

255461 T T 2ej



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

## ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS TERPENOIDES AISLADOS DE *Pinus oocarpa* Schiede SOBRE *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G A**

P R E S E N T A

ANGELICA FLORES PEREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE SERAFIN CALDERON PARDO



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
1997



BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE ECOLOGIA  
UNAM

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS TERPENOIDES AISLADOS DE  
Pinus oocarpa Schiede SOBRE Trypanosoma cruzi

realizado por ANGELICA FLORES PEREZ

con número de cuenta 8624806-8 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario DR. JOSE SERAFIN CALDERON PARDO

Propietario DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN

Propietario M. EN C. EUGENIO ALEJANDRO FLORES OROPEZA

Suplente M. EN C. JAVIER ANTONIO TABOADA RAMIREZ

Suplente M. EN C. EMMA MALDONADO JIMENEZ

*[Handwritten signatures and stamps]*  
FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*[Handwritten signature]*  
P.A.

M. EN C. ALEJANDRO MARTINEZ MENA



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. José S. Calderón con mi más profundo respeto, por ser mi director de tesis,.  
A su paciencia, su apoyo, por compartir sus conocimientos en este trabajo y por la confianza que siempre me brindo.

A la Dra. Julieta Rubio por ser mi asesora en la parte biológica, por su apoyo constante y por compartir sus conocimientos y su equipo de trabajo para la realización y termino de esta tesis, además por ser parte del comité evaluador.

Al Instituto de Química, UNAM donde fue elaborada gran parte de esta tesis.

Al Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM donde fué realizada la prueba tripanocida.

Al apoyo económico que fué otorgado para este proyecto por el SNI.

A los Investigadores que revisaron el manuscrito y que hicieron valiosas aportaciones para mejorar el presente trabajo :

Al M. en C. Eugenio Flores Oropeza del Ins. Quím. UNAM por sus enseñanzas durante el desarrollo experimental fitoquímico y por sus valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo, pero sobre todo por su profesionalismo y su amistad.

Al M. en C. Javier Antonio Taboada Ramírez y a la M en C. Emma Maldonado Jiménez por sus valiosos comentarios y sugerencias durante el proceso de revisión de este trabajo.

A Laura Vargas y a Clementina Castro del IIBM UNAM por su asesoría y valiosa ayuda en la realización de la prueba tripanocida.

A Javier Carvallo de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM ; por su apoyo, por compartir muchos de sus conocimientos y por sus comentarios y aportaciones valiosas.

## **DEDICATORIAS**

**A la VIDA.**

En memoria de mi hermano Demetrio.

A mi mamá : Que a tu manera siempre luchaste por darnos cariño, apoyo, conocimientos y valor a la vida.

A mis hermanos y sobrinos por todos los momentos compartidos y aprendidos.

A René : Con todo cariño te dedico el presente trabajo porque con tu ayuda incondicional, tu confianza en mi y tu apoyo te has empeñado en animarme a seguir siempre adelante.

A Adriana Valera : Por tu fortaleza, tus consejos, tu apoyo y tu ejemplo me han animado a seguir adelante, pero sobre todo por tu valiosa amistad y los momentos gratos que hemos compartido.

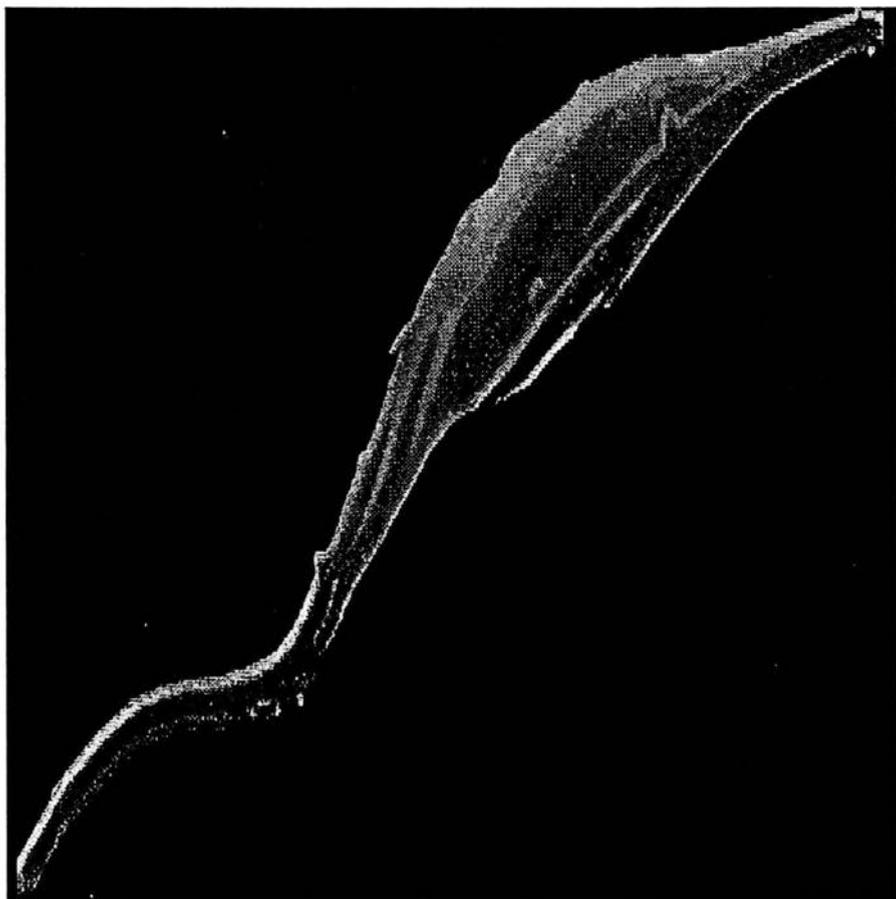
A las vagonas : Por su amistad y todos aquellos momentos de trabajo y diversión que tuvimos y que nos unieron. Esther por su apasionada forma de vivir y Rocío la redactora de la vida

A mis amigos y compañeros de la Facultad : Graciela con la que siempre compartí, me angustie, y me apoye en aquellos momentos gratos y difíciles. Raymundo el amigo que siempre está dispuesto a ayudarte con la biotecnología de punta y al Noe siempre tan preocupado con las especies en extinción pero cuando lo necesitas ahí esta. Y a todos con los que siempre viví todo aquello que nos enseñaron así como los los momentos soleados y lluviosos de más de 76 hrs.

A mis compañeros del Instituto de Investigaciones Biomedicas : Javier y Luis con los que compartí aquellos momentos de angustia y de felicidad con el *T. cruzi*. Y a todas aquellas personas que han estado presentes en mi vida.

Este trabajo fue elaborado en el L-7 de la Unidad de Plantas Medicinales del Instituto de Química de la UNAM bajo la dirección del Dr. José S. Calderón Pardo. Y en el Laboratorio de Genética y Toxicología del Instituto de Investigaciones Biomedicas de la UNAM asesorada por la Dra. Julieta Rubio Lighthourn

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS TERPENOIDES**  
**AISLADOS DE *Pinus oocarpa* Schiede SOBRE**  
***Trypanosoma cruzi***



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	
<b>2.1 DITERPENOS</b>	<b>2</b>
<b>2.2 LAS PINACEAS</b>	<b>9</b>
<b>2.3 ENFERMEDAD DE CHAGAS</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b>	
<b>4.1 METODOLOGÍA QUÍMICA</b>	<b>38</b>
<b>4.2 METODOLOGÍA BIOLÓGICA</b>	<b>41</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	
<b>5.1 PARTE QUÍMICA</b>	<b>47</b>
<b>5.2 PARTE BIOLÓGICA</b>	<b>48</b>
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>62</b>
<b>7. CONCLUSIÓN</b>	<b>65</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>66</b>



BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
UNAM

# ***INTRODUCCIÓN***

# 1. INTRODUCCIÓN

México cuenta con una gran diversidad de flora, sus antiguos pobladores conocían las propiedades medicinales de miles de plantas a las que clasificaban de acuerdo con las enfermedades en que eran utilizadas. Tenían plantas para todas las enfermedades y dolores, de cuyos zumos, infusiones y aplicaciones componían sus remedios, y lograban efectos admirables. El doctor Francisco Hernández a finales del siglo XVI, llegó a consignar 1,200 plantas medicinales en su preciosa obra de diez tomos (**Acosta 1977**).

Actualmente se han llevado a cabo estudios químicos de plantas medicinales y se ha encontrado que éstas contienen una gran diversidad de metabolitos secundarios, los cuales han mostrado actividad citotóxica, anticancerígena, antibacteriana, fungicida, antiviral, etc. Los resultados de esta línea de investigación han permitido confirmar que en muchos casos existe una clara correlación entre el uso popular de una determinada planta y la actividad biológica de algunos de sus compuestos químicos, como los ejemplos mundialmente conocidos : morfina, cafeína, ácido salicílico, etc.

Siguiendo esta línea de pensamiento seleccionamos al pino *Pinus oocarpa*, a cuya resina se le atribuye, entre otras actividades biológicas, la de ser antiparasitario, suponiendo que algunos de sus compuestos químicos tuvieran actividad contra *Trypanosoma cruzi* agente causal de la enfermedad de Chagas, que es uno de los padecimientos que más muertes causa en América Latina.

Por lo anteriormente mencionado, se decidió llevar a cabo un estudio fitoquímico de la resina de *Pinus oocarpa* con el objeto de aislar e identificar sus metabolitos secundarios principales, para conocer su posible actividad tripanocida, utilizando como controles positivos al NIFURTIMOX, fármaco que se ha utilizado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y al ácido 7 $\alpha$ -hidroxisandaracopimárico, compuesto aislado de *Salvia microphylla*.

***A N T E C E D E N T E S***

## 2. ANTECEDENTES

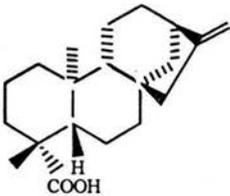
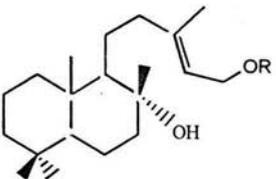
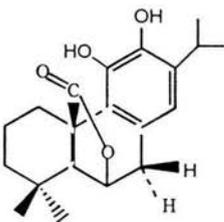
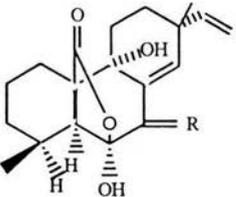
### 2.1 DITERPENOS

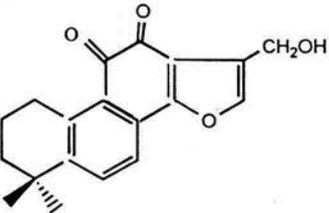
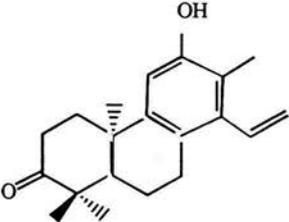
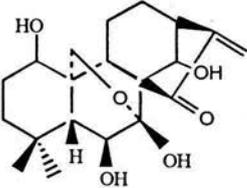
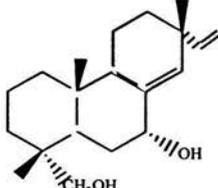
Los Terpenos son metabolitos secundarios, que en su mayoría son tóxicos para un gran número de insectos y mamíferos que se alimentan de las plantas y que aparentemente juegan un papel importante de defensa en el reino vegetal.

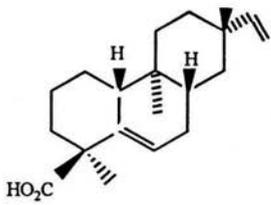
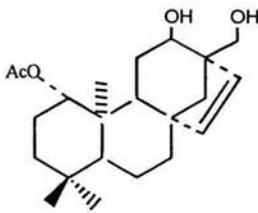
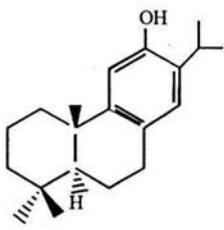
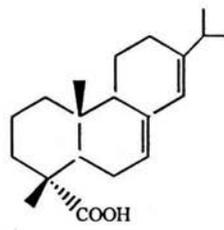
Entre las subclases de terpenos de considerable interés están los diterpenos que son compuestos constituidos por veinte átomos de carbono y están formados por la unión de cuatro unidades de isopreno, se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, hongos y particularmente en las resinas de los arbustos y árboles. Algunos de ellos, poseen actividades biológicas muy importantes, las cuales se mencionan a continuación :

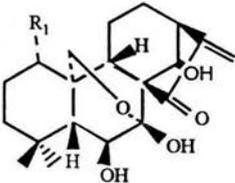
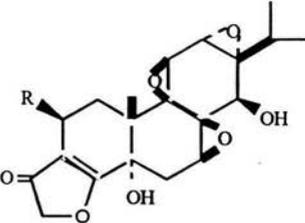
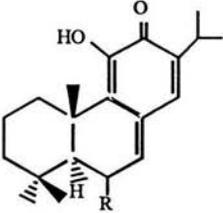
<b>DITERPENOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA</b>		
<b>ACTIVIDAD/COMPUESTO</b>	<b>FUENTE NATURAL</b>	<b>REFERENCIA</b>
<p><b>AGENTE EDULCORANTE:</b></p> <p>Steviósido (1)</p>	<p>Stevia (18 ssp)</p>	<p>(Soejarto, 1982)</p>

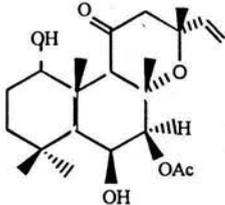
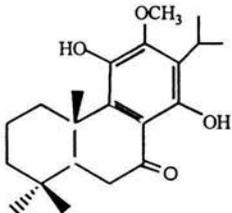
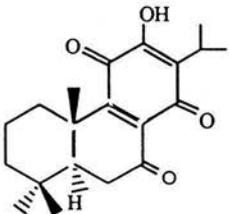
**DITERPENOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

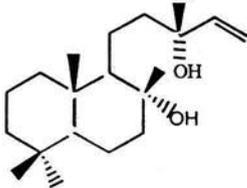
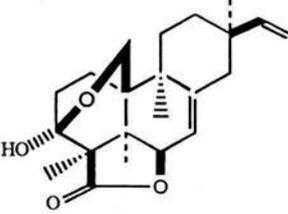
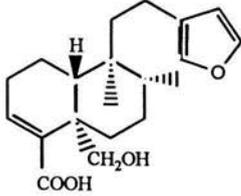
ACTIVIDAD/COMPUESTO	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
<p><b>ANTIBACTERIANOS:</b></p>  <p>Acido kaurenoico (2)</p>	<p><i>Wedelia scabema</i></p>	<p>(Mathur, 1975)</p>
 <p>Tipo labdano (3)</p>	<p><i>Cistus icanus</i></p>	<p>(Chinou, 1994)</p>
 <p>Tipo lactona (4)</p>	<p><i>Salvia</i> (7 spp)</p>	<p>(González, 1989)</p>
 <p>R=O LLS-491β (5) R=β-OH, α-H LLS491γ (6)</p>	<p><i>Aspergillus chavaliery</i></p>	<p>(Ellestead, 1972)</p>

ACTIVIDAD/COMPUESTO	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
<p><b>ANTIBACTERIANOS</b></p>  <p>Przewaquinona A (7)</p>	<p><i>Salvia przewalskii</i></p>	<p>(Hanson, 1984)</p>
 <p>Sonderaniol (8)</p>	<p><i>Croton sonderianus</i></p>	<p>(Hanson, 1984)</p>
 <p>Isodón (9)</p>	<p><i>Isodon japonicus</i></p>	<p>(Kubo, 1978)</p>
 <p>7-18-Dihidroxi-sandaropimaradieno (10)</p>	<p><i>Iboza riparia</i></p>	<p>(Hanson, 1984)</p>

ACTIVIDAD/COMPUESTO	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
<p><b>ANTIBACTERIANOS:</b></p>  <p>Diterpeno tipo ent-rosa-5-15-dieno (11)</p>  <p>1-Acetiljativatriol (12)</p>	<p><i>Echinolea inflexa</i></p> <p><i>Sideritis pusilla</i></p>	<p>(Nicoletti, 1988)</p> <p>(Díaz, 1988)</p>
<p><b>COHESIVOS Y ANTIMICROBIANOS</b></p>  <p>Ferruginol (13)</p>  <p>Acido abiético (14)</p>	<p><i>Podocarpus ferrugineus</i> <i>Cryptomeria japonica</i></p> <p><i>Juniperus phoeniceae</i></p>	<p>(Connolly, 1991)</p> <p>(Connolly, 1991)</p>

ACTIVIDAD/COMPUESTO	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
<p><b>ANTITUMORALES:</b></p>  <p> <math>R_1 = \text{H}</math>, Oridonina (15)  <math>R_1 = \text{Ac}</math>, Lasiokaurina (16) </p>	<p><i>Isodon japonicus</i></p>	<p>(Fujita, 1976)</p>
 <p> <math>R = \text{H}</math> Triptólida (17)  <math>R = \text{OH}</math> Triptiólida (18) </p>	<p><i>Trypterigium wilfordii</i></p>	<p>(Morris, 1972)</p>
 <p> <math>R = \text{O}</math> Taxodiona (19)  <math>R = \text{OH}</math> Taxodona (20) </p>	<p><i>Taxodium distichum</i></p>	<p>(Morris, 1969)</p>

ACTIVIDAD/COMPUESTO	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
<p><b>CARDIOTÓNICOS</b></p>  <p>Diterpeno C (21)</p>	<p><i>Coleus forskohlii</i></p>	<p>(Newmman, 1972)</p>
 <p>Inuroyleanol (22)</p>	<p><i>Inula royleana</i></p>	<p>(Bhat, 1975)</p>
 <p>7-Cetoroleanona (23)</p>	<p><i>Inula royleana</i></p>	<p>(Bhat, 1975)</p>

ACTIVIDAD/COMPUESTO	FUENTE NATURAL	REFERENCIA
<p><b>FUNGICIDA</b></p>  <p>Sclareol (24)</p>	<p><i>Nicotiana glutinosa</i></p>	<p>(Bailey, 1974)</p>
<p><b>INHIBIDOR DE CRECIMIENTO DE PLANTAS:</b></p>  <p>Momilactona B (25)</p>	<p><i>Oryza sativa</i></p>	<p>(Kato, 1973)</p>
<p><b>PISCICIDA:</b></p>  <p>Acido hautriwaico (26)</p>	<p><i>Emerocarpus setigerus</i></p>	<p>(Hanson, 1984)</p>

## **2.2 LAS PINACEAS**

Las coníferas cubren aproximadamente el 8% de la superficie de la tierra y su importancia ecológica y económica están bien reconocidas. Sus maderas se utilizan para la elaboración de papel y en la industria de la construcción. Mientras que sus resinas son usadas como agentes de protección contra la degradación biológica y sus compuestos volátiles son empleados en las industrias de la pintura, perfumería y farmacéutica (**San Feliciano, 1991**).

Las coníferas comprenden la familia de las Pináceas, a la que pertenece el género *Pinus* (**Tabla 1**), en el cual centramos nuestro mayor interés.

En México las coníferas ocupan 15% del territorio y de ellas más del 90% corresponden a los *Pinus*, los que forman el pilar más fuerte de la industria forestal del país. Aproximadamente, un 60% de las especies de pinos mexicanos tienen importancia comercial y el 80% del total de productos forestales del país son obtenidos de los pinos. Los pinares en México, como en otras partes del mundo, tienen un hábitat serrano, poblando montañas y pendientes en barrancos (**Eguiluz, 1982**).

Esta topografía accidentada, junto con la posición geográfica del país, han ofrecido una inmensidad de nichos con microclimas específicos para el desarrollo de híbridos y mutantes, que recombinados naturalmente han incrementado la diversificación de muchas especies. México es el país con más especies de pinos reportados y reconocidos. Se conocen 77 taxa y probablemente existan otras especies en lugares poco accesibles del país (**Eguiluz, 1985**).

**TABLA 1 Clasificación taxonomica de las coníferas**

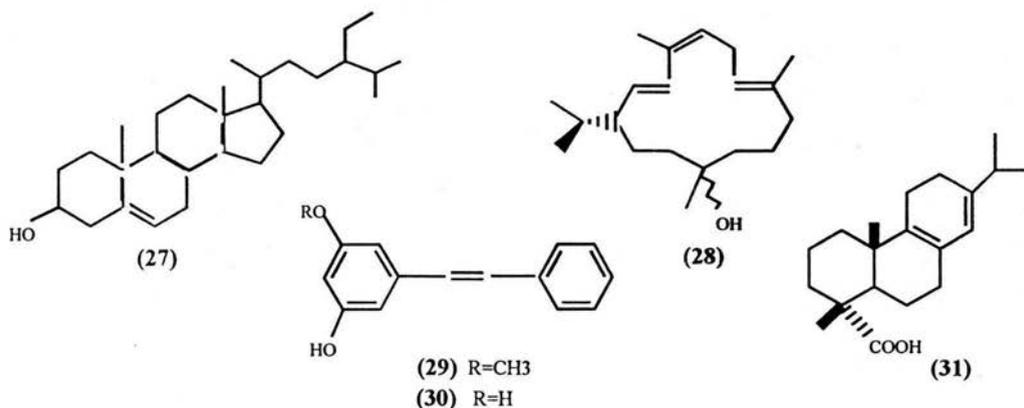
ORDEN	FAMILIA	GENERO	No. SP	
Coniferales	Araucariaceae	Agathis	13	
		Araucaria	18	
	Cupressaceae	Actinostrobus	3	
		Austrocedrus	1	
		Callitris	14	
		Calocedrus	3	
		Chamaecyparis	3	
		Cupressocyparis	3	
		Cupressus	25	
		Diselma	1	
		Fitzroya	1	
		Fokdenia	1	
		Juniperus	60	
		Libocedrus	5	
		Microbita	1	
		Neocallitropsis	1	
		Papuacedrus	2	
		Pilgerodendron	1	
		Platycladus	1	
		Tetraclinis	1	
		Thuja	5	
		Thujopsis	1	
	Widdringtonia	3		
	Pinaceae	Abies	55	
		Cathaya	1	
		Cedrus	4	
		Keteleeria	10	
		Larix	15	
		Picea	37	
		Pinus	120	
		Pseudolarix	1	
		Pseudotsuga	8	
		Tsuga	10	
		Podocarpaceae	Acropyle	2
			Dacrycarpus	9
			Dacrydium	25
	Decussocarpus		12	
	Falcatifolium		5	
	Halocarpus		3	
	Lagarostrobos		2	
	Lepidothamnus		3	
	Microcachrys		1	
	Microstrobos		2	
	Parasitaxus		1	
	Phyllocladus		5	
	Podocarpus		94	
	Prumnopitys		10	
Saxegothaea	1			
Taxodiaceae	Athrotaxis	3		
	Cryptomeria	2		
	Cunninghamia	2		
	Glyptostrobus	1		
	Taxodium	3		
	Metasequoia	1		
	Sciadopitys	1		
	Sequoia	1		
Sequoiadendron	1			
Taiwania	2			

## 2.2.2 Actividad biológica de las pináceas

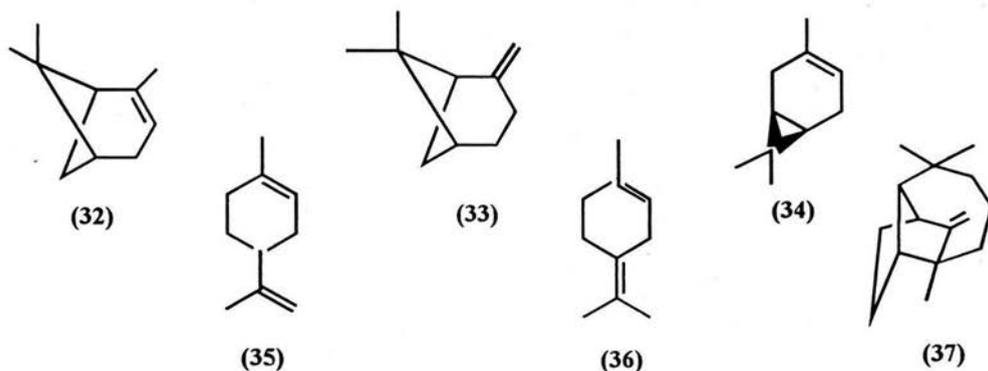
La familia de las pináceas tiene una amplia variedad de actividades biológicas asociadas con sus metabolitos secundarios (San Feliciano, 1991). A continuación algunos ejemplos :

Se conoce que la larva de la mosca sierra (*Neodiprion sertifer*), la cual se alimenta de hojas y ramas de coníferas como *Pinus sylvestris*, se protege de sus enemigos emitiendo por la boca un fluido viscoso y con un fuerte olor a resina de pino, el cual aleja a sus depredadores. El análisis químico del fluido de la larva y de las ramas de *Pinus sylvestris* dió como resultado la identificación de los mismos compuestos en el fluido, en las ramas y en las hojas de *Pinus sylvestri*, por lo tanto, en este caso el pino provee a la larva de una defensa química contra sus depredadores (Eisner, 1974).

Los pinos sufren del ataque de algunos parásitos, entre los más importantes se encuentra el hongo *Fomes annosus*. Sin embargo, se ha encontrado que algunos pinos tienen resistencia contra estos hongos. Ciertos estudios demostraron que se debe en parte a la presencia de compuestos inhibidores en la resina. *Pinus densiflora* es uno de los pinos que presentó mayor resistencia, por lo que se analizó su resina, de la cual se aislaron e identificaron algunos compuestos entre los que se encontraron  $\beta$ -sitosterol (27), cembrol (28), pinosilvina (29), éter monometílico de pinosilvina (30), ácido palústrico (31) y algunos ácidos diterpénicos del tipo abietano. Con estos compuestos se hicieron ensayos de inhibición de crecimiento en *Fomes annosus*, encontrando que la pinosilvina y su éter monometílico fueron los compuestos más activos, ya que la inhibición fue del 100% a una concentración de 0.04 a 0.001%. También se reporta al ácido palústrico y los ácidos diterpénicos del tipo abietano como inhibidores, aunque no tan eficaces. Estudios adicionales demostraron la presencia de pinosilvina en otras especies de pinos como *Pinus sylvestris*, *Pinus mugo*, y *Pinus banksiana*, comprobándose que la pinosilvina se produce como una respuesta a la invasión fúngica y que además es un compuesto derivado de procesos metabólicos de la resina (Dumas, 1983).

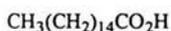


**Himejima (1992)** reporta que la resina de *Pinus ponderosa* tiene actividad contra bacterias gram-positivas (*Bacillus subtilis* y *Brevibacterium ammoniagenes*), pero no contra bacterias gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), contra hongos como *Candida utilis*, pero no contra *Saccharomyces cerevisiae*. Para dilucidar qué compuestos de la resina están actuando, se aislaron por destilación con arrastre de vapor compuestos monoterpénicos:  $\alpha$ -pineno (32),  $\beta$ -pineno (33), 3-careno (34), limoneno (35) y terpinoleno (36) y el sesquiterpeno longifoleno (37). Estos fueron probados en los microorganismos antes mencionados y se encontró que el longifoleno mostró actividad contra bacterias gram-positivas, mientras que los monoterpenos fueron activos contra hongos.



En otro estudio se probó la actividad de ácidos diterpénicos resínicos, encontrándose que la ingestión del extracto hexánico de las hojas de *Pinus ponderosa*, compuesto por ocho ácidos diterpénicos, causó la reabsorción de embriones en ratones durante la etapa temprana de gestación (Kurbik en Himejima 1992).

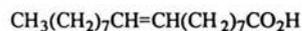
También Gardener (1994) cita que cuando el ganado en estado avanzado de preñez consumía las hojas de *Pinus ponderosa*, ocurría un gran número de abortos ; por lo que se decidió investigar la causa llevando a cabo pruebas con la fracción ácida de las hojas de este pino. Los componentes mayoritarios identificados en esta fracción ácida fueron 4 ácidos grasos de cadena lineal (palmitico (38), linoleico (39), oleico (40) y esteárico (41)), cuatro ácidos diterpénicos tricíclicos (isopimárico (42) dehidroabiético (43) abiético (14) y neoabiético (44)), y dos ácidos diterpénicos del tipo labdano (imbricataloico (45) e isocuprésico (46)). Se encontró que los ácidos abietánicos no inducían aborto por si mismos, sin embargo, a dosis altas fueron tóxicos, causando depresión, falta de apetito y muerte. Se identificó al ácido isocuprésico como el que presentaba mayor actividad abortiva en *Pinus ponderosa*.



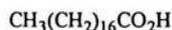
(38)



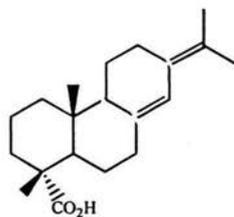
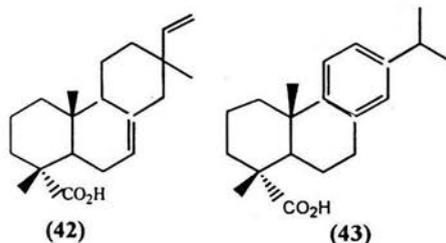
(39)



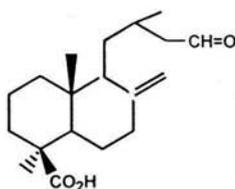
(40)



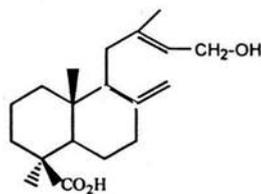
(41)



(44)

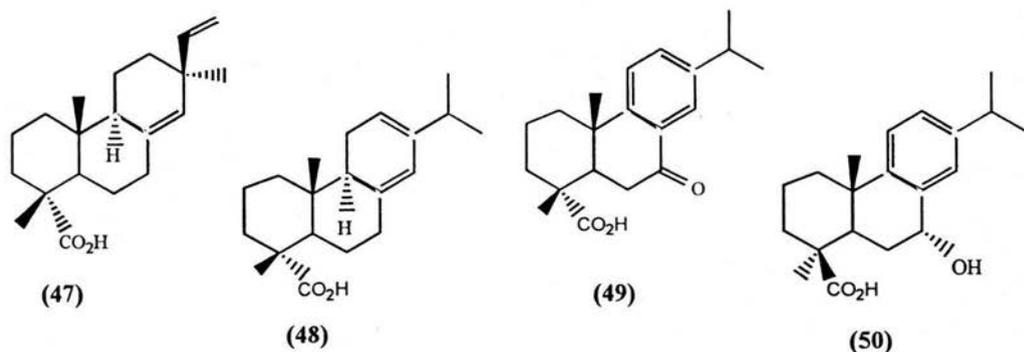


(45)

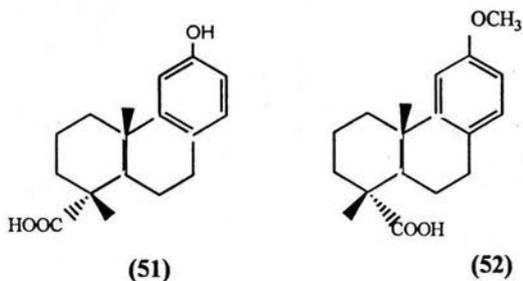


(46)

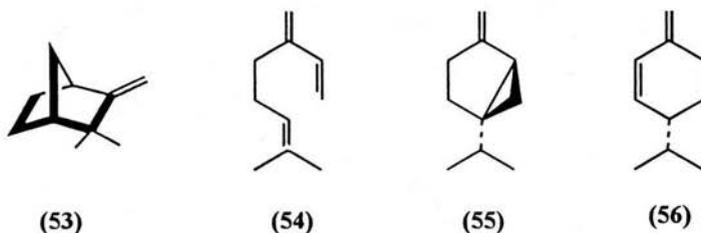
En busca de compuestos nuevos que actuaran como inhibidores de agregación de plaquetas se estudió la resina de *Pinus massoniana*. De la fracción ácida de la resina de este pino se aislaron los ácidos: pimárico (47), levopimárico (48), palústrico (31), neoabiético (44), abiético (14), dehidroabiético (43), 7-oxodehidroabiético (49), y 7 $\alpha$ -hidroxidehidroabiético (50), los cuales fueron probados en ensayos de inhibición de agregación de plaquetas de conejos, en donde el ácido levopimárico (48) mostró ser el más activo a una concentración 0.08 mmol/l con un porcentaje de inhibición del 90%, seguido de los ácidos pimárico (47) y palústrico (31) exhibieron un 59% y 42% de inhibición respectivamente (Cheung, 1994).



Söderberg (1996) hizo un estudio de efectos de citotoxicidad en epitelio humano y fibroblastos con la resina de *Pinus merkussi* y tres compuestos ácidos aislados de ésta: dehidroabiético (43), podocárpico (51) y O-metilpodocárpico (52); con los que se hicieron ensayos antibacteriales con *Staphylococcus aureus*; encontrándose que el ácido dehidroabiético y la resina fueron los compuestos más tóxicos y efectivos contra *Staphylococcus aureus*, seguido de los ácidos O-metilpodocárpico y podocárpico que tuvieron una ligera toxicidad. Se sugiere que la actividad está mediada por la acción que se ejerce en la membrana celular, además la diferencia de la toxicidad de los compuestos se debe a la alteración estructural en los anillos aromáticos de la molécula.



*Rhyacionia frustrana*, es un parásito común de *Pinus taeda* que come la parte interna del tallo, dañando el tejido vascular y matando el meristemo apical, su sobrevivencia depende de una apropiada selección de ovoposición. Las hembras ovopositan exclusivamente en *Pinus taeda*, éste crece junto a *Pinus elliottii* en el que no ovopositan. Se cree que el mecanismo por el cual la hembra distingue la resistencia del hospedero es quizá una respuesta mecánica, química o un estímulo visual. Debido a lo anterior se hizo un estudio en cuanto a las diferencias de los compuestos de los dos pinos, se encontró que ambos contenían  $\alpha$ -pineno (32), camfeno (53),  $\beta$ -pineno (33), mirceno (54), sabineno (55),  $\beta$ -fellandreno (56), y limoneno (35), pero en diferentes proporciones. En *Pinus elliotti* se encontró  $\beta$ -pineno en un 35.6%, mirceno en 3.4%, y lípidos cuticulares en 6% mientras que en *Pinus taeda* fue de 15.3%, 10.9% y 11% respectivamente (Ross, 1995).



### 2.2.3 Características de *Pinus oocarpa*

Entre las especies más importantes de las pináceas en México está el *Pinus oocarpa*. Desde el punto de vista ecológico, genético y económico, es muy importante por su amplia distribución, su plasticidad adaptativa y como protector de suelos, evitando la erosión y el proceso de sabanización que a menudo se presenta al destruir estos bosques. Generalmente se le usa como fuente de resina, sin embargo, existen zonas de Chiapas y Jalisco ubicadas sobre los 1200m s.n.m. donde se encuentran poblaciones con muy buenos rendimientos maderables, susceptibles de un potencial aprovechamiento (Sánchez, 1986).

#### Taxonomía

<b>Familia :</b>	Pináceas
<b>Subfamilia :</b>	Abietíneas
<b>Género :</b>	<i>Pinus</i>
<b>Especie :</b>	<i>oocarpa</i>

<b>Nombres comunes de la especie :</b>	Ocote, pino resinoso (Oax.), ixtaji, ichtaj, tzin (Chis.), ocote chino, pino chino, ocote macho, pino amarillo (Jal.), pino colorado, pino prieto (Sin.)
--	--

La altura media de estos árboles va de 15 a 30 m de alto, ocasionalmente 35 m, y 50-70 cm de diámetro; copa redondeada y frecuentemente compacta, ramas fuertes y extendidas; corteza agrietada, oscura o grisácea, en placas delgadas, largas y casi rectangulares, de color amarillento interiormente. Ramillas morenas y moreno rojizo, ásperas y escamosas; la base de las brácteas son decurrentes.

Hojas en fascículos de 5, ocasionalmente de 3 y 4, de 20-25 cm de longitud, de color verde claro brillante, tiesas y ásperas, ocasionalmente delgadas y flexibles; los márgenes finamente aserrados, estomas presentes en la superficie dorsal y ventral, canales resinosos 4-8, por lo general septales, vainas persistentes, y oscuras de 10-30 mm y escamas acuminadas. Los conos en esta especie son muy variables en forma y tamaño, van de globosos a ovoide cónicos, varían en tamaño de 6-10 cm de longitud, van del color amarillento pálido al ocre pulido (**fig.1**). Las escamas son gruesas, moreno oscuras, aplastadas, destacándose claramente las huellas de las alas, algo ensanchado en su parte media. Las semillas son pequeñas, café oscuro, semillas aladas 10-12 mm de longitud, los cotiledones son 5-7 (**Perry, 1991**).

Madera suave y algo ligera, textura uniforme y de color claro con tinte amarillento. Produce gran cantidad de resina, sobre todo en época de secas, de la cual, por calentamiento, se puede destilar un producto volátil o aguarrás usado como disolvente de pinturas (**Zamora, 1981**).

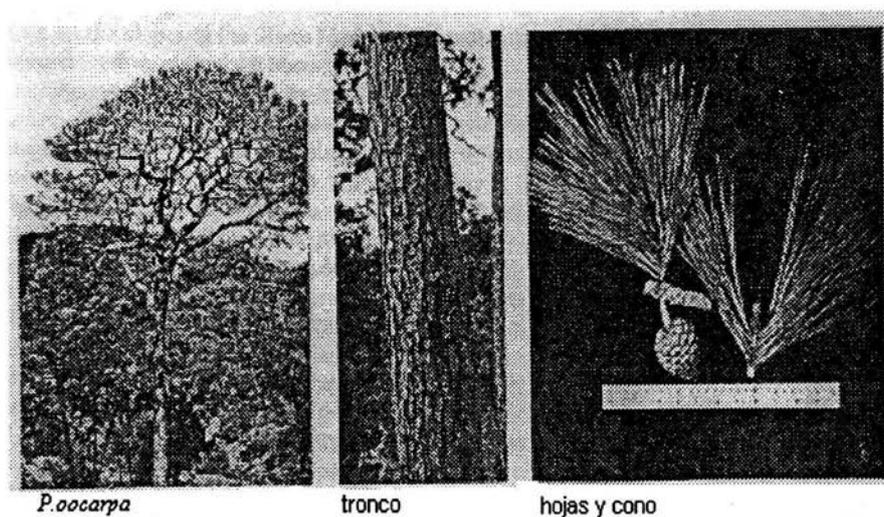


FIG 1

Se extiende desde los 300 hasta 3000m s.n.m., habitando en Son., Chih., Sin., Dur., Nay., Jal., Mich., Gro., Oax., Chis., Edo de Mex., Mor., Pueb. (**Fig. 2**), extendiéndose hasta las regiones del sur entre las montañas de México, también se encuentran en Guatemala, El Salvador, Honduras y Noreste de Nicaragua. Su rango de distribución comprende desde 12°48' -27°00' latitud Norte y 85°51'-109°08' de longitud oeste. En México se ubica entre los 15°00' - 27°00' latitud Norte y 92°00'-108°51' longitud oeste. Los climas en que habita fluctúan entre templados, templados fríos, semicálidos y cálidos; poblando preferentemente regiones subtropicales e incluso tropicales con precipitaciones anuales que varían de 650- 2600 mm y temperatura mínima media anual de 3°C, temperatura máxima media anual 35°C (**Eguiluz, 1982**).

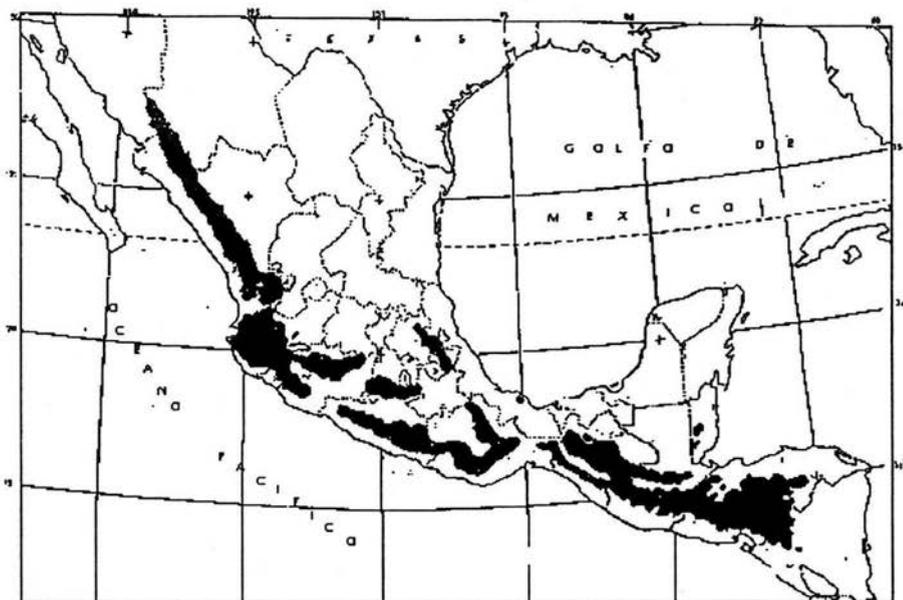


FIG. 2 Distribución de *Pinus oocarpa*

En el **cuadro 2** se indican algunos compuestos terpénicos encontrados en muestras de resinas colectadas en México y Guatemala, así como el porcentaje de árboles con altas concentraciones de tales compuestos (**Eguiluz, 1982**).

**Cuadro 2.** Componentes químicos de la resina del tronco de *P. oocarpa*

	<i>P.oocarpa</i> México	<i>P. oocarpa</i> Guatemala
TERPENOS	%	%
$\alpha$ -Pino	17.9	nd
Camfeno	r	---
$\beta$ -Pino	r	9.5
$\Delta^3$ - Careno	nd	4.7
Sabineno	---	---
Para-cimeno	24.8	1
$\beta$ -Felandreno	8	19.5
(+)-Limoneno	29.3	27.8
Terpinoleno	r	---
Linalol	1.8	---
$\alpha$ -Fenchol	nd	2
$\alpha$ -Terpineol	---	---
Terpineno 4-ol	---	7
Metil-cavicol	1.9	3.9
Trans-cariofileno	23.1	nd
$\gamma$ -Muroleno	r	nd
$\alpha$ -Muroleno	1.2	nd
$\delta$ -Cadineno	---	nd
$\gamma$ -Cadineno	2.3	nd
Cadineno	r	nd
Desconocidos	10	nd

r = residuos (todas las cantidades menores del 1%)

--- = compuesto ausente.

nd = no se determinó

En las comunidades de algunos estados de la República Mexicana esta especie de pino es usada para tratar diversos malestares; en el **cuadro 3** se muestran algunos de sus usos terapéuticos, así como la manera de prepararlo (Aguilar, 1994).

**CUADRO 3**

**USOS TERAPÉUTICOS MAS COMUNES DE *Pinus oocarpa schiede* EN ALGUNOS ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA**

NOMBRE POPULAR	LOCALIDAD	USOS	PARTE UTILIZADA	PREPARACIÓN	VÍA DE ADMÓN.
Juncia	Tenejapa, Chis.	Inflamación	Hojas	Infusión	Local
Ocote, tsiin	San Juan Guichicouli, Oax.	Ansia/granos	Resina	Infusión	Local
Ocote	Ahuatla, Quimixtlán, Pue.	Ronquera	Tallo	Infusión	Oral
Planta de ocote	San Pedro Chenalho, Chis.	Disentería	Hojas	Infusión	Oral

## 2.3 ENFERMEDAD DE CHAGAS

En 1909 Carlos Chagas realizando estudios sobre el paludismo descubrió un protozooario (*Trypanosoma cruzi*) en el intestino de un hemíptero del género *Triatoma* (chinche hocicona).

Posteriormente encontró el mismo tripanosoma en la sangre de un niño que tenía fiebre, anemia y linfadenopatía y demostró que este parásito era la causa de una enfermedad endémica en ciertas zonas de Brasil.

La tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es el único caso que se conoce en la medicina donde el insecto transmisor y el parásito se descubrieron antes de ser diferenciada la enfermedad como entidad nosológica. La enfermedad fue llamada así en honor a su descubridor.

Desde su descubrimiento a la fecha se ha encontrado el parásito prácticamente en todos los países del Continente Americano (Carrol 1979).

### 2.3.1 *Trypanosoma cruzi*

Agente etiológico (fig. 3) de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis Americana (Tay, 1991).

Reino : Animalia  
Subreino : Protozoa  
Phyllum: Sarcomastigophora  
Subphyllum: Mastigophora  
Clase: Zoomastigophora  
Familia: Trypanosomatidae  
Genero: *Trypanosoma*  
Especie: *cruzi*

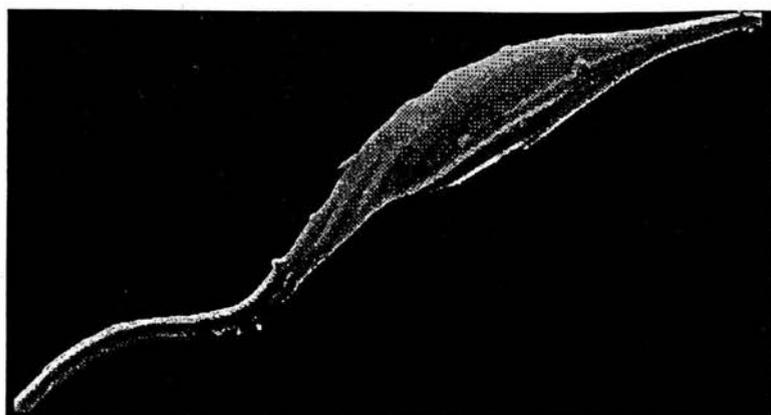


Fig. 3 *Trypanosoma cruzi*

### 2.3.2. Distribución geográfica:

Se encuentra ampliamente distribuido por todo el continente, ocupando desde el paralelo 43° al norte (E.U.A.) hacia el paralelo 49° latitud sur (Argentina), fig. 4 (Pinto, 1992).

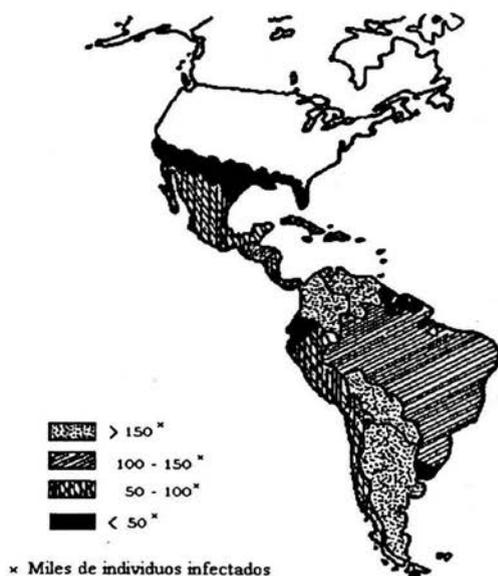


Fig. 4 Distribución geográfica y epidemiología de *Trypanosoma cruzi*

### 2.3.3 Epidemiología

Se estima que en el continente americano hay unos 18 millones de personas infectadas por *T. cruzi* causando alrededor de 45 000 muertes al año (Mc. Carthy 1996). Se calcula que cerca de 300 000 individuos infectados viven en Sao Paulo, Brasil, debido a las inmigraciones de lugares aledaños a la ciudad, así también en E.U.A se calcula que cerca de 50 000 individuos están infectados (fig. 4) y muchos de ellos son provenientes de México y América Central (Pinto, 1992).

En la República Mexicana (Fig. 5) se considera como área endémica probable todo el territorio que se encuentra entre los 0 m y los 200 m sobre el nivel del mar, es decir las 2/3 partes del territorio nacional (Kenneth, 1984). En 1990 se comprobaron alrededor de 300 casos agudos de la enfermedad y más de 2500 con diagnóstico serológico en los Estados de Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Edo. de Mex., Sonora, Nayarit y Tabasco (Velasco, 1992).



Fig. 5 Ubicación de casos humanos de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana

*Trypanosoma cruzi* se desarrolla exitosamente en un gran número de insectos, pero se considera que los insectos reduvios son el único vector de importancia, ya que estas especies invaden casas y habitualmente defecan durante el proceso de alimentación, depositando junto con la materia fecal a los tripomastigotes metacíclicos, los cuales pueden penetrar la piel por el hoyo de la picadura, en el momento del rascado al romper la piel, al frotarse los ojos con los dedos contaminados con materias fecales del triatómino infectado, por la mucosa oral o nasal, al ingerir triatóminos infectados (algunas personas se comen los triatomas por considerar que tienen efectos afrodisiacos).

El género *Triatoma* es el más importante para México, ya que está ampliamente distribuido en todo el territorio nacional con 26 sp y subespecies de las que muchas tienen hábitos domiciliarios. Se le conoce con multitud de nombres: Chinche hocicona, pick, chinche de compostela, chinche americana, chinche besucona, chinche voladora, etc. Miden de 1.5 a 3.5 cm. Tienen hábitos nocturnos, aunque algunas especies pican a plena luz del día (**Fig 6**).



**Fig. 6** Insecto reduvionid, particularmente del género *Triatoma* transmisor de *Trypanosoma. cruzi*

También se ha comprobado que un método potencial de transmisión es la transfusión sanguínea, ya que los tripomastigotes procíclicos pueden sobrevivir al menos 2 semanas, algunos autores sugieren que hasta 3 meses, en sangre refrigerada.

Así también la transmisión de estos protozoarios puede ser por manipulación de animales infectados en laboratorios de investigación, transmisión congénita (siendo su frecuencia mucho menor, ya que las mujeres chagásicas mueren por la infección), por leche materna, saliva, esperma, al desollar animales infectados, por transplantes de órganos y tejidos, por la ingestión de vísceras semicrudas de animales infectados y migración, entre otros (Markell, 1986).

### 2.3.4 Morfología y ciclo biológico

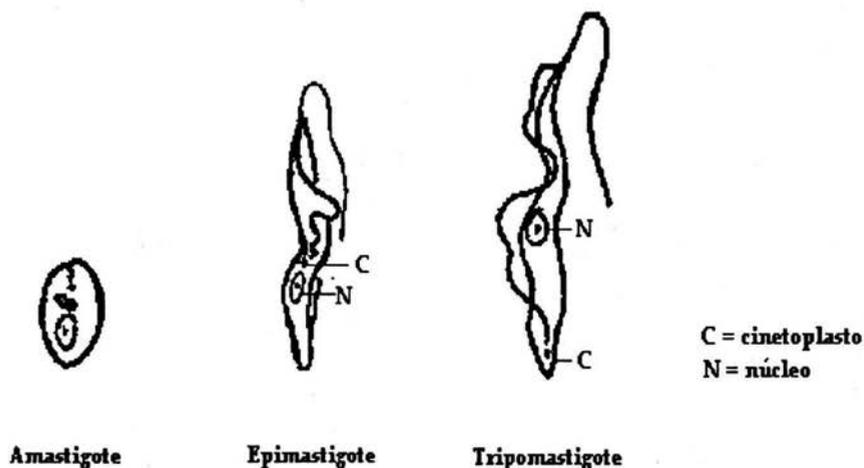
*Trypanosoma cruzi* es un organismo pleomórfico ya que desarrolla diferentes formas en su ciclo de vida, tanto en el hombre o huésped reservorio, como en los insectos transmisores. Se presenta en la naturaleza en tres estadios, ver Fig. 7 (Carrol, 1979):

**Tripomastigote**, flagelado de cuerpo alargado de 20-25 $\mu$ m de longitud, fusiforme y generalmente se le observa incurvado en forma de "C o S", presenta un núcleo vesiculoso, cinetoplasto subterminal posterior al núcleo, el cual está formado principalmente por ADN. Del cinetoplasto surge la membrana ondulante que recorre al parásito a todo lo largo de su cuerpo saliendo libre en la porción anterior (flagelo) para moverse activamente como chicote. Se localiza en la sangre de los mamíferos como tripomastigote procíclico y en el intestino posterior de los triatomínicos infectados como tripomastigote metacíclico (formas infectivas, no proliferativas).

**Epimastigote**, fusiforme de 20 a 25  $\mu\text{m}$  donde el cinetoplasto se encuentra anterior al núcleo, el flagelo forma una pequeña membrana, este estadio se multiplica en el intestino de los triatomíneos por fisión binaria y se diferencia para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos. El epimastigote es una forma no infectiva, proliferativa y se encuentra predominantemente, 99% en fase logarímicamente, en los cultivos axénicos.

**Amastigote**, redondeados (leishmanoide), mide de 2-7  $\mu\text{m}$ , sin flagelo libre aparente, presenta un gran núcleo y cinetoplasto en forma de bastoncillo. Se divide también por fisión binaria. Es infectivo, se localiza en los tejidos (miocardio, esófago, colon, neuroglia) del hospedero vertebrado en donde se diferencia a tripomastigote procíclico.

Cabe hacer notar que se ha reportado también formas intermedias.

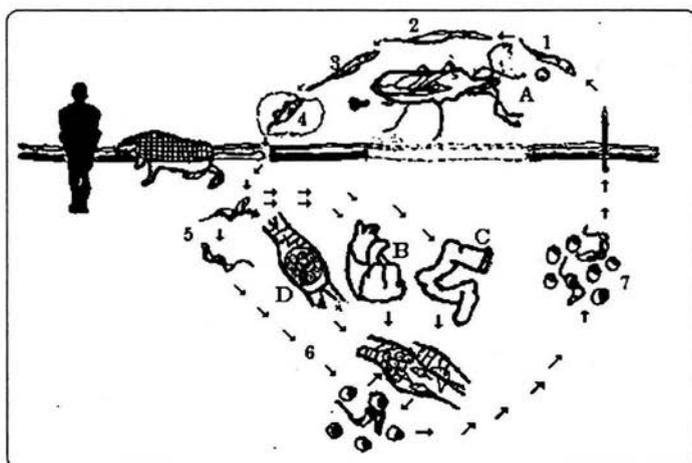


**Fig. 7** Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico se realiza en dos tipos de hospederos, vertebrados e invertebrados :

	Hombre
	Primates
Vertebrados	Carnívoros
	Lagomorfos
	Marsupiales
	Desdentados
Invertebrados	Aproximadamente 109-115 especies perteneciente a 14-15 géneros Redúvios de la familia Triatomínidae

Los triatominos nacen libres de infección y pueden adquirirla en cualquiera de sus estadios mediante la ingesta de tripomastigotes procíclicos durante su alimentación. La infección aparece entre 15 y 60 días después de la hematofagia y se prolonga durante varios meses o bien el resto de su vida. En la **fig. 8** se muestra el ciclo de vida donde el triatomino infectado con *T. cruzi* excreta al parásito (tripomastigote metacíclico 4) en materia fecal (A) y orina durante ó minutos después de la hematofagia.



**Fig. 8** Ciclo de vida de *T. cruzi* en el hospedero vertebrado y en el insecto triatomino

El tripomastigote metacíclico penetra a su hospedero vertebrado a través de la mucosa o piel rota, invadiendo las células locales del sistema fagocítico mononuclear , a varios tejidos como muscular, cardíaco (B), intestino (C) o músculo esquelético (D) y se transforma en amastigote. Este se reproduce dentro de la célula, invadiéndola, la cual al no soportar más parásitos se revienta, saliendo al exterior, transformándose rápidamente en tripomastigote sanguíneo (o procíclico 6 y 7), diseminándose vía hematológica por todo el organismo, se vuelve a transformar en amastigote, se multiplican profusamente, rompen las células y se repite este mecanismo durante la vida del huésped. Además, puede ser picado por otro triatomino, en el insecto el parásito se transforma a epimastigote (1-3) el cual se divide en el intestino y finalmente algunos epimastigotes pasan a la parte posterior del intestino, donde ellos se transforman en tripomastigotes metacíclicos los cuales pasan a las heces fecales cuando el insecto vuelve a alimentarse, repitiéndose este proceso, ya que se trata de un proceso infeccioso que no es autolimitante (Tay 1991).

### 2.3.5 Patogenia y sintomatología

El parásito afecta al huésped de diferentes maneras, entre las más importantes tenemos la destrucción de las células del sistema reticuloendotelial y de otros tejidos, por el crecimiento y multiplicación del flagelado. Köberle (en Bocca, 1981) señala la producción de una tripanotoxina en la miocarditis chagásica, así como la producción de "mega órganos" (megacardio, megaesófago y megacolon principalmente): Los parásitos invaden gran cantidad de tejidos y órganos como corazón, cerebro, hígado, bazo, ganglios linfáticos, músculos, etc., (Fig. 10 y 11) produciendo lesiones y cuadros clínicos diversos (Tay 1991).

La sintomatología de la infección por *T. cruzi* es tan variada como las lesiones que produce el agente etiológico. La duración mínima del período de incubación en el hombre fluctúa entre 7 y 14 días, aunque algunos autores consideran que es de 12 a 30 días (Chester 1984).

Por lo general la enfermedad se divide en 3 fases : aguda, indeterminada y crónica.

**Fase aguda :** Padecida generalmente por los niños. Dura de 20 a 30 días, se caracteriza por fiebre elevada, seguida a las dos semanas por un depósito de material mucoso en los tejidos que causa tumefacción a veces por todo el cuerpo. La cara se hincha, presentándose edema palpebral intenso (signo de Romaña-Mazza) en uno o en ambos ojos (Fig. 9).

Las glándulas tiroideas, preauricular, paratiroides y submaxilar, los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado se encuentran aumentados de tamaño. La fiebre es intermitente, remitente o continua. La queratitis es común.

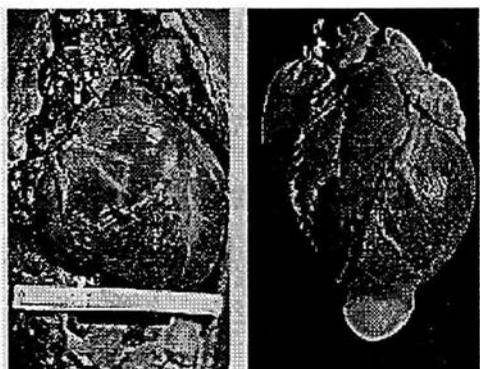
El cuadro es de tipo tifoideo con fiebre, esplenomegalia y hepatomegalia, pero sin edema. Generalmente va acompañado de nerviosismo, alteraciones del psiquismo y en ocasiones presenta signos de encefalomiелitis o de meningoencefalitis. La muerte sobreviene en un lapso de dos a cuatro semanas o la enfermedad pasa a la fase crónica.

**Fase indeterminada** La mayoría de los casos agudos de la Enfermedad de Chagas se transforman en un periodo de entre 2 a 3 meses a un estado sub-agudo y de éste, a un estado crónico asintomático, comúnmente llamado fase indeterminada. Alrededor del 40% de los casos serológicamente positivos se clasifican bajo este grupo cuando sólo se llevan a cabo exámenes de rutina.

**Fase crónica.** Se observa en niños, pero es más frecuente en adultos. Los síntomas de esta fase están relacionados con el daño sufrido en la fase aguda, por lo que depende de la localización principal de los parásitos intracelulares durante este tiempo. Se han descrito los de tipo cardíaco, meningoencefálico, mixedematoso, pseudomixedematoso y supracraneal de la enfermedad. Megaesofago y megacolon, las manifestaciones en esta fase son debidas al peristaltismo desordenado como resultado de la destrucción de los ganglios autónomos que están dentro de las paredes viscerales. Los pacientes pueden vivir muchos años asintomáticos o bien se hacen aparentes la disnea, palpitaciones, dolor precordial e insuficiencia cardíaca o presentarse muerte súbita (Tay 1991).



**Fig. 9** Signo de Romaña



**Fig. 10** Megacardio



**Fig 11** Megacolon



BIBLIOTECA  
INSTITUTO DE ECOLOGIA  
UNAM

### 2.3.6 Diagnóstico

Para efectuar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas puede hacerse mediante la combinación de datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio.

La más fuerte evidencia clínica y epidemiológica que debe tomarse en cuenta es la procedencia del enfermo, se le interroga de posibles estancias en zonas endémicas, ya que los signos y síntomas (Romaña-Chagoma de inoculación, adenopatías, fiebre, etc.) muchas veces pasan inadvertidas y las manifestaciones clínicas en la etapa crónica, en ocasiones tardan 10 años o más en aparecer (**Kenneth 1984**)

El diagnóstico de laboratorio para determinar la presencia del parásito se efectúa mediante exámenes parasitológicos directos o indirectos. Los tripomastigotes se encontrarán en sangre circulante, particularmente durante la etapa aguda de la infección, momento en el que se pueden detectar mediante los siguientes métodos (**Tay 1991**) :

**Examen directo sangre** : Este examen se efectúa con muestra de sangre.

**Hemocultivo** : Se emplean medios de cultivo especiales como el Novy, Nicolle y Mc-Neal (NNN).

**inoculación de animales de laboratorio** : Generalmente se usa el ratón blanco de laboratorio (*Mus musculus*).

**Xenodiagnostico** : Se emplean vectores Triatominos no infectados

**Examen inmunologico** : Las pruebas más utilizadas en este método son, fijación de complemento (FC), hemaglutinación (HA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y se emplean en la fase crónica del padecimiento.

### 2.3.7 Tratamiento

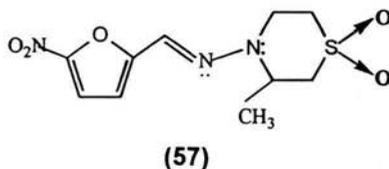
Se ha intentado usar numerosos fármacos para el **tratamiento** de la enfermedad de Chagas, pero sin resultados satisfactorios. Los derivados **del nitrofurano** han mostrado tener una alta actividad tripanocida, sin embargo también son **muy tóxicos** para el humano por lo que se hace evidente la búsqueda de nuevas estructuras químicas que puedan ser usadas para el tratamiento de la tripanosomiasis americana. Los dos fármacos que se han utilizado con mayor frecuencia son el Nifurtimox y el Benznidazol.

#### NIFURTIMOX (59)

**Sinónimos:** Bayer 2502, Lampit,

#### 3-Metil-4(5'nitrofurforilidenamino-tetrahidro(1-4)-thiazina1,1-dióxido

**Fórmula:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S



**Peso molecular:** 287.3 g

Este fármaco es un derivado del nitrofurano, es **empleado** en la fase aguda de la enfermedad de Chagas. Es un polvo de color amarillo, **relativamente** insoluble en agua. El fármaco es administrado por vía oral y tolerado más por **los niños** que por los adultos. Las dosis diarias recomendadas son: en adultos, 8-10 **mg/Kg/día** vía oral por 120 días; la dosis pediátrica es de 1-10 años de edad, de 15-20 **mg/Kg/día** y en niños de 11-16 años 12.5-15mg/Kg/día por 90 días, también por vía oral.

Existen dos argumentos acerca del modo de acción del Nifurtimox en *T.cruzi*. El primero explica las interacciones del sustituyente nitro en las reacciones biosintéticas, especialmente en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, principalmente ADN, este mecanismo es similar al propuesto para la acción bactericida de este tipo de fármacos que causan mutagénesis y carcinogénesis. El segundo argumento relaciona la producción de aniones superóxido, como resultado del metabolismo del fármaco, los cuales son acumulados a niveles tóxicos en *T. cruzi* debido a que el parásito no posee la enzima catalasa (**Denicola, 1993**).

El fármaco no es tolerado por los pacientes en fase crónica, cuando es suministrado por más tiempo que el recomendado (120 días). Los efectos colaterales están relacionados con trastornos en el sistema nervioso y en el tracto gastrointestinal, náuseas y vómitos son comunes, pérdida de peso, pérdida de la memoria y disturbios del sueño, mialgias, convulsiones, paratesias, polineuritis y pueden presentarse episodios psicóticos, por lo que pocos pacientes completan el período de tratamiento (**Kenneth 1984**).

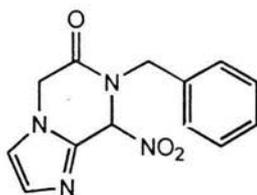
## **BENZNIDAZOL (60)**

**Sinónimos:** Ro7-1051, Radanil, Rochagan,

**N-benzil-2-nitro-1-imidazoleacetamida**

**Fórmula:**  $C_{12}H_{12}N_4O_3$

**Peso molecular:** 260.3 g



( 58 )

El Benznidazol es un derivado del 2-nitroimidazol, presenta actividad tripanocida efectiva únicamente del 30% al 70% usado durante la fase aguda, en cambio no muestra actividad cuando se usa en la fase crónica **(Rodríguez 1995)**.

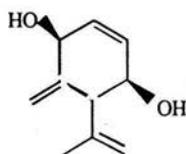
Es un polvo de color amarillo claro relativamente insoluble en agua, La dosis recomendada es: En adultos 5 mg/Kg./día durante 30-120 días por vía oral.

**Díaz (1988)** reporta que el Benznidazol actúa como vía de interferencia en la síntesis de macromoléculas (DNA, proteínas y lípidos). La diferencia entre este fármaco y el Nifurtimox es probablemente a consecuencia de la baja electronegatividad del nitroimidazol comparada con la del 5-nitrofurano.

En pruebas clínicas iniciales con el Benznidazol en dosis mayores a las recomendadas se observaron como efectos colaterales polineuropatía y progresiva dermatitis purpúrica, siendo estos síntomas menores que los causados por el Nifurtimox **(Figuroa, 1994)**.

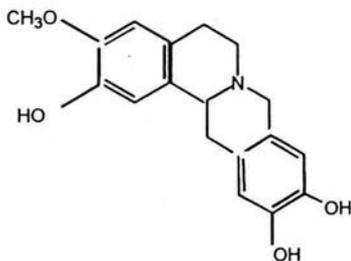
### 2.3.8 Productos naturales tripanocidas

De *Piqueria trinervia* se aisló un compuesto monoterpénico (Piquerol A **(59)**) que resultó ser una sustancia biológicamente activa. Estudios *in vitro* mostraron que producía baja toxicidad en mamíferos, inhibición del crecimiento en plantas y que provoca muerte en ácaros y moluscos, lo cual alentó a realizar bioensayos para probar la capacidad tripanocida del compuesto. Los resultados mostraron que a concentraciones mayores de los 100 µg/ml hubo una significativa actividad contra el protozooario (**Castro 1992**).



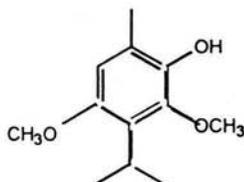
**(59)**

*Annona spinescens*, de la familia de las Magnoliales crece en las costas del este de Brasil. **Emerson (1996)** reporta el estudio del contenido de alcaloides de la planta y bioensayos de actividad tripanocida de un nuevo alcaloide encontrado en la planta, denominado pesoine **(60)**. El resultado del bioensayo mostró que el alcaloide **(60)** provocó el 55% de lisis del parásito a una concentración de 250 µg/ml.



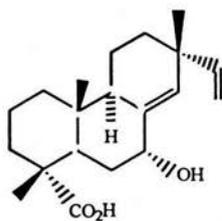
**(60)**

Del extracto de éter de petróleo de *Oxandra espintana* se aisló un nuevo compuesto al que se le denominó espintanol (**61**), este fué probado en 20 cepas tipificadas de *Trypanosoma cruzi*, observándose variaciones importantes en su actividad. En las cepas Tulahuen, A99 CL7, R 107, Te CL2 el espintanol mostró una actividad importante, en cambio en la cepas 9280 CL1, M6241 CL 6, A98 CL5 no hubo actividad (Hocquemiller 1991).

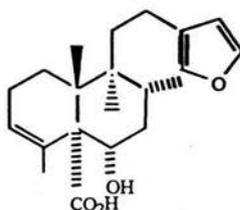


(61)

Figuroa y Rivera (1994) probaron la actividad tripanocida de dos ácidos diterpénicos : el 7  $\alpha$ -hidroxisandaracopimárico (**62**) y el ácido kerlinico (**63**) extraídos de *Salvia microphylla* y *Salvia keertlii* respectivamente. Los dos compuestos a una concentración 1 mM mostraron actividad contra el parásito.



(62)



(63)

# **OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Explorar la actividad tripanocida de los terpenoides aislados de la resina de pino (*Pinus oocarpa schiede*) empleando *Trypanosoma cruzi* como modelo biológico.

#### **3.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- a) Aislamiento y purificación de los terpenoides de *Pinus oocarpa schiede*
- b) Implementar y validar una metodología sencilla para determinar *in vitro* la actividad tripanocida del ácido pimárico, una mezcla de ácidos diterpénicos (pimárico, isopimárico y dehidroabiético), el ácido dehidroabiético y el longifoleno.
- c) Obtener información de parámetros observables (crecimiento, muerte, movilidad y morfología) de la actividad tripanocida en el bioensayo.
- d) Determinar la relación estructura-actividad tripanocida de los terpenoides.

# **M E T O D O L O G Í A**

## 4 METODOLOGIA

La metodología consta de dos partes: a) Química (extracción de los productos naturales) dirigida por el Dr. José S. Calderón Pardo de la Unidad de Plantas Medicinales en el Instituto de Química, UNAM y b) Biológica (bioensayo de actividad tripanocida) asesorada por la Dra. Julieta Rubio Lightbourn del Depto. de Genética y Toxicología Ambiental en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

### 4.1 PARTE EXPERIMENTAL QUÍMICA

#### 4.1.1 Material Químico

Resina 42.51 g Ixtapa Chiapas del tronco de *Pinus oocarpa*.

Columnas :

60 cm de largo X 7.0 cm de diámetro

40 cm " " X 4.5 cm " "

90 cm " " X 2.5 cm " "

Gel de sílice 70/230 para empacar columnas, sílica gel para placa, Gel de sílice (MERCK) para adsorción de los compuestos previa a la cromatografía en columna.

Para el seguimiento de las fracciones colectadas se utilizaron cromatofolios de aluminio con gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor con indicador fluorescente UV 254. Como reveladores se utilizó una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N y lámpara ultravioleta.

Los disolventes usados fueron destilados previamente.

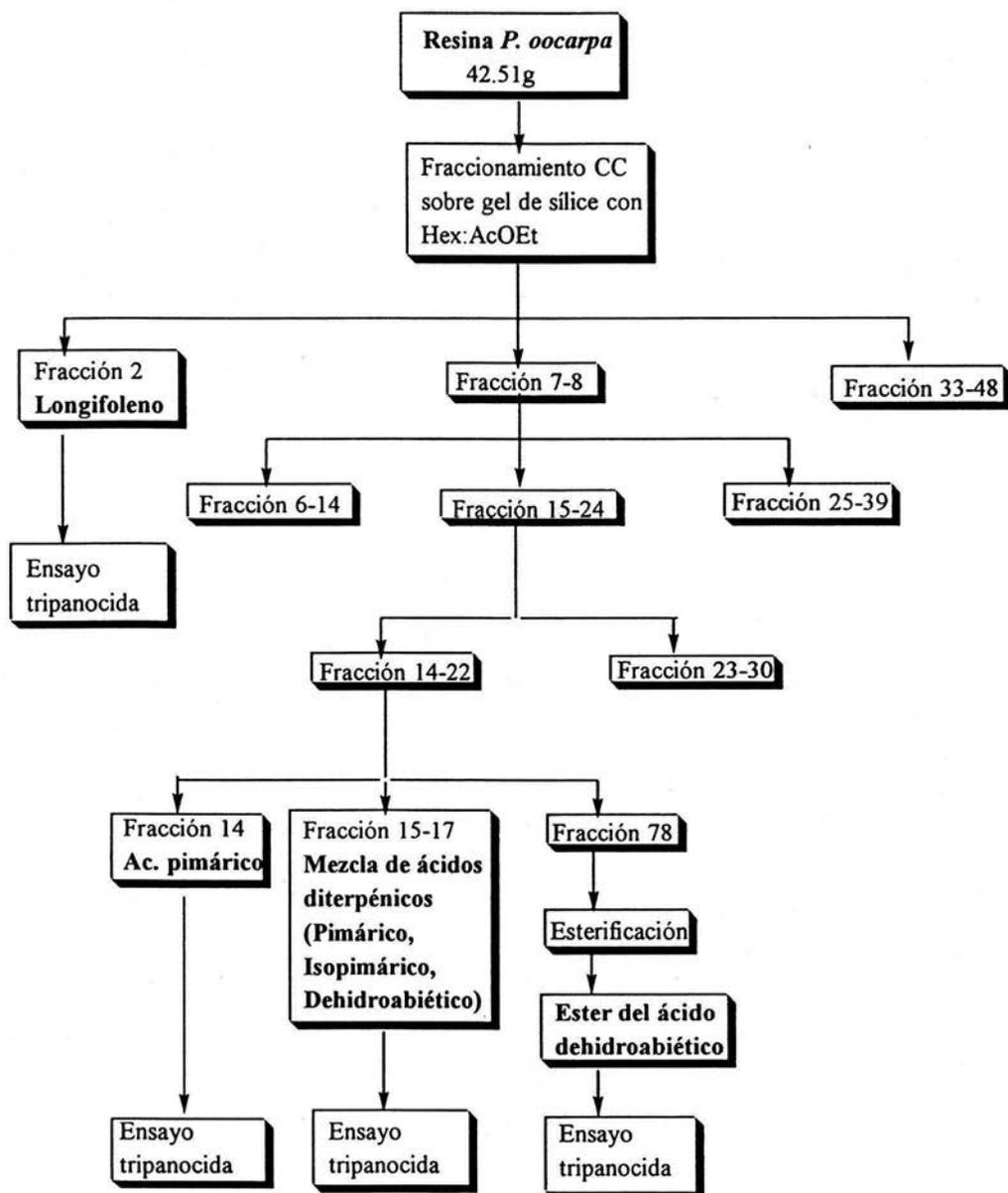
### 4.1.2 Metodología Química

La resina de *Pinus oocarpa* fue colectada en Ixtapa, Chiapas.

42.5g de la resina fueron cromatografiados en una columna con un diámetro de 10 cm y se empacó con 800g de sílica gel para placa, se eluyó inicialmente con hexano y posteriormente con mezclas de hexano-acetato de etilo, de polaridad creciente. Se recolectaron 48 fracciones de 500 ml y el disolvente fue eliminado a presión reducida en un rotavapor BUCHI Waterbath B-480, cada una de estas fracciones se monitoreo por cromatografía en capa fina y se reunieron las que presentaban un  $R_f$  similar. De la fracción 2 eluida con hexano, se obtuvo un líquido incoloro, cuyo peso molecular determinado por espectrometría de masa fue de 204 y que corresponde a la fórmula molecular  $C_{15}H_{14}$ , este compuesto fué el longifoleno.

Las fracciones (7-8) eluidas con Hexano :AcOEt 9 :1 fueron recromatografiadas obteniéndose 40 fracciones, de 250 ml, de esta columna se reunieron las fracciones (15-24) de acuerdo a su  $R_f$  obteniéndose un peso de 11.4 g. Estas fracciones se sometieron a una nueva cromatografía en columna de gel de sílice.

De la columna anterior resultaron 46 fracciones, reuniéndose las fracciones 14-24 eluidas con Hexano:AcOEt 95:5 con un peso de 7.95g. Estas fracciones se recromatografiaron, obteniendo 100 fracciones. La fracción 14 eluida con Hexano:AcOEt 95 :5 dió un compuesto sólido, cristalino identificado como ácido pimárico con peso molecular de 302, fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O_2$ . Las fracciones 15-22 se reunieron, dando 3.15g de un líquido viscoso que se identificó como una mezcla de ácidos diterpénicos (pimárico, isopimárico y dehidroabiético). La fracción 78 fué esterificada con una solución de diazometano, obteniendo , después de la purificación por cromatografía en capa fina, 25 mg del éster metílico del ácido dehidroabiético con peso molecular 316 y con fórmula molecular  $C_{21}H_{32}O_2$ .



## 4. 2 PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA

### 4. 2. 1 MATERIAL BIOLÓGICO

#### 4.2.1.1 Cepa *Trypanosoma cruzi*

En este estudio se utilizó la cepa "Y" aislada de humano, en Sao Paulo, Brasil.

#### 4.2.1.2 Medio de cultivo

##### Medio LIT (Liver Infusion Tryptose)

Composición :

NaCl	4.0	g
KCl	0.4	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.0	g
Glucosa	2.0	g
Triptosa	5.0	g
Infusión de hígado	5.0	g
Disolución de hemina	0.025	g
Suero fetal bovino (inactivado)	100	ml
Agua bidestilada	1000	ml

Los componentes fueron disueltos en agua destilada, excepto el suero y la hemina. El pH de la disolución fue ajustado a 7.2. Posteriormente, esta disolución fue esterilizada en autoclave a 20 P.C.I ó 1.4 cm<sup>2</sup> durante 30 min.

La disolución de hemina y el suero fueron adicionados al resto de los componentes una vez frío y en condiciones de esterilidad, en una campana de flujo laminar.

#### 4.2.1.3 Hemina

Se preparó a una concentración de 50 mg/ml en una mezcla de trietanol amina-agua desionizada 1:1. Se esterilizó con un filtro NALGENE 0.45  $\mu\text{m}$  en una campana de flujo laminar.

#### 4.2.1.4 PBS

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
Agua destilada	1000 ml

Los componentes fueron disueltos en el agua destilada, y se ajustó el pH a 7.2. Se esterilizó en autoclave a 20 P.C.I ó 1.4  $\text{cm}^2$  por 30 min. Se guardó a temperatura ambiente.

#### 4.2.1.5 Solución fijadora

Se preparó una disolución al 10% de formaldehído en una disolución amortiguadora de fosfato salino (PBS).

#### 4.2.1.6 Mantenimiento de la cepa

Los organismos fueron mantenidos en medio axénico (LIT) en frascos FALCON de 25  $\text{cm}^2$  a 28°C y subcultivados cada tercer día.

## 4.2.2 METODOLOGÍA BIOLÓGICA

### 4.2.2.1 IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

Para determinar el efecto de los compuestos en el crecimiento de *T. cruzi* se procedió a establecer la curva de crecimiento normal de la cepa. Se tomaron células de un cultivo de 3 días, la concentración inicial de microorganismos para la curva fué de  $5 \times 10^6$  cel/ml en 4 ml de medio de cultivo LIT, en tubos PYREX con tapón de rosca de 14 ml e incubados a 28°C.

El conteo se hizo con una dilución de 1:10 (450  $\mu$ l de formaldehído y 50  $\mu$ l de cultivo) de esta dilución se tomaron 10  $\mu$ l con una micropipeta (GILSON) y se depositó en la cámara de Neubauer.

La cuenta se realiza utilizando los 16 cuadros localizados sobre las diagonales de la cámara (fig. 12).

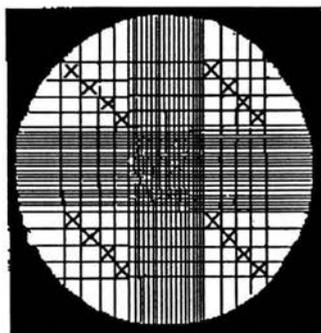


Fig. 12 Cámara de Neubauer

El No. total de células presentes en un mililitro de cultivo se obtiene mediante la fórmula:

$$N = n \times 10 \times 1000 \times fd$$

donde:

n = No. de células contadas

fd = Factor de dilución

Al mismo tiempo del conteo se hicieron lecturas de los cultivos en un espectrofotómetro a 580 nm. El ensayo se hizo por triplicado diariamente (cada 24 hrs)

#### **4.2.2.2 BIOENSAYO**

##### ***4.2.2.2.a. Prueba de solubilidad en DMSO de los compuestos***

Como se requería de medios de cultivo de base acuosa fue necesario realizar pruebas de solubilidad de los compuestos, debido a que estos no son solubles en agua. La prueba se realizó con DMSO un disolvente probado y recomendado, por su baja toxicidad, para este tipo de ensayos.

La prueba consistió en encontrar la mínima cantidad de disolvente que no sea tan tóxico para el organismo y que sea suficiente para disolver el compuesto en el medio de cultivo LIT.

#### **4.2.2.2 b Prueba de toxicidad de DMSO sobre *Trypanosoma cruzi***

Para determinar la concentración adecuada de DMSO que permitiera disolver los compuestos activos en el medio LIT sin afectar el crecimiento de *T. cruzi*, se realizaron ensayos con diversas concentraciones de dicho disolvente.

Para este ensayo, se tomaron células de un cultivo de tres días, se inició con una concentración de  $5 \times 10^6$  cel/ml, en 4ml de medio LIT, en tubos PYREX con tapón de rosca de 14 ml e incubados a 28°C. El DMSO se adicionó a estos cultivos, en donde se probaron las siguientes concentraciones: 2% y 1% v/v.

Para contar con un patrón de comparación que permitiera evaluar el efecto del disolvente, se realizó paralelamente una prueba control con el medio de cultivo LIT y la misma concentración de células, pero sin DMSO. El ensayo se realizó por triplicado, diariamente se hizo conteo y lectura para observar su comportamiento.

#### **4.2.2.2. c. Actividad tripanocida de los compuestos**

Una vez establecidas las condiciones de trabajo del ensayo control y de la concentración óptima del disolvente, se procedió a iniciar los experimentos con los compuestos problema.

Los ensayos fueron realizados con inóculos a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml provenientes de un cultivo de tres días en 4ml de LIT, en tubos PYREX con tapón de rosca de 14 ml. Se eligió el tercer día porque en este día el cultivo se presenta en la fase logarítmica de la curva de crecimiento, lo cual significa que los microorganismos se encuentran en condiciones óptimas de desarrollo, es decir :

- 1) En esta fase se sintetiza nuevo material celular,
- 2) La masa aumenta exponencialmente

Los compuestos (resina, ácido pimárico, mezcla de ácido diterpénicos y longifoleno) fueron probados en las siguientes concentraciones: 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml y 50 µg/ml ; el éster metílico del ácido dehidroabiético se probó sólo a la concentración de 200 µg/ml debido a la poca cantidad que se obtuvo del compuesto. Se usaron como controles positivos NIFURTIMOX, y ácido 7 $\alpha$ -hidroxisandaracopimárico (7 $\alpha$ -hsp), este último en estudios anteriores resultó activo en la cepa C4.

Los ensayos fueron realizados por triplicado, con ensayo control cultivo en LIT y cultivo en LIT y disolvente (DMSO), se leyó la absorbancia de los tubos en un espectrofotómetro y se observó la morfología de los parásitos en un microscopio invertido, diariamente(cada 24 hrs).

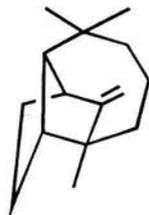
Para determinar el efecto tripanocida de los compuestos, se tomaron en cuenta los parámetros observables en los microorganismos en cultivo como son: movilidad, morfología, formación de roseta y porcentaje de inhibición de crecimiento o de lisis de los microorganismos en cultivo, dependiendo de la actividad de los compuestos.

## **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PARTE QUIMICA

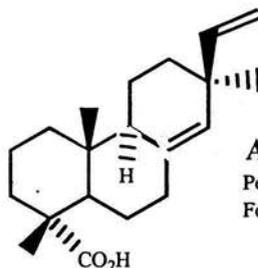
#### COMPUESTOS AISLADOS Y PROBADOS EN ENSAYO TRIPANOCIDA



**Longifoleno**

Peso Molecular: 204

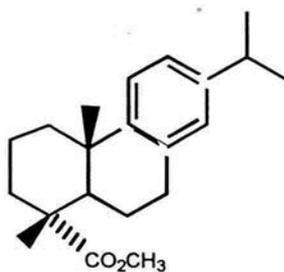
Fórmula Molecular:  $C_{15}H_{24}$



**Ac. pimárico**

Peso Molecular: 302

Fórmula Molecular:  $C_{20}H_{30}O_2$

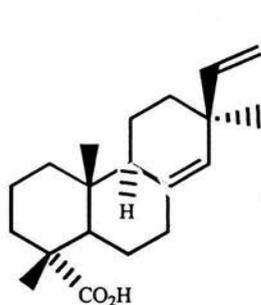


**Ester metílico del  
ácido  
dehidroabiético**

Peso Molecular: 316

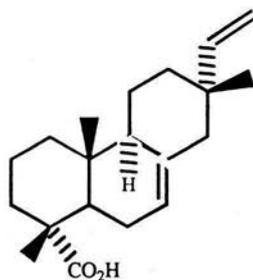
Fórmula Molecular:  $C_{21}H_{32}O_2$

#### Mezcla de ácidos diterpénicos



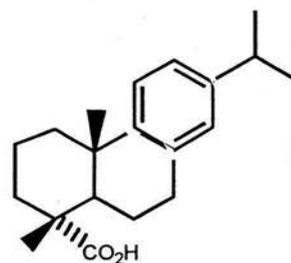
Ac. pimárico

+



Ac. isopimárico

+



Ac. dehidroabiético

## 5.2 PARTE BIOLÓGICA

### 5.2.1 IMPLEMENTACION Y VALIDACION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

En la implementación de la curva de crecimiento de la cepa "Y" se observó que el crecimiento de las poblaciones del parásito describe una curva sigmoïdal la cual se divide en 2 fases: logarítmica (95-99% epimastigotes) y estacionaria (presenta un porcentaje de organismos con morfología variable).

En la **gráfica 1** se muestra la curva de crecimiento de la cepa "Y", donde se detalla qué estadio celular del parásito se observa normalmente en cada fase. Y en la **gráfica 2** es la curva de crecimiento por método espectrofotométrico donde se observa una curva muy parecida a la curva de crecimiento de método por conteo en cámara de Neubauer

La curva por conteo se extrapoló con la de espectrofotometría para encontrar la relación absorbancia - No. de células (**gráfica 3**).

### 5.2.2 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

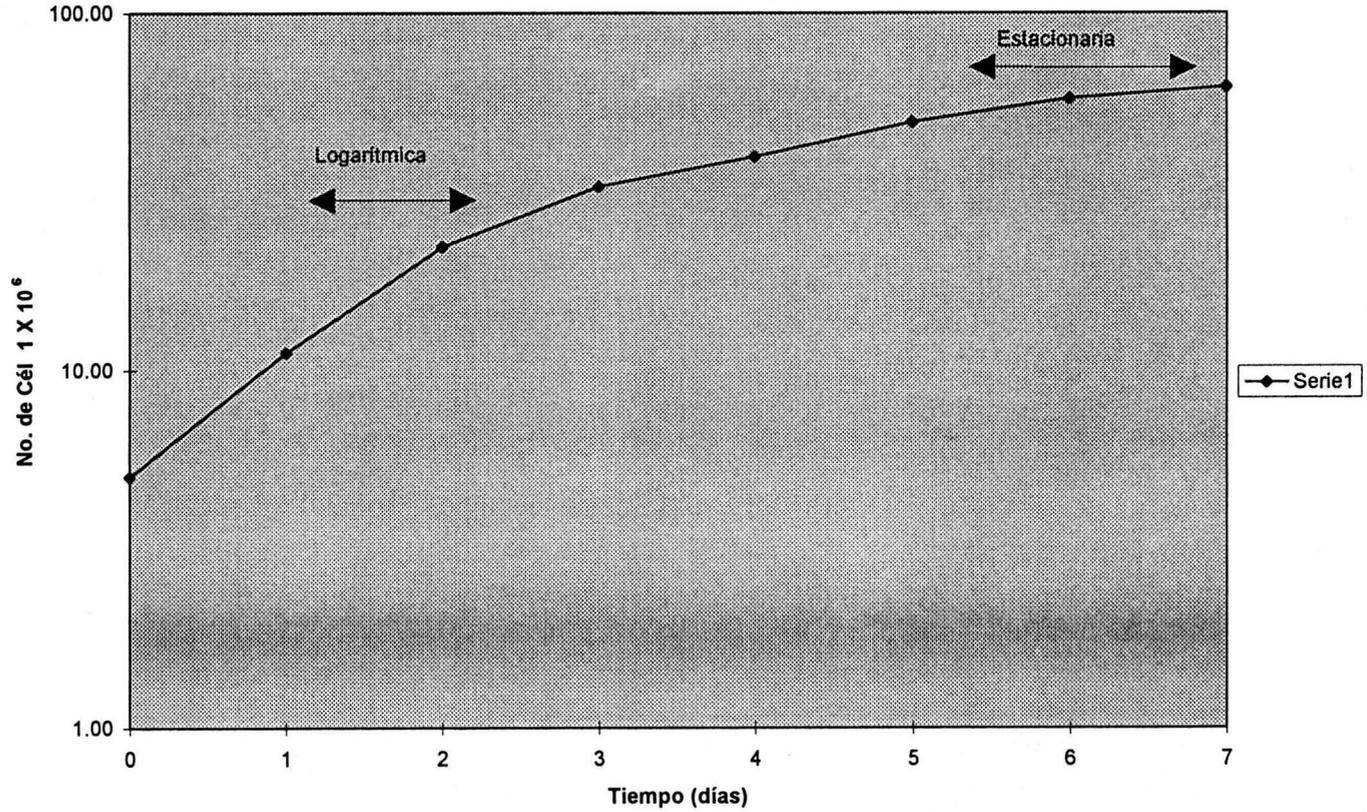
La solubilidad de los compuestos se obtuvo, empleando una concentración final de DMSO al 1%.

### 5.2.3 PRUEBA DE TOXICIDAD

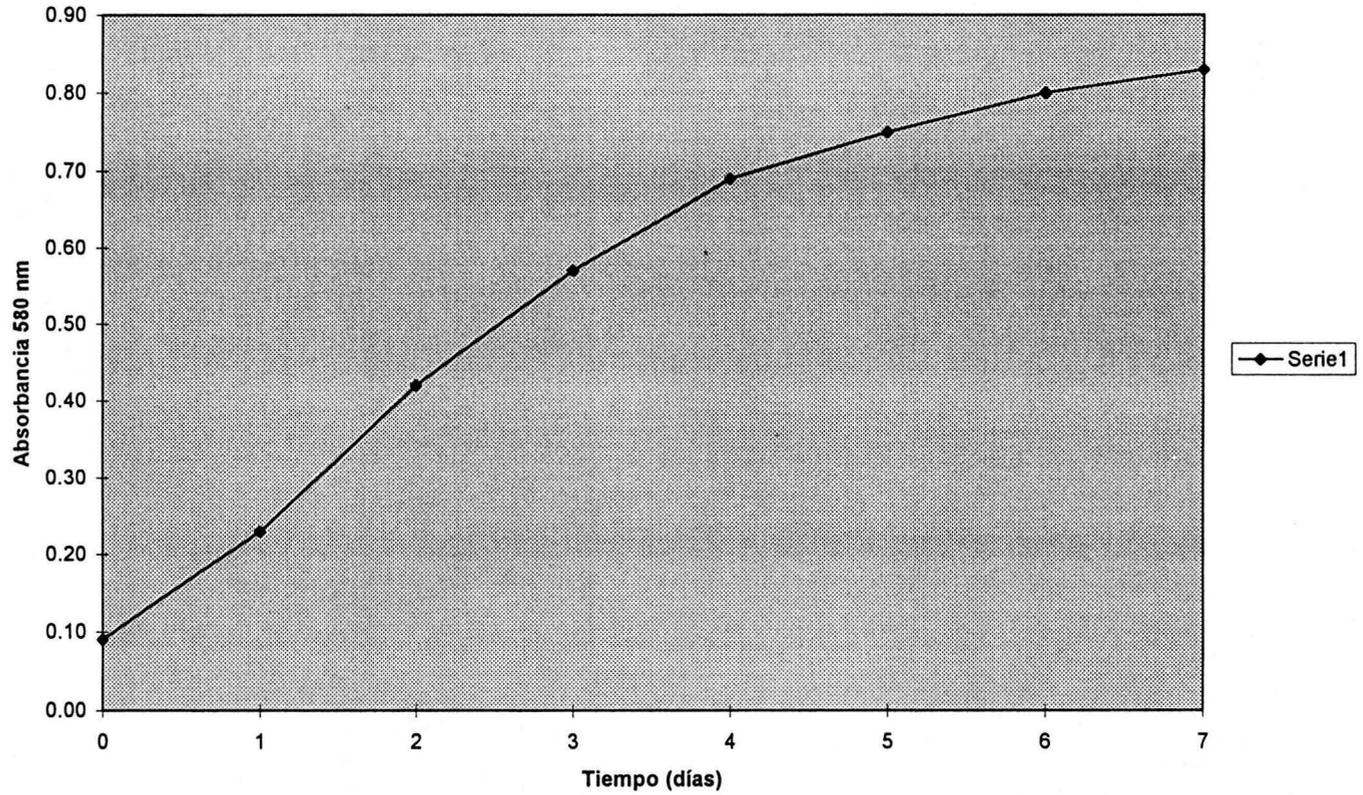
De acuerdo a la **gráfica 4** se determinó que la concentración final óptima del disolvente fue de 1%, ya que con este porcentaje se observó una curva de crecimiento muy parecida a la curva control del parásito.



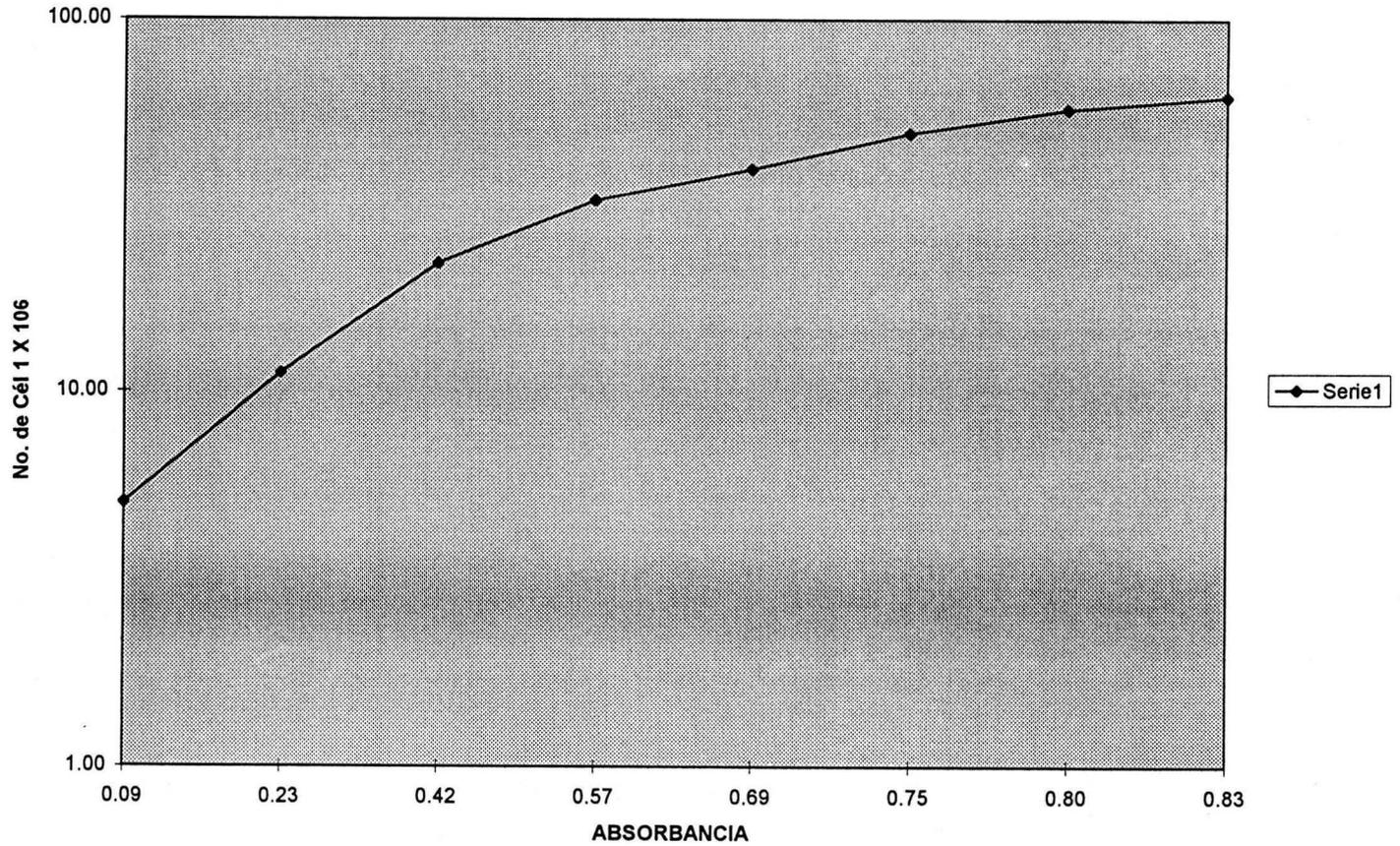
### Curva de crecimiento método por conteo



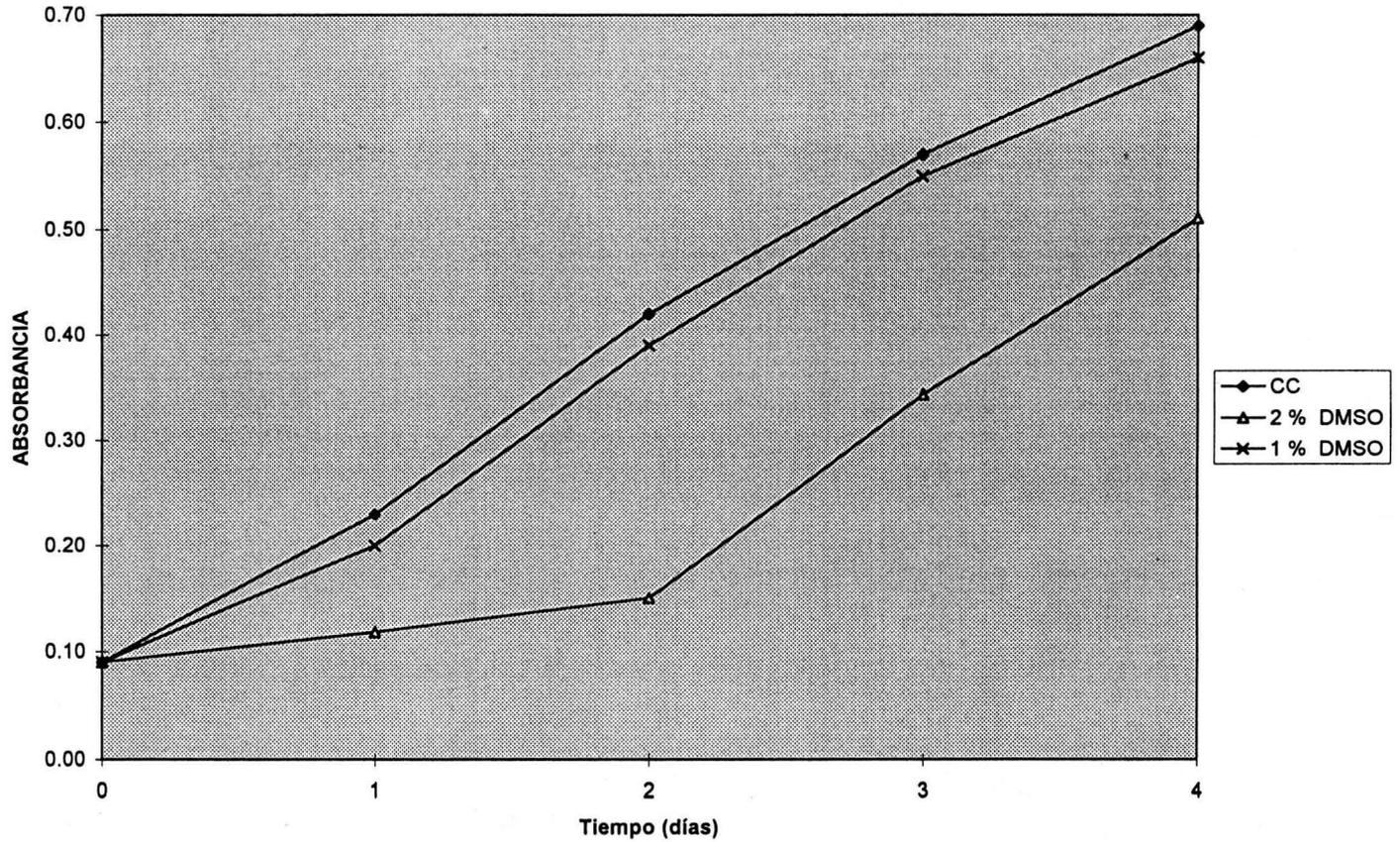
Curva de crecimiento método espectrofotométrico



Extrapolación de curva de crecimiento de método por conteo y espectrofotométrico



Curva de toxicidad de DMSO



### 5.2.3 ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DE LOS COMPUESTOS

La actividad tripanocida de los compuestos (Resina, ácido pimárico, mezcla de ácidos diterpénicos, longifoleno) a diferentes concentraciones se muestran en las **gráficas 5, 6, 7 y 8**

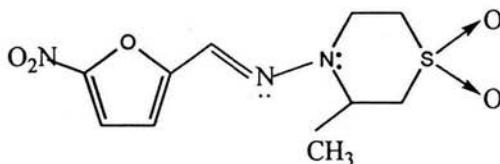
A la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  la resina y el longifoleno tuvieron actividad sobre el parásito en 1 hr. ocasionando lisis total y parcial respectivamente, así como el ácido pimárico y la mezcla, aunque en estos dos últimos compuestos la lisis total se presentó en 2hrs. Con el ácido dehidroabiético el 100% de inhibición de crecimiento se obtuvo desde el día 1 (24hrs), las células tenían movimiento lento y deformidades; presentándose la lisis total hasta el día 2 (48hrs). Con Nifurtimox el 100 % de inhibición de crecimiento con lisis total se presentó en el día 1, y con el ácido  $7\alpha$  hidroxisandarocopimárico ( $7\alpha$ -hsp) el 100% de inhibición de crecimiento se presentaba desde el día 1, sin embargo, la movilidad y la morfología de los parásitos eran normales sin presentarse lisis total durante el seguimiento del ensayo (**gráfica 5**).

La resina, el longifoleno, el ácido pimárico y la mezcla provocaron 100% de inhibición con lisis total en el día 1 en la concentración de 150 mg/ml, al igual que Nifurtimox, en cambio el  $7\alpha$ -hidroxisandarocopimárico tuvo una inhibición del 50 % y su morfología y movimiento fue normal durante los 3 días (72 hrs) del registro (**gráfica 6**).

Con la concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ , la resina y el longifoleno provocaron 100% de inhibición de crecimiento, presentando células lisadas y células sin movimiento y con lisis parcial respectivamente. Con el ácido pimárico y con la mezcla la inhibición de crecimiento fue de 89 %, aunque la morfología y el movimiento de los parásitos eran iguales a los del control. Con el Nifurtimox el 100 % de inhibición de crecimiento fué el día 1, presentándose la lisis total hasta las 48 hrs; en cambio el ácido  $7\alpha$  hidroxisandarocopimárico presentó una inhibición de crecimiento menor del 40% en

A una concentración de 50 µg/ml no hubo lisis celular, excepto con Nifurtimox que se presenta a las 48 hrs. Los compuestos que ocasionan un porcentaje de inhibición de crecimiento significativo son la resina y el longifoleno, los otros compuestos se comportaron muy parecidos a la curva de crecimiento control LIT-DMSO (gráfica 8).

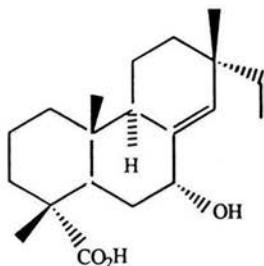
#### ESTRUCTURA DEL CONTROL POSITIVO



NIFURTIMOX

#### ESTRUCTURA DEL COMPUESTO TRIPANOCIDA (cepa C4) AISLADO DE

*Salvia microphylla*



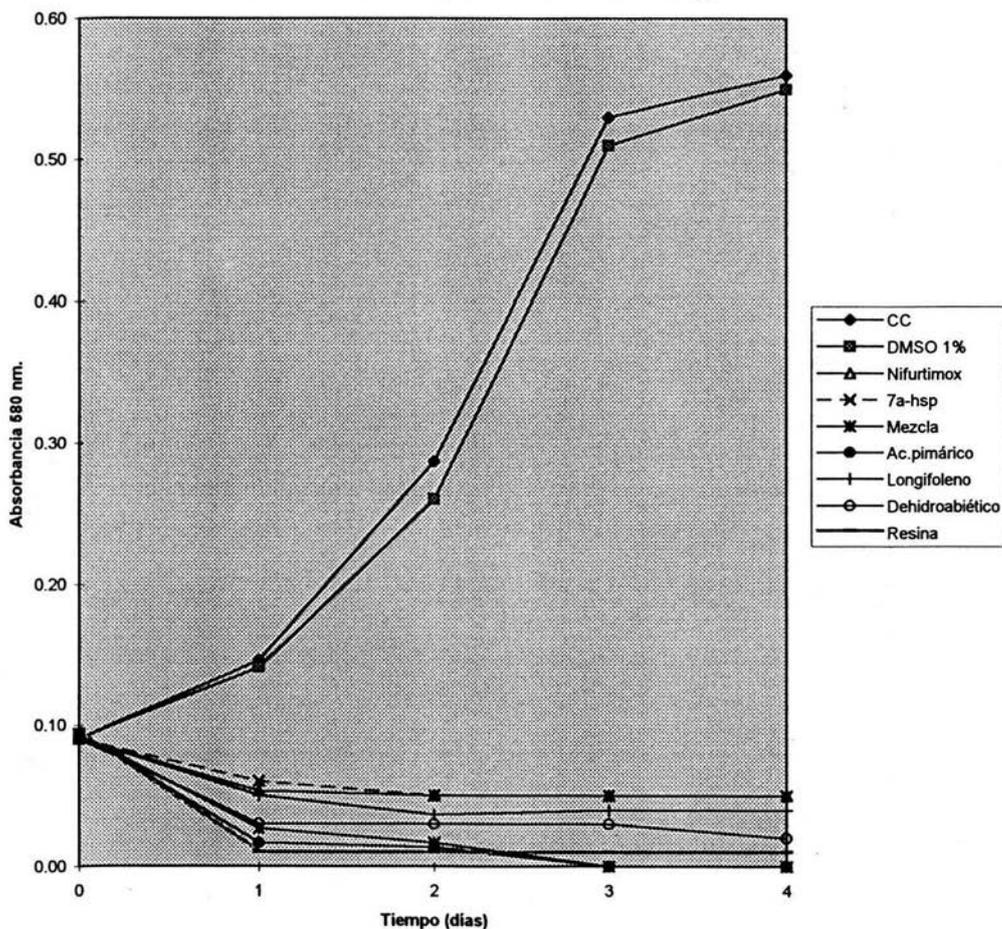
7α-Hidroxisandaracopimárico

PROMEDIO DE LAS LECTURAS DE CURVAS DE CRECIMIENTO CON COMPUESTOS A 200 mg/ml

Referido a la absorbancia 580 nm

COMPUESTOS	DIAS					OBSERVACIONES
	0	1	2	3	4	
CC	0.09	0.15	0.29	0.53	0.56	
DMSO 1%	0.09	0.14	0.26	0.51	0.55	
Nifurtimox	0.09	0.05	0.05	0.05	0.05	24 horas células sin movimiento y lisis parcial
7a-hsp	0.09	0.06	0.05	0.05	0.05	Durante el bioensayo movimiento lento y morfología normal
Mezcla	0.09	0.03	0.02	0.00	0.00	2 horas lisis total
Ac.pimárico	0.09	0.02	0.01	0.00	0.00	2 horas lisis total
Longifoleno	0.09	0.05	0.04	0.04	0.04	1 horas lisis parcial y hay células sin movimiento
Dehidroabiético	0.09	0.03	0.03	0.03	0.02	En 24 hrs. habían células deformes, lisis total 48 horas
Resina	0.10	0.01	0.01	0.01	0.01	1 horas lisis total

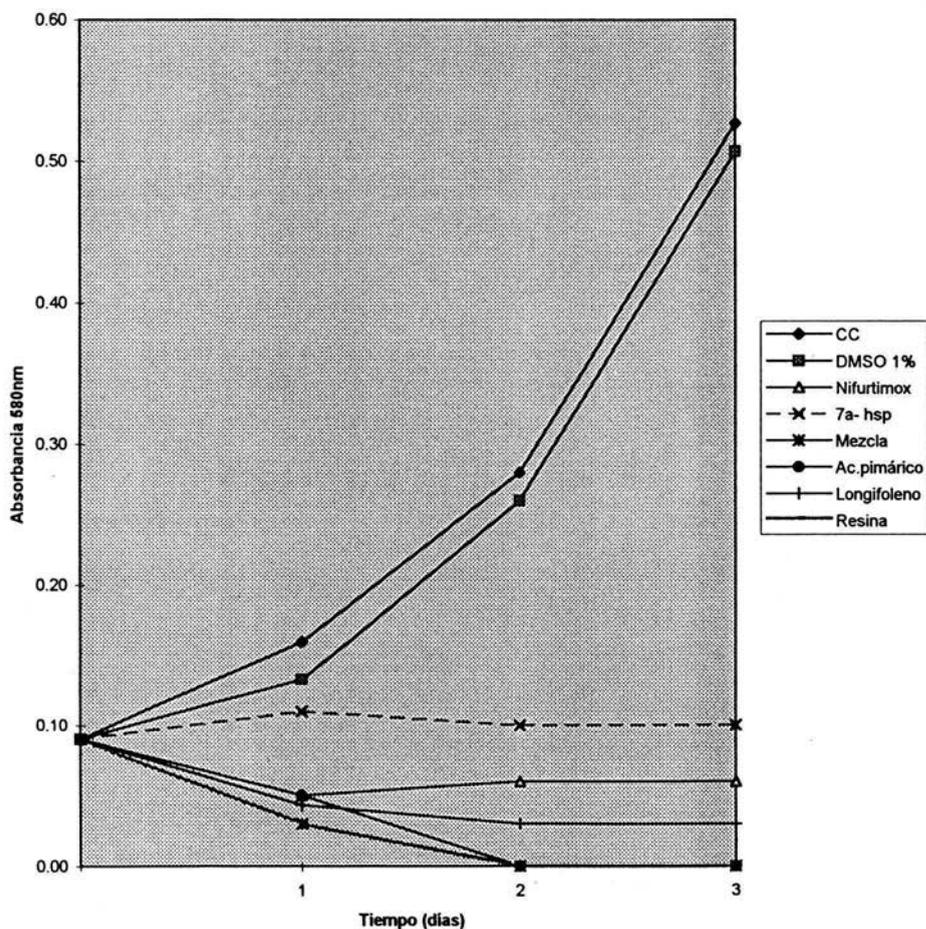
Gráfica 5  
Toxicidad de compuestos resínicos a 200 µg/ml



PROMEDIO DE LAS LECTURAS DE CURVAS DE CRECIMIENTO CON COMPUESTOS A  
150µm/ml  
Referido a la absorbancia 580 nm

COMPUESTOS	DIAS				OBSERVACIONES
	1	2	3	3	
CC	0.09	0.16	0.28	0.53	
DMSO 1%	0.09	0.13	0.26	0.51	
Nifurtimox	0.09	0.05	0.06	0.06	48 horas. células sin movimiento, lisis parcial
7α- hsp	0.09	0.11	0.10	0.10	Del día 1-4 movimiento y morfología normal, sin división celular
Mezcla	0.09	0.03	0.00	0.00	24 horas lisis total
Ac.pimárico	0.09	0.05	0.00	0.00	24 horas lisis total
Longifoleno	0.09	0.04	0.03	0.03	24 horas células sin movimiento
Resina	0.09	0.03	0.00	0.00	24 horas lisis total

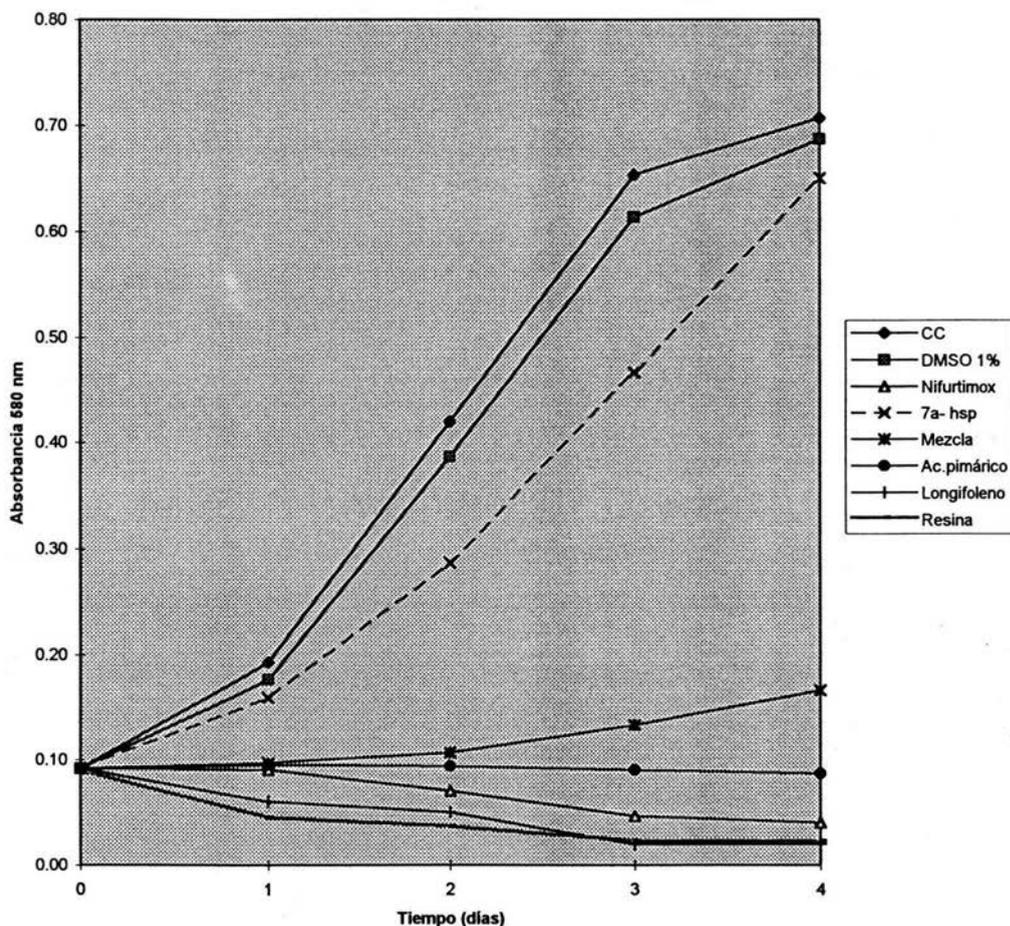
Gráfica 6  
Toxicidad de compuestos resínicos a 150 µg/ml



PROMEDIO DE LAS LECTURAS DE CURVAS DE CRECIMIENTO CON COMPUESTOS A 100  $\mu\text{g/ml}$   
 Referido a la absorbancia 580 nm

COMPUESTOS	DIAS					OBSERVACIONES
	0	1	2	3	4	
CC	0.09	0.19	0.42	0.65	0.71	
DMSO 1%	0.09	0.18	0.39	0.61	0.69	
Nifurtimox	0.09	0.09	0.07	0.05	0.04	48 horas células sin movimiento y lisis parcial.
7 $\alpha$ - hsp	0.09	0.16	0.29	0.47	0.65	Del día 1-4 el crecimiento, morfología y movimiento normal
Mezcla	0.09	0.10	0.11	0.13	0.17	Durante el bioensayo movimiento y morfología normal sin división celular
Ac. pimárico	0.09	0.10	0.09	0.09	0.09	
Longifoleno	0.09	0.06	0.05	0.02	0.02	24 horas células sin movimiento
Resina	0.09	0.05	0.04	0.02	0.02	24 horas lisis total

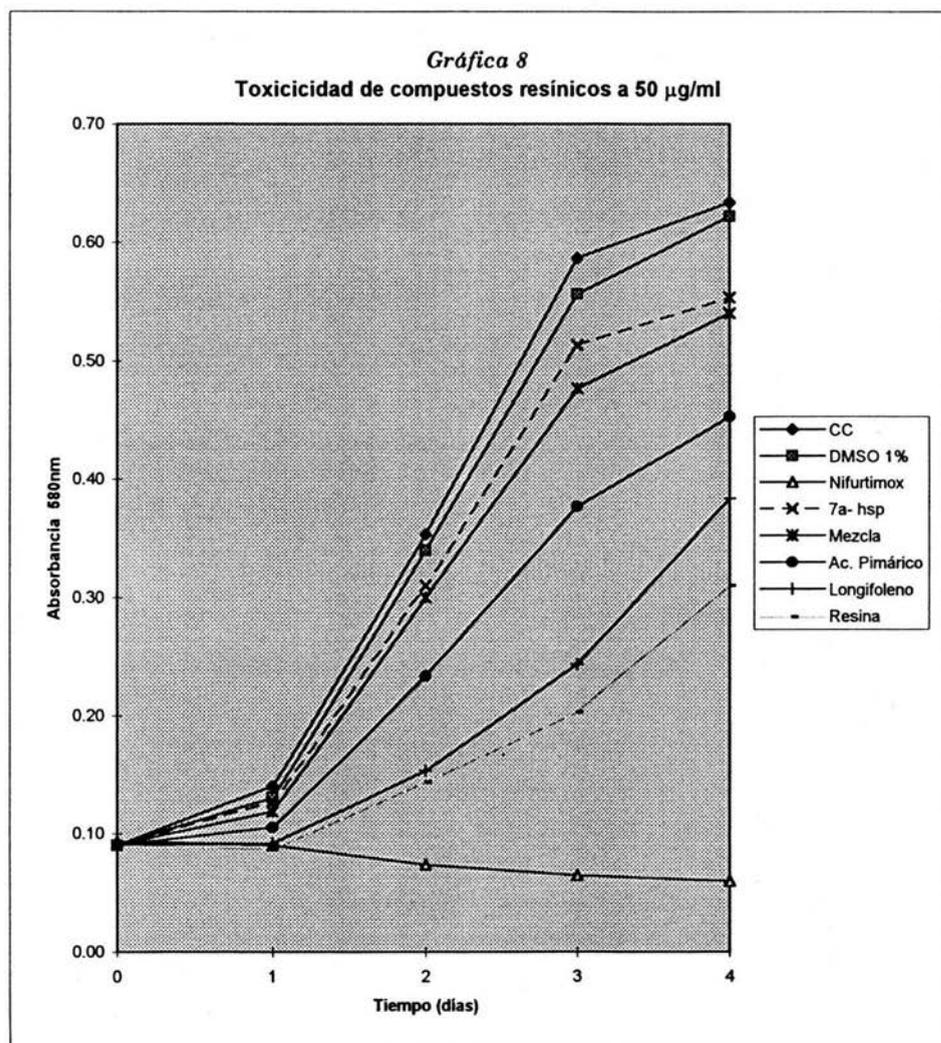
Gráfica 7  
 Toxicidad de compuestos resinicos a 100  $\mu\text{g/ml}$



PROMEDIO DE LECTURAS DE LA TOXICIDAD DE COMPUESTOS RESINICOS A 50 µg/ml  
Referido a la absorbancia 580 nm

COMPUESTOS	DIAS					OBSERVACIONES
	0	1	2	3	4	
CC	0.09	0.14	0.35	0.59	0.63	
DMSO 1%	0.09	0.13	0.34	0.56	0.62	
Nifurtimox	0.09	0.09	0.07	0.07	0.06	48 horas células sin movimiento y lisis parcial.
7α- hsp	0.09	0.13	0.31	0.51	0.55	Durante los 4 días del seguimiento del bioensayo
Mezcla	0.09	0.12	0.30	0.48	0.54	se encontraron las células con morfología normal
Ac. Pimárico	0.09	0.11	0.23	0.38	0.45	movimiento y división celular
Longifoleno	0.09	0.09	0.15	0.24	0.38	Durante el bioensayo la movilidad y morfología fué
Resina	0.09	0.09	0.14	0.20	0.31	normal y casi no se presentó la división celular

Gráfica 8  
Toxicidad de compuestos resínicos a 50 µg/ml



**PORCENTAJE DE INHIBICION DE CRECIMIENTO DIA 0 (2HRS)**

	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml
CC	0	0	0	0
DMSO 1%	0	0	0	0
Nifurtimox	0	0	0	0
7α-hsp	0	0	0	0
mezcla	0	0	0	100
Ac. pimárico	0	0	0	100
Ac. dehidroabiético	0	0	0	0
Longifoleno	0	0	0	100
Resina	0	0	0	100

**PORCENTAJE DE INHIBICION DE CRECIMIENTO DIA 1 (24HRS)**

	50 µg/m	100 µg/m	150 µg/m	200 µg/ml
CC	0	0	0	0
DMSO 1%	0	0	0	0
Nifurtimox	100	100	100	100
7 α-hsp	0	22	71	100
Mezcla	25	89	100	100
Ac.pimárico	50	89	100	100
Ac. dehidroabiético	*	*	*	79
Resina	100	100	100	100
Longifoleno	100	100	100	100

**PORCENTAJE DE INHIBICION DE CRECIMIENTO DIA 2 (48 HRS).**

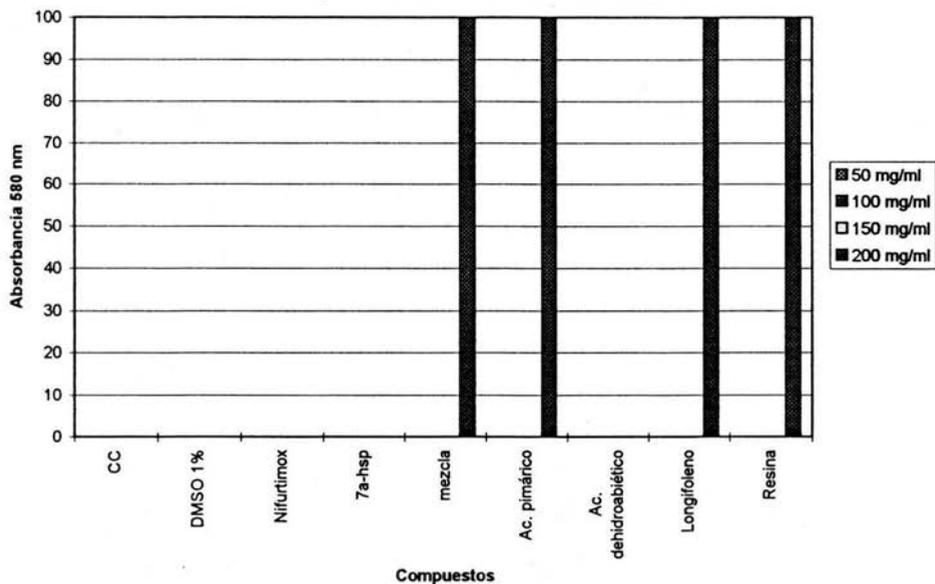
	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml
CC	0	0	0	0
DMSO 1%	0	0	0	0
Nifurtimox	100	100	100	100
7 α-hsp	12	33	94	100
Mezcla	16	93	100	100
Ac.pimárico	44	100	100	100
Ac. dehidroabiético	*	*	*	89
Resina	80	100	100	100
Longifoleno	76	100	100	100

**PORCENTAJE DE INHIBICION DE CRECIMIENTO DIA 3 ( 72 HRS).**

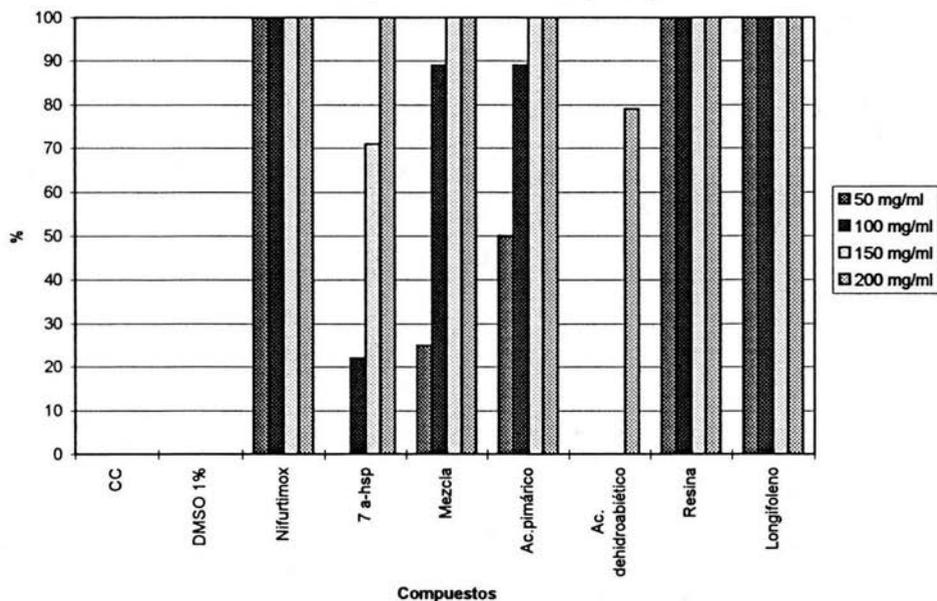
	50 µg/ml	100 µg/ml	150 µg/ml	200 µg/ml
CC	0	0	0	0
DMSO 1%	0	0	0	0
Nifurtimox	100	100	100	100
7 α-hsp	11	27	98	100
Mezcla	17	93	100	100
Ac.pimárico	38	100	100	100
Ac. dehidroabiético	*	*	*	100
Resina	77	100	100	100
Longifoleno	68	100	100	100

\*Concentraciones que no fueron probadas

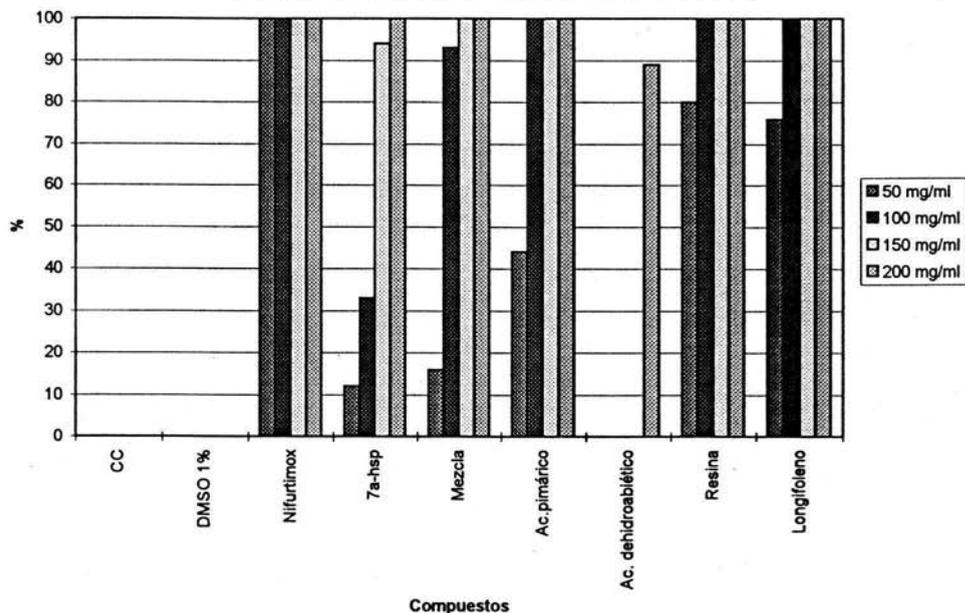
**Gráfica 9**  
**Porcentaje de inhibición de crecimiento 2 Hrs**



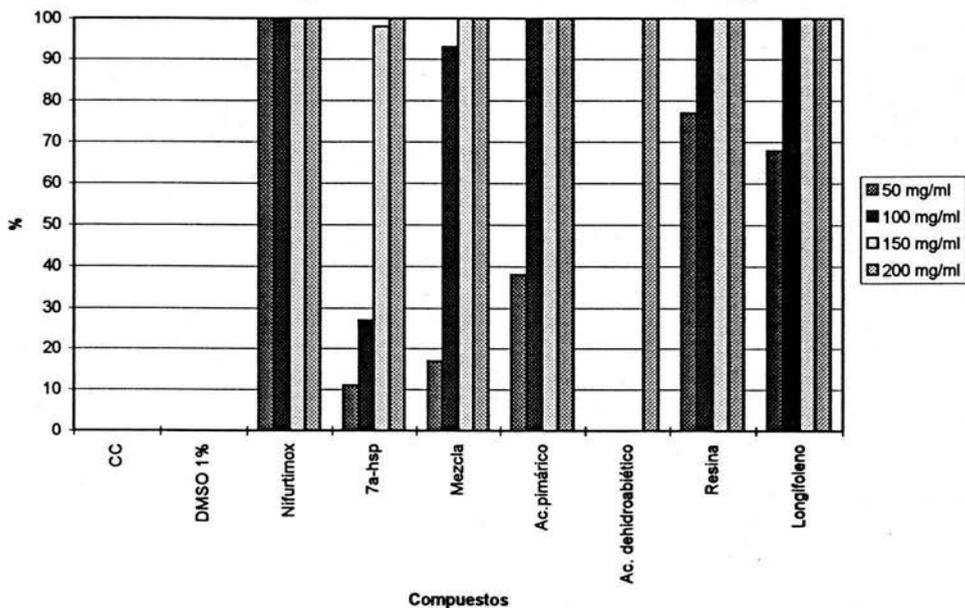
**Gráfica 10**  
**Porcentaje de inhibición día 1 (24 hrs)**



**Gráfica 11**  
**Porcentaje de inhibición de crecimiento día 2 (48 hrs)**



**Gráfica 12**  
**Porcentaje de inhibición de crecimiento día 3 (72 hrs)**



## **DISCUSIÓN**

## DISCUSIÓN

Para el seguimiento del ensayo tripanocida de los terpenoides se usó el método espectrofotométrico debido a que se tienen menos parámetros de error que en el método por conteo en cámara de Neubauer.

Los compuestos empleados se usaron en las concentraciones recomendadas en la literatura para este tipo de ensayos de determinación de actividad biológica.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la resina y algunos de sus compuestos tienen efecto tripanocida.

A la concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  se puede considerar que la resina, longifoleno, ácido pimárico y la mezcla son inclusive más eficaces que el Nifurtimox, ya que la actividad de los compuestos antes mencionados sobre el parásito fué lisis total en las dos primeras horas del día 0, mientras que con Nifutimox no había actividad evidente en ese tiempo.

La resina y los compuestos terpénicos antes mencionados resultaron ser también eficaces a la concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$  comparados con el Nifurtimox, ya que este fármaco provoca lisis parcial y células sin movimiento hasta el segundo día, mientras que con nuestros compuestos ya se mostraba la lisis total o células sin movimiento (longifoleno) de *T. cruzi* desde el primer día.

A las concentraciones de 100  $\mu\text{g/ml}$  todavía encontramos actividad de los compuestos terpénicos sobre el parásito, así como la resina. En cambio a 50  $\mu\text{g/ml}$  se pueden diferenciar los compuestos con mejor actividad sobre *T. cruzi*, ya que en estas concentraciones el ácido pimárico y la mezcla sólo inhiben el crecimiento por debajo del

50%. En cambio longifoleno y la resina inducen más del 50% de inhibición de crecimiento del parásito, mostrando casi la misma actividad que el Nifurtimox, aunque además, con la resina las células se observan lisadas totalmente.

La resina fue la que presentó mayor actividad, probablemente debido al sinergismo de los compuestos que contiene. La lisis que se presentó con ésta puede ser debido a la presencia de los ácidos diterpénicos en la resina.

De acuerdo con las observaciones en laminillas en el microscopio la actividad de los compuestos diterpénicos de la resina, los cuales provocan lisis total a concentraciones mayores de 150  $\mu\text{g/ml}$ , podemos decir que éstas son sustancias lipofílicas capaces de ser incorporadas, en la membrana del parásito, y una vez incorporadas la membrana puede verse perturbada por dichas sustancias.

El longifoleno, un sesquiterpeno que representa el 40% de los componentes de la resina, fue el segundo en actividad. Aún cuando ocasiona el 100% de inhibición, las células se observaban sin movilidad y completas, por lo que suponemos que este compuesto actúa de manera diferente a los diterpenos antes mencionados.

El ácido pimárico a una concentración de 200  $\mu\text{g/ml}$  provoca lisis total en 2 hrs y a 50  $\mu\text{g/ml}$ , sólo inhibe el 50% del crecimiento. Podemos decir que su rango de actividad lo tenemos de 200  $\mu\text{g/ml}$  a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

El éster metílico del ácido dehidroabiético, aunque sólo se probó a 200  $\mu\text{g/ml}$ , no tiene una actividad comparable a los otros compuestos, ya que la lisis total de *Trypanosoma cruzi* se presentó hasta el tercer día, presentando sin embargo, desde el primer día modificaciones en su citoesqueleto.

La mezcla de los ácidos ditérmicos a 50  $\mu\text{g/ml}$  no muestra gran actividad, posiblemente debido a que el ácido pimárico que es muy activo cuando está puro, se encuentra en menor proporción en la mezcla. Por otro lado, el éster metílico del ácido dehidroabiético puro, muestra una actividad menor que la del ácido pimárico y la actividad del tercer componente, el ácido isopimárico puro, no se determinó, por lo cual sería interesante aislar el ácido isopimárico y ver su actividad sobre el parásito para ver su influencia en la actividad de la mezcla .

El ácido 7  $\alpha$ -hidroxisandaracopimárico no tuvo actividad significativa o comparable a los compuestos resínicos a las concentraciones probadas, aunque su estructura química es parecida a la del ácido pimárico. Esta diferencia en actividad probablemente se deba a que el ácido 7  $\alpha$ -hidroxisandaracopimárico tiene un grupo hidróxilo en el carbono 7, el cual modifica la polaridad del compuesto, además la esteroquímica de los sustituyentes del carbono 13 es diferente a la que presentan los sustituyentes del C-13 del ácido pimárico. A cualquiera de estas características, o a ambas, podría atribuirse su diferencia en actividad biológica.

## **CONCLUSIÓN**

## CONCLUSIÓN

Del presente estudio se concluye lo siguiente :

- De la resina de *Pinus oocarpa* se obtuvieron los siguientes diterpenos : el ácido pimárico, el éster metílico del ácido dehidroabiético y una mezcla que contiene ácidos diterpénicos (pimárico, isopimárico y dehidroabiético). Y un sesquiterpeno (longifoleno).
- Se encontró que el rango de actividad de la resina, longifoleno, ácido pimárico, y la mezcla es de 50 µg/ml a 200 µg/ml.
- La mayor actividad la presentó la resina y el longifoleno, aún a una concentración de 50 µg/ml.
- Los compuestos aislados de la resina de *Pinus oocarpa* son igual o más activos que el Nifurtimox (fármaco tóxico que se emplea para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas), pero suponemos que por ser de origen natural podrían ser menos tóxicos para el humano.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

## ***BIBLIOGRAFÍA***

- Acosta, R.J.; Avelegra, A. L. (1977) Esplendor del México Antiguo Tomo II pp 211-220 Centro de Investigaciones Antropológicas de México. México D:F:
- Aguilar, A.; Camacho, J.R.; Chino, S.; Jáquez, P.; Lopez, M.R. (1994) Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. pp 159 México
- Bailey, J.A.; Vincent, G.G. and Burdon R.S. (1974) Diterpenes from *Nicotiana glutinosa* and their effect on fungal growth.  
*Journal Of General Microbiology* **85**
- Bhat, S.V.; Kalyanaraman, P.S.; Kohl, H. and Souza, N.J. (1975) Inuroyleanol and 7-Ketoroyleanone, two novel diterpenoids of *Inula royleana*.  
*Tetrahedron* **31** 1001.
- Bocca, T. C. (1981) Enfermedad de Chagas, Clínica de la fase aguda
- Carrol, R. E.; Farr, R. P.; Clifton, R. J. (1979) Parasitología Clínica. pp 107-116 Ed. SALVAT Barcelona, España
- Castro, C.; Jiménez, M. y González de la Parra, M. (1992) Inhibitory Effect of Piquerol A on the Growth Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*  
*Planta Medica* **58** 281-282.
- Connolly, J. D. and Hill, R. A. Dictionary of Terpenoids Vol 2 pp 810-815 Ed. Chapman & Hall. Great Britain
- Chance, L.M. and Molyneux, H.D. (1995) The human Trypanosomiasis (Sleeping sickness and Chagas disease)  
*Current Opinion in Infectious diseases* **8** 328-335
- Chester, B. P.; Clifton, J. R. and Wayne, C. E. (1984) Clinical parasitology. pp 56-96 Ed. LEA & FEBIGER. Philadelphia E. U.
- Cheung, H.T.A.; Fu, S. L. and Smal, M.A. (1994) Inhibition of Platelet Aggregation By Diterpene Acids from *Pinus massoniana* Resin.  
*Arzneim-Forsch / Drug Res.* **44** 17-25

- Chinou, I. ; Detzos, C. ; Harvala, C. ; Roussaski, C. and Verbist, J.F. (1994) Citototoxic and Antibacterial Labdane-Type Diterpenes from the Aereal Parts of *Cistus incanus*. *Planta Medica* **60** 34-36
- Denicola, A. ; Rubbo, H. ; Rodríguez, D. and Radi, R. (1993) Peroxynitrite-Mediated Cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **304** 279-281.
- Díaz, R.M. ; García, G. ; Moreno, E. ; Parra, A. and Quevedo, S. (1988) Studies on the Relationship of Structure to Antimicrobial Properties of Diterpenoid Compounds from *Sideritis*. *Planta Medica* **54** 301-304.
- Díaz de Toranzo, E.G. ; Castro, J.A. ; Franke de Cazzulo, B. M. and Cazzulo, J.J: (1988) *Experientia* **44** 880.
- Dumas, M.T. ; Hubbes, M. and Strunz G. M. (1983) Identification of some compounds associated with resistance of *Pinus densiflora* to *Fomes annosus*. *Eur. Jour For Path.***13** 151-160
- Eguiluz, P.T. (1982) Clima y distribución del Género Pinus en México *Revista Ciencia Forestal* **7** 30-44
- Eguiluz, P.T. ; Perry, P.J. (1983) *Pinus tecumani*: Una especie nueva de Guatemala. *Revista Ciencia Forestal* **8** 3-14
- Eisner, T. ; Johnessee, S.J. ; Carrel, J. ; Hendry, L. ; Meinwald, J. (1974) Defensive Use by an Insect of a Plant Resin. *Science* **184** 996-999
- Ellestead, G. ; Knstmann, M.P. ; Miranda, P. and Morton G.O. (1972) Structures of Fungal Diterpene Antibiotics LLS-491  $\beta$  and  $\gamma$ . *J. Am. Chem. Soc.* **94** 6206
- Emerson, F. Queiroz, F.R. and Cavé, A. (1996) Pessoine and Spinosine, Two Catecholic Berbines from *Annona spinenscens*. *J. Nat. Prod.* **59** 438-440.
- Figueroa, S.P. ; Rivera, V.L. (1994) Estudio del Efecto Tripanocida de Compuestos Aislados de *Salvia microphilia* y *Salvia keerlii*

Tesis de licenciatura Facultad de Química UNAM.

- Fujita, E. ; Nagao, Y. ; Node, M. ; Kaneko, K. ; Nakazaswa, S. and Kuroda, H. (1976) Antitumor activity of the isodon Diterpenoids : Structural requirements for the activity. *Experientia*. **32** 203.
- Gardener, R.D. ; Molyneux, J.R. ; James, F.L. ; Panter, E.K. and Stegelmeier, L.B. (1994) Ponderosa Pine Needle-Induced Abortion in Beef Cattle Identification of Isocupressic Acid as the Principal Active Compound .  
*J. Agric. Food Chem.* **42** 756-761
- Hanson, J.R. ( 1984) Diterpenoids Natural Products.  
*Reports I.* 533.
- Himejima, M. ; Hobson, K.R. ; Otsuka, T. ; Wood, D.D. ; and Kubo, I. (1992) Antimicrobial Terpenes from Oleoresin of Ponderosa Pine Tree (*Pinus ponderosa*) a Defense Mechanism Against Microbial Invasion.  
*Journal of Chemical Ecology* **18** 1809-1818
- Hocquemiller, R. ; Cortes, D. ; Arango, G. ; Myint, H. and Cavé, A. (1991) Isolement et synthese de l'espintanol, nouveau monoterpene antiparasitaire.  
*Journal of Natural Products* **54** 445-452
- Kato, T. ; Kabuto, Ch. ; Sasaki, N. ; Tsunagawa, M. ; Aizawa, H. ; Fujita, K. ; Kato, Y. and Kitahara, Y. (1963) Momilactones, Growth Inhibitors from rice, *Oryza sativa*.  
*Tetrahedron Letters*. **39** 3861-3864
- Keith, B.D. (1987) Conifers. Facts on Line Publicationes New York U.S.A.
- Kenneth, S. ; Warren, M.D. ; Adel, A.F. and Mahmoud M.D. (1984) Tropical and Geographical Medicine. pp 253-267 Ed. Mc Graw Hill Book Company
- Kubo, U. ; Taniguchi, M. and Kubota, T. (1978) The biological activities of the Isodon Diterpenoids  
*Rev. Latinoamer. Quím.* 157-162
- Levine, A. et al (1980) Parasit pp 766-767 Committee on Sistematics and Evolution
- Markell, K:R. ; Voge, M. (1986) Medical Parasitology pp. 112-121 Ed. W.B. Saunders Company
- McCarthy, M (1996) Drug eradicates Chagas'Parasite in Mice.

- Morris, K. M. ; Karim, A. and Marcks C. (1969) Tumor Inhibitors XLVIII Taxodione and Taxodone, Two Novel Diterpenoid Quinone Methide Tumor Inhibitors from *Taxodium distichum*. *J. Org. Chem.* **34** 3912
- Morris, K. M. ; Court, W.A. ; Daley, R. G. ; Gilmore, C. J. And Bryan, R. F. (1972) Triptolide, Novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Trypterigium wilfordii*. *J. Am. Chem. Soc.* **90** 7194.
- Newman, A. A. (1972) Chemistry of Terpenes and Terpenoides Academic Press, London.
- Nicoletti, M. ; Serafitni, M. and de Albuquerque J.F.C. (1988) A new Diterpene from *Echinolea inflexa*. *Rev. Latinoamer. Quim.* **19** 13-14
- Perry, J.P (1991) The Pines of México and Central América pp. 172-175. Ed Timber. Portlan Oregon E.U.
- Pinto, D.J. (1992) Epidemiology of Chagas disease in Chagas Disease (Wendel, S. ; Brener, Z. ; Camargo, M.E. ; Rassi, A. Edts.) ISBT Brazil Sao Paulo
- Rodríguez, R.R. ; Lane, E.J. ; Carter, E. C. ; Bogitsh, J. B. ; Singh, K.P. ; Zimmerman, J. L. ; Molenda, J.J. and Jones, M.M. (1995) Chelaing Agent Inhibition of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes *In Vitro*. *Journal of Inorganic Biochemistry* **60** 277-288
- Ross, W.D. ; Birgersson, G. ; Espelie, E.K. and Berisford, C:W: (1995) Monoterpene Emissions and Cuticular Lipids of Loblolly and Slash Pines: Potential Bases for Oviposition Preference of the Nantucket pine tip moth *Canadian Journal Botany* **73** 21-25
- San Feliciano , A. and Lopez, J.L (1991) Recent Chemistry of Conifer Terpenoids in : Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids (Harborne, J.B. and Barberan, T. Eds.) Pp 1-27 Clarendon Press. Oxford E.U.
- Sánchez, A. V. (1986) Poblaciones Naturales de *Pinus oocarpa* schiede de Chiapas y Oaxaca. Tesis de Licenciatura, UNAM México

- Söderberg, A.T. ; Johansson, A. and Rolf, G. (1995) Toxic Effects of Some Conifers Resin Acids and Tea Tree Oil on Human Epithelial and Fibroblast Cells. *Toxicology* **107**, 99-109
- Soejarto, D. D. ; Kinghorn, A.D. and Farnsworth, N.R. (1982) Potential Sweetening Agents of Plant Origin III Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf Herbarium Samples for Sweetness. *Journal of Natural Products* **45** 590.
- Tay, Z.J. ; Aguilera, L.R. ; Velasco, C.O. y Gutierrez, Q.M. (1991) Parasitología Médica . Ed Francisco Méndez Cervantes. México D:F:
- Velasco, C.O. ; Valdespino, G.J.L. ; Tapia, C.R. ; Salvatierra, B. ; Guzmán, B.C. ; et al (1992) Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública de México* **34** 186-196
- Zamora, S.C. (1981) Algunos Aspectos Sobre *Pinus oocarpa schiede*, en el Estado de Chiapas . *Ciencia Forestal* **6** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales de México