



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO ANTIBACTERIANO Y QUÍMICO
DE LOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LAS
FLORES DE *Chiranthodendron pentadactylon*
Larreat (Sterculiaceae).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

**P R E S E N T A:
OSCAR AVILA VARGAS**



MÉXICO, D. F.

2006



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	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario	Dr. Fernando Calzada Bermejo
1er. Suplente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
2º. Suplente	Dr. José Fausto Rivero Cruz

Sitio donde se realizó la tesis:

El presente trabajo de tesis se desarrolló en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.

Dr. Fernando Calzada Bermejo
Asesor

M. en C. Alma Delia Alanís Ríos
Supervisor técnico

Oscar Avila Vargas
Sustentante

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma De México y en especial a la Facultad de Química, por que en sus instalaciones y junto con muchos miembros de su comunidad, adquirí valores y conocimientos diversos que me han sido muy útiles en los aspectos educativo, personal y profesional.

Al Dr. Fernando Calzada Bermejo, por darme la oportunidad de ser uno más de sus colaboradores en el estudio de las plantas medicinales. Sus conocimientos, sugerencias y comentarios, sin duda fueron parte esencial para la culminación de esta tesis.

A la M. en C. Alma Delia Alanís Ríos, por sus comentarios y apoyo en la evaluación microbiológica.

A la Dra. Mariana Meckes Fischer, jefa de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales.

A la Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents y a la Dra. Rachel Mata Essayag por que sus comentarios lograron enriquecer aún más el trabajo escrito.

A todas aquéllas personas que siempre han creído en mí y que me han apoyado incondicionalmente hasta ahora.

A todos ustedes gracias.

DEDICATORIAS.

A Dios, por que él es mi mejor amigo y conoce a perfección todo acerca de mi persona.

En la vida he tenido momentos muy difíciles y aunque alguna vez llegue a dudar de ti, he llegado a la conclusión de que siempre me has acompañado y lo seguirás haciendo en éste difícil pero bello momento que es la vida.

A mis padres: Margarita y Bartolo.

Todo lo que soy se lo debo a ustedes y siempre estaré agradecido por todo el apoyo y educación que me han brindado, ya que estos han sido artífices de mi formación como persona y como profesional. Estoy muy orgulloso de ustedes.

A mis hermanos: Osvaldo, Ma. Elena, Rosa Delia y Héctor.

Los amo y les agradezco todo su apoyo y comprensión hacia mi persona.

A mis sobrinas: Sadritzi, Andrea, Meztli y Danae.

No cabe duda de que en ustedes siempre encontré la verdad, la sinceridad y la esperanza. Nunca se den por vencidas y busquen la superación para ser mejores cada día.

A mis cuñados: Rosa Ma. y Omar. Gracias por ser parte de esta familia, los aprecio mucho.

Laura, Anel, Nancy, Jazmín, Edith, Carolina, Christian, Adolfo y Victor.

Nunca voy a olvidar las experiencias que viví junto a ustedes. Los amo y estoy agradecido por esa amistad tan hermosa que surgió en la prepa. ¡... arriba, la facultad de Coapa!

Adriana, Liliana, Noemí, Josué, Isidoro, Claudia, Rosa, Nancy y Raúl.

Su amistad y los momentos tan lindos que pasamos en la facultad siempre los voy a recordar.

A mis queridos compañeros de la UIM FPN

La estancia y el trabajo en el laboratorio siempre fueron más amenos con su presencia.

ÍNDICE.

Lista de abreviaturas.....	iii
Lista de tablas.....	v
Lista de figuras.....	v
Lista de esquemas.....	v
Lista de gráficas.....	vi
Resumen.....	vii
I INTRODUCCIÓN.....	1
II ANTECEDENTES.....	3
II.1 Generalidades de la diarrea.....	3
II.2 Diagnóstico de la diarrea.....	7
II.3 Tratamiento de la diarrea.....	8
II.4 Generalidades de <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat.....	17
III JUSTIFICACIÓN.....	22
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
V OBJETIVO GENERAL.....	24
V.1 Objetivos específicos.....	24
VI HIPÓTESIS.....	24
VII MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
VII.1 Preparación del extracto metanólico crudo de las flores de <i>Ch. pentadactylon</i>	25

VII.2 Evaluación biológica.....	26
VII.2.1 Enterobacterias.....	26
VII.2.2 Determinación de la actividad antibacteriana.....	26
VII.3 Análisis cromatográfico.....	27
VII.4 Fraccionamiento del extracto metanólico activo de <i>Ch. pentadactylon</i>	28
VII.5 Fraccionamiento de la fracción primaria F9 derivada del extracto metanólico de <i>Ch. pentadactylon</i>	29
VII.6 Identificación del β -sitosterol.....	30
VII.7 Aislamiento y purificación del tilirósido, la (+) catequina y la (-) epicatequina....	31
VII.8 Aislamiento y purificación de la astragalina y la isoquercitrina.....	33
VIII RESULTADOS	34
IX DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	38
X RESUMEN Y CONCLUSIONES	45
XI BIBLIOGRAFÍA	46

Lista de abreviaturas.

AcOEt	Acetato de etilo
Ac.	Acido
H ₂ SO ₄ (10%)	Acido sulfúrico al 10 %
AMH	Agar Muller Hinton
H ₂ O	Agua
ATCC	American Type Culture Collection
β	Beta
CMH	Caldo Muller Hinton
cm	Centímetro
CMN S XXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
NaCl	Cloruro de sodio
<i>et al.,</i>	Colaboradores
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CCA	Cromatografía en columna abierta
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
DMSO	Dimetilsulfóxido
F1/F10	Fracciones primarias uno a diez
FS1/FS9	Fracciones secundarias uno a nueve
glu	Glucosa
G	Glucurónido
°C	Grado centígrado

g	Gramo
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kg	Kilogramo
L	Litro
MeOH	Metanol
μg	Microgramo
μL	Microlitro
mg	Miligramo
mg/kg	Miligramo por cada kilogramo
mg/mL	Miligramo por cada mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
OMS	Organización Mundial de la Salud
%	Por ciento
δ	Receptor delta
μ	Receptor mu
SNC	Sistema Nervioso Central
TMP-SMX	Trimetoprima-Sulfametoxazol
UV	Ultravioleta
UIM FPN	Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales
UFC	Unidades formadoras de colonias
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por cada mililitro

Lista de tablas.

Tabla 1. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea provocada por bacterias.....	10
Tabla 2. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	28
Tabla 3. Resumen del fraccionamiento mediante CCA del extracto metanólico de las flores de <i>Ch. pentadactylon</i>	29
Tabla 4. Resumen del fraccionamiento mediante CCA de la fracción primaria F9 derivada del extracto metanólico de <i>Ch. pentadactylon</i>	30
Tabla 5. Programa de elución utilizado en la CLAR para separar la fracción primaria F3.....	32
Tabla 6. Porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano causado por el extracto metanólico derivado de las flores de <i>Ch. pentadactylon</i>	34
Tabla 7. Porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano causado por las fracciones primarias derivadas del extracto metanólico de <i>Ch. pentadactylon</i>	35
Tabla 8. Porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano causado por los compuestos puros obtenidos de las flores de <i>Ch. pentadactylon</i>	36
Tabla 9. Porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano causado por las fracciones FS2/FS9 derivadas de la fracción primaria F9.....	37

Lista de figuras.

Figura 1. Estructura química de algunos fármacos empleados para tratar la diarrea.....	14
Figura 2. <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat.....	18
Figura 3. Compuestos aislados de <i>Ch. pentadactylon</i>	20

Lista de esquemas.

Esquema 1. Preparación del extracto metanólico de las flores de <i>Ch. pentadactylon</i>	25
--	----

Lista de gráficas.

Gráfica 1. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por el extracto y fármacos controles.....	39
Gráfica 2. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por las fracciones F9, F10 y fármacos controles.....	40
Gráfica 3. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por los compuestos puros aislados.....	41
Gráfica 4. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por el tilirósido y fármacos controles.....	41
Gráfica 5. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por algunas mezclas de los compuestos puros.....	42
Gráfica 6. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por el tilirósido, el ácido p-cumárico, el camperol y la astragalina.....	43
Gráfica 7. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por las fracciones FS7, FS8, FS9 y fármacos controles.....	44

Resumen.

Se realizó el estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico obtenido a partir de las flores de la especie *Chiranthodendron pentadactylon*.

Como técnicas de separación y purificación se emplearon: la cromatografía de adsorción en columna abierta, la cromatografía en capa fina preparativa y la cromatografía líquida de alta resolución.

Lo anterior permitió el aislamiento de seis compuestos, cinco flavonoides que fueron caracterizados como: tilirósido, (-) epicatequina, (+) catequina, astragalina e isoquercitrina; y de un esterol: el β -sitosterol. La caracterización de estos compuestos se llevó a cabo mediante cocromatografía en capa fina comparativa empleando muestras de referencia disponibles en el laboratorio.

También se llevó a cabo la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico, de las fracciones primarias, fracciones secundarias, de los compuestos puros aislados y las mezclas de algunos de estos compuestos sobre nueve cepas de enteropatógenos causantes de diarrea y disentería, tales como: *Escherichia coli* (dos cepas), *Shigella sonnei* (dos cepas), *Shigella flexneri* (dos cepas) *Salmonella sp* (dos cepas) y *Vibrio cholerae*.

El tilirósido, a una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$, fue el compuesto que presentó mayor actividad antibacteriana, con inhibiciones del desarrollo bacteriano en el intervalo de 58.3 % a 77.4 % para los nueve enteropatógenos evaluados.

I INTRODUCCIÓN.

Desde los tiempos antiguos, el hombre ha estado íntimamente ligado y en continua interacción con todo su entorno. En su afán por subsistir como especie, fue adaptándose poco a poco a las bondades y peligros de la naturaleza; de tal forma que por puro empirismo aprendió a no vivir aislado, a confeccionar su vestimenta, a elaborar su vivienda, a escoger sus alimentos, etc. (Evans, 1991).

Puesto que la salud del hombre primitivo era esencial para que siguiera subsistiendo, se fue capacitando para determinar que plantas y animales poseían valor alimenticio y cuáles debían ser evitados a causa de su mal sabor o por ser venenosos. Los poderes curativos de ciertas plantas fueron descubiertos indudablemente por accidente, pero una vez aprendidos fueron demasiado importantes como para ser olvidados. Así, fue usando partes de plantas y animales para preparar pociones “curativas” que eliminaban el dolor y combatían las enfermedades. Estos conocimientos se han transmitido a lo largo de las civilizaciones en forma oral y escrita (Evans, 1991; Tyler *et al.*, 1979).

Tomando en cuenta los conocimientos adquiridos, actualmente se extraen, separan y aíslan constituyentes de las plantas y de los animales que son útiles en la terapéutica. De esta manera, lo que hoy conocemos como farmacognosia ha progresado desde una época de empirismo hasta la era actual de los agentes terapéuticos específicos (Tyler *et al.*, 1979).

En el reino vegetal existen aproximadamente entre 250,000 a 500,000 especies de plantas; a muchas de éstas se les han comprobado propiedades terapéuticas pero la gran mayoría no han sido estudiadas desde el punto de vista químico y farmacológico, aún sabiendo que en el mundo cerca del 80 % de la población usa o ha usado las plantas como una fuente accesible para curar enfermedades (Murphy, 1999; Hostettmann *et al.*, 1995; Alanís, 1997).

En cuanto a México se refiere, es bien conocido que a lo largo y ancho de todo nuestro país el uso de plantas medicinales esta muy arraigado, no obstante, al igual que en el mundo entero su estudio es muy limitado. Hoy día gracias a los conocimientos que nos legaron nuestros ancestros y al gran interés de muchos científicos, se han logrado avances importantes en el estudio de plantas medicinales. Es necesario señalar que un gran número de plantas son analizadas constantemente en relación a su posible valor farmacológico, particularmente por sus propiedades antisecretoras, antiprotozoarias, antibacterianas, antidiarreicas, antiinflamatorias, hipotensoras, hipoglucémicas, antituberculosas, antibióticas, etc. (Evans, 1989; Hostettmann *et al.*, 1995; Alanís *et al.*, 2005; Calzada *et al.*, 2005).

En la mayoría de los casos, el estudio se basa en las enfermedades más comunes que afectan a la población mexicana. Tal es el caso de los trastornos gastrointestinales como diarrea y disentería, las cuales, son un grave problema de salud en un país como el nuestro. En México, se estima que uno de cada veinte fallecimientos de todas las edades es por esta causa y en los niños menores de cinco años una de cada seis defunciones corresponde a este padecimiento (Kumate *et al.*, 1998). El uso de fármacos sintéticos para tratar estas afecciones no esta a discusión, pero hay que recordar que varias plantas también han sido usadas para el mismo propósito. Por esta razón, es de vital importancia hacer los estudios necesarios que permitan validar su uso en la medicina tradicional mexicana (Alanís *et al.*, 2005; Velázquez *et al.*, 2006).

Por otra parte, es alarmante el exterminio de especies vegetales en ciertas áreas del país, incluso antes de que dichas plantas hayan sido registradas y, mucho menos, estudiadas química y biológicamente, lo que viene a incrementar la necesidad de realizar esfuerzos cada vez mayores, respecto a la conservación de las plantas medicinales utilizadas en determinadas zonas del país (Evans, 1991; Hostettmann *et al.*, 1995).

II ANTECEDENTES.

II.1 Generalidades de la diarrea.

Desde el punto de vista fisiopatológico, la diarrea es un proceso de secreción intestinal activa en el que se pierde la capacidad de absorción de agua y electrolitos; se manifiesta básicamente por evacuaciones acuosas (Kumate *et al.*, 1998). La alteración de la frecuencia y consistencia de las evacuaciones constituyen un mecanismo de respuesta del organismo ante un agente agresor que puede ser: no infeccioso (tóxico, dietético, psicológico, inmunológico y hormonal), o infeccioso (bacterias, virus, parásitos y hongos). En el primer caso la diarrea puede presentarse por alteraciones en el estado de ánimo del individuo o por diversos agentes químicos y alimenticios. En cuanto a los agentes infecciosos, son aquéllos que se adquieren por la vía fecal-oral, por ingestión de agua y alimentos contaminados con heces principalmente.

La diarrea es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los niños menores de 5 años. La diarrea casi siempre cede en forma espontánea y la mortalidad se relaciona con las complicaciones, de las cuales la más frecuente es la deshidratación. De los niños menores de 5 años que fallecen por diarrea, 70 % mueren por deshidratación, 20 % por diarrea persistente y 10 % por complicaciones que son poco comunes como septicemia, insuficiencia renal, íleo paralítico, neumatosis intestinal y complicaciones quirúrgicas (Kumate *et al.*, 1998; Martín, 2002).

En cuanto a la deshidratación, ésta constituye la principal causa de muerte cuando no se diagnostica y trata oportunamente. Ocasiona diferentes tipos de desequilibrio hidroelectrolítico y ácido-base, siendo el patrón más frecuente, la hipopotasemia con acidosis metabólica. Es más común en los niños menores de 1 año de edad. Su gravedad se relaciona directamente con el

número y volumen de las evacuaciones y con la presencia de vómitos. Puede llevar al paciente a choque hipovolémico (Kumate *et al.*, 1998).

Se sabe que la mejoría en la higiene y en el saneamiento del ambiente llevan consigo una disminución en la incidencia de infecciones entéricas, sobre todo en las que son transmitidas por agua o alimentos contaminados (Herrera y Hernández, 2002).

En los niños, algunas conductas específicas que incrementan el riesgo para que se manifieste la diarrea son: que el niño tenga una lactancia materna deficiente durante los primeros 4 a 6 meses de vida; así como el uso de biberones mal lavados (considerado como un medio de cultivo para microorganismos enteropatógenos); mantener los alimentos perecederos a temperaturas inadecuadas (multiplicación rápida de bacterias); uso de agua contaminada con enterobacterias; falta de lavado de manos después de defecar, de cambiar los pañales a un bebé, antes de manejar los alimentos y disposición inadecuada de las heces por carencia de drenaje o por hábitos inadecuados. Otros factores inherentes al huésped que influyen en la frecuencia, gravedad y duración de la diarrea son: estado inmunitario, estado nutricional, sarampión, etc.

La morbilidad y mortalidad de la diarrea también se vinculan con el nivel educativo y cultural de la población, con el ingreso económico y los factores ambientales, entre los que sobresalen, las características de la vivienda, el acceso a los servicios de salud y la calidad de éstos. Por lo anterior, la mortalidad por diarrea es aproximadamente 1 000 veces mayor en países en desarrollo que en los industrializados (Kumate *et al.*, 1998; Herrera y Hernández, 2002).

El número de episodios de diarrea por persona por año es en promedio de 3.5 para los menores de 5 años, lo que significa aproximadamente entre 1.3 a 1.7 miles de millones de episodios de diarrea al año. Lo anterior se traduce en cerca de cuatro millones de muertes, aproximadamente 8 cada minuto (Herrera y Hernández, 2002; Kumate *et al.*, 1998). De todas las edades, el grupo más afectado es el de los 6 meses a los 2 años de edad (Claeson y Merson, 1990), sobre todo

cuando existen factores agregados que comprometen la inmunidad como el sarampión o la deshidratación (Herrera y Hernández, 2002).

Estudios realizados en Asia, África y Latinoamérica, han demostrado que la diarrea es causa importante de morbilidad y mortalidad, constituyendo la tercera causa de muerte a nivel mundial, precedida únicamente por las infecciones respiratorias agudas y las perinatales (Herrera y Hernández, 2002). La tasa de muertes por 100 000 personas por año en países en desarrollo es de 650 para los menores de 5 años y menor a 50 en los mayores de esta edad. En Latinoamérica se calcula una tasa de 420 para los menores de 5 años (Kumate *et al.*, 1998).

En México, se ha estimado una frecuencia anual de 2 a 4 episodios diarreicos por niño en áreas urbanas y de 4 a 9 en las rurales. Dentro del grupo de menores de 5 años, la tasa más alta se encuentra en los niños de 6 a 11 meses de edad (363 por cada 100 000 niños que nacen) y está relacionada con la disminución de anticuerpos maternos, falta de inmunidad activa y alimentos contaminados con enterobacterias. En el grupo de 1 a 4 años de edad la tasa de mortalidad es de 49. Del total de muertes por diarrea, el 63 % ocurren en menores de 5 años, lo que equivale anualmente a una muerte por cada 1 000 niños menores de 5 años (Kumate *et al.*, 1998; Herrera y Hernández, 2002).

La diarrea incrementa su frecuencia durante los meses calurosos y lluviosos. En nuestro país, 60 % de los casos notificados se presentan entre los meses de mayo y septiembre (Kumate *et al.*, 1998).

La diarrea es causa de más del 30 % de los ingresos hospitalarios en países en desarrollo, teniendo un impacto importante sobre la economía. Se ha calculado que cerca del 48 % de los casos con diarrea han recibido un tratamiento innecesario e ineficaz; por ejemplo, se ha demostrado que un niño menor de 5 años recibe en promedio cuatro medicamentos por episodio de diarrea (Herrera y Hernández, 2002; Mota *et al.*, 1994).

En el estudio de la diarrea aguda, es básico considerar su tipo, mismo que orienta a los agentes etiológicos involucrados. Es así que se tienen los siguientes tipos de diarrea: diarrea aguda, diarrea con sangre, diarrea persistente y diarrea crónica.

La diarrea aguda es la más frecuente en el mundo y en México. Se caracteriza por un incremento en el número de evacuaciones de consistencia líquida, acompañadas o no de fiebre, vómito, hiporexia y ataque al estado general. Los dos agentes que se aíslan con más frecuencia son *Rotavirus* y *E. coli* enterotoxigénica, aunque hay otros como *E. coli* enteropatógena y *E. coli* enteroadherente, *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Vibrio cholerae* toxigénico, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Giardia lamblia*, *Virus Norwalk*, *Adenovirus* 40 y 41, entre otros.

La diarrea con sangre es resultado de la invasión inflamatoria de la mucosa del colon debida a bacterias, parásitos y/o acción de citotoxinas. Puede haber dos formas: el síndrome disentérico y el síndrome diarreico con sangre. El primero de ellos se caracteriza por evacuaciones de escaso volumen, compuestas de poca materia fecal, moco y sangre, en algunas ocasiones pus, acompañadas de cólicos abdominales, pujo, tenesmo y fiebre; el segundo, se asocia con evacuaciones compuestas de materia fecal líquida, estrías de sangre, moco y con poca afectación al estado general. La diarrea con sangre es ocasionada principalmente por: *Shigella flexneri*, *Sh. sonnei*, *Sh. boydii*, *Sh. dysenteriae*, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroinvasiva, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *S. choleraesuis*, *S. paratyphi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica*, *Entamoeba histolytica*, *Trichinella spiralis*, *Schistosoma japonicum* y *S. mansoni*, entre otros.

La diarrea persistente es aquella que inicia en forma aguda y se prolonga más de 14 días. Dentro de sus agentes causantes podemos mencionar a *G. lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Trichuris trichiura*, *Cryptosporidium*, *Isospora belli*, entre otros. Casi siempre se

manifiesta en niños menores de 6 meses con desnutrición previa o con desnutrición aguda. La mayoría de los casos de diarrea persistente no tienen relación directa con algún germen específico sino que se trata de una complicación nutricional de la diarrea aguda llamada “desnutrición intestinal” (Kumate *et al.*, 1998).

La diarrea crónica con o sin mala-absorción intestinal es causada por diversos mecanismos, a menudo simultáneos, tanto infecciosos como por intolerancia a nutrientes (azúcares y proteínas) y desnutrición. Los agentes más frecuentes responsables de diarrea crónica son *G. lamblia* y algunos helmintos (Herrera y Hernández, 2002; Kumate *et al.*, 1998).

II.2 Diagnóstico de la diarrea.

Se considera que un paciente tiene diarrea cuando presenta más de tres evacuaciones de consistencia disminuida en 24 horas, en relación a su patrón habitual. En el caso de los recién nacidos presentan de 7 a 10 evacuaciones de consistencia semilíquida al día, por lo que el diagnóstico se deberá establecer solo si existe un incremento mayor en el número de evacuaciones y en la cantidad de líquido, en relación con lo observado habitualmente.

Para hacer un diagnóstico adecuado de la diarrea lo primero es evaluar el estado de hidratación del paciente. En segundo lugar, se debe identificar si existen otros signos como: fiebre intensa y persistente, distensión abdominal progresiva, evacuaciones con sangre, desnutrición grave o diarrea persistente. Por último, se deben evaluar las condiciones socioeconómicas de la familia, su nivel educativo, sus conceptos acerca de diarrea y la deshidratación, así como su acceso a los servicios de salud.

Debido a que la mayoría de los casos de diarrea cursan en forma benigna y se curan espontáneamente en pocos días, no es necesaria la solicitud de exámenes de laboratorio. Éstos sólo serán indicados: ante la sospecha de cólera, diarrea con sangre que no se cura después de tres días, diarrea persistente, en estudios de brotes epidémicos, en pacientes con complicaciones

infecciosas extraintestinales (meningitis por *Salmonella*) y en estudios epidemiológicos para investigar frecuencia de gérmenes, patogenicidad de los mismos, sensibilidad a antibióticos, etc. (Kumate *et al.*, 1998; Martín, 2002).

II.3 Tratamiento de la diarrea.

Para el control de la diarrea es necesario: llevar a cabo un diagnóstico correcto del paciente; seleccionar y administrar de manera adecuada el tratamiento de hidratación; seguir una alimentación adecuada, normal y en su horario habitual; el uso de antimicrobianos sólo en casos de diarrea con sangre o en pacientes con cólera; la educación y participación de la madre o del paciente en el reconocimiento oportuno de los signos de deshidratación y otros. La atención eficaz en casos de diarrea puede evitar más del 90 % de las muertes, particularmente en niños menores de 5 años (Kumate *et al.* 1998; Martín, 2002).

La diarrea de cualquier etiología, en general, es tratada mediante la rehidratación oral, siendo este el tratamiento que recomienda la OMS. Esta terapia se fundamenta en el hecho de que la absorción intestinal de glucosa y la de sodio van unidas y que, por tanto, la glucosa acelera la absorción de agua y solutos. El procedimiento terapéutico es fácil de aplicar, de bajo costo, sin riesgos y con gran eficacia (Kumate *et al.*, 1998).

El tratamiento debe incluir la restitución del déficit de agua y electrolitos y además se deben proporcionar los líquidos y electrolitos normales. Por ello es erróneo indicar líquidos sin electrolitos por vía oral o parenteral (Maulén *et al.*, 1993).

Diversos estudios han concluido que la terapia de rehidratación oral permite hidratar a más del 90 % de los pacientes en menos de seis horas, siempre y cuando no se utilice en sujetos con estado de choque, en cuyo caso debe indicarse la hidratación por vía parenteral. Lo anterior, está evitando a nivel mundial de uno a dos millones de muertes al año en menores de 5 años por

deshidratación; evita admisiones hospitalarias innecesarias y reduce gastos y complicaciones por el uso de venoclisis (Kumate *et al.*, 1998; Martín, 2002).

La solución electrolítica recomendada por la OMS es aquella que contiene: cloruro de sodio (3.5 g), cloruro de potasio (1.5 g), citrato de sodio (2.9 g), glucosa (20.0 g) y agua (1 L). En México esta fórmula se distribuye en forma gratuita en sobres con polvo para disolver en 1 L de agua, con el nombre oficial de vida suero oral. Generalmente se administra de acuerdo a tres planes: plan A) si la evaluación del paciente indica que éste no está deshidratado; plan B) si la evaluación del paciente indica que sí está deshidratado pero sin choque y plan C) la hidratación intravenosa se utilizará cuando el paciente presente choque hipovolémico y en caso de limitación para usar la rehidratación oral (Kumate *et al.*, 1998; Martín, 2002).

Setenta a ochenta por ciento de todos los casos de diarrea infecciosa aguda, en personas que viven en países en desarrollo, son originadas por agentes virales. La causa bacteriana se encuentra, por tanto, en sólo 10 a 20 % de los casos y en menos de 10 % se pueden atribuir a parásitos. Por lo anterior, solamente un número pequeño de pacientes requiere tratamiento antibiótico y la mayoría de ellos debe tratarse con las soluciones de hidratación oral recomendadas universalmente (Terregrosa, 1996).

Los antimicrobianos a menudo son utilizados para tratar la sintomatología de la diarrea; sin embargo son fármacos que se utilizan frecuentemente de manera inadecuada. Lo anterior ha provocado el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a diversos antibióticos con el transcurso de los años. Por tanto, la selección de antimicrobianos para tratar la diarrea exige juicio clínico y conocimiento de factores farmacológicos y microbiológicos tales como: características farmacológicas del medicamento e identidad y patrón de susceptibilidad local del microorganismo infeccioso (Goodman y Gilman, 2003; Noyola, 2002).

Existe una gran cantidad de antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la diarrea provocada por bacterias (Tabla 1); siendo también diversos los mecanismos mediante los cuales ejercen su efecto antibacteriano.

Tabla 1. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea provocada por bacterias.

Microorganismo	Fármaco
<i>Shigella</i>	Tetraciclina, trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX), ampicilina, cloranfenicol, cefixima, ceftriaxona, quinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, fluoroquinolonas).
<i>Salmonella</i>	Ampicilina, amoxicilina, TMP-SMX, cloranfenicol, cefotaxima, ceftriaxona, cefixima, ciprofloxacina y otras quinolonas.
<i>E. coli</i> enterotoxigénica	Ciprofloxacina, TMP-SMX, tetraciclina, quinolonas.
<i>E. coli</i> enteropatógena	TMP-SMX, ácido nalidíxico, neomicina, cefalexina, gentamicina oral.
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	Ciprofloxacina, TMP-SMX, norfloxacina, antibióticos usados en shigelosis.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica y <i>E. coli</i> enteroadherente	No se ha demostrado beneficio alguno con antibióticos.
<i>Clostridium difficile</i>	Vancomicina, metronidazol, bacitracina.
<i>Yersinia</i>	TMP-SMX, cloranfenicol, tetraciclina, cefalosporinas de 3 ^a generación, aminoglucósidos y quinolonas.
<i>Vibrio cholerae</i>	Tetraciclina, TMP-SMX, furazolidona, cloranfenicol, doxiciclina.
<i>Campilobacter</i>	Eritromicina, clindamicina, aminoglucósidos, y quinolonas.

A continuación se describen algunos de estos fármacos, su mecanismo de acción y efectos secundarios.

Las penicilinas, cefalosporinas y otros compuestos como la vancomicina y la bacitracina son capaces de inhibir la síntesis de la pared de péptidoglucano de la bacteria. Entre los efectos secundarios de las penicilinas (Figura 1), ampicilina **1** y amoxicilina, entre otras, podemos mencionar las reacciones de hipersensibilidad (erupción maculopapular, erupción cutánea, erupción urticaria, fiebre, broncoespasmo, vasculitis, dermatitis exfoliativa y anafilaxia entre otras), depresión de médula ósea, granulocitopenia, dolor y reacción inflamatoria en los sitios de inyección intramuscular, náusea con o sin vómito, diarrea y colitis pseudomembranosa.

Algunas cefalosporinas como la cefotaxima, ceftriaxona y cefalexina **2** también producen reacciones de hipersensibilidad; además son nefrotóxicas; junto con antibióticos β -lactámicos se ha informado hemorragia grave, trombocitopenia y disfunción plaquetaria.

Las reacciones adversas producidas por la vancomicina incluyen las de hipersensibilidad y frecuentemente disfunción auditiva.

El empleo parenteral de la bacitracina ocasiona nefrotoxicidad y la aplicación local produce reacciones de hipersensibilidad poco frecuentes.

Las tetraciclinas (tetraciclina **3**, clortetraciclina, doxiciclina y otras) inhiben la síntesis de proteínas de la bacteria al ligarse al ribosoma bacteriano 30 S. Este tipo de compuestos pueden irritar las vías gastrointestinales en grado variable en algunos individuos y causar ardor, molestias epigástricas y abdominales, náusea y vómito, esofagitis y úlceras esofágicas, diarrea (tetraciclinas orales), colitis pseudomembranosa, fotosensibilidad, hepatotoxicidad en dosis altas y en mujeres embarazadas, toxicidad renal, manchas en dientes de niños, disminución del crecimiento óseo (en la gestación y la niñez), leucocitosis, púrpura trombocitopénica y reacciones de hipersensibilidad.

El cloranfenicol **4** inhibe la síntesis proteínica en bacterias al unirse de manera reversible a la subunidad ribosómica 50 S. El principal efecto adverso del cloranfenicol se manifiesta en la médula ósea. En ella, el fármaco afecta el sistema hematopoyético en dos formas: por una acción

tóxica que depende de la dosis que se manifiesta como anemia, leucopenia o trombocitopenia y por una respuesta que se manifiesta en anemia aplásica. El cuadro surge en individuos que reciben el fármaco por largo tiempo o en varias ocasiones. También produce supresión eritroide de médula ósea y otros como náusea, vómito, visión borrosa, síndrome del niño gris, reacciones de hipersensibilidad, diarrea, delirio, entre otros.

Los macrólidos como la eritromicina actúan de manera similar al cloranfenicol y su efecto adverso más importante es la hepatitis colestásica; enfermedad que se caracteriza por la presencia de vómito, náusea y cólicos abdominales seguido de ictericia acompañada de fiebre, leucocitosis y eosinofilia. Su ingestión en dosis grandes produce molestias epigástricas, cólicos abdominales y diarrea. También puede causar arritmias.

Los efectos secundarios producidos por la clindamicina **5** incluyen diarrea, colitis pseudomembranosa, erupciones cutáneas, eritema multiforme exudativo, granulocitopenia, trombocitopenia y reacciones anafilácticas. Actúa de la misma forma que el cloranfenicol.

La actividad antimicrobiana de la combinación trimetoprima-sulfametoxazol es consecuencia de su acción en dos fases de la vía enzimática en la síntesis del ácido tetrahidrofólico. El sulfametoxazol **6** inhibe la incorporación de ácido para-aminobenzoico (PABA) en el ácido fólico y la trimetoprima **7** evita la reducción del dihidrofolato en tetrahidrofolato al bloquear la dihidrofolato reductasa de microorganismos. La mayoría de los efectos adversos de esta combinación se manifiestan por reacciones de hipersensibilidad. Cuando las células del paciente muestran deficiencia en folato puede causar megaloblastosis, leucopenia o trombocitopenia. Puede provocar náusea, vómito, glositis, estomatitis, cefalea, depresión, alucinaciones, anemia, trastornos de la coagulación, granulocitopenia, agranulocitosis, púrpura y trastornos renales.

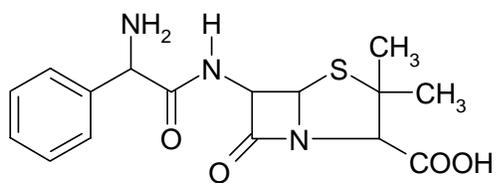
Las quinolonas inhiben el superenrollamiento de ADN mediado por la girasa del ADN bacteriano, evitando así la transcripción del ARN. Son varios los efectos secundarios de este tipo

de compuestos entre los que podemos citar a la ciprofloxacina **8** y al ácido nalidíxico **9**, por ejemplo: náusea, molestias abdominales, cefalea, mareos, alucinaciones, convulsiones, reacciones de fotosensibilidad; en niños se han descrito artralgias e hinchazón articular.

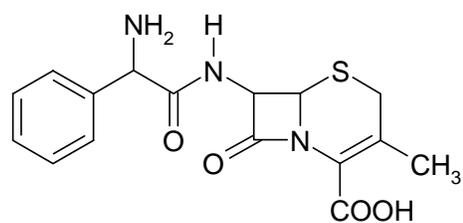
Los aminoglucósidos poseen la capacidad de bloquear la síntesis de proteínas y evitar la traducción de ARNm en el ribosoma; teniendo como sitio de acción primaria la subunidad ribosómica 30 S. Todos los aminoglucósidos pueden producir toxicidad de tipo vestibular, coclear y renal; estos efectos complican su empleo y dificultan su administración. Un tratamiento prolongado con estos compuestos puede causar nefrotoxicidad. También pueden ocurrir parálisis muscular duradera y reacciones de hipersensibilidad; aunque son poco frecuentes. Entre estos compuestos podemos citar a la kanamicina **10**, neomicina, estreptomina y gentamicina (Goodman y Gilman, 2003; PLM, 2005).

Los anticolinérgicos diciclomina (Bentyl) y atapulgita (Donnagel) disminuyen la motilidad intestinal y pueden aliviar los cólicos pero no modifican la diarrea (Michael, 2001).

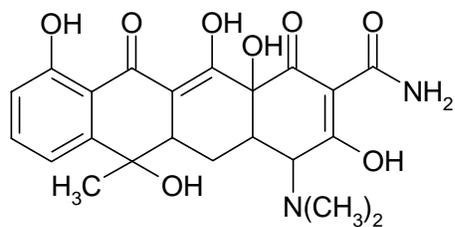
Los adsorbentes caolín, pectina y carbón activado basan su mecanismo de acción en la adsorción de toxinas, bacterias y sus productos, y proveen una cubierta sobre la mucosa intestinal inflamada. Estos compuestos disminuyen el carácter líquido de los excrementos, pero no su volumen, pueden provocar pérdida de potasio y sodio, su eficacia en el tratamiento de la diarrea infecciosa aguda no ha sido comprobada (Terregrosa, 1996; Goodman y Gilman, 1996; Michael, 2001).



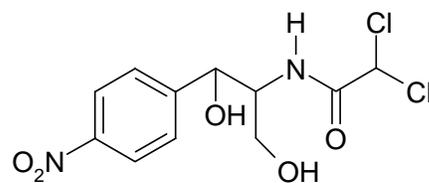
ampicilina **1**



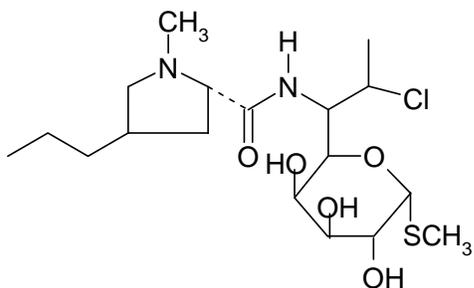
cefalexina **2**



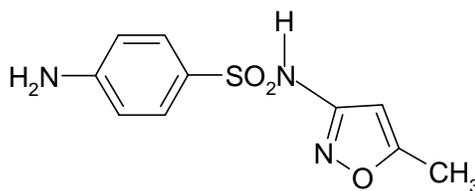
tetraciclina **3**



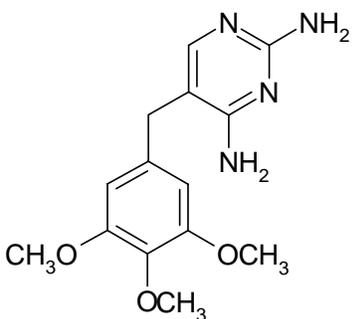
cloranfenicol **4**



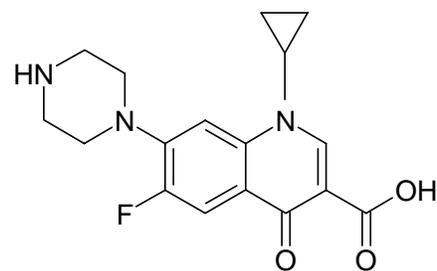
clindamicina **5**



sulfametoxazol **6**



trimetoprima **7**



ciprofloxacina **8**

Figura 1. Estructura química de algunos fármacos empleados para tratar la diarrea.

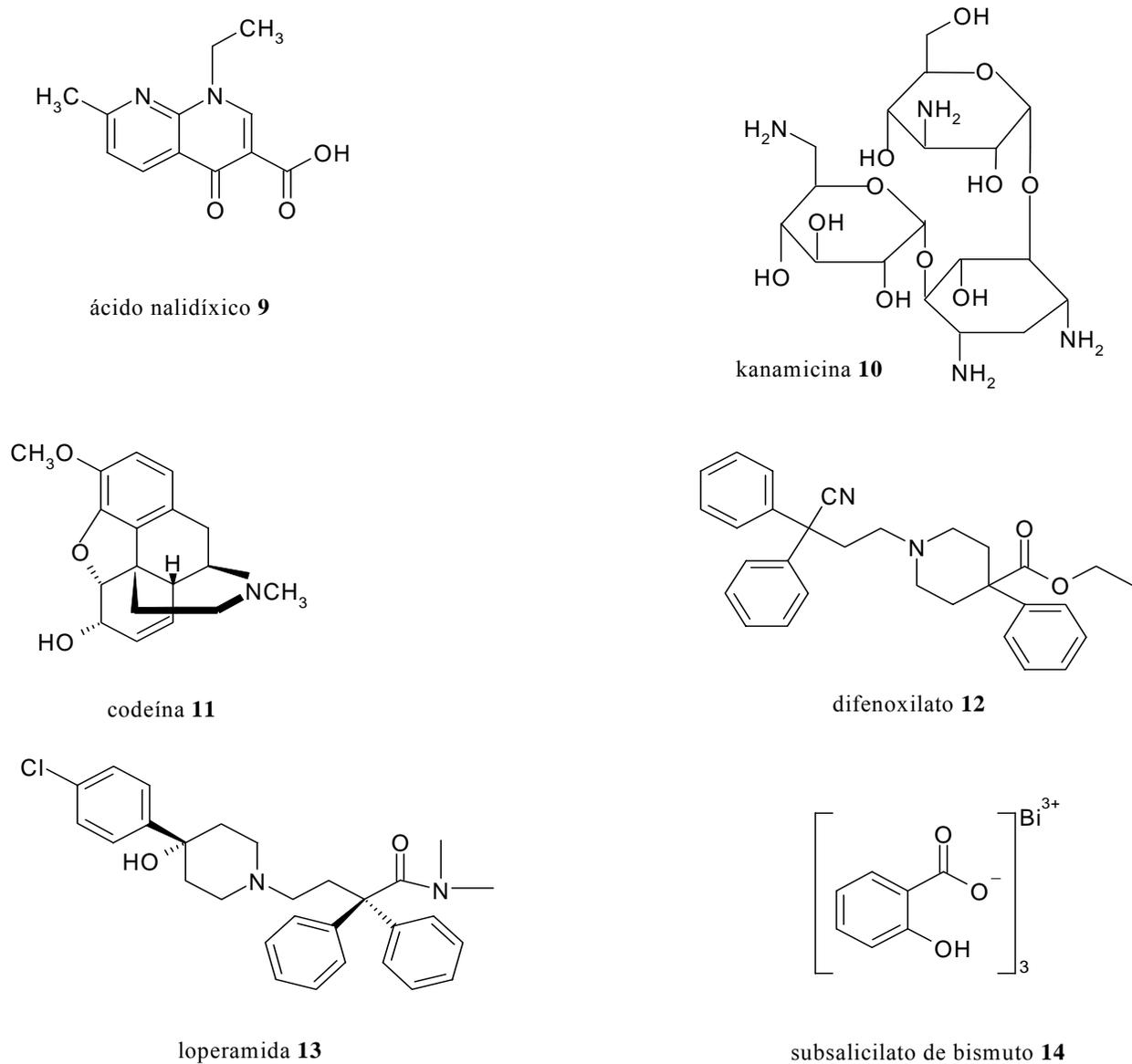


Figura 1. Estructura química de algunos fármacos empleados para tratar la diarrea (continuación).

Otro grupo de compuestos que a menudo son empleados son aquéllos que funcionan como antiseoretos y entre los cuales podemos mencionar a los opiáceos y sus derivados (codeína **11**, difenoxilato **12** y loperamida **13**) y al subsalicilato de bismuto **14** (Michael, 2001). Los análogos de los opioides pueden afectar la función gastrointestinal por su acción central y periférica. Aunque se ha usado la codeína y las soluciones alcohólicas de polvo de opio, en la actualidad se

prefieren los opioides sintéticos difenoxilato y loperamida ya que estos agentes penetran poco en el Sistema Nervioso Central (SNC) y si se usan adecuadamente pueden tener efectos antidiarreicos en dosis que tienen muy pocos efectos secundarios.

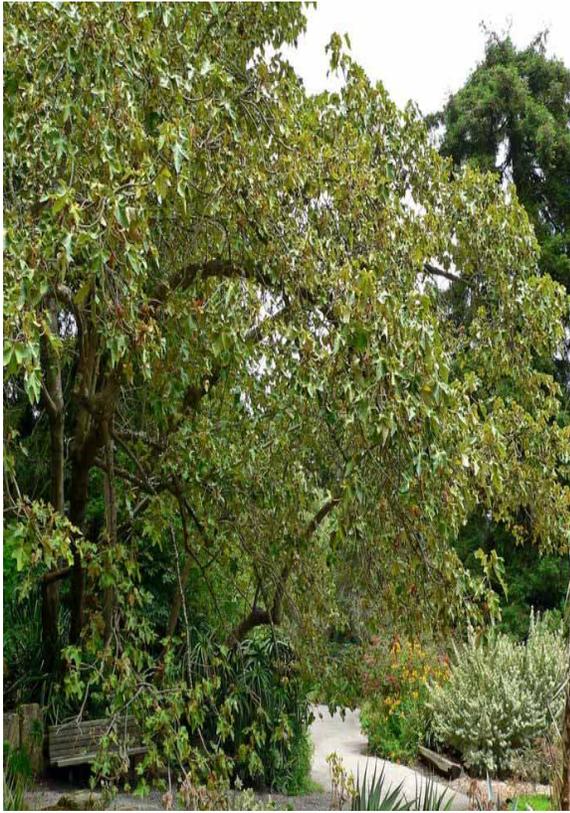
Los análogos de los opioides actúan en los receptores μ y δ en el tubo digestivo y alteran tanto la motilidad como la secreción. La activación de los receptores μ puede producir incremento del tono del esfínter rectal, trastorno de los movimientos peristálticos normales y reducción de las secreciones. La activación de los receptores δ puede producir reducción de la actividad secretora. La activación de ambos receptores tiende a incrementar la absorción de cloruro de sodio (NaCl) y agua. Algunos de estos efectos ocurren a través de receptores situados en las neuronas intestinales, pero son también probables los efectos directos en las células epiteliales y el músculo liso del intestino. Por tanto, los opioides retardan el tránsito intestinal, reducen la secreción y estimulan la absorción. El efecto neto es una reducción de la cantidad de líquido que llega al intestino grueso desde el intestino delgado, de modo que no se sobrecarga la capacidad de absorción del colon (Michael, 2001; Goodman y Gilman, 1996). Cabe señalar que su uso no está indicado en pacientes con disentería, fiebre o con síntomas sistémicos y que además causan empeoramiento del cuadro en sujetos infectados por *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* o *C. difficile* (Michael, 2001).

Una alternativa en casos de diarrea infecciosa leve a moderada son los compuestos a base de salicilato de bismuto. Su mecanismo de acción incluye: a) prevención de la adherencia de microorganismos a la mucosa intestinal; b) efectos antimicrobianos; c) inactivación de toxinas por el componente bismuto y d) efecto antiinflamatorio del componente salicilato (Michael, 2001; Goodman y Gilman 1996; Terregrosa, 1996). En cuanto a los efectos secundarios de sus componentes, el subsalicilato provoca neurotoxicidad, mareos, cefalea, constipación, evacuaciones oscuras, ataxia, temblores, delirio y convulsiones (Velázquez, 2006).

I.4 Generalidades de *Ch. pentadactylon* Larreat.

Ch. pentadactylon es una planta originaria de México, pertenece a la familia Sterculiaceae y se le conoce con los nombres comunes de: “flor de manita, mano de león, árbol de las manitas, manita, mano de dragón, palo de yaco, palo de tabuco, teyacua, macpalxochitl, mapilxochitl, mapasúchilita ndaa y tunda kua”. Crece en climas cálido, semicálido y templado desde los 200 y hasta los 2600 m sobre el nivel del mar, principalmente en el bosque mesófilo de montaña. Se encuentra en los estados de Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Morelos y Estado de México; además se localiza en Centro América principalmente en Guatemala (Lara y Márquez, 1996, Linares *et al.*, 1988; Rzedowski, 1978; Argueta *et al.*, 1994; Martínez, 1944).

Ch. pentadactylon (Figura 1) es un árbol de 10 a 15 m de altura (Figura 1a), de ramas tomentosas con pelos estrellados, cuyo conjunto presenta un color ferruginoso; hojas (Figura 1c) anchamente ovadas, largo pecioladas de 12 a 30 cm de largo, cordadas en la base, irregularmente lobuladas (5 a 8 lóbulos), estipuladas, estrellado-tomentosas abajo y con pecíolo largo, con bordes puntiagudos, lisas en el anverso y vellosas en el reverso; con flores solitarias (Figura 1b) de unos 15 cm, angulosas y hermafroditas, sin corola, su cáliz es campanulado, grueso y coriáceo, mide unos 3.5 a 4.5 cm de largo, con cinco lóbulos y protegido por tres brácteas; por fuera es tomentoso y de color café-rojizo y por dentro de un color rojo intenso; no posee pétalos; cinco estambres de color rojo que están unidos en su base formando una columna y que se prolongan hacia fuera, arqueándose, ofreciendo la forma de una mano; el ovario se oculta en la base de la columna; el fruto (Figura 1d) es una cápsula leñosa de unos 10 a 15 cm, quinquelocular, revestido de pelos rígidos de color leonado, con cinco valvas, con espinas por dentro; semillas numerosas (Figura 1e), pequeñas, negras, brillantes y con espinas (Lara y Márquez, 1996; Argueta *et al.*, 1994; Linares *et al.*, 1988).



a



b



c



d



e

Figura 1. *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat. a: árbol; b: flor; c: hojas; d: fruto; e: semillas.

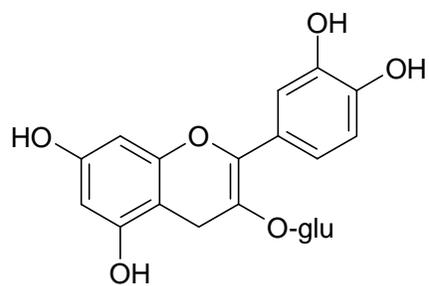
Ch. pentadactylon ha sido utilizada, desde antes de la conquista para tratar úlceras crónicas, para el dolor e inflamación de los ojos y para calmar el dolor causado por las hemorroides. Después de la conquista se le atribuyó acción cardiotónica y antiepiléptica. También se le usa como astringente, catártico, emoliente, analgésico, para calmar los nervios, como antiinflamatorio, para curar los humores, para la diarrea, la disentería y contra el estreñimiento. Se usa también como planta de sombra y ornato en parques y jardines, por su follaje y la belleza de sus flores que semejan una mano (Argueta *et al.*, 1994; Martínez, 1944; Macdonald, 1997; Linares *et al.*, 1988; Lara y Márquez, 1996).

Desde el punto de vista farmacológico, los extractos de *Ch. pentadactylon* han sido objeto de cuatro estudios farmacológicos: en el primero se reportó que un extracto polar de las flores, administrado en ratones a una dosis de 300 mg/kg por vía intraperitoneal, tuvo efecto anticolinérgico, piloerección, pérdida ligera del tono muscular, catatonía y aumento del diámetro pupilar (Argueta *et al.*, 1994).

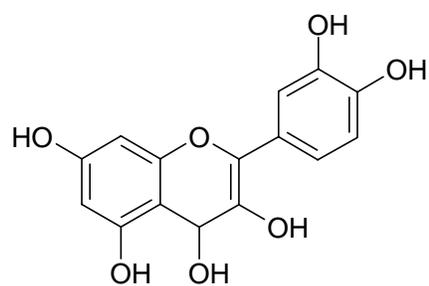
El segundo estudio se realizó con el extracto acuoso de las flores y en el cual se midió el efecto vasoactivo sobre la aorta torácica aislada de rata, precontractada con noradrenalina. Las dosis abarcaron un rango de 0.5-12 mg/mL y la actividad observada fue moderada (Perusquia *et al.*, 1995).

En el tercer estudio se determinó la actividad antisecretora *in vivo* de los extractos metanólico y acuoso de las flores de *Ch. pentadactylon*, empleando como prueba de monitoreo la inhibición de la secreción intestinal inducida por la toxina de *V. cholerae* en rata. Ambos extractos se evaluaron a una dosis de 300 mg/kg, obteniéndose un porcentaje de inhibición de 84.4 % para el extracto acuoso y de 87.6 % para el extracto metanólico (Velázquez *et al.*, 2006).

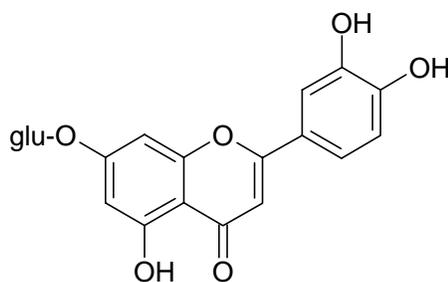
En un cuarto estudio se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon* en distintas especies de enteropatógenos causantes de diarrea y



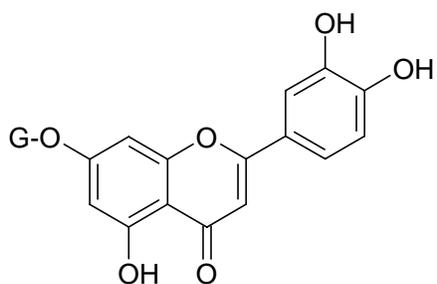
cianidina 3-O-glucósido **21**



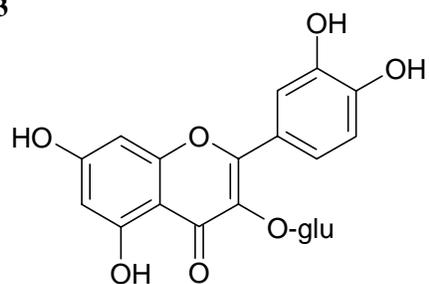
leucocianidina **22**



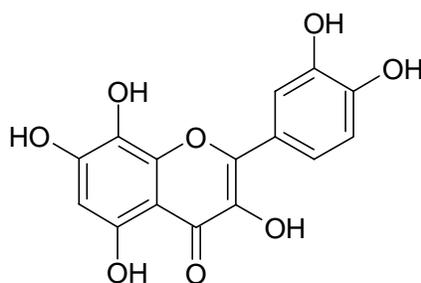
luteolina 7-O-glucósido **23**



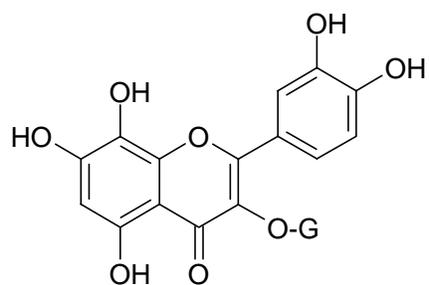
luteolina 7-O-glucurónido **24**



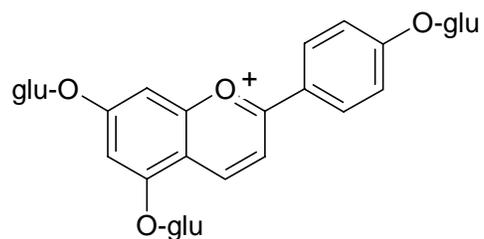
quercetina 3-O-glucósido **25**



gossipetina **26**



gossipetina 3-O-glucurónido **27**



apigenidina 5, 7, 4' tri-O-glucósido **28**

Figura 2. Compuestos aislados de *Ch. pentadactylon* (continuación).

III JUSTIFICACIÓN.

La diarrea infecciosa constituye uno de los problemas más graves de salud a nivel mundial. Es una manifestación clínica que se presenta en todas las edades de la vida del hombre, principalmente en los extremos de ésta, donde los aspectos social, cultural, económico, educativo, ambiental y nutricional son de gran relevancia para que esta se exprese con mayor regularidad en diversos sitios de la geografía mundial.

México no esta exento de ésta problemática pues cada año hay un número elevado de fallecimientos debidos a la diarrea. Los grandes contrastes que existen en todos los aspectos ya mencionados, hacen que la diarrea se presente frecuentemente en los sectores de la población más marginados, con bajos niveles de educación, bajos ingresos económicos y hábitos alimenticios deficientes.

Sin embargo, México es un país que posee una gran tradición en el uso de las plantas para tratar la diarrea y la disentería. No obstante, aunque el uso de estas plantas esta muy difundido en todo el territorio nacional, es necesario realizar los estudios químicos y farmacológicos de estas plantas, para poder validar su uso en la medicina tradicional mexicana y sobre todo para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos específicos, que ayuden a que la incidencia de estas afecciones sea cada vez menor en la población mexicana.

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El uso de plantas medicinales para tratar los trastornos gastrointestinales esta muy arraigado y difundido en bastas regiones del territorio nacional. En este sentido, las flores de *Ch. pentadactylon* han sido empleadas desde antes de la conquista, por los habitantes de ciertas regiones del país, para tratar ciertos síntomas comunes que afectan al tracto gastrointestinal.

De acuerdo a lo anterior, se han realizado estudios farmacológicos con el extracto metanólico de esta planta y se ha demostrado que este último posee actividad contra diversas enterobacterias causantes de la diarrea como: *E. coli*, *Sh. sonnei*, *Sh. flexneri* y *Salmonella sp.* en concentraciones de 8 mg/mL o menos.

Con el propósito de contribuir al estudio fitoquímico y farmacológico de la especie *Ch. pentadactylon*, es necesario que se lleve a cabo un estudio fitoquímico biodirigido del extracto crudo, para aislar e identificar los compuestos químicos responsables de la actividad antibacteriana y con ello contribuir en el proceso de validación de la planta.

V OBJETIVO GENERAL.

Obtener los principios activos antibacterianos de *Ch. pentadactylon* con la finalidad de contribuir al proceso de validación de la planta.

V.1 Objetivos específicos.

V.1.1 Realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto activo de *Ch. pentadactylon* para aislar los compuestos activos.

V.1.2 Identificar los compuestos químicos aislados.

V.1.3 Determinar el % de inhibición del crecimiento bacteriano causado por el extracto, las fracciones y los compuestos químicos obtenidos del extracto metanólico de *Ch. pentadactylon*.

V.1.4 Determinar la actividad antibacteriana de las mezclas de algunos de los compuestos puros aislados con el fin de comprobar si éstas son capaces de potenciar o disminuir dicha actividad.

VI HIPÓTESIS.

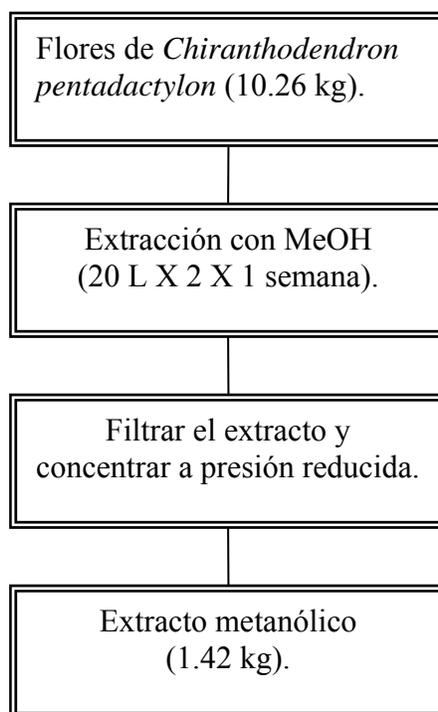
Si el extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon* presenta actividad antibacteriana, entonces posee uno o más compuestos químicos responsables de dicha actividad. Por lo que pueden ser aislados mediante un método fitoquímico biodirigido.

VII MATERIALES Y METÓDOS.

VII.1 Preparación del extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon*.

El material vegetal (10.26 kg de las flores) se adquirió en el mercado de “Sonora” en la Ciudad de México. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario del IMSSM y su identificación botánica fue llevada a cabo por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras (Voucher 14 256).

El material vegetal seco y molido se extrajo por maceración con metanol (20 L X 2) a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró y se concentró en un rotaevaporador a presión reducida a una temperatura de 40 °C, obteniéndose 1.42 kg de un extracto de color rojo.



Esquema 1. Preparación del extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon*.

VII.2 Evaluación biológica.

VII.2.1 Enterobacterias.

Las cepas empleadas fueron: *Escherichia coli* enterohemorrágica 0157:H7, *Shigella sonnei* (dos cepas), *Shigella flexneri* (dos cepas), *Salmonella sp* (dos cepas), *V. cholerae* y como cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922. Todas las cepas se mantuvieron en refrigeración en medio Agar Muller-Hinton (AMH) hasta su utilización. Las cepas, son aislados clínicos de pacientes pediátricos con diarrea y fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Torres *et al.*, 1995).

VII.2.2 Determinación de la actividad antibacteriana.

El ensayo utilizado para la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto metanólico, fracciones primarias, fracciones secundarias y compuestos puros fue el descrito por Alanís *et al.*, 2005.

Preparación del inóculo: para la prueba cada una de las nueve cepas de enterobacterias se resembró en un tubo de vidrio que contenía 10 mL de medio Caldo Muller Hinton (CMH) a 37 °C durante 4 horas con agitación constante, al término de este tiempo los cultivos se ajustan con el medio CMH a una transmitancia de 0.5 Mc Farland que equivale a un inóculo de 1.5×10^8 UFC/mL. Alícuotas de 50 µL de cada suspensión se transfirieron a los pozos de un replicador de Steers calibrado para sembrar 10^4 UFC.

Preparación de las muestras: las muestras a evaluar se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1 % en medio AMH, de las muestras resultantes se transfirieron 200, 400, 800, 1600 µL a cuatro matraces Erlenmeyer de manera independiente y se llevaron a un aforo de 20 mL con medio AMH para obtener una concentración final de 1, 2, 4 y 8 mg/mL, respectivamente. En el caso de las fracciones y compuestos puros se realizaron las diluciones correspondientes para

evaluar las muestras a concentraciones menores (400, 300, 200 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente las muestras se adicionaron en cajas de Petri. Cada concentración se ensayo por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces.

Las cajas de Petri conteniendo las muestras, se siembran con el inóculo contenido en el replicador de Steers que contiene las nueve cepas de enterobacterias. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Cada prueba incluyó un control (medio AMH, DMSO y enterobacterias) y un blanco (medio AMH y enterobacterias). Finalmente se determinó el halo de crecimiento en milímetros mediante medición directa con una regla y se calcularon los porcentajes de inhibición comparando con el control que se consideró como el 100 % de crecimiento. La concentración más alta a la cual no se detectó el crecimiento bacteriano corresponde a la concentración mínima inhibitoria (CMI). El establecimiento de las concentraciones empleadas para evaluar a las muestras se realizó mediante análisis preliminares a distintas concentraciones obteniéndose así las concentraciones idóneas para el ensayo.

VII.3 Análisis cromatográfico.

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) tanto analítico como preparativo se llevaron a cabo siguiendo las técnicas convencionales. Se emplearon placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (20 X 20 cm. Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) y diversos sistemas de elución. Los agentes cromógenos que se emplearon se muestran en la tabla 2. Cabe señalar que antes de llevar a cabo el revelado de las placas con dichos agentes cromógenos, estas últimas se visualizaron con luz UV con ayuda de una lámpara modelo UV gL-58 a longitudes de onda de 254 y 365 nm

Tabla 2. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente cromógeno	Composición	Referencia
Sulfato cérico-H ₂ SO ₄	Sulfato cérico 12 g Ac. sulfúrico 22.5 mL Hielo 350 g	Stahl, 1969
Vainillina-H ₂ SO ₄	Ac. sulfúrico al 5 % en etanol 100 mL Vainillina 1 g	Wagner <i>et al.</i> , 1984
Tricloruro de aluminio	Cloruro de aluminio 5 g Agua 100 mL	Wagner <i>et al.</i> , 1984
Tricloruro férrico	Cloruro de fierro III 10 g Agua 100 mL	Wagner <i>et al.</i> , 1984
H ₂ SO ₄ (10 %)	Ac. sulfúrico 9.8 mL Agua 100 mL	Wagner <i>et al.</i> , 1984
Fast blue (0.5 % H ₂ O)	Fast blue 0.5 g Agua 99.5 mL	Wagner <i>et al.</i> , 1984

VII.4 Fraccionamiento del extracto metanólico activo de *Ch. pentadactylon*.

El fraccionamiento del extracto metanólico de *C. pentadactylon* se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta (CCA), se emplearon 152 g de extracto metanólico. Como fase estacionaria se empleó 1 kg de Silica gel 60 (0.063 – 0.200 mm Merck). Los eluyentes empleados fueron acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) en diferentes proporciones. En el proceso, se obtuvieron 270 fracciones de 100 mL cada una, las cuales, fueron agrupadas en 10 fracciones primarias (F1/F10) de acuerdo a sus similitudes cromatográficas (Tabla 3). El concentrado de las fracciones individuales y agrupadas se llevó a cabo en un rotaevaporador a presión reducida y a una temperatura de 40 °C.

Tabla 3. Resumen del fraccionamiento mediante CCA del extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon*.

FRACCIÓN	FRACCIONES AGRUPADAS	SISTEMA DE ELUCIÓN	CANTIDAD OBTENIDA (g)	RENDIMIENTO* (%)
F1	1/7	AcOEt 100%	0.175	0.016
F2	8/10; 11/15	AcOEt 100%	0.529	0.048
F3	16/37; 38/52	AcOEt 100%	2.010	0.183
F4	53/78; 79/101	AcOEt 100%; AcOEt:MeOH (95:5)	3.581	0.326
F5	102/128; 129/146	AcOEt:MeOH (95:5); (90:10)	3.543	0.322
F6	147/155; 156/166	AcOEt:MeOH (90:10)	3.761	0.342
F7	167/175; 176/185	AcOEt:MeOH (90:10); (80:20)	9.192	0.836
F8	186/194; 195/203; 204/216	AcOEt:MeOH (80:20)	25.480	2.318
F9	217/229; 230/236; 237/245; 246/256	AcOEt:MeOH (80:20); (70:30)	61.800	5.622
F10	257/270	AcOEt:MeOH (50:50)	52.060	4.736

*Referido al peso seco de la planta.

VII.5 Fraccionamiento de la fracción primaria F9 derivada del extracto metanólico de *Ch. pentadactylon*.

La fracción primaria F9 (51.80 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante CCA. Como fase estacionaria se emplearon 474.4 g de Silica gel 60 (0.063 – 0.200 mm Merck) para cromatografía en columna. Los eluyentes empleados fueron AcOEt, MeOH y H₂O en diferentes proporciones. En el proceso, se obtuvieron 215 fracciones de 50 mL cada una, las cuales, fueron agrupadas en 9 fracciones secundarias (FS1/FS9) de acuerdo a sus similitudes cromatográficas (Tabla 4).

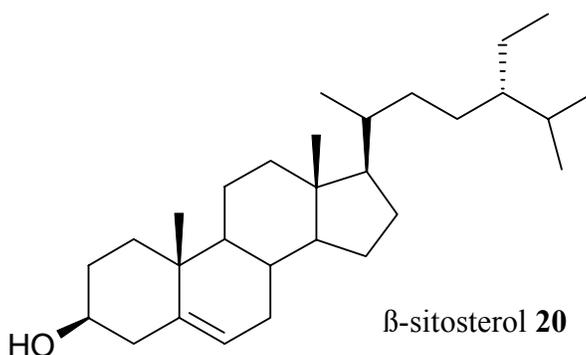
Tabla 4. Resumen del fraccionamiento mediante CCA de la fracción primaria F9 derivada del extracto metanólico de *Ch. pentadactylon*.

FRACCIÓN	FRACCIONES AGRUPADAS	SISTEMA DE ELUCIÓN	CANTIDAD OBTENIDA (g)	RENDIMIENTO* (%)
FS1	1/17	AcOEt:MeOH (7:2)	0.0363	0.004
FS2	18/25	AcOEt:MeOH (7:2)	0.1261	0.014
FS3	26/29; 30/38	AcOEt:MeOH (7:2)	0.2604	0.028
FS4	39/44	AcOEt:MeOH (7:2)	0.1996	0.021
FS5	45/54; 55/69	AcOEt:MeOH (7:2)	3.9335	0.427
FS6	70/84; 85/99; 100/114	AcOEt:MeOH (7:2)	13.4190	1.456
FS7	115/129; 130/140	AcOEt:MeOH (7:2); (7:3)	5.8890	0.639
FS8	141/150; 151/164	AcOEt:MeOH (7:3)	3.4845	0.378
FS9	165/172; 173/182; 183/193; 194/215	AcOEt:MeOH:H ₂ O (7:3:1)	11.989	1.301

*Referido al peso seco de la planta.

VII.6 Identificación del β -sitosterol.

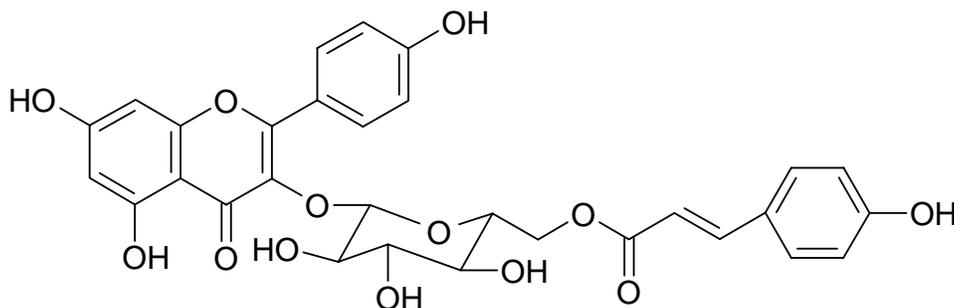
De la fracción primaria F1 se obtuvo un sólido de color blanco que por análisis en CCF y empleando una referencia disponible en el laboratorio, fue identificado como β -sitosterol **20**. Como eluyente se utilizó una mezcla de Hexano:AcOEt (8:2) y silica gel como fase estacionaria.



VII.7 Aislamiento y purificación del tilirósido, la (-) epicatequina y la (+) catequina.

Las fracciones F2 y F3 se recrystalizaron con AcOEt para obtener 7.2 mg y 162.4 mg respectivamente, de un sólido color amarillo, el cual se identificó como tilirósido **29** por comparación con una muestra auténtica de este compuesto en CCF, empleando un sistema de elución constituido por AcOEt:ácido acético glacial:ácido fórmico:agua (10:1.1:1.1:2.7).

Las aguas madres de la fracción F2 se evaporaron a sequedad y una porción (10 mg) se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCFP). Como fase móvil se utilizó un sistema ternario constituido por AcOEt:MeOH:H₂O (10:1.6:1.3) y como fase estacionaria sílica gel sobre placas de aluminio (20 X 20 cm, Sílica gel 60 F₂₅₄, Merck). Por cada 10 mg de F2 se obtuvieron 1.3 mg adicionales de tilirósido.



tilirósido **29**

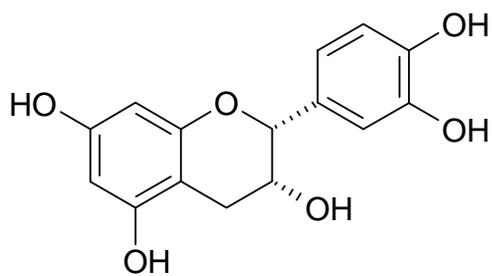
Las aguas madres de la fracción F3 se evaporaron a sequedad y una porción (10 mg) se purificó mediante CCFP, empleando la misma fase móvil y estacionaria que en el caso anterior. Se obtuvieron 2.4 mg de una mezcla de (-) epicatequina **30** y (+) catequina **31** por cada 10 mg de esta fracción. Esta mezcla se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para obtener 1.2 mg de (-) epicatequina y 1.2 mg de (+) catequina. La separación de los flavan 3-oles se llevó a cabo empleando una columna de fase reversa, el método de gradientes (Tabla 5) y un

flujo de 3.2 mL/min. La detección se realizó a 280 nm y el tiempo total de elución fue de 30 minutos.

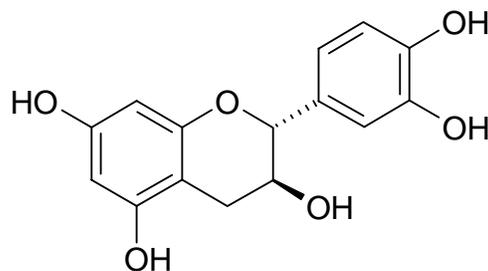
Tabla 5. Programa de elución utilizado en la CLAR para separar la fracción primaria F3

Fracción	Fase	Tiempo (min)	% A acetonitrilo	% B ácido fórmico 5 %
F3	0	4	20	80
	1	10	20	80
	2	1	50	50
	3	10	50	50
	4	1	100	0
	5	8	100	0

La (-) epicatequina se aisló como un sólido de color café claro con un punto de fusión de 240-244 °C y un tiempo de retención de 14.6 minutos. La (+) catequina se aisló como un sólido color café claro con un punto de fusión de 182-185 °C y un tiempo de retención de 10.5 minutos (Alanís, 2000).



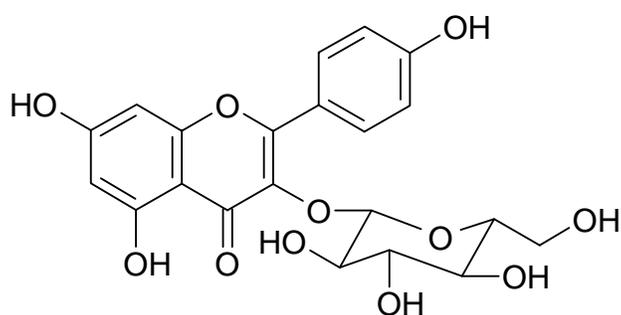
(-) epicatequina **30**



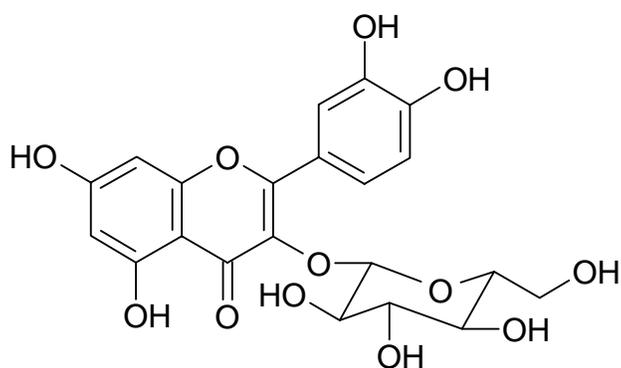
(+) catequina **31**

VII.8 Aislamiento y purificación de la astragalina y la isoquercitrina.

La fracción F5 (10 mg) se sometió a una CCFP. La fase móvil que se empleó estuvo constituida por AcOEt:ácido acético glacial:ácido fórmico:agua (10:1.1:1.1:2.7). La fase estacionaria fue la misma que para los casos anteriores. Se obtuvieron dos sólidos de color amarillo que fueron identificados por cromatografía en capa fina comparativa como astragalina **32** (1.0 mg) e isoquercitrina **33** (2.3 mg).



astragalina **32**



isoquercitrina **33**

VIII RESULTADOS.

Con el propósito de contribuir al estudio fitoquímico y farmacológico de la especie *Ch. pentadactylon*, se llevó a cabo el estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de las flores de esta especie. Después de llevar a cabo el fraccionamiento de dicho extracto mediante cromatografía en columna abierta se obtuvieron 10 fracciones primarias (F1/F10), las cuales fueron sometidas a un estudio de actividad antibacteriana sobre 9 especies de enteropatógenos que causan diarrea y disentería. Los resultados de la actividad antibacteriana del extracto metanólico y de las 10 fracciones primarias se muestran en la tabla 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano causado por el extracto metanólico derivado de las flores de *Ch. pentadactylon*.

Cepa	A	B	C	D	E	F	G	H	I
MUESTRA (8 mg/mL)									
Extracto	59	56.8	73.3	71.4	42.9	51.5	50	50	61.1
CONTROLES (8 mg/mL)									
Cloranfenicol	10	15	12	26	12	8	5	0	28
Trimetoprima	100	100	52	29	100	100	100	100	100

A: *Escherichia coli* 0157:H7, B: *Escherichia coli* ATCC 25922, C: *Shigella sonnei*-1, D: *Shigella sonnei*-2, E: *Shigella flexneri*-1, F: *Shigella flexneri*-2, G: *Salmonella* sp.-1, H: *Salmonella* sp.-2, I: *Vibrio cholerae*.

Tabla 7. Porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano causado por las fracciones primarias derivadas del extracto metanólico de *Ch. pentadactylon*.

Cepa	A	B	C	D	E	F	G	H	I
FRACCIONES PRIMARIAS (400 µg/mL)									
F2	33.3	54.8	38.5	40.7	55	53.9	33.3	36	20
F3	33.3	54.8	46.1	48.1	55.6	53.8	33.3	36	50
F4	33.3	48.4	38.5	40.7	40.7	38.5	33.3	36	40
F5	33.3	35.5	38.5	40.7	40.7	38.5	33.3	20	20
F6	4.2	35.5	15.4	25.9	33.3	38.8	50	52	20
F7	33.3	48.4	38.5	40.7	48.1	53.8	33.3	36	100(0.4)
F8	16.7	35.5	23.1	25.9	29.9	23.1	16.7	24	10
F9	33.3	61.3	53.9	55.6	55.6	53.8	50	52	40
F10	57.1	58.6	53.8	61.3	60	47.8	53.8	45.4	54.5
CONTROLES (400 µg/mL)									
Cloranfenicol	6.8	13.5	0	0	4	9.8	11.5	9.8	12.7
Trimetoprima	100	100	15.6	3.6	100	100	100	100	32.7

A: *Escherichia coli* 0157:H7, B: *Escherichia coli* ATCC 25922, C: *Shigella sonnei*-1, D: *Shigella sonnei*-2, E: *Shigella flexneri*-1, F: *Shigella flexneri*-2, G: *Salmonella* sp.-1, H: *Salmonella* sp.-2, I: *Vibrio cholerae*.

Así mismo, se realizó la purificación de las fracciones F1, F2, F3 y F5, lo cual condujo al aislamiento y posterior identificación del β -sitosterol, tilirósido, astragalina, isoquercitrina y la mezcla (-) epicatequina/(+) catequina (1:1). Los resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos puros y algunas mezclas se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano causado por los compuestos puros obtenidos de las flores de *Ch. pentadactylon*.

Cepa	A	B	C	D	E	F	G	H	I
COMPUESTOS PUROS (400 µg/mL)									
29	58.3	77.4	69.2	70.4	74.1	69.2	66.7	68	70
30	0	22.6	23.1	25.9	25.9	38.5	33.3	36	20
31	16.7	61.3	38.5	63	48.1	46.1	33.3	44	40
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	3.2	0	0	11.1	7.7	0	28	20
34	31.2	20.6	17.5	6.19	7.06	20.6	14.2	16.7	20
35	21.4	24.1	15.3	16.1	12	13	23.1	9.1	9.1
MEZCLAS DE COMPUESTOS PUROS (400µg/mL)									
29/30	50	44.8	46.2	48.4	44	39.1	38.5	45.4	54.5
29/31	42.8	51.7	53.8	41.9	44	30.4	23.1	18.2	27.3
30/31	16.7	48.4	38.5	40.7	55.6	46.1	50	52	40
29/30/31	57.1	58.6	53.8	67.7	60	47.8	53.8	45.4	45.4
CONTROLES (400 µg/mL)									
Cloranfenicol	6.8	13.5	0	0	4	9.8	11.5	9.8	12.7
Trimetoprima	100	100	15.6	3.6	100	100	100	100	32.7

A: *Escherichia coli* 0157:H7, B: *Escherichia coli* ATCC 25922, C: *Shigella sonnei*-1, D: *Shigella sonnei*-2, E: *Shigella flexneri*-1, F: *Shigella flexneri*-2, G: *Salmonella* sp.-1, H: *Salmonella* sp.-2, I: *Vibrio cholerae*; 29: Tilirósido, 30: (-) Epicatequina, 31: (+) Catequina, 32: Astragalina, 33: Isoquercitrina; 34: camperol; 35: Ácido p-cumárico.

Dado que la fracción F9 presenta buena actividad antibacteriana contra las distintas especies de enteropatógenos, se decidió realizar su fraccionamiento. Después de realizar dicho fraccionamiento mediante CCA, se obtuvieron 9 fracciones (FS1/FS9) las cuales, también fueron evaluadas en las nueve cepas de enteropatógenos ya descritas. Los resultados de este ensayo se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano causado por las fracciones FS2/FS9 derivadas de la fracción primaria F9

Cepa	A	B	C	D	E	F	G	H	I
FRACCIÓN (400 µg/mL)									
F9	33.3	61.3	53.9	55.6	55.6	53.8	50	52	40
FRACCIONES SECUNDARIAS (400 µg/mL)									
FS2	37.5	11.8	32.5	24.9	3.6	11.8	14.2	16.7	0
FS3	37.5	29.4	40.0	24.9	30.0	29.4	31.4	33.3	20.0
FS4	50.0	29.4	40.0	24.9	20.0	29.4	31.4	25.0	20.0
FS5	37.5	11.8	10	12.6	7.1	11.8	0	0	0
FS6	37.5	11.8	25	6.2	7.1	11.8	14.2	16.7	20.0
FS7	62.5	47.1	55.0	43.7	40.0	47.1	48.5	50.0	40.0
FS8	75.0	64.7	55.0	53.1	60.0	64.7	48.5	50.0	40.0
FS9	62.5	47.1	55.0	43.7	40.0	47.1	48.5	50.0	40.0
CONTROLES (400 µg/mL)									
Cloranfenicol	6.8	13.5	0	0	4	9.8	11.5	9.8	12.7
Trimetoprima	100	100	15.6	3.6	100	100	100	100	32.7

A: *Escherichia coli* 0157:H7, B: *Escherichia coli* ATCC 25922, C: *Shigella sonnei*-1, D: *Shigella sonnei*-2, E: *Shigella flexneri*-1, F: *Shigella flexneri*-2, G: *Salmonella* sp.-1, H: *Salmonella* sp.-2, I: *Vibrio cholerae*.

IX DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

La selección de *Chiranthodendron pentadactylon* como una fuente de productos antibacterianos, deriva de los resultados biológicos primarios que se obtuvieron como parte del proyecto que se conduce en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), que tiene el propósito de sustentar algunas de las propiedades medicinales que se le atribuyen a la flora medicinal mexicana (Alanís *et al.*, 2002; 2005).

El extracto orgánico se preparó a partir de las flores de *Ch. pentadactylon* empleando como disolvente de extracción metanol. El extracto resultante se sometió a ensayo de actividad antibacteriana, a una concentración de 8 mg/mL, contra las cepas ya mencionadas. Los porcentajes de inhibición del desarrollo bacteriano obtenidos abarcan un rango del 42.9 % al 73.3 %. El valor mínimo y máximo de porcentaje de inhibición se presentó en la especie *Sh. flexneri-1* y *Sh. sonnei-1*, respectivamente (Tabla 6).

Al comparar la actividad antibacteriana del extracto metanólico contra la de los fármacos cloranfenicol y trimetoprima (controles), podemos apreciar que a una concentración de 8 mg/mL, el efecto antibacteriano del extracto es mayor al del cloranfenicol; sin embargo la actividad de éste con respecto a la de la trimetoprima solo es mayor en el caso de las dos cepas de *Sh. sonnei* (Gráfica 1).

El fraccionamiento del extracto metanólico mediante CCA permitió obtener 10 fracciones primarias (F1/F10). De estas, las fracciones F2 a F10 se sometieron al mismo ensayo de actividad antibacteriana a concentraciones de 400 µg/mL cada una.

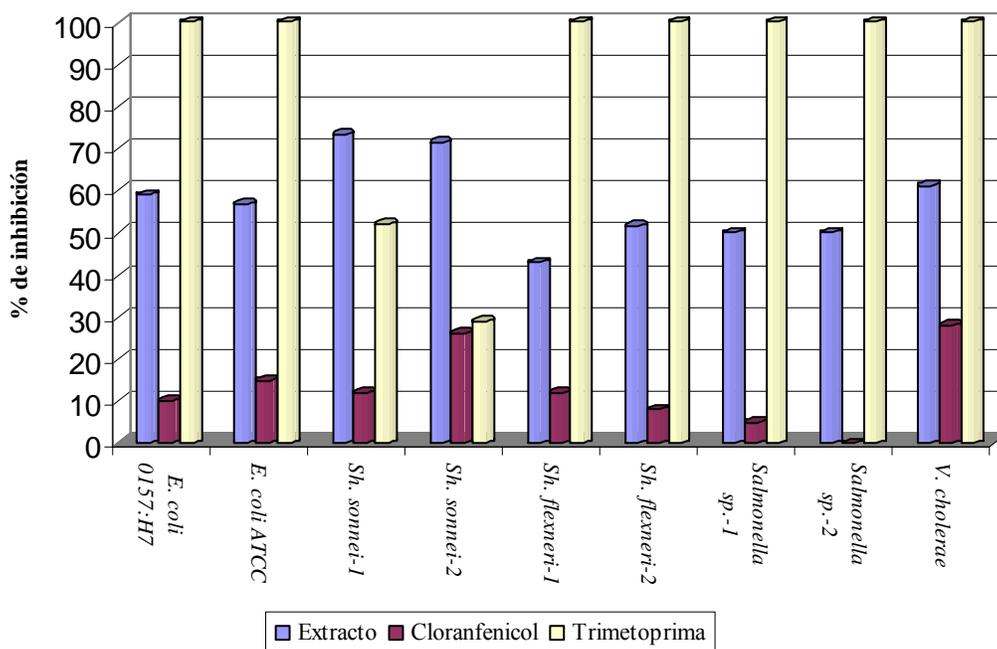
La fracción F10 mostró los valores más altos de porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano sobre cuatro cepas: *E. coli* 0157:H7, *Sh. sonnei-2*, *Sh. flexneri-1* y *Salmonella sp.-1*, abarcando

un rango del 53.8 % al 61.3 % de inhibición. A su vez, la fracción F9 presentó el mayor efecto inhibitorio en tres cepas: *E. coli* ATCC 25922, *Sh. sonnei*-1 y *Salmonella sp.-2* con valores de porcentaje de inhibición del 52 % al 61.3 % (Tabla 7).

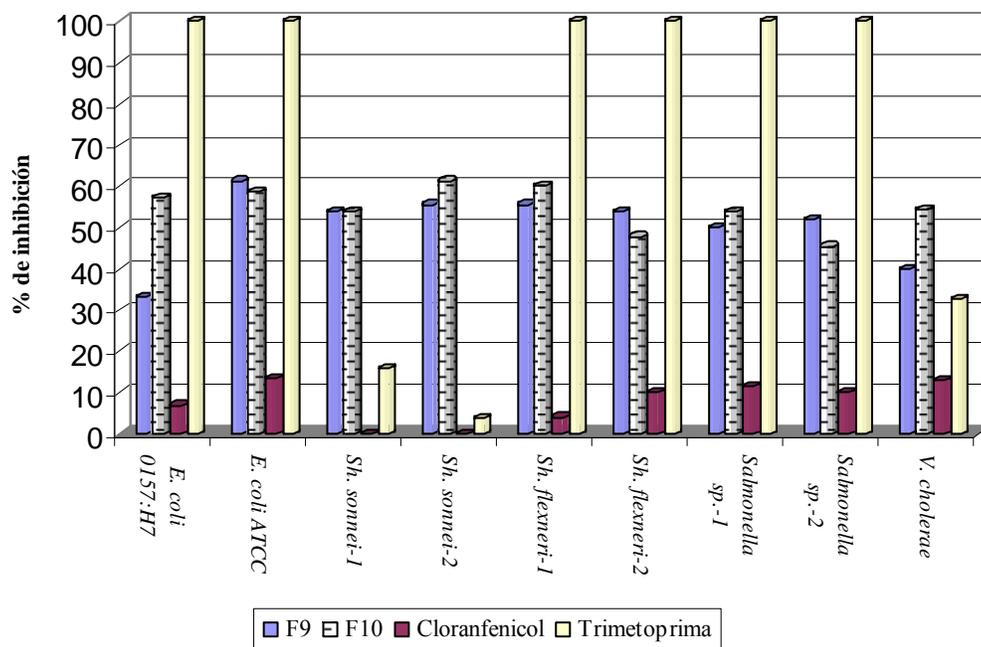
Las fracciones F2, F6 y F7 poseen mayor actividad contra una sola cepa bacteriana: *Sh. flexneri*-2 (53.9 %), *Salmonella sp.-2* (52 %) y *V. cholerae* (100 %), respectivamente.

Las fracciones F3, F4, F5 y F8 mostraron efectos inhibitorios del 10 % al 55.6 % sobre los distintos enteropatógenos.

En general, los datos de actividad antibacteriana de todas las fracciones primarias superan en actividad al cloranfenicol. En cuanto a la trimetoprima, la actividad de F9 y F10 solo es mayor en el caso de las dos especies de *Sh. sonnei* y en *V. cholerae* (Gráfica 2).



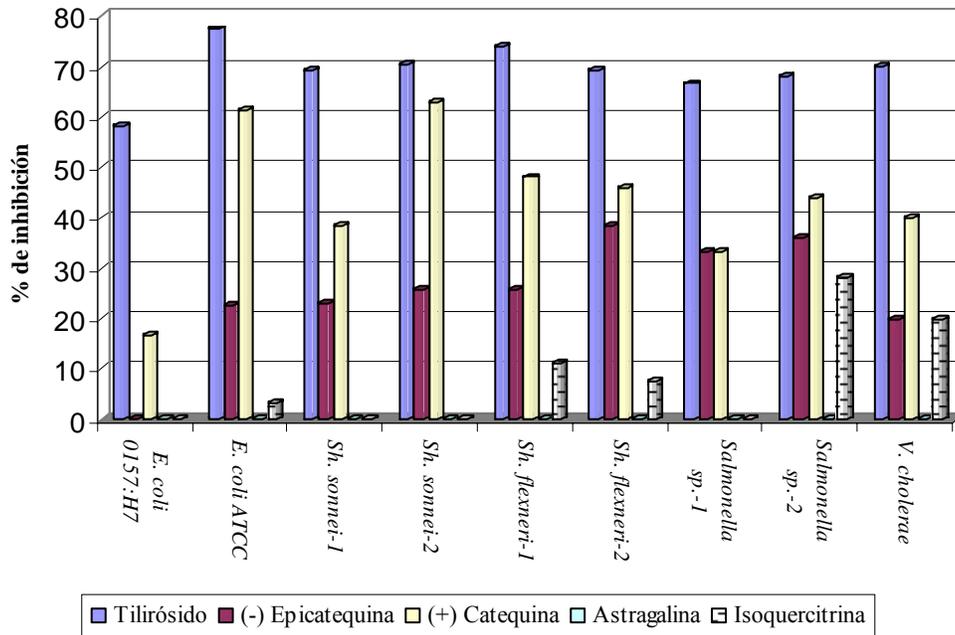
Gráfica 1. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por el extracto y fármacos controles.



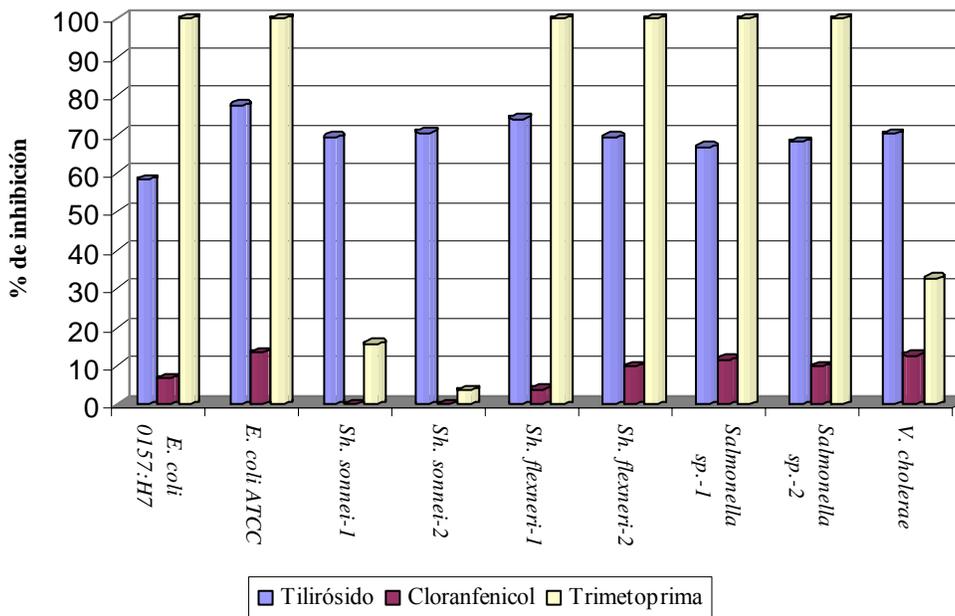
Gráfica 2. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por las fracciones F9, F10 y fármacos controles.

Mediante análisis de CCF y usando muestras de referencia disponibles en el laboratorio se logró identificar y aislar cinco flavonoides: tilirósido **29**, (-) epicatequina **30**, (+) catequina **31**, astragalina **32** e isoquercitrina **33**; así como un esteroide: el β -sitosterol **20**. Los cinco flavonoides se sometieron al mismo ensayo de actividad antibacteriana, encontrándose que el tilirósido es el compuesto con el mayor efecto antibacteriano con un rango de inhibición del 58.3 % al 77.4 %. Le siguen en actividad la (+) catequina (16.7 % a 63 %) y la (-) epicatequina (20 % a 38.5 %). Cabe señalar que el valor más bajo y más alto de inhibición se presentó en la cepa de *E. coli* 0157: H7 y en *E. coli* ATCC 25922, respectivamente (Tabla 8 y gráfica 3).

En relación a los fármacos controles, la actividad del tilirósido es mayor a la del cloranfenicol pero no a la de la trimetoprima, salvo en los casos de *Sh. sonnei*-1, *Sh. sonnei*-2 y *V. cholerae* (Tabla 8 y gráfica 4).



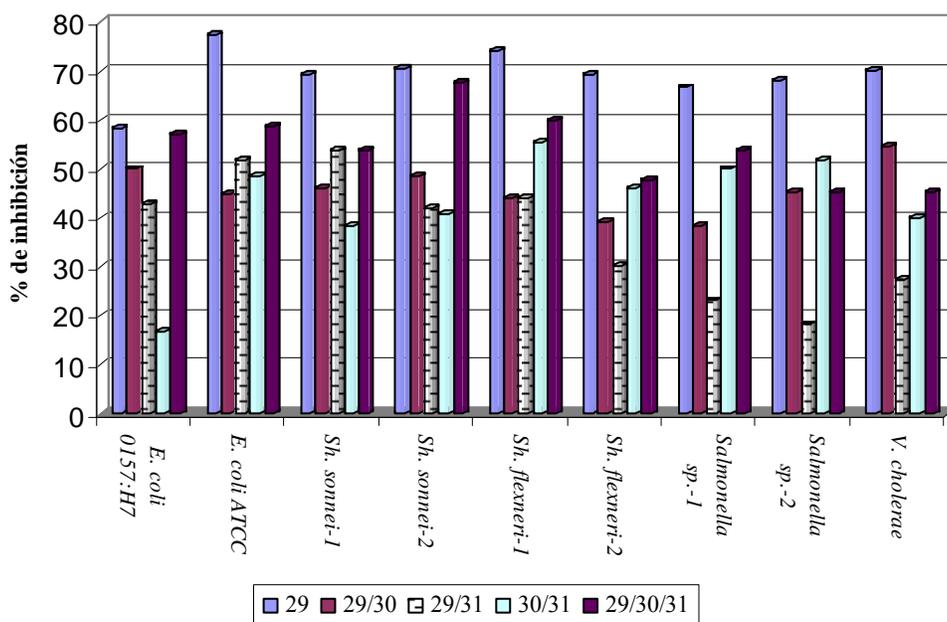
Gráfica 3. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por los compuestos puros aislados.



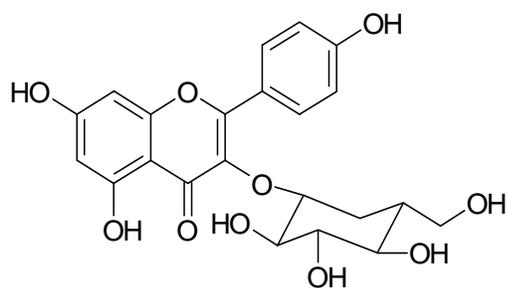
Gráfica 4. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por el tilirósido y fármacos controles.

Considerando la posibilidad de que la combinación de algunos de los compuestos aislados pudiera incrementar su actividad al mezclarlos, se evaluaron cuatro combinaciones, de las cuales ninguna superó la actividad del tilirósido cuando se evalúa de forma individual (Tabla 8 y gráfica 5). Esto nos permite proponer que el efecto antibacteriano de las fracciones F2 y F3 sólo se debe al tilirósido.

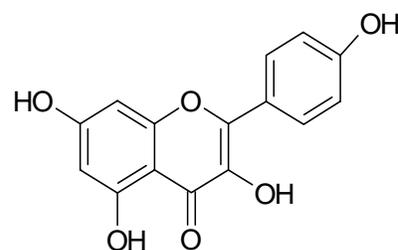
Suponiendo que el tilirósido se pudiera hidrolizar en el tracto gastrointestinal tal como sucede con algunos glicósidos de flavonoides y que sus productos de hidrólisis fueran los responsables de la actividad antibacteriana, se realizó la evaluación, con muestras de referencia disponibles en el laboratorio, de los compuestos camperol **34**, ácido p-cumárico **35** y astragalina **32**, los cuales forman parte de la estructura química de éste flavonoide. Lo anterior permitió demostrar que ninguno de los tres compuestos es el responsable de la actividad biológica del tilirósido, sino que se necesita la molécula completa del flavonoide para ejercer su efecto antibacteriano (Tabla 8 y gráfica 6).



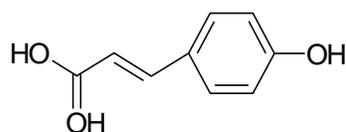
Gráfica 5. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por algunas mezclas de los compuestos puros.



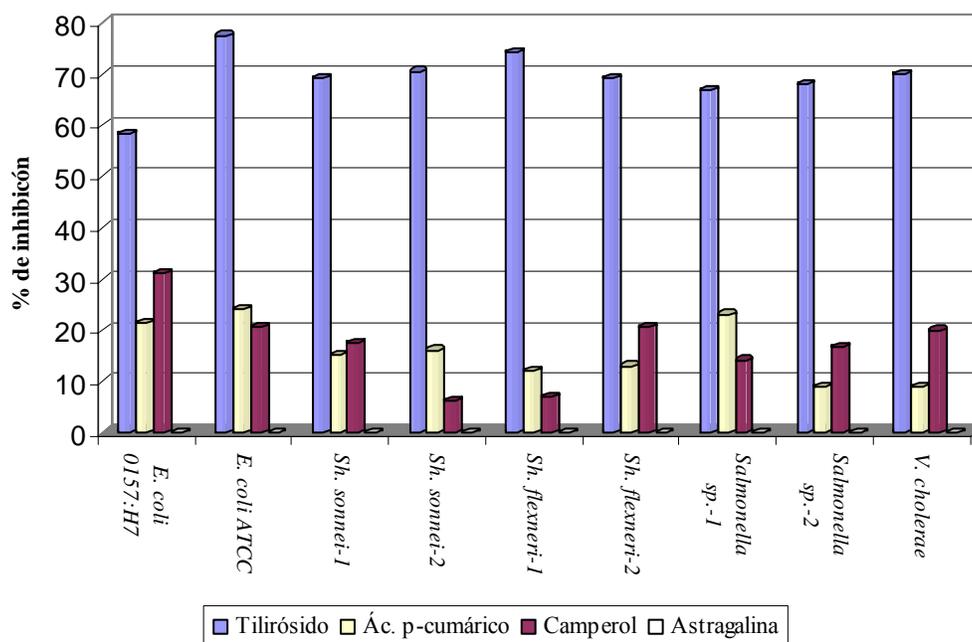
astragalina **32**



camperol **34**



ácido p-cumárico **35**



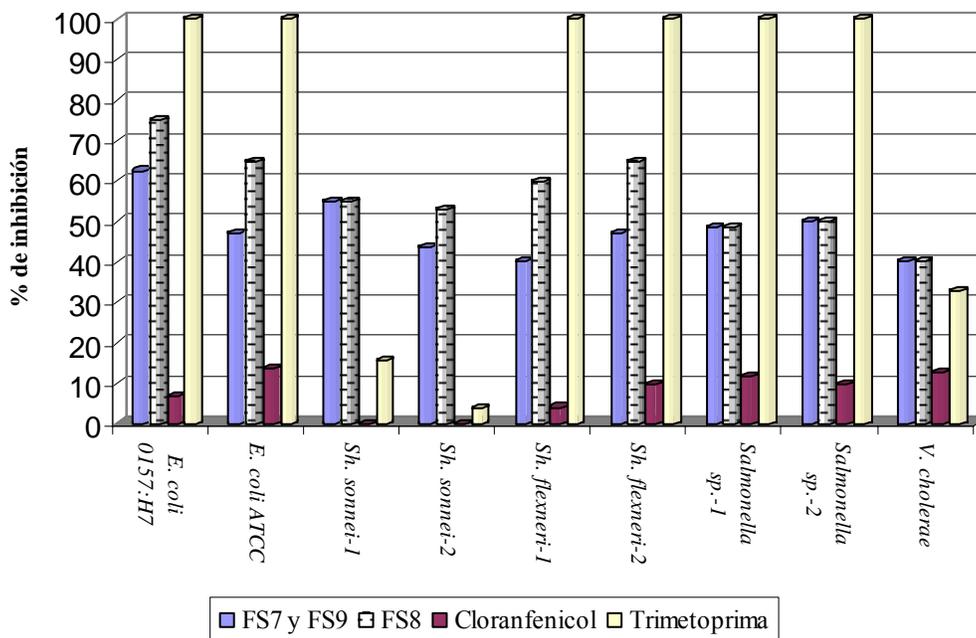
Gráfica 6. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por el tilirósido, el ácido p-cumárico, el camperol y la astragalina.

La separación de la fracción F9 mediante CCA condujo a la obtención de nueve fracciones secundarias (FS1/FS9). La fracción FS8 presentó la mayor actividad antibacteriana (a una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$) con un rango de actividad del 40 % al 75 % de inhibición.

Las fracciones FS7 y FS9 presentaron los mismos valores de por ciento de inhibición para todos los enteropatógenos y comparten, junto con la fracción FS8, el primer lugar en actividad antibacteriana en el caso de *Sh. sonnei*-1, las dos cepas de *Salmonella sp.* y *V. cholerae* (Tabla 9).

Las fracciones FS2 y FS5 no presentaron efecto alguno sobre el desarrollo de *V. cholerae*. La ausencia de actividad también se presenta en las dos cepas de *Salmonella sp.* pero solo en el caso de la fracción FS5.

Por otra parte, el efecto antibacteriano de FS8 (similar al de su fracción de origen) supera al del cloranfenicol en todos los casos; sin embargo solo es mayor en las dos cepas de *Sh. sonnei* y *V. cholerae* al hacer la comparación de actividades con la trimetoprima. (Gráfica 7).



Gráfica 7. Inhibición del desarrollo bacteriano causado por las fracciones FS7, FS8, FS9 y fármacos controles.

X RESUMEN Y CONCLUSIONES.

X.1 El estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de *Ch. pentadactylon* condujo al aislamiento e identificación de cinco flavonoides (tilirósido, astragalina, isoquercitrina, (-) epicatequina y (+) catequina) y un esteroide (β -sitosterol).

X.2 El tilirósido fue el compuesto que presentó la mayor actividad antibacteriana (58.3 % a 77.4 % de inhibición) comparada contra el extracto metanólico, cada una de las fracciones, compuestos aislados y las mezclas de estos últimos.

X.3 La presencia del tilirósido y su actividad demostrada, permiten explicar en parte el uso que se le da a esta planta en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diarrea y la disentería.

X.4 Los resultados obtenidos y las diferencias estructurales permiten proponer al tilirósido como molécula prototipo para el desarrollo de fármacos antidiarreicos y al extracto metanólico para el desarrollo de fitofármacos.

X.5 Los resultados obtenidos demuestran que los procedimientos biodirigidos constituyen métodos adecuados para la obtención de nuevos compuestos con actividad biológica.

XI BIBLIOGRAFÍA.

- ❖ Alanís, A., Calzada, F., Torres, J. 2002. Screening of some Mexican medicinal plants for antibacterial activity. *Revista de fitoterapia* S1, 311
- ❖ Alanís, A., Calzada, F., Cervantes, J., Torres, J., Ceballos G. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 153-157
- ❖ Alanís, A. 1997. Estudio fitoquímico del extracto metanólico de la raíz de *Cuphea pinetorum* Benth. Tesis de licenciatura. México, p. 1 y 2
- ❖ Alanís A. 2000. (-) Epicatequina, principio con actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* obtenida de las partes aéreas de *Rubus coriifolius* Focke (Rosaceae). Tesis de maestría. México, p. 47, 48, 54, 55
- ❖ Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México, p. 644-645
- ❖ Avila, J.G. 2002. Estudio fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides*. Evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis de doctorado en farmacia. México, p. 7-11; 141-144
- ❖ Bruneton, J. 1991. Elementos de fitoquímica y farmacognosia. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España, p. 157-166
- ❖ Bruneton, J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España, p. 306-321
- ❖ Calzada, F., Cervantes, J., Yépez, L. 2005. *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 191-193
- ❖ Calzada, F. 2000. Proantocianidinas de tipo A y flavonoles con actividad antiprotozoaria de *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron (Asteraceae). Tesis de doctorado en farmacia. México, p. 1-3
- ❖ Claeson, M., Merson, M.H. 1990 Global progress in the control of diarrheal diseases. *Journal of Pediatric Infectious Diseases* 9, 345
- ❖ Cordell, G., Colvard, M. 2005. Some thoughts on future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 5-14

- ❖ Domínguez, X. 1985. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México, p. 81-84
- ❖ Evans, W.Ch. 1991. Trease y Evans. Farmacognosia. 13ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, p. 3-4, 65-66, 448-450
- ❖ Hardman, J. y Limbird, L. 1996. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. Vol. I. McGraw-Hill Interamericana. México, p. 990-993
- ❖ Hardman, J. y Limbird L. 2003. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 10ª edición. Vol. I y II. McGraw-Hill Interamericana. México, p. 1051-1055, 1161-1253
- ❖ Greenwood, D. 1995. Antimicrobial Chemotherapy. Third Edition. Oxford University Press, p 251-262
- ❖ Harborne J.B. 1994. The Flavonoids. Advances in research since 1986. Chapman and Hall. Printed in Great Britain, p. 499-502
- ❖ Herrera, I.F. y Hernández, J.F. 2002. Epidemiología de la enfermedad diarreica. En: Herrera I.F. y Romero, R. (Eds.). Síndrome diarreico infeccioso. Ed. Medica Panamericana, p. 1-7
- ❖ Hostettmann, H., Marston, A., Maillard M., Hamburger M. 1995. Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine. Oxford Science Publications. Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 37, p. 17-18
- ❖ Hutchinson, J., LL.D., F.R.S. 1967. The genera of flowering plants. Dicotyledones. Volume II. Oxford University Press. Printed in Great Britain, p.551
- ❖ Jäger, A. 2005. Is traditional medicine better 25 years later? *Journal of Ethnopharmacology* 100, 3-4
- ❖ Kuklinski, C. 2000. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega S.A., Barcelona, España, p. 51-53, 126-129
- ❖ Kumate, J., Muñoz, O., Gutiérrez, G., Santos, J. 1998. Manual de infectología clínica. Méndez Editores. México, p. 47-61
- ❖ Lara, F., Márquez, C. 1996. Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. UNAM. México, p. 57
- ❖ Linares, E., Flores, B., Bye, R. 1988. Selección de plantas medicinales de México. Ed. Limusa. México, p. 44-45
- ❖ Lewis, W. 2003. Medicinal Botany Plants Affecting Human Health. Ed. Wiley John Wiley & Sons, Inc. USA, p. 1-17

- ❖ Mabberley, D. 1997. The plant-Book. A portable dictionary of the vascular plants. Cambridge University Press, p.152
- ❖ Macdonald, G. 1997. A Dictionary of Natural Products. Plexus Publishing, Inc. USA, p. 167
- ❖ Markham, K.R. 1982. Introduction to the flavonoids. Techniques of flavonoid identification. Academic Press, London, p. 1-3
- ❖ Martín, P. 2002. Tratamiento no antimicrobiano de la diarrea. En: Herrera, I.F. y Romero, R. (Eds.). Síndrome diarreico infeccioso. Ed. Médica Panamericana, p. 555, 556
- ❖ Martínez, M. 1987. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. FCE. México, p. 123
- ❖ Martínez, M. 1944. Las plantas medicinales de México. Ed. Botas. México, p. 394-395
- ❖ Maulén, I., Acosta, M., Llamosas, B., Andraca, R. 1993. Tratamiento de la diarrea aguda en niños. Rehidratación oral, endovenosa, mantenimiento y recomendaciones nutricionales. *Acta Pediátrica de México* 14, 228-237
- ❖ Michael, M. 2001. Terapéutica de los trastornos digestivos. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, p. 551-560
- ❖ Mota, H.F., Gómez, U.J., Garrido, M.T., Gibovich, G. 1994. Percepción del manejo de casos de diarrea en establecimientos de salud. *Boletín Médico, Hospital Infantil México* 51, 8
- ❖ Murphy, M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 12 No. 4 p. 564-582
- ❖ Noyola, D.E. 2002. Tratamiento antimicrobiano de la diarrea aguda. En: Herrera, I.F. y Romero, R., (Eds.). Síndrome diarreico infeccioso. Ed. Medica Panamericana, p. 565-568
- ❖ Perusquia, M., Mendoza, S., Bye, R., Linares, E., Mata, R. 1995. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 63-69
- ❖ Placido, E. 2005. Actividad antibacteriana del extracto hexánico de *Hipocratea excelsa* HBK. Tesis de licenciatura. México, p. 14-19
- ❖ PLM[®] Diccionario de especialidades farmacéuticas. Edición 51, México 2005.
- ❖ Quattrochi, U. 2000. World Dictionary of Plants Names. Common names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology. Vol. 2. CRC Press LLC. Printed in The United States of America, p. 517

- ❖ Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México, p. 324
- ❖ Seigler, D. 1998. Plant Secondary Metabolism. Kluwer Academic Publishers. Printed in The United States of America, p. 151-190
- ❖ Stahl, E. 1969. Thin Layer chromatography. A Laboratory Handbook. Spring-Verlag, New York.
- ❖ Torres, J., González-Arroyo, S., Pérez, R., Muñoz, O. 1995. Inappropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbiological studies. *Archives Medical Research* 26, 23-29
- ❖ Tyler, V., Brady, L., Robbers, J. 1979. Farmacognocia. 2a edición. Ed. El Ateneo. Impreso en la Argentina p. 1-3
- ❖ Velázquez, C., Calzada F., Torres J., González F., Ceballos G. 2006. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in México. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 66-70
- ❖ Wagner, H., Bladt, S., Zgainki, E.M. 1984. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York Tokio. Printed in Germany, p. 299-304