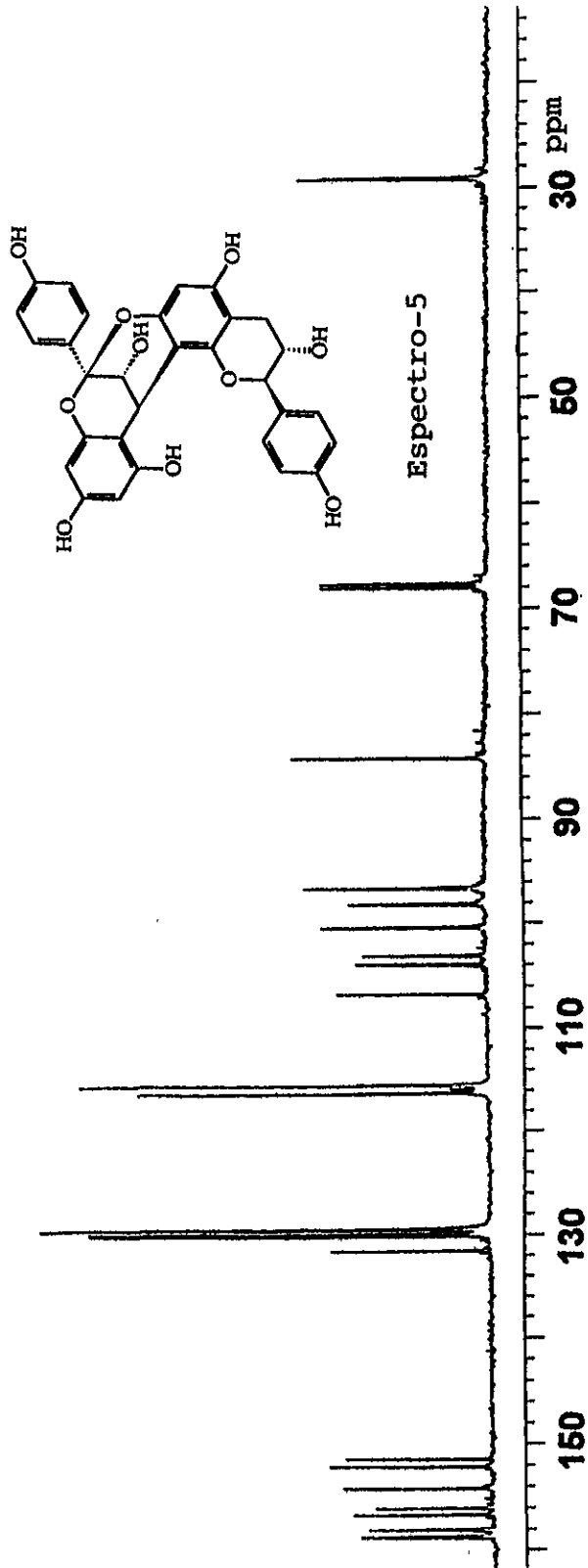
a) En δ_H 4.08 (d) y 4.26 (d) se observó un sistema AB característico de los hidrógenos H-3 y H-4 del anillo C de la unidad flavanil superior de una proantocianidina del tipo A. Las señales correspondientes para los

carbonos del anillo C aparecen a δ_c 100.45 (2C), 67.70 (3C) y 29.08 (4C)

b) En δ_H 4.80 (d), 4.17 (ddd), 2.93 (dd) y 2.58 (dd) se aprecian las señales diagnósticas de los hidrógenos H-2, H-3, H-4a y H-4b del anillo F de la unidad flavanil terminal de una proantocianidina del tipo A. Las señales de los carbonos correspondientes aparecen en δ_c 84.21 (C-2F), 68.05 (C-3F) y 29.20 (C-4F).

c) En la región aromática del espectro de RMN 1H se observaron dos sistemas A_2B_2 [en δ 7.50 (d, H-2,6B) y 6.82 (d, H-3,5B); en δ 7.29 (d, H-2,6E) y 6.83 (d, H-3,5E)], un sistema AB [en δ 6.08 (d, H-8A) y 5.96 (d, H-6A)] y un singulete aislado [en δ 6.10 (H-6D)]. En el espectro de RMN- ^{13}C se observaron también las señales para los carbonos aromáticos correspondientes a los anillos B, E, A y D en δ 129.98 (C-2,6B), 115.54 (C-3,5B), 130.11 (C-2,6E), 116.33 (C-3,5E), 96.56 (C-8A), 98.16 (C-6A) y 96.64 (C-6D).





Debe mencionarse que las resonancias de ^{13}C fueron asignadas mediante los experimentos HMQC y HMBC (Espectros 6 y 10) y son consistentes con las descritas para compuestos relacionados (Ohigashi *et al.*, 1982; Kasahara *et al.*, 1983; Porter *et al.*, 1991; Drewes y Tylor 1994). La asignación total de las resonancias de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se resume en las Cuadro 15.

Una vez determinada la naturaleza del compuesto **169** como una proantocianidina de tipo A, se procedió a establecer el subtipo. En este sentido, el análisis detallado de las correlaciones observadas en los espectros NOESY (Espectro 7) y COSY (Espectro 8) fueron de utilidad y permitieron establecer que el producto natural era una proantocianidina del grupo A-1. A continuación se describen las evidencias más relevantes de este análisis:

En el experimento NOESY se observaron dos correlaciones importantes, la primera entre los

hidrógenos H-4C/ H-3C y H-2F, y la segunda entre los hidrógenos H-6A/ H-2,6E. En el experimento COSY se observó correlación entre los hidrógenos H-4C/ H-3C y H-2F. Estas observaciones definieron sin ambigüedad que los sitios de unión interflavanoide son de los tipos 2C->0->7D y 4C->8D. Una evidencia adicional que apoya la estructura subtipo A-1 del compuesto **169** se obtuvo a partir del análisis del experimento NOESY (Espectro 9) del derivado pentametilado **169a**, en el cual se observó correlación entre el OMe-5A con los hidrógenos H-6A, H-4A, H-2,6E y H-2F. El cuadro de conectividades establecidos en el experimento HMBC (Espectro 10) se encontraba en armonía con la estructura general de una proantocianidina del grupo A-1 para la geranina A (Pant *et al.*, 1992; Vivas *et al.*, 1996).

Una vez establecido el núcleo estructural del compuesto **169**, restaba por establecer la estereoquímica de los centros quirales: 2C, 3C, 4C, 2F y 3F.

Cuadro 15. Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de la geranina A (169).

Posición	δ_{H}	δ_{C}
2C	-	100.45
3	4.08 d (3.5)	67.70
4	4.26 d (3.5)	29.08
5A	-	156.70
6	6.08 d (2.5)	98.16
7	-	159.05
8	5.96 d (2.5)	96.56
9	-	154.25
10	-	104.02
1B	-	131.64
2	7.50 d (9.0)	129.98
3	6.82 d (9.0)	115.54
4	-	158.79
5	6.82 d (9.0)	115.54
6	7.50 d (9.0)	129.98
2F	4.80 d (8.0)	84.21
3	4.17 ddd (5.5, 8.0, 8.5)	68.05
4a	2.58 dd (8.5, 16.5)	29.20
4b	2.93 dd (5.5, 16.5)	29.20
5D	-	156.04
6	6.10 s	96.64
7	-	152.13
8	-	106.82
9	-	151.43
10	-	103.21
1E	-	129.81
2	7.29 d (8.4)	130.11
3	6.83 d (8.4)	116.33
4	-	158.69
5	6.83 d (8.4)	116.33
6	7.29 d (8.4)	130.11

*MeOH- d_4 , ^1H [500 MHz. (J en Hz)], ^{13}C 125 MHz, δ en ppm. Asignaciones confirmadas por RMN ^1H - ^{13}C -HMQC y HMBC.

En el caso de los carbonos 2C y 4C la configuración absoluta se estableció por métodos quirópticos.

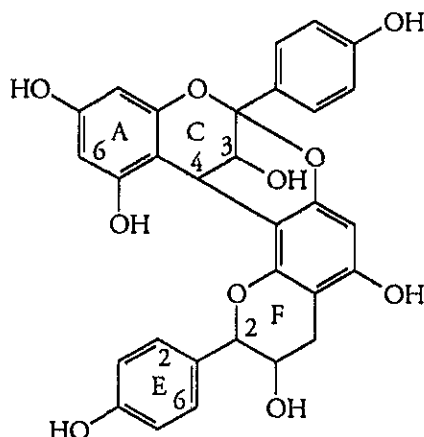


Figura 14. Estructura general de la geranina A.

De acuerdo con Barret y colaboradores (Barret *et al.*, 1979), el signo positivo del efecto Cotton en el espectro de DC entre 220-240 nm observado para un gran número de proantocianidinas es indicativo de la configuración "R" en el carbono 4C (Kasahara *et al.* 1983; Nonaka *et al.*, 1987; Baldé *et al.*, 1991; Drewes *et al.*, 1992; Cronjé *et al.*, 1993).

El efecto Cotton positivo ($[\theta] = 3.26 \times 10^3$) observado en el espectro de DC del compuesto 169 (Espectro 11) a 220 nm es consistente con una

configuración *R* en el carbono 4C. En consecuencia, el carbono 2C posee una configuración absoluta *S*.

Una vez establecida la configuración absoluta del carbono 2C y 4C como *S* y *R*, respectivamente, el siguiente paso en el proceso de la elucidación estructural del compuesto **169** fue la determinación de la estereoquímica absoluta de los dos hidroxilos alcohólicos ubicados en los carbonos 3C y 3F de la molécula y, para ello, se aplicó la metodología de los ésteres de Mosher (Yoshiukawa et al., 1998).

Para establecer la configuración absoluta de alcoholes secundarios por el método de Mosher es necesario la formación de los ésteres correspondientes con los ácidos quirales (*S*)- y (*R*)- α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético (*S*- y *R*-MTPA). Posteriormente, se analizan las diferencias de los desplazamientos químicos en los espectros de RMN-¹H de los ésteres (*S*)- y (*R*)-MTPA con el fin de determinar el efecto protector inducido por el anillo aromático y el

efecto desprotector inducido por el grupo metoxilo del MTPA sobre los hidrógenos cercanos al centro quiral (Dale y Mosher, 1973; Hundt et al., 1990; Drewes et al., 1992; Rossouw et al., 1994)

Según el modelo empleado por Dale y Mosher en la conformación de máxima estabilidad (Ohtani et al., 1991) del éster el trifluorometilo, el carbonilo del éster y el hidrogeno están eclipsados formando un plano, los hidrógenos del lado derecho del plano del MTPA deben de tener diferencias de desplazamientos químicos ($\Delta\delta = \delta_R - \delta_S$) negativas ($\delta_R < \delta_S$), y los hidrógenos del lado izquierdo del plano deben tener diferencias positivas ($\delta_R > \delta_S$), tal como se ilustra en la Figura 15. Por último, se determina la configuración absoluta del alcohol secundario aplicando la regla de Cahn-Ingold-Prelog (Figura 15).

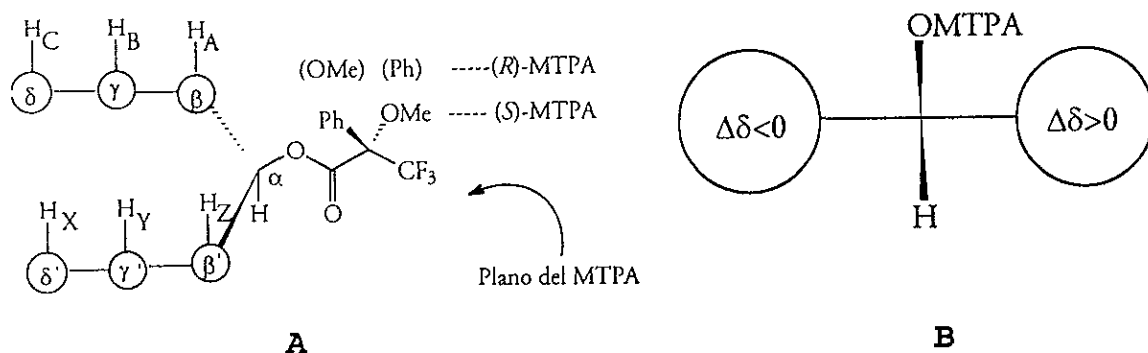


Figura 15. **A)** Conformación de máxima estabilidad y plano del MTPA propuesto para los ésteres (R)- y (S)-de Mosher. **B)** Modelo para determinar la estereoquímica absoluta en alcoholes secundarios.

La comparación de los desplazamientos químicos en los espectros de RMN- ^1H (Espectros 12 y 13) de los diésteres de Mosher R (**169R**) y S (**169S**) de la geranina A (**169**), permitió realizar las siguientes observaciones y conclusiones (Cuadro 16): a) La diferencia positiva ($\Delta\delta_{R-S}$) para H-2,6E y las diferencias negativas para H-6A y OMe-5A indican una estereoquímica R para el centro quiral 3C y, en consecuencia, la estereoquímica absoluta de 2C se asignó automáticamente como S. La diferencia positiva para uno de los protones H-4F y la

diferencia negativa para H-2,6E y H-3,5E permiten proponer una estereoquímica *S* para el centro quiral 3F y, en consecuencia, la estereoquímica absoluta del centro quiral 2F se asignó como *R*.

En resumen, la estereoquímica absoluta de los centros estereogénicos de la geranina A (169) se estableció como 2C(*S*), 3C(*R*), 4C(*R*), 2F(*R*) y 3F(*S*).

Así, se concluye que el conjunto de las evidencias químicas, espectroscópicas, espectrométricas y quirópticas permiten proponer la estructura epiafzelequina-(4 β ->8, 2 β ->O->7)-afzelequina (Kolodziej et al., 1993) para la geranina A 169.

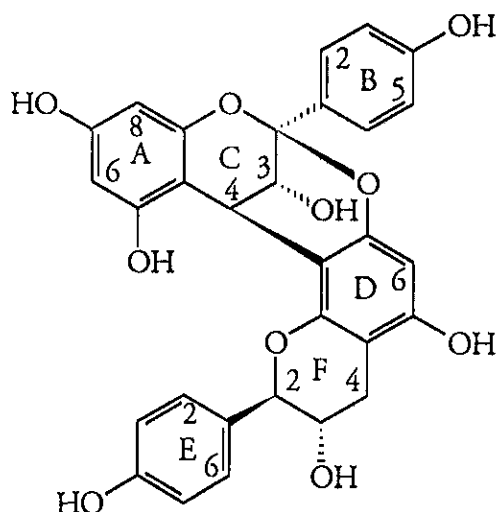
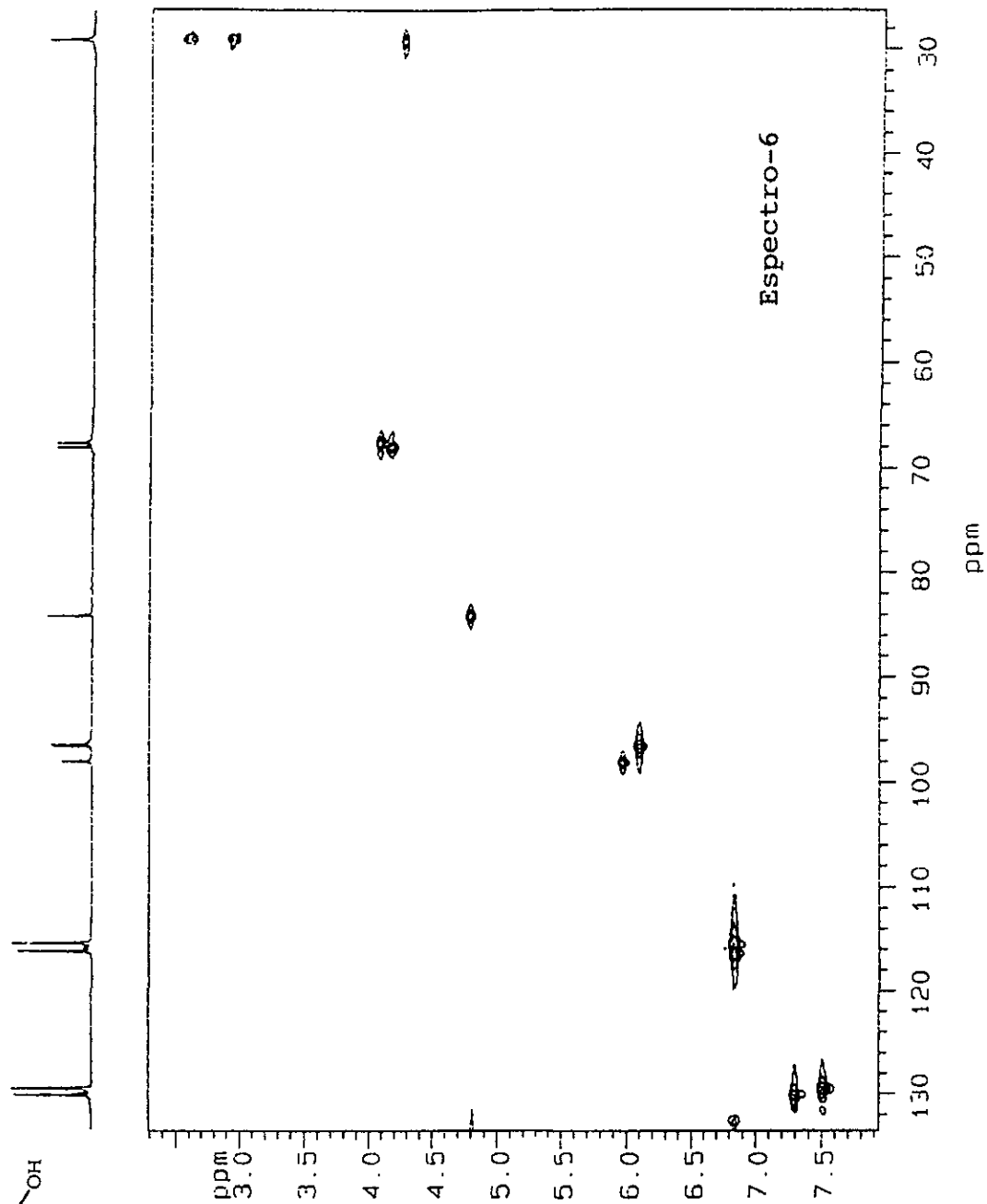
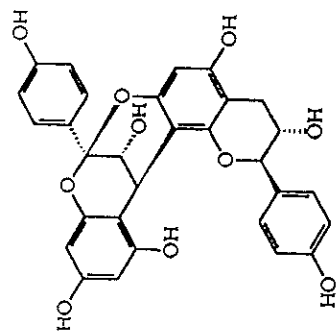
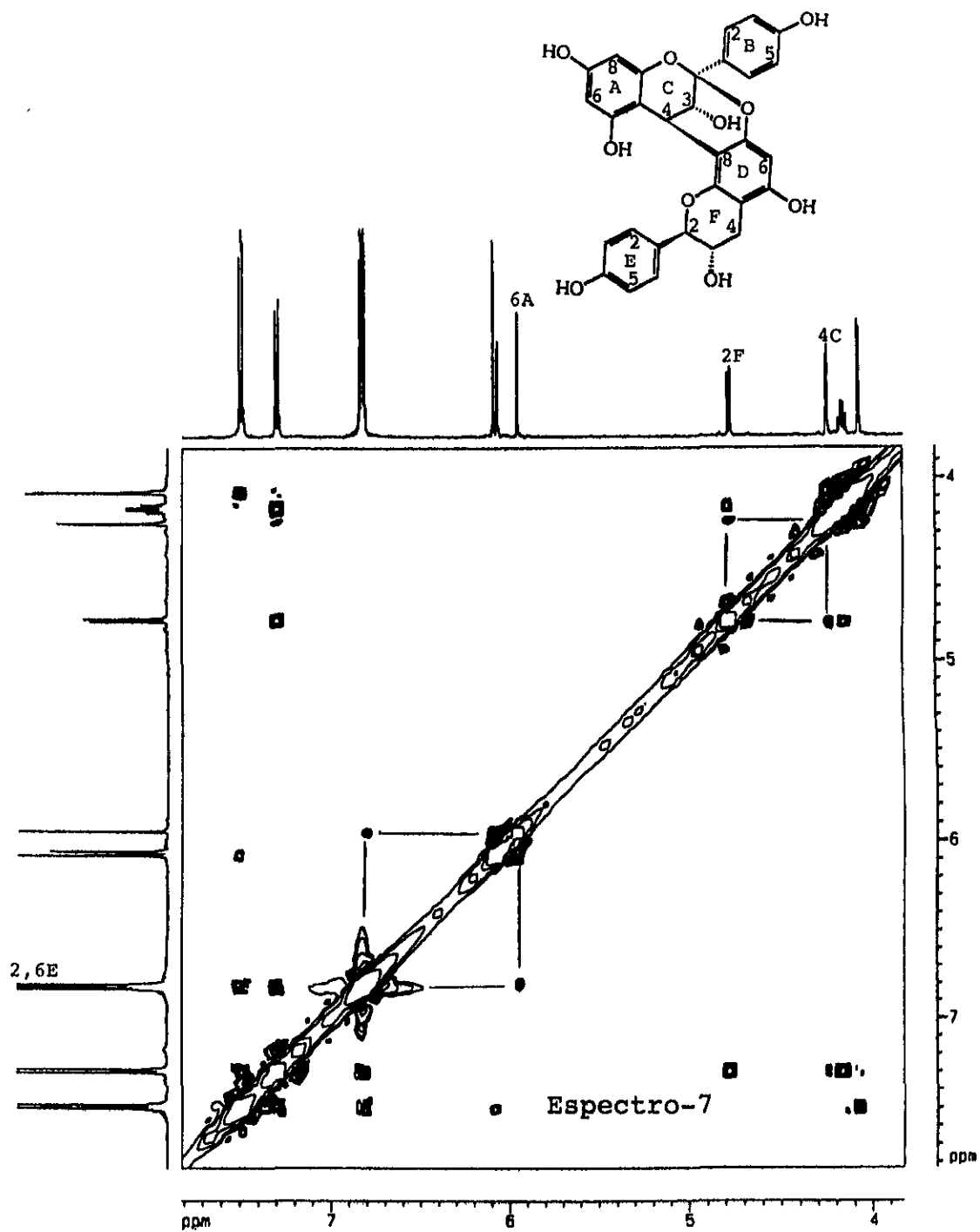
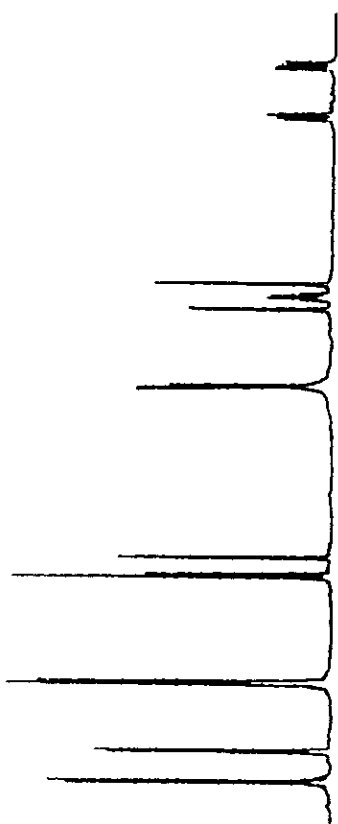
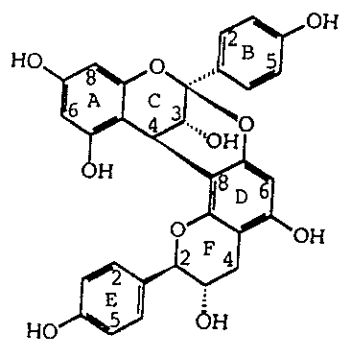


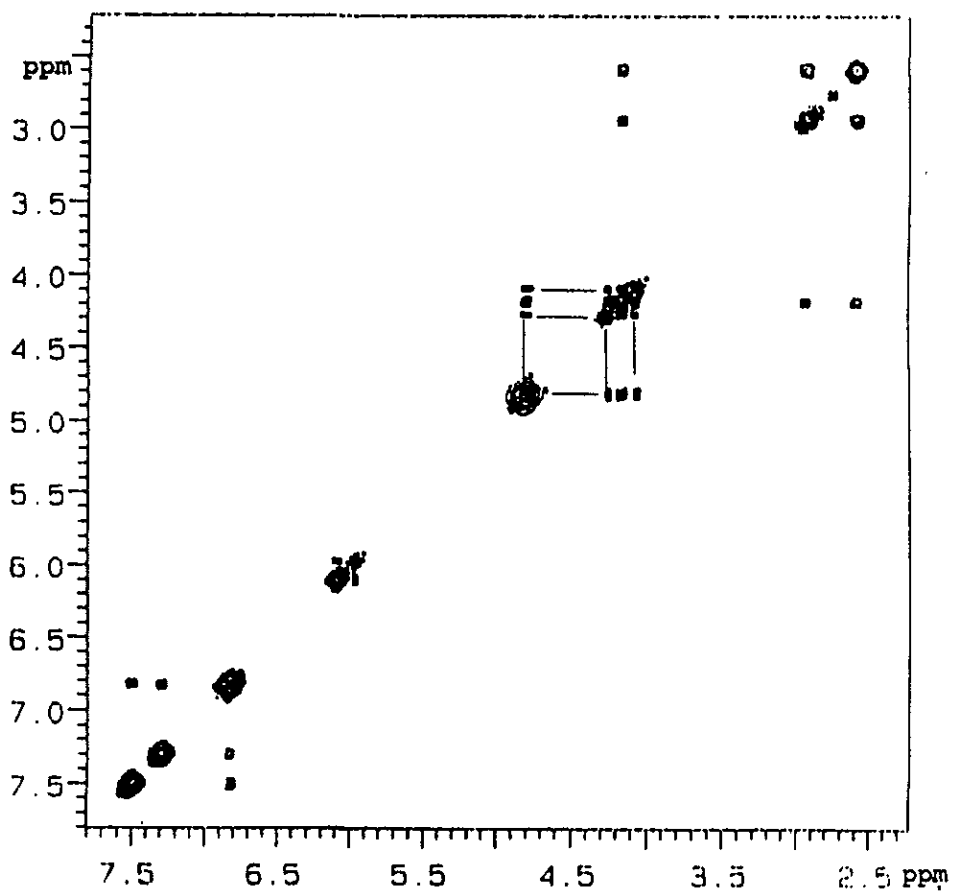
Figura 16. Estructura de la geranina A (169).

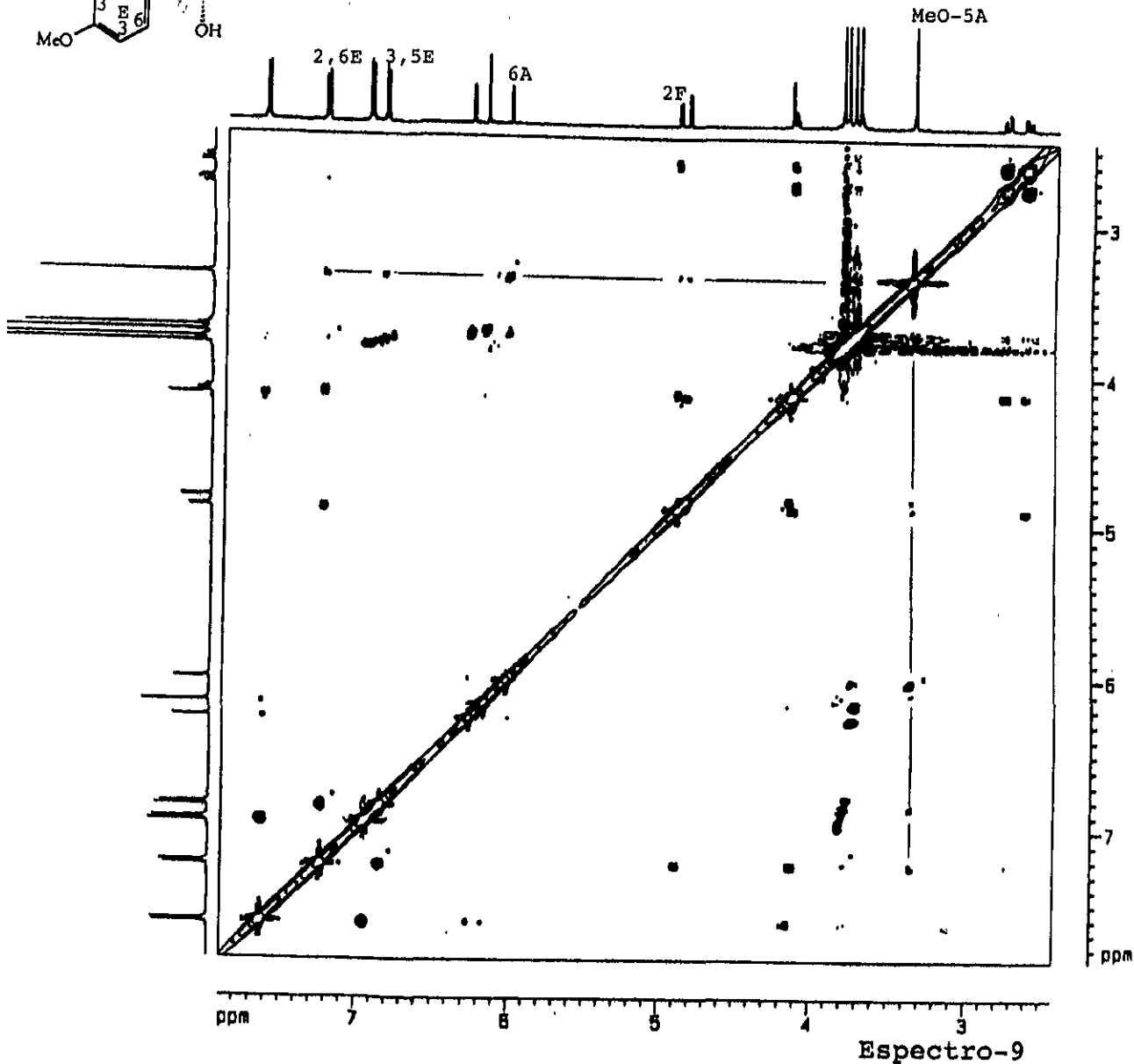
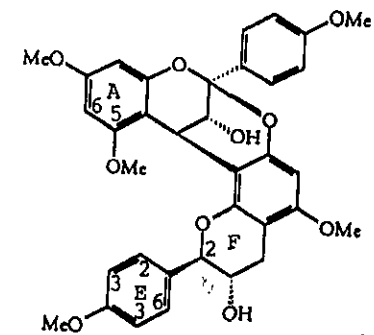


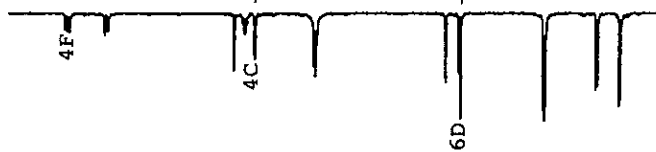
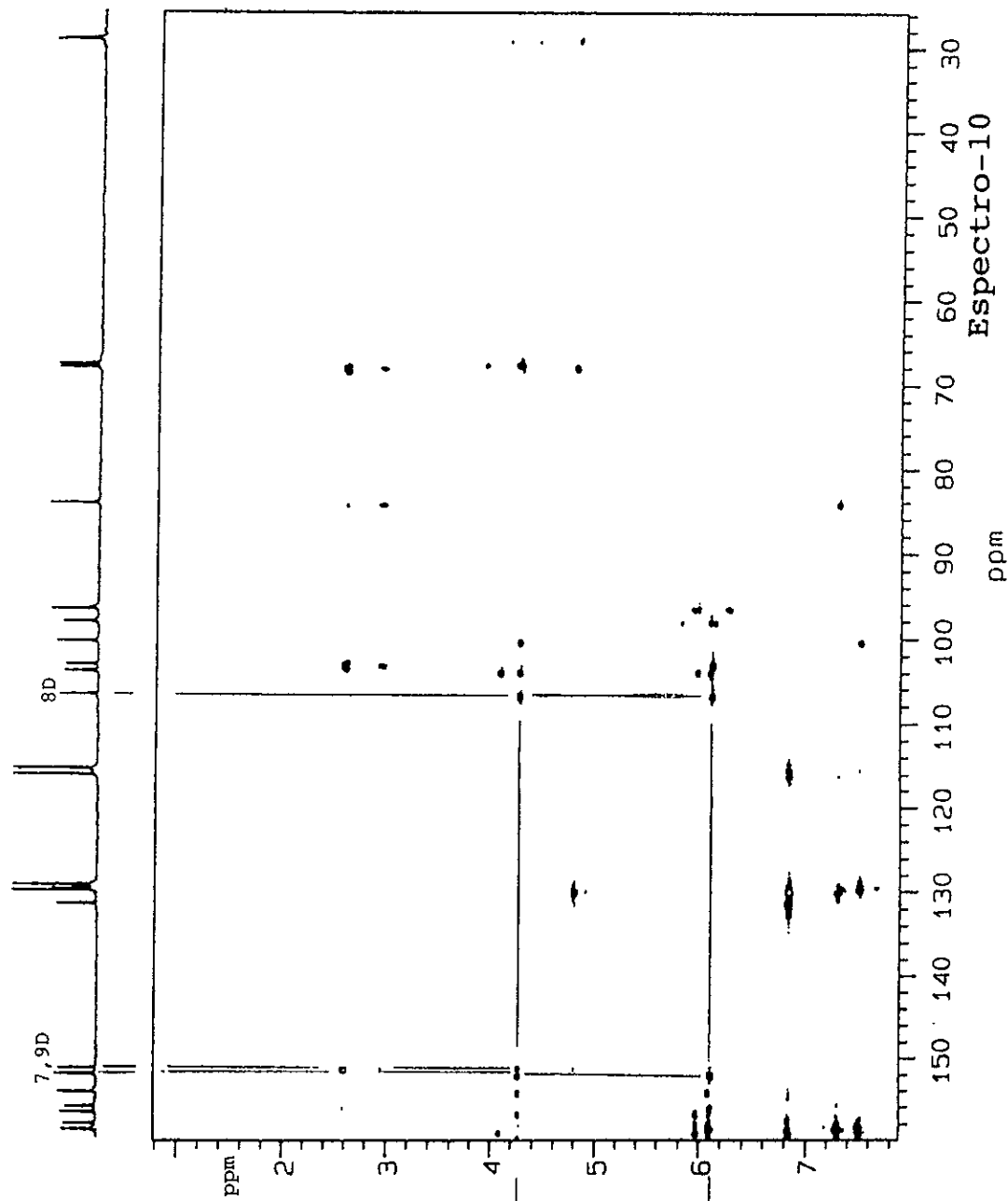
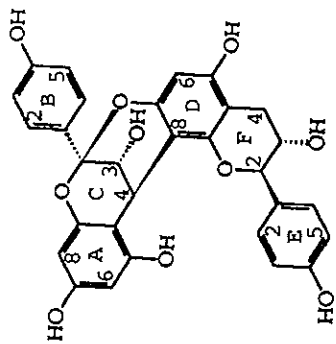


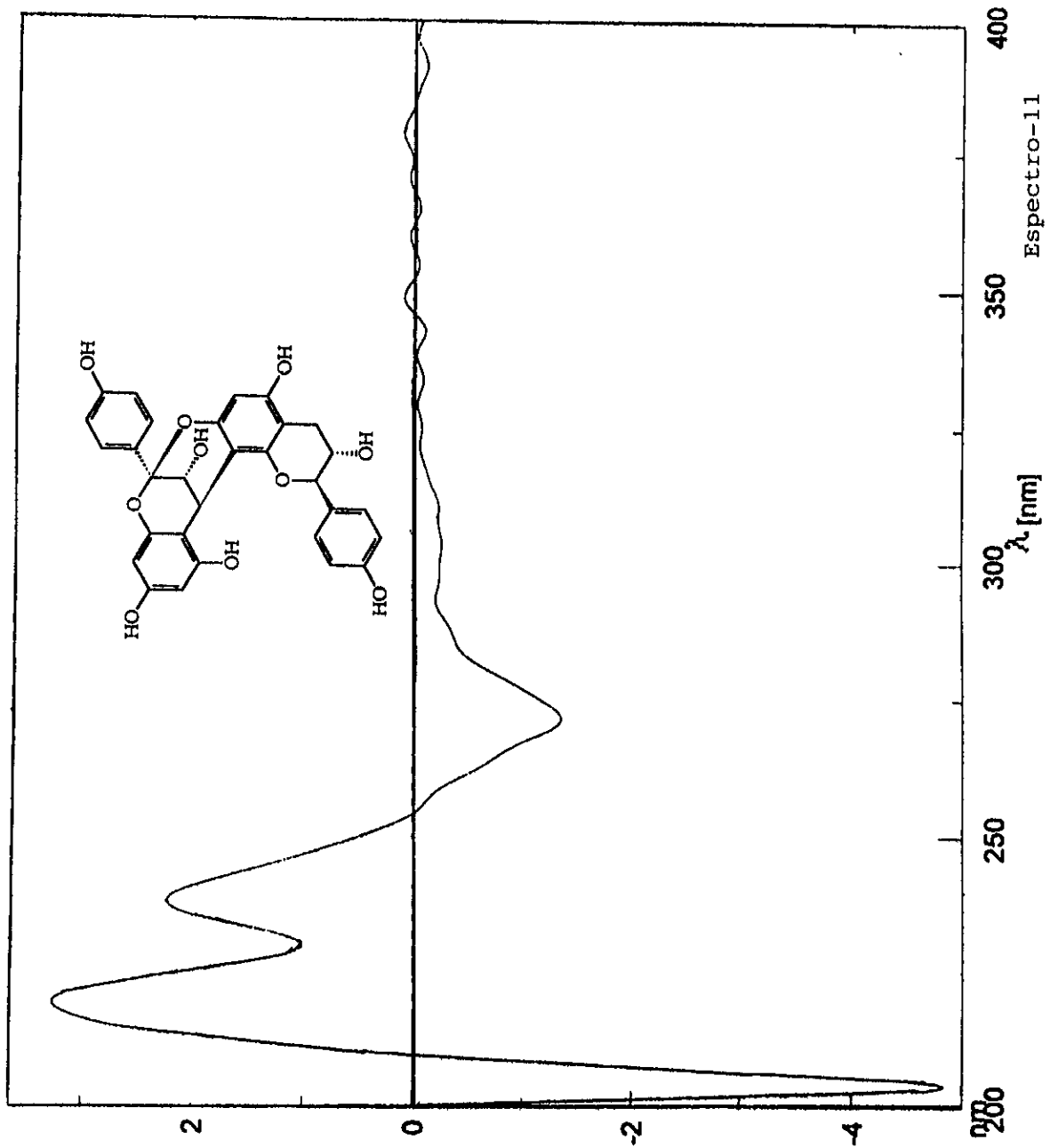


Espectro-8







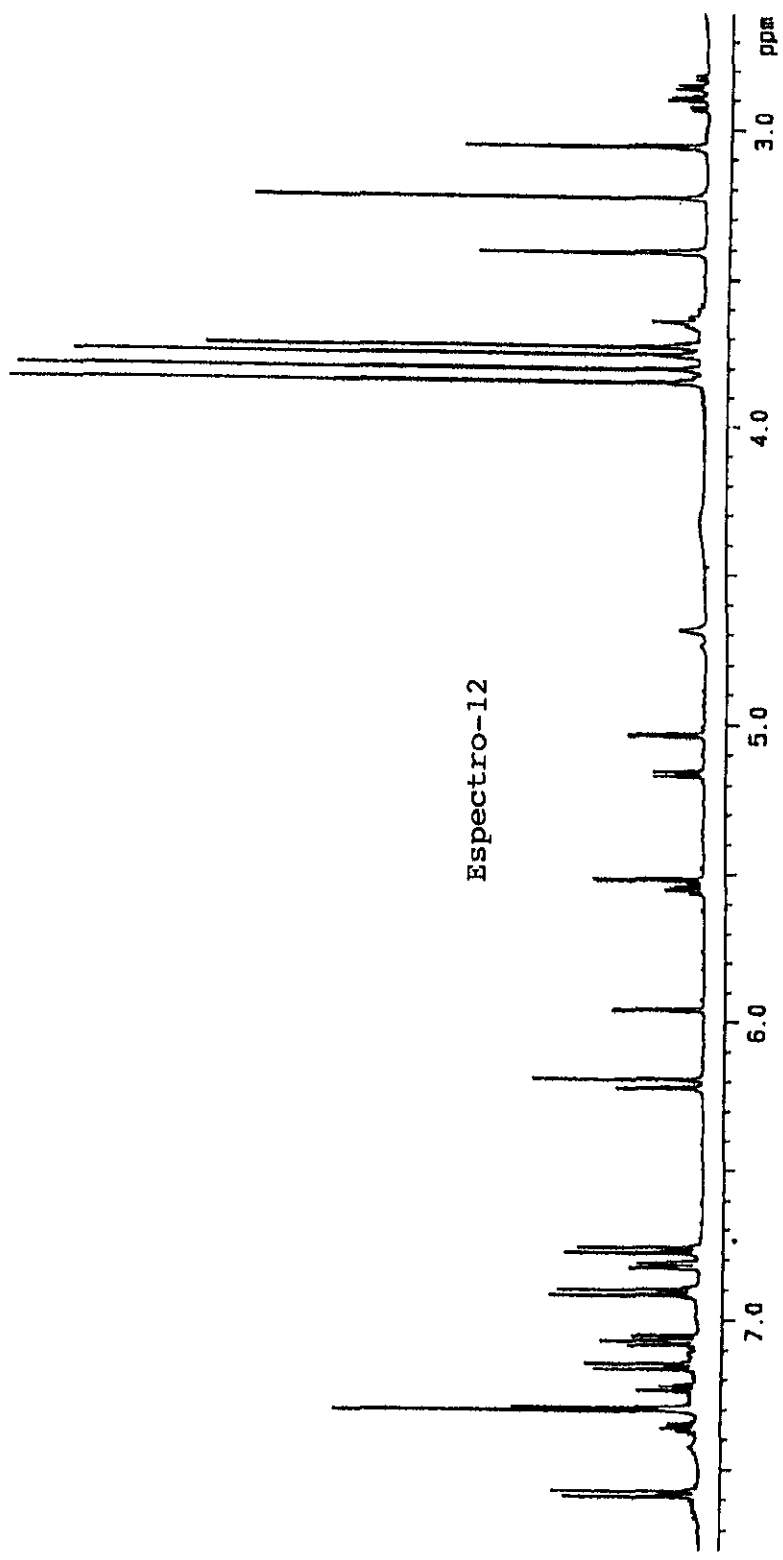
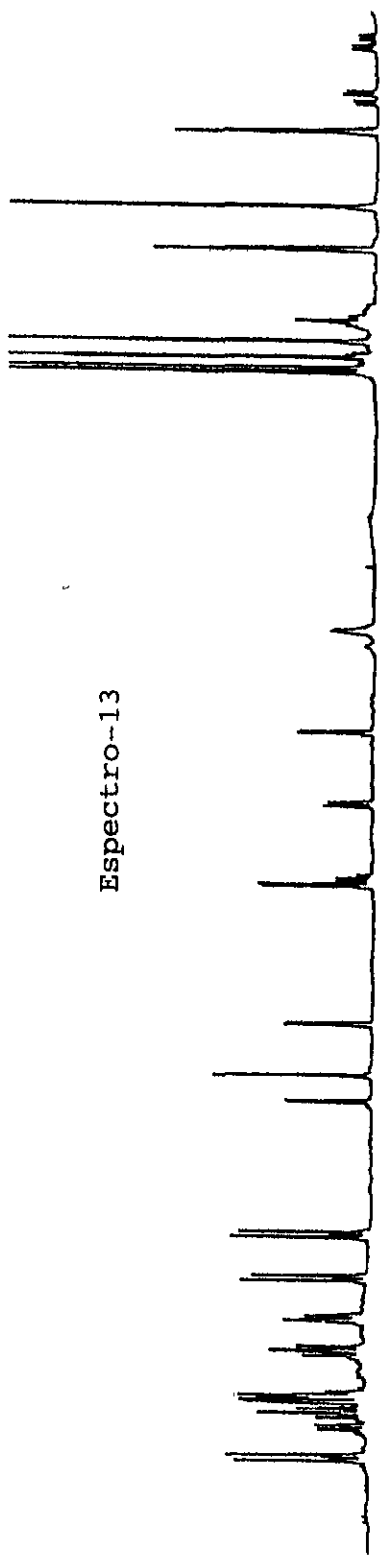


Cuadro 16. Desplazamientos químicos (RMN-¹H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la geranina A 169R y 169S.

Protones	Geranina A (169)			
	(R)-MTPA 169R	(S)-MTPA 169S	$\Delta\delta_{(R-S)}$	Configuración absoluta del carbinol
H-6A	5.96	6.08	-0.12	3C(R)
MeO-5A	3.23	3.26	-0.03	3C(R)
H-2,6B	7.58	7.45	+0.13	3C(R)
H-2F	5.16	5.26	-0.10	3F(S)
H-4 _{ax}	2.84	2.71	+0.13	3F(S)
H-2,6E	7.15	7.25	-0.10	3F(S)
H-3,5E	6.77	6.85	-0.08	3F(S)

CDCl₃, 500MHz.

Con el objeto de obtener información adicional de las propiedades conformacionales de la geranina A (169), se realizaron cálculos de mecánica molecular usando el programa PCMODEL V 6.00.



Los experimentos se realizaron básicamente para determinar la influencia del anillo aromático E y del hidroxilo 3F en la estabilidad conformacional de la geranina A y de esta manera, explicar el valor obtenido en la constante de acoplamiento del protón 2F y el desplazamiento observado para el MeO-5C en el espectro RMN ^1H del derivado **169a**.

Los resultados indicaron la existencia de dos conformeros de máxima estabilidad (**169-dieq** y **169-diax**; Figura 17) con energías mínimas (E_{MMX}) de 45.8 kcal/mol y de 47.1 kcal/mol, respectivamente. Si se considera que $\Delta E_{\text{MMX}} = \Delta G^\circ = 1.3$ kcal/mol y usando la fórmula $\Delta G^\circ = -RT(\ln K)$, el valor de la constante de equilibrio conformacional (K) a 25 °C es de 9. En consecuencia, el conformero **169-diax** sólo contribuye aproximadamente con un 10% en el equilibrio conformacional.

En el caso del derivado pentametilado **169a**, los valores de E_{MMX} para los conformeros más estables (**169a-diax** y **169a-dieq**) son de 63.6 kcal/mol y de 63.1

kcal/mol, respectivamente ($\Delta E_{\text{MMX}} = \Delta G^\circ = .0.5$ kcal/mol; $K = 2.3$). Los valores de E_{MMX} obtenidos son consistentes con un aumento del 30% en el equilibrio conformacional del conformero **169a-diax**. Estos resultados permiten explicar las diferencias en los valores de las constantes de acoplamiento observados para el protón 2F en los espectros RMN ^1H de los compuestos **169** ($J_{2F,3F} = 8.0$ Hz) y **169a** ($J_{2F,3F} = 6.5$ Hz). Los valores de $J_{2F,3F}$ calculados para los conformeros **169a-dieq** y **169a-diax** usando el programa PCMODEL son de 9 y 1.7 Hz, respectivamente. El valor promedio calculado para la constante de acoplamiento en el equilibrio conformacional entre un 70% de **169a-dieq** y 30% de **169a-diax** es de 6.8 Hz, el cual es muy similar al valor experimental obtenidos.

Para explicar el desplazamiento químico a campos más altos del MeO-5C en el compuesto **169a**, se calcularon las distancias interatómicas entre el MeO-5C y el anillo aromático E, en los conformeros **169a-dieq** y

169a-diax. Los resultados demuestran una fuerte protección del anillo aromático E sobre el MeO-5C en ambos confórmeros (Figura 18).

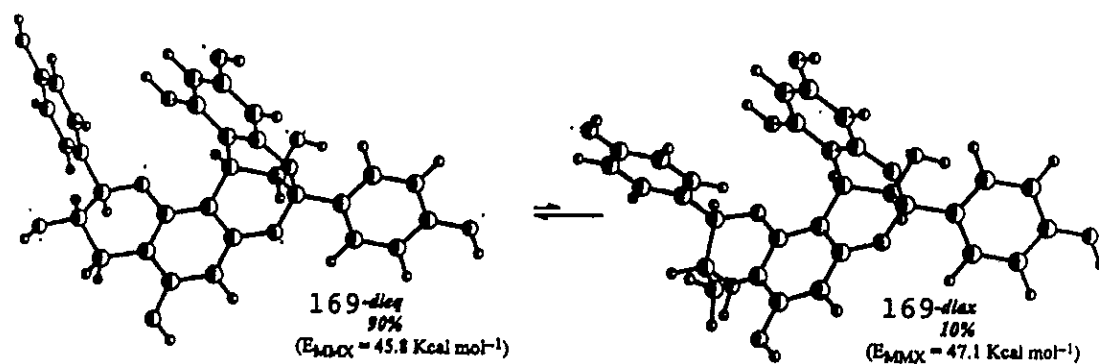


Figura 17. Equilibrio conformacional de 169.

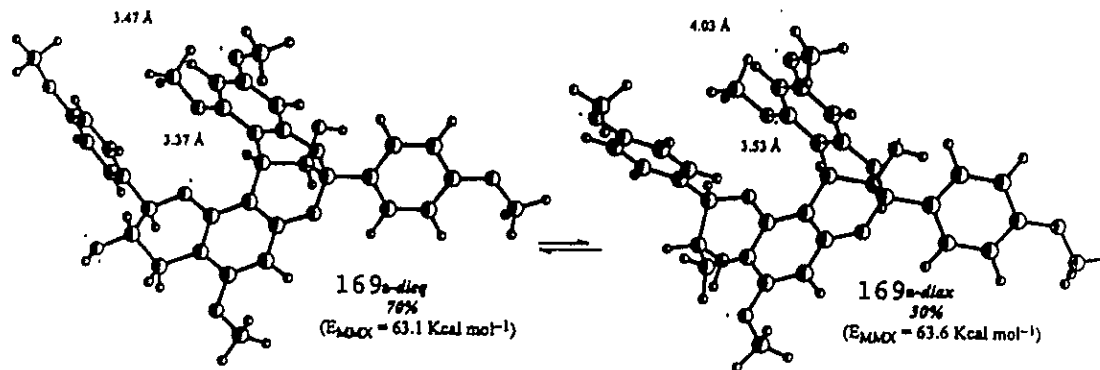


Figura 18. Equilibrio conformacional de 169a.

El mismo análisis se aplicó para los diésteres de Mosher **169R** y **169S** (Figura 19), encontrándose que los residuos de MTPA adoptan una conformación sumamente próxima a la propuesta para los modelos de Mosher (Dale y Mosher, 1973). Así se fundamentan los resultados resumidos en el Cuadro 16.

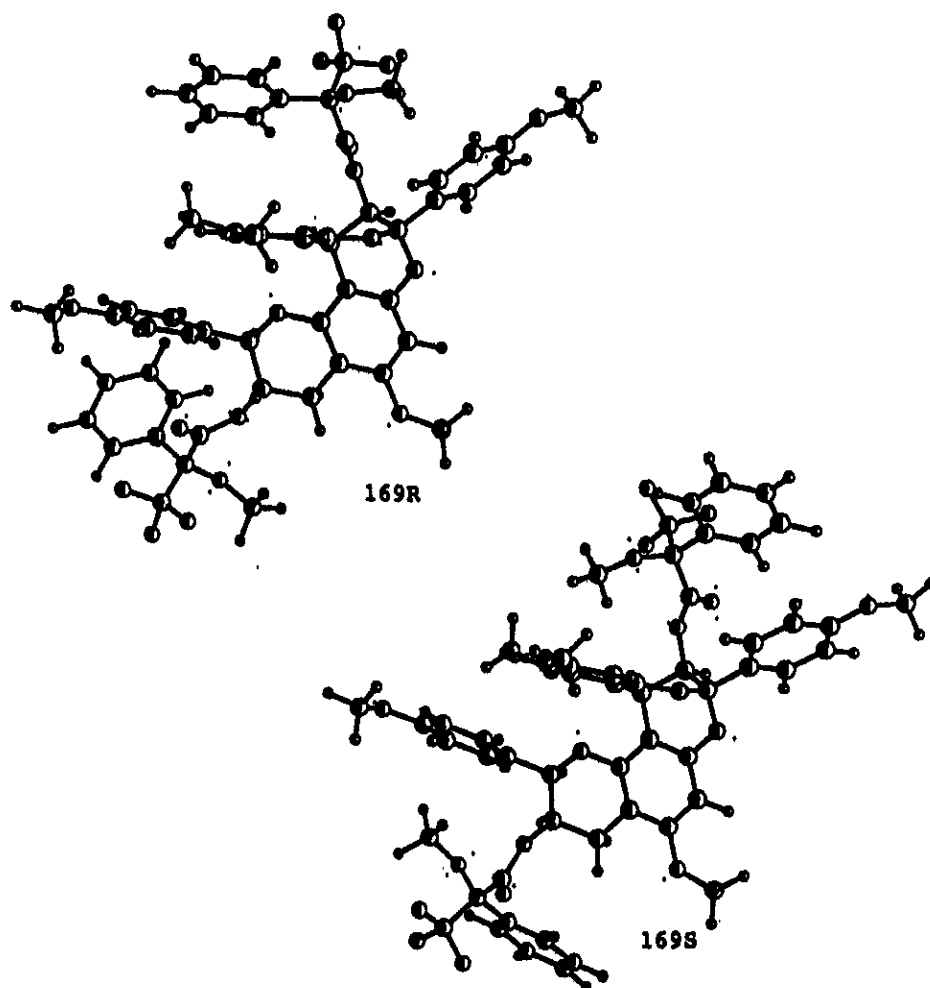


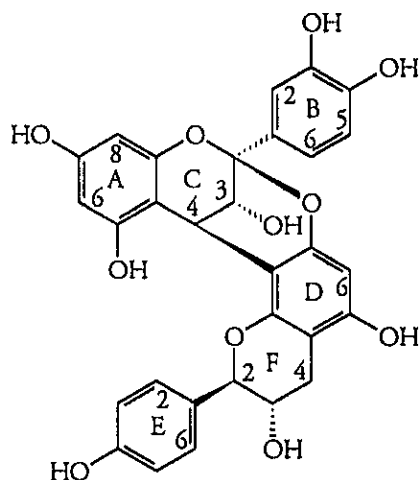
Figura 19. Equilibrio conformacional de **169R** y **169S**.

V.1.1.2 Caracterización estructural de la geranina B (170) y la geranina C (171).

Los compuestos **170** y **171** se obtuvieron como sólidos de color marrón y crema, respectivamente. Sus datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos se resumen en los Cuadros 17 y 18, respectivamente.

Al igual que el compuesto **169**, sus fórmulas moleculares se establecieron como $C_{30}H_{24}O_{11}$ y $C_{30}H_{24}O_{12}$ respectivamente, por espectrometría de masas (FAB⁺). Los espectros de los compuestos **170** y **171** (Espectros 14 y 15) mostraron sus iones moleculares en una m/z de 561 [M+H]⁺ y 577 [M+H]⁺, respectivamente. Estos iones cuasimoleculares detectados resultaron 16 y 32 unidades de masa más grandes que el encontrado para la geranina A (**169**). Estas diferencias en peso son congruentes con la presencia de uno y dos grupos hidroxilos adicionales en las estructuras de **171** y **172**, respectivamente.

Cuadro 17. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la geranina B (170).



Geranina B (170)

p.f. = 230-232 °C

P.M. = 560 uma EM-FAB⁺ (NBA)

F.M. = C₃₀H₂₄O₁₁ calculada por análisis elemental

[α]_D = +18° (c = 0.3 mg/ml, MeOH)

IR ν_{max} (KBr) = 3394, 1613, 1516, 1455, 1230, 963 cm⁻¹

..... (Espectro A-7)

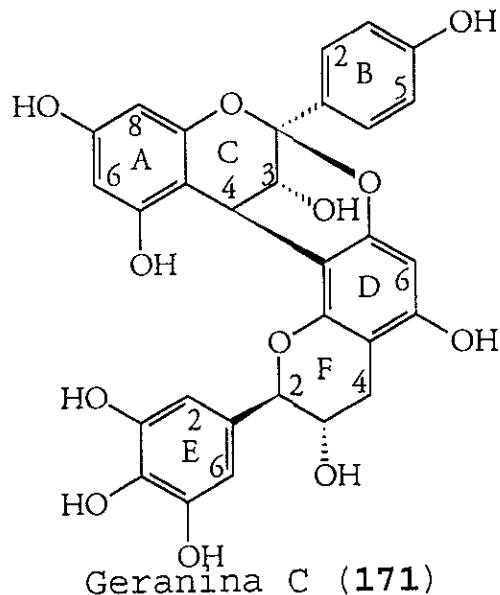
UV (ε) (MeOH) λ_{max} = 205, 258, 274 nm..... (Espectro A-8)

EM-FAB⁺m/z (int.rel) = [M+H] 561 (7.5), 425 (7.85), 271 (38), 154 (100)..... (Espectro 14)

DC (MeOH) Δε(nm) = -2.3 x 10³ (273), 4.74 x 10³ (238), 1.70 x 10³ (221)..... (Espectro 16)

RMN ¹H y ¹³C = Cuadro 19..... (Espectros 18 y 20)

Cuadro 18. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la geranina C (171).



P.M. = 576 uma EM-FAB⁺ (NBA)

F.M. = C₃₀H₂₄O₁₂ calculada por análisis elemental

[α]_D = +40° (c = 0.3 mg/ml, MeOH)

IR ν_{max} (KBr) = 3394, 1614, 1516, 1456, 1230, 964 cm⁻¹

..... (Espectro A-9)

UV (ε) (MeOH) λ_{max} = 204.5, 259.5, 274 nm... (Espectro A-10)

EM-FAB⁺ m/z (int. rel) = [M+H] 577 (5.0), 329 (20), 271 (34), 154 (100)..... (Espectro 15)

DC (MeOH) Δε (nm) = -1.31 x 10³ (272), 2.47 x 10³ (238), 3.80 x 10³ (220), -5.65 x 10³ (204.6)..... (Espectro 17)

RMN ¹H y ¹³C = Cuadro 19..... (Espectros 19 y 21)

La obtención de los derivados hexametilado **171a** (Espectro A-11) y heptametilado **172a** (Espectro A-12), al tratar a los compuestos **171** y **172** con sulfato de dimetilo demostró la presencia de seis y siete hidroxilos fenólicos, respectivamente.

Los espectros de DC (Espectros 16 y 17) de ambas proantocianidinas también mostraron un efecto Cotton positivo cerca de 220 nm, indicando de esta manera que la configuración absoluta en los carbonos 4C y 2C eran igual a la de la geranina A (**169**).

Los espectros de RMN unidimensionales (Espectros 18-21) y bidimensionales (A-13/A-16) de los compuestos **170** y **171**, respectivamente; fueron muy similares a los obtenidos para **169** (Cuadro 19), en congruencia con una estructura proantocianidina subtipo A-1. Las principales diferencias observadas en los espectros unidimensionales de la geranina A y aquellas de **170** y **171** son las siguientes:

a) En el caso de la geranina B, la diferencia se observa en las señales correspondientes al anillo aromático B. En lugar del sistema A_2B_2 correspondientes a los hidrógenos del anillo B, el espectro de RMN de la geranina B presenta un sistema ABX [en δ_H 7.12, 7.0 y 6.79], congruentes con un anillo aromático trisustituido.

b) En el caso de la geranina C, la diferencia se observa en las señales correspondientes al anillo aromático E. En lugar del sistema A_2B_2 presente en el espectro de **169**, la región aromática del espectro de RMN de la geranina C presenta un singulete que integra para dos hidrógenos en δ_H 6.90. Esta diferencia indica que el anillo E es tetrasustituido en la geranina C.

El análisis de los espectros de HMQC (Espectro 22 y 23) y HMBC (24 y 25) permitió comprobar la localización de los anillos trisustituido y tetrasustituido en la estructura de los compuestos **170** y **171**, respectivamente.

La estereoquímica absoluta de los centros esterogénicos 3C y 3F se determinó al igual que en el caso de 169, mediante el análisis de los espectros de RMN ^1H (Espectros 26-29), (Cuadros 20 y 21) de los diésteres de Mosher (170R, 170S, 171R y 171S) obtenidos a partir de los permetil derivados de 170 y 171.

Para el compuesto 170 el valor positivo ($\Delta\delta_{R-S}$) obtenido para H-5B ($\Delta\delta_{R-S} = +0.09$) y el valor negativo calculado ($\Delta\delta_{R-S}$) para H-6A ($\Delta\delta_{R-S} = -0.12$), indicaron una estereoquímica R para el centro quiral C-3C. En el caso de carbono 3F la estereoquímica se estableció como S considerando la diferencia positiva obtenida para H-4F_{ax} ($\Delta\delta_{R-S} = +0.13$) y las diferencias negativas calculadas para H-2F ($\Delta\delta_{R-S} = -0.02$) y H-2,6E ($\Delta\delta_{R-S} = -0.12$). En consecuencia la estereoquímica para C-2C y C-2F se asignó como S y R respectivamente, siguiendo el mismo razonamiento que para 169.

Cuadro 19 Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de las geraninas B y C (170 y 171).

Posición	Geranina B (170)		Geranina C (171)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2C	-	100.33	-	100.45
3	4.08 d (3.5)	67.82	4.06 d (3.5)	67.51
4	4.25 d (3.5)	29.22	4.23 d (3.5)	29.22
5A	-	156.77	-	156.77
6	5.94 d (2.5)	98.11	5.94 d (2.2)	98.11
7	-	158.89	-	158.79
8	6.06 d (2.5)	96.58	6.06 d (2.2)	96.58
9	-	154.24	-	154.00
10	-	104.02	-	104.02
1B	-	132.28	-	131.70
2	7.12 d (1.85)	115.52	7.49 d (8.6)	129.48
3	-	145.63	6.80 d (8.6)	115.52
4	-	146.77	-	158.79
5	6.79 d (8.25)	115.61	6.80 d (8.6)	115.52
6	7.0 dd (8.25, 1.85)	119.83	7.49 d (8.6)	129.48
2F	4.80 (8.0)	84.30	4.72 d (7.8)	84.49
3	4.16 ddd (5.6, 8.0, 8.4)	68.10	4.15 ddd (5.7, 7.8, 8.3)	68.10
4a	2.57 dd (8.4, 16.4)	29.22	2.57 dd (8.3, 16.4)	29.22
4b	2.93 dd (5.6, 16.4)	29.22	2.93 dd (5.7, 16.4)	29.22
5D	-	156.12	-	156.12
6	6.08 s	96.58	6.08 s	96.58
7	-	152.18	-	152.18
8	-	106.82	-	106.82
9	-	151.44	-	151.44
10	-	103.19	-	103.20
1E	-	129.91	-	130.56
2	7.29 d (8.4)	130.13	6.90 s	115.61
3	6.81 d (8.4)	116.29	-	146.77
4	-	158.79	-	158.89
5	6.81 d (8.4)	116.29	-	146.77
6	7.29 d (8.4)	130.13	6.90 s	115.61

*MeOH- d_6 , ^1H [500 MHz (J en Hz)], ^{13}C (125 MHz).

Con base en las evidencias discutidas, la estructura para la geranina B (170) se determinó como *epi*-catequina-(4 β ->8, 2 β ->O->7)-afzelequina.

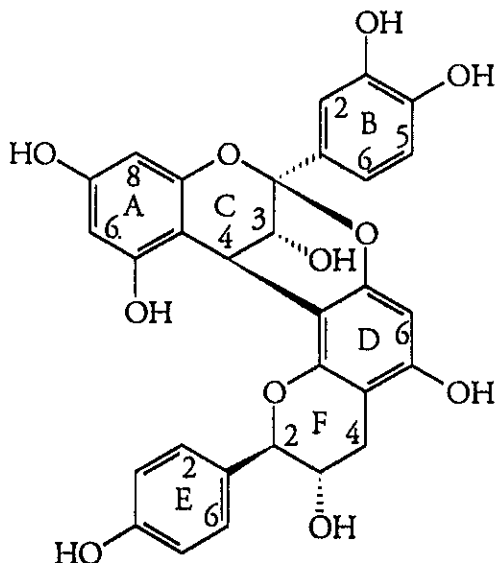


Figura 20. Estructura de la geranina B.

En el caso del compuesto 171 los valores positivos ($\Delta\delta_{R-S}$) obtenidos para H-2,6B ($\Delta\delta_{R-S}= +0.12$) y los valores negativos calculados ($\Delta\delta_{R-S}$) para H-6A ($\Delta\delta_{R-S}= -0.11$) y MeO-5A ($\Delta\delta_{R-S}= -0.04$), indicaron una estereoquímica R para el centro quiral C-3C y en consecuencia la estereoquímica de C-2C se asignó como S. En el caso de carbono 3F la estereoquímica se estableció como S

considerando la diferencia positiva obtenida para H-4F_{ax} ($\Delta\delta_{R-S} = +0.12$) y la diferencia negativa calculada para H-2F ($\Delta\delta_{R-S} = -0.03$). Así, la estereoquímica absoluta de C-2F se estableció como R, siguiendo el mismo razonamiento que para **169**.

Con base en las evidencias discutidas, la estructura para la geranina C (**171**) se determinó como *epi*-afzelequina-(4 β ->8, 2 β ->O->7)-galocatequina.

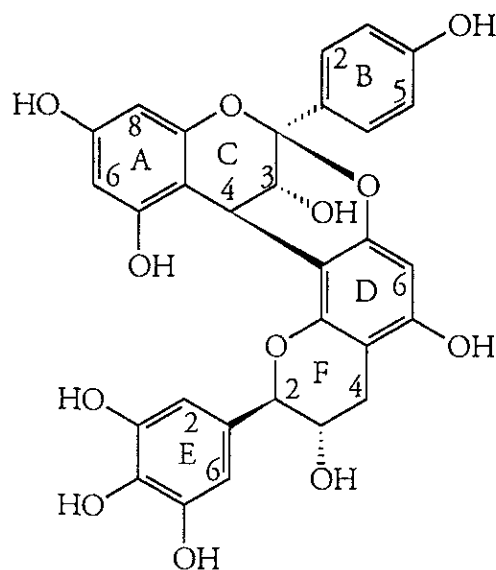


Figura 21. Estructura de la geranina C.

Cuadro 20. Desplazamientos químicos (RMN-¹H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la geranina B **170R** y **170S**.

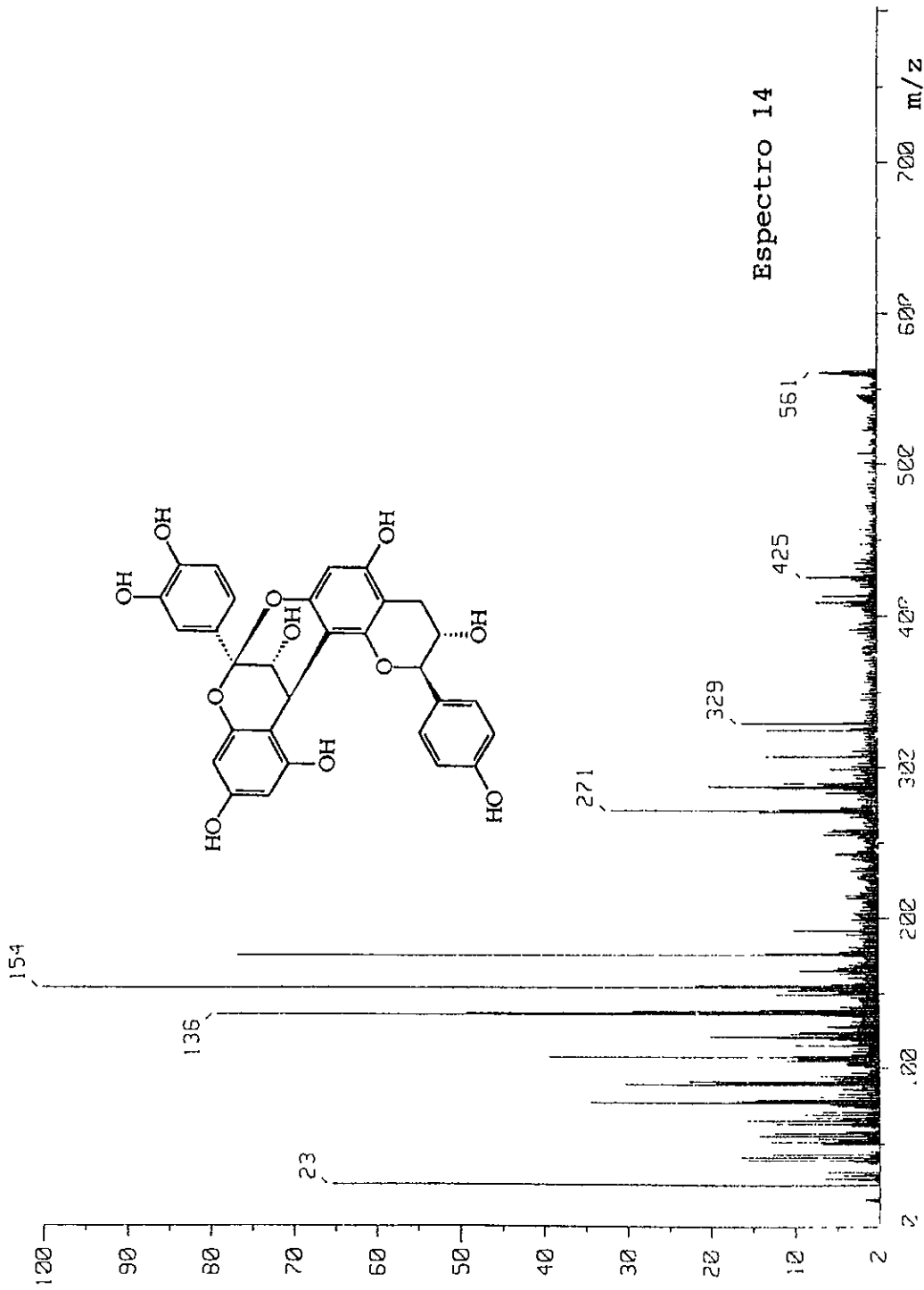
Protones	Geranina B (170)			
	(R)-MTPA 170R	(S)-MTPA 170S	$\Delta\delta$ (R-S)	Configuración absoluta del carbinol
H-6A	5.97	6.09	-0.12	3C(R)
MeO-5A	3.34	3.35	-0.01	3C(R)
H-5B	6.89	6.80	+0.09	3C(R)
H-2F	5.03	5.05	-0.02	3F(S)
H-4 _{ax}	2.97	2.83	+0.15	3F(S)
H-2, 6E	7.26	7.38	-0.12	3F(S)
H-3, 5E	6.84	6.93	-0.09	3F(S)

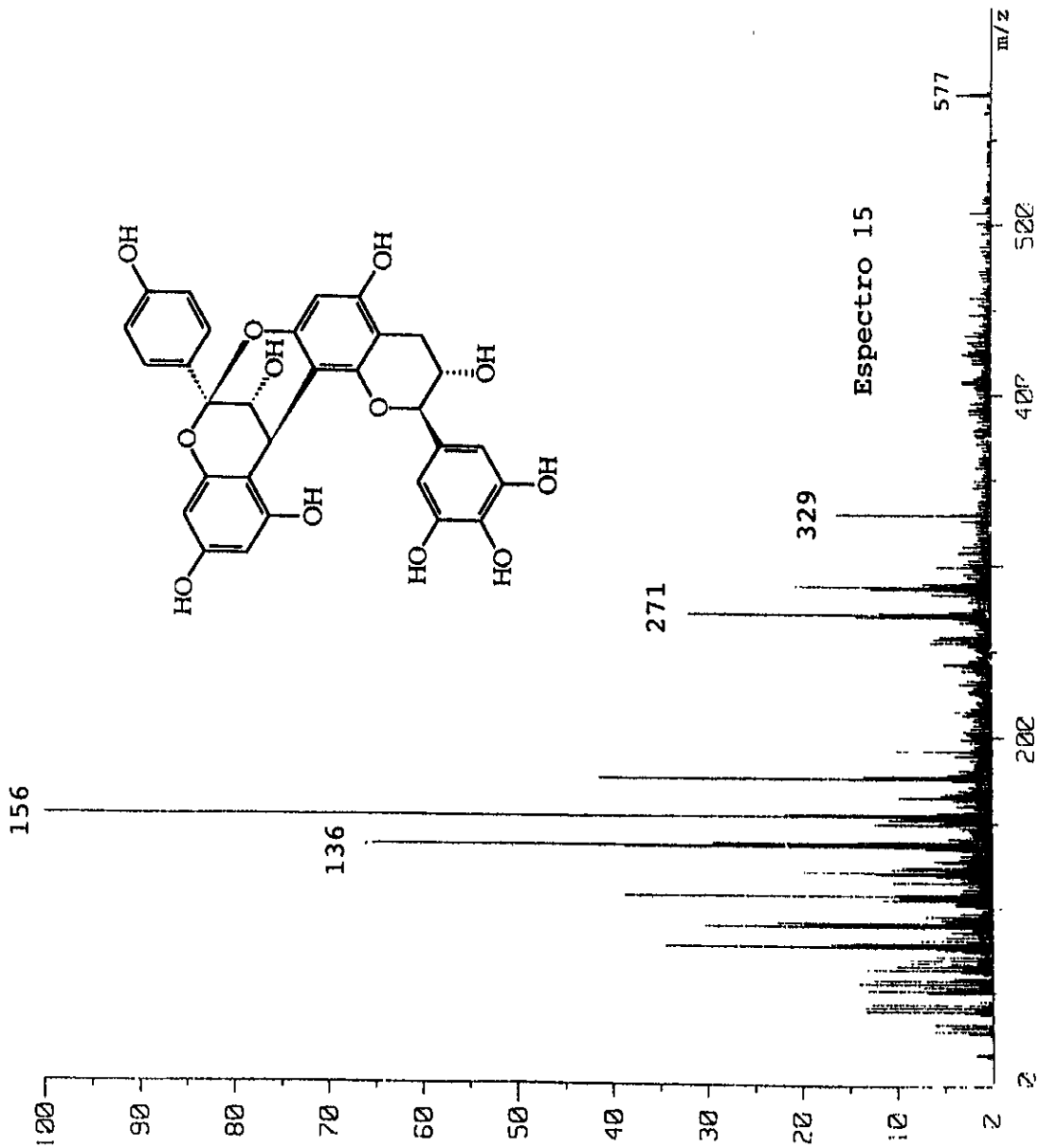
CDCl₃, 500MHz.

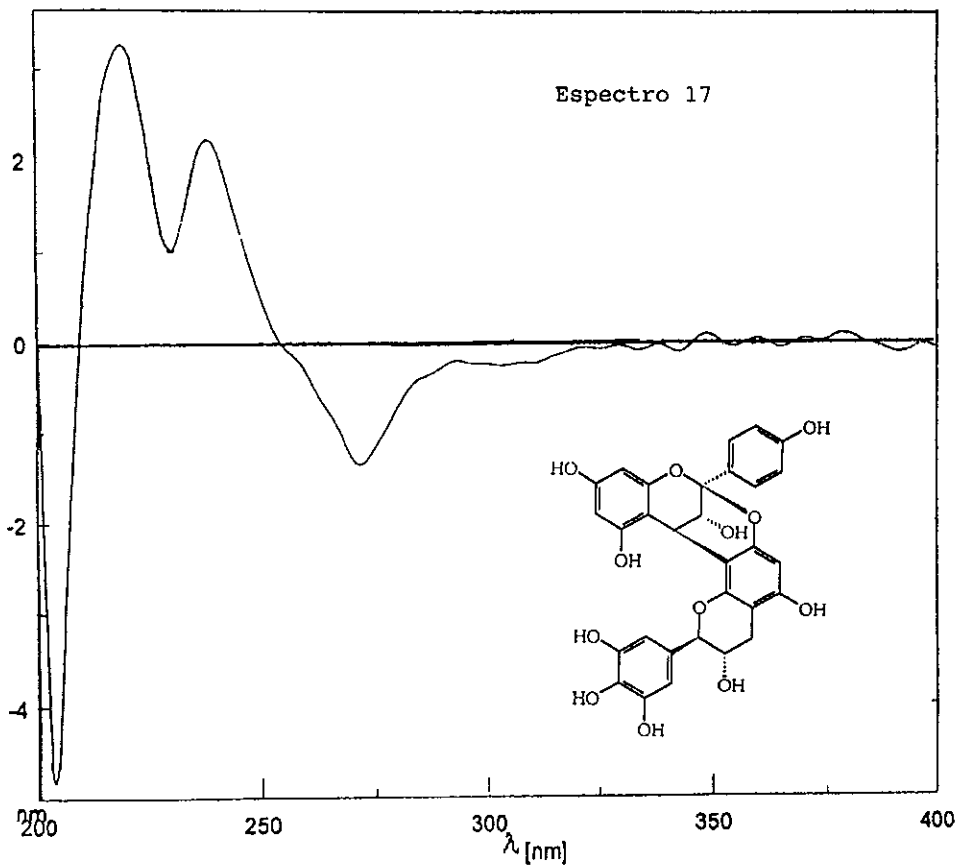
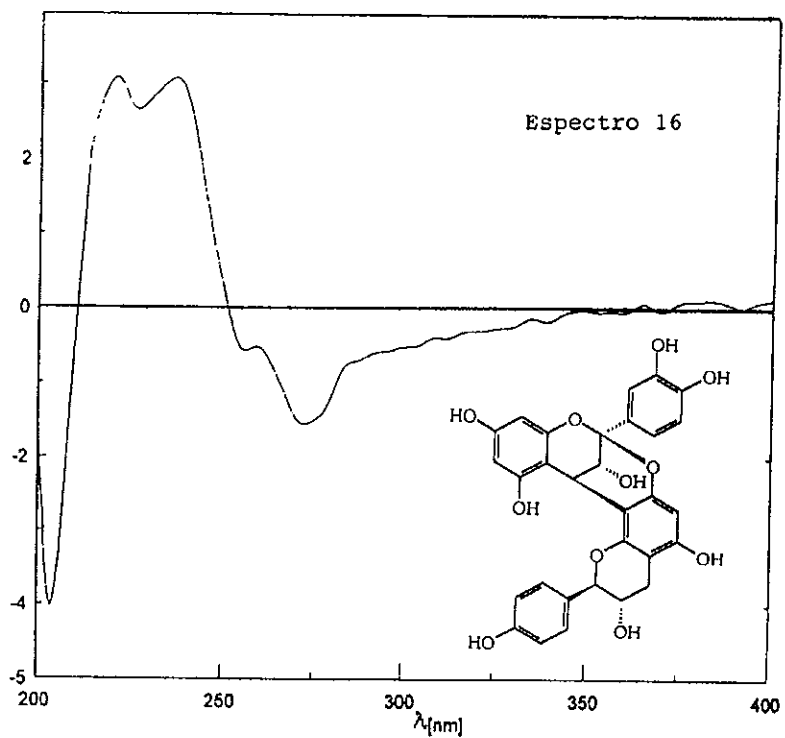
Cuadro 21. Desplazamientos químicos (RMN-¹H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la geranina C **171R** y **171S**.

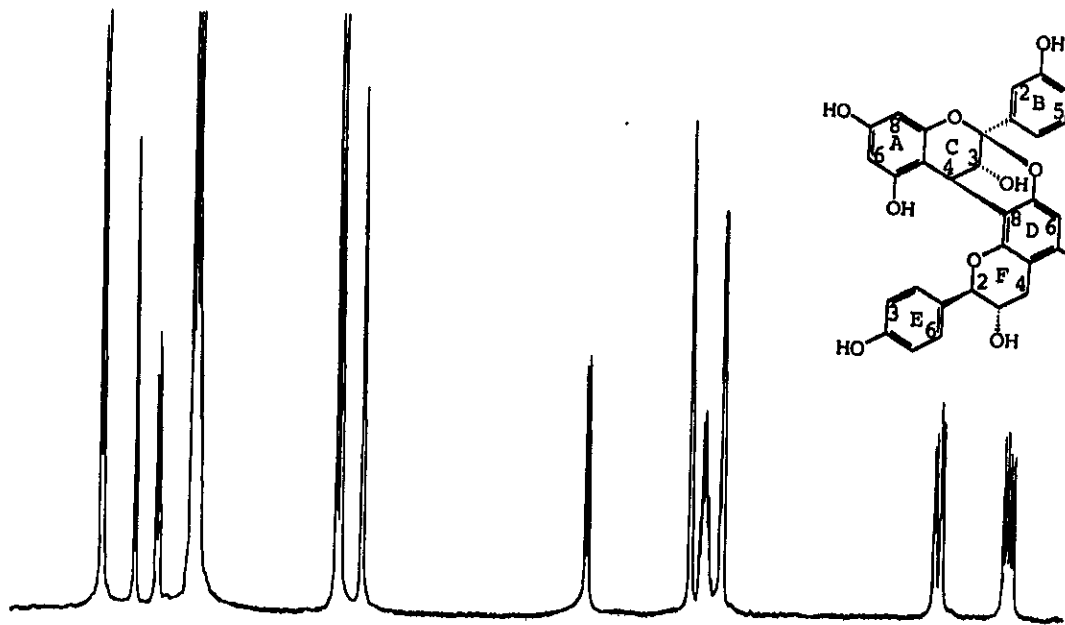
Protones	Geranina C (171)			
	(R)-MTPA 171R	(S)-MTPA 171S	$\Delta\delta$ (R-S)	Configuración absoluta del carbinol
H-6A	5.95	6.06	-0.11	3C(R)
MeO-5A	3.28	3.24	-0.04	3C(R)
H-2, 6B	7.57	7.45	+0.12	3C(R)
H-2F	5.02	5.05	-0.03	3F(S)
H-4 _{ax}	2.95	2.83	+0.12	3F(S)

CDCl₃, 500MHz.

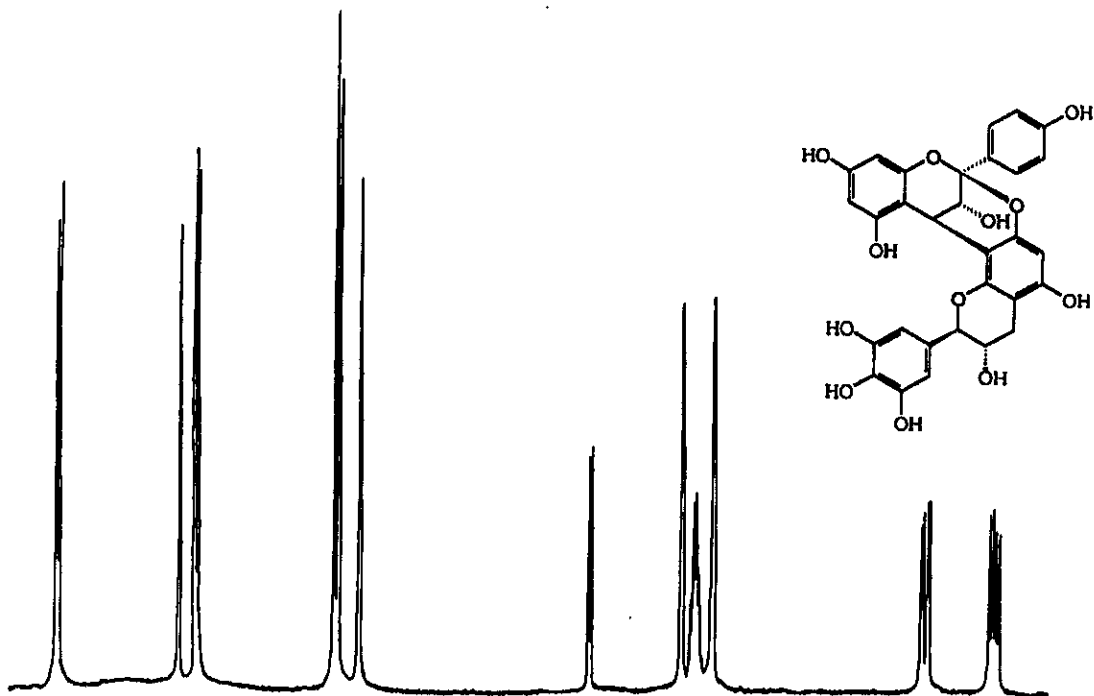
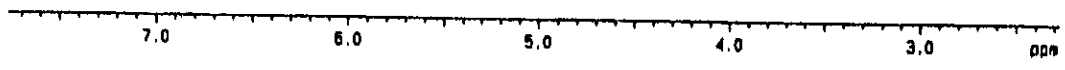




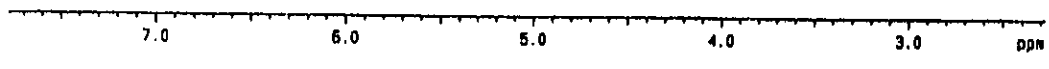


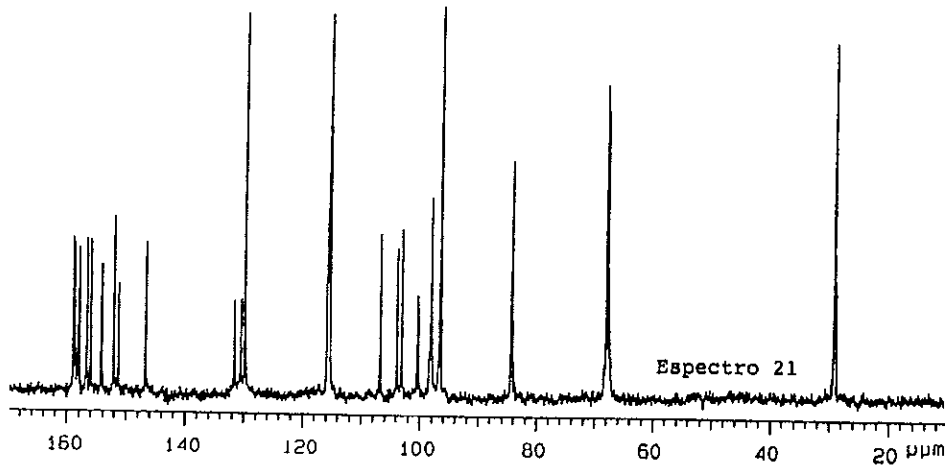
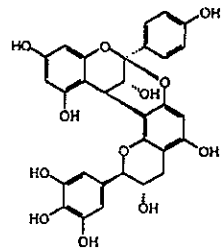
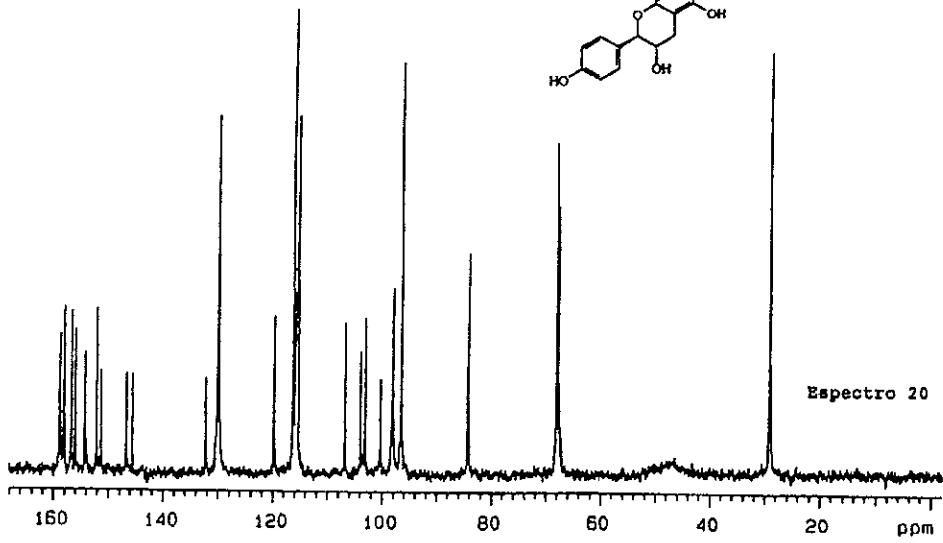
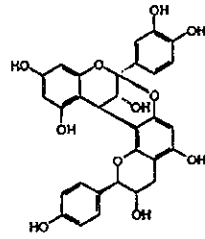


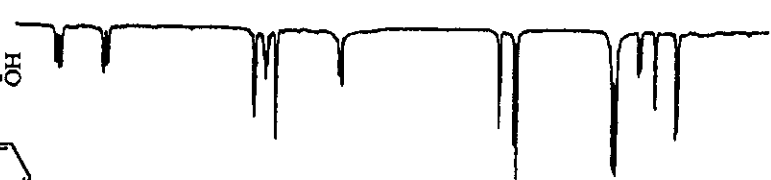
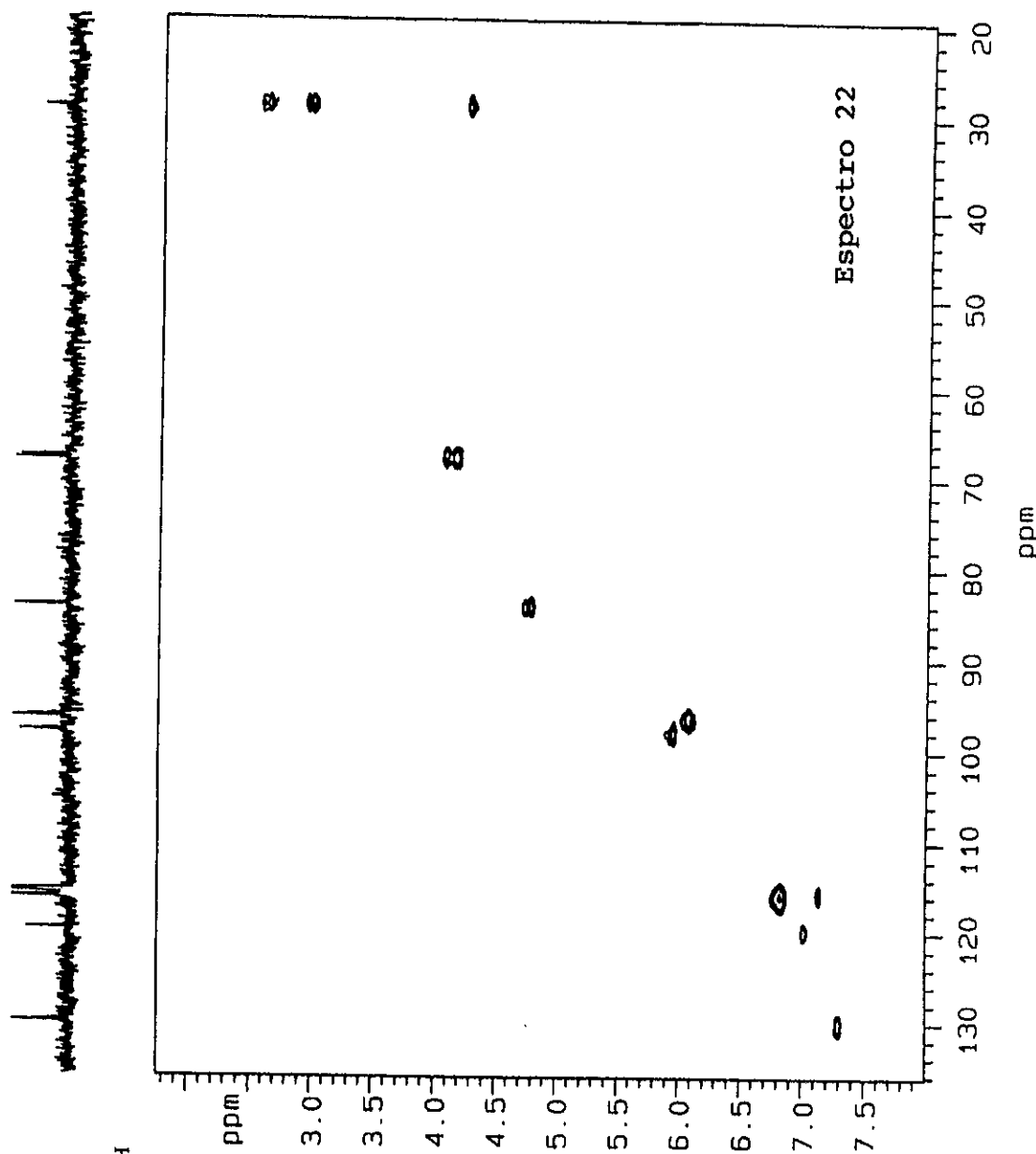
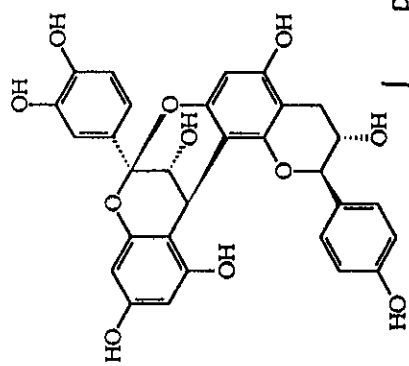
Espectro 18

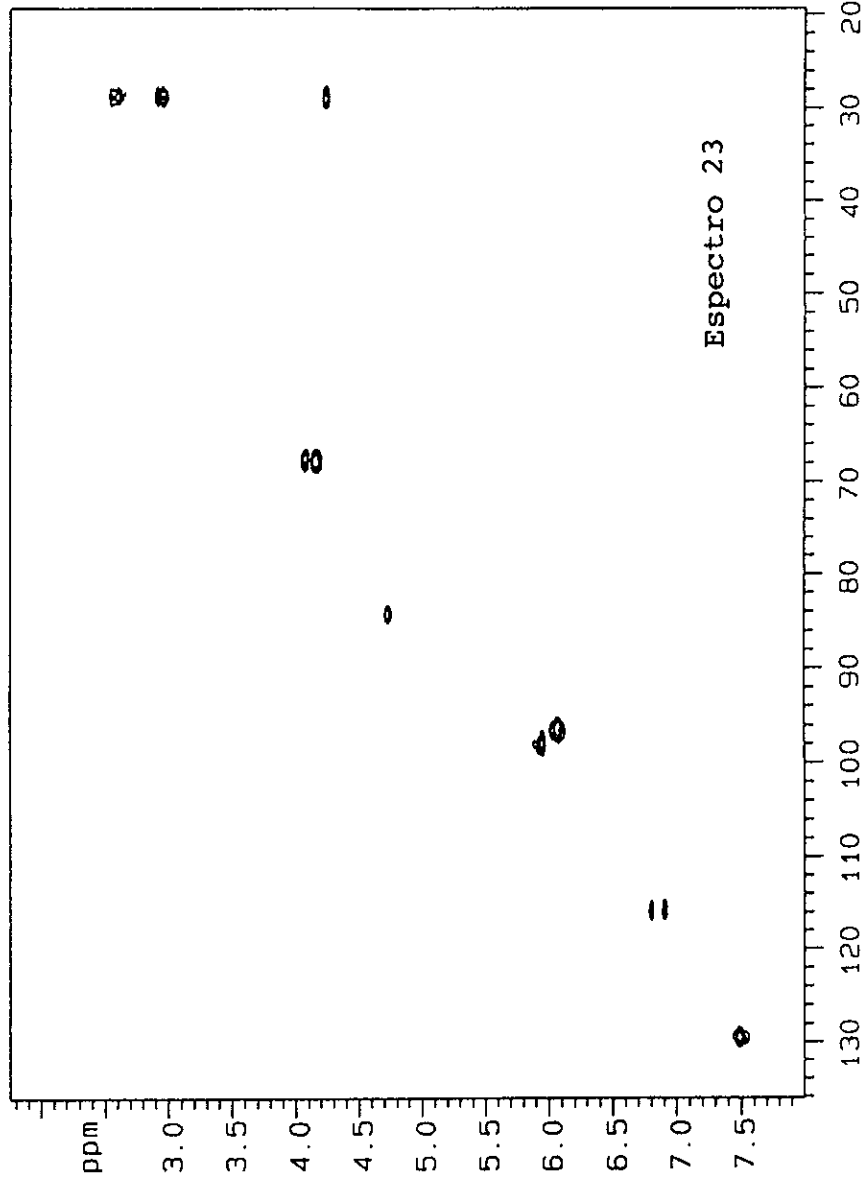
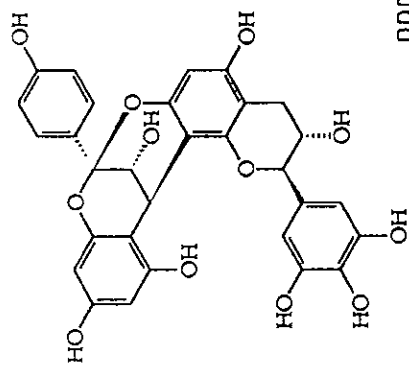


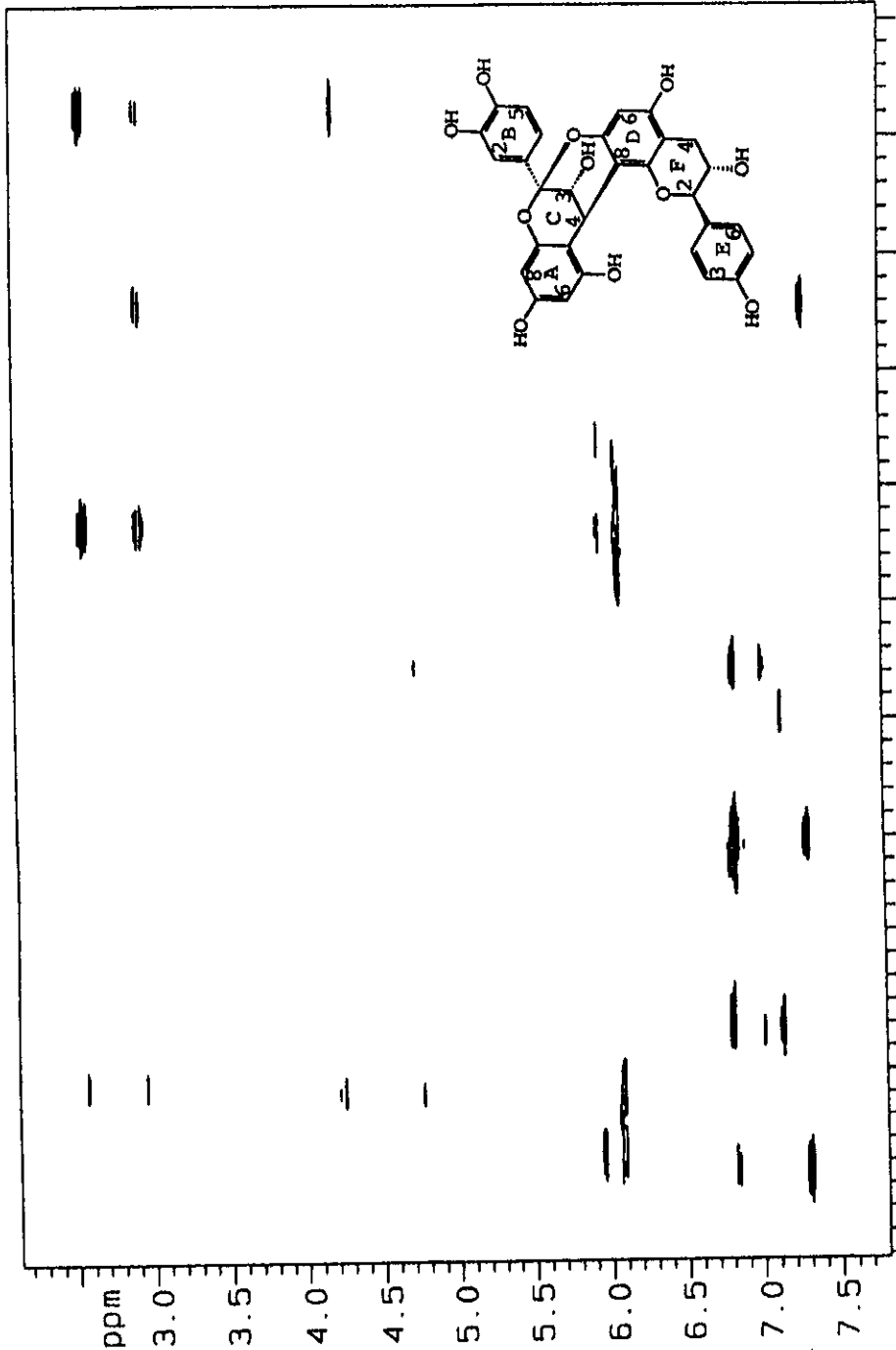
Espectro 19



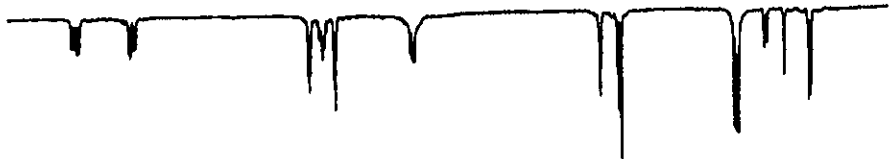


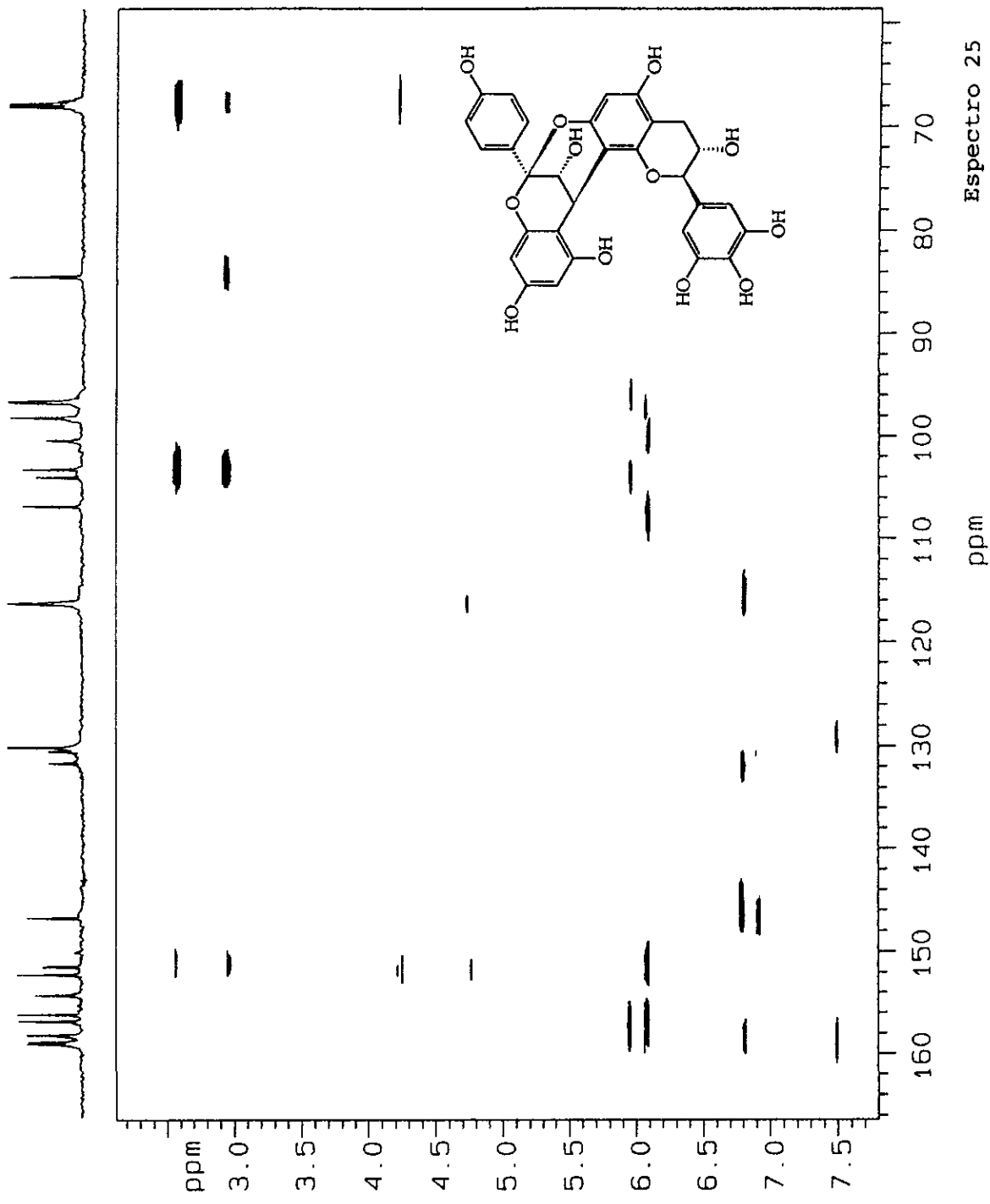






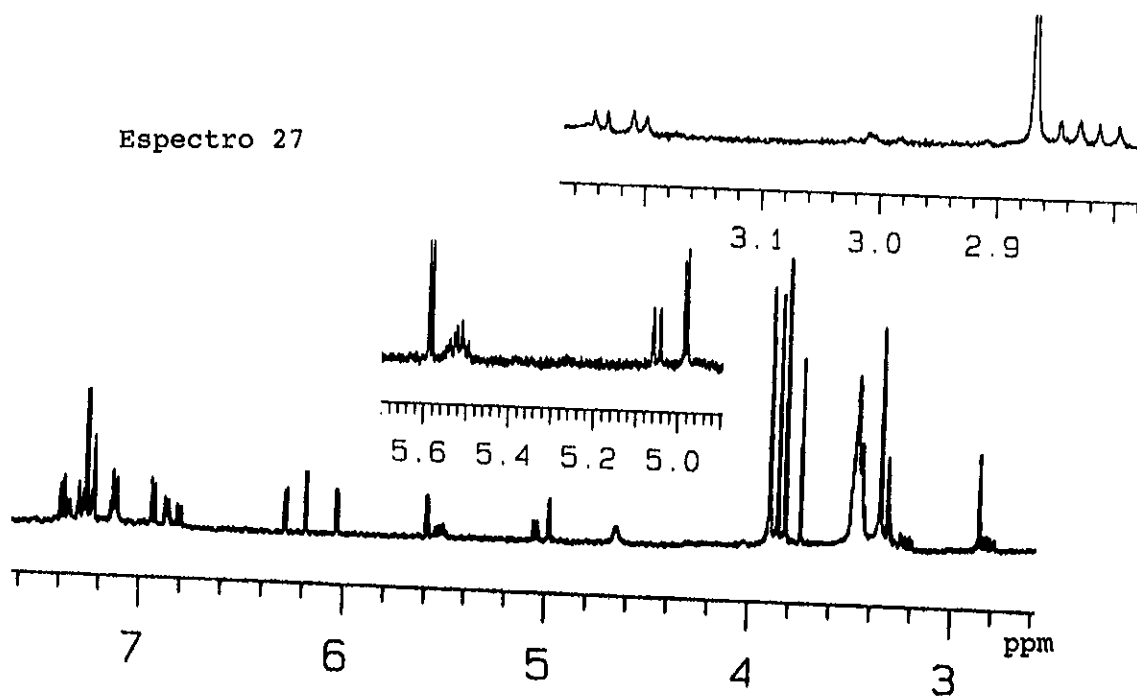
160 150 140 130 120 110 100 90 80 70
 ppm
 Espectro 24



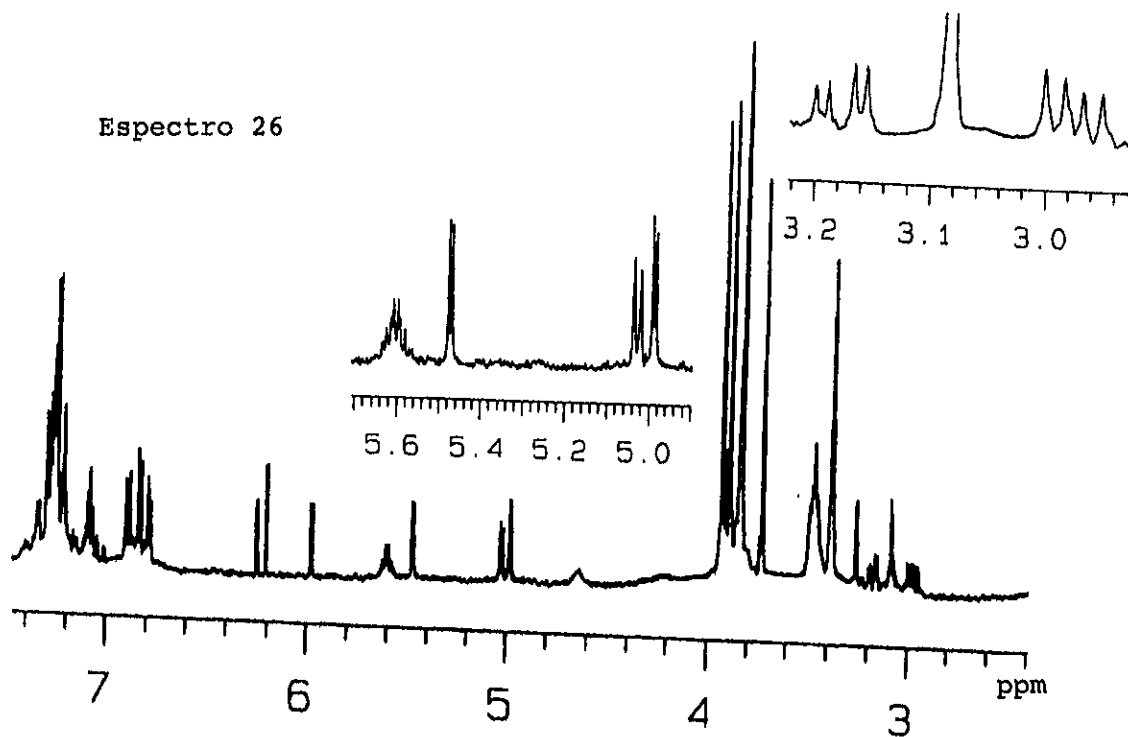


Espectro 25

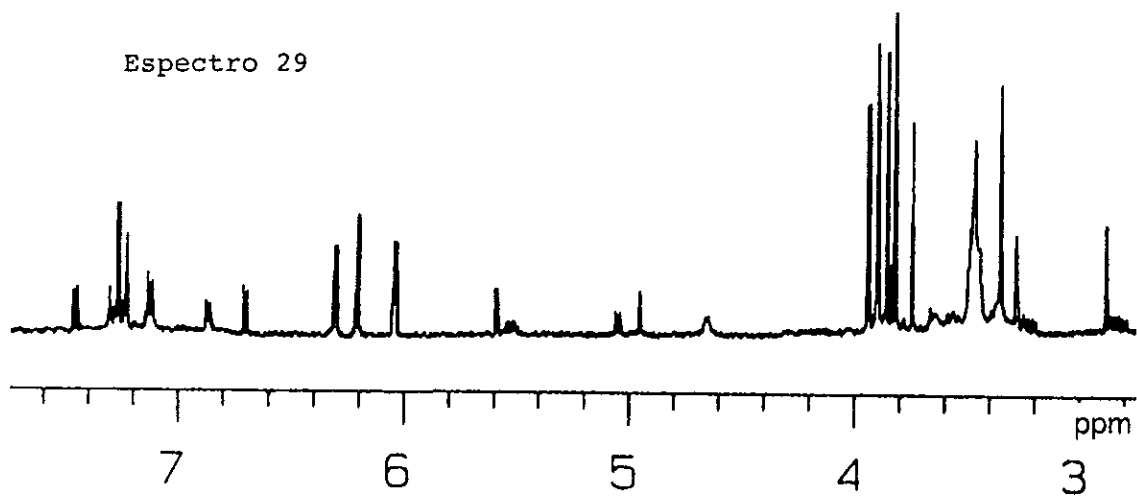
Espectro 27



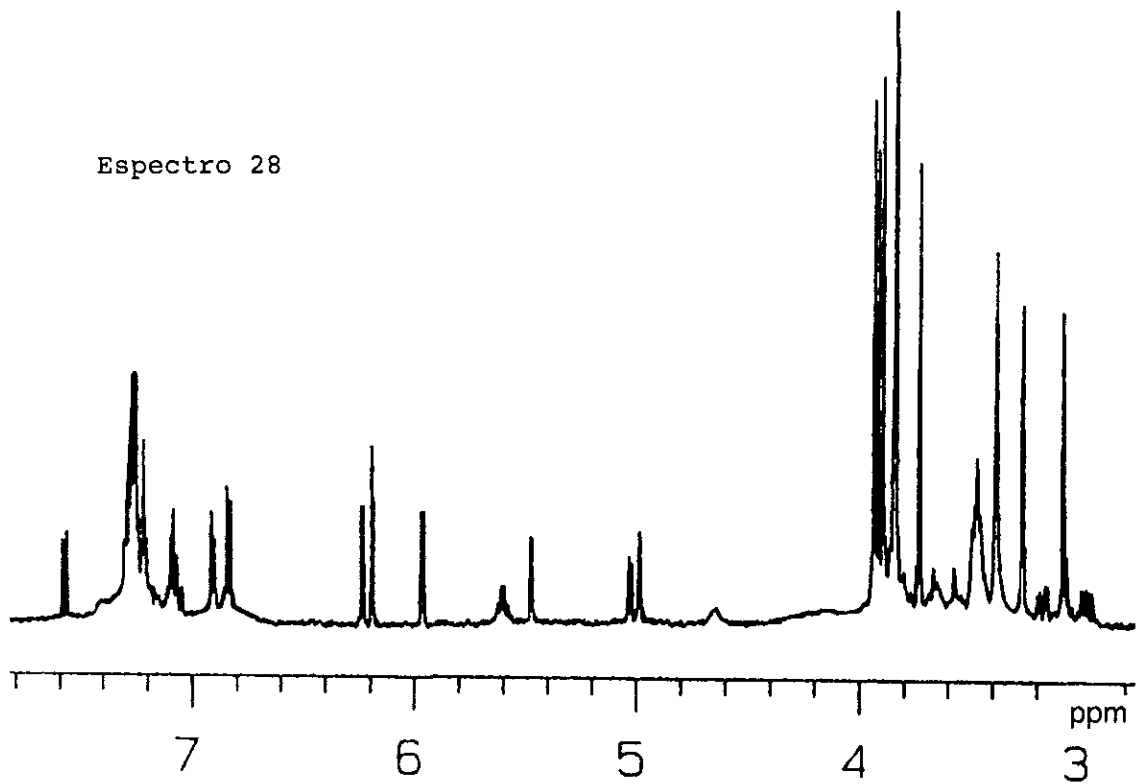
Espectro 26



Espectro 29



Espectro 28



V.1.1.3 Caracterización estructural de la geranina D (172)

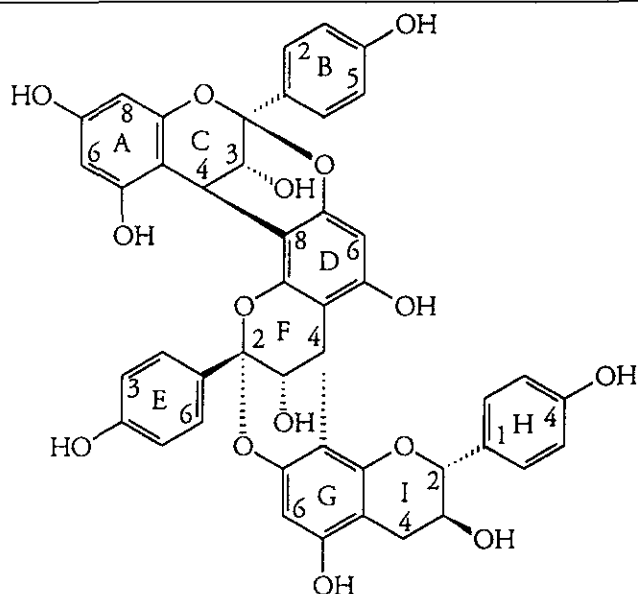
El compuesto 172 se aisló como un sólido amorfo de color rojo y soluble en MeOH. Los datos físicos, espectrocópicos y espectrométricos del compuesto 172 se resumen en la Cuadro 22.

La fórmula molecular del compuesto se estableció como $C_{45}H_{34}O_{15}$ por espectrometría de masas en su modalidad FAB⁺ (Espectro 30).

Los espectros en el IR (Espectro 31) y el UV (Espectro 32), así como el de DC (Espectro 33), resultaron similares a los obtenidos para los compuestos 169-171, lo que permitió inferir que el compuesto 172 también correspondía a una proantocianidina del tipo A.

El espectro de masas FAB⁺ presentó un ion cuasimolecular en una m/z 815 $[M+H]^+$ consistente con una estructura trimérica (Morimoto *et al.*, 1987; Balde *et al.*, 1995a).

Cuadro 22. Constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de la geranina D (172).



Geranina D (172)

P.M. = 814 uma EM-FAB⁺ (NBA)

F.M. = C₄₅H₃₄O₁₅ calculada por análisis elemental

[α]_D = +37° (c = 0.3 mg/ml, MeOH)

IR ν_{max} (KBr) = 3404, 1614, 1516, 1452, 1232, 968 cm⁻¹

..... (Espectro 31)

UV (ε) (MeOH) λ_{max} = 204.5, 261.5, 273.5 nm... (Espectro 32)

EM-FAB⁺m/z (int.rel) = [M+H] 815 (10.0), 325 (40), 154 (100)..... (Espectro 30)

DC (MeOH) Δε (nm) = -0.96 x 10³ (272.5), 7.76 x 10³ (236),
..... (Espectro 33)

RMN ¹H y ¹³C = Cuadro 23..... (Espectros 34 y 35)

Los espectros de RMN (Espectros 34 y 35, Cuadro 23) del compuesto **172** mostraron señales diagnósticas de una proantocianidina del tipo A trimérica (Morimoto *et al.*, 1987; Balde *et al.*, 1995a) en la cual cada una de las unidades constitutivas era un 5, 7, 4'-trihidroxiflavan-3-ol (Baek *et al.*, 1993).

Las observaciones más importantes que conducen a esta conclusión fueron las siguientes:

a) Las señales en δ_H 4.08 (d, H-3C), 4.29 (d, H-4C), 6.02 (d, H-6A), 6.06 (d, H-8A), 6.82 (d, H-3,5B) y 7.50 (d, H-2,6B) y en δ_C 67.73 (C-3C), 29.69 (C-4C), 98.05 (C-6A), 96.76 (C-8A), 129.52 (C-2,6B) y 115.58 (C-3,5B) se asignaron a la unidad flavanil superior de una proantocianidina tipo A (Baldé *et al.*, 1995a).

b) Las señales en δ_H 4.06 (d, H-3F), 4.28 (d, H-4F), 6.06 (s, H-6D), 6.82 (d, H-3,5E) y 7.48 (d, H-2,6E) y en δ_C 67.70 (C-3F), 29.60 (C-4F), 96.76 (C-6D) 115.58 (C-3,5E) y 129.52 (C-2,6E), se asignaron a la unidad flavanil intermedia del compuesto (Baldé *et al.*, 1995a)

c) Las señales en δ_H 4.70 (d, H-2I), 4.26 (ddd, H-3I), 3.06 (dd, H-4Ib), 2.55 (dd, H-4Ia), 6.25 (s, H-6G), 6.89 (d, H-3,5H), 7.45 (d, H-2,6H), y en δ_C 84.65 (C-2I), 67.91 (C-3I), 30.42 (C-4I), 97.43 (C-6G), 116.60 (C-3,5H) y 130.79 (C-2,6H) se asignaron a una unidad afzelequina terminal (Baek et al., 1993). Debe mencionarse que las señales del espectro de RMN ^{13}C fueron asignadas mediante experimentos HMQC y HMBC (Espectro 36 y 37) y fueron consistentes con las descritas para los únicos dos compuestos relacionados (Morimoto et al., 1987; Balde et al., 1995a).

La obtención de los derivados heptametilado (**172a**, Espectro 38) y decaacetilado (**172b**, Espectro 39), al tratar al compuesto **172** con sulfato de dimetilo y anhídrido acético/piridina respectivamente, demostró la presencia de diez hidroxilos, siete del tipo fenólico y tres del tipo alcohólico, esta información también apoyo la naturaleza trimérica y la presencia de tres

unidades del tipo 5, 7, 4'-trihidroxi-flavan-3-ol, en el compuesto 172.

El análisis global de la información anterior, cuyo resultado se ilustra en la Figura 22, permitió proponer la estructura general para la geranina D.

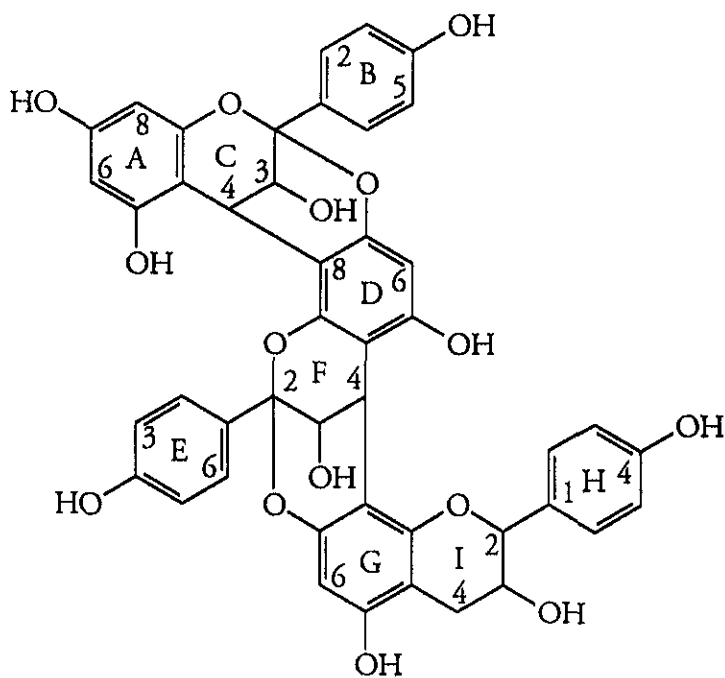


Figura 22. Estructura general de la geranina D.

Cuadro 23 Desplazamientos químicos de RMN ^1H y ^{13}C de, la geranina D (172).

Geranina D (172)		
Posición	δ_{H}	δ_{C}
2C	-	100.57
3	4.08 d (3.5)	67.73
4	4.29 d (3.5)	29.69
5A	-	156.73
6	6.02 d (2.5)	98.05
7	-	159.00
8	6.06 d (2.5)	96.76
9	-	154.05
10	-	105.99
1B	-	129.52
2,6	7.50 d (9)	129.52
3,5	6.82 d (9)	115.58
4	-	159.00
2F	-	100.57
3	4.06 d (3.5)	67.70
4	4.28 d (3.5)	29.60
5D	-	156.35
6	6.06 s	96.76
7	-	152.18
8	-	106.27
9	-	151.64
10	-	103.63
1E	-	129.52
2,6	7.48 d (9)	129.52
3,5	6.82 d (9)	115.58
4	-	158.31
2I	4.70 d (9)	84.65
3	4.26 ddd (9, 9.5, 6)	67.91
4a	2.55 dd (9.5, 16.5)	30.42
4b	3.06 dd (6, 16.5)	30.42
5G	-	152.85
6	6.25 s	97.43
7	-	152.68
8	-	109.67
9	-	151.06
10	-	103.79
1H	-	131.53
2,6	7.45 d (8.5)	130.79
3,5	6.89 d (8.5)	116.60
4	-	159.00

*MeOH- d_6 , ^1H [500 MHz (J en Hz)], ^{13}C (125 MHz).

Una vez establecida la estructura general de la geranina D, se procedió a determinar la estereoquímica absoluta de los carbonos 2C, 3C, 4C, 2F, 3F, 4F, 2I y 3I. En el caso de los carbonos 4C y 2C la estereoquímica absoluta se determinó de la misma manera que en el caso de los compuestos **169-171**. El espectro de DC (Espectro 33) de la geranina D mostró un efecto Cotton positivo a 236 nm ($[\theta] = 7.76 \times 10^3$), indicando de esta manera que la configuración absoluta en el carbono 4C de este compuesto era R y, en consecuencia, la orientación de los enlaces interflavonoide sobre 4C y 2C era β (Balde et al., 1995b).

La estereoquímica absoluta de 3C, 3F y 3I se estableció utilizando el método de Mosher. En este caso el análisis de los datos ($\Delta\delta_{R-S}$) (Espectros 40 y 41; Cuadro 24) de los triésteres R (**172R**) y S (**172S**) mostró diferencia positiva para H-2,6B [$\Delta\delta_{R-S} = +0.11$] y diferencias negativas para H-6A [$\Delta\delta_{R-S} = -0.05$] y MeO-5A

$[\Delta\delta_{R-S} = -0.04]$ indicando que la estereoquímica absoluta del carbono 3C era R. La diferencia negativa encontrada para H-2,6E $[\Delta\delta_{R-S} = -0.01]$ y las diferencias positivas para H-6D $[\Delta\delta_{R-S} = +0.01]$ y MeO-5D $[\Delta\delta_{R-S} = +0.02]$ permitieron establecer una estereoquímica absoluta S para el carbono 3F. Finalmente, las diferencias positivas obtenidas para H-6G $[\Delta\delta_{R-S} = +0.01]$ y H-4I $[\Delta\delta_{R-S} = +0.21$ y $+0.13]$ revelaron una estereoquímica absoluta S en el carbono 3I y en consecuencia la configuración absoluta del carbono 2I se determinó como R, considerando la relación trans entre H-3I y H-2I.

En resumen, la estructura de esta nueva proantocianidina del tipo A designada con el nombre trivial de geranina D (172) (Figura 23), se propone como la *epi*-afzelequina-(4 β ->8, 2 β ->O->7)-afzelequina-(4 α ->8, 2 α ->O->7)-afzelequina.

Cuadro 24. Desplazamientos químicos (RMN-¹H) para señales diagnósticas de los ésteres de Mosher de la geranina D **172R** y **172S**.

Protones	Geranina D (172)			
	(<i>R</i>)-MTPA 172R	(<i>S</i>)-MTPA 172S	$\Delta\delta$ (<i>R-S</i>)	Configuración absoluta del carbinol
H-6A	6.09	6.14	-0.05	3C(<i>R</i>)
MeO-5A	3.22	3.26	-0.04	3C(<i>R</i>)
H-2, 6B	6.80	6.69	+0.11	3C(<i>R</i>)
6D	6.16	6.15	+0.01	3F(<i>S</i>)
MeO-5D	3.12	3.10	+0.02	3F(<i>S</i>)
H-2, 6E	6.88	6.89	-0.01	3F(<i>S</i>)
H-4Ia	2.86	2.65	+0.21	3I(<i>S</i>)
H-4Ib	2.76	2.63	+0.13	3I(<i>S</i>)
H-6G	6.16	6.15	+0.01	3I(<i>S</i>)

CDCl₃, 500MHz.

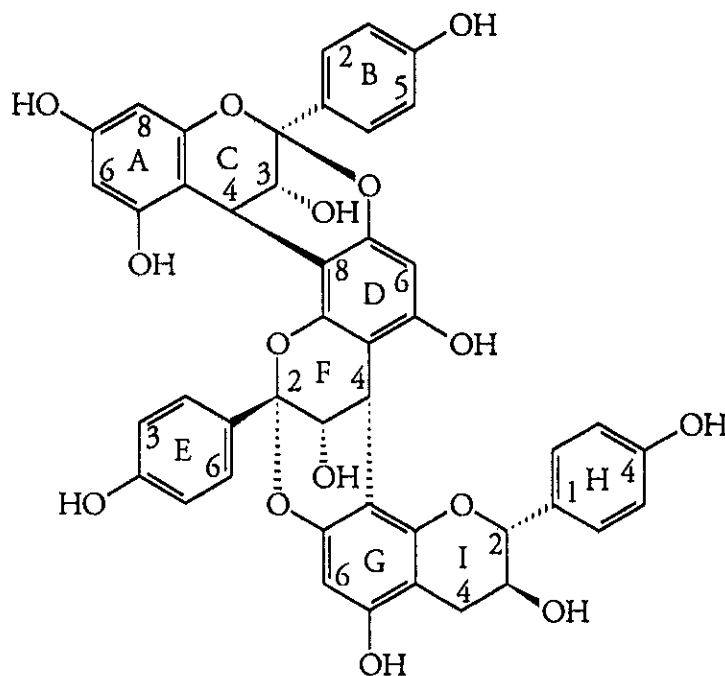
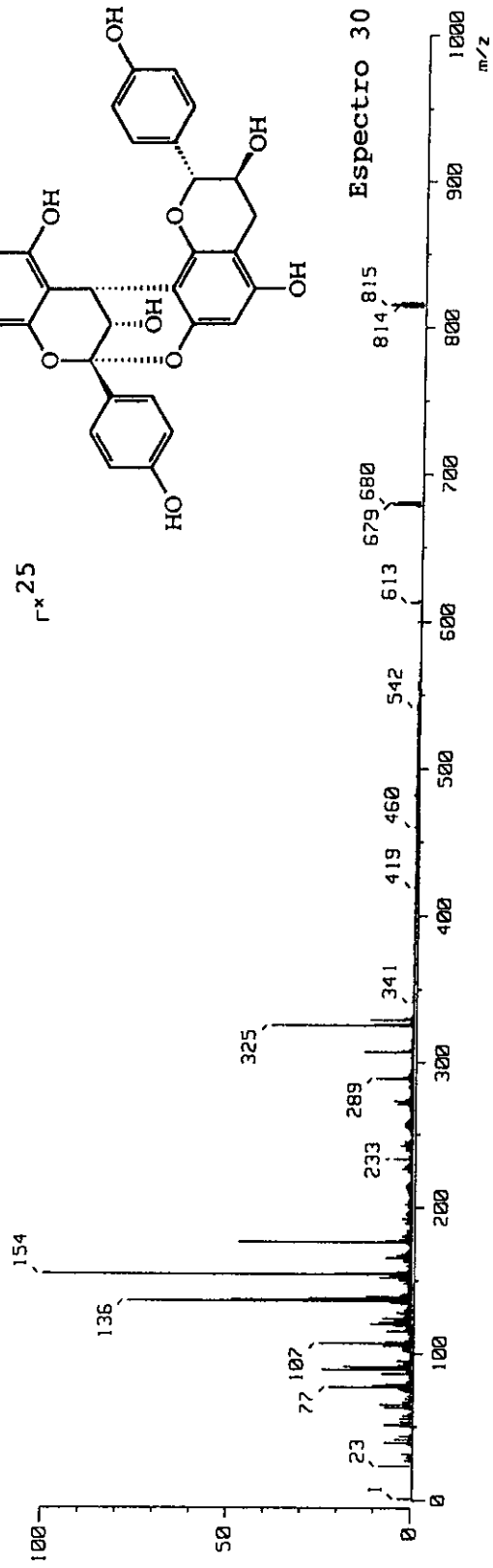
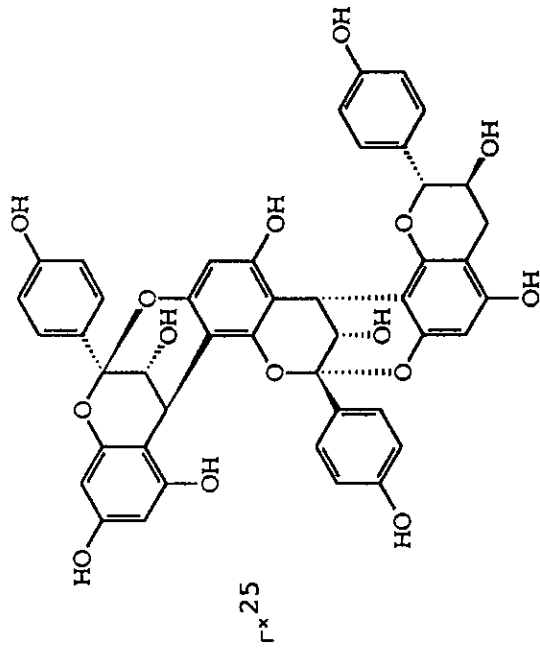
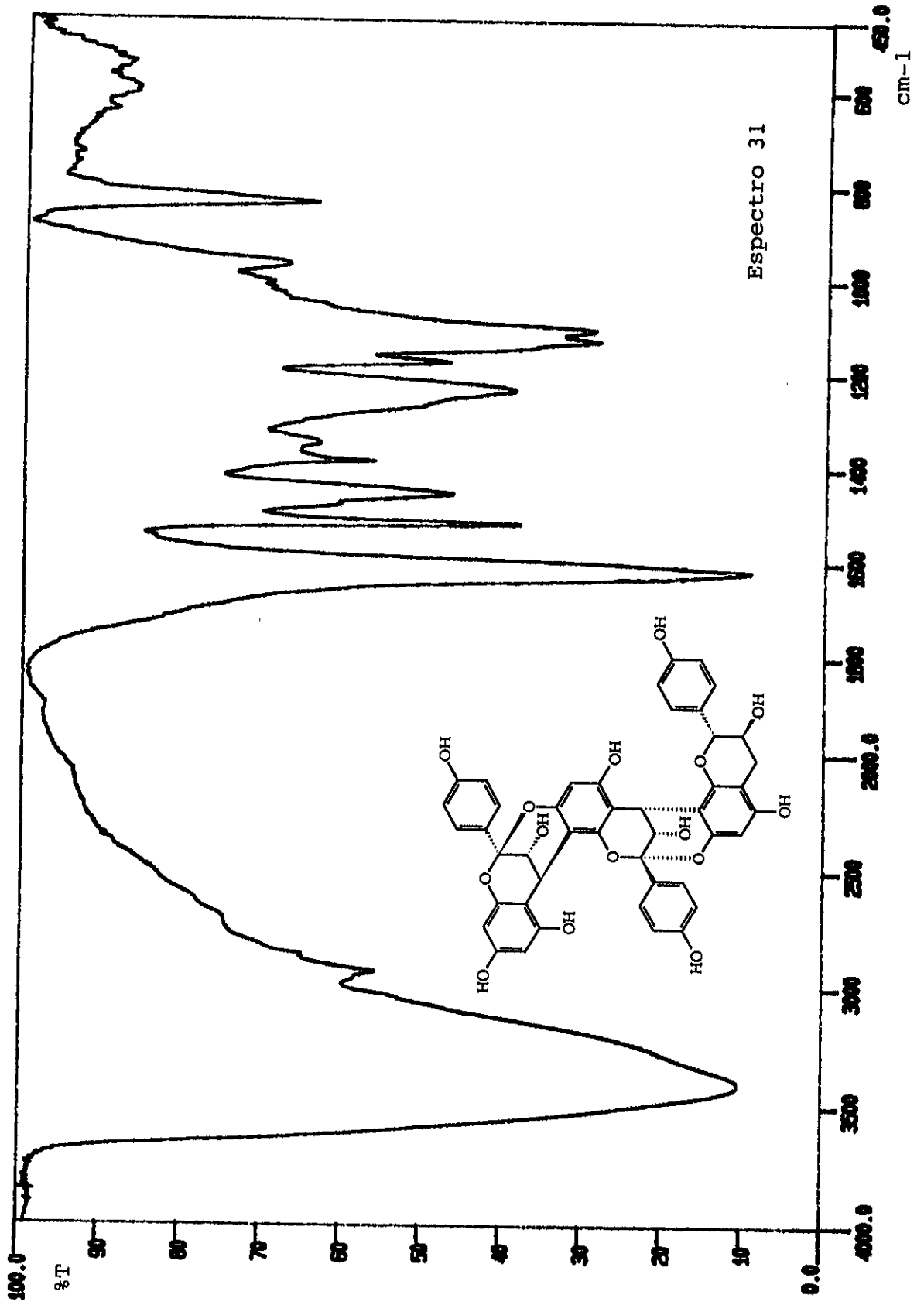
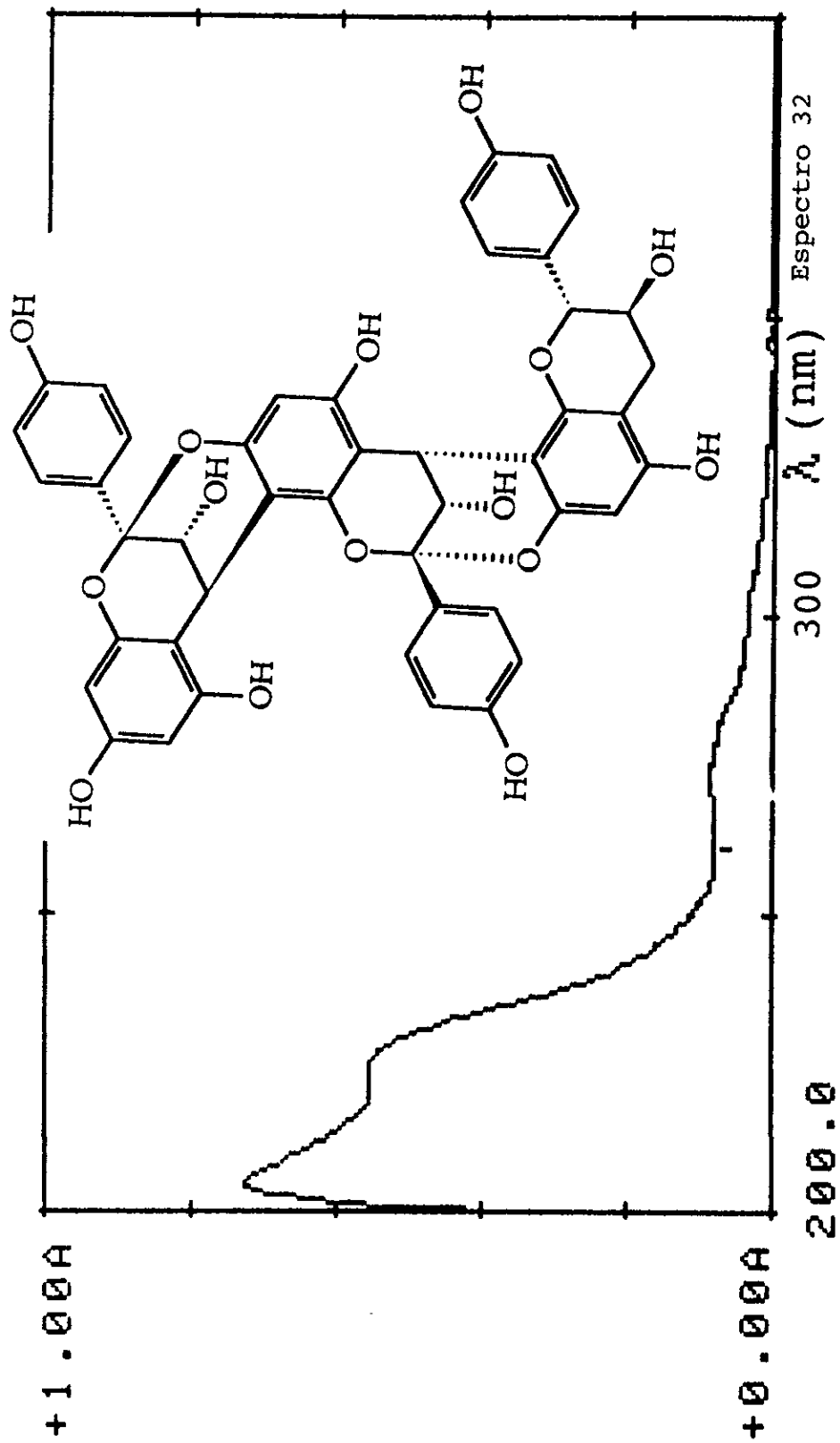
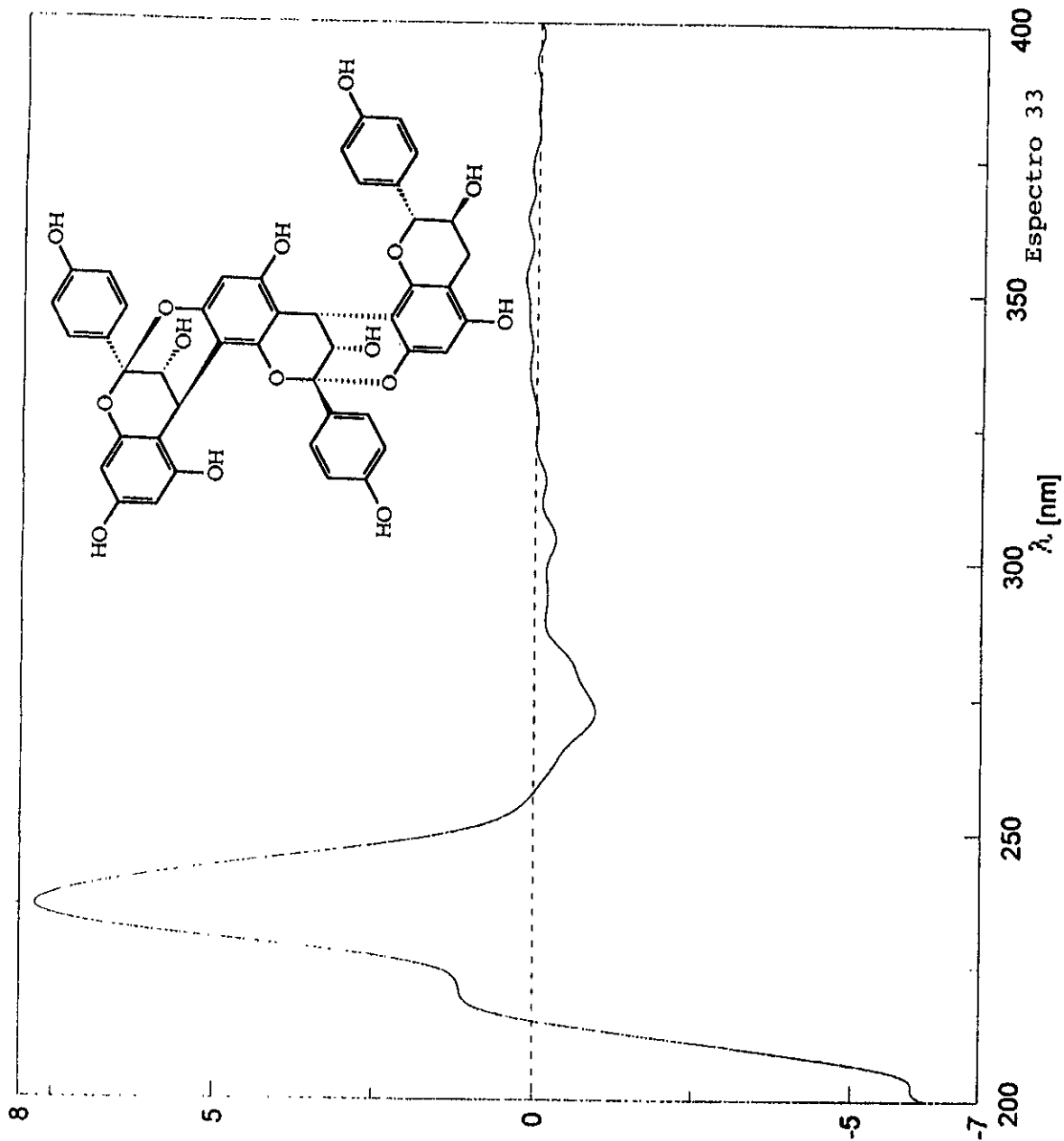


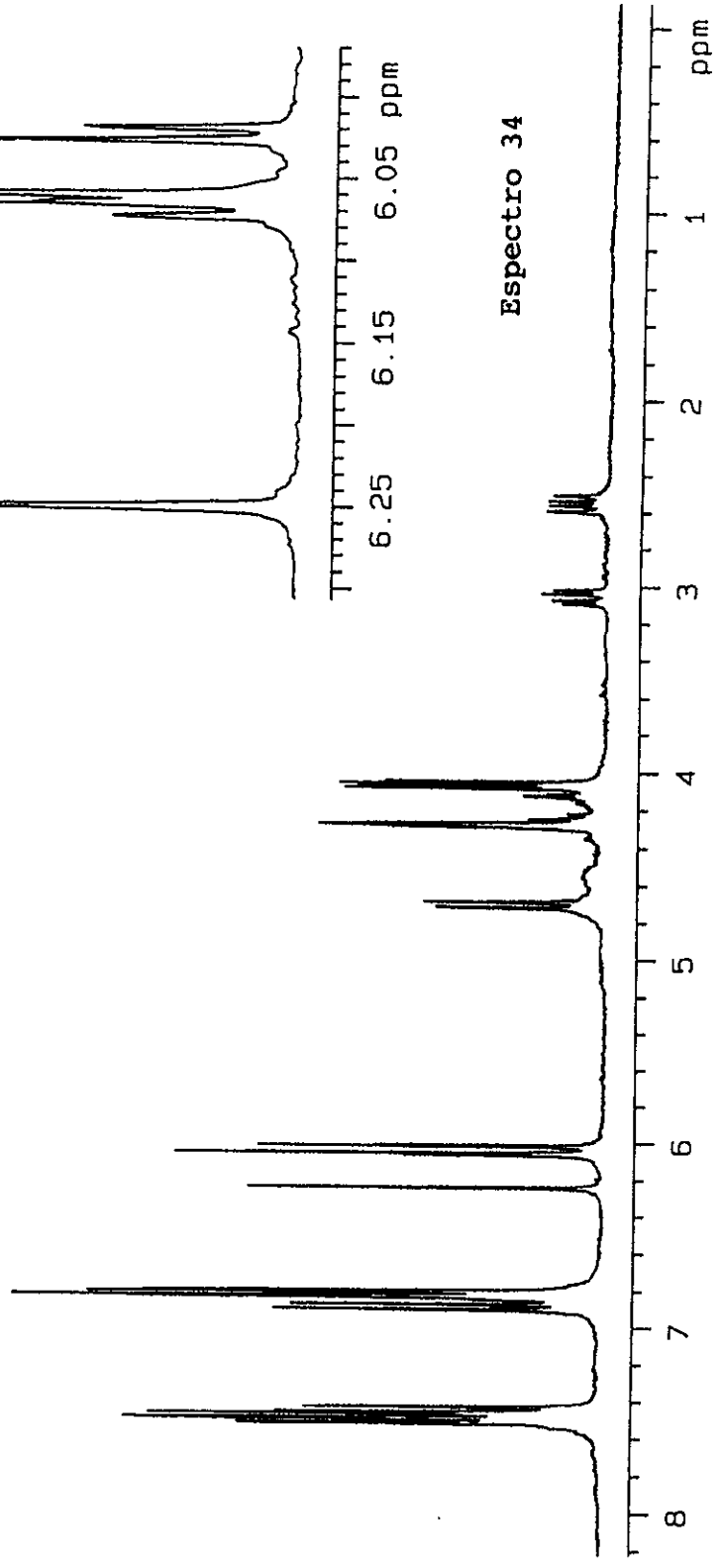
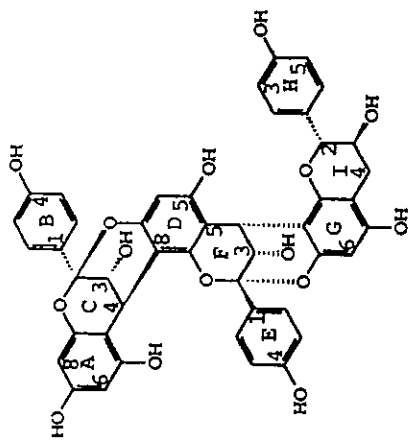
Figura 23. Estructura de la geranina D.

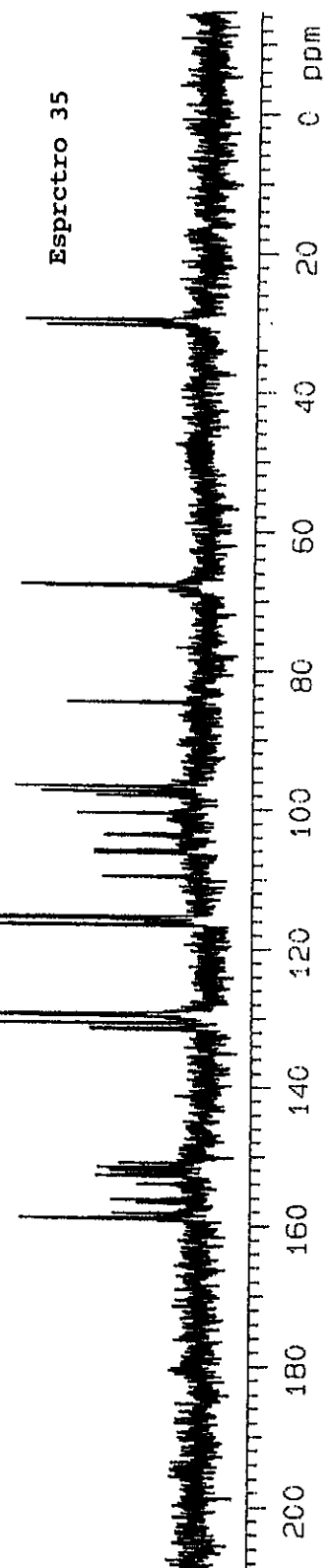
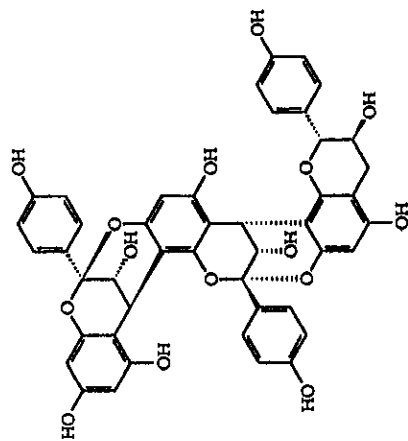


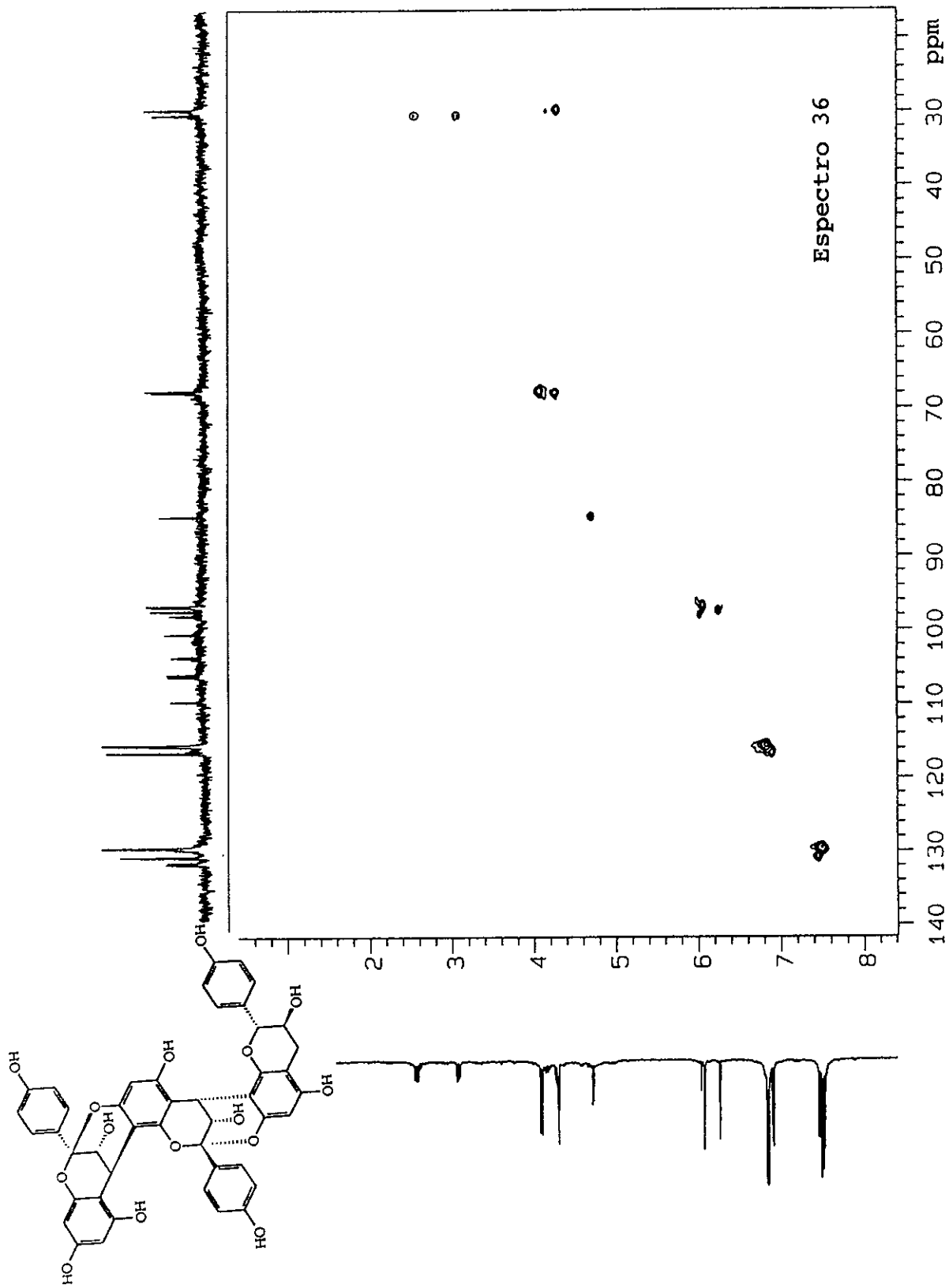


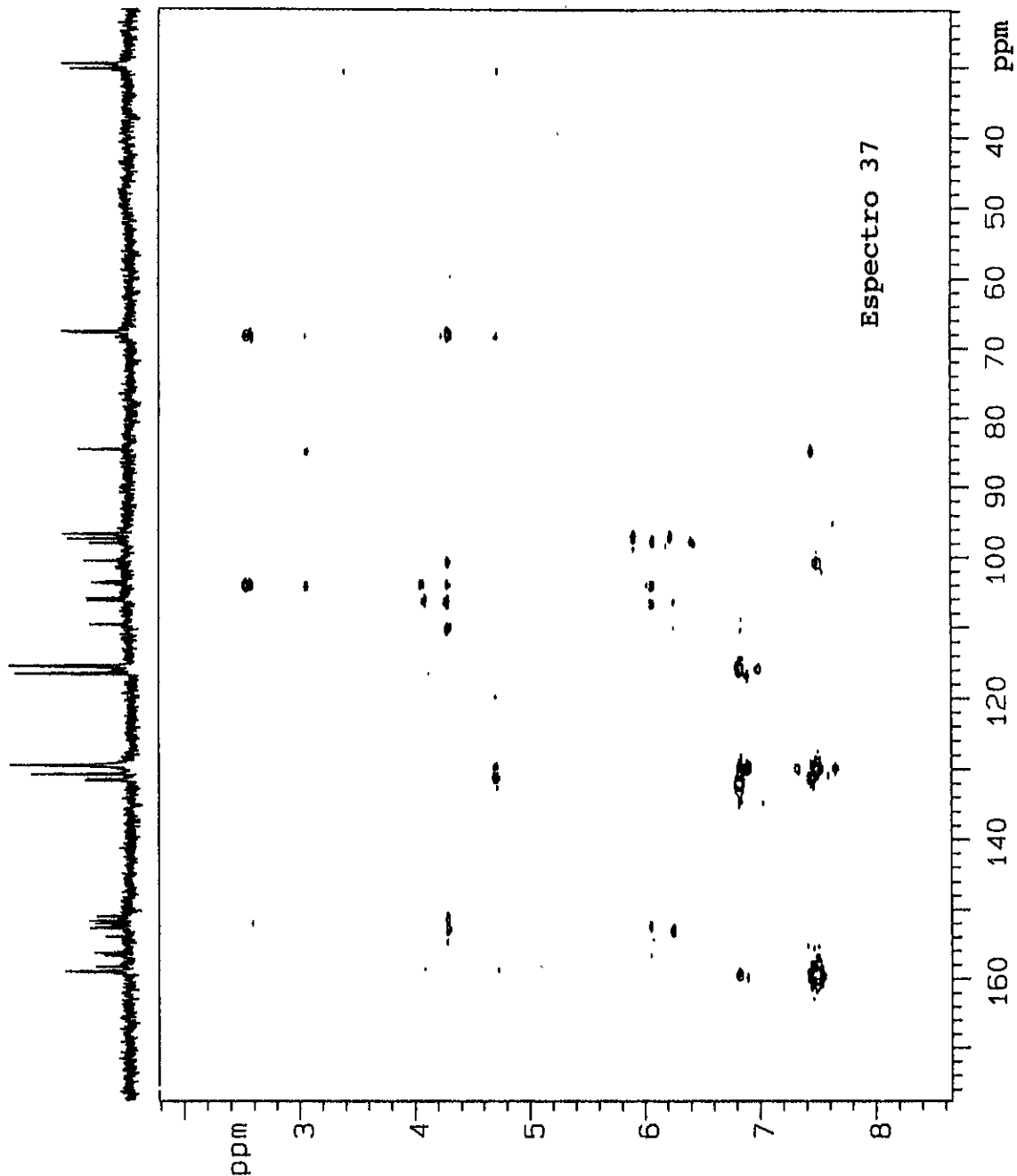


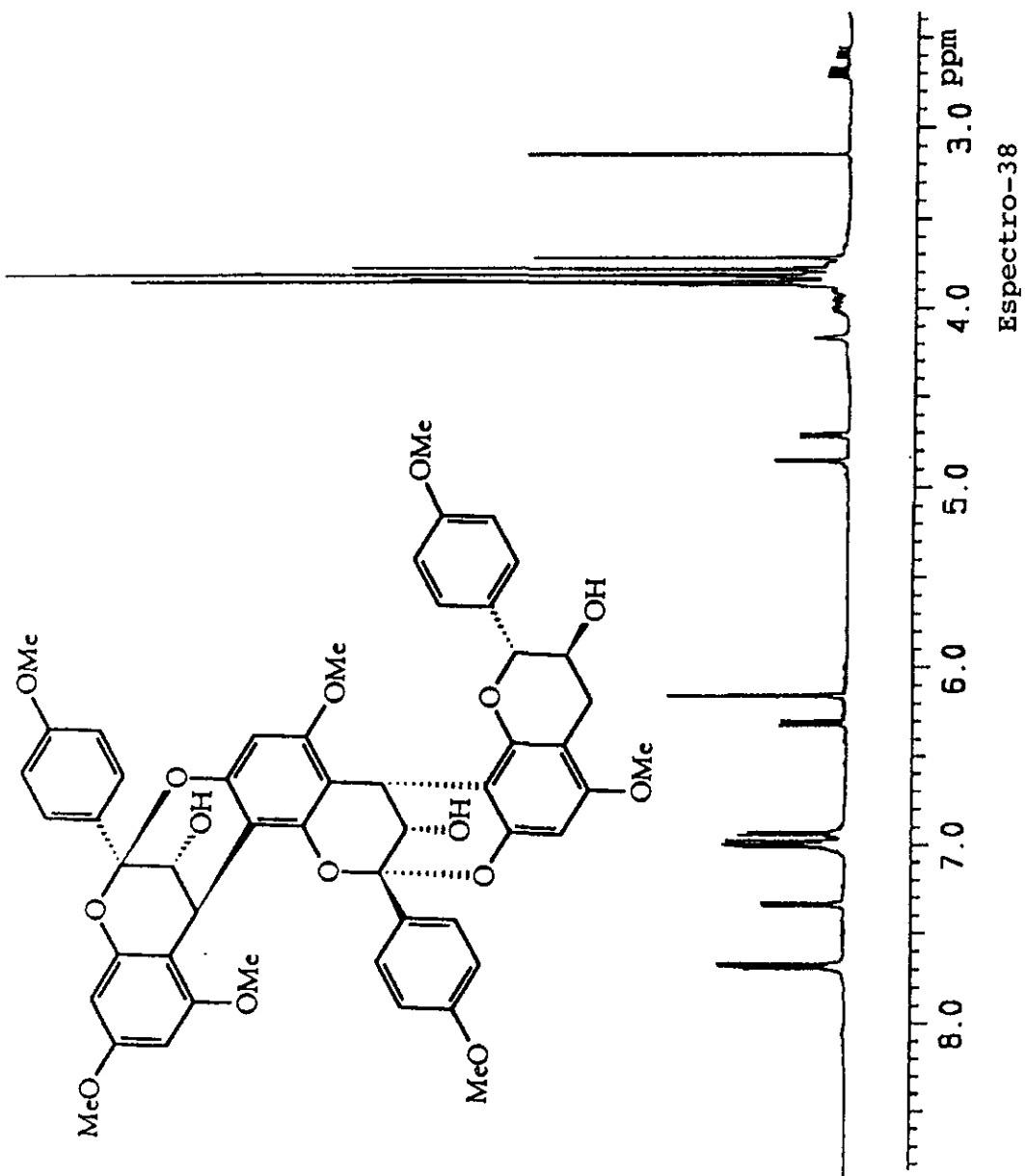


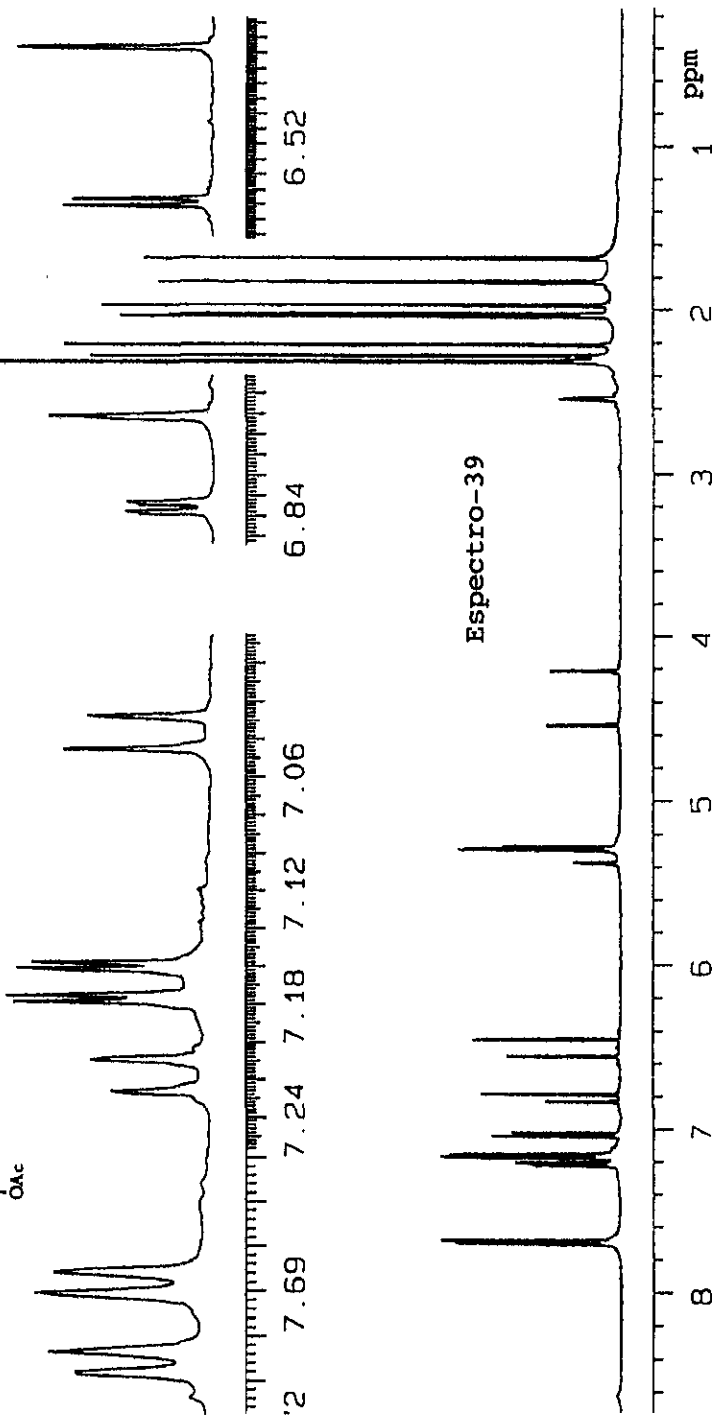
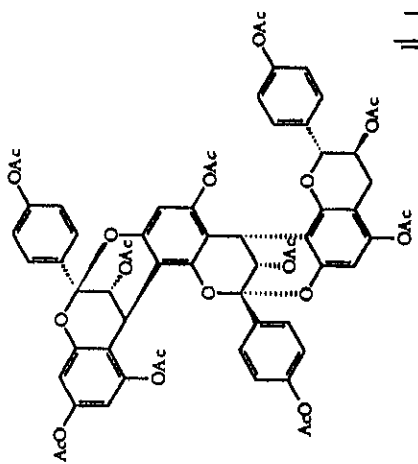


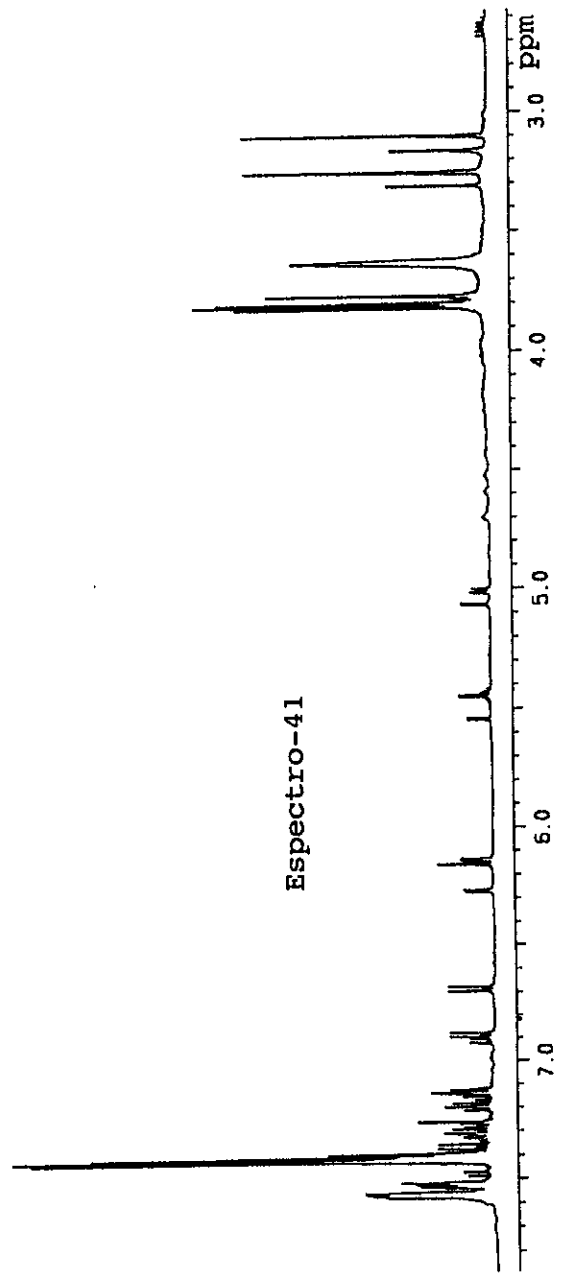
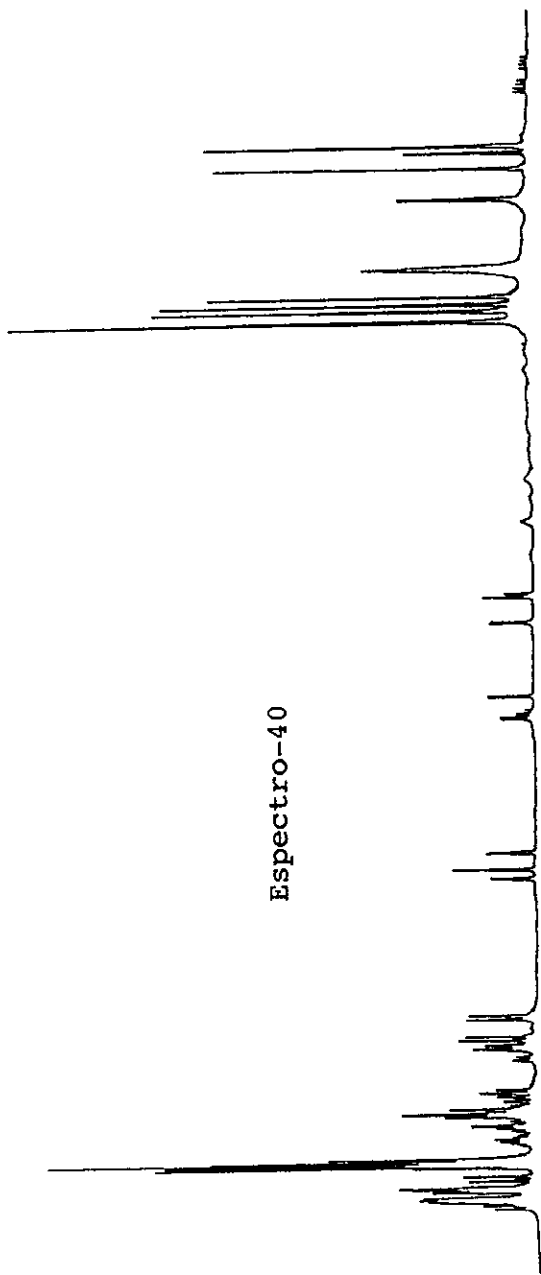












V.1.1.4 Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados de las raíces de *G. niveum*.

La geranina B fue el compuesto más activo contra ambos protozoarios. En el caso de la geranina A, ésta presentó un efecto específico contra los trofozoitos de *G. lamblia*. Los compuestos restantes mostraron una actividad moderada contra ambos protozoarios. En general, los compuestos aislados presentaron una mayor actividad contra *G. lamblia*.

En comparación con los resultados obtenidos para los controles positivos, los compuestos **165-172** son más potentes que la emetina. En el caso del metronidazol las geraninas A y B resultaron 11 y 28 veces menos potentes contra el protozoario *G. lamblia*. El Cuadro 25 muestra el efecto de los compuestos puros aislados sobre el crecimiento de los trofozoitos de *E. histolytica* y *G. lamblia*

Cuadro 25. Actividad antiprotozoaria de los compuestos obtenidos a partir de la fracción secundaria F3-5 derivada de la fracción primaria F3 de *Geranium niveum*.

Muestra	CI ₅₀ μ g/mL (IC 95%)	
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
Geranina A (169)	184.7 (186.1-183.4)	2.4 (2.6-2.1)
Geranina B (170)	13.6 (14.0-13.0)	6.0 (7.0-5.9)
Geranina C (171)	52.0 (52.2-51.7)	96.30 (96.4-96.2)
Geranina D (172)	28.6 (28.8-28.3)	75.2 (75.3-75.1)
Reinoutrina (167)	108.9 (109.1-105.6)	85.1 (97.2-80.1)
Hiperina (168)	143.6 (185.9-110.9)	49.2 (49.3-49.1)
Galato de metilo (165)	22.6 (23.6-22.5)	31.2 (31.3-31.0)
Acido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico (166)	19.25 (19.5-18.7)	181.76 (181.5-180.9)
Metronidazol*	0.04 (0.103-0.029)	0.21 (0.27-0.14)
Emetina*	134.94 (135.8-134.1)	71.10 (71.2-70.9)

*Control positivo; (IC)= intervalo de confianza al 95%

Es importante destacar que las geraninas A-C carecen de actividad citotóxica contra las líneas celulares MCF-7 (carcinoma de mama), HT-29 (adenocarcinoma de colon) y A-549 (carcinoma de pulmón).

V.2 Resultados y discusión en la investigación de las partes aéreas de *C. filaginoides*.

El estudio biodirigido del extracto activo, preparado a partir de las partes aéreas de *C. filaginoides*, condujo al aislamiento de un terpenoide, el eritrodiol (151) (Mata et al., 1997) y ocho glicósidos de flavonoles de los cuales tres constituyen nuevos productos naturales y se denominaron con los nombres triviales de yaksininas A-C (173-175). Los restantes flavonoles se identificaron como la astragalina (176) (Markham, 1982), la isoquercitrina (177) (Markham et al., 1978), la nicotinflorina (178), la narcisina (179) (Bader et al., 1993) y la rutina (97) (Markham, 1982). Los espectros de RMN, IR y EM de los compuestos conocidos se muestran en el apéndice B.

Los glicósidos aislados en este estudio presentan como aglicona al camperol, a la isoramnetina o a la quercetina. La parte sacárida se une a la aglicona en el carbono 3C a través de un enlace O-glicosídico. La

porción sacárida está constituida por un azúcar (glucosa o galactosa) en los compuestos **173-177** y por dos azúcares (rutinosa) en el caso de los compuestos **98, 178 y 179**.

Los productos novedosos **173-175** tienen la particularidad de presentar la porción sacárida (glucosa o galactosa) esterificada en la posición C-6'' por un residuo de ácido cafeico.

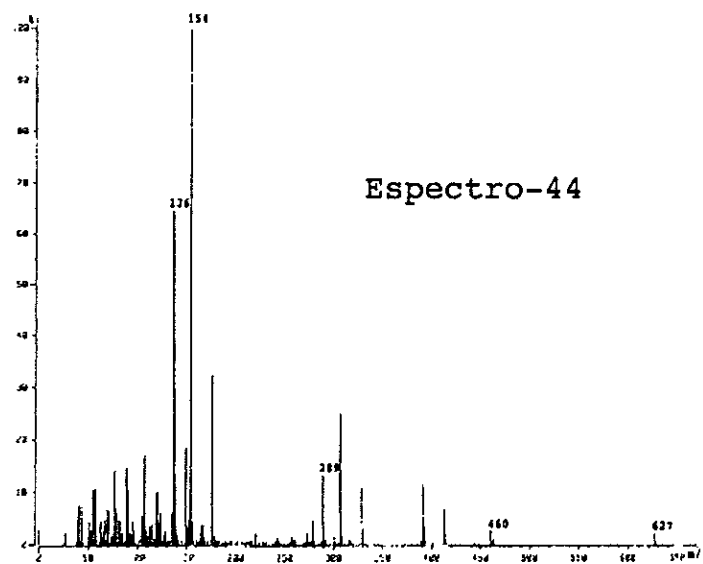
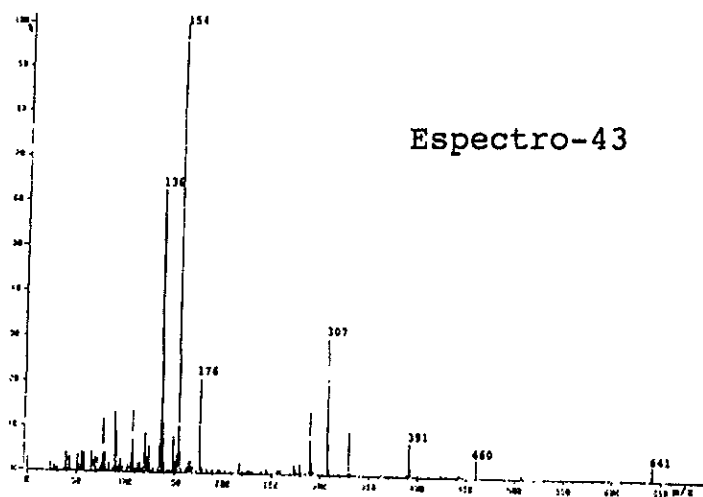
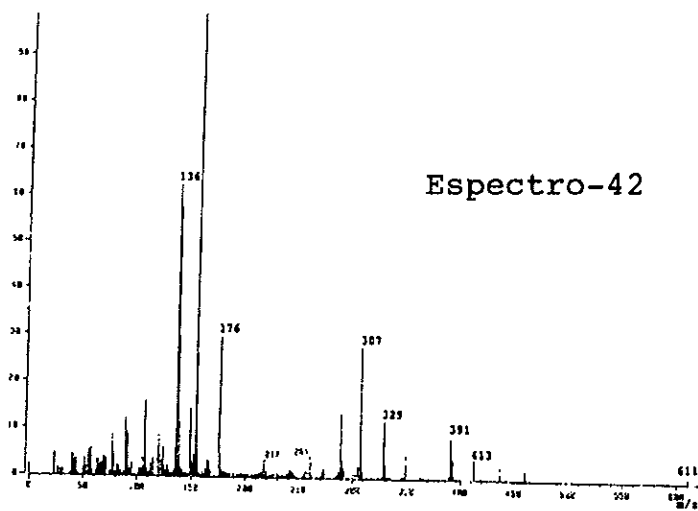
La elucidación de las estructuras moleculares de los tres compuestos novedosos, denominados con los nombres triviales de yaksininas A-C se describirá con detalle en la siguiente sección.

V.2.1 Caracterización estructural de las yaksininas A-C (173-175).

Los compuestos **173-175** se obtuvieron como sólidos de color amarillo oro, solubles en MeOH y con puntos de fusión de 233-235 °C (desc); 196-197 °C (desc) y 237-239 °C (desc), respectivamente.

La fórmula molecular de los compuestos 173-175, se estableció como $C_{30}H_{26}O_{14}$, $C_{31}H_{28}O_{15}$ y $C_{30}H_{26}O_{15}$, respectivamente por espectrometría de masas modalidad FAB positivo (Espectros 42-44).

El análisis detallado de los espectros de RMN (Espectros 45-50; Cuadros 26 y 27) de los compuestos 173-175 permitió confirmar que: a) la unidad aglicona de los compuestos 173-175 es el camperol, la isoramnetina y la quercetina, respectivamente; b) la unidad glicona en los compuestos 173-175 es la galactosa, la galactosa y la glucosa, respectivamente; c) la unión glicosídica se establece entre el hidroxilo en la posición 3C de la estructura del flavonol y el carbono anomérico del azúcar correspondiente y d) en el carbono 6'' del azúcar se encuentra unido una unidad cafeiloxi (Bennini *et al.*, 1992; Hasler *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1993; Kaouadji *et al.*, 1993; Bader *et al.*, 1993; De Tommasi *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Yun *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

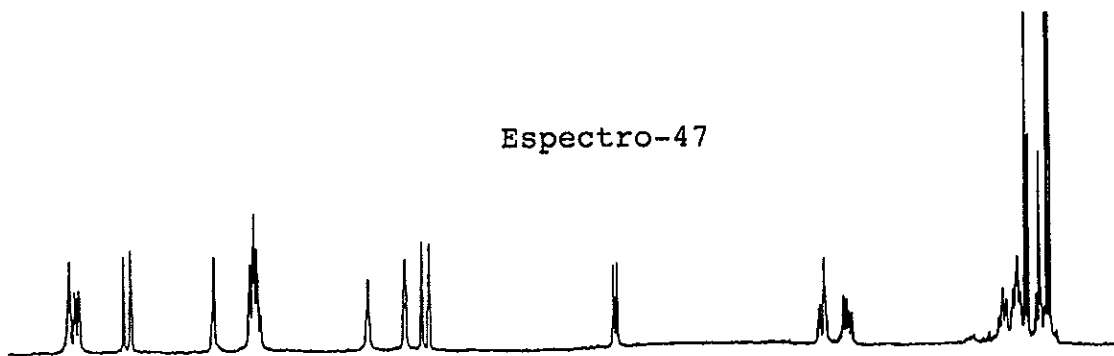


Cuadro 26. Desplazamientos químicos de RMN $^1\text{H}^*$ de las yaksininas A-C (173-175).

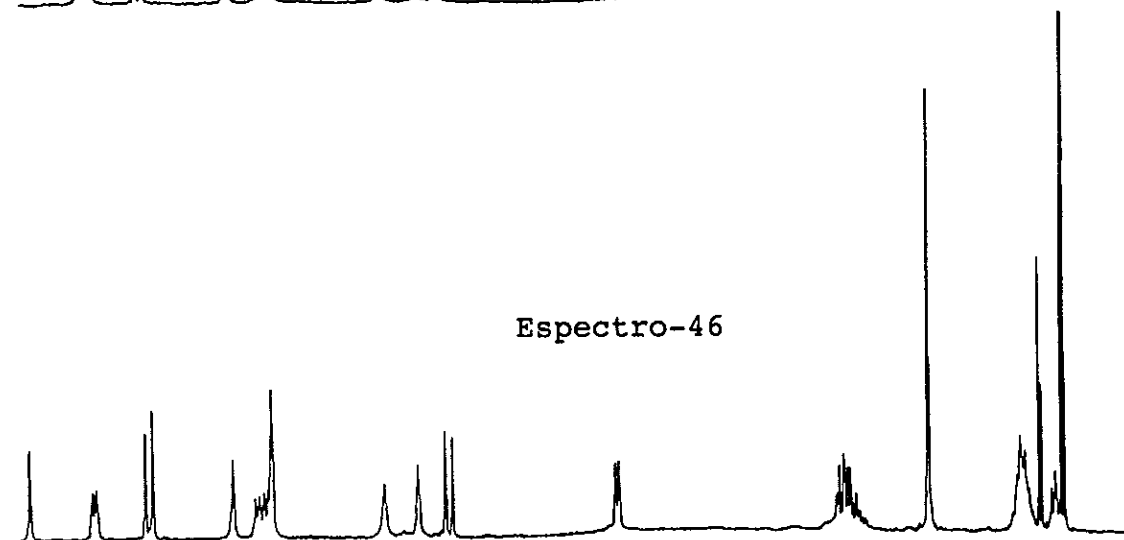
Protones -anillo	Compuesto		
	173	174	175
H-6A	6.12 (d, 2)	6.12 (sa)	6.11 (sa)
H-8	6.28 (d, 2)	6.27 (sa)	6.28 (sa)
H-2B	7.98 (d, 9)	7.82 (d, 1.5)	7.59 (d, 2)
H-3	6.49 (d, 9)	-	-
H-4	-	-	-
H-5	6.49 (d, 9)	6.80 (m)	6.79 (d, 8.5)
H-6	7.98 (d, 9)	7.54 (dd, 8.5, 1.5)	7.55 (dd, 8.5, 2)
H-1''	5.17 (d, 7.5)	5.24 (d, 7)	5.19 (d, 8)
H-2''	3.44 (m)	3.47 (m)	3.51 (t, 8)
H-3''	3-4 (m)	3-4 (m)	3-4 (m)
H-4''	3.33 (m)	3.33 (m)	3.33 (m)
H-5''	3.44 (m)	3.47 (m)	3.43 (t, 8)
H _A -6'''	4.28 (dd, 2, 11.75)	4.27 (dd, 2, 11.75)	4.29 (dd, 2, 11.75)
H _B -6'''	4.16 (dd, 7, 11.75)	4.22 (dd, 7, 11.75)	4.18 (dd, 7, 11.75)
H-2'''	6.01 (d, 16)	5.98 (d, 16)	6.03 (d, 15.5)
H-3'''	7.34 (d, 16)	7.30 (d, 16)	7.33 (d, 15.5)
H-5'''	6.95 (d, 1.5)	6.94 (sa)	6.96 (sa)
H-8'''	6.78 (m)	6.78 (m)	6.78 (m)
H-9'''	6.78 (m)	6.78 (m)	6.78 (m)
MeO	-	3.89 (s)	-

*MeOH- d_4 , 500 MHz (J en Hz)

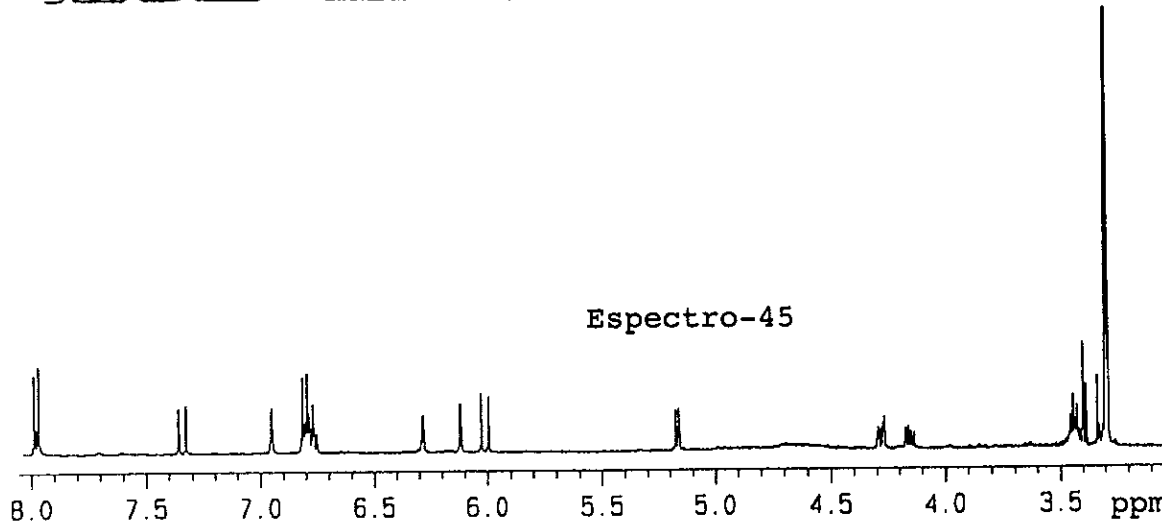
Espectro-47



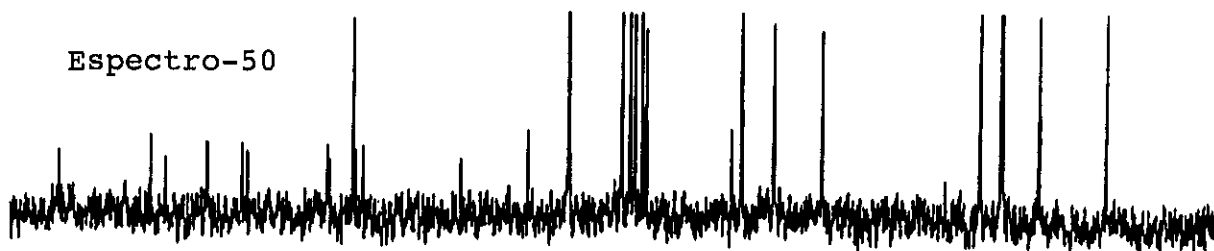
Espectro-46



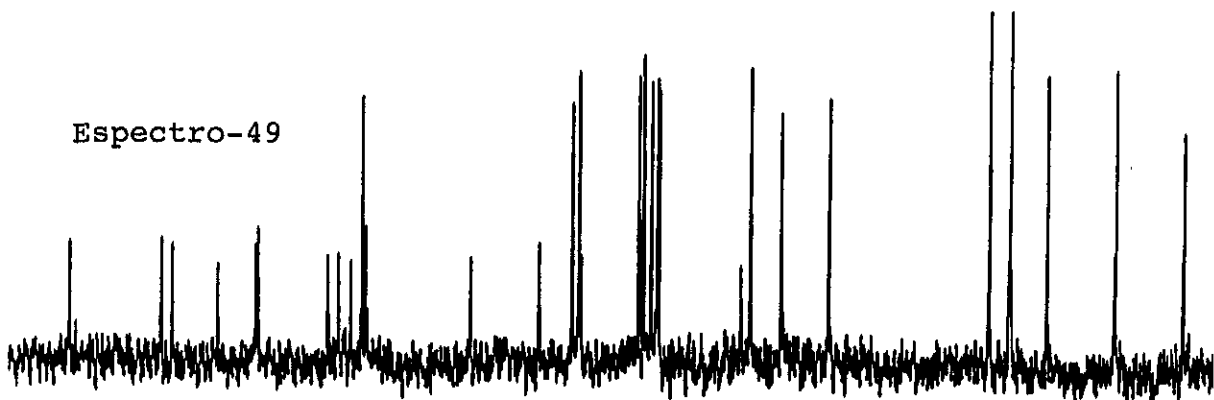
Espectro-45



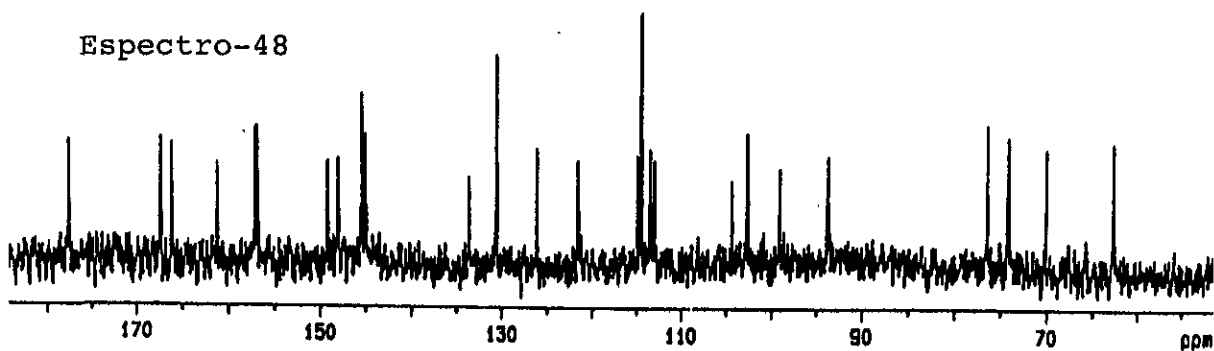
Espectro-50



Espectro-49



Espectro-48



170 150 130 110 90 70 ppm

Cuadro 27. Desplazamientos químicos de RMN C¹³* de las yaksininas A-C (173-175).

Carbono-anillo	173	174	175
2C	157.13	157.27	159.09
3	133.72	133.72	135.20
4	177.66	177.70	179.28
5A	161.20	161.36	162.87
6	99.19	99.22	100.50
7	166.28	166.27	167.39
8	93.84	93.91	95.15
9	157.04	157.02	158.51
10	104.1	103.67	105.17
1B	121.40	121.53	123.30
2	130.70	113.02	114.65
3	114.60	146.88	149.82
4	149.30	149.41	149.59
5	114.60	112.79	117.30
6	130.70	122.46	123.21
1''	102.79	102.66	104.03
2''	74.34	74.36	75.84
3''	74.24	74.36	78.05
4''	70.26	70.38	71.69
5''	76.59	76.59	75.65
6''	62.87	62.83	64.33
1'''	167.38	167.47	168.98
2'''	113.66	113.68	115.93
3'''	145.56	145.65	146.98
4'''	126.19	126.15	127.69
5'''	113.16	113.02	115.12
6'''	145.10	145.28	145.92
7'''	148.28	148.21	146.70
8'''	115.01	115.07	116.46
9'''	121.69	121.78	123.30
MeO	-	55.24	-

*MeOH-d₄, 500 MHz

Las observaciones más importantes que condujeron a estas conclusiones fueron las siguientes:

a) Las señales en δ_H 7.98 (d), 6.49 (d), 6.12 (d), 6.28 (d) y en δ_C 130.70, 114.60, 99.19, 93.84 se asignaron a la unidad camperol del compuesto **173** (Kaouadji et al., 1993; Liu et al., 1999). Las señales en δ_H 7.54 (dd), 6.8 (m), 7.82 (d), 6.27 (sa), 6.12 (sa), 3.89 (s) y en δ_C 103.02, 112.79, 122.46, 55.24 fueron asignadas a la aglicona isoramnetina (Sen et al., 1992; Bader et al., 1993) del compuesto **174**. Cabe destacar que la ubicación del metoxilo en la posición 3B se hizo mediante el análisis del experimento NOESY (Espectro 51) donde se observaron correlaciones entre las señales en δ_H 3.89 (MeO-3B) / δ_H 7.82 (H-2B). Las señales en δ_H 7.55 (dd), 6.79 (d), 7.59 (d), 6.28 (sa), 6.11 (sa) y en δ_C 114.65, 117.30, 123.21 se asignaron a la porción quercetina presente en el compuesto **175** (Hasler et al., 1992).

b) Las señales en δ_c 102.79, 74.34, 74.24, 70.26, 76.59 y 62.87 se asignaron a la unidad β -galactosa del compuesto **173**. Las señales en δ_c 102.66, 74.36, 74.36, 70.38, 76.59 y 62.83 corresponden a la unidad β -galactosa del compuesto **174**; y las señales en δ_c 104.03, 75.84, 78.05, 71.69, 75.65 y 64.33 se asignaron a la unidad de β -glucosa del compuesto **175** (Hasler *et al.*, 1992; Bader *et al.*, 1993; De Tommasi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999).

c) Las señales en δ_H 6.01 (d), 7.34 (d), 6.95 (d), 6.78 (m); 5.98 (d), 7.30 (d), 6.94 (sa), 6.78 (m); y 6.03 (d), 7.33 (d), 6.96 (sa), 6.78 (m) corresponden a la unidad cafeiloxi presente en cada uno de los compuestos **173-175**, respectivamente (Yun *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999).

d) Las señales en δ_c 133.72, 102.79 (en el compuesto **173**); 133.72, 102.66 (en el compuesto **174**) y 135.20, 104.03 (en el compuesto **175**) permitieron concluir que

la unión glicosídica se establece entre el hidroxilo sobre el carbono de la posición 3C y el carbono anomérico del azúcar, en los tres compuestos (Hasler et al., 1992; Bader et al., 1993; Liu et al., 1999).

e) Finalmente, las señales en δ_H 4.28, 4.16 (en el compuesto **173**); 4.27, 4.22 (en el compuesto **174**); y 4.29, 4.18 (en el compuesto **175**) permitieron conocer que el residuo cafeiloxi estaba ubicado en la posición 6'' del azúcar en los tres compuestos (Bennini et al., 1992; Kaouadji et al 1993; Wang et al., 1999).

De manera adicional, la hidrólisis ácida de los compuestos **173-175** permitió identificar como productos de hidrólisis: camperol, galactosa, ácido cafeico en el caso del compuesto **173**; isoramnetina, galactosa, ácido cafeico en el caso del compuesto **174**; y quercetina, glucosa, ácido cafeico en el caso del compuesto **175**. El azúcar obtenido en los productos de hidrólisis se identificó mediante CCF por comparación con muestras auténticas. Los espectros de RMN, IR y masas de las

agliconas y del ácido cafeico resultaron idénticos a los de muestras auténticas (Apéndice A).

En resumen, las evidencias espectroscópicas, espectrométricas y químicas presentadas permiten establecer las estructuras **173-175** para las yaksininas A-C, respectivamente.

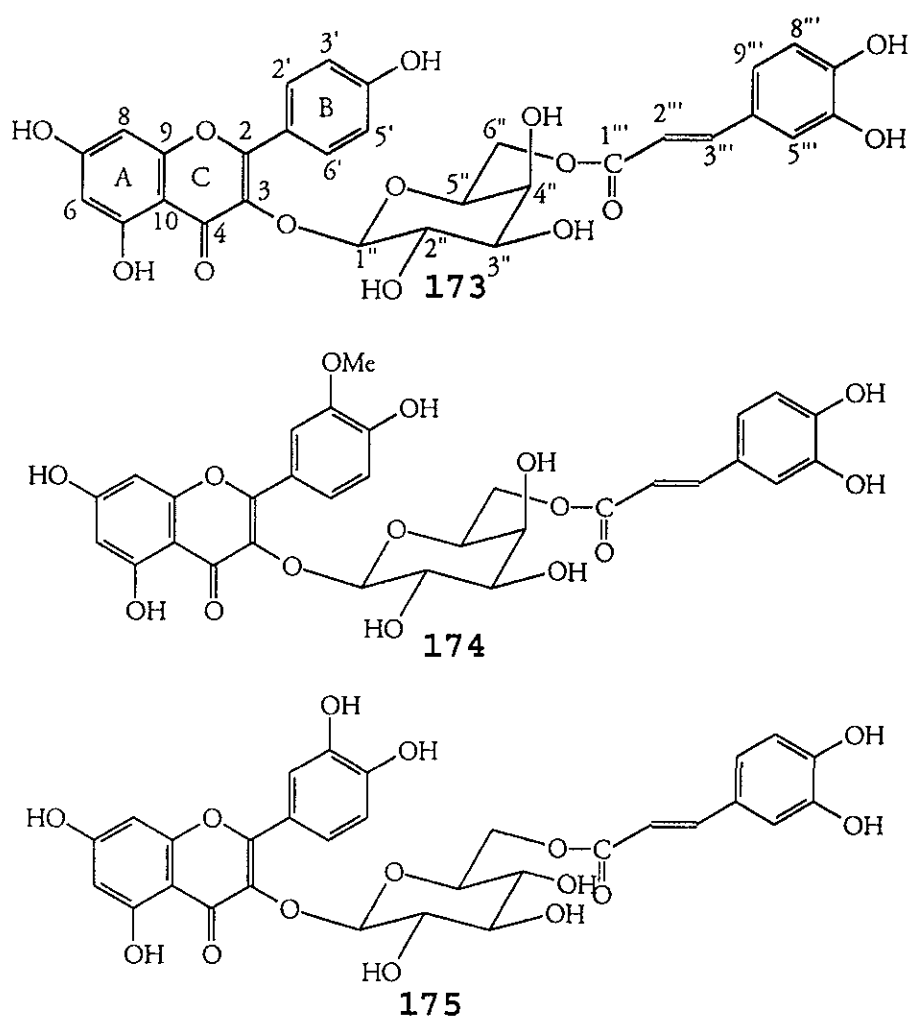
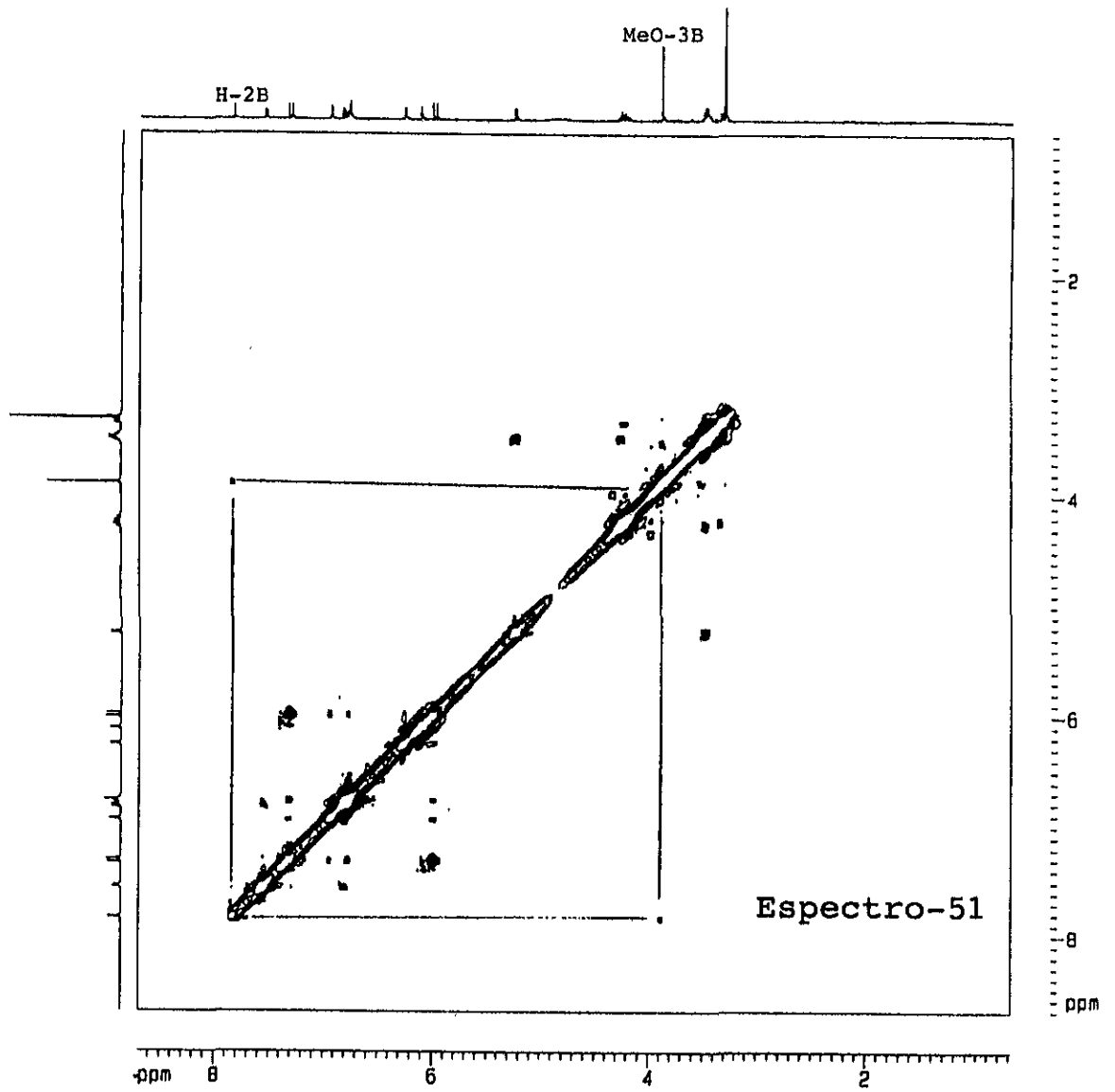


Figura 24. Estructuras de las yaksininas A-C (**173-175**).



V.2.2 Resultados de la determinación de la actividad antiprotozoaria de los compuestos 97, 151 y 173-179 aislados de *C. filaginaides*

De los nueve compuestos aislados la nicotinflorina y el eritrodiol mostraron actividad contra ambos protozoarios (Cuadro 28). La yaksinina C, la astragalina, la isoquercitrina y la narcisina fueron los compuestos con mejor actividad contra *E. histolytica*. En el caso de los trofozoitos de *G. lamblia* el compuesto con mejor actividad fue el 178. Los nueve compuestos evaluados resultaron menos potentes que el metronidazol. Sin embargo, todos los compuestos presentaron una mejor actividad contra los trofozoitos de *E. histolytica* que la emetina. Por último, los compuestos 151, 176 y 178 resultaron con una mejor actividad que el alcaloide emetina contra los trofozoitos de *G. lamblia*.

Cuadro 28. Actividad antiprotozoaria de los compuestos obtenidos de *C. filaginoides*.

Muestra	CI ₅₀ µg/mL (IC 95%)	
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
Yaksinina A (173)	29.97 (30.53-29.41)	46.96 (47.53-46.89)
Yaksinina B (174)	44.73 (45.19-44.28)	15.27 (15.34-15.21)
Yaksinina C (175)	14.02 (14.24-13.79)	104.85 (104.96-104.74)
Astragalina (176)	61.20 (61.47-60.93)	47.52 (47.58-47.45)
Isoquercitrina (177)	14.73 (14.91-14.54)	87.29 (87.42-87.17)
Nicotiniflorina (178)	30.93 (31.05-30.76)	22.49 (22.58-22.40)
Narcisina (179)	17.19 (17.42-16.96)	94.66 (94.80-94.52)
Rutina (97)	119.67 (121.1-118.5)	178.73 (179.3-177.8)
Eritrodiol (151)	12.66 (12.91-12.41)	29.94 (30.02-29.50)
Metronidazol*	0.04 (0.103-0.03)	0.21 (0.27-0.14)
Emetina*	134.94 (135.8-134.1)	71.10 (71.2-70.9)

*Control positivo; ND: no determinada; (IC)= intervalo de confianza al 95%.

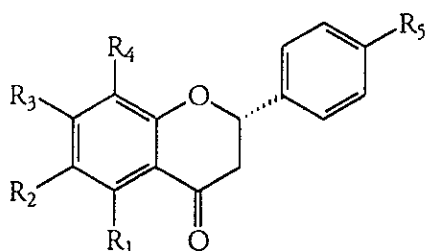
V.3 Estudio relación estructura química actividad antiprotozoaria de flavonoides selectos de origen natural.

Recientemente, se demostraron por vez primera las propiedades antiamebianas y anti-giardia del camperol (30) y del tilirósido (31), flavonoles comúnmente aislados de especies vegetales empleadas para el tratamiento de problemas gastrointestinales (Calzada et al., 1995; 1998; *inter alia*). En consecuencia, con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades antiprotozoarias de los flavonoides se diseñó un estudio de relación estructura química-actividad antiprotozoaria de flavonoides selectos. Para ello, se evaluó el efecto de 19 flavonoides de origen natural sobre trofozoitos de *E. histolytica* y *G. lamblia*.

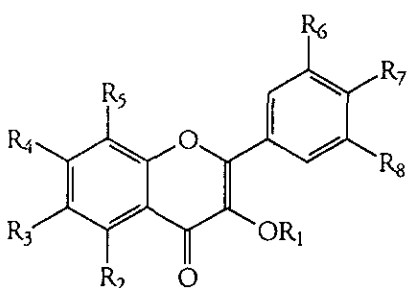
El estudio de relación estructura química-actividad antiprotozoaria se realizó en dos etapas; en la primera, se evaluaron los 19 flavonoides naturales; en

la segunda, se evaluaron los derivados acetilados y metilados de los flavonoides naturales que presentaran la mejor actividad antiprotozoaria, así como algunos compuestos aromáticos representativos de los anillos A, B y C del núcleo flavonoide. Los objetivos de las evaluaciones efectuadas en la segunda etapa del estudio son, por una parte, determinar la contribución de los grupos hidroxilos presentes en los productos naturales en la actividad antiprotozoaria y, por la otra, comprobar si la actividad que presentan los flavonoides se debe a los productos del metabolismo de este importante grupo de compuestos (Hattori *et al.*, 1988; Ibrahim *et al.*, 1990; Limasset *et al.*, 1999).

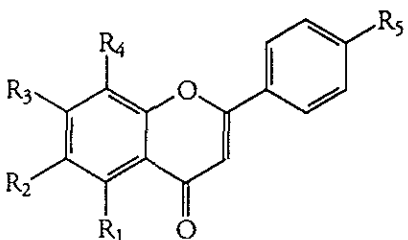
Los productos naturales evaluados (Figura 25) difieren en el número, naturaleza y localización de los sustituyentes oxigenados en los anillos A-C y en la presencia o ausencia del doble enlace entre los carbonos 2C/3C.



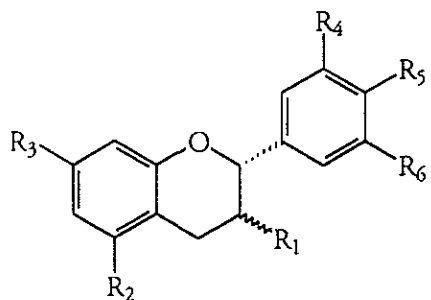
- 180: $R_1=R_3=R_5=OH$, $R_2=R_4=H$
 181: $R_1=R_5=OH$, $R_2=R_3=R_4=OMe$



- 92: $R_1=R_3=R_5=R_6=R_7=R_8=H$, $R_2=R_4=OH$
 30: $R_1=R_3=R_5=R_6=R_8=H$, $R_2=R_4=R_7=OH$
 94: $R_1=R_3=R_5=R_8=H$, $R_2=R_4=R_6=R_7=OH$
 93: $R_1=R_3=R_5=H$, $R_2=R_4=R_6=R_7=R_8=OH$
 31: $R_1=Glc-O-coumaroiloxi$, $R_2=R_4=R_7=OH$
 $R_3=R_5=R_6=R_8=H$
 168: $R_1=Gal$, $R_2=R_4=R_6=R_7=OH$, $R_3=R_5=R_8=H$
 167: $R_1=Xil$, $R_2=R_4=R_6=R_7=OH$, $R_3=R_5=R_8=H$
 97: $R_1=GlcORam$, $R_2=R_4=R_6=R_7=OH$, $R_3=R_5=R_8=H$
 101: $R_1=R_3=R_4=R_5=R_8=H$, $R_2=R_6=R_7=OH$
 182: $R_1=Me$, $R_2=R_4=R_7=OH$, $R_3=OMe$, $R_5=R_6=R_8=H$



- 183: $R_1=R_3=R_5=OH$, $R_2=R_4=H$
 184: $R_1=R_3=OH$, $R_2=R_4=R_5=H$
 185: $R_1=OH$, $R_2=R_4=R_5=H$, $R_3=OMe$



- 78: $R_1=OH(\alpha)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=OH$, $R_6=H$
 80: $R_1=OH(\beta)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=OH$, $R_6=H$
 186: $R_1=OH(\alpha)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=OH$
 187: $R_1=Ogaloiloxi(\alpha)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=OH$

Figura 25. Flavonoides de origen natural evaluados contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

De acuerdo a los resultados que se resumen en el Cuadro 29, los flavonoides más activos en las evaluaciones realizadas fueron la (-)-epicatequina (78), la (-)-epigallocatequina (186) y el camperol (30). Los valores de CI_{50} oscilan entre 1.92 y 7.93 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y entre 1.64 y 8.73 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de *G. lamblia*. Los dos primeros compuestos pertenecen a los flavonoides del tipo flavan-3-ol y el tercero al grupo de los flavonoles. Ninguno de los compuestos resultó con mejor potencia que el metronidazol, sin embargo, todos fueron más activos que la emetina. La presencia de los productos 78, 186, 30, 31 y 180, en varias especies de plantas usadas tradicionalmente para tratar padecimientos gastrointestinales podría apoyar la efectividad de las mismas en la medicina tradicional como agentes terapéuticos.

El análisis comparativo de los resultados del Cuadro 29 permitió establecer las siguientes observaciones y conclusiones: (i) el doble enlace entre

los carbonos 2/3, y el grupo 4-ceto del anillo C no son esenciales para mejorar la actividad antiprotozoaria. Así, los compuestos 78 (epicatequina) y 186 (epigalocatequina) que carecen de estos grupos funcionales fueron más activos que los compuestos 94 (quercetina) y 93 (miricetina) que si los poseen. En consecuencia, es posible que la actividad contra *E. histolytica* y *G. lamblia* de los compuestos del tipo flavan-3-ol se encuentre relacionada con la falta de planaridad de los anillos A y C de la estructura tipo;

(ii) la disposición *cis* de los sustituyentes en los carbonos 2C y 3C de los flavan-3-oles parece ser un importante requerimiento para una actividad antiprotozoaria significativa; el compuesto 80 [(+)-catequina] que posee una configuración 2,3-*trans* es menos activo que los compuestos 78 y 186 [(-)-epicatequina y epigalocatequina] con una configuración *cis*;

(iii) en los flavan-3-oles, la mayor actividad se observó cuando el hidroxilo en la posición 3C se

encuentra libre. Cuando el hidroxilo se esterifica la actividad decrece drásticamente como lo indica la diferencia de actividades entre los productos **186** y **187** [(-)-epigallocatequina y 3-galoiloxi-epigallocatequina, respectivamente].

(iv) En los flavonoles la glicosidación del grupo hidroxilo libre en el carbono 3C no afecta significativamente la actividad antiprotozoaria, ya que los compuestos **30** (camperol) y **94** (quercetina) que poseen el hidroxilo libre muestran una actividad similar a sus glicósidos **31**, **97**, **167** y **168**.

(v) En los flavonoles y los flavan-3-oles, cuando el grado de hidroxilación aumenta en el anillo B la actividad antiprotozoaria disminuye significativamente. Así, la actividad de los compuestos **30** (camperol) y **78** (epicatequina) es mayor que la de los productos **93**, **94** y **186** (miricetina, quercetina y epigallocatequina, respectivamente).

Cuadro 29. Actividad antiprotozoaria de los flavonoides contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Flavonoide	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
	CI ₅₀ µg/mL (IC 95%)	
(-)-Epicatequina (78)	1.92 (1.97-1.31)	1.64 (1.74-1.40)
(-)-Epigallocatequina (186)	6.89 (9.48-5.00)	8.06 (9.97-6.05)
Camperol (30)	7.93 (7.98-7.89)	8.73 (8.75-8.71)
Tilirósido (31)	17.45 (22.07-13.80)	17.36 (22.34-13.48)
Apigenina (180)	10.06 (10.73-9.40)	34.34 (34.41-34.28)
(+)-Catequina (80)	65.55 (67.30-62.20)	33.95 (35.10-31.50)
3-galoiloxi-(-)- epigallocatequina (187)	77.32 (77.59-77.03)	366.52 (368.14-365.00)
Pinocembrina (184)	80.76 (81.07-80.42)	57.39 (57.57-57.21)
4',5,7- Trihidroxiflavanona (183)	98.24 (98.97-97.50)	47.84 (47.97-47.72)
3,6-Dimetoxicamperol (182)	105.30 (106.7-104.4)	65.40 (67.55-64.20)
Reinoutrina (167)	108.92 (109.14-105.58)	85.11 (97.24-80.10)
Quercetina (94)	114.30 (115.23-113.36)	26.47 (31.94-22.10)
Miricetina (93)	115.31 (117.30-114.50)	177.70 (178.20-177.40)
Rutina (97)	119.67 (121.10-118.50)	178.73 (179.3-177.8)
Hiperina (168)	143.61 (185.88-110.95)	49.20 (49.31-49.08)
Galangina (92)	158.67 (159.08-157.40)	48.70 (49.20-47.30)
Fisetina (101)	189.01 (191.30-188.20)	80.48 (80.71-79.95)
Pinostrobina (185)	184.45 (187.17-181.79)	80.76 (80.98-80.54)
Xantomicrol (181)	274.85 (278.27-271.51)	77.96 (78.10-77.82)
Emetina*	134.94 (135.80-134.10)	71.10 (71.2-70.9)
Metronidazol*	0.04 (0.103-0.03)	0.20 (0.27-0.14)

*Controles positivos; (IC)= intervalo de confianza al 95%

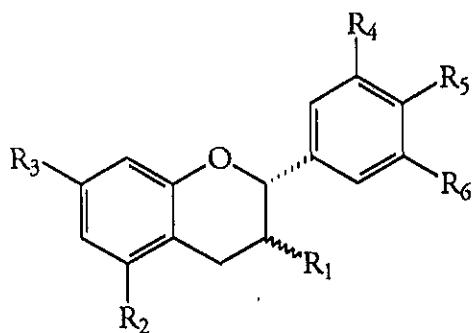
(vi) Los compuestos con una mayor actividad presentan como característica común la presencia de grupos hidroxilos en los carbonos 3C, 5A, 7A y 4B [compuestos 30, 78 y 186 (camperol, epicatequina y epigallocatequina, respectivamente)].

Después de determinar que los compuestos 78, 186 y 30 son los más potentes como antiprotozoarios se procedió a la preparación de sus derivados metilados y acetilados para así determinar la contribución de los diferentes grupos hidroxilos en la actividad antiprotozoaria. En la Figura 26 se ilustran las estructuras de los flavonoides más activos (30, 78 y 186) y sus derivados metilados y/o acetilados. En el Cuadro 30 se resumen los resultados de actividad antiprotozoaria de los flavonoides 30, 78 y 186 y sus derivados metilados y/o acetilados. Como se puede observar en el Cuadro 30, la peracetilación de los flavonoides 30 y 78, para generar los derivados 30b y 78b respectivamente, provocó una disminución drástica

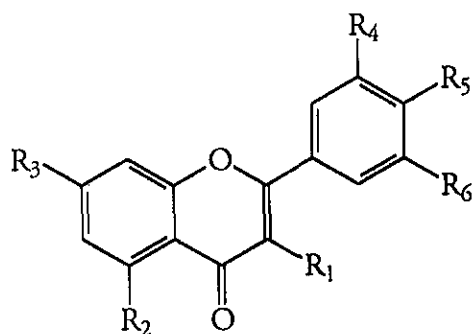
en el efecto antiprotozoario contra ambos trofozoitos de prueba. En el caso de los derivados metilados **30a** y **78a**, se observó una mejoría de la actividad contra el protozoario *G. lamblia*. Sin embargo, en el caso de *E. histolytica* la actividad disminuyó.

De manera adicional, se prepararon los derivados metilados de los compuestos **92-94**. Los resultados indican que la actividad antiprotozoaria se pierde al incrementar el número de grupos metoxilos en el anillo B, tanto en los flavan-3-oles (**78a** y **186a**) como en flavonoles (**30a** y **92a-94a**).

Con la excepción de los compuestos **30** y **78** la metilación de los compuestos naturales provocó una mejoría en la actividad antiprotozoaria. Este efecto es más notable contra los trofozoitos de *G. lamblia*. Cabe destacar que la actividad que presentó el compuesto **78a** contra *G. lamblia* fue superior a la del metronidazol.



- 78**: $R_1=OH(\alpha)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=OH$, $R_6=H$
78a: $R_1=OH(\alpha)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=OMe$, $R_6=H$
78b: $R_1=OAc(\alpha)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=OAc$, $R_6=H$
80: $R_1=OH(\beta)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=OH$, $R_6=H$
80a: $R_1=OH(\beta)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=OMe$, $R_6=H$
80b: $R_1=OAc(\beta)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=OAc$, $R_6=H$
186: $R_1=OH(\alpha)$, $R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=OH$



- 92**: $R_1=R_2=R_3=OH$, $R_4=R_5=R_6=H$
92a: $R_1=R_2=R_3=OMe$, $R_4=R_5=R_6=H$
30: $R_1=R_2=R_3=R_5=OH$, $R_4=R_6=H$
30a: $R_1=R_2=R_3=R_5=OMe$, $R_4=R_6=H$
30b: $R_1=R_2=R_3=R_5=OAc$, $R_4=R_6=H$
94: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OH$, $R_6=H$
94a: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OMe$, $R_6=H$
94b: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=OAc$, $R_6=H$
93: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=OH$
93a: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=OMe$

Figura 26. Estructura de los derivados metilados o acetilados de los flavonoides evaluados.

Cuadro 30. Actividad antiprotozoaria de los flavonoides 30, 78, 92-94 y 186, así como de los derivados metilados (30a, 78a, 92a-94a y 186a) y peracetilados (30b, 78b, 94b y 186b).

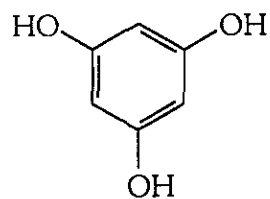
Compuesto	<i>E. histolytica</i> <i>G. lamblia</i>	
	CI ₅₀ : µg/mL (IC 95%)	
(-)-Epicatequina (78)	1.92 (1.97-1.31)	1.64 (1.74-1.40)
(-)-Epigallocatequina (186)	6.89 (9.48-5.00)	8.06 (9.97-6.05)
Camperol (30)	7.93 (7.98-7.89)	8.73 (8.75-8.71)
3,5,7,3',4'-pentaacetoiloxi-(-)-epicatequina (78b)	40.30 (40.56-40.15)	61.68 (61.83-61.53)
3,5,7,3',4'-pentaacetoiloxi-(+)-catequina (80b)	60.95 (61.41-60.47)	92.36 (92.60-92.14)
3,5,7,4'-tetraacetoiloxicamperol (30b)	60.40 (60.74-60.07)	18.37 (18.40-18.33)
3,5,7,3',4'-pentaacetoiloxiquercetina (94b)	38.91 (39.42-38.40)	33.98 (34.07-33.90)
5,7,3',4'-tetrametoxi-(-)-epicatequina (78a)	49.15 (49.32-49.00)	0.043 (0.046-0.040)
5,7,3',4'-tetrametoxi-(+)-catequina (80a)	63.88 (64.82-62.95)	19.46 (19.62-19.29)
3,5,7,4'-tetrametoxicamperol (30a)	36.80 (37.13-36.47)	1.43 (1.46-1.39)
3,5,7-trimetoxigalangina (92*)	38.79 (39.08-38.50)	5.01 (5.12-4.90)
3,5,7,3',4'-pentametoxiquercetina (94*)	28.91 (29.42-28.40)	33.98 (34.07-33.90)
3,5,7,3',4',5'-hexametoximiricetina (93*)	32.31 (32.53-32.11)	69.04 (69.18-68.88)
Metronidazol*	0.04 (0.103-0.03)	0.20 (0.27-0.14)
Emetina*	134.94 (135.8-134.1)	71.10 (71.2-70.9)

*Controles positivos; (IC)= intervalo de confianza al 95%

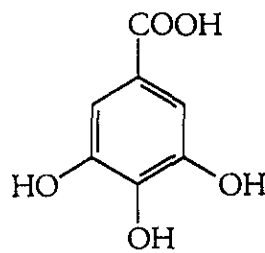
Finalmente, los diez derivados sintetizados fueron más potentes que la emetina contra los dos protozoarios de prueba.

Como ya se mencionó en la sección de antecedentes, en algunas ocasiones la actividad de los flavonoides es debida a los ácidos aromáticos y fenoles que se generan de su metabolismo microbiano intestinal (Limmasset *et al.*, 1999). En consecuencia, se decidió evaluar seis compuestos (Figura 27) que conservan en su estructura porciones de los anillos A-C de los flavonoides más potentes encontrados en esta investigación.

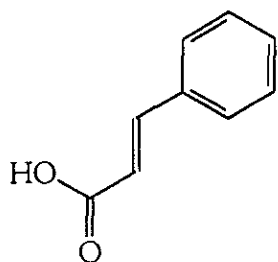
Los resultados de la evaluación (Cuadro 31), mostraron que ninguno de los compuestos (126 y 188-192) evaluados supera la actividad mostrada por los flavonoides más activos (30, 78 y 186). Esta observación sugiere que la actividad antiprotozoaria es debida a la entidad flavonoide y no a sus productos metabólicos como se ha demostrado para otras actividades biológicas (Limmasset *et al.*, 1999).



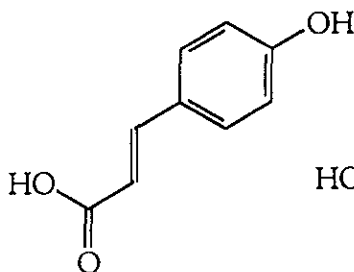
188



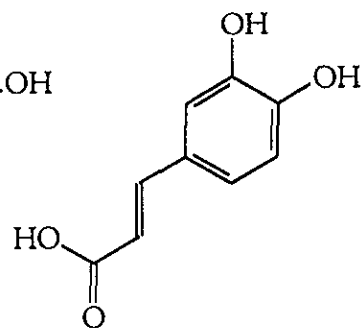
126



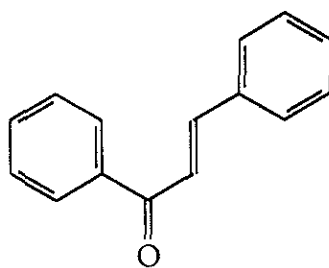
189



190



191



192

Figura 27. Estructura de los compuestos 126 y 188-192

Cuadro 31. Actividad antiprotozoaria de los compuestos 30, 78, 126, 186 y 188-192.

Compuesto	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
	CI ₅₀ : µg/mL (IC 95%)	
(-)-Epicatequina (78)	1.92 (1.97-1.31)	1.64 (1.74-1.40)
(-)-Epigallocatequina (186)	6.89 (9.48-5.00)	8.06 (9.97-6.05)
Camperol (30)	7.93 (7.98-7.89)	8.73 (8.75-8.71)
Fluoroglucionol (188)	25.34 (25.75-24.94)	61.97 (62.09-61.86)
Acido cinámico (189)	46.05 (45.50-45.59)	49.47 (49.55-49.40)
Acido -p-cumárico (190)	224.28 (226.65-222.00)	85.41 (85.5-85.30)
Acido cafeico (191)	199.11 (202.55-195.81)	28.81 (28.96-28.65)
Acido gálico (126)	220.09 (222.1-222.26)	70.32 (70.45-70.20)
Trans-Chalcona (192)	237.83 (242.20-233.67)	25.02 (25.09-24.95)
Metronidazol*	0.04 (0.103-0.03)	0.20 (0.27-0.14)
Emetina*	134.94 (135.8-134.1)	71.10 (71.2-70.9)

*Controles positivos; (IC)= intervalo de confianza al 95%.

Si se considera la estructura, la 3,5,7,9,4'-pentaoxigenación y la planaridad de los anillos A y C de los flavonoides más activos obtenidos en la presente

investigación, se puede proponer un modelo para el sitio receptor con características muy parecidas para los dos protozoarios de prueba, *E. histolytica* y *G. lamblia*.

La semiplanaridad o planaridad en conjunto con la forma de "L" que presentan los flavonoides en el espacio, permite proponer una forma bilobular (Figura 28) de la cavidad receptora. Esta forma de sitio receptor es parecida a los modelos propuestos para otros flavonoides en varias cepas de hongos (Ibrahim et al., 1990a; 1990b).

El grado de oxigenación y la localización de las funciones oxigenadas en los compuestos activos, permiten especular la existencia de cinco sitios de interacción de naturaleza hidrofílica entre el flavonoide y el sitio receptor (Figura 28). Por otro lado, la naturaleza lipofílica y plana de los anillos A y C, permiten proponer dos sitios adicionales de unión

flavonoide-receptor de naturaleza lipofílica (Figura 28).

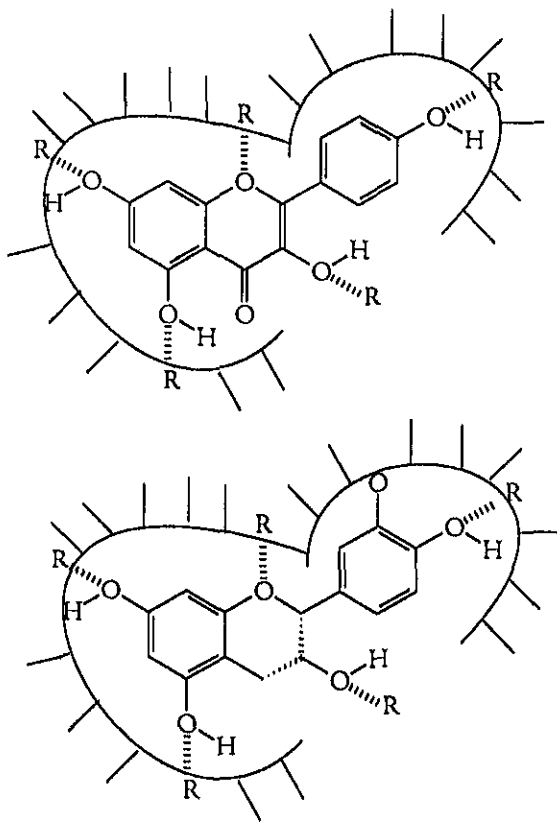


Figura 28. Modelos propuestos para la interacción de flavonoles y flavan-3-oles con el sitio receptor en los protozoarios *G. lamblia E. histolytica*.

En los modelos ilustrados en la Figura 28 se propone que el sistema de anillos A-C del núcleo base de un flavonoide se orienta de tal forma de que se

logren maximizar la interacción de éste con los receptores hidrofílicos y lipofilílicos (Ibrahim et al., 1990a; 1990b).

La pérdida de actividad en los flavonoles y los flavan-3-oles al incrementarse el número de hidroxilos en el anillo B (30, 94, 93, 78 y 186), indica que este anillo aromático se encuentra ubicado en una parte del receptor de tamaño definido donde sólo es posible la interacción del hidroxilo fenólico en 4B. Un incremento en el número de hidroxilos en el anillo B se traduce en una unión deficiente entre los sitios receptores y la molécula, con la consecuente pérdida de actividad biológica.

El incremento de actividad contra los trofozoitos de *G. lamblia* de los derivados 30a y 78a en comparación con sus flavonoides de origen (30 y 78) podría estar asociado con la transformación de sus grupos fenólicos libres y sugieren que los hidroxilos fenólicos libres son importantes para su metabolismo, ya que al ser

transformados en grupos funcionales no hidrolizables se presenta un gran incremento en la actividad biológica. Esta observación es congruente con el metabolismo de los flavonoides en bacterias y hongos, en donde éstos se metabolizan a través de los hidroxilos fenólicos libres (Udupa et al., 1969; Griffiths y Smith, 1972; Hattori et al., 1988; Ibrahim et al., 1990a; 1990b).

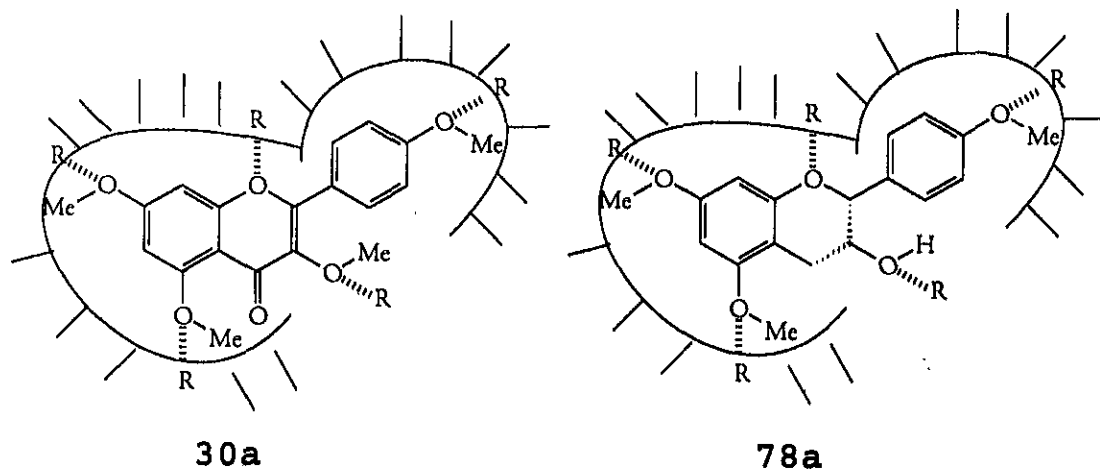


Figura 29. Interacción flavonoide receptor de los compuestos 30a y 78a

La pérdida drástica en la actividad contra *E. histolytica* de los derivados 30a y 78a comparada con el incremento del efecto observado en *G. lamblia* permite proponer una diferencia en el tamaño de la cavidad

receptora de los protozoarios. En *E. histolytica* sería más pequeña, de tal forma que al incrementar el tamaño de la molécula en los derivados metilados (30a y 78a), se incrementa el impedimento estérico para la interacción con el sitio receptor y, en consecuencia, se observa una pérdida en la actividad antiprotozoaria (Figura 30).

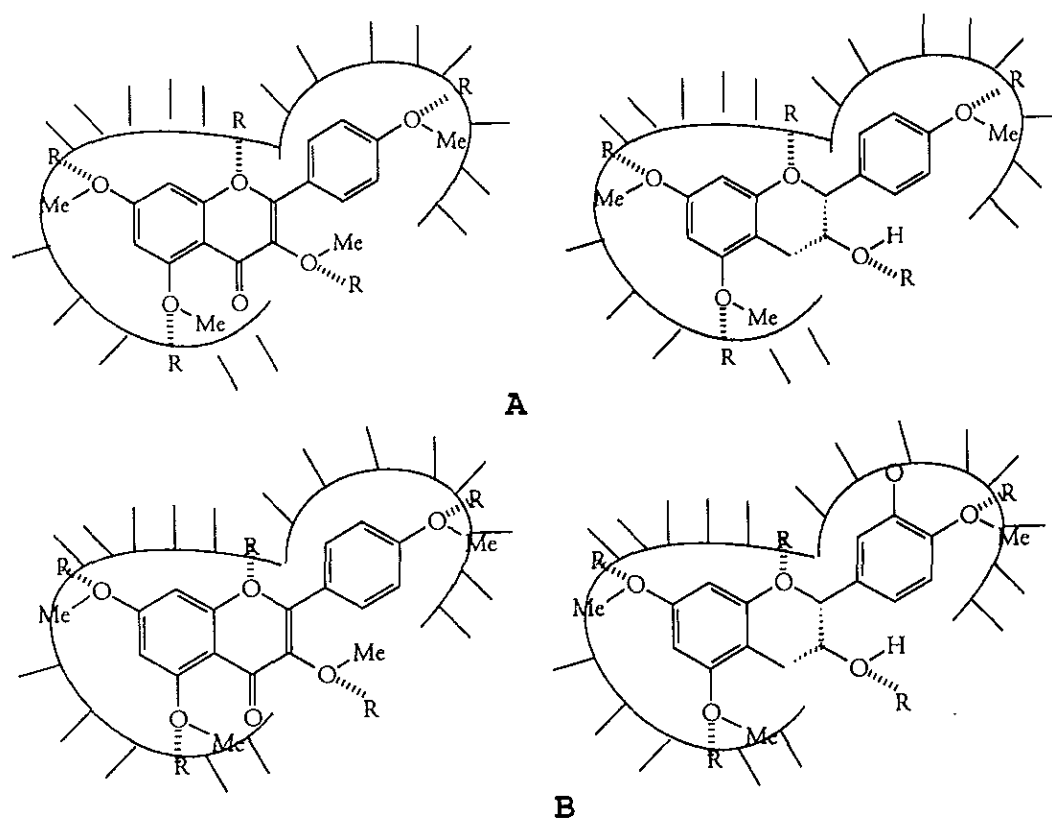


Figura 30. Interacción flavonoide receptor: (A) = *G. lamblia* y (B) = *E. histolytica*.

VI CONCLUSIONES

VI.1 Los resultados globales obtenidos en esta investigación demuestran que la selección de plantas mediante el criterio etnomédico y su estudio mediante el empleo de procedimientos biodirigidos constituyen métodos adecuados para la obtención de nuevos compuestos bioactivos, en este caso útiles para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la disentería amibiana y la giardiosis.

VI.2 Los resultados derivados de la evaluación de la actividad antiprotozoaria de las 19 plantas seleccionadas explican en alguna medida su uso en las prácticas médicas populares como agentes para el tratamiento de problemas gastrointestinales.

VI.3 El estudio fitoquímico biodirigido del extracto orgánico de las raíces de *G. niveum* permitió

el aislamiento de un fenol (el galato de metilo, 165), un terpenoide (el ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico, 166), dos flavonoides (la reinoutrina, 167; la hiperina, 168) y cinco análogos de proantocianidina del subtipo A-1, cuatro de ellos constituyen productos naturales novedosos (las geraninas A-D, 169-172). La geranina D es la tercera proantocianidina descrita en la literatura con una unidad adicional de flavan-3-ol en su estructura.

Los resultados obtenidos en *G. niveum* son de importancia quimiotaxonómica ya que por vez primera se describe la presencia de proantocianidinas y terpenoides del tipo oleaneno en el género *Geranium*. Cabe destacar que es la segunda ocasión en que se describe el aislamiento del ácido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico en la naturaleza.

De los ocho compuestos aislados de *G. niveum*, la geranina B fue el compuesto más activo contra los dos protozoarios de prueba y la geranina A resultó

altamente activa contra *G. lamblia*. Cabe mencionar que ninguna de las proantocianidinas diméricas, ni el extracto íntegro, presentaron actividad citotóxica contra las tres diferentes líneas celulares derivada de tumores humanos ensayadas.

La actividad antiprotozoaria demostrada para las proantocianidinas del subtipo A-1 y los terpenoides del tipo oleaneno, permite proponerlos como nuevos prototipos para el desarrollo de nuevos agentes antientamoeba y anti giardia.

VII.4 El estudio fitoquímico biodirigido del extracto orgánico de las partes aéreas de *C. filaginoides* condujo al aislamiento de un terpenoide (el eritrodiol, **151**) y ocho flavonoides glicosídicos, tres de los cuales constituyen flavonoles con estructuras novedosas (yaksininas A-C, **173-175**, respectivamente). Los compuestos isoquercitrina (**177**), nicotiflorina (**178**) y narcisina (**179**) se aislaron por

vez primera de esta especie vegetal; los dos restantes (la isoquercitrina, 177 y la rutina, 97) habían sido aislados previamente de esta misma fuente.

De los nueve compuestos aislados sólo el eritrodiol y la nicotinflorina mostraron actividad contra ambos protozoarios.

La actividad encontrada para los ocho flavonoles aislados confirma las propiedades antiprotozoarias descritas con anterioridad para esta clase de compuestos y reafirma su potencial para el desarrollo de nuevos fármacos útiles contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

VII.5 El estudio relación estructura química-actividad antiprotozoaria de flavonoides de origen natural permite concluir que los *cis*-flavan-3-oles son moléculas prototipo para el desarrollo de nuevos compuestos con propiedades antiprotozoarias.

La potencia anti-giardia que presenta la tetrametoxiepicatequina, que inclusive supera a la determinada para el metronidazol, permite concluir que este compuesto constituye un candidato idóneo para el desarrollo de agentes de uso terapéutico. Cabe destacar en este sentido que la síntesis de este producto y análogos no representa complejidad alguna.

VII.6 La poca actividad antiprotozoaria que presentaron los ácidos aromáticos y fenoles evaluados permiten concluir que es necesaria la integridad de los núcleos flavan-3-ol y flavonol para el efecto antiprotozoario.

VII.7 Los resultados derivados de esta tesis permiten concluir que la búsqueda de nuevos compuestos útiles para el desarrollo de fármacos con un potencial terapéutico a partir de plantas medicinales debe realizarse de manera multidisciplinaria.

En resumen, esta investigación constituye un aporte al conocimiento químico y farmacológico de la flora medicinal mexicana en particular de las especies *G. niveum* y *C. filaginoide*; una contribución al descubrimiento de moléculas prototipo para el futuro desarrollo de agentes terapéuticos para tratar enfermedades provocadas por protozoarios y, por último, una contribución al conocimiento de los protozoarios *E. histolytica* y *G. lamblia* en cuanto a su susceptibilidad a nuevos compuestos.

VII PERSPECTIVAS

VII.1 Dado que en esta investigación se demostró que los flavan-3-oles constituyen un nuevo prototipo estructural para la obtención de agentes antiprotozoarios de interés terapéutico, se continuará con la síntesis de compuestos análogos para dar inicio al trámite de una patente que respalde el desarrollo de

estos compuestos como agentes antiamebianos y anti-giardia. Así mismo, la obtención de los análogos permitirá ampliar el conocimiento, tanto químico como farmacológico de esta clase de compuestos.

VII.2 Completar el estudio químico y farmacológico de otras de las plantas antiprotozoarias encontradas en este estudio y generar un programa permanente de investigación de plantas medicinales mexicanas como una fuente potencial de agentes antiprotozoarios.

VIII BIBLIOGRAFIA

- Abdalla, S., Abu Zarga, M. H. y Sabri, S. (1994). Effects of the flavone luteolin, isolated from *Colchicum richii*, on guinea-pig isolated smooth muscle and heart and on blood pressure and blood flow. *Phytotherapy Research*, **8**, 265-270.
- Abdalla, S., Abu Zarga, M., Afifi, F., Al-Khalil, S. y Sabri, S. (1988). Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated guinea-pig smooth muscle. *Gen Pharmacology*, **19**, 559-563.
- Abu-Niaaj, L., Abu-Zarga, M., Sabri, S. y Abdalla, S. (1993). Isolation and biological effects of 7-o-methylepidictyol, a flavanone isolated from *Artemisia monosperma*, on rat isolated smooth muscles. *Planta Medica*, **59**, 42-45
- Acevedo, A. L. A. y Estrada, S. S. E. (1995). Tesis: *Estudio químico y biológico preliminar de Conyza*

filaginoides (D. C.) Hieron. (Astereaceae).

Facultad de Química, U.N.A.M.

Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jáquez, P. y López, M. E. (1994). *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. I.M.S.S. 43.

Alarcón, G. y Muñoz, R. M. (1997). Estudio comparativo: una toma al día de quinfamida, en el tratamiento de la amibiasis intestinal asintomática en niños. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, **XI**, 1-3.

Anderson, J. E., Goetz, C. M., Suffnes, M. y McLaughlin, J. L. (1991). A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis*, **2**, 107-111.

Arellano, J., Granados, J., Frenk, P., López-Osuna, M., Santos, I. y Kretschmer, R. (1992). Increased frequency of HLA-DR3 in mexican mestizo pediatric

patients with amebic liver abscess (ALA). *Archives of Medical Research*, **23**, 269-270.

Arnone, A., Nasini, G., Vajna, P. O. y Merlini, L. (1997). Constituents of dragon's blood. 5. Dracoflavans B₁, B₂, C₁, C₂, D₁, and D₂, new A-type deoxyproanthocyanidins. *Journal of Natural Products*. **60**, 971-975.

Arredondo, G. J. L. y Hernández, T. M. (1998). Diarrea infecciosa. En: *Subdirección General de Investigación. Instituto Nacional de Perinatología*. Ed. Schering -Plough.

Bader, G., Tuja, D., Wray, V. y Hiller, K. (1993). Flavonol glycosides from *Heteropappus altaicus* and *H. biennis*. *Planta Medica*, **59**, 284-285.

Baek, N-I., Chung, M-S., Shamon, L., Kardono, L. B. S., Tsauri, S., Padmawinata, K., Pezzuto, J. M., Soejarto, D. D. y Kinghorn, A. D. (1993). Selliguelain A, a novel highly sweet

- proanthocyanidin from the rhizomes of *Selliguea feei*. *Journal of Natural Products*, **56**, 1532-1538.
- Baek, N-I., Kennelly, E. J., Kardono, L. B. S., Tsauri, S. Padmawinata, K., Soejarto, D. D. y Kinghorn, A. D. (1994). Flavonoids and a proanthocyanidin from rhizomes of *Selliguea feei*. *Phytochemistry*, **36**, 513-518.
- Baldé, A. M., Pieters, L. A., Gergely, A., Kolodziej, H., Claeys, M. y Vlietinck, A. (1991). A-type proanthocyanidins from stem-bark of *Pavetta owariensis*. *Phytochemistry*, **30**, 337-342.
- Baldé, A. M., Pieters, L. A., Wray, V., Kolodziej, H., Berghe, D. A. V., Claeys, M. y Vlietinck, A. J. (1991b). Dimeric and trimeric proanthocyanidins possessing a doubly linked structure from *Pavetta owariensis*. *Phytochemistry*, **30**, 4129-4135.
- Baldé, A. M., Bruyne, T., Pieters, L., Kolodziej, H., Vanden, B. D., Claeys, M. Vlietinck, A. (1995a). Ologomeric proanthocyanidins possessing a doubly

linked structure from *Pavetta oawariensis*.
Phytochemistry, **38**, 719-723.

Baldé, A., Bruyne, T. D., Pieters, L., Kolodziej, H.,
Berghe, D. V., Claeys, M. y Vlietinck, A. (1995b).
tetrameric proanthocyanidins containing a doble
interflavanoid (A-type) linkage from *Pavetta*
owariensis. *Phytochemistry*, **40**, 933-938.

Barret, M. W., Klyne, W., Scopes, P. M., Fletcher, A.
C., Porter, L. J. y Haslam, E. (1979). Plant
proanthocyanidins. Part 6. Chiroptical studies.
Part 95. Circular dichroism of procyanidins.
Journal Chemical Society Perkin I, 2375-2377.

Barrientos, B. T. y Gutiérrez, L. M. T. (1994). Tesis:
Determinación de la actividad antimicrobiana y
citotóxica potencial de extractos derivados de
treinta especies vegetales utilizadas en la
medicina tradicional mexicana. Facultad de Química.

Bashir, A. K., Abdalla, A. A., Wasfi, I. A., Hassan, E.
S., Amiri, M. H. y Crabb (1994). Flavonoids of

Limonium axillare. *International Journal of Pharmacognosy*, **32**, 366-372.

Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A. y Del Río, J. (1997). Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 4504-4515.

Benítez, O., Uribe, F., Navarro, A., Hernández, D., Ruíz, J. y Cravioto, A. (1991). Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, **48**, 65-70.

Bennini, B., Chulia, A. J., Kaouadji, M. y Thomasson, F. (1992). Flavonoid glycosides from *Erica cinerea*. *Phytochemistry*, **31**, 2483-2486.

Beret, A. y Cazenave, J. P. (1986). The effects of flavonoids on blood vessel wall interaction. En : *Plant flavonoids in Biology and Medicine II : Biochemical, Pharmacological and structure-activity relationships*. Eds. Middleton, E., Harborne, J. y

B. Beretz, A. Progress in Clinical and Biological Research 280, Alan R. Liss Inc. New York, 187-200.

Biagi, F. (1981). Amibiases, En: *Antibiotics Chemotherapy*. Ed. Shogeld. New York S. Karger.

Bors, W., Hellers, W., Michael, C. y Saran, M. (1990a). Radical chemistry of flavonoids antioxidants. En: *Antioxidants in therapy and preventive medicine*. Ed. Emerit, Plenum Press, New York, 165-170.

Bors, W., Hellers, W., Michael, C. y Saran, M. (1990b). Flavonoids as antioxidant: Determination of radical-scavenging efficiencies. En: *Methods in enzymology*. Eds. Packer, L. y Glazer, A. Academic Press, San Diego, 343-345.

Braga, L. L., Mendonca, Y., Paiva, C. A., Sales, A., Cavalcante, A. L. M. y Mann, B. J. (1998). Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3044-3045.

- Bhutani, K. K., Sharma, G. L. y Ali, M. (1987). Plant based antiamebic drugs; Part I. Antiamebic activity of phenanthroindolizidina alkaloids; common structural determinants of activity with emetine. *Planta medica*, 532-536.
- Bye, R. (1985). En: *Two mummies from Chihuahua: A multidisciplinary study*. Eds. Tyson, R. A. y Elerick, D. V. San Diego Museum Papers, San Diego, 19, 77-104.
- Calzada, F., López, R., Meckes, M. y Cedillo-Rivera, R. (1995). Flavonoids of the aerial parts of *Hellianthemum glomeratum*. *International Journal of Pharmacognosy*, 351-352.
- Calzada, F., Alanís, A., D., Meckes, M., Tapia-Contreras, A. y Cedillo-Rivera, R. (1998). In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of Southern Mexico. *Phytotherapy Research*, 12, 70-72.

- Calzado-Flores, C. C., Segura-Luna, J. J., Domínguez, X. y García-González, S. (1986). *Castela texana*: cernimiento de su actividad anti-amibiana. *Archivos de Investigación Médica*, **17**, 127-134.
- Camacho, M. R., Sánchez, B., Quiroz, H., Contreras J. L. y Mata, R. (1991). Pinocembrine: a bioactive flavanone from *Teloxys graveolens*. *Journal of Ethnopharmacology*, **31** 383-389.
- Capasso, A., Pinto, A., Sorrentino, R y Capasso, F. (1991). Inhibitory effects of quercetin and other flavonoids on electrically-induced contractions of guinea-pig isolated ileum. *Journal of Ethnopharmacology*, **34**, 279-281.
- Capasso, A., Piacente, S., Cumanda, J., De Tommasi, N., Ragucci, M. y Pizza, C. (1998). Flavonol glycosides from *Croton menthodoros* reduce *in vitro* morphine withdrawal. *Pharmaceutical Biology*, **36**, 310-314.

- Carrero, J. C. y Laclette, P. (1996). Molecular Biology of *Entamoeba histolytica*: A review. *Archives of Medical Research*, **27**, 403-412.
- Cedillo-Rivera, R. (1989). Es la giardiasis un problema real. *Boletín Mensual Epidemiología*, **4**, 1-6.
- Cedillo-Rivera, R. y Muñoz, O. (1992). *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal Medical Microbiology*, **37**, 221-224.
- Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A., Torres, J. y Muñoz, O. (1997). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to fluoroquinolones, nitrofurans and other antiamebic agents. *Archives of Medical Research*, **28**, suppl. S295-S297.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K. Poel, B. V., Pieters, L., Vlietinck, A. J. y Berghe, D. V. (1998). Structure-activity relationship and classification of flavonoids as

- inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, **61**, 71-76.
- Conde-Bonfil, M. C. y Mora-Zerpa, C. (1992). *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Pública de México*, **34**, 335-341.
- Cordell, G. A. (1993). Pharmacognosy-new roots for an old science. En: *Studies in Natural Products Chemistry* , Vol.13. Elsevier Science Publisher. 629-675.
- Cordell, G. A. (1995). Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, **40**, 1585-1612.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. y Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, **60**, 52-60.
- Cronjé, A., Steynberg, J. P., Brandt, E. V., Young, D. A. y Ferreira, D. (1993). Oligomeric flavanoids. Part 16. Novel prorobinetidins and the first A-type proanthocyanidin with a 5-deoxy A- and a 3,4-cis C-ring from the maiden investigation of commercial

wattle bark extract. *Journal Chemical Society Perkin Trans I*. 2467-2477.

Chávez, B., Cedillo-Rivera, R. y Martínez-Palomo, P. (1992). *Giardia lamblia* : ultrastructural study of the *in vitro* effect of benzimidazoles. *Journal Protozoology*, **39**, 510-515.

Dale, J. A. y Mosher, H. S. (1973). Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, *o*-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters. *Journal of the American Chemical Society*, **95:2**, 512-519.

De Tommasi, N., Piacente, S., Gacs-Baitz, E., De Simone, F., Pizza, C. y Aquino, R. (1998). Triterpenoid saponins from *Spergularia ramosa*. *Journal of Natural Products*, **61**, 323-327.

Descher, E. E., Ruperto, J., Wong, G. y Newmark, H. L. (1993). The effect of dietary quercetin and rutin

on AOM-induced acute colonic epithelial abnormalities in mice fed a high-fat diet. *Nutr Cancer*, **20**, 199-204.

Devera, R., Nievla-Punos, G., Nastasi-Vatanese, J. A., Velázquez-Alvarez, V. J. y González-Meneses, R. (1998). Giardiasis en escolares de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar, Venezuela. *Revista Biomédica Universidad Autónoma de Yucatán*, **9**, 145-150.

Devon, T. K. y Scott, A. I. (1975). *Handbook of Naturally Occurring Compounds*. Academic Press: New York, Vol. I. 141.

Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Limusa. 81-90.

Domínguez, X. A. (1990). *Phytochemistry Methods Frontiers*. Revista Latinoamericana de Química.

Domínguez, X. A. (1973). Flavonoides y compuestos afines. En : *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa. 81-90.

DPN, *Dictionary of Natural Products*. (1994). Chapman & Hall Chemical Data Base. London, **3**, 3139.

Drewes, S., Taylor, C. W., Cunningham, A. B., Ferreira, D., Steenkamp, J. A. y Mouton, H. L. (1992). *Epi*afzelechin-(4 β ->8,2 β ->O->7)-*ent*-afzelechin from *Cassipourea gerrardii*, *Phytochemistry*, **31**, 2491-2494.

Drewes, S. y Taylor, C. W. (1994). Methylated A-type proanthocyanidins and related metabolites from *Cassipourea gummiflua*, *Phytochemistry*, **37**, 551-555.

Elangovan, V., Sekar, N. y Govindasamy, S. (1994). Chemopreventive potential of dietary bioflavonoids against 20-methylcholanthrene-induced tumorigenesis. *Cancer Letter*, **87**, 107-113.

Elsohly, H. N., Joshi, A. S. y Nimrod, A. C. (1999). Antigiardial isoflavones from *Machaerium aristulatum*. *Planta Medica*, **65**, 490.

Ekong, R., Partridge, S. J., Anderson, M. M., Kirby, G. C. y Warhusrt, D. C. (1991). *Plasmodium falciparum*

effects of phaeanthine, a naturally occurring bisbenzylisoquinoline-sensitive parasites *in vitro*, and its influence on chloroquine activity. *Ann Trop Med Parasitology.*, **85**, 205.

Drewes, S. E., Taylor, C. W., Cunningham, A. B., Ferreira, D., Steenkamp, J. A. y Mouton, C. H. L. (1992). Epiafzelechin- (4 β -> 2 β ->O->7)-entafzelechin from *Cassipourea gerrardi*. *Phytochemistry*, **31**, 2491-2494.

Drewes, S. E. y Taylor C. W. (1994). Methylated A-type proanthocyanidins and related metabolites from *Cassipourea gummiflua*. *Phytochemistry*, **37**, 551-555.

Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D. y Guo, Z. (1989). Las plantas medicinales en la terapéutica. *Bol Sanit Panam*, **107**, 314-329.

Ferreira, D. y Bekker, R. (1996). Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring o-heterocycles. *Journal of Natural Products Reports*, 411-433.

- Ferreira, D., Steynberg, J. P., Roux, D. G. y Brandt, V. (1992). Diversity of structure and function in oligomeric flavanoids. *Tetrahedron*, **48**, 1743-1803.
- Gadow, A., Joubert, E. y Hansmann, Ch. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), tocopherol, BHT, and BHA. *Journal Agricultural Food and Chemistry*, **45**, 632-638.
- Glasby, J. S. (1991). *Dictionary of planta containing secondary metabolites*. Taylot & Francis, London. 149.
- Gentry, H. S. (1942). *Rio May plants*. Carnegie Institution of Whashington, Washington, D.C. 156.
- Gómez, M. C., Pérez, D., Ayala, P., Samuelson, J. y Orozco, E. (1996). Physiology and Molecular Biology of multidrug resistance in *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research.*, **27**, 421-425.

- González-Garza, M. T., Matlin, S. A., Mata-Cárdenas, B. y Said-Fernández, S. (1992). Further studies on the *in vitro* activity of gossypol as antiamebic agent. *Archives of Medical Research*, **23**, 69-70.
- González-Ruíz, A., Haque, R., Rehman, T., Aguirre, A., Castañón, G., Hall, A., Guhl, F., Ruíz-Palacios, G., Warhurst, D. C. y Miles, M. A. (1992). Further diagnostic use of an invasive-specific monoclonal antibody against *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*, **23**, 281-283.
- Goodman, A., Goodman, L. y Rall, T. W. (1988). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed. Médica Panamericana, México.
- Goodman, L., Rall, W. T., Nies, A. S. y Palmer, T. (1990). Eight. Ed. *The pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press Ed.
- Griffiths, L.A., y Smith, G. E. (1972). Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. *Biochem Journal*, **128**, 901-911.

- Guarner, V. (1990). Amebiasis. Infection and disease by *Entamoeba histolytica*. Academic Press limited. Ed. Kretschmer, R. R. 222-235.
- Hammad, H. M. y Abdalla, S. S. (1997). Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activityrelationship. *Gen Pharmaceutical*, **28**, 767-771.
- Haque, R., Ali, J. K. M., Akther, S. y Petri, W.A. (1998). Comparison of PCR, isoenzyme analisis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 449-452.
- Harborne, J. B., Mabry, T. J. y Mabry M. (1975). *The Flavonoids*. Chapman and Hall Lyd., London.
- Harborne, J. B. y Mabry, T.J. (1982), *The Flavonoids*. Chapman and Hall Ltd., London.
- Harborne, J. B. (1995). Phenolics. En: *Natural products their chemistry and biological significance*. Eds: Mann, J., Davidson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe,

D. V. y Harborne, J. B. Longman Scientific & Technical, 361-388.

Hashimoto, F., Nonaka, G-I. y Nishioka, I. (1989). Tannins and related compounds. XC. 8-c-ascorbyl (-)-epigallocatechin 3-O-gallate and novel dimeric flavan-3-ols, oolonghomobisflavans A and B, from Oolong tea. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **37**, 3255-3263.

Haslam, E. (1989). *Chemistry & pharmacology of natural products. Plant polyphenols, vegetable tannins revisited.* Cambridge University Press Cambridge. **119**, 124-127 y 141-145.

Hasler, A., Gross, G-A., Meier, B. y Sticher, O. (1992). Complex flavonol glycosides from leaves of *Ginkgo biloba*. *Phytochemistry*, **31**, 1391-1394.

Hatano, T., Ogawa, N., Shingu, T. y Okuda, T. (1990). Tannins of Rosaceous plants. IX. *Chem Pharm Bull*, **38**, 3341-3346.

- Hattori, M., Shu, Y-Z., El-Sedawy, A. I., Namba, T., Kobashi, K. y Tomimori, T. (1988). Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. *Journal of Natural Products*, **51**, 874-878.
- Heo, H. Y., Lee, S. J., Kwon C. H., Kin, S. W., Sohn, D. H. y Au, W. W. (1994). Anticlastogenic effect of galangin against bleomycin-induced chromosomal aberrations in mouse spleen lymphocytes. *Mutat Research*, **311**, 225-229.
- Hergert, H. L. (1988). Biogenesis of condensed tannins-an overview. *Chemistry and significance of condensed tannins*. Ed. Hemingway, R. H. y Karchesy, J. J. Plenum Press, New York. 71-79.
- Hemingway, R. W. (1988). Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives. En: *Chemistry and significance of condensed tannins*. Ed. Hemingway, R. H. y Karchesy, J. J. Plenum Press, New York. 83-107.

- Heminway, R. W. y Laks, P. E. (1992). *Plant polyphenols, synthesis, properties, significance*. Plenum Press, New York. 171, 539-570 y 717-728.
- Hernández, F. (1959). *Historia Natural de la Nueva España*. U.N.A.M. 476.
- Hikino, H., Shimoyama, N., Kasahara, Y., Takahashi, M. y Konno, Ch. (1982). Structure of mahuannin A and B, hypotensive principles of *Ephedra* roots. *Heterocycles*, **19**, 1381-1384.
- Hosstetmann, K., Wolfender, J-L. y Rodriguez, S. (1997). Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica*, **63**, 2-10.
- Hundt, A. F., Burger, J. F. W., Steynberg, J. P., Steenkamp, J. A. y Ferreira, D. (1990). Absolute configurations of flavan-3-ols and 4-arylflavan-3-ols via modified Mosher's method. *Tetrahedron Letters*, **31**, 5073-5076.

- Ibrahim, A. y Abul-Hajj, Y. J. (1990a). Microbiological transformation of (+/-)-flavanone and (+/-)-isoflavone. *Journal of Natural Products*, **53**, 644-656.
- Ibrahim, A. y Abul-Hajj, Y. J. (1990b). Microbiological transformation of chromone, chromanone, and ring a hidroxyflavones. *Journal of Natural Products*, **53**, 1471-1478.
- Jung, K. Y., Do, J. CH. Y Son, K. H. (1993). Kaempferol 3-O-[6" -O-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl) glucoside] from leaves of *Polygala japonica*. *Phytochemistry*, **34**, 1196-1197.
- Kaouadji, M., Morand, J-M. y Garcia, J. Further acylated kaempferol rhamnosides from *Platanus acerifolia* Buds. *Journal of Natural Prododucts*, **56**, 1618-1621.
- Kandaswami, C., Perkins, E., Soloniuk, D. S., Drzewiecki, G. y Middleton, E. (1991). Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous

cell carcinoma *in vitro*. *Cancer letter*, **56**, 147-152.

Kasahara, Y., Shimoyama, N., Konno, Ch. y Hikino, H. (1983). Structure of mahuanin C, a hypotensive principle of *Ephedra* roots. *Heterocycles*, **20**, 1741-1744.

Katellaris, P. H., Naeem, A y Farthing, M. J. G. (1994). Activity of metronidazol, azithromycin and three benzimidazoles on *Giardia lamblia* growth and attachment to a human intestinal cell line. *Aliment Pharmacology Therapy* , **8**, 187-192.

Kaul, T. N., Middleton, E. y Ogra, P. L. (1985). Antiviral effects of flavonoids on human viruses. *Journal Medical Virology*, **15**, 71-79.

Keene, A. T., Harris, A., Phillipson, J. D. y Warhurst, D. C. (1986). *In vitro* amoebicidal testing of natural products; Part I. Methodology. *Planta Medica*, 278-284.

- Koch-Weser, J. M. D. y Goldman, P. M. D. (1980). Drug therapy. *The New England Journal of Medicine*, **303**, 1212-1218.
- Kolodziej, H., Sakar, M. S., Burger, J. W., Engelshove, R. y Ferreira D. (1991). A-type proanthocyanidins from *Prunus spinosa*. *Phytochemistry*, **30**, 2041-2047.
- Kolodziej, H., Ferreira, D., Lemiére, G., De Bruyne, T., Pieters, L. y Vlietinck A. (1993). On the nomenclature of oligoflavanoids with an A-type unit. *Journal of Natural Products*, **56**, 1199-1200.
- Kooststra, M. (1994). Protection from UV-B induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol Biol*, **26**, 771-774.
- Kretschmer, R. R. (1990). Amebiasis. Infection and diseases by *Entamoeba histolytica*. Ed. CRC Press Boston.
- Kumate, J., Muñoz, O., Gutierrez, G. y Santos, J. I. (1998). *Manual de infectología clínica*. 15 ed. 85-109.

- Larocca, L. M., Piantelli, M., Leone, G., Sica, S., Teofili, L., Benedetti-Panici, P., Scambia, G., Mancuso, S., Capelli, A. y ranelletti, F. O. (1990). Type II oestrogen binding sites in acute lymphoide and myeloid leukaemias: Growth inhibitory effect of oestrogen and flavonoids. *Br Journal Hematology*, **75**, 489-485.
- Lee, S-S., Wang, J-S. y Chen, K. Ch-S. (1995). Chemical constituents from roots of *Zizyphus jujuba* Mill. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **42** 77-82.
- Lewis, N. G. y Yamamoto, E. (1988). Tannins-their place inplant metabolism. En: *Chemistry and significance of condensed tannins*. Ed. Hemingway, R. H. y Karchesy, J. J. Plenum Press, New York. 23-46.
- Limasset, B., Ojasoo, T., Le Doucen, C. y Dore, J-C. (1999). Inhibition of chemiluminescence in human PMNs by monocyclic phenolic acids and flavonoids. *Planta Medica*, **65**, 23-29.

- Lindquist, H. (1996). *Microbiology Drugs Resistance*, 2, 433-434.
- Liu, H., Orjala, J., Sticher, O. y Rali, T. (1999). Acylated flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*. *Journal of Natural Products*, 62, 70-75.
- Liu, Y-L., Neuman, P., Timmermann, B. N. y Mabry, T. J. (1989). Techniques for flavonoid analysis. *Revista Latinoamericana de Química*. Suppl.I. 90-130.
- Manach, C., Regerat, F., Texier, O., Agullo, G., Demigne, C. y Remsey, C. (1996). Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr Research*, 16, 517-544.
- Markham, K. R. (1982). Introduction to the flavonoids. En : *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press.
- Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H. y Mabry, T. J. (1978). Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III, *Tetrahedron*, 34, 1389-1397.

- Markham, K. R. y Ternai, B. (1976). ^{13}C NMR o flavonoids-
II. *Tetrahedron*, **32**, 2607-2612.
- Martínez, M. (1989). *Las Plantas Medicinales de México*.
Ed. Botas. 291.
- Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada,
F., Rojas, I., Bye, R. y Linares, E. (1997). Smooth
muscle relaxing flavonoids and terpenoids from
Conyza filaginoides. *Planta Medica*, **63**, 31-35.
- Mayoral, G. R. A. y Torres, R. E. (1996). Eficacia
comparativa entre quinifamida y metronidazol en el
tratamiento de la amibiasis luminal. *Acta Médica
Escuela Superior de Medicina I. P. N.*, **31**, 53-58.
- Meckes, M., Calzada, F., Paz, D. y Rodríguez, J (1997).
Program and abstracts. The 38 th. Annual meeting of
the ASP. 97.
- Meckes, M., Paz, D., Acosta, J. y Mata, R. (1998). The
effects of chrysin and pinostrobin, two flavonoids
isolated from *Teloxys graveolens*, on isolated
guinea-pig ileum. *Phytomedicine*, **5**; 459-463.

- Meloni, B. P., Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A. y Seville, P. (1990). Albendazole: a more effective anti-giardial agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **84**, 375-379.
- Middleton, E. Jr. (1988). Plant flavonoid effects on mammalian cell systems. En: *Herbs, Spices, and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture, and Pharmacology*. Vol. 3. Eds. Craker, L. E y Simon, J. E. ORYX PRESS. 103-144.
- Middleton, E. Jr. M. D. (1996). Biological properties of plant flavonoids: an overview. *International Journal of Pharmacognosy*, **34**, 344-348.
- Morales, M. A., Tortoriello, J., Meckes, M., Paz, D. y Lozoya, X. (1994). Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Archives of Medical Research*, **25**, 17-21.

- Mori, A., Nishino, Ch., Enoki, N. y Tawata S. (1987).
Antibacterial activity and mode of action of plant
flavonoid against *Proteus vulgaris* and
Staphylococcus aureus. *Phytochemistry*, **26**, 2231-
2234.
- Morimoto, S., Nonaka, G-I. y Nishioka, I. (1987).
Tannins and related compounds. LIX. Aesculitannins,
novel proanthocyanidins with doubly-bonded
structures from *Aesculus hippocastanum* L. *Chemical
Pharmaceutical Bulletin*, **35**, 4717-4729.
- Morimoto, S., Nonaka, G-I., Nishioka, I. (1988). Tannins
and related compounds. LX. Isolation and
characterization of proanthocyanidins with a
doubly-linked unit from *Vaccinium vitis-idaea* L.
Chemical Pharmaceutical Bulletin, **36**, 33-38.
- Mustafa, E. H., AbuZarga, M. y Abdalla, S. (1992).
Effects of cirsiol, a flavone isolated from
Achillea fragrantissima, on rat isolated ileum. *Gen
Pharmacol*, **23**, 555-560.

- Nash, T. y Rice, W. G. (1998). Efficacies of Zn-finger active drugs against *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, 1488-1492.
- Navarro, J. (1992). *Historia Natural del Jardín Americano*. U.N.A.M-I.M.S.S.-I.S.S.T.E. 291.
- Nonaka, G-I., Morimoto, S., Kinjo, J-I., Nohara, T. Y Nishioka, I. (1987). Tannins and related compounds. L. Structures of proanthocyanidin A-1 and related compounds. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **35**, 149-155.
- Nishino, Ch., Enoki, N., Tawata, S., Mori, A., Kobayashi, K. y Fukushima, M. (1987). Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. *Agricultural Biology Chemistry*, **51**, 139-143.
- Noori, S., Al-Waili, N. S., Al-Waili, B. H. y Sallom, K. Y. (1988). Therapeutic use of mebendazole in giardial infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **82**, 438.

Ohigashi, H., Minami, S., Fukui, H., Koshimizu, K., Mizutani, F., Sugiura, A. y Tomana, T. (1982). Flavonols, as plant growth inhibitors from roots of peach, *Prunus persica*. *Agricola Biology Chemistry*, **46**, 2555-2561.

Olarte, J. (1992). Etiología de las diarreas infecciosas: viejos y nuevos agentes. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México.*, **49**, 143-150.

Oliver-Bever, B. (1986). *Medicinal plants in tropical West. Africa*. Cambridge University Press, Cambridge.

Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y. y Kakisawa, H. (1991). High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configuration of terpenoids. *Journal of the American Chemical Society*, **113**, 4092-4096.

Padilla, R. N., Figueroa, F. R., Rivera, S. Ma. R., Alarcón, A., Muñoz, M. (1997). Estudio comparativo: una toma a un día contra dos tomas al día de

quinfamida, en el tratamiento de la amibiasis intestinal asintomática en niños. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría.*, **11**, 1-3.

Pant, G., Nautiyal, K. A., Rawat, M. S. M., Sutherland, J. K. Morris, G. A. (1992). Identification and Ab Initio carbon-13 NMR assignment of a proanthocyanidin from *Prunus jacquemontii*, *Magnetic Resonance in Chemistry*, **30**, S142-S147.

Pelter, A., Ward, R. S. y Gray, T. I. (1976). The carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of flavonoids and related compounds, *Journal Chemical Society Perkin I*, 2475-2483.

Peterson, G. y Barnes, S. (1993). Genistein and biochain A inhibit the growth of human prostate cancer cells but not epidermal growth factor receptor tyrosine autophosphorylation. *Prostate*, **22**, 335-345.

Phillipson, J. D. (1991a). A matter of some sensitivity. *Phytochemistry*, **38**, 1319-1343.

- Phillipson, J. D. (1991). Assays for antimalarial and amoebicidal activities. En: *Methods in Plant Biochemistry* .Vol. 6. Academic Press Limited. 135-152.
- Phillipson, J. D., y O'Neill, M. J. (1987). Antimalarial and amoebicidal natural products. En: *Biologically Active Natural Products*. Ed. Hostettmann, K y Lea, P. J. Claredon Press Oxford, 49-64.
- Phillipson, J. D., Wright, C. W., Kirby, G.C. y Warhurst, D. C. (1995). Phytochemistry of some plants used in traditional medicine for the tretment of protozoal diseases. En: *Phytochemistry of plants used in traditional medicine*. Ed. Hostettmann, K., Marston, A., Maillard, M. y Hamburger, M. Oxford Science Publications. 94-135.
- Polya, G. M. y Foo, L. Y. (1994). Inhibition of eukaryote signal-regulated protein kinases by plant-derived catechin-related compounds. *Phytochemistry*, 35, 1399-1405.

- Ponce-Macotela, M., Navarro-Alegría, I., Martínez-Gordillo, M. N. y Alvarez-Chacón, R. (1994). *Revista de Investigación Clínica.*, **46**, 343-347.
- Porter, L. J., Ma, Z. y Chan, B. G. (1991). Cacao procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry*, **30**, 1657-1663.
- Rascon-Torres, R., Cornelio, S., Carabeo, I. (1994). En: *Flora medicinal indígena de México*. Eds. Aguilar, A., Argueta, A., Cano, L. Instituto Nacional Indigenista, México. 325-362.
- Rodríguez-García, R., Aburto-Bandala, M. y Sánchez-Maldonado, M. I. (1996). Eficacia del albendazol en el tratamiento de giardiasis en niños. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, **53**, 173-177.
- Rojas, A., Cruz, S., Ponce-Monter, H. y Mata, R. (1996). *Planta Medica*, **62**, 184-189.

- Romero-Cabello, R., Robert. L., Muñoz-García, R. y Tanaka, J. (1995). Estudio aleatorio para comparar seguridad y eficacia de albendazol y metronidazol en el tratamiento de giardiasis en niños. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **37**, 315-323.
- Romero, R., Robert, L., Muñoz, R., Alarcón, A., Tay, J. y Sánchez, J. M. (1997). Tratamiento profiláctico con quinfamida para el control comunitario de las infecciones intestinales por *Entamoeba histolytica*. *Parasitología al Día*, **21**, 97-103.
- Rossow, W., Hundt, A. F., Steenkamp, J. A. y Ferreira, D. (1994). Oligomeric flavonoids. Part 17. Absolute configurations of flavan-3-ols and 4-arylflavan-3-ols via the Mosher method. *Tetrahedron*, **50**, 12477-12488.
- Sanz, J. F. y Marco, J. A. (1991). Ein neues butenolid aus *Conyza bonariensis*. *Liebigs Ann Chem*, 399-400.
- Saturnino, P., Capasso, A., Saturnino, C., De Martino, G., Lozano, N. y Aquino, R. (1997). Flavonol

glycosides from *Aristeguieta discolor* and their inhibitory activity on electrically-stimulated guinea pig ileum. *International Journal of Pharmacognosy*, **35**, 305-312.

Searle. (1999). Cuarta reunión de expertos en ambiasis. Searle.

Secretaría de Salud. (1993). Guía para el manejo efectivo de niños con enfermedad diarreica y pacientes con cólera. S. S. A. 7a Ed. México. Ed. Mota, H. F.

Sen, S., Sahu, N. P. y Mahato, S. B. (1992). Flavonol glycosides from *Calotropis gigantea*, *Phytochemistry*, **31**, 2919-2921.

Scambia, G., Ranelletti, F. O., Benedetti-Panici, P., Piantelli, M., Bonanno, G., De Vincenzo, R., Ferrandina, G., Rumi, C., Larocca, L. M. y Mancuso, S. (1990). Inhibitory effect of quercetin on OVCA433 cells and presence of type II oestrogen

binding sites in primary ovarium tumors and cultured cells. *Br Journal Cancer*, **62**, 942-946.

Shigematsu, N., Kouno, I. y Kawano, N. (1982).
Quercetin-3-(6" -caffeoylgalactoside) from
Hydrocotyle sibthorpioides. *Phytochemistry*, **21**,
2156-2158.

Shukla, S. C. y Das, S. R. (1988). Cure of amoebiasis by
seed powder of *Cassia fistula*. *International
Journal of Crude Drug Research*, **26**, 141-144.

Sohni, Y. R., Kaimal, P. y Bhatt, R. M. (1995). The
antiamoebic effect of a crude drug formulation of
herbal extracts against *Entamoeba histolytica* in
vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology.*,
45, 43-52.

Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography, A
Laboratory Handbook. Spring-Verlag, New York.

Stobiecki, M. y Popenda, M. (1994). Flavan-3-ols from
seeds of *Lupinus angustifolius*. *Phytochemistry*, **37**,
1707-1711.

- Torres, J., González-Arroyo, S., Pérez, R. y Muñoz, O. (1995). Inappropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbiological studies. *Archives of Medical Research*, **26**, 23-29.
- Udupa, S. R., Banerji, A. y Chadha, M.S. (1969). Microbiological transformations of flavonoids-II. *Tetrahedron*, **25**, 5415-5419.
- Vivas, N., Glories, Y., Pianet, I., Barbe, B. y Laguerre, M. (1996). A complete structural and conformational investigation of procyanidin A2 dimer. *Tetrahedron Letters*, **37**, 2015-2018.
- Vlietinck, A. R. (1987). *Biologically active substances from traditional drugs*. En: *Biologically active natural products*. Ed. Hostettmann, K. y Lea, P. J. Claredon Press, Oxford. 33-47.
- W. H. O. (1991). Tropical and intestinal parasitic diseases. En: *World health statistical annual*, WHO 199. 15-18.

- Waldworth, A. N. y Faulds, D. (1992). Hydroxyethylrutinosides: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in venous insufficiency and related disorders. *Drugs*, **44**, 1013-1032.
- Wang, M., Shao, Y., Li, J., Zhu, N., Rangarajan, M., La Voie, E. J. y Ho CH-T. (1999). Antioxidative phenolic glycosides from Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Natural Products*, **62**, 454-456.
- Wright, W. C., O'neill, M. J., Phillipson, J. D. y Warhurst, D.C. (1988). Use of microdilution to assess *in vitro* antiamebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* Stem, and a number of quassinoids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **32**, 1725-1729.
- Wright, W. C., Allen, D., Cai, Y., Chen, Z., Phillipson, J. D., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., Tits, M. y Angenot, L. (1994). Selective antiprotozoal

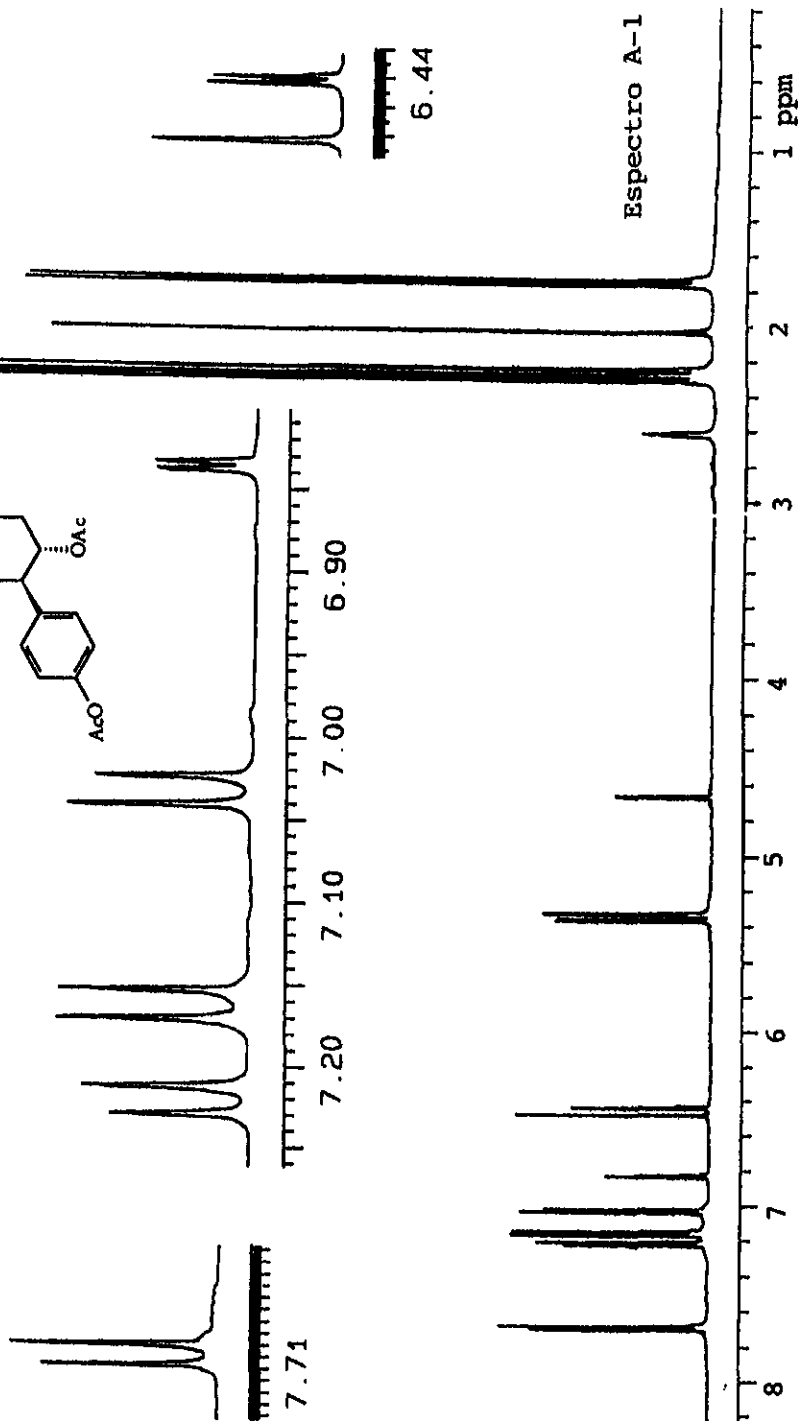
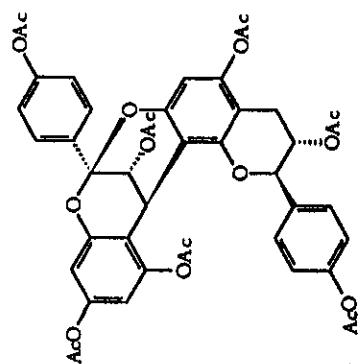
activity of some *Strychnos* alkaloids. *Phytotherapy Research.* , 8, 149-152

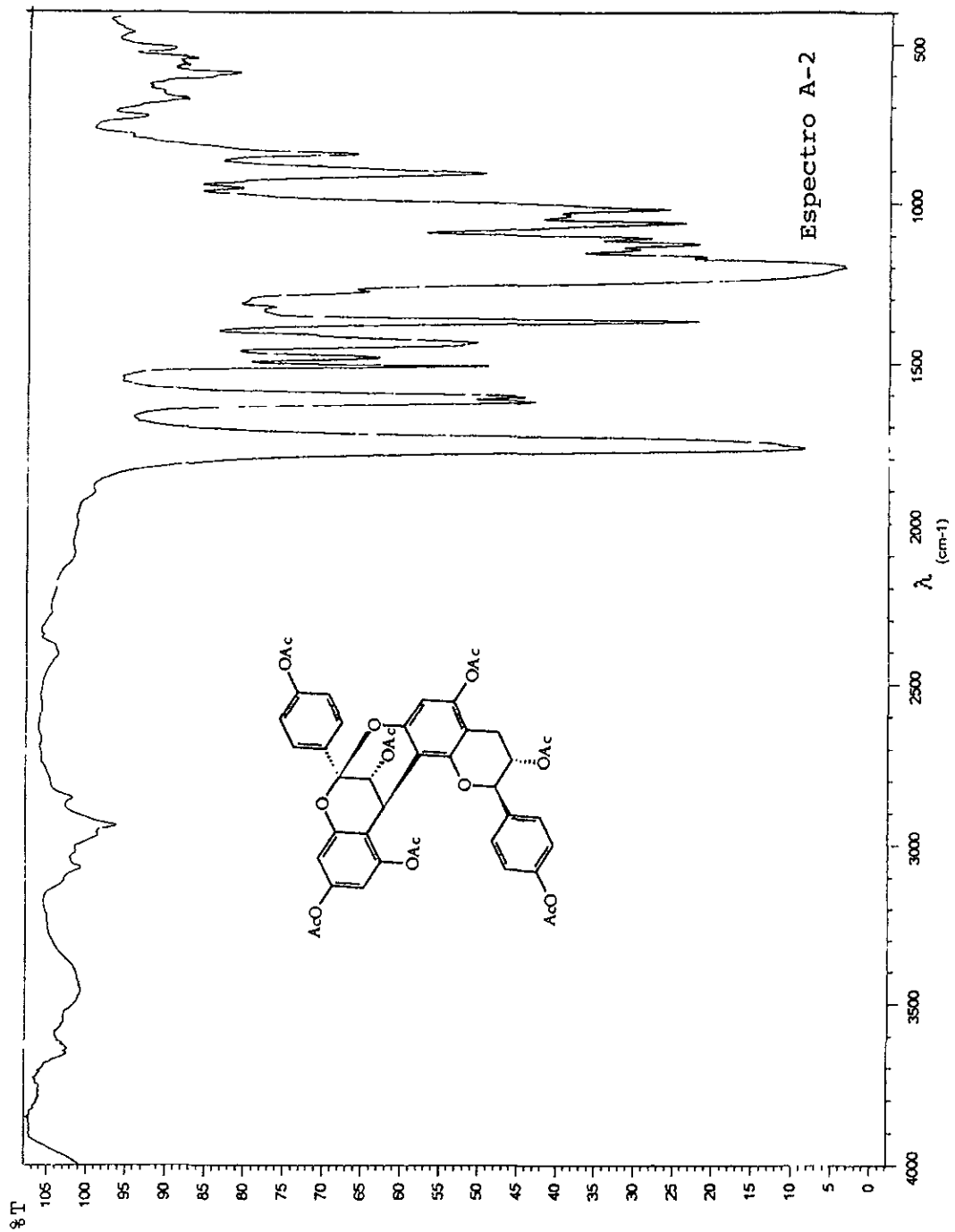
Yoshida, M., Sakai, T., Hosokawa, N., Marui, N., Matsumoto, K., Nishino, H. y Aoike, A. The effec of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. *FEBS Letter*, 260, 10-13.

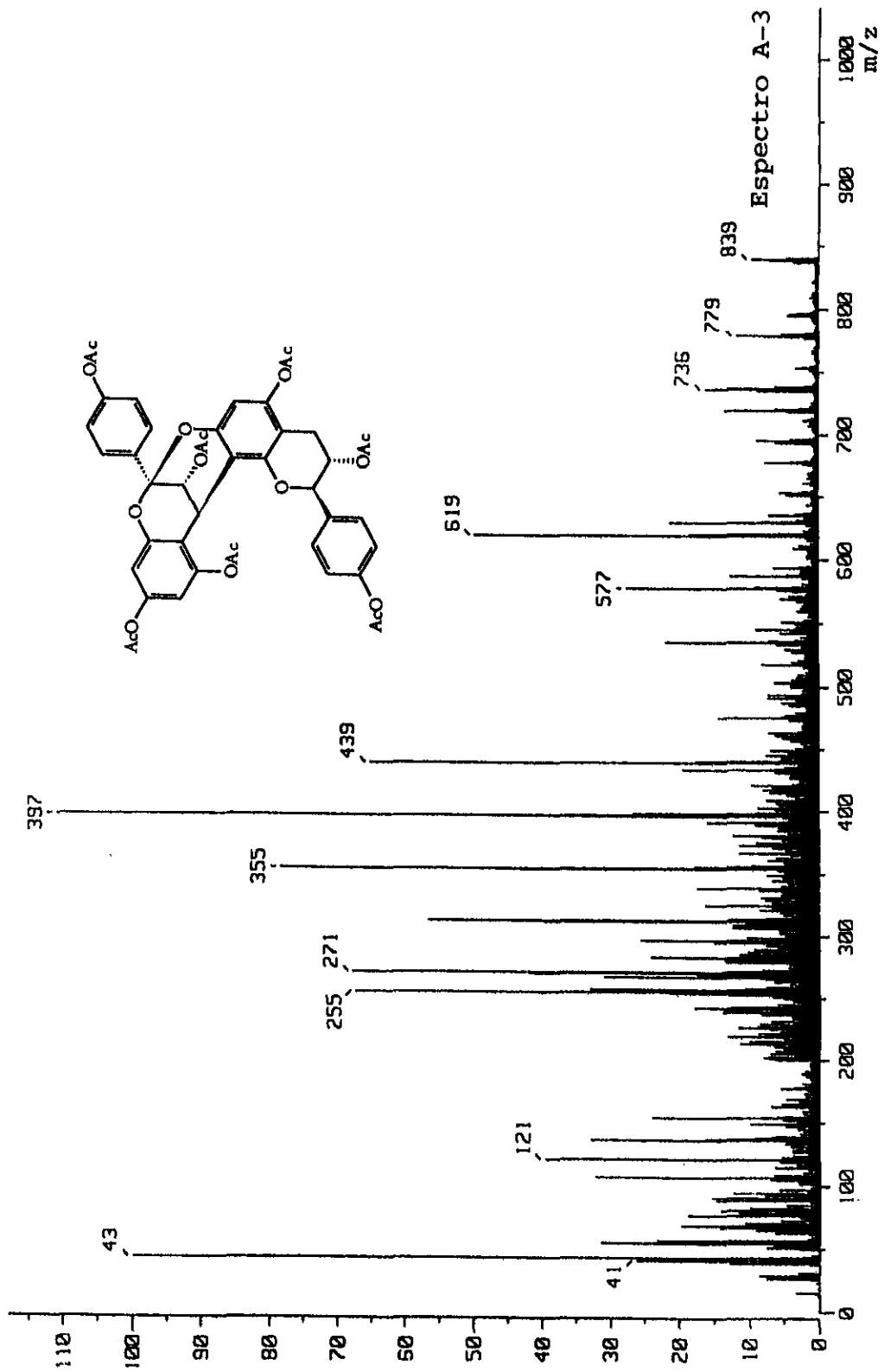
Yoshikawa, M., Murakami, T., Shimada, H., Yoshizumi, S., Saka, M., Yamahara, J. y Matsuda, H. (1998). Medicinal foodstuffs. XIV. *Chemical Pharmaceutical Bull*, 46, 1008-1014.

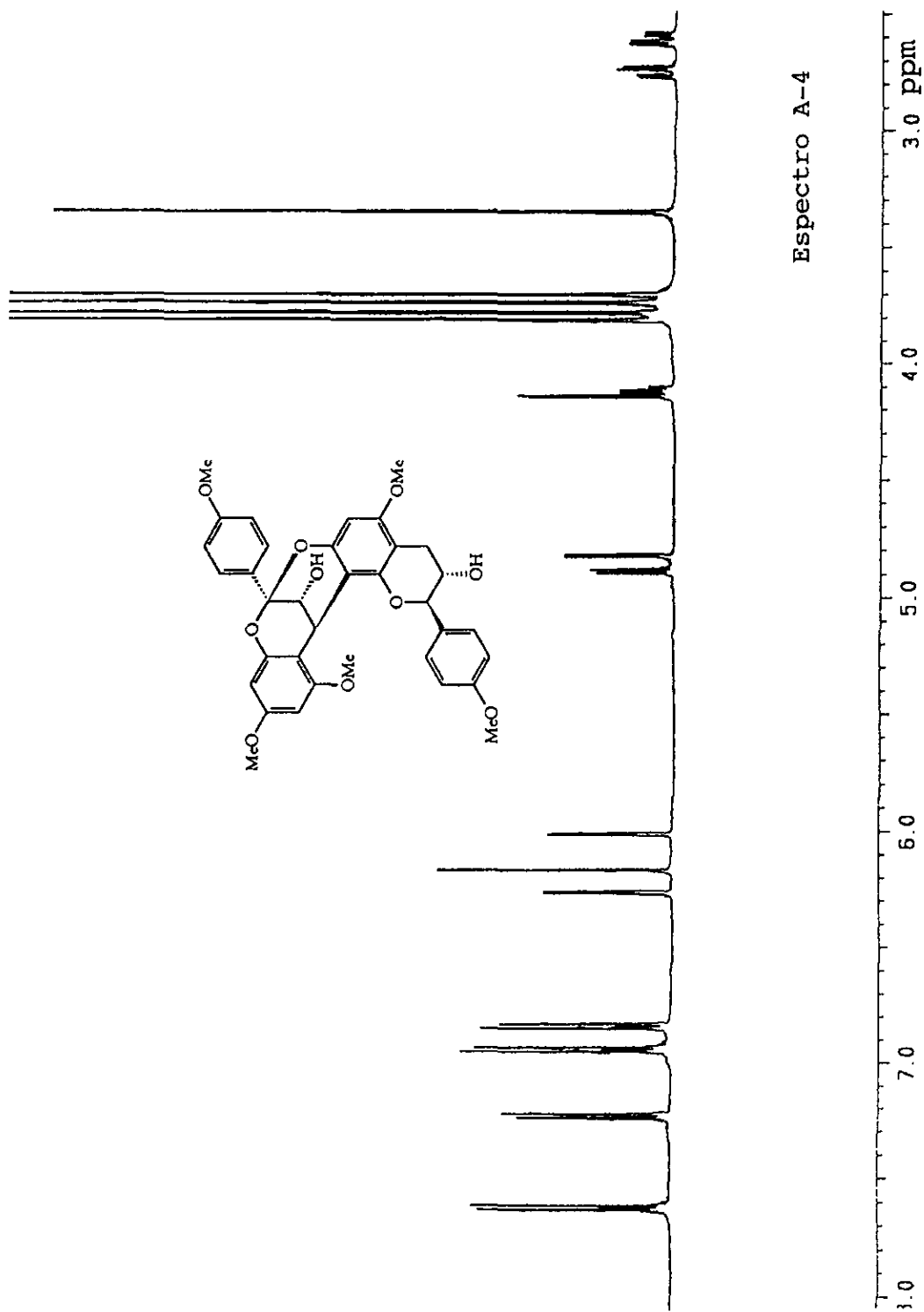
Yun, B-S., Ryoo, I-J., Lee, I-K., Park, K-H., Choung, D-O., Han, K-H. y Yoo, I-D. (1999). Two bioactive pentacyclic triterpene esters from the root bark of *Hibiscus syriacus*. *Journal of Natural Products*, 62, 764-766.

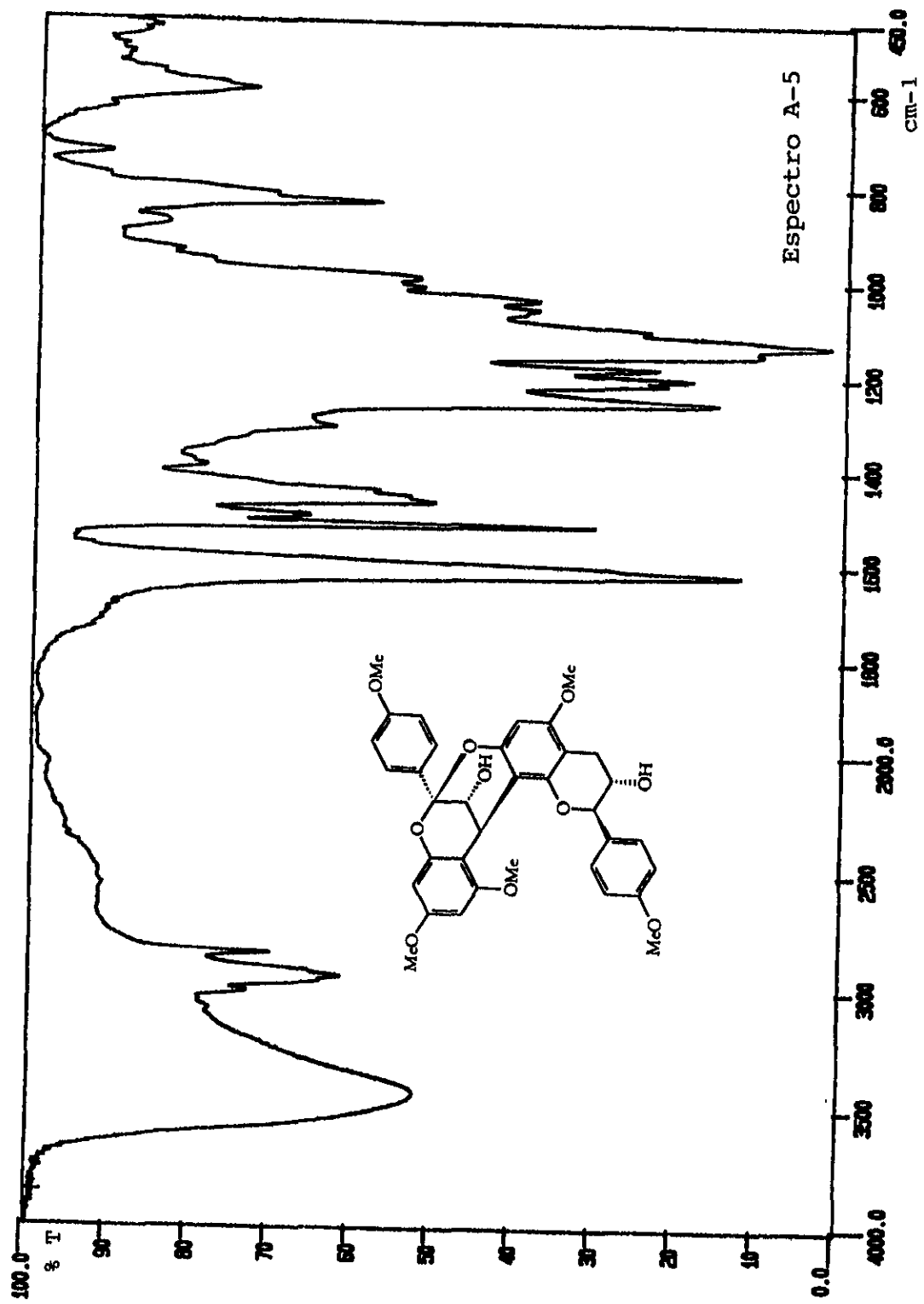
APENDICE A

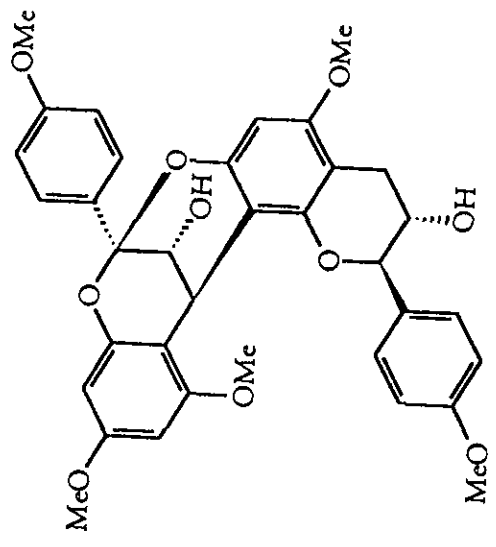
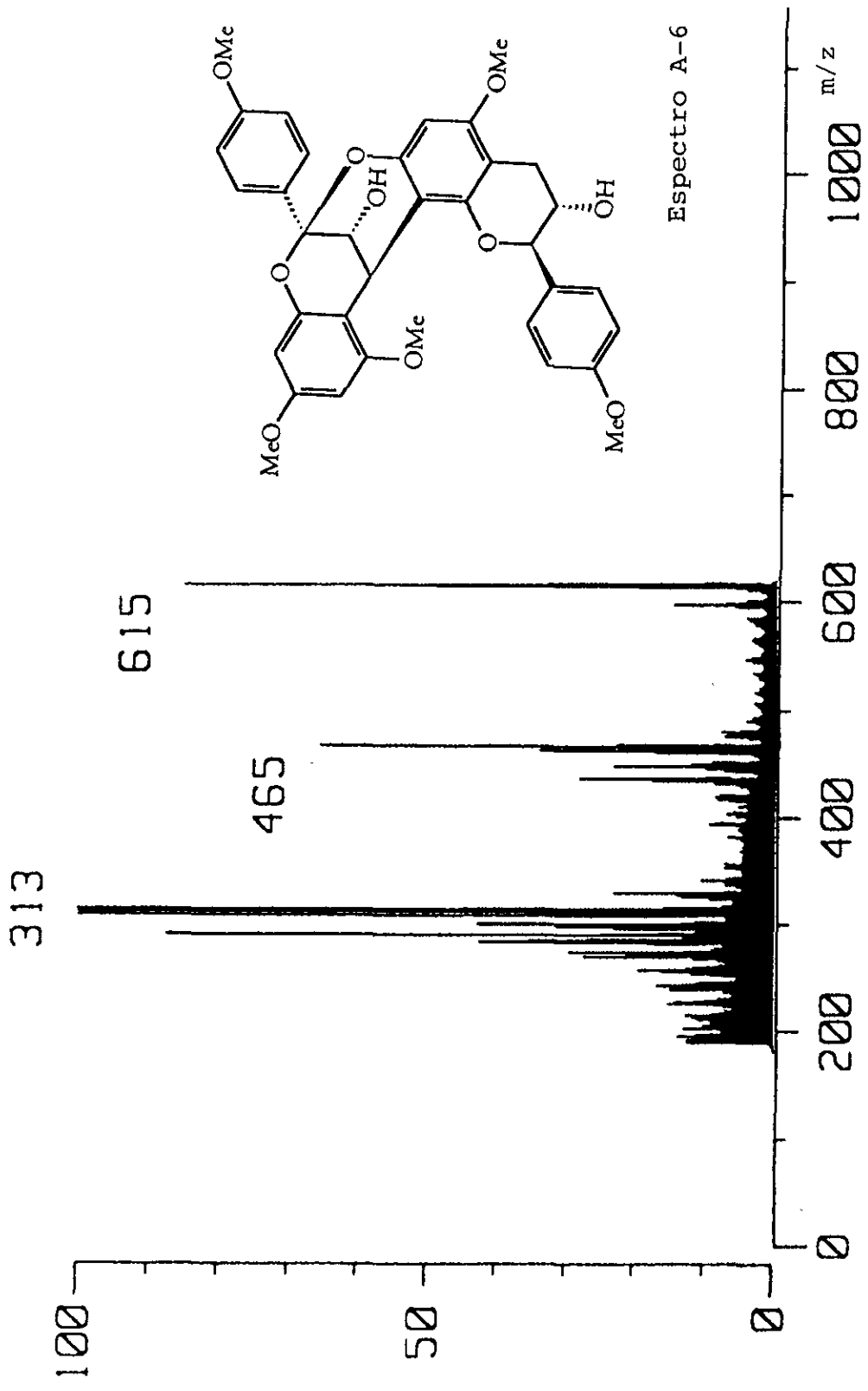


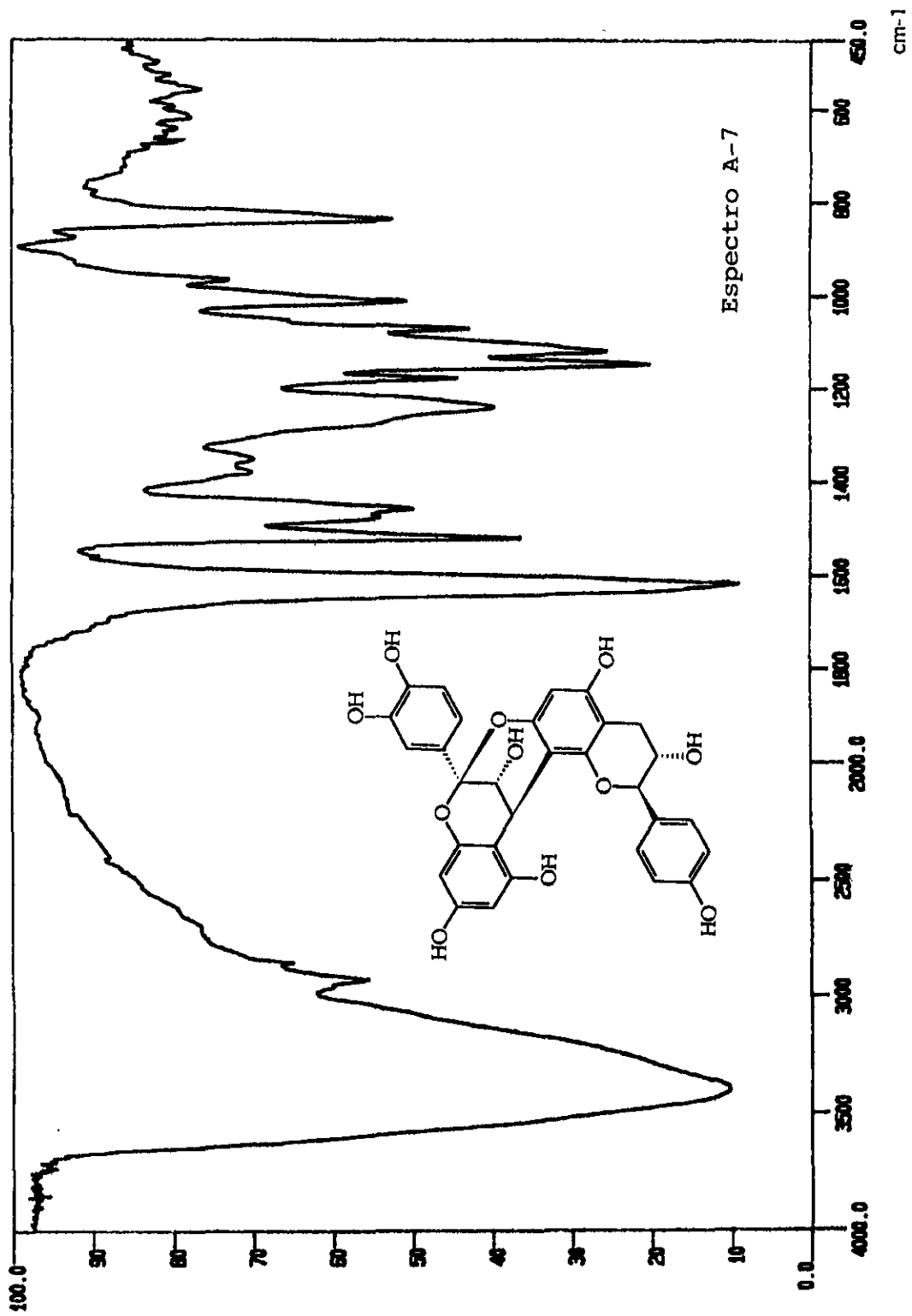




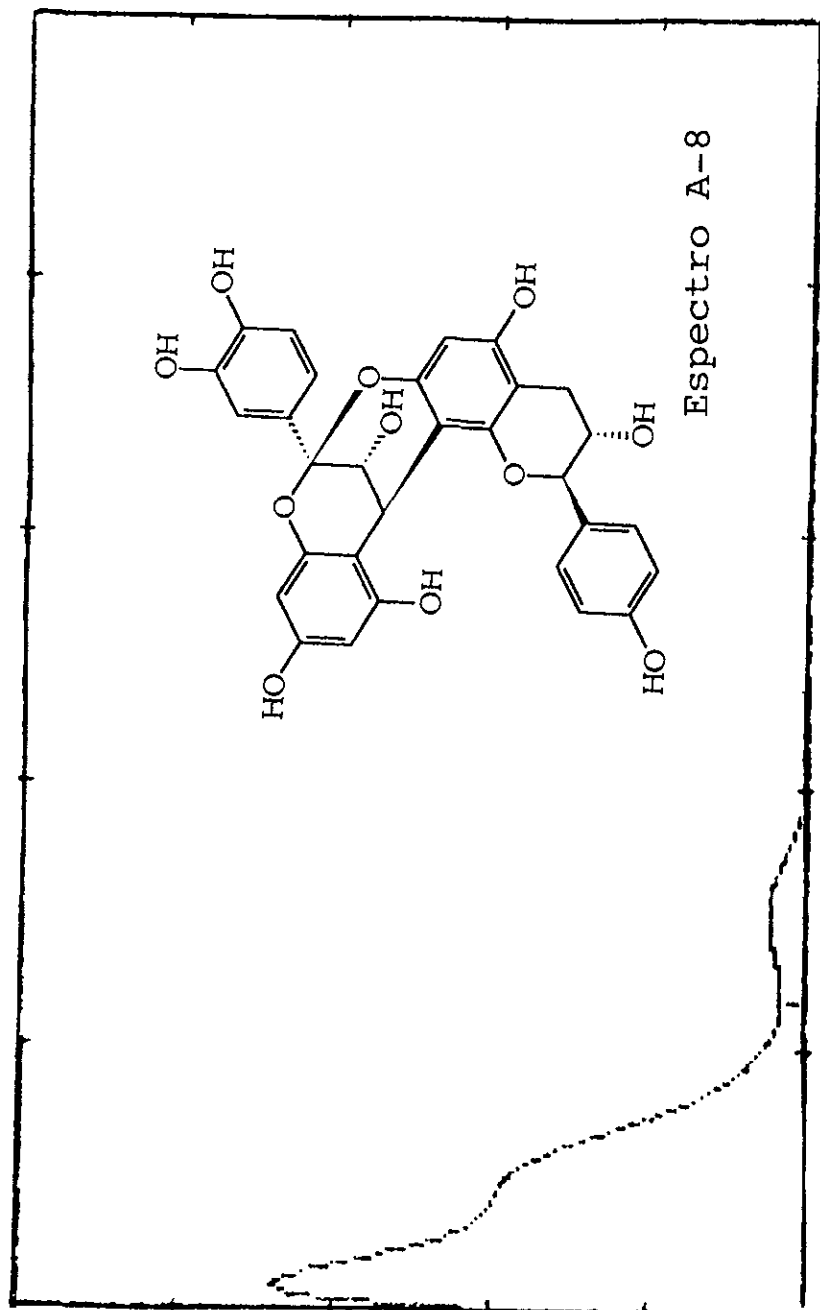








11.000

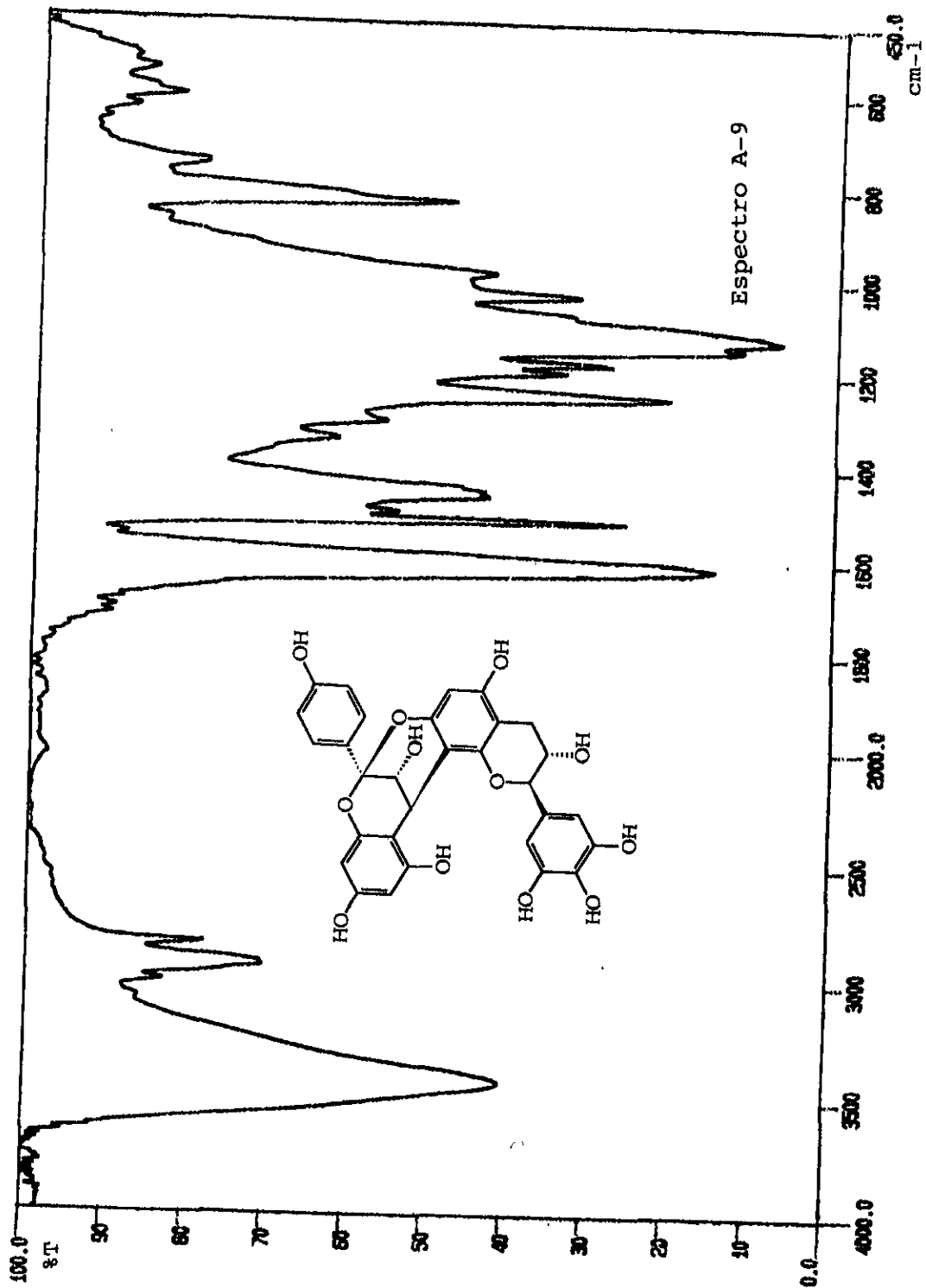


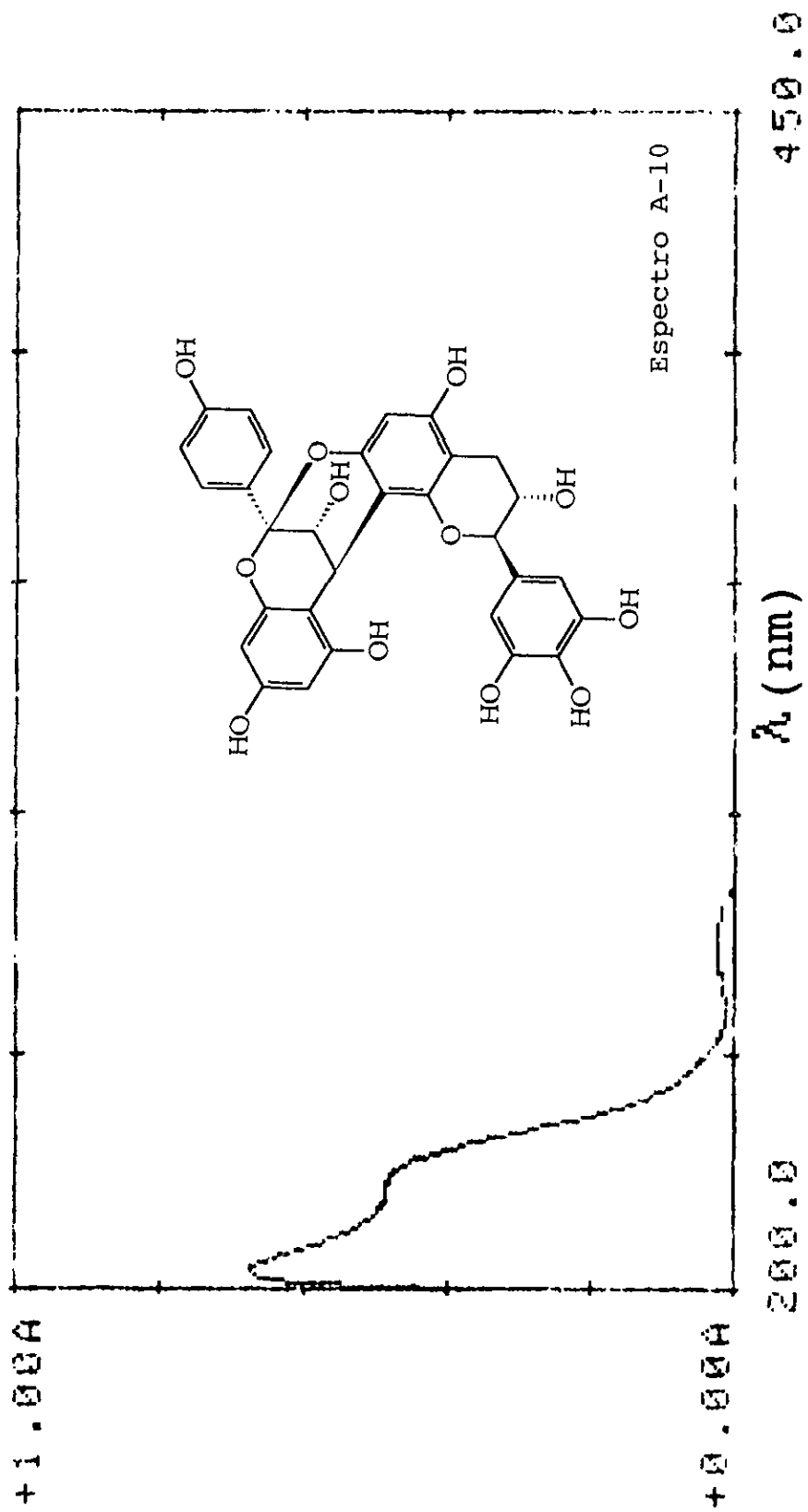
0.000

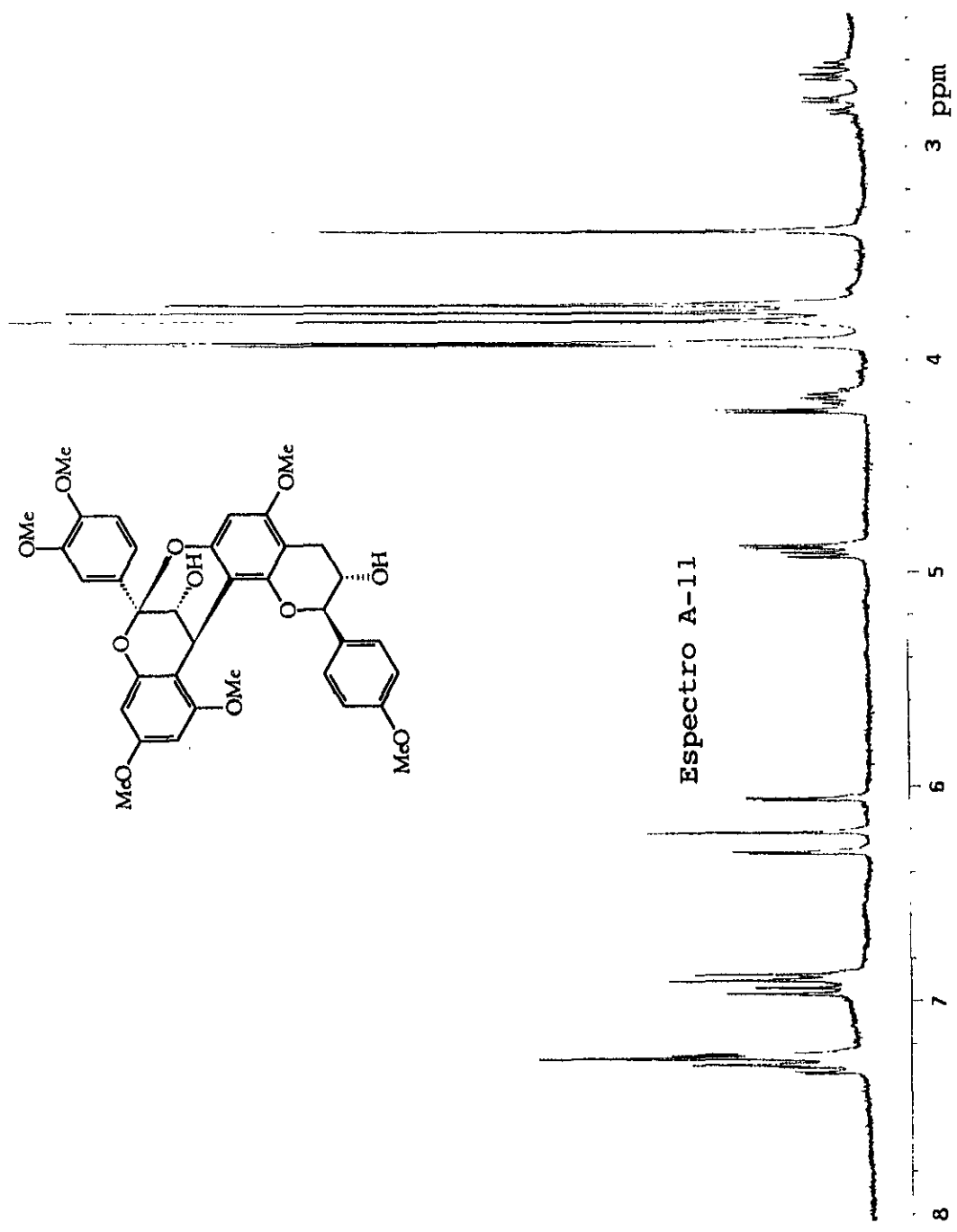
200.0

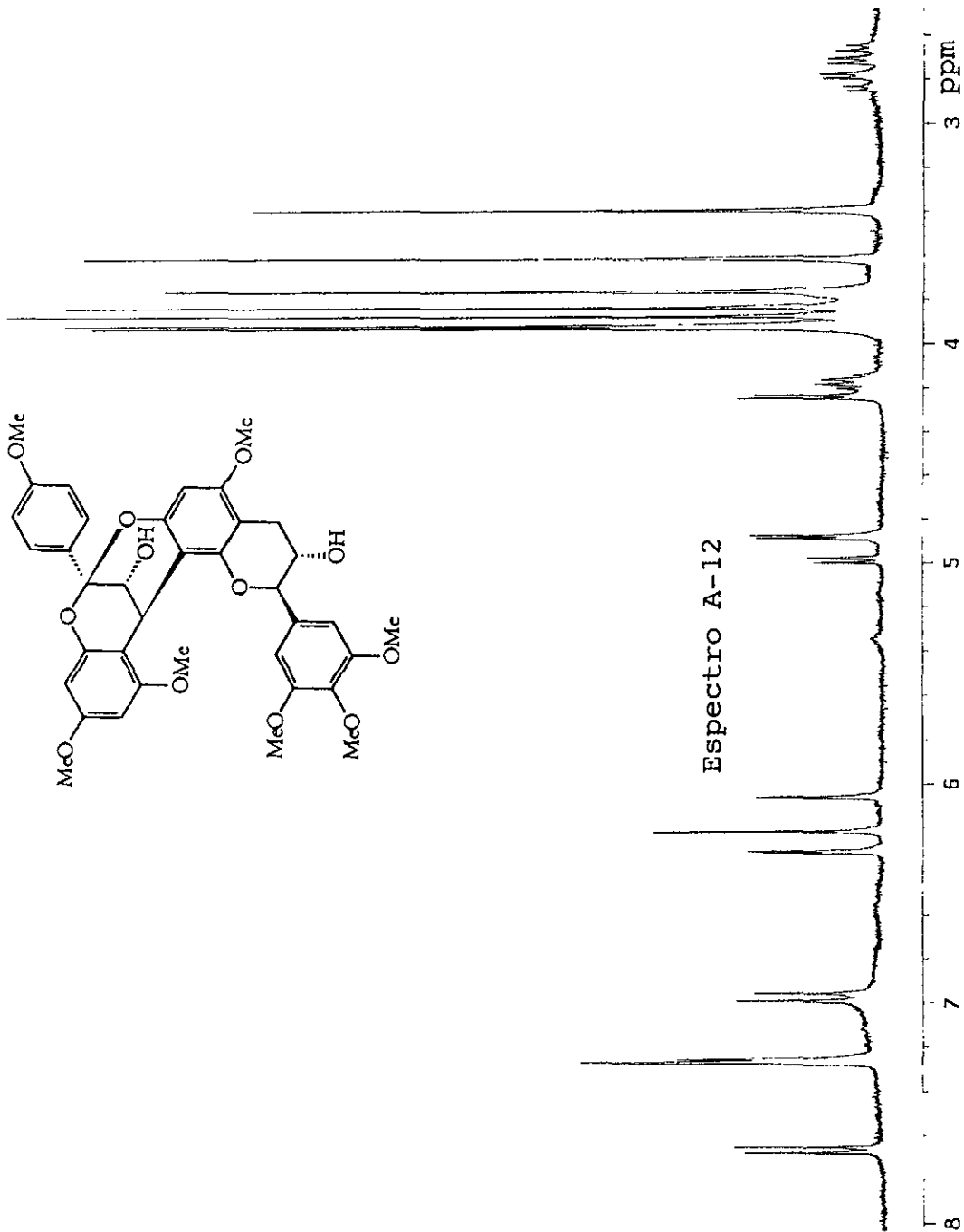
λ (nm)

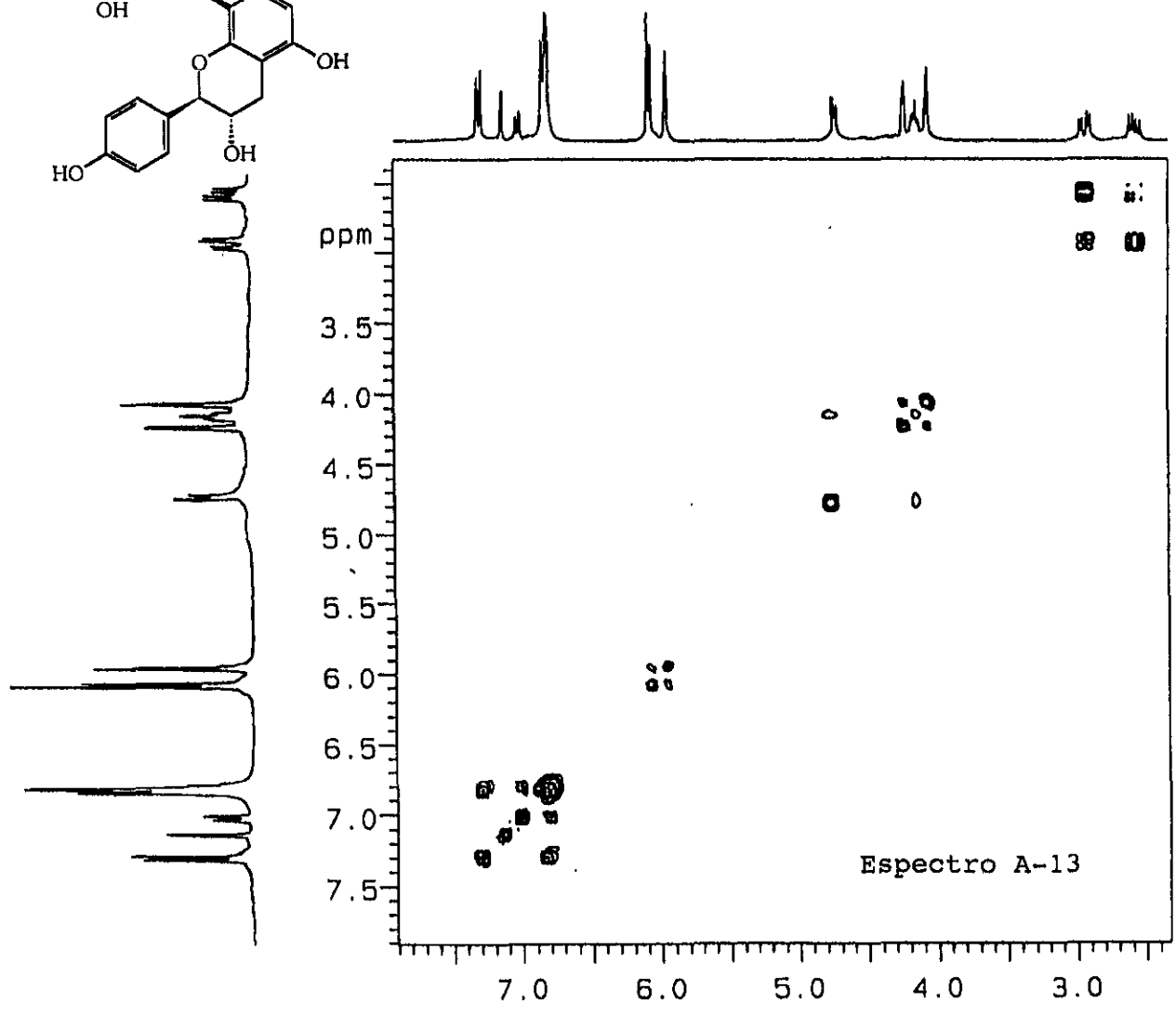
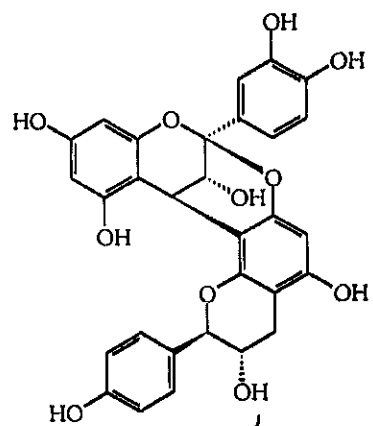
450.0

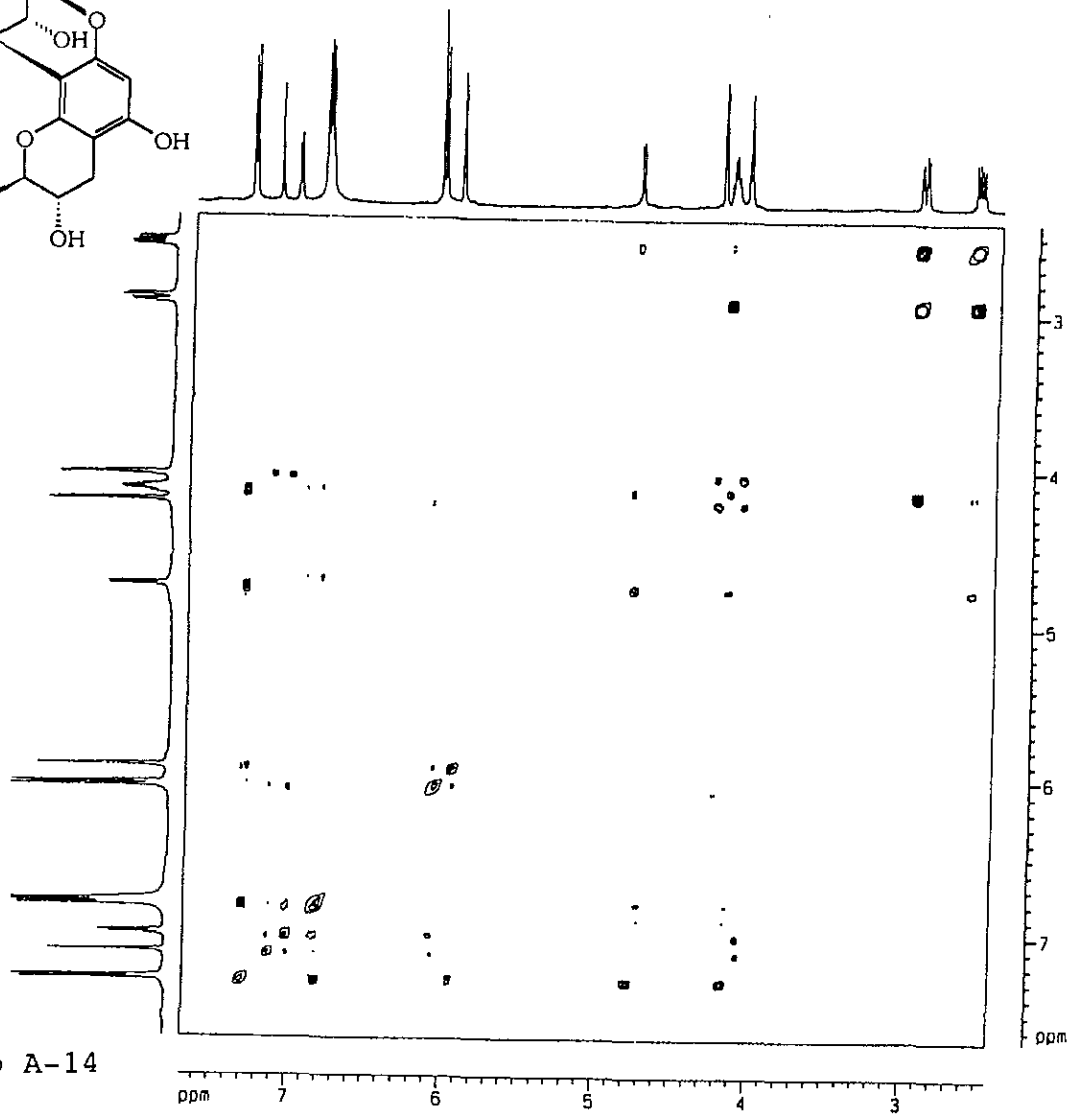
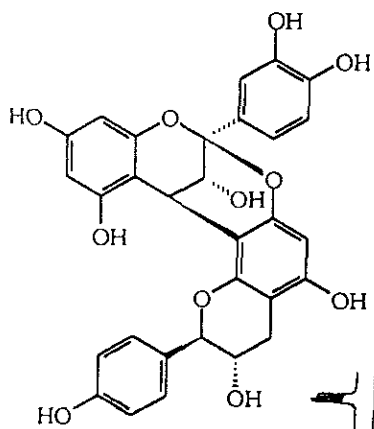




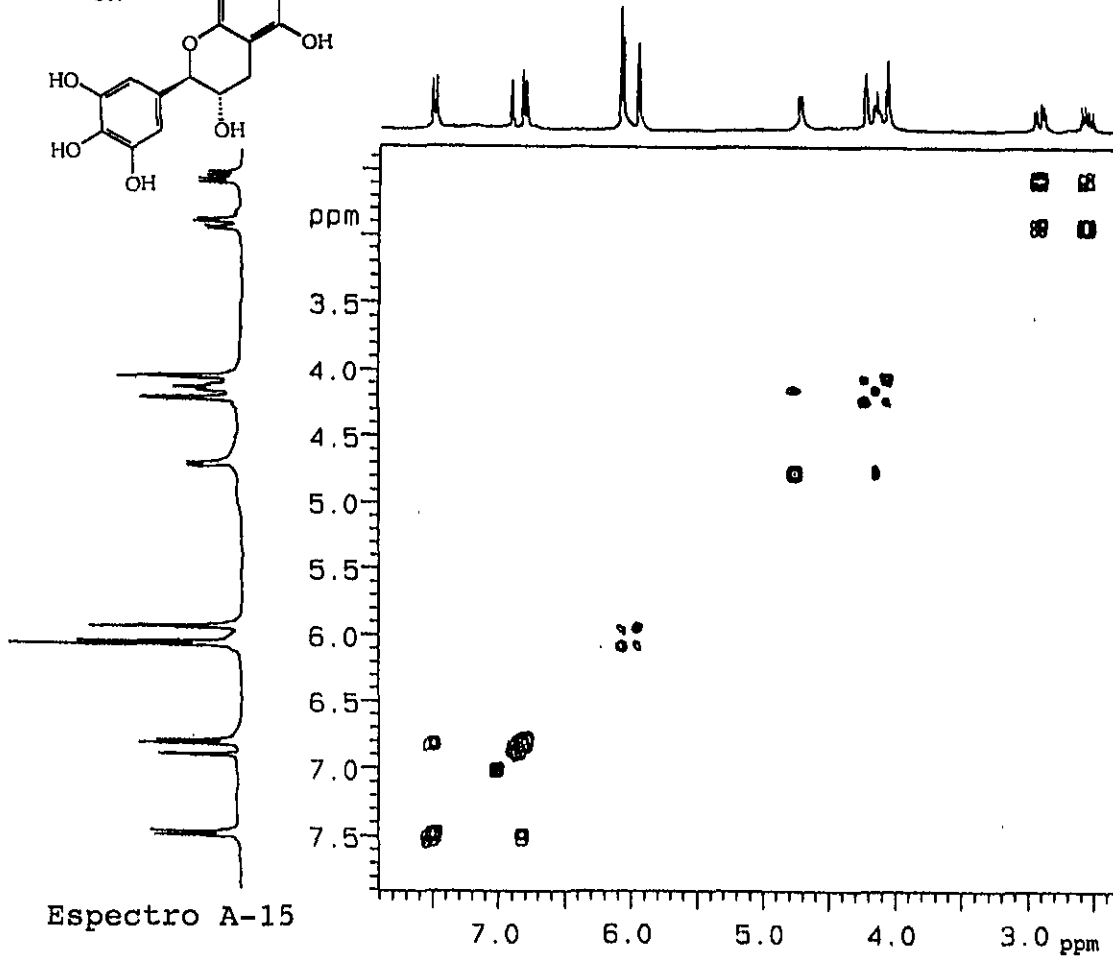
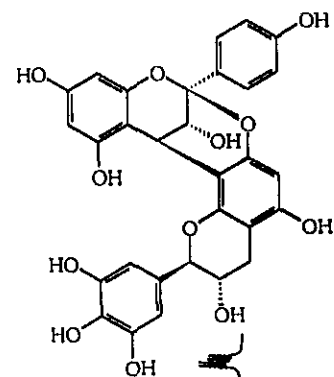


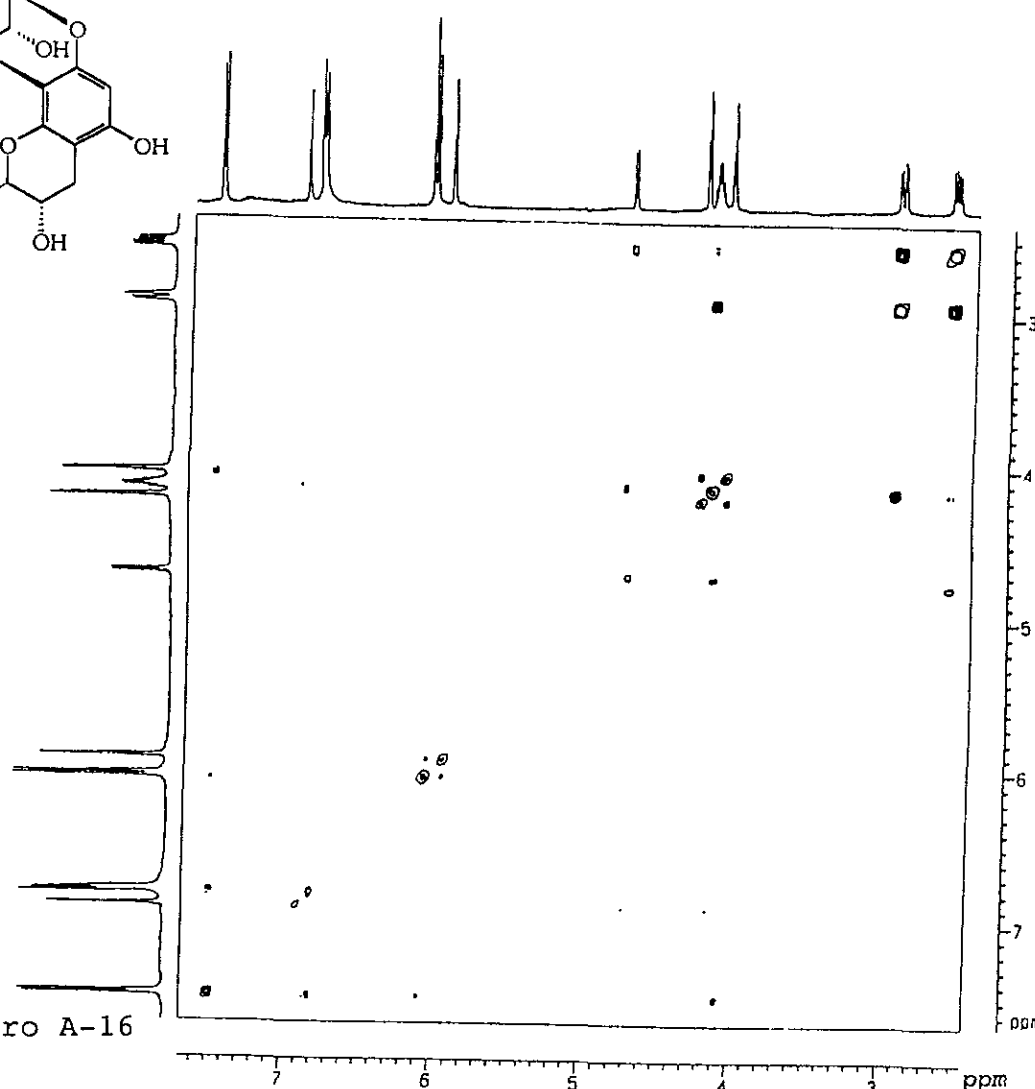
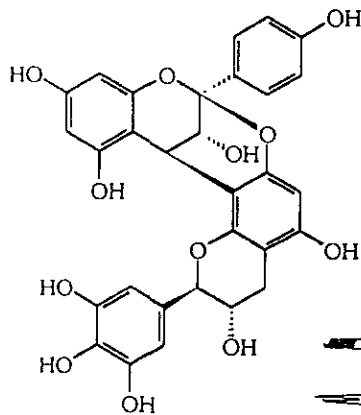




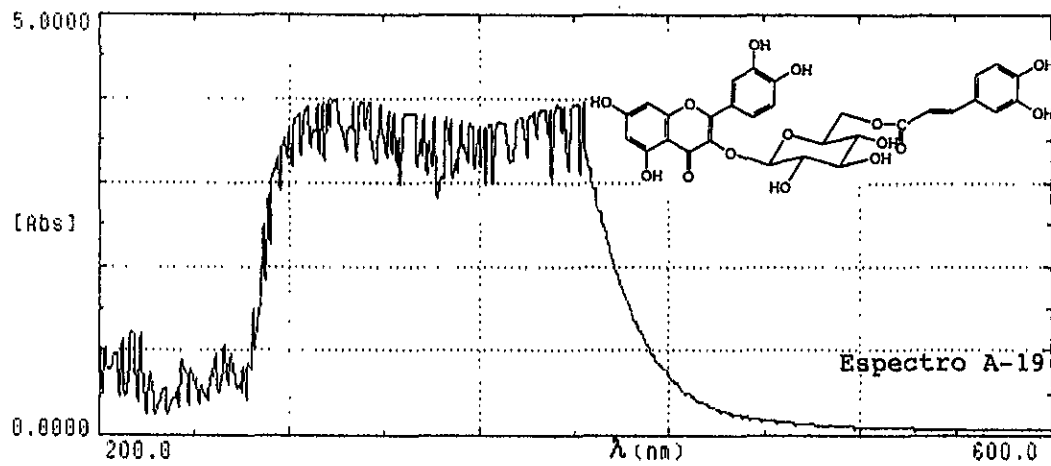
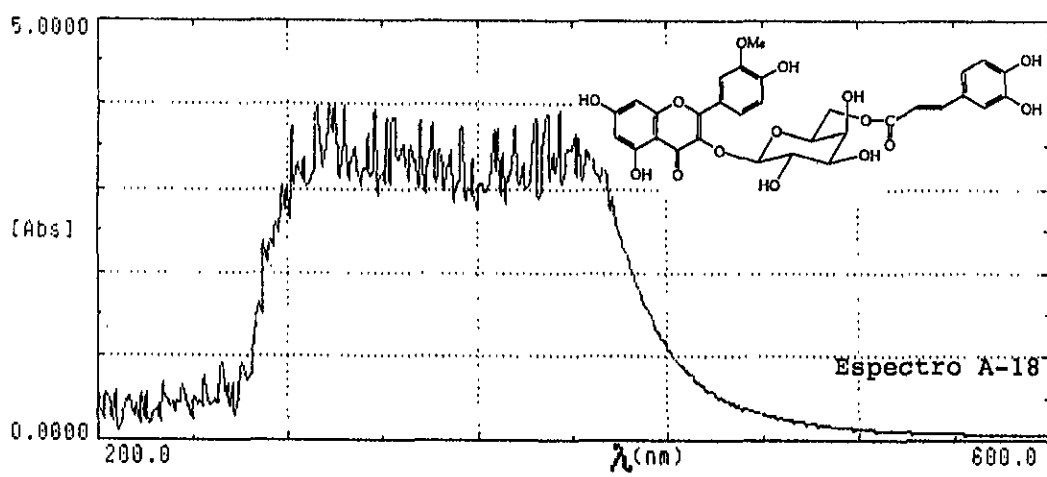
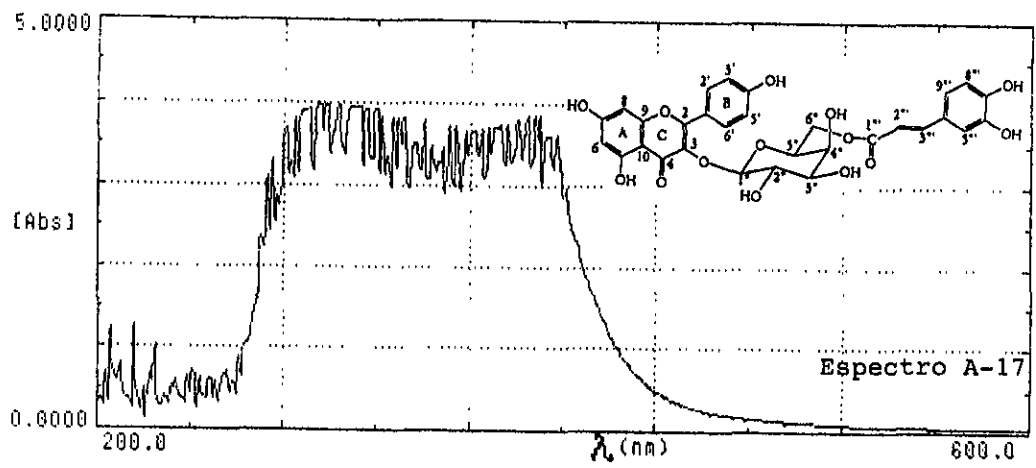


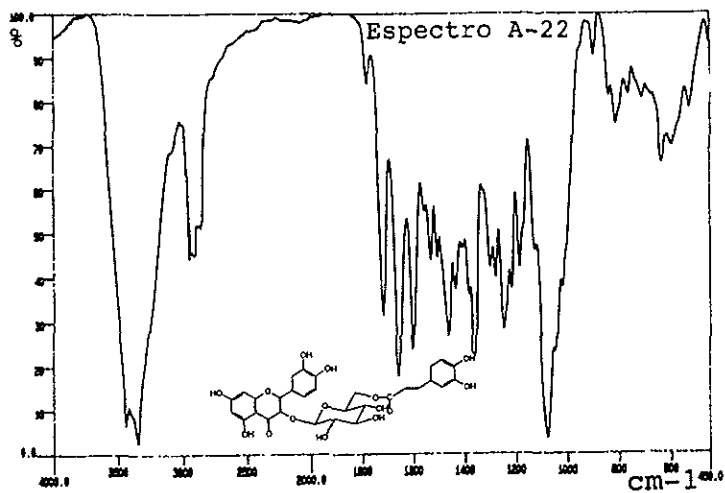
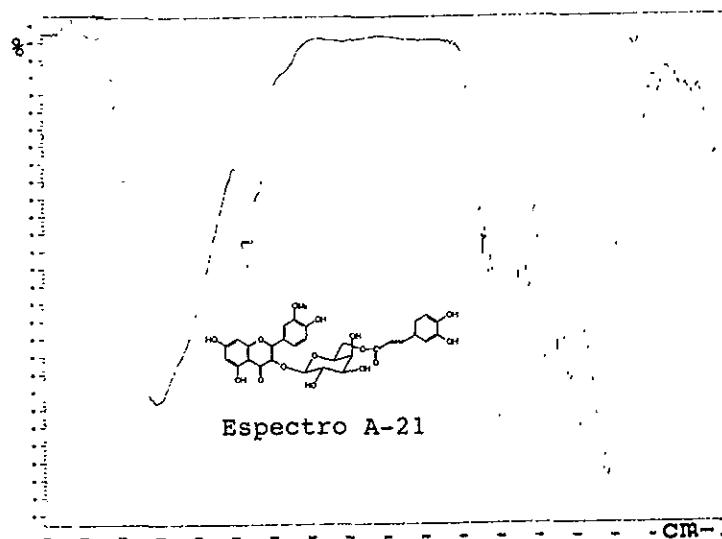
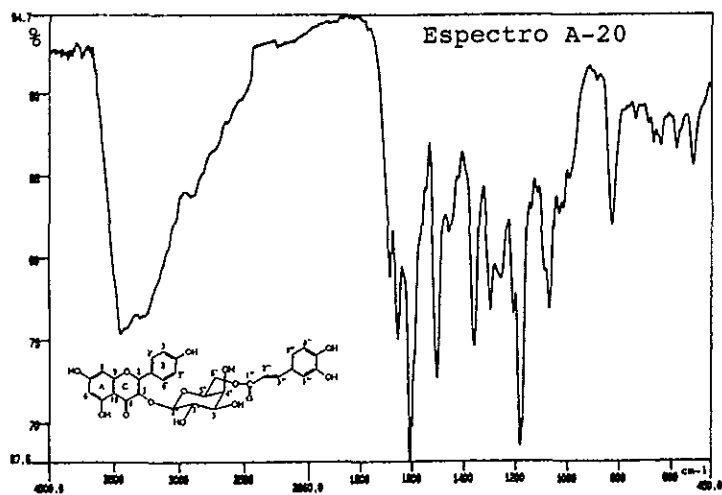
Espectro A-14

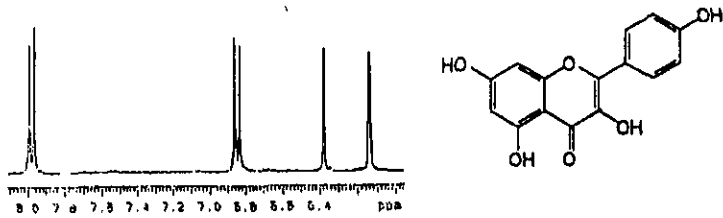




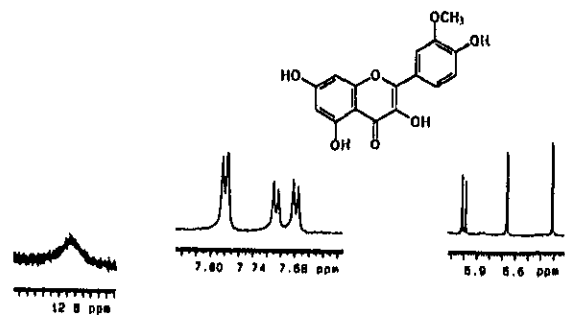
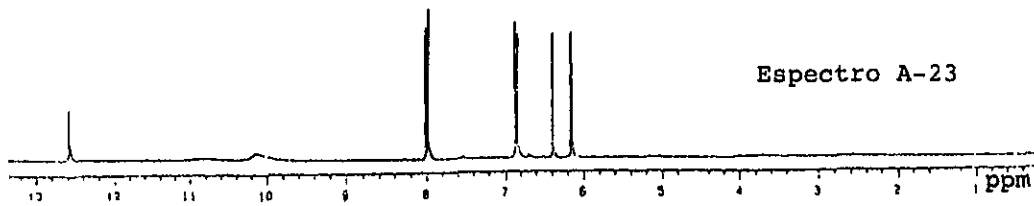
Espectro A-16



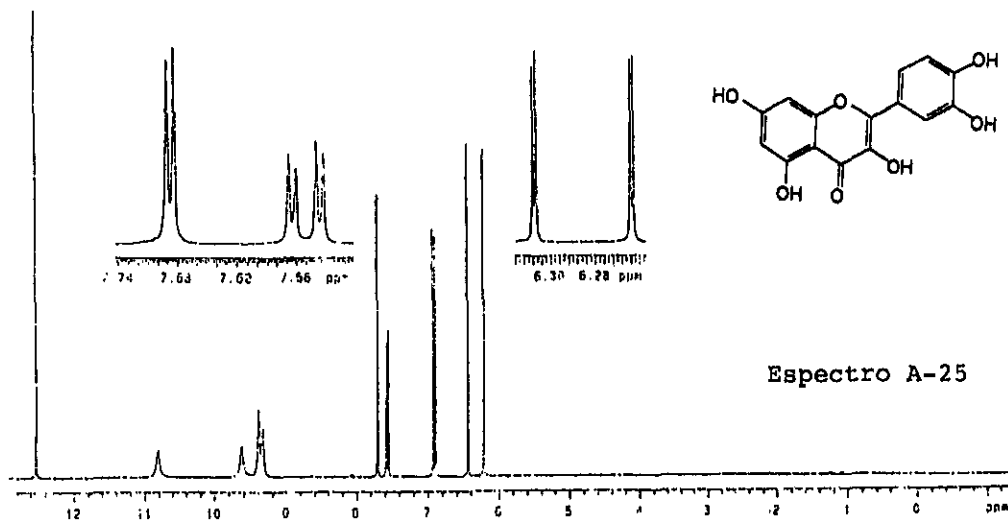
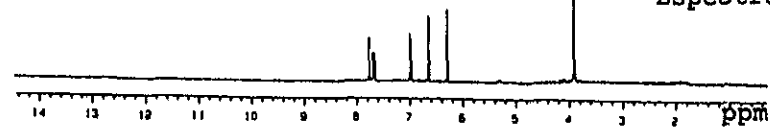




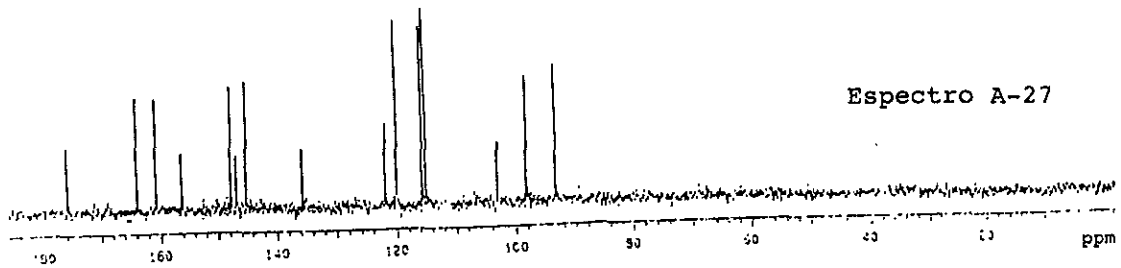
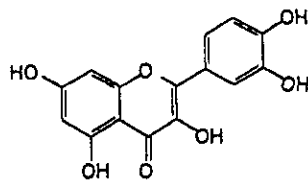
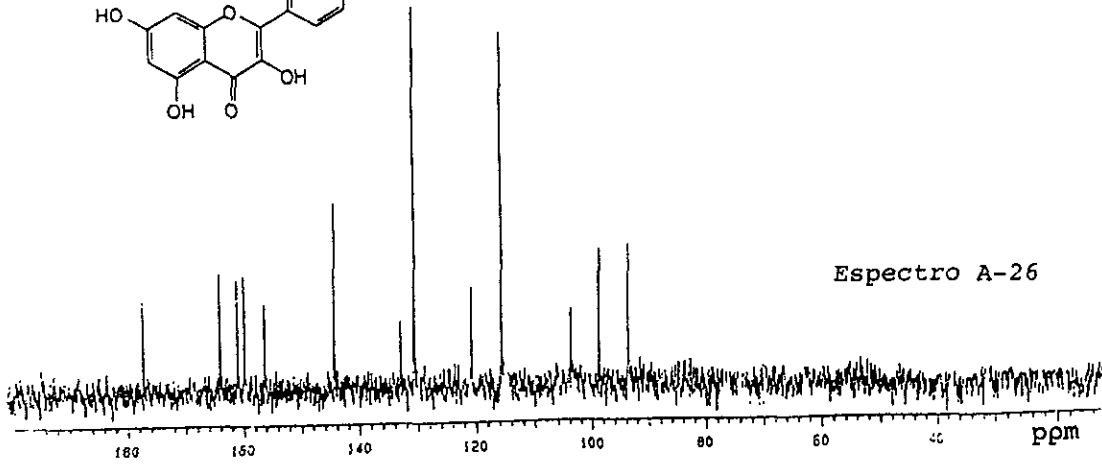
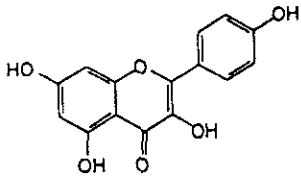
Espectro A-23

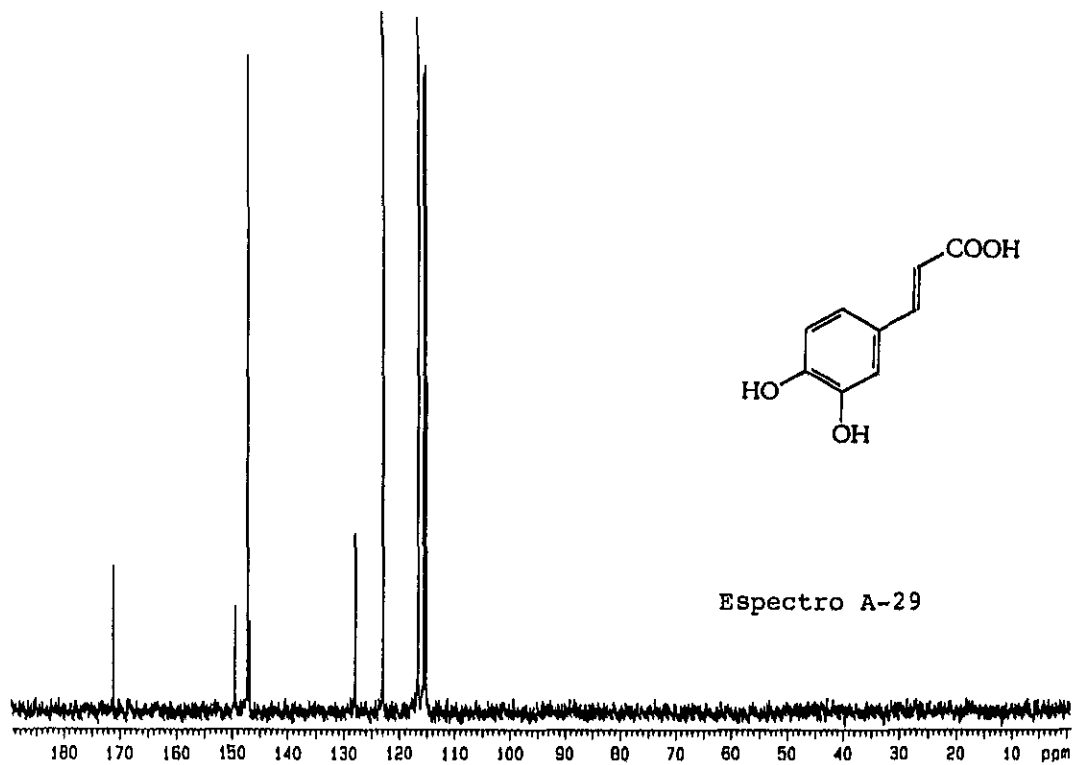
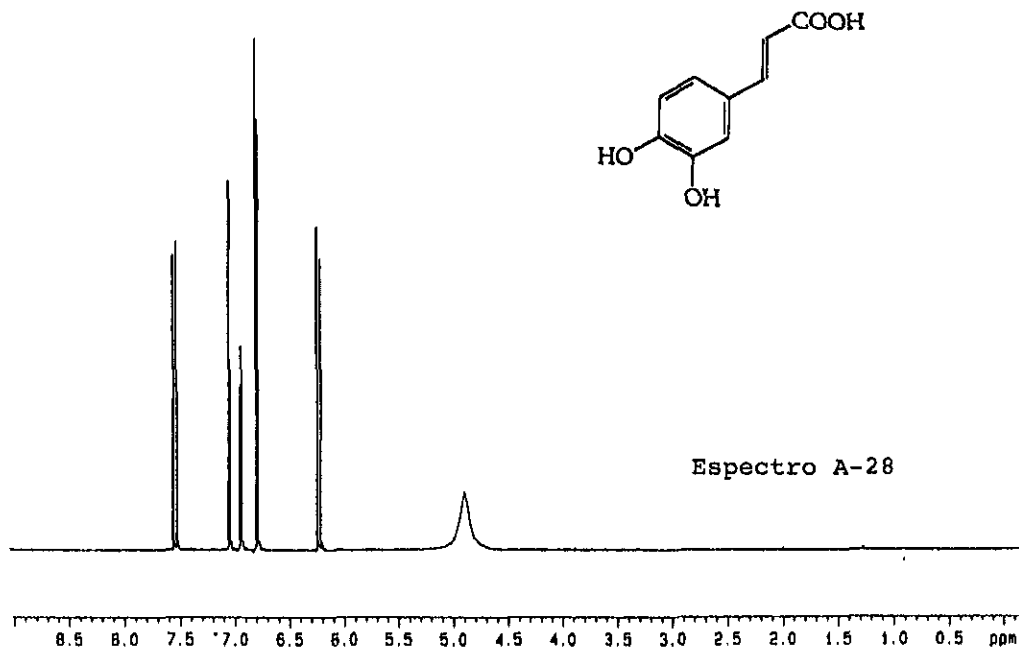


Espectro A-24

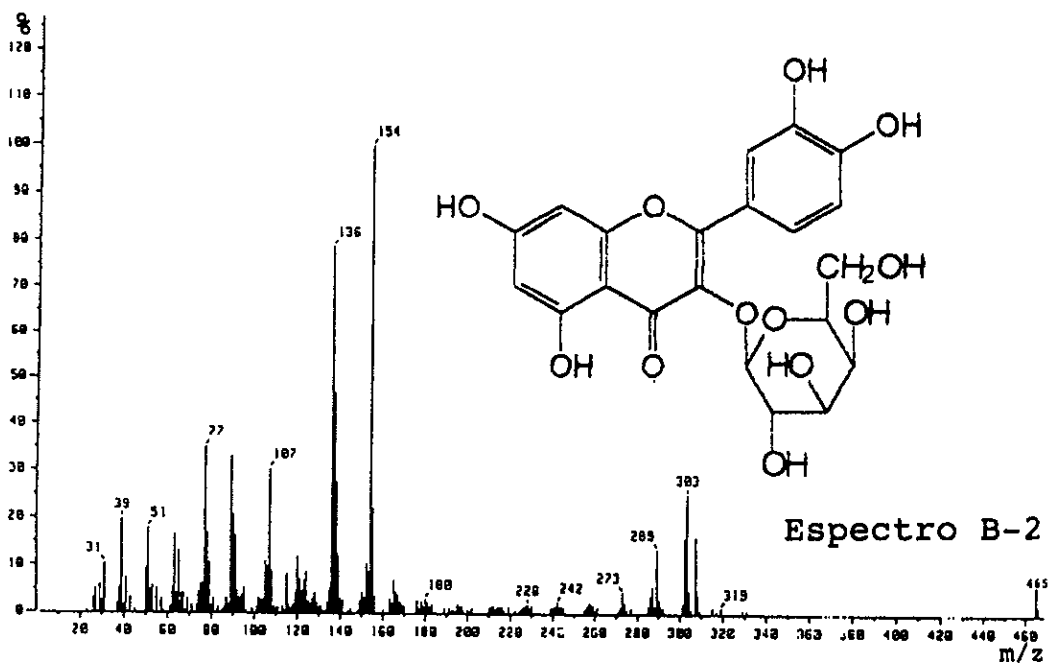
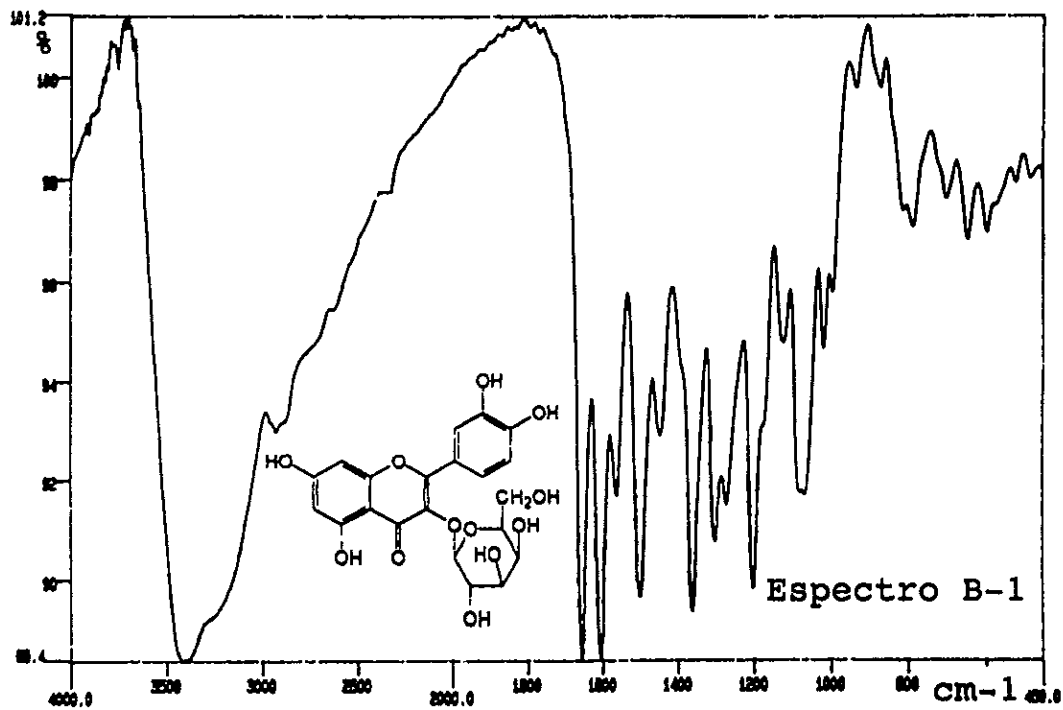


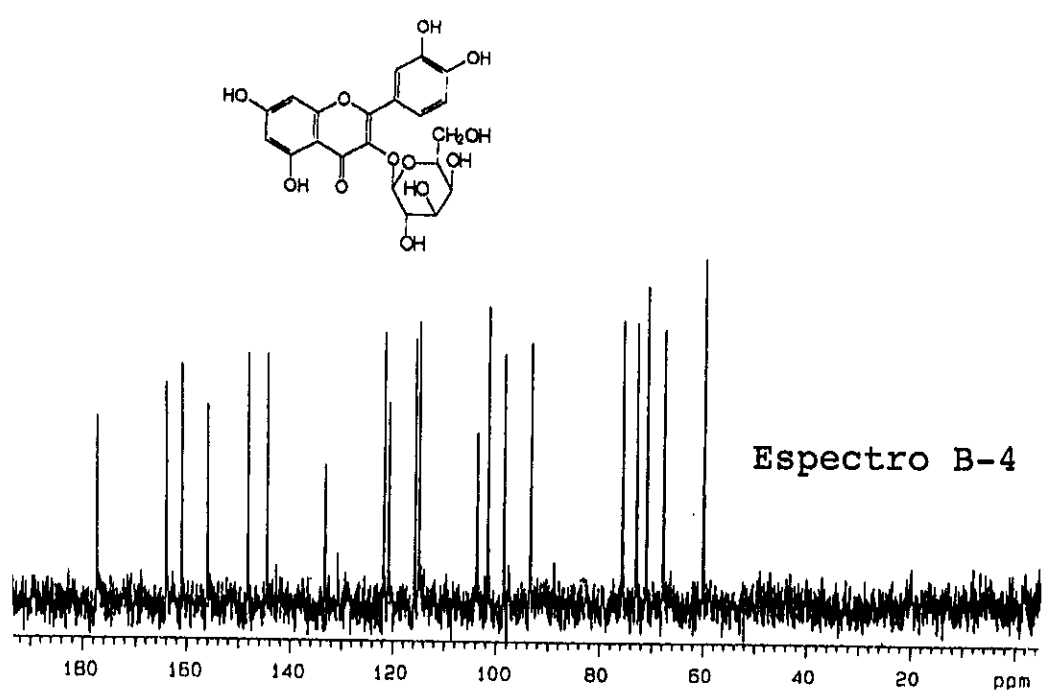
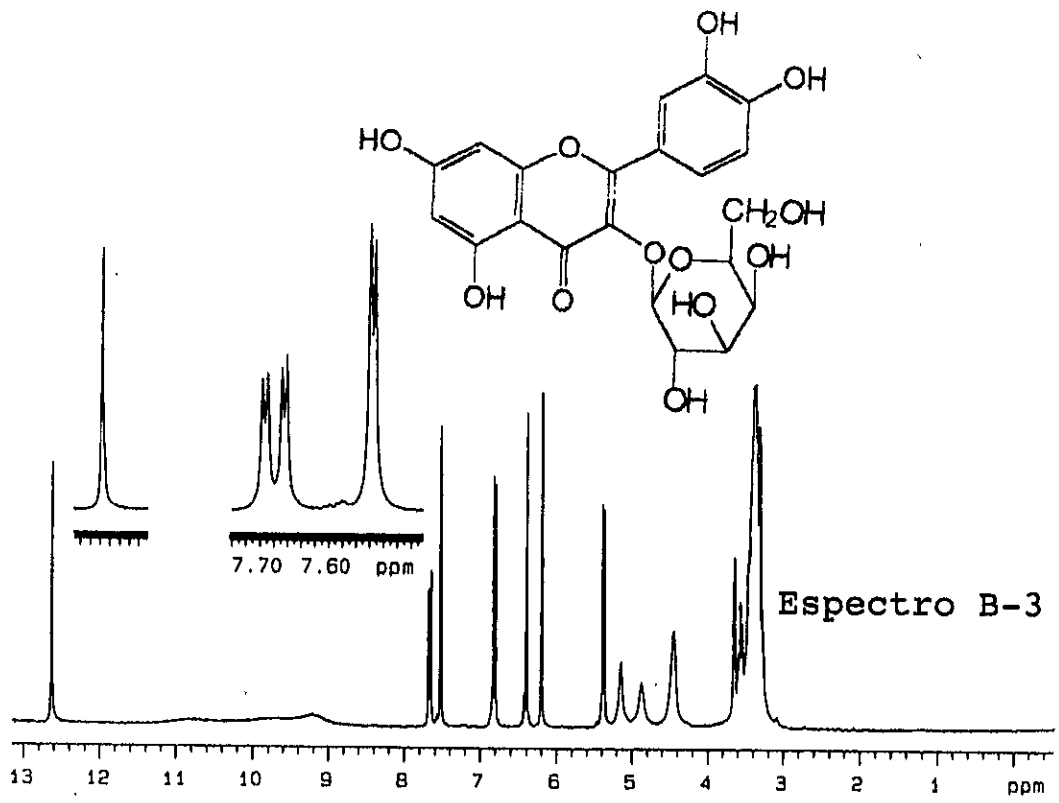
Espectro A-25

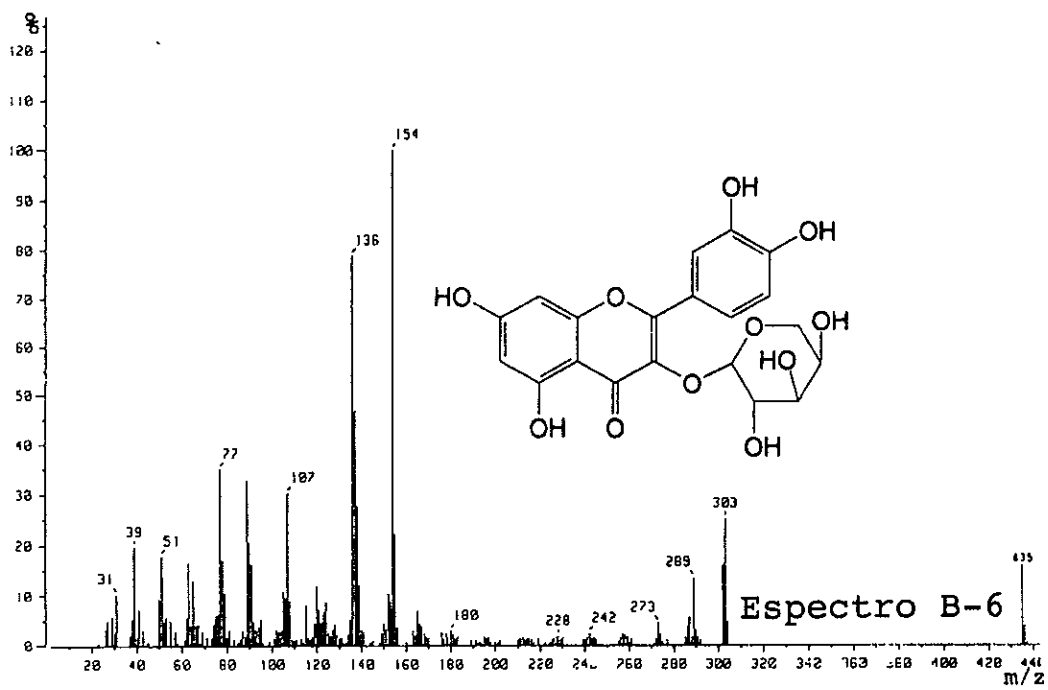
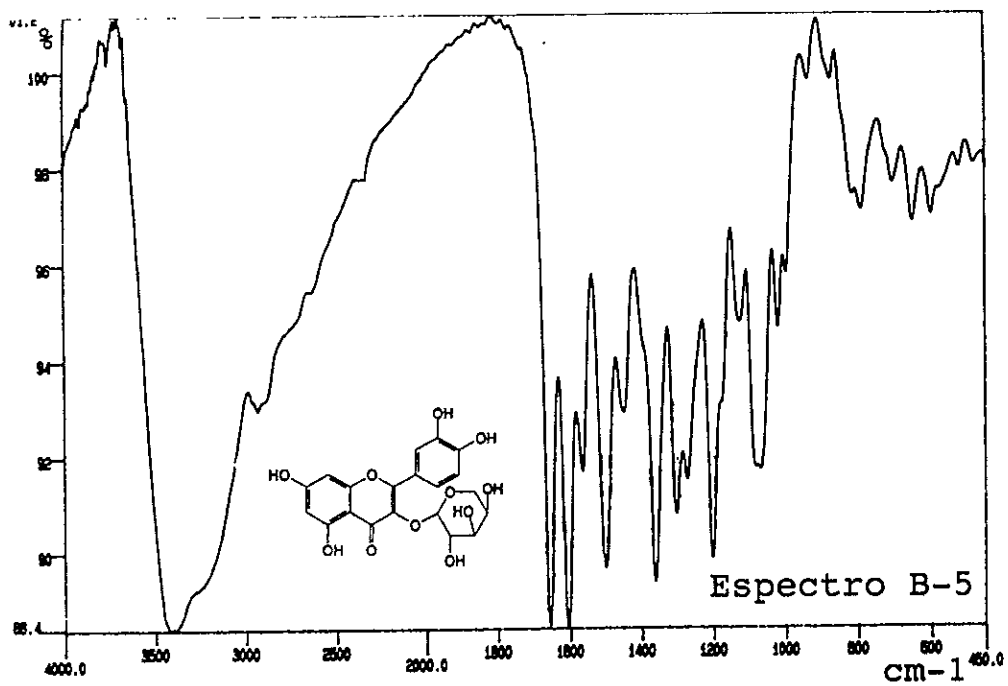


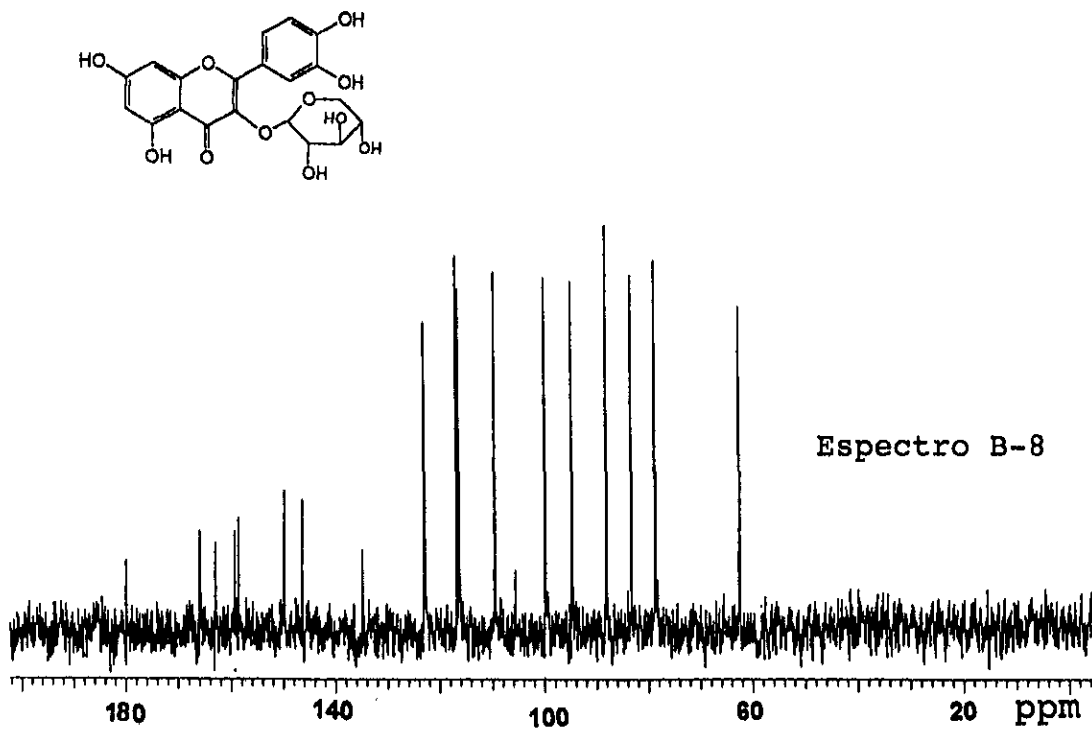
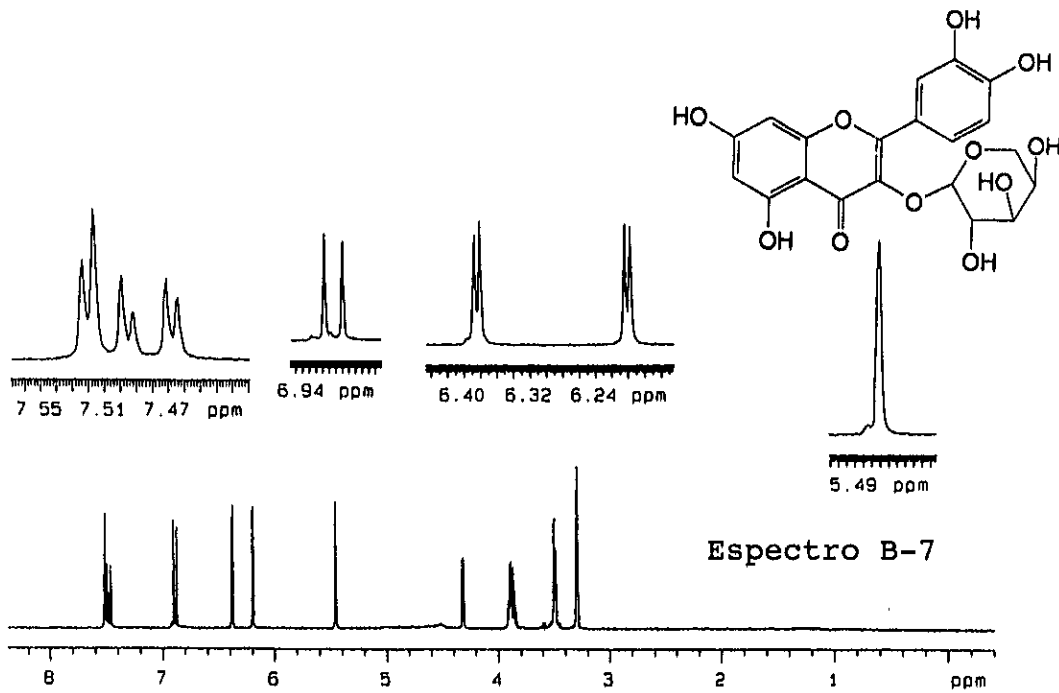


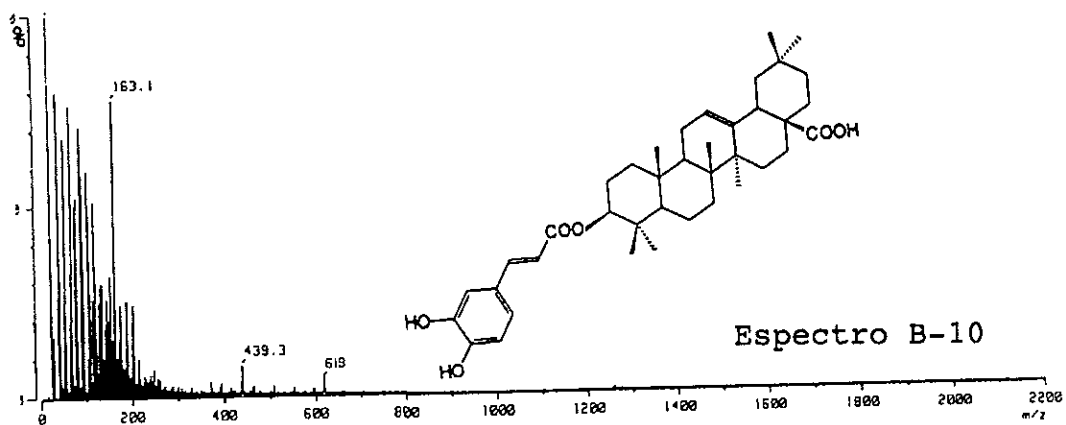
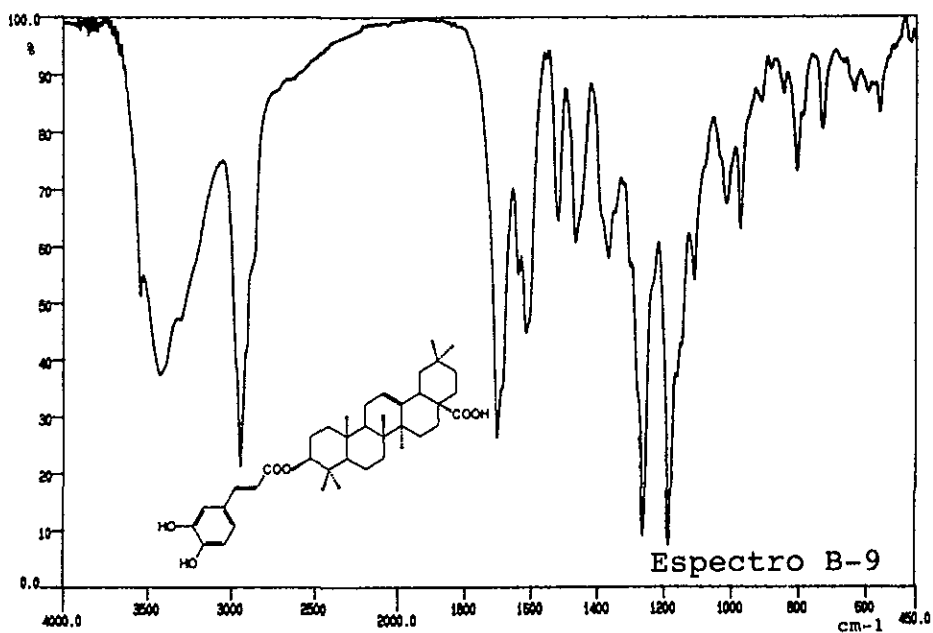
APENDICE B

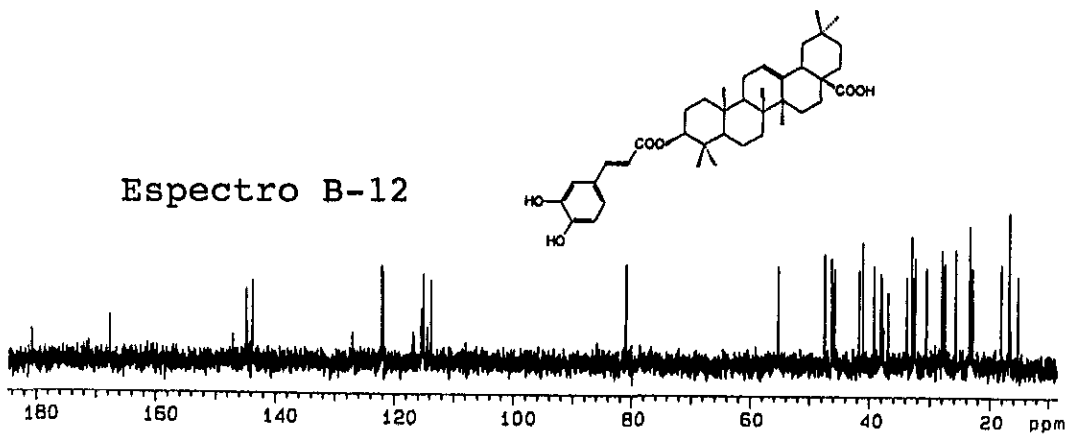
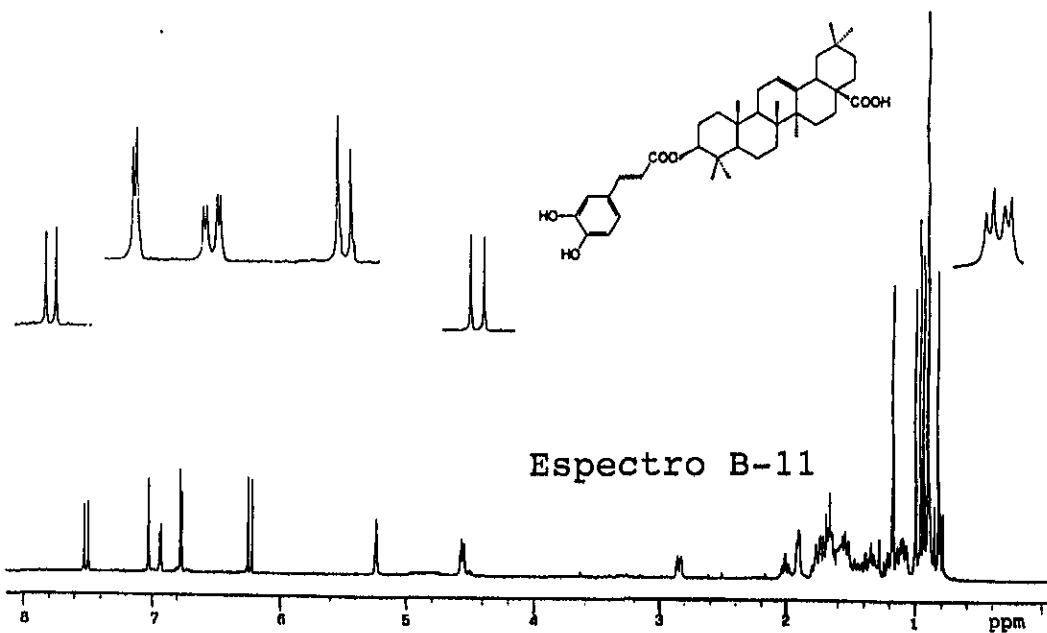


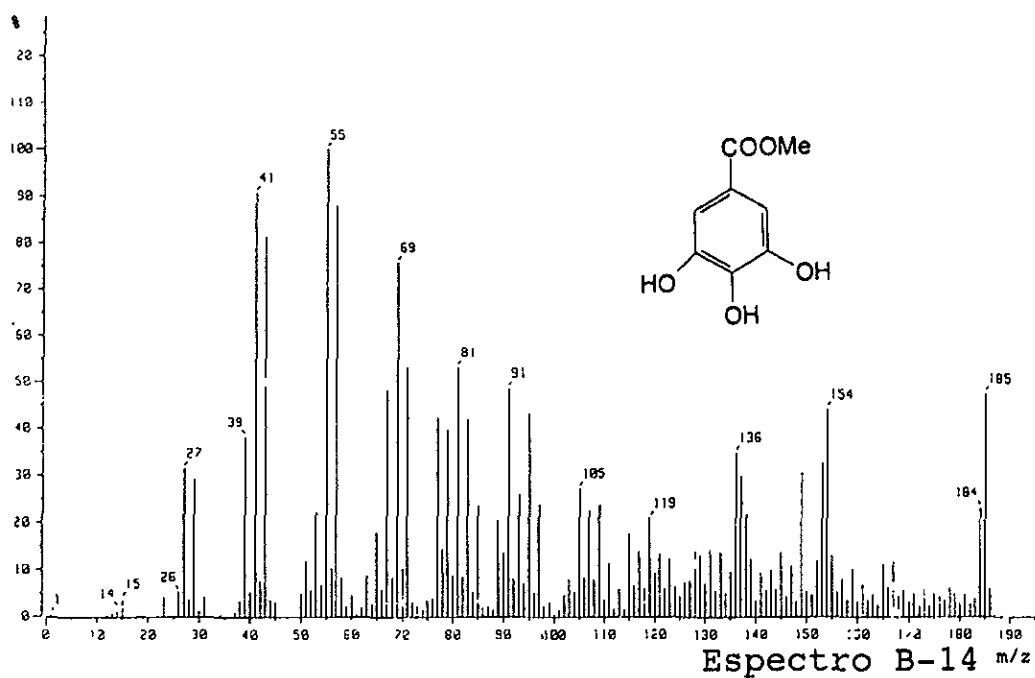
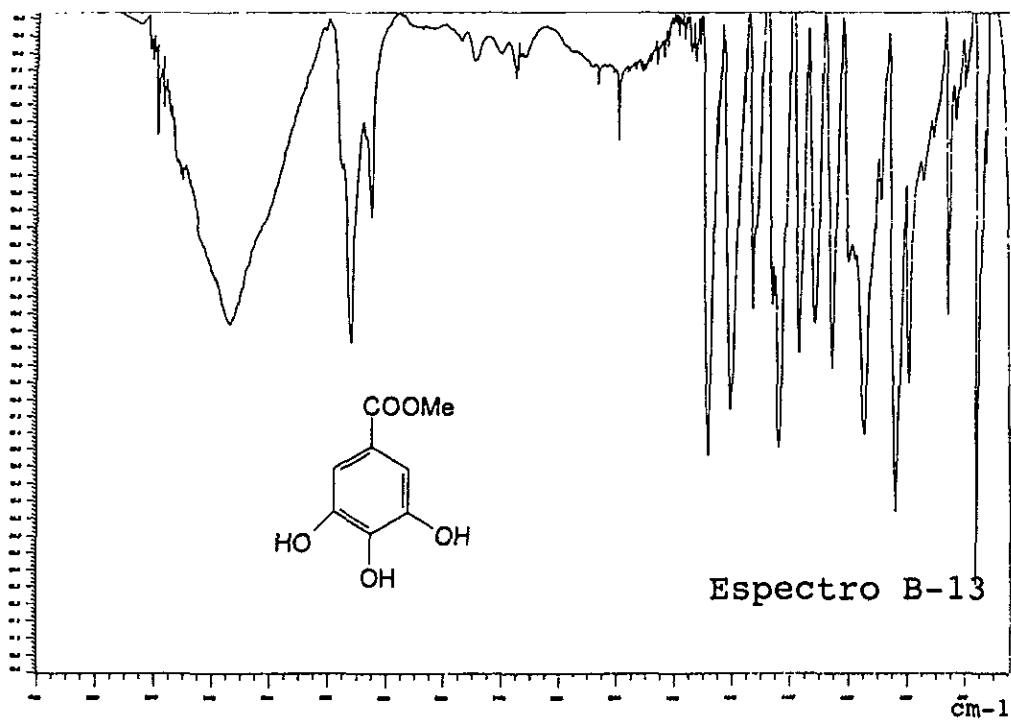


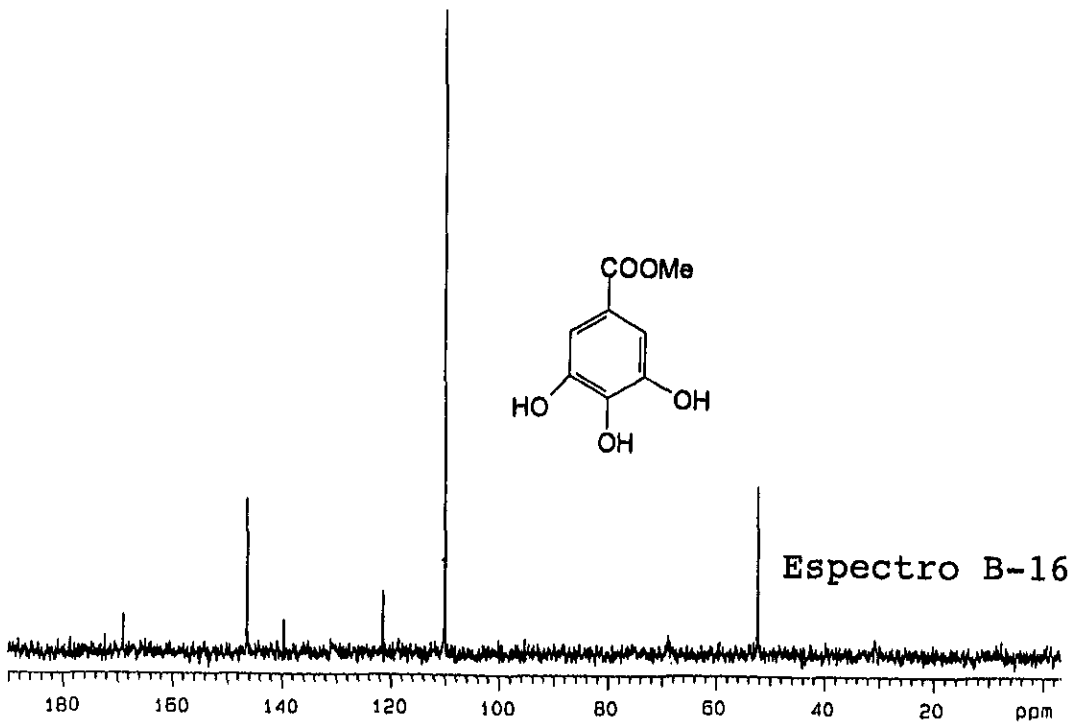
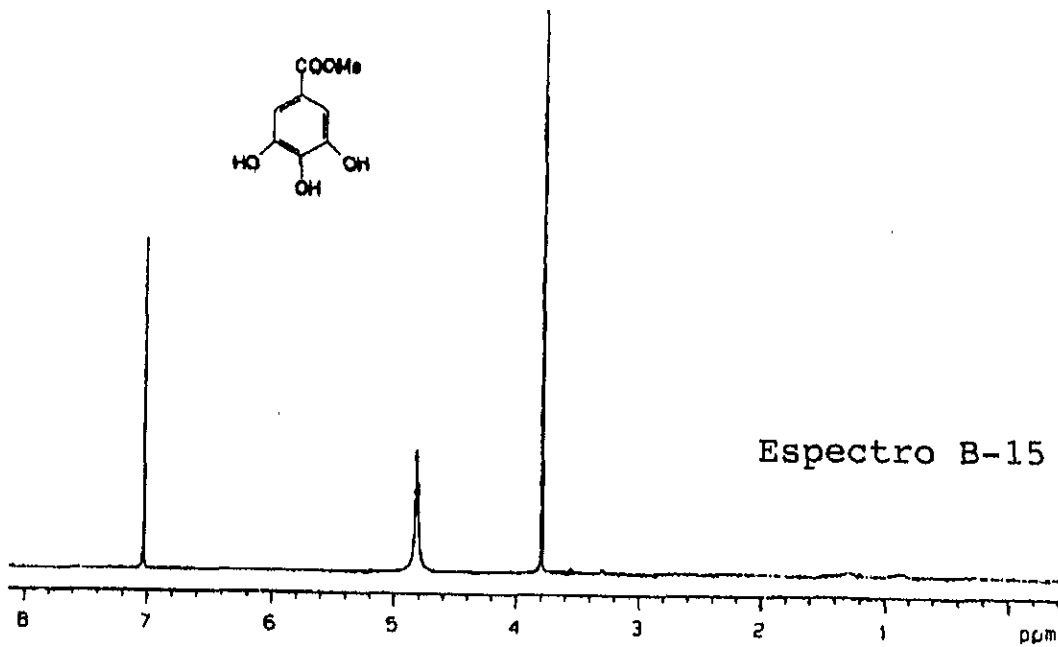


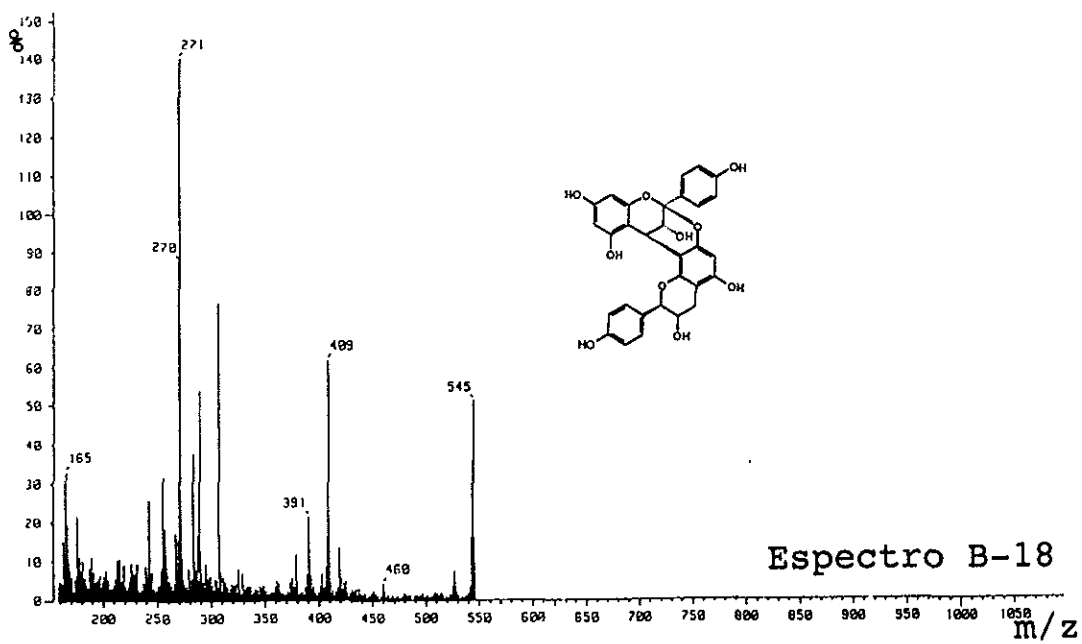
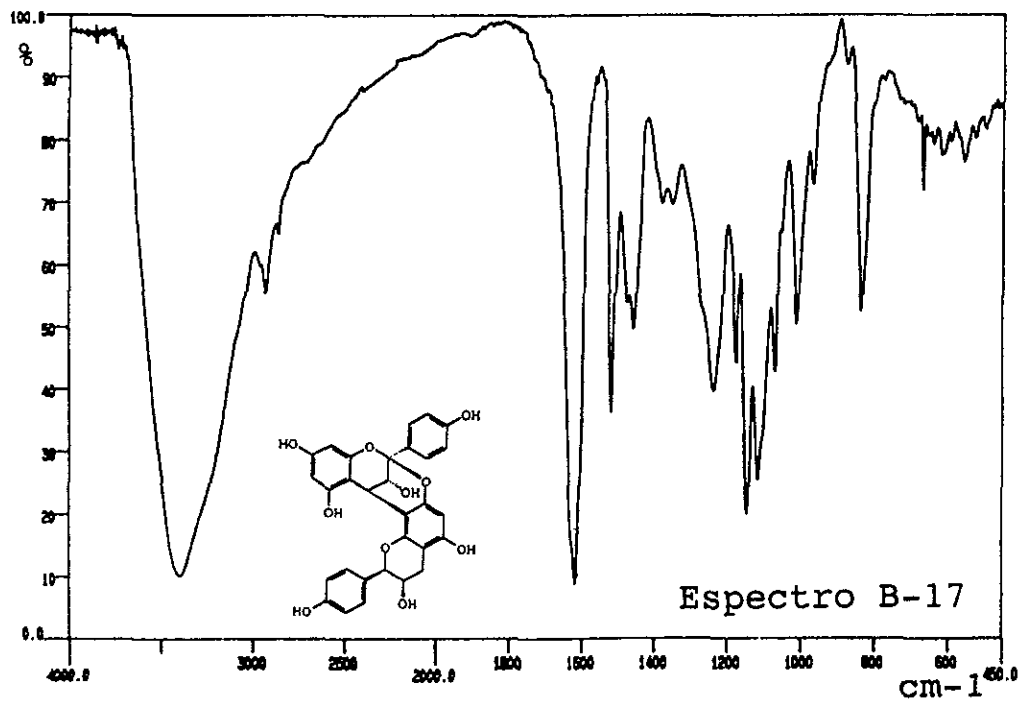


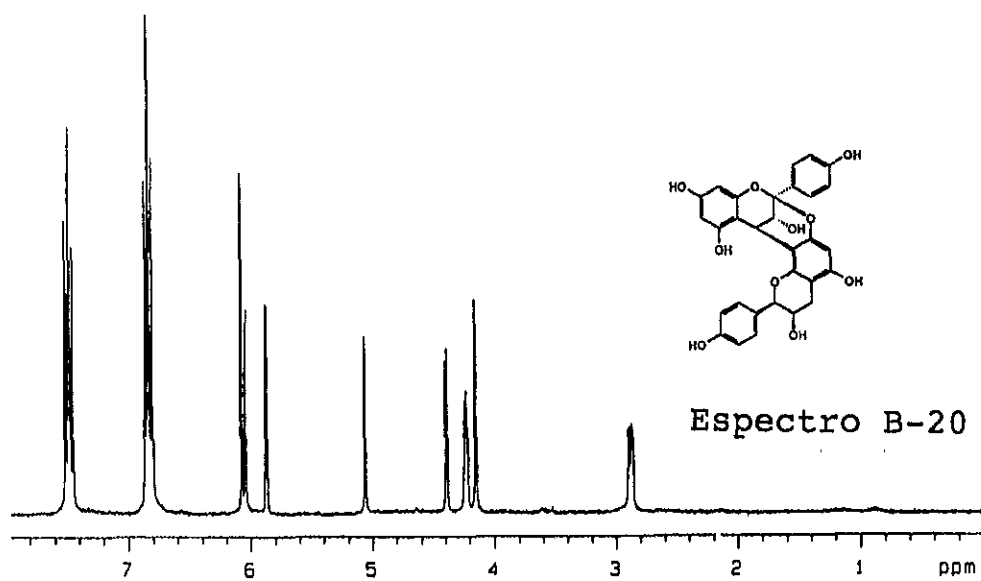
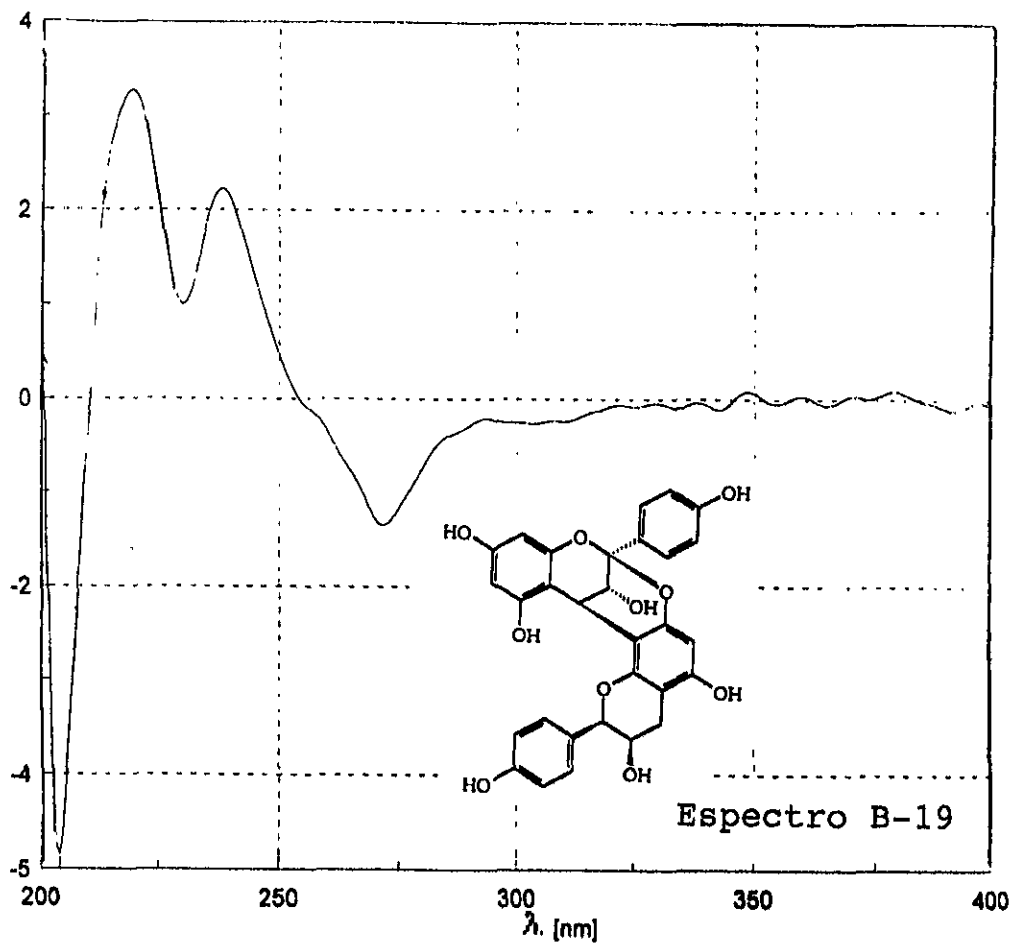


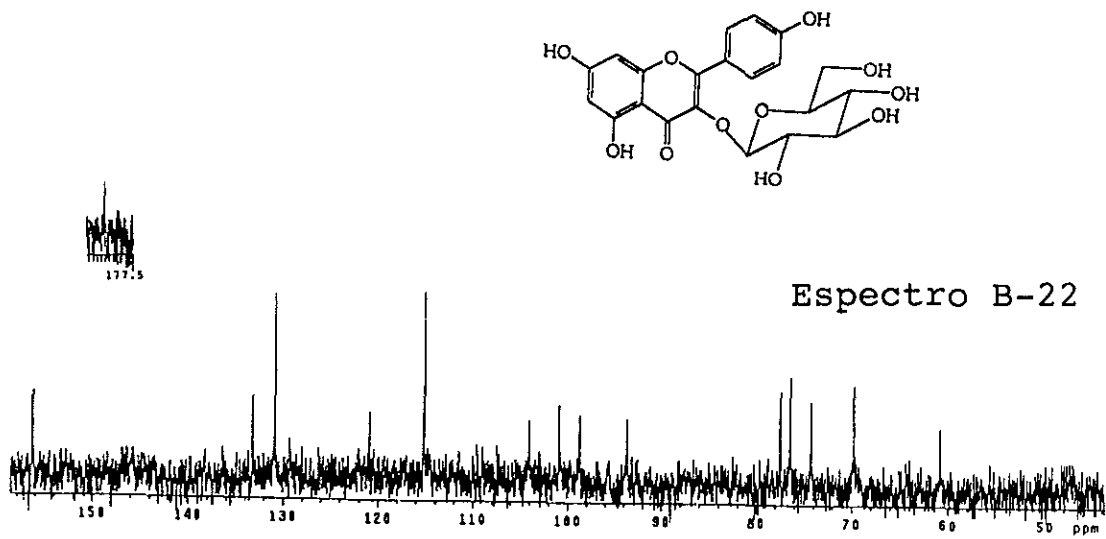
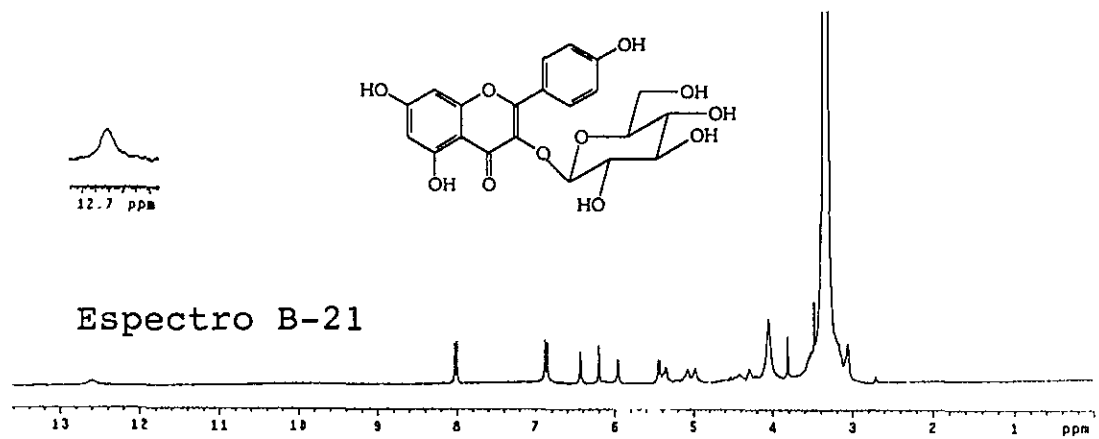


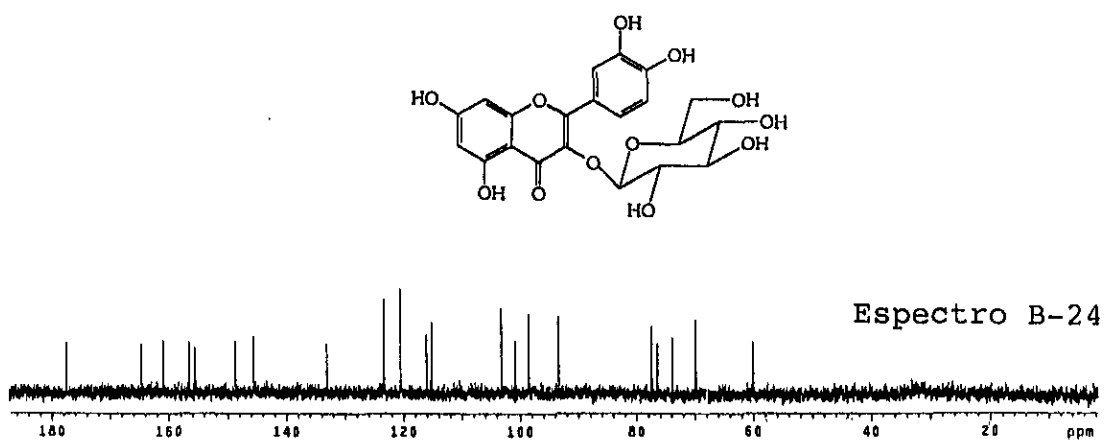
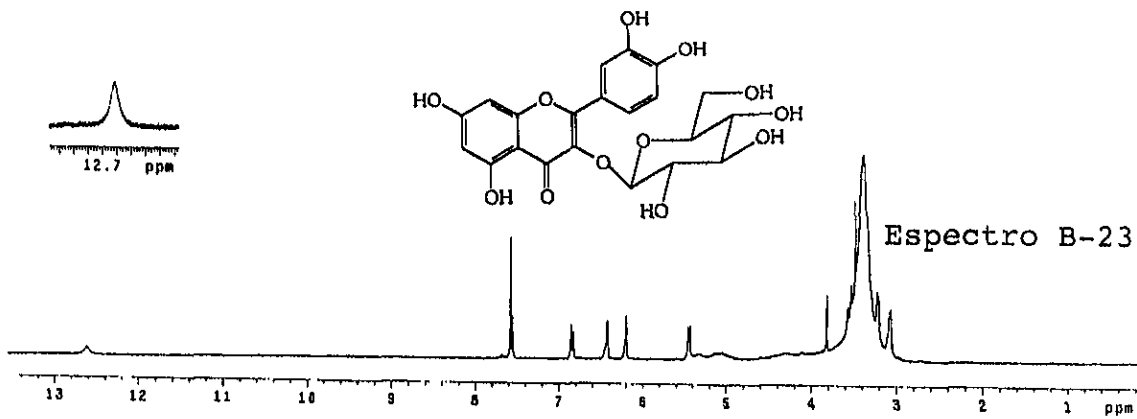


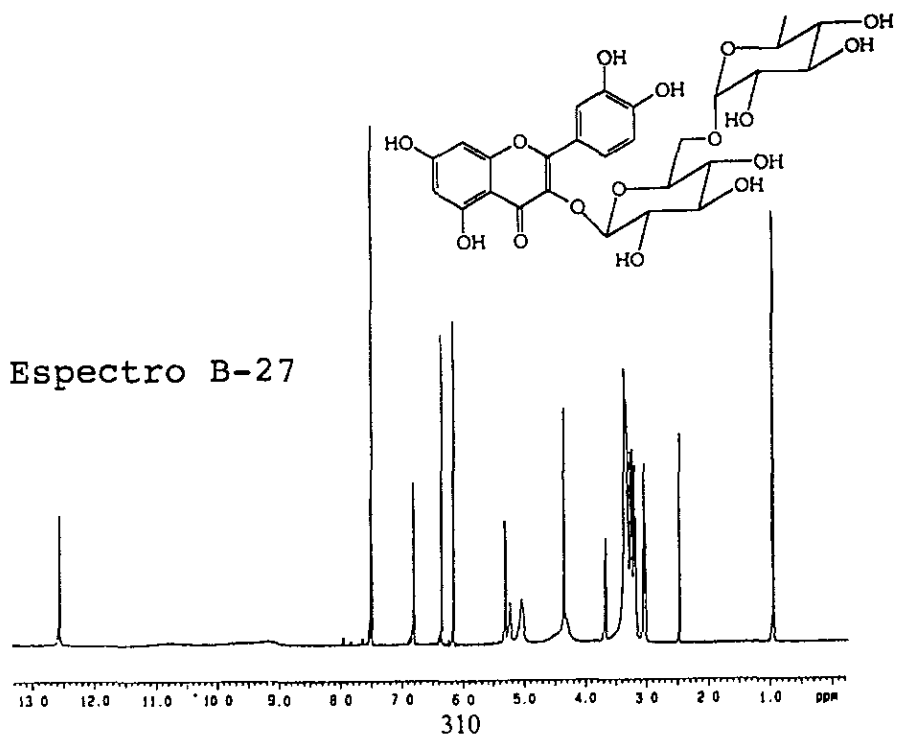
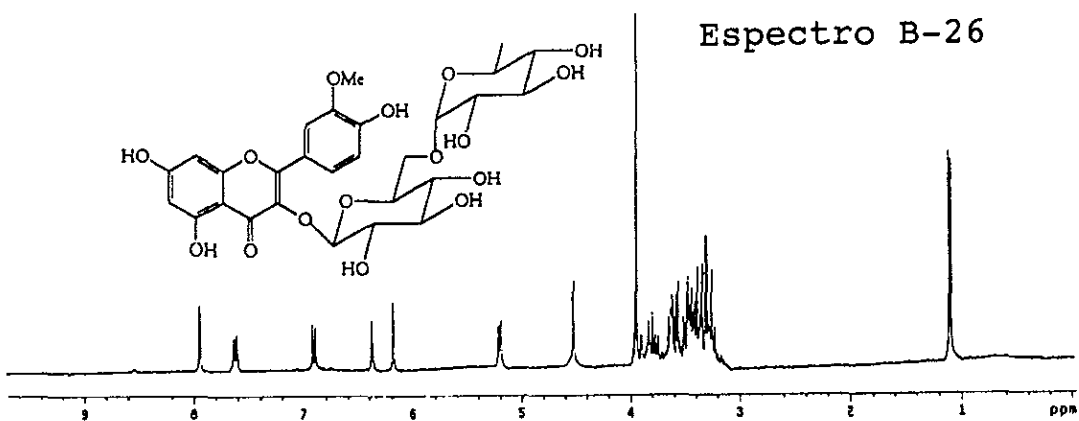
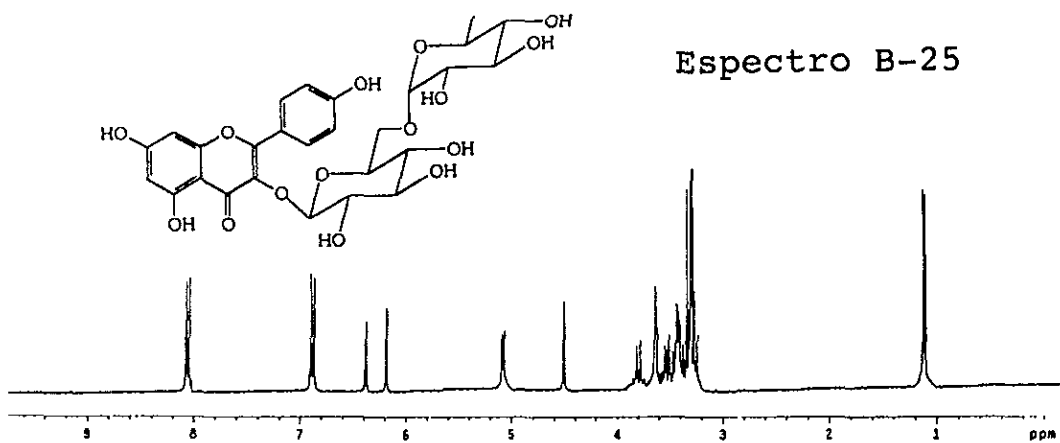


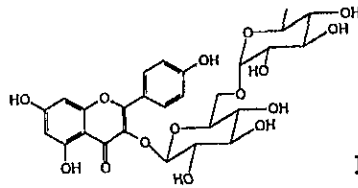




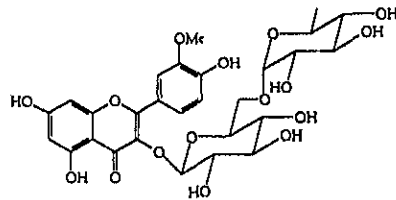
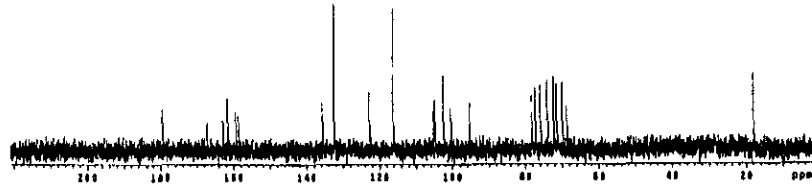




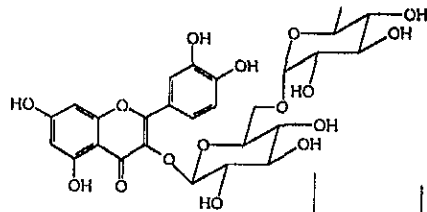
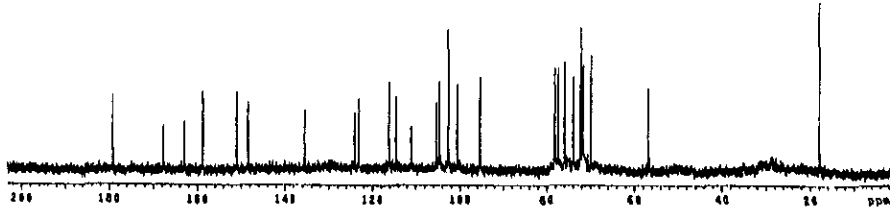




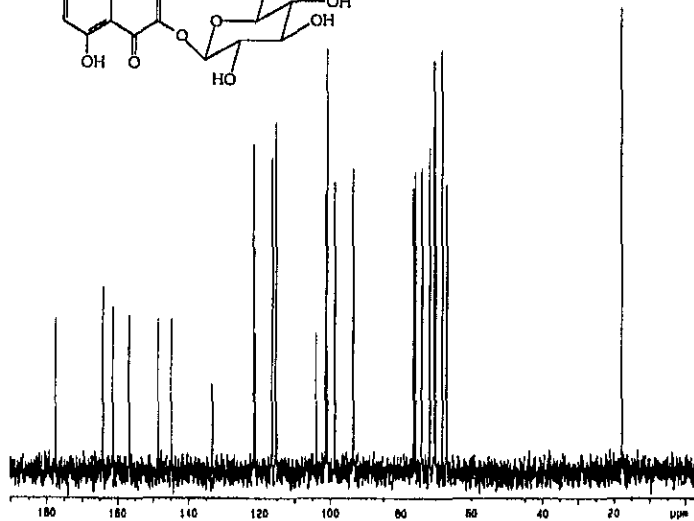
Espectro B-28

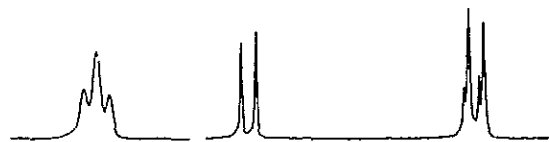
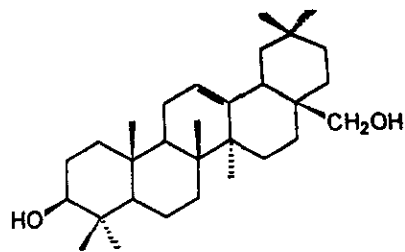


Espectro B-29

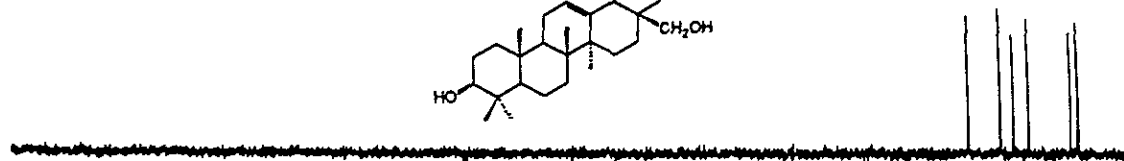
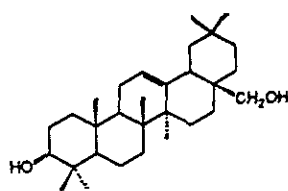
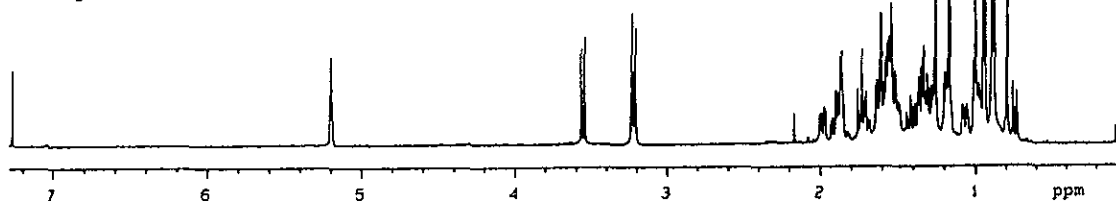


Espectro B-30

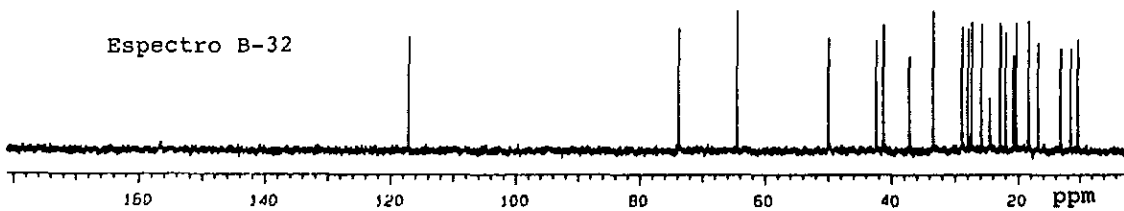




Espectro B-31



Espectro B-32



APENDICE C

SCREENING OF MEXICAN MEDICINAL PLANTS FOR ANTIPROTOZOAL ACTIVITY*

F. Calzada^{1,3}, M. Meckes¹, R. Cedillo-Rivera², A. Tapia-Contreras² and R. Mata³

¹Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales,
Universidad Nacional Autónoma de México, México

²Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias,
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, México

³Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de Plantas Medicinales,
Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán, México

ABSTRACT

The MeOH extracts from 19 Mexican medicinal plants belonging to different families have been assessed for antiprotozoal activity against Entamoeba histolytica and Giardia lamblia. Five plant extracts, derived from Acalypha phleoides, Cnidoscolus tehuacanensis, Geranium niveum, Helianthella quinquenervis and Teloxys graveolens, were found to possess significant activity against both protozoa, but were less potent than metronidazole. These findings tend to support the ethnomedical use of the species for the treatment of infectious diarrhoea in Mexican traditional medicine.

INTRODUCTION

Diseases caused by protozoa are responsible for considerable mortality and morbidity in Mexico where an important segment of the population employ a few medicinal plants for the treatment of infectious diarrhoeal diseases (Diaz, 1977; Martinez, 1989; Arellano et al., 1992; Cedillo-Rivera & Muñoz 1992; Conde-

Bonfil & De la Mora-Zerpa, 1992; Soto-Núñez & Sousa, 1995). However, most of these species have not yet been investigated from a pharmacological point-of-view. Since medicinal plants used in traditional medicine are an important source of biologically active compounds and have potential for the development of novel antiprotozoal drugs (Phillipson, 1991; Wright et al., 1994), we have initiated a screening program to evaluate the antiprotozoal potential of some Mexican medicinal plants and to isolate the active constituents for therapeutic exploitation. In this context, the aim of the present study was to investigate the *in vitro* activity of some crude extracts derived from 19 Mexican plants against *Entamoeba histolytica*, the protozoa causing amoebic dysentery, and *Giardia lamblia*, the organism responsible for giardiasis. The selected species (Table 1) are highly valued to treat diarrhoeal infections in Mexican folk medicine. It is important to point out that none of these species, except *Castela texana* (Calzado-Flores et al., 1986; Dou et al., 1996) have been previously evaluated as antiprotozoal agents. However, from a chemical point-of-view, the composition of some of these species has been previously described. Phytochemical investigations of *P. trifoliata* have allowed the isolation of different types of secondary metabolites including several alkaloids and coumarins (Frolova et al., 1964; Kowalska & Borkowski, 1966; Mulvey et al., 1969; Reish et al., 1969, 1972, 1973, 1975 a,b, 1978, Korosi et al., 1976; Novak et al., 1970; Szendri et al., 1973, 1974; Rideau et al., 1979; Petit-Paly et al., 1989). From *S. humillis*, six limonoids were isolated (Okorie & Taylor, 1971; Segura-Correa et al., 1993). Several triterpenoids were obtained from *K. deppeana*

Keywords: Antiprotozoal activity, *Entamoeba*, *Giardia*, Medicinal plants, Mexico.

Address correspondence to: F. Calzada, Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Unidad de Plantas Medicinales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.I.

*This work is taken in part from the Ph.D. Thesis of F. Calzada, and is dedicated to the memory of our colleague Julio Hernández Salgado.

(Noguera et al., 1994) and *C. mexicana* (Mata et al., 1988; 1989). α -Spinasterol and β -amirina were isolated from *C. flaginoides* (Dominguez et al., 1972). Chemical analysis of *H. quinquenervis* has revealed the presence of acetylchromenes (Herz & Kulanthaivel, 1984; Castañeda et al., 1996). Several sesquiterpene lactones and flavonoids were obtained from *R. latipaliaris* (Mata et al., 1990; Rojas et al., 1991; Jimenez et al., 1993). Flavonoids and simple sesquiterpenoids were isolated from *T. graveolens* (Mata et al., 1987) and both species of *Castela* were found to contain several quassinoids and flavonoids (Kubo et al., 1993; Dou et al., 1996). Finally, from *M. depressa*, several phenyl propanoids were identified (Jimenez et al., 1996).

MATERIALS AND METHODS

Plant Materials

Botanical species assessed were collected from different areas of Mexico and are detailed in Table 1. Specimens of plants have been deposited at the National Herbarium (MEXU), Instituto de Biología, UNAM.

Extraction of Plant Materials for Testing Antiprotozoal Activity

Biological studies were performed with the extracts of the dried plants prepared as follows: 100 g of the finely ground material were macerated at room temperature with MeOH (1 l). The resulting extracts were evaporated under reduced pressure.

Parasites

The strains of the microorganisms used in the assays were *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS and *Giardia lamblia* IMSS:0989:1. *E. histolytica* was maintained in TYI-S-33 medium, supplemented with 10% bovine serum (Diamond & Bartgis, 1971), and *G. lamblia* was cultured in TYI-S-33 modified medium, supplemented with 10% calf serum (Cedillo et al., 1991). Both strains were axenically maintained and for the assays were employed in the log phase of growth.

Antiprotozoal Assay

In vitro testing against *E. histolytica* and *G. lamblia* was performed using a method previously described (Cedillo-Rivera et al., 1992; Cedillo-Rivera & Muñoz, 1992). Each test extract (100 mg) was dissolved in 1 ml of DMSO and 19 ml of culture medium and incorporated in disposable tubes with 4 ml of medium to obtain the required range of concentration: 2.5–200

$\mu\text{g/ml}$. The tubes containing the extract-incorporated medium were inoculated with *E. histolytica* HM1-IMSS or with *G. lamblia* IMSS:0989:1 to achieve an inoculum of 6×10^3 trophozoites/ml and 5×10^4 trophozoites/ml, respectively. Each test include metronidazole (Sigma) as standard amoebicidal and giardicidal drug, a control (culture medium plus trophozoites and DMSO) and a blank (culture medium). After incubation for 48 h at 37°C, trophozoites were detached by chilling and 50 μl of each culture tube was subcultured in fresh medium before counting. The final number of parasites was determined with a haemocytometer and the percentages of trophozoite growth inhibition were calculated by comparison with the control culture. The results were confirmed by a colorimetric method: the trophozoites, were washed by centrifugation and incubated for 45 min at 37°C in phosphate buffer saline with 0.075% of MMT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) and 250 mg of phenazine methosulfate. The dye produced (formazan) was extracted with HCl/i-PrOH and the absorbance was determined at 570 nm. In both cases the percentage of inhibition calculated for each concentration was transformed into probit units.

The plot of probit against log concentration was made; the best straight line was determined by regression analysis and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values calculated. The experiments were performed in duplicate and repeated at least three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Nineteen crude plant extracts obtained from medicinal plants used in Mexican folk medicine for treatment of infectious diarrhoea were tested against axenically grown trophozoites of *E. histolytica* and *G. lamblia*. The results are summarized in Table 1. The extracts from *A. phleoides*, *C. tehuacanensis*, *G. niveum*, *H. quinquenervis* and *T. graveolens* were found to possess significant activity against both protozoa with IC₅₀ values ranging from 2.6 to 20.6 $\mu\text{g/ml}$ for *G. lamblia*, and from 4.6 to 13.7 $\mu\text{g/ml}$ in the case of *E. histolytica*. The extract of *H. quinquenervis* was the most active against both organisms. A second group of extracts (*C. mexicana*, *C. erecta*, *H. longipes* and *P. trifoliata*) exhibited moderate activity against both protozoa. In general, the activity of the above nine extracts against *G. lamblia* and *E. histolytica* parallel each other. Of the remaining extracts, those from *C. flaginoides*, *D. papposa*, *K. deppiana*, *L. virginicum*, *M. depressa*, *P. scandens*, *R. latipaliaris*, *S.*

REFERENCES

- Arellano J, Granados J, Frenk P, López-Osuna M, Santos I, Kretschmer RR (1992): Increased frequency of HLA-DR3 in Mexican mestizo pediatric patients with amebic liver abscess (ALA). *Arch Med Res* 23: 269-270.
- Calzado-Flores CC, Segura-Luna JJ, Dominguez XA, Garcia-Gonzalez S (1986): *Castela texana*: cernimiento de su actividad antiambiobiana. *Arch Invest Méd (Méx.)* 17: 127-134.
- Castañeda P, Gomez L, Mata R, Lotina-Hessen B, Anaya AL, Bye R (1996): Phytochemical growth inhibitory compounds and antifungal constituents of *Helianthella quinquevallis*. *J Nat Prod* 59: 323-326.
- Cedillo-Rivera R, Enciso-Moreno JA, Martinez-Palomo A, Orega-Pierres G (1991): Isolation and axenization of *Giardia lamblia* isolates from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Arch Invest Méd (Méx.)* 22: 79-85.
- Cedillo-Rivera R, Ramírez A, Muñoz O (1992): A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 23: 59-61.
- Cedillo-Rivera R, Muñoz O (1992): *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazol, mebendazol and other chemotherapeutic agents. *J Med Microbiol* 37: 221-224.
- Conde-Bonfil MC, De la Mora-Zerpa C (1992): *Entamoeba histolytica*. un desafío vigente. *Salud Publica Mex* 34: 335-341.
- Diamond LS, Bartgis IL (1971): Axenic cultures *in vitro* testing of drugs against *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Méd (Méx.)* 2 (Suppl. 1): 339-343.
- Díaz, JL (1977): *Usos de las plantas medicinales de México*. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A.C., México.
- Dominguez XA, Quintero G, Butruille D (1972): Triterpenoids and triacotane from *Conyza filaginoides*. *Phytochemistry* 11: 1855-1856.
- Dou J, McChesney JD, Sindelar RD, Goins DK, Walker LA (1996): A new quassinoid from *Castela texana*. *J Nat Prod* 59: 73-76.
- Frolova VI, Kuzovkoo AD, Kibol'chich PN (1964): Alkaloids of *Ptelea trifoliata*. L. The structure of pteleine. *Zhurnal Obshchei Khimii* 34: 3599-3505.
- Herz W, Kulanthaivel P (1984): Chromans from *Helianthella quinquevallis*. *Phytochemistry* 23: 435-437.
- Jimenez A, Pereda R, Bye R, Linares E, Mata R (1993): Ratibinolide III, A sesquiterpene lactone glucoside from *Ratibida latipalmaris*. *Phytochemistry* 34: 1079-1082.
- Jimenez A, Mata R, Lotina-Hessen B, Anaya-Lang AL, Velasco IL (1996): Phytochemical growth inhibitory compounds from *Malmes depressa*. *J Nat Prod* 59: 202-204.
- Korosi M, Szendrei K, Novak I, Reish J, Blazso G, Minker E, Koltai M (1976): Quaternary alkaloids of *Ptelea trifoliata*. II. Examination of the components by an indirect method. *Herba Hung* 15: 9-17.
- Kowalska M, Borkowski B (1966): Alkaloids in leaves and roots of *Ptelea trifoliata*. *Acta Polon Pharm* 23: 295-304.
- Kubo I, Murai Y, Chaudhuri S (1993): Castelalin, a quassinoid from *Castela tortuosa*. *Phytochemistry* 33: 461-463.
- Martinez M (1989): *Las Plantas Medicinales de México*, 6th ed. Ed. Botas, México.
- Mata R, Navarrete A, Alvarez L, Pereda-Miranda R, Delgado G, Romo de Vivar A (1987): Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*. *Phytochemistry* 26: 191-193.
- Mata R, Rios L, Camacho M del R, Reguero MT, Lorence D (1988): Triterpenes from *Cigarrilla mexicana*. *Phytochemistry* 27: 1887-1889.
- Mata R, Castañeda P, Camacho M del R, Delgado G (1989): Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine. V: Cucurbitacin glucosides from *Cigarrilla mexicana*. *J Nat Prod* 5: 836-839.
- Mata R, Rojas A, Soriano M, Villena R, Bye R, Linares E (1990): Ratibinolide, a new sesquiterpene lactone from *Ratibida latipalmaris*. *Heterocycles* 31: 1111-1114.
- Mulvey RK, Jalewski CJ (1969): Kukosagimine. Plant source and its isolation from *Ptelea trifoliata* root bark. *Econom Bot* 23: 75-81.
- Noguera B, Camacho M del R, Mata R, Bye R, Linares E (1994): Constituents of *Kohleria deppeana*. *Fitoterapia* LXV: 182.
- Novak I, Szendrei K, Papay V, Minker E, Koltai M (1970): Hungarian rutaceae species: *Ptelea trifoliata*. *Herba Hung* 9: 23-21.
- Okone DA, Taylor DAH (1971): Meliaceae. Limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* 10: 469-470.
- Petit-Palay G, Montagu M, Meriene C, Ambrose JD, Rideau M, Viel C, Chenieux JC (1989): New alkaloids from *Ptelea trifoliata*. *Planta Med* 55: 469-470.
- Phillipson JD (1991): Assays for antimalarial and amoebicidal Activities (K. Hostettmann, Ed.) *Methods in Plant Biochemistry* Vol. 6, Academic Press Limited, Great Yarmouth, Norfolk, pp. 135-152.
- Reish J, Szendrei K, Novak I, Minker E, Papay, V (1969): Chemistry of natural products. XXVI. Components of *Ptelea trifoliata* blossoms. Arctigenin methyl ether, (+)-hydroxylunine, and ptelefolin. *Tetrahedron Lett* 3803-3806.
- Reish J, Szendrei K, Novak I, Minker E, Korosi J, Csedo K (1972): Natural product chemistry 35. Three new 2-quinoline alkaloids from *Ptelea trifoliata*. *Tetrahedron Lett* 449-452.
- Reish J, Mithom YW, Korosi J, Szendrei K, Novak I (1973): Natural products chemistry XLV. O-Methyltelefolonium as ptelea leading alkaloid. *Phytochemistry* 12: 2552-2553.
- Reish J, Korosi J, Szendrei K, Novak I, Minker E (1975a): Natural products chemistry 50. Coumarins and quinoline alkaloids from root bark of *Ptelea trifoliata*. *Phytochemistry* 14: 1678-1679.
- Reish J, Korosi J, Szendrei K, Novak I, Minker E (1975b): Studies on natural products chemistry LIII. 7,8-Methylenedioxyquinoline derivatives as alkaloids of the flowers of *Ptelea trifoliata*. *Phytochemistry* 14: 840-841.
- Reish J, Mester I, Szendrei I, Koeroesi J (1978): Studies on natural products. 66. Pteleodimerine. The first dimeric quinolone alkaloid. *Tetrahedron Lett* 39: 3681-3682.

- Rideau M, Verchere C, Hïbon P, Chenieu JC, Maupas P, Viel C (1979): Dihydrofuroquinolin alkaloids from Rutaceae: Isolation structure, biological properties. *Phytochemistry* 18: 155-159.
- Rojas A, Villena R, Jimenez A, Mata R (1991): Chemical studies on Mexican traditional medicine, XXI. Ratibinolide II, a new sesquiterpene lactone from *Ratibida latipalearis*. *J Nat Prod* 54: 1279-1282.
- Segura-Correa R, Mata R, Anaya AL, Hernández-Bautista B, Villena R, Soriano-García M, Bye R (1993): New tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *J Nat Prod* 56: 1567-1574.
- Soto-Núñez JC, Sousa M (1995): Plantas medicinales de la Cuenca del río Balsas. Cuaderno 25. Instituto de Biología, UNAM, México D.F. p. 198.
- Szendrei K, Novak I, Petz M, Reish J, Bailey HE, Bailey VL (1973): Coumarins and Alkaloids from *Ptelea trifoliata* subspecies *pallida* var *confinis*. *Lloydia* 36: 333-337.
- Szendrei K, Petz M, Novak I, Reish J, Bailey HE, Bailey VL (1974): Isolation and structure analysis of quinoline alkaloids and coumarins from *Ptelea trioliata* subspecies *pallida* var *coninis*. *Herba Hung* 13: 49-61.
- Wright CW, Allen D, Cai Y, Chen Z, Phillipson JD, Kirby GC, Warhurst DC, Tits M, Angenot L (1994): Selective antiprotozoal activity of some *Strychnos* alkaloids. *Phytother Res* 8: 149-152.

Accepted: August 25, 1998

The microbial strains (Table 1), were from the American Type Culture Collection. Culture media were purchased from Oxoid (U.K). MIC of the dried extracts, of the essential oil, as well as of the isolated compounds were determined by a micro-dilution assay essentially as recommended by NCCLS (12). Microbial cells were suspended in Mueller Hinton broth to give a final density of 5×10^5 – 10^6 CFU/ml and incubated at 37 °C for 18 h under aerobic conditions with the respective compounds and fractions that have been dissolved in MeOH. Control microbial cultures were incubated with MeOH under the same conditions. MeOH was determined not to be toxic under these experimental conditions. MIC was defined as the lowest concentration that inhibited visible growth.

Copies of the original spectra are available on request from the author of correspondence.

Acknowledgements

This work was supported by grants from General Secretariat of Research and Technology (contract 96BE59), and APIVITA S.A.

References

- Greuter, W., Raus, R. (1981) *Med-Checklist Notule* 4, Willdenowia 11, 275.
- Greuter, W., Burdet, H. M., Long, G. (1984) *Med-Checklist*, Vol. 1, p. 315, Geneva.
- Hegnauer, R. (1964) *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol. III, p. 429, Birkhäuser Verlag, Basel, Stuttgart.
- Gunther, E. (1950) *The Essential Oils*, Vol. 4, p. 45, Van Nostrand and Co. Inc., New York.
- Demetzos, C., Harvala, C., Philianos, S. M., Skaltsounis, A. L. (1990) *J. Nat. Prod.* 53, 1365–1368.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Skaltsounis, A. L., Couladis, M., Harvala, C., Libot, F. (1994) *Phytochemistry* 35, 979–981.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Hotelier, F., Harvala, C. (1989) *Ann. Pharmaceutics Fr.* 47, 314–318.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Loukis, A., Harvala, C. (1994) *J. Ess. Oil Res.* 6, 37–41.
- Demetzos, C., Mitaku, S., Couladis, M., Harvala, C., Kokkinopoulos, D. (1994) *Planta Med.* 60, 590–591.
- Adams, P. R. (1995) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, pp. 438, 425, 428, 282.
- Van den Doel, H., Kratz, P. D. (1963) *J. Chromatog.* 11, 463–471.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1995) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*: National Committee for Clinical Laboratory Standards, WAYNE, Pa., Vol. 15, p. 14, Approved standard no M7-A3.

Ass. Prof. Dr. Costas Demetzos

Department of Pharmacy
Laboratory of Pharmacognosy
University of Athens
GR Panepistimiopolis Zografou 15771
Athens
Greece
E-mail: c.demetzo@atlas.uoa.gr
Fax: +30-1-72784596

Antiamoebic and Antigiardial Activity of Plant Flavonoids* **

Fernando Calzada^{1,2,*}, Mariana Meckes², and Roberto Cedillo-Rivera³

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México

² Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México

³ Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México

** Taken in part from the PhD thesis of F. Calzada

Received: March 17, 1998; Revision accepted: June 28, 1998

Abstract: The *in vitro* antiprotozoal activity of 18 natural flavonoids has been determined against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. (–)-Epicatechin, (–)-epigallocatechin and kaempferol were the most active flavonoids against both protozoa.

Infectious diarrhoeas are a health problem in developing countries. Two major causes of such diseases are *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*, the organisms that cause amoebic dysentery and giardiasis, respectively. The significant *in vitro* antiprotozoal activity displayed by kaempferol, tiliroside, and quercetin (1, 2) prompted us to undertake the present investigation.

The test compounds differ in the number, nature, and allocation of the oxygen-bearing substituents in rings A and B, as well as in the presence or absence of a 2,3-double bond, a hydroxy functionality at C-3, and a 4-keto group in ring C. In Table 1 the IC₅₀ values are listed for the series of compounds tested (Fig. 1).

Among those, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin, and kaempferol were the most potent flavonoids against both protozoa with IC₅₀ values ranging from 1.92 to 7.93 µg/ml for *E. histolytica* and from 1.64 to 8.73 µg/ml in the case of *G. lamblia*.

The structure-effect correlations revealed that the 2,3-double bond and the 4-keto group of ring C were not essential for high antiprotozoal activity. Compounds 5 and 6 were less active in comparison with compounds 16 and 18. Hence, the antiprotozoal activity against *E. histolytica* and *G. lamblia* seems to be related to the non-planarity of the A and C ring component of the flavan-3-ol structure. In addition, the 2,3-*cis*(α) stereochemistry might be an important requirement for the observed activity since compound 17 which is *trans*-configured is less active as antiprotozoal agent than *cis*-compounds 16 and 17. Also, a 5,7-dihydroxylated A ring and the presence of a 3-hydroxy group were the common structural features of most active compounds (4, 16, and 18). On the other hand, when the degree of oxygenation was

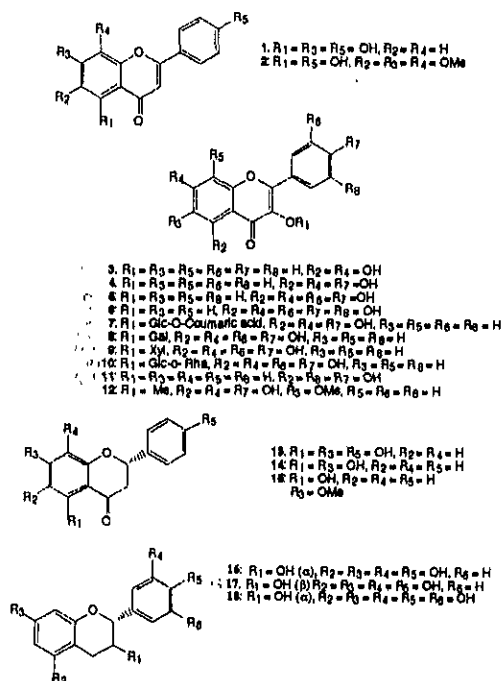


Fig. 1 Structure of flavonoids tested for antiprotozoal activity against *E. histolytica* and *G. lamblia*

increased in the B-ring the antiprotozoal activity significantly decreased (5, 6, and 18). Glycosylation of the free 3-hydroxy group in ring C caused no significant differences in the inhibitory activity. Compounds 4 and 5 which possess a free

hydroxy at C-3 showed a similar activity than their glycosides (7–10).

The presence of the antiprotozoal compounds, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin and kaempferol in several plant species used traditionally for the treatment of bloody diarrhoea could account for the effectiveness of such plants in folk medicine as therapeutic agents.

Materials and Methods

Test compounds: The flavonoids examined in this report were obtained commercially (Sigma Chemical), or isolated from different plant species: Thus kaempferol (4), quercetin (5), and tilliroside (7) were obtained from *H. glomeratum* Lag (1) and *C. pinetorum* Benth (2); pinocembrin (14) and pinostrobin (15) from *Teloxys graveolens* (Willd.) Weber (3); xanthomicrol (2) from *Brickellia paniculata* Robinson (4), and 3,6-dimethoxykaempferol (12) from *Conyza filaginoides* (DC.) Hieron (5).

In vitro test: In vitro testing against *E. histolytica* and *G. lamblia* was assessed using a method previously described (6, 7). The microorganisms used in the assays were *E. histolytica* strain HM1-IMSS and *G. lamblia* strain IMSS:0989:1. Each compound was dissolved in 1 ml of dimethyl sulphoxide (DMSO) and 19 ml of culture medium and incorporated in disposable polypropylene microcentrifuge tubes with 4 ml of medium to obtain the required range of concentrations: 2.5–300 µg/ml. Each test include metronidazole (Sigma) as standard amoebicidal and giardicidal drug, a control (culture medium plus trophozoites and DMSO) and a blank (culture medium).

Acknowledgements

Thanks are due to Dr. Rachel Mata (Facultad de Química, UNAM) for valuable discussions and comments on the manuscript. This study was partially sponsored by the following projects: PADEP (programa de Apoyo a las Divisiones de Estudio de Posgrado, UNAM) N° 005356, 005320 and 005377.

Flavonoid	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
(–)-Epicatechin (16)	1.92 (1.97–1.31)	1.64 (1.74–1.40)
(–)-Epigallocatechin (18)	6.89 (5.00–9.48)	8.06 (6.05–9.97)
Kaempferol (4)	7.93 (7.98–7.89)	8.73 (8.75–8.71)
Tilliroside (7)	17.45 (22.07–13.80)	17.36 (22.34–13.48)
Apigenin (1)	10.06 (10.73–9.40)	34.34 (34.41–34.28)
(+)-Catechin (17)	65.55 (67.30–62.20)	33.95 (35.10–31.50)
Pinocembrin (14)	80.76 (81.07–80.42)	57.39 (57.57–57.21)
4',5,7-Trihydroxyflavanone (13)	98.24 (98.97–97.50)	47.84 (47.97–47.72)
3,6-Dimethoxykaempferol (12)	105.30 (106.7–104.4)	65.40 (67.55–64.20)
Reynoutrin (9)	108.92 (109.14–105.58)	85.11 (97.24–80.1)
Quercetin (5)	114.30 (115.23–113.36)	26.47 (22.10–31.94)
Myricetin (6)	115.31 (117.30–114.50)	177.70 (178.20–177.40)
Rutin (10)	119.67 (121.10–118.50)	178.73 (179.3–177.8)
Hyperine (8)	143.61 (185.88–110.95)	49.20 (49.31–49.08)
Galangin (3)	158.67 (159.08–157.40)	48.70 (49.20–47.30)
Fisetin (11)	189.01 (191.30–188.20)	80.48 (80.71–79.95)
Pinostrobin (15)	184.45 (187.17–181.79)	80.76 (80.98–80.54)
Xanthomicrol (2)	274.85 (278.27–271.51)	77.96 (78.10–77.82)
Metronidazole	0.04	0.20

Results are expressed as mean (n = 6) IC₅₀ (concentration that inhibited the growth of trophozoites in 50 %).

Table 1 Antiprotozoal activity of flavonoids against *E. histolytica* and *G. lamblia* IC₅₀ µg/ml (95 % confidence limits).

References

- ¹ Calzada, F. López, R., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R. (1995) *Int J. Pharmacog.* 33, 351–352.
- ² Calzada, F., Alanís, A. D., Meckes, M., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R. (1998) *Phytother. Res.* 12, 70–72.
- ³ Mata, R., Navarrete, A., Alvarez, L., Pereda-Miranda, R., Delgado, G., Romo de Vivar, R. (1987) *Phytochemistry* 26, 191–193.
- ⁴ Meckes, M., Calzada, F., Paz, D., Rodríguez, J. (1997) Program and abstracts. The 38th Annual meeting of the ASP, p. 97.
- ⁵ Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, I., Bye, R., Linares, M. (1997) *Planta Med.* 63, 31–35.
- ⁶ Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A., Muñoz, O. (1992) *Arch. Med. Res.* 23, 240.
- ⁷ Cedillo-Rivera, R., Muñoz, O. (1992) *J. Med. Microbiol.* 37, 221–224.

M en C. Fernando Calzada Bermejo

Unidad de Investigación Médica
en Farmacología de Productos Naturales
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional
Siglo XXI, IMSS
Av Cuahutémoc 330
Col Doctores
C.P. 06725
México D F
México
E-mail: rachel@servidor.unam.mx
Fax +5217610952
(Rachel Mata/Fernando Calzada)

Synergistic Effects of the Alkaloid Sinomenine in Combination with the Immunosuppressive Drugs Tacrolimus and Mycophenolic Acid* *

Bernhard Vieregge, Klaus Resch, and Volkhard Kaever[†]

Institut für Klinische Molekularpharmakologie, Medizinische
Hochschule Hannover, Hannover, Germany

* * This work was part of the thesis of B. Vieregge

Received: April 30, 1998, Revision accepted: June 27, 1998

Abstract: The alkaloid sinomenine extracted from the medicinal plant *Sinomenium acutum* is used in China for the treatment of various rheumatic diseases. It has immunomodulatory properties in a cardiac allograft transplantation model. Its antiproliferative effect on human mononuclear cells in combination with different immunosuppressive drugs was further analysed *in vitro*. Sinomenine dose-dependently attenuated thymidine incorporation, interleukin-2 synthesis, and cell cycle progression of activated T-lymphocytes. Cell proliferation was synergistically decreased by addition of sinomenine together with sub-optimal concentrations of the established immunosuppressive drugs tacrolimus or mycophenolic acid, respectively.

Abbreviations:

IC₅₀: half-maximal inhibitory concentration
IF: Interaction factor
IL-2: interleukin-2
PBMC: peripheral blood mononuclear cells

Several immunosuppressive drugs are available and are used in transplantation for the protection of allograft survival or for the treatment of autoimmune diseases. Especially for the newer immunosuppressive drugs such as tacrolimus and mycophenolic acid little is known about their harmful side effects upon longer periods of usage. Most toxic side effects of immunosuppressive drugs occur in relation to their applied concentrations. On the other hand, high concentrations are normally needed to ensure allograft survival in episodes of acute rejection. It may, therefore, be recommended that established drugs or new agents showing synergistic immunosuppressive effects are used simultaneously in order to reduce the effective concentrations of each single substance.

The medicinal plant *Sinomenium acutum* Rehd. et Wils. (Menispermaceae) has been used in China for more than 2000 years for the treatment of various diseases (1). The main active constituent has been identified as the alkaloid sinomenine (7,8-didehydro-4-hydroxy-3,7-dimethoxy-17-methyl-9 α ,13 α ,14 α -morphinan-6-one) (2). Sinomenine is in clinical use in China and Japan due to its analgetic and anti-inflammatory activities (3). Its anti-rheumatic properties have been proven in clinical studies (4, 5). In the last years additional immunomodulatory effects of sinomenine have been revealed *in vitro* and in different animal models. On the

Geranins A and B, New Antiprotozoal A-Type Proanthocyanidins from *Geranium niveum*[†]

Fernando Calzada,^{‡,§} Carlos M. Cerda-García-Rojas,[§] Mariana Meckes,^{||} Roberto Cadillo-Rivera,^{||} Robert Bye,[⊥] and Rachel Mata^{*‡}

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., México, Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México D.F. 07000, México, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, 06725, México D.F., México, and Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México D.F., México

Received October 16, 1998

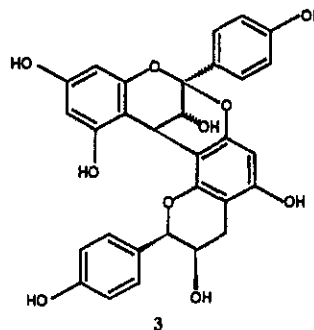
Bioassay-guided fractionation of the antiprotozoal extract of *Geranium niveum* led to the isolation of two new A-type proanthocyanidins, *epi*-afzelechin-(4 β -8,2 β -O-7)-afzelechin (1) and *epi*-catechin-(4 β -8,2 β -O-7)-afzelechin (2). Compounds 1 and 2 were given the trivial names of geranins A and B, respectively. In addition, five known compounds, mahuannin B (3), reynoutrin (4), hyperin (5), methyl gallate (6), and 3- β -caffeoyl-12-oleanen-28-oic acid (7), were obtained. The structures of the new proanthocyanidins were elucidated by spectroscopic and chemical methods as well as CD measurements. Compounds 1, 2, and 4-7 were tested against axenically grown trophozoites of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*.

Geranium niveum S. Watson (Geraniaceae) is a silvery canescent-leaved herb which grows along the dry stream banks and grassy meadows of the pine-oak forests in the high mountains of western Chihuahua, Mexico. The Tarahumara Indians call this perennial herb "makiki" and employ the decoction of the roots as an antifebrile, a purgative, and as a remedy for kidney pain.¹⁻³

In a preliminary screening conducted to evaluate the antiprotozoal activity of some Mexican medicinal plants we found that a CHCl₃-MeOH (1:1) extract prepared from the roots of *G. niveum* exhibited antiprotozoal activity against axenically grown trophozoites of *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*.⁴ In this paper we describe the isolation and characterization of the major antiprotozoal substances from the roots of *G. niveum*.

Results and Discussion

A sample of dry *G. niveum* roots was exhaustively extracted with CHCl₃-MeOH (1:1). The crude active extract was subjected to sequential solvent partition with CHCl₃ and EtOAc. The resulting fractions were tested for their ability to inhibit the growth of trophozoites of *G. lamblia* and *E. histolytica*.⁴⁻⁶ The highest level of activity was found in the EtOAc fraction (see Experimental Section). The active fraction was separated by sequential column chromatography using Si gel with increasing solvent polarity, gel permeation (Sephadex LH-20) and HPLC to yield three A-type proanthocyanidins, *epi*-afzelechin-(4 β -8,2 β -O-7)-afzelechin (1), *epi*-catechin-(4 β -8,2 β -O-7)-afzelechin (2), and mahuannin⁷ B (3), two flavonoids, reynoutrin⁸ (4) and hyperin⁹ (5), as well as methyl gallate¹⁰ (6) and 3- β -caffeoyl-12-oleanen-28-oic acid¹¹ (7). Compounds 1 and 2 are new natural products and were given the trivial names of geranin A and B, respectively.



The structures of the known compounds were ascertained by comparison of their physical and spectroscopic properties with those reported in the literature.

Compound 1 was isolated as a red powder and responded positively to the vanillin-sulfuric acid reagent. The molecular formula was determined as C₃₀H₂₄O₁₀ on the basis of the ion peak at *m/z* 545 [M + 1]⁺ in the positive FABMS (NBA), NMR (Tables 1 and 2), and elemental analysis data. Upon methylation with dimethyl sulfate compound 1 afforded the pentamethyl derivative, 1a. The NMR spectra of 1 were similar to those of other A-type proanthocyanidins.¹²⁻¹⁴ The ¹H NMR spectrum (Table 1) displayed the characteristic signals for the dihydropyran rings of the upper (U) and terminal (T) flavan-3-ol units. The resonances for upper dihydropyran ring appeared as an AB system [δ 4.08 (H-9U) and 4.26 (H-4U), each 1H, each d, *J* = 3.5 Hz], and those of the terminal unit were observed at δ 4.80, 1H, d, *J* = 8.0 Hz (H-2 T); 4.17, 1H, ddd, *J* = 8.5, 8.0, and 5.5 Hz (H-3T); 2.93, 1H, dd, *J* = 16.5, 5.5 Hz (H-4Ta), and 2.58, 1H, dd, *J* = 16.5, 8.5 Hz (H-4Tb). The aromatic region of this spectrum exhibited two A₂B₂ and one AB system for two *p*-disubstituted and one tetrasubstituted benzene rings, respectively. Finally, a singlet, consistent with the presence of a pentasubstituted benzene, was observed at δ 6.10 (H-6T). The ¹³C NMR data (Table 2) and HMQC correlations supported the above

* To whom correspondence should be addressed. Phone: (525) 622-5289.

FAX: (525) 622-5329. E-mail: rachel@servidor.unam.mx.

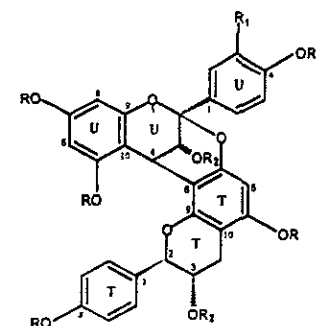
[†] Taken from the Ph.D. dissertation of F. Calzada. Part XL in the series Chemical Studies on Mexican Medicinal Plants.

[‡] Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

[§] Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

^{||} Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

[⊥] Jardín Botánico, Universidad Nacional Autónoma de México.



	R	R ₁	R ₂
1	H	H	H
1a	Me	H	H
1b	Me	H	(S)-MTPA
1c	Me	H	(R)-MTPA
2	H	OH	H
2a	Me	OMe	H
2b	Me	OMe	(S)-MTPA
2c	Me	OMe	(R)-MTPA

assignments. The two flavonoid moieties can be linked to build up the basic skeleton of an A-type proanthocyanidin through three type of linkages, namely (4→8,2→O→7); (4→6,2→O→5); and (4→6,2→O→7). A NOESY experiment allowed us to discriminate between these possibilities; thus, the correlations H-4U/H-2T, H-3U and H-6U/H-2T, H-6T defined the (4→8,2→O→7) linkage. It is important to point out that the correlations H-2T/H-3U and H-4U were also observed in the COSY spectrum of 1. Additional evidence for the proposed linkage was deduced from the correlations OMe-5U/H-6U, H-4U, H-2T, H-6T, and H-2T observed in the NOESY spectrum of 1a. An HMBC experiment correlated the proton spin systems and the carbon skeleton. The next step was then to assign the stereochemistry at the chiral centers. In the case of carbons 2U and 4U, the absolute stereochemistry was determined by CD measurements.¹⁶ The CD spectrum of geranin A (1) showed a strong positive Cotton effect at 220 nm ($[\theta] = 3.26 \times 10^3$); this observation indicated R configuration at C-4U. The absolute stereochemistry at C-3U and C-3T was established using Mosher ester methodology.^{13,16,17} The R-(+)- and S-(-)-MTPA esters 1c and 1b, respectively, were prepared from the methyl derivative 1a using standard procedures.¹⁸ The analysis of the $\Delta\delta_H(R-S)$ data (Table 3) of the R-(+)- and S-(-)-MTPA esters 1c and 1b showed positive differences for H-2', 6'U [$\Delta\delta_H(R-S) = +0.13$] and H-3', 5'U [$\Delta\delta_H(R-S) = +0.19$] and a negative difference for H-6U [$\Delta\delta_H(R-S) = -0.12$] indicated that the absolute stereochemistry of the chiral center at C-3U was R. Thereafter, the absolute configuration at C-2U was automatically assigned as S. The positive difference found for H-4Tax [$\Delta\delta_H(R-S) = +0.13$] and the negative differences for H-2T [$\Delta\delta_H(R-S) = -0.10$] and H-2', 6T [$\Delta\delta_H(R-S) = -0.10$] revealed that the absolute stereochemistry of the chiral center at C-3T was S. Thus, the absolute configuration at C-2T was determined as R because of the trans relationship between H-3T and H-2T. Accordingly, the structure for this new proanthocyanidin, designated as geranin A, was proposed to be *epi*-afzelechin-(4 β →8,2 β →O→7)-afzelechin (1).

Molecular mechanic calculations using the PCMODEL program were carried out to obtain additional stereostructural features of compound 1. The minimum energy

Table 1. ¹H NMR (500 MHz) Chemical Shifts for Compounds 1 and 2 in MeOH-*d*₄^a

ring/protons	1	2
U 3	4.08 d (3.5)	4.08 d (3.5)
4	4.26 d (3.5)	4.25 d (3.5)
6	5.96 d (2.5)	5.94 d (2.5)
8	6.08 d (2.5)	6.06 d (2.5)
2'	7.50 d (9.0)	7.12 d (1.85)
3'	8.82 d (9.0)	—
5'	8.82 d (9.0)	6.79 d (8.25)
6'	7.50 d (9.0)	7.0 dd (8.25, 1.85)
T 2	4.80 d (8.0)	4.80 d (8.0)
3	4.17 ddd (5.5, 8.0, 8.5)	4.16 ddd (5.6, 8.0, 8.4)
4a	2.58 dd (8.5, 16.5)	2.57 dd (8.4, 16.4)
4b	2.93 dd (5.5, 16.5)	2.93 dd (5.6, 16.4)
6	6.10 s	6.08 s
2'	7.29 d (8.4)	7.29 d (8.4)
3'	6.83 d (8.4)	6.81 d (8.4)
5'	6.83 d (8.4)	6.81 d (8.4)
6'	7.29 d (8.4)	7.29 d (8.4)

^a Values in parentheses are *J* in Hz.

Table 2. ¹³C NMR (125 MHz) Chemical Shifts for Compounds 1 and 2 in MeOH-*d*₄

ring/carbon	1	2
U 2	100.45	100.33
3	87.70	87.82
4	29.08	29.22
5	156.70	156.77
6	98.16	98.11
7	159.05	158.89
8	96.56	96.58
9	154.25	154.24
10	104.02	104.02
1'	131.64	132.28
2'	129.98	115.62
3'	115.54	145.63
4'	158.79	146.77
5'	115.54	116.29
6'	129.98	115.62
T 2	84.21	84.30
3	68.05	68.10
4	29.20	29.22
5	156.04	156.12
6	96.64	96.68
7	152.13	152.18
8	106.82	106.82
9	151.43	151.44
10	103.21	103.19
1'	129.81	129.91
2'	130.11	130.13
3'	116.33	116.29
4'	158.69	158.79
5'	130.11	130.13
6'	116.33	116.29

conformation of 1 represented by 1-*dieq* in Figure 1 had $E_{MMX} = 45.8$ kcal mol⁻¹. A second local minimum was found for this compound at $E_{MMX} = 47.1$ kcal mol⁻¹ corresponding to the conformation depicted in 1-*di*ax, where the phenyl and hydroxyl group of the T-pyran ring are pseudoaxial. If it is assumed that $\Delta E_{MMX} \approx \Delta G^\circ = 1.3$ kcal mol⁻¹ and using the $\Delta G^\circ = -RT(\ln K)$ equation, it can be calculated that $K = 9.0$ at 25 °C and, therefore, conformer 1-*di*ax only contributes with ca. 10% to the conformational equilibrium. However, in the pentamethyl derivative 1a, conformer 1a-*di*ax becomes more significant being present in ca. 30%, as calculated from $E_{MMX} = 63.1$ kcal mol⁻¹ for 1a-*dieq* $E_{MMX} = 63.6$ kcal mol⁻¹ for 1a-*di*ax ($\Delta E_{MMX} \approx \Delta G^\circ = 0.5$ kcal mol⁻¹; $K = 2.3$). This phenomenon can be experimentally observed, since the coupling constant $J_{2T,3T}$ changes from 8.0 Hz in 1 to 6.5 Hz in 1a. The calculated $J_{2T,3T}$ values for conformers 1a-*dieq* and 1a-*di*ax using the PCMODEL program are 9.0 and 1.7 Hz, respectively.

Table 3. Partial ¹H NMR Data of the (S)- and (R)-Mosher Esters of 1 and 2

protons	1				2			
	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{R-S}$	carbinol config	(S)-MTPA	(R)-MTPA	$\Delta\delta_{R-S}$	carbinol config
4U	5.02	5.03	+0.01	R	4.98	4.99	+0.01	R
6U	6.08	5.96	-0.12	R	6.09	5.97	-0.12	R
8U	6.26	6.22	-0.04	R	6.28	6.24	-0.04	R
OMe-5U	3.26	3.23	-0.03	R	3.35	3.34	-0.01	R
2',6'U	7.45	7.58	+0.13	R	a	a	-	-
3'U	6.71	6.90	+0.19	R	-	-	-	-
-5'U	6.71	6.90	+0.19	R	6.80	6.89	+0.09	R
3'5'T	6.85	6.77	-0.08	S	6.93	6.84	-0.09	S
2',6'T	7.25	7.15	-0.10	S	7.26	7.15	-0.11	S
2T	5.26	5.16	-0.10	S	5.05	5.03	-0.02	S
4Tax	2.71	2.84	+0.13	S	2.83	2.97	+0.15	S

^a Overlapped with ester signals.

Table 4. Antiprotozoal Activity of the MeOH-CHCl₃ (1:1) Extract and Compounds from *G. niveum*

compound	IC ₅₀ μ g/mL (CI) ^a	
	<i>G. lamblia</i>	<i>E. histolytica</i>
extract	20.6 (20.7-20.5)	8.7 (8.9-8.5)
1	2.4 (2.6-2.1)	184.7 (186.1-183.4)
2	6.0 (7.0-5.9)	13.6 (14.0-13.0)
5	85.1 (97.2-80.1)	108.9 (109.1-108.6)
6	49.2 (49.3-49.1)	143.8 (185.9-110.9)
7	31.2 (31.3-31.0)	22.6 (23.6-22.5)
8	ND	19.25 (19.5-18.7)
metronidazole ^b	0.21	0.04

^a CI = 95% confidence intervals. ^b Positive control.

Therefore, the calculated value for the averaged coupling constant in the conformational equilibrium between 70% **1a-dieq** and 30% **1a-diax** is $J_{2T,3T} = 6.8$ Hz, which is very close to the experimental value of 8.5 Hz. To explain why the conformations of **1a** are closer in energy than the corresponding conformations of **1**, the interatomic distances between the carbon atom of the methoxyl group at C-5U and those of the phenyl ring at C-2T were calculated. Surprisingly, as exemplified in Figure 1, it was found that both groups were closer in **1a-dieq** than in **1a-diax**. Thus, although **1a-dieq** is the more stable conformer, **1a-diax** is present in important amounts in the dynamic equilibrium because of some steric hindrance being released when **1a-dieq** interconverts to **1a-diax**. These characteristic features in **1** and **1a** can be useful for the stereochemical analysis of similar substances as it has been pointed out in a related work.¹⁹

The minimum energy structures of the Mosher diesters **1b** and **1c** were also calculated. As expected, the α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid moieties closely resembled the characteristic conformations found in the Mosher models,¹⁶ allowing an easy interpretation of the results listed in Table 3.

Geranin B (**2**) was isolated as a chestnut powder. The positive FAB spectrum of compound **2** exhibited the $[M + H]^+$ peak at m/z 561. Thus, the quasi-molecular ion of **2** was 16 units larger than that of compound **1**; this difference suggested the presence of one additional hydroxyl group in **2**. The CD spectrum of **2** also revealed a positive cotton effect near 220 nm, indicating that the absolute configuration at C-4U was the same as in **1**. The 1D NMR (Tables 1 and 2) as well as the NOESY and HMBC spectra were almost identical to those of **1** and therefore, consistent with an A-type proanthocyanidins possessing a (4- β -8,2 β -O-7) interflavanyl linkage. The main differences between the NMR spectra of compound **1** and those of **2** were the signals attributable to the aromatic ring at C-2U. In the case of compound **2**, the proton signals for the benzene ring at C-2U were not observed as an A₂B₂ pattern but as an ABX

spin system at δ 7.12 [d, $J = 1.85$ Hz (H-2'U)], 7.0 [dd, $J = 8.25$ and 1.85 Hz (H-6'U)] and 6.79 [d, $J = 8.25$ Hz (H-5'U)], consistent with a trisubstituted benzene ring. Moreover, the HMBC correlations observed for the aromatic nuclei of the rings at C-2U provided additional support for the substitution pattern proposed for such a ring in compound **2**. The absolute stereochemistry of the stereogenic centers C-3U and C-3T was also determined by analysis of the ¹H NMR (Table 3) of the di-(S)- (**2b**) and di-(R)- (**2c**) Mosher esters of the permethyl derivative **2a**. The positive value ($\Delta\delta_{R-S}$) obtained for H5'U [$\Delta\delta_{H(R-S)} = +0.09$] as well as the negative value ($\Delta\delta_{R-S}$) calculated for H-6U [$\Delta\delta_{H(R-S)} = -0.12$] indicated an *R* stereochemistry at C-3U. In the case of C-3T the stereochemistry was established as *S* considering the positive difference found for H-4Tax [$\Delta\delta_{H(R-S)} = +0.13$] and the negative differences for H-2T [$\Delta\delta_{H(R-S)} = -0.02$] and H-2',6'T. [$\Delta\delta_{H(R-S)} = -0.11$]. The stereochemistry at C-2U and C-2T was automatically assigned as *S* and *R*, respectively, following the same rationality as for compound **1**. On the basis of the above evidence, the structure for proanthocyanidin **2** was proposed as *epi*-catechin-(4 β -8,2 β -O-7)-afzelechin.

Table 3 summarizes the antiprotozoal activity data for some of the isolated compounds, of which the most active were the proanthocyanidins **1** and **2**. In both cases, *G. lamblia* was the most sensitive protozoan. To our knowledge, this is the first report of antiprotozoal properties for this type of compound. It is important to point out that none of the geranins displays cytotoxic activity against three different cell lines (MCF-7 breast carcinoma, HT-29 colon adenocarcinoma, and A-549 lung carcinoma). Finally, our findings could provide some scientific support for the ethnomedical use of the roots of this species.

Experimental Section

General Experimental Procedures. IR spectra were obtained in KBr disk on a Perkin-Elmer 599 B spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Varian VXR-500 S spectrometer. HMBC and HMQC spectra were obtained at 500/125 MHz. Melting points were determined using a Fisher Johns apparatus and are uncorrected. CD spectra were taken on a JASCO 720 spectropolarimeter at 25 °C in MeOH. Optical rotations were taken on a JASCO DIP-360 polarimeter. UV spectra were registered on spectrophotometer Perkin-Elmer 202. The FABMS spectra (positive mode) were recorded in a JEOL DX300 with a JMA system, using an NBA matrix. The target was bombarded with Xe atoms (10 keV). Semi prep. HPLC was performed on a Spherisorb S60DS2 column (250 \times 10 mm i.d., Waters) at a flow rate of 3.2 mL min⁻¹. The eluants were 5% formic acid (A) and acetonitrile (B). The isocratic profile used was 73% A.

Plant Material. The roots of *G. niveum* were obtained from plants at the end of the growing season in the municipality of

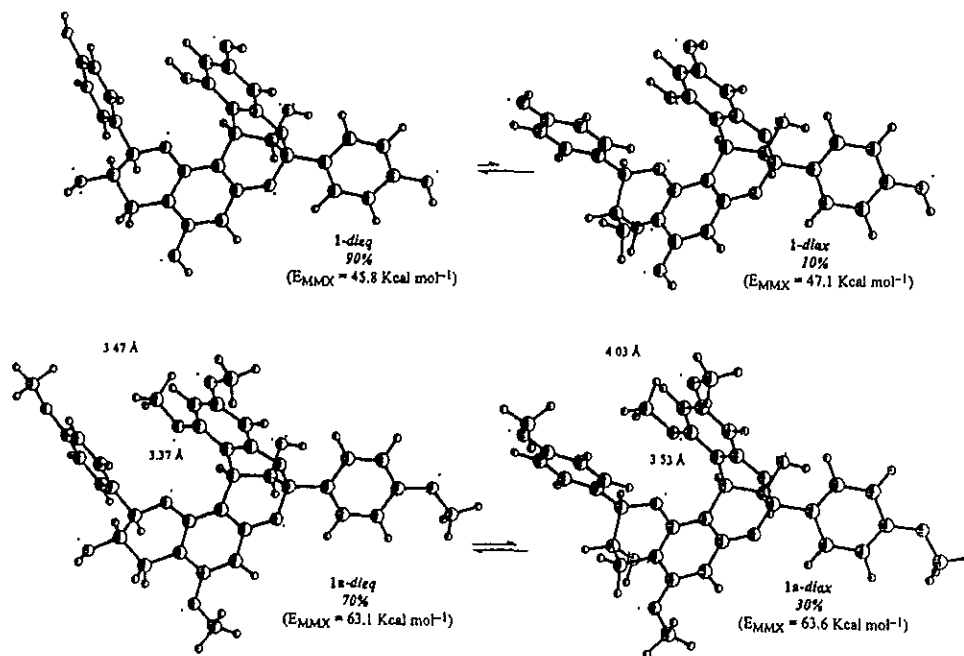


Figure 1. Conformational equilibria of **1** and **1a** obtained by MMX calculations.

Bocoyna, Chihuahua, and were air-dried in the shade. Voucher specimens (R. Bye 18054, 18265) are deposited in the Ethnobotanical Collection of the National Herbarium of Mexico (MEXU).

Extraction and Isolation. The air-dried plant material (5.3 kg) was ground and extracted exhaustively by maceration at room temperature with MeOH-CHCl₃ (1:1, 14.5 L × 3). After filtration, the extract was concentrated in vacuo to yield 173 g of a syrupy residue. The active extract (100 g) was suspended in H₂O (500 mL) and partitioned with CHCl₃ [F1, 2 g, 500 mL × 3, *E. histolytica*, IC₅₀ (CI) 92.7 (93.4–92.4) μg/mL, *G. lamblia*, IC₅₀ (CI) 138.1 (140.2–137.3) μg/mL]. The aqueous layer [F2, *E. histolytica*, IC₅₀ (CI) 35.0 (37.4–34.3) μg/mL, *G. lamblia*, IC₅₀ (CI) 84.8 (36.2–33.4) μg/mL] was dried and redissolved in H₂O (500 mL), and partitioned with EtOAc [F3, 94.2 g, 500 mL × 3, *E. histolytica*, IC₅₀ (CI) 6.6 (6.8–6.3) μg/mL, *G. lamblia*, IC₅₀ (CI) 18.7 (19.1–18.5) μg/mL]. The second aqueous layer [F4, 3.5 g, *E. histolytica*, IC₅₀ (CI) 113.0 (114.2–112.8) μg/mL, *G. lamblia*, IC₅₀ (CI) 127.9 (129.5–126.7) μg/mL] was concentrated in vacuo. The most active fraction F3 (94 g) was subjected to column chromatography over Si gel (950 g) and eluted with a gradient of CHCl₃/EtOAc [100, 50, 50, 100], EtOAc/acetone [50:50], and acetone/MeOH [50:50]. One hundred and twenty five fractions (500 mL each) were collected and pooled on basis of their TLC profiles to yield eight major fractions (F3-1–F3-8); bioactivities in the antiprotozoal assays showed one active pool [F3-5, 8.4 g, *E. histolytica*, IC₅₀ (CI) 4.9 (5.1–4.5) μg/mL, *G. lamblia*, IC₅₀ (CI) 3.6 (4.3–3.5) μg/mL]. F3-5 (2.2 g), eluted with EtOAc (100%), was further chromatographed on a Sephadex LH-20 (Pharmacia) column (50 g) eluted with EtOH to afford a mixture of compounds **1**–**3**, **4** (15 mg), **5** (276 mg), **6** (25 mg), and **7** (23 mg). The mixture **1**–**3** was resolved by HPLC (see general) with solvents A:B (73:27) to yield **1** (485 mg) and **2** (16 mg), **3** (10 mg).

Geranin A (1). Red powder; mp 245–248 °C, [α]_D +40° (c 0.3, MeOH); CD (MeOH) Δε (nm) –1.35 × 10³ (271.6), 2.21 × 10³ (238), 3.26 × 10³ (220), –4.82 × 10³ (204); UV (ε) (MeOH) λ_{max} 204.5, 258, 274 nm; IR (KBr) ν_{max} 3396, 1614, 1516, 1454, 1234, 962 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (Tables 1 and 2); FABMS

m/z [M + H]⁺ 545 (10), 409 (12), 271 (27), 154 (100); anal. C 66.21%, H 4.46%, calcd for C₃₀H₂₄O₁₀, C 66.17%, H 4.44%.

Geranin B (2). Chestnut powder; mp 230–232 °C; [α]_D +18° (c 0.3, MeOH); CD (MeOH) Δε (nm) –2.3 × 10³ (273), 4.74 × 10³ (238), 1.70 × 10³ (221); UV (MeOH) λ_{max} 205, 258, 274 nm; IR (KBr) ν_{max} 3394, 1613, 1516, 1455, 1230, 963 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (Tables 1 and 2); FABMS *m/z* [M + H]⁺ 545 (41), 409 (34), 307 (100), 271 (98), 154 (84); anal. C 66.23%, H 4.44%, calcd for C₃₀H₂₄O₁₁, C 66.17%, H 4.44%.

Other Compounds (3–7). The identification of the known compounds **3**–**7** was accomplished by comparisons of their spectral data (UV, MS, ¹H and ¹³C NMR) with those previously described for mahuanin B (**3**),⁷ reynoutrin⁸ (**4**) and hyperrin⁹ (**5**), methyl gallate⁹ (**6**), and 3-β-caffeoyl-12-oleanen-28-oic acid¹¹ (**7**).

Methyl Ethers 1a and 2a. Compounds **1** (100 mg) and **2** (11 mg) were methylated with dimethyl sulfate and potassium carbonate in acetone to afford 75 mg of **1a** and 10 mg of **2a**. **1a**: mp 143–145 °C; IR (KBr) ν_{max} 3426, 1614, 1514, 1464, 1254, 1176, 1124, 1034, 832 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.61 (dd, *J* = 6.8, 16.7 Hz, H-4T), 2.75 (dd, *J* = 5.25, 16.7 Hz, H-4T), 3.35 (s, OMe-5U), 3.70 (s, OMe-5T), 3.73 (s, OMe-7U), 3.78 (s, OMe-4T), 3.81 (s, OMe-4U), 4.12 (m, H-3T), 4.14 (d, *J* = 3.65 Hz, H-3U), 4.83 (d, *J* = 3.65 Hz, H-4U), 4.89 (d, *J* = 6.5 Hz, H-2T), 6.02 (d, *J* = 2.3 Hz, H-6U), 6.17 (s, H-6T), 6.26 (d, *J* = 2.3 Hz, H-8U), 6.84 (d, *J* = 8.7 Hz, H-3T and H-5T), 6.94 (d, *J* = 8.9 Hz, H-3U and H-5U), 7.23 (d, *J* = 8.7 Hz, H-2T and H-6T), 7.62 (d, *J* = 8.9 Hz, H-2U and H-6U); FAB-MS *m/z* [M + H]⁺ 616 (85), 465 (58), 313 (100). **2a**: IR (KBr) ν_{max} 3406, 2833, 1610, 1511, 1462, 1250, 1176, 1122, 1054, 832 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.65 (dd, *J* = 7.2, 16.7 Hz, H-4T), 2.81 (dd, *J* = 6.1, 16.7 Hz, H-4T), 3.39 (s, OMe-5U), 3.74 (s, OMe-5T), 3.77 (s, OMe-7U), 3.81 (s, OMe-4T), 3.91 (s, OMe-4U), 3.93 (s, OMe-3U), 4.17 (m, H-3T), 4.24 (d, *J* = 3.9 Hz, H-3U), 4.88 (d, *J* = 3.9 Hz, H-4U), 4.91 (d, *J* = 6.6 Hz, H-2T), 6.05 (d, *J* = 2.7 Hz, H-6U), 6.21 (s, H-6T), 6.30 (d, *J* = 2.7 Hz, H-8U), 6.80–7.4 (m, H-3T, H-5T, H-2T, H-6T, H-2U, H-6U, H-5U, and H-6U); FAB-MS *m/z* [M + H]⁺ 645 (15), 614 (58), 154 (100), 135 (85).

Mosher Esters of Compounds 1 and 2. **1a** (1.5 mg) or

MANUSCRITOS EN PREPARACION

Yaksinins A-C, New antiprotozoal Acylated Flavonol Glycosides from *Conyza filafinoides*.

Geranins C and D, Additional New Antiprotozoal A-Type Proanthocyanidins from *Geranium niveum*.

Antiamoebic and Antigiardial Activity of Plant Flavonoids Derivatives.

APENDICE D

Cuadro D-1. Actividad antiprotozoaria de los compuestos obtenidos a partir de la fracción secundaria F3-5 derivada de la fracción primaria F3 de *Geranium niveum*.

Muestra	CI ₅₀ μ M (IC 95%)	
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
Geranina A (169)	338 (342-337)	4.4 (4.7-3.8)
Geranina B (170)	24.2 (25-23.2)	10.7 (12.5-10.53)
Geranina C (171)	90.2 (90.6-89.7)	167.1 (167.3-167)
Geranina D (172)	35.1 (35.4-34.7)	92.3 (92.5-92.2)
Reinoutrina (167)	250.96 (251.47-243.3)	196.1 (224-184.5)
Hiperina (168)	309.5 (400.6-239.1)	106.0 (106.3-105.7)
Galato de metilo (165)	122.8 (128.3-122.3)	169.5 (170.1-168.5)
Acido 3- β -cafeiloxi-12-oleanen-28-oico (166)	31.1 (31.5-30.2)	294.1 (293.7-292.7)
Metronidazol*	0.23 (0.6-0.17)	1.2 (1.5-0.8)
Emetina*	280.5 (282.3-278.8)	147.8 (148-147.4)

*Control positivo; (IC) = intervalo de confianza al 95%

Cuadro D-2. Actividad antiprotozoaria de los compuestos obtenidos de *C. filaginoides*.

Muestra	CI ₅₀ μM (IC 95%)	
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
Yaksinina A (173)	49.1 (50-48.2)	77 (78-76.9)
Yaksinina B (174)	69.9 (70.6-69.2)	23.8 (23.9-23.7)
Yaksinina C (175)	22.4 (22.7-22)	167.5 (167.6-167.3)
Astragalina (176)	136.6 (137.2-136)	106.1 (106.2-105.9)
Isoquercitrina (177)	31.7 (32.1-31.3)	188.1 (188.4-187.8)
Nicotinflorina (178)	52 (52.2-51.8)	37.8 (38-37.7)
Narcisina (179)	27.5 (27.9-27.1)	151.7 (151.9-151.5)
Rutina (97)	196.1 (198.5-194.3)	293 (294-291.5)
Eritrodiol (151)	29.85 (30.4-29.3)	70.6 (70.8-69.6)
Metronidazol*	0.23 (0.6-0.17)	1.2 (1.5-0.8)
Emetina*	280.5 (282.3-278.8)	147.8 (148-147.4)

*Control positivo; ND: no determinada; (IC)= intervalo de confianza al 95%.

Cuadro D-3. Actividad antiprotozoaria de los flavonoides contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Flavonoide	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
	CI ₅₀ μ M (IC 95%)	
(-)-Epicatequina (78)	6.6 (6.7-4.5)	5.6 (6-4.8)
(-)-Epigallocatequina (186)	22.5 (31-16.3)	26.33 (32.6-19.8)
Camperol (30)	27.7 (27.9-27.6)	30.5 (30.6-30.45)
Tilirósido (31)	23.6 (29.8-18.64)	23.45 (30.18-18.21)
Apigenina (180)	36.98 (39.44-34.5)	126.2 (126.5-126)
(+)-Catequina (80)	226 (232-214.5)	117 (121-108.6)
3-galoiloxi(-)-epigallocatequina (187)	168.8 (169.4-168.2)	800.3 (803.8-797)
Pinocembrina (184)	318 (319.1-316.6)	225.9 (226.6-225.2)
4',5,7-Trihidroxiflavanona (183)	363.8 (366.5-361.1)	177.1 (177.6-176.7)
3,6-Dimetoxicamperol (182)	319. (323.3-316.3)	198.2 (204.7-194.5)
Reinoutrina (167)	250.96 (251.47-243.3)	196.1 (224-184.5)
Quercetina (94)	378.5 (381.5-375.3)	87.6 (105.7-73.2)
Miricetina (93)	362.6 (368.8-360)	558.8 (560.4-557.8)
Rutina (97)	196.1(198.5-194.3)	293(294-291.5)
Hiperina (168)	309.5 (400.6-239.1)	106.0 (106.3-105.7)
Galangina (92)	587.6 (589.2-583)	180.37 (182.2-175.2)
Fisetina (101)	660.8 (668.8-658)	281.4 (282.2-279.5)
Pinostrobina (185)	684.6 (693.2-673.3)	299.1 (300-298.3)
Xantomicol (181)	799 (808.9-789.2)	226.6 (227-226.2)
Emetina*	280.5(282.3-278.8)	147.8(148-147.4)
Metronidazol*	0.23(0.6-0.17)	1.2(1.5-0.8)

*Controles positivos; (IC)= intervalo de confianza al 95%

Cuadro D-4. Actividad antiprotozoaria de los flavonoides 30, 78, 92-94 y 186, así como de los derivados metilados (30a, 78a, 92a-94a y 186a) y peracetilados (30b, 78b, 94b y 186b).

Compuesto	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
	CI ₅₀ : μM (IC 95%)	
(-)-Epicatequina (78)	6.6 (6.7-4.5)	5.6 (6-4.8)
(-)-Epigalocatequina (186)	22.5 (31-16.3)	26.33 (32.6-19.8)
Camperol (30)	27.7 (27.9-27.6)	30.5 (30.6-30.45)
3,5,7,3',4'-pentaacetoiloxi(-)-epicatequina (78b)	80.6 (81.1-80.3)	123.3 (123.6-123)
3,5,7,3',4'-pentaacetoiloxi(+)-catequina (80b)	121.9 (122.8-120.1)	184.7 (185.2-184.3)
3,5,7,4'-tetraacetoiloxicamperol (30b)	133 (133.8-132.3)	40.46 (40.52-40.37)
3,5,7,3',4'-pentaacetoiloxiquercetina (94b)	76 (77-75)	66.3 (66.5-66.2)
5,7,3',4'-tetrametoxi(-)-epicatequina (78a)	142 (142.5-141.6)	0.12 (0.13-0.11)
5,7,3',4'-tetrametoxi(+)-catequina (80a)	184.6 (187.3-181.9)	56.2 (56.7-55.75)
3,5,7,4'-tetrametoxicamperol (30a)	83.62 (108.56-106.6)	4.1 (4.26-4.0)
3,5,7-trimetoxigalangina (92a)	124.32 (125.2-114.7)	16 (16.4-15.7)
3,5,7,3',4'-pentametoxiquercetina (94a)	77.7 (79.1-76.34)	91.3 (91.6-91.1)
3,5,7,3',4',5'-hexametoximiricetina (93a)	80.37 (80.92-79.8)	171.7 (172.1-171.3)
Metronidazol*	0.23 (0.6-0.17)	1.2 (1.5-0.8)
Emetina*	280.5 (282.3-278.8)	147.8 (148-147.4)

*Controles positivos; (IC)= intervalo de confianza al 95%