



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

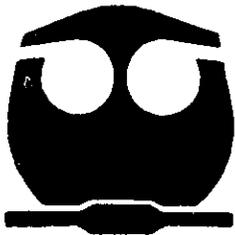
FACULTAD DE QUIMICA

FLAVONOIDES CON ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA in vitro CONTRA Entamoeba histolytica y Giardia lamblia DE LAS PARTES AEREAS DE Helianthemum glomeratum Lag.

2964-36

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: ANTONIO DELGADO DE ANDA



MEXICO, D.F.

2001



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Mata Essayag Rachel  
VOCAL: Rivero Cruz Blanca Estela  
SECRETARIO: Calzada Bermejo Fernando  
1er. SUPLENTE: Acevedo Arteaga Laura Alicia  
2do. SUPLENTE: Ramírez Ahumada María del Carmen

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación Médica en  
Farmacología de Productos Naturales  
Hospital de Pediatría C.M.N.S.XXI.

ASESOR: Dr. Fernando Calzada Bermejo

SUSTENTANTE: Antonio Delgado de Anda

"Si todas las ciencias se extienden por el estudio, sí los nuevos descubrimientos sólo se consiguen a fuerza de búsqueda, ¿por qué la historia no podría esperar de igual modo ventajosas mejoras en el conocimiento de estos hechos, que únicamente serían como en otra parte el fruto de nuevos estudios?."

Marqués de Sade

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través del proyecto 28328-N

A la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales del Hospital de Pediatría del CMN S XXI (IMSS) por permitirme realizar el trabajo de tesis.

Al Dr. Fernando Calzada Bermejo por dirigir esta tesis y contribuir en gran medida a mi formación "gracias por su confianza".

A la Q. Mariana Meckes Fischer por las facilidades otorgadas en la elaboración del presente trabajo.

Al M. en C. Roberto Cedillo Rivera por el apoyo otorgado para la realización de las pruebas biológicas.

A la B. Amparo Tapia por su apoyo en la realización de las pruebas biológicas.

A la M. en C. Abigail Aguilar por la ayuda prestada en la clasificación botánica de la especie vegetal estudiada.

A la M. en C. Claudia Velázquez González por la ayuda incondicional prestada en la elaboración de esta tesis.

A los Sinodales Dra. Rachel Mata Essayag y a la M. en C. Rivero Cruz Blanca por la revisión y comentarios a este manuscrito.

A la UNAM.

## DEDICATORIAS

A mis padres:

Antonio y Virginia; por el espacio que me dan en sus vidas.

A mis hermanos:

Emmanuel y Mario; por compartir nuestros logros y fracasos.

A mi cuñada y sobrina:

Maru y Maira; por ser parte integral en el cariño que une a mi familia.

A mis hijos:

En especial a Jessica y Fernanda; por ser esas mujercitas que alegran mi vida.

A mi compañera:

Guadalupe; por existir.

A mis abuelos:

Gregorio y Chelo, Angel y Victoria; por la herencia que tengo de ellos en mis caracteres.

A mis tíos:

En especial a Pepe, Lucía ( gracias por el apoyo moral) y Virginia; por su cariño.

A mis primos:

En especial a Agustín, Francisco y Alejandro; por que a pesar de la distancia sigue existiendo afecto.

A mis amigos (amiguitos):

Guadalupe, Laura H., Claudia L., Lucía Verónica, Elizabeth, Alma Delia, Mónica, Sara, Carmen, Miriam, Martha, Viviana, Fabiola, Mixi, Alma Rosa, Raquel, Lourdes, José, Tenko, Jorge F., Fernando C., Antonio C., Luis J., Habraham, Villa, Tesoro, Jasso y en especial a Claudia Velázquez G. por su amistad.

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	iv
Lista de espectros.....	vii
Lista tablas.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de esquemas.....	x
Resumen.....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1. Generalidades de <i>Helianthemum glomeratum</i> Lag.....	3
2.2. Generalidades sobre metabolismo microbiano intestinal de los flavonoides.....	10
<b>3. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>14</b>
3.1 Objetivos específicos.....	14
<b>4. METAS.....</b>	<b>15</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>6. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>16</b>
6.1. Material vegetal.....	16

6.2.	Preparación del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>H. glomeratum</i> Lag.....	16
6.3.	Ensayo biológico.....	17
6.4.	Análisis cromatográfico.....	19
6.5.	Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.....	21
6.6.	Fraccionamiento secundario de la fracción F3.....	23
6.6.1.	Purificación de camperol 3-O-(3'',6'' di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido <b>7</b> .....	25
6.6.2.	Purificación de tilirósido <b>3</b> .....	25
6.6.3.	Purificación de los compuestos astragalina <b>8</b> , quercitrina <b>9</b> e isoquercetina <b>10</b> .....	26
6.7.	Caracterización de los compuestos aislados.....	26
6.7.1.	Equipos utilizados.....	26
6.7.2.	Hidrólisis ácida de los flavonoides.....	27
7.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	30
7.1.	Identificación de los compuestos obtenidos.....	31
7.1.1.	Identificación de tilirósido <b>3</b> , camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido <b>7</b> y astragalina <b>8</b> .....	31

7.1.2. Identificación de quercitrina 9 e isoquercetina 10.....	41
7.2. Resultados de la actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados de <i>Helianthemum glomeratum</i> Lag.....	49
8. CONCLUSIONES.....	51
9. BIBLIOGRAFÍA.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
HCl	Ácido clorhídrico
cm	Centímetros
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
c	Concentración
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria cincuenta
conc	Concentrado
<i>j</i>	Constante de acoplamiento
CCF	Cromatografía en capa fina
cbp	Cuanto baste para
°C	Grados centígrado
d	Doblete
dd	Doble de doble
DMSO	Dimetil sulfóxido
δ	Desplazamiento químico
<i>E.</i>	<i>Entamoeba</i>
<i>G.</i>	<i>Giardia</i>
g	Gramo
glu	Glucosa

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

h	Hora
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
IMSS	Instituto Mexicano de Seguridad Social
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{g}/\text{mL}$	Microgramo por mililitro
mg	Miligramo
m	Multiplete
NCI	National Cancerology Institute
NHI	National Health Institute
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
ppm	Partes por millón

## LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

%	Por ciento
p. f.	Punto de fusión
ramn	Ramnosa
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de Hidrógeno
SSA	Secretaria de Salubridad y Asistencia
s	Singulete
TMS	Tetrametilsilano
TAS	Toxicidad Artemia salina
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1	Espectro en el UV de la astragalina <b>8</b> .....	37
Espectro 2	Espectro de UV del tilirósido <b>3</b> .....	37
Espectro 3	Espectro de UV del camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p- cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido <b>7</b> .....	37
Espectro 4	Espectro en el IR de la astragalina <b>8</b> .....	38
Espectro 5	Espectro de IR del tilirósido <b>3</b> .....	38
Espectro 6	Espectro de IR del camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p- cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido <b>7</b> .....	38
Espectro 7	Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la astragalina <b>8</b> .....	39
Espectro 8	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del tilirósido <b>3</b> .....	39
Espectro 9	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p- cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido <b>7</b> .....	39
Espectro 10	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de la astragalina <b>8</b> .....	40
Espectro 11	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del tilirósido <b>3</b> .....	40

## LISTA DE ESPECTROS (continuación)

Espectro 12	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p- cumaroil)-β-D-glucopiranosido <b>7</b> .....	40
Espectro 13	Espectro en el UV de la quercitrina <b>9</b> .....	45
Espectro 14	Espectro en el UV de la isoquercetina <b>10</b> .....	45
Espectro 15	Espectro en el IR de la quercitrina <b>9</b> .....	46
Espectro 16	Espectro en el IR de la isoquercetina <b>10</b> .....	46
Espectro 17	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la quercitrina <b>9</b> .....	47
Espectro 18	Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la isoquercetina <b>10</b> .....	47
Espectro 19	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la quercitrina <b>9</b> .....	48
Espectro 20	Espectro de RMN <sup>13</sup> C de la isoquercetina <b>10</b> .....	48

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	20
Tabla 2	Resultados de actividad antiprotozoaria del fraccionamiento del extracto metanólico.....	21
Tabla 3	Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de la fracción F3.....	23
Tabla 4	Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos <b>8</b> , <b>3</b> y <b>7</b> .....	31
Tabla 5	Desplazamientos químicos de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de astragalina <b>8</b> , tilirósido <b>3</b> y camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p-cumaróil)- $\beta$ -D-glucopiranosido <b>7</b> .....	36
Tabla 6	Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos <b>9</b> y <b>10</b> .....	41
Tabla 7	Desplazamientos químicos de RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de la quercitrina <b>9</b> e isoquercetina <b>10</b> .....	44
Tabla 8	Resultados de actividad antiprotozoaria de los compuestos <b>3</b> y <b>7-10</b> .....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Helianthemum glomeratum</i> Lag.....	5
Figura 2	Compuestos aislados de <i>H. glomeratum</i> .....	9
Figura 3	Degradación de flavonoides por la flora intestinal bacteriana.....	11
Figura 4	Hidrólisis de flavonoides por la flora intestinal bacteriana.....	12
Figura 5	Hidrólisis ácida de los compuestos <b>8</b> , <b>3</b> y <b>7</b> .....	28
Figura 6	Hidrólisis ácida de los compuestos <b>9</b> y <b>10</b> .....	29
Figura 7	Estructuras de los compuestos <b>8</b> , <b>3</b> y <b>7</b> .....	35
Figura 8	Estructuras de los compuestos <b>9</b> y <b>10</b> ....	43

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Obtención del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>H. glomeratum</i> Lag...17
Esquema 2	Fraccionamiento del extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de <i>H. glomeratum</i> Lag.....22
Esquema 3	Separación y purificación de la fracción de F3 (AcOEt).....24

## RESUMEN

El fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de *H. glomeratum* Lag, empleando como bioensayo de seguimiento la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. lamblia*, así como técnicas de separación y purificación (cromatografía en columna abierta y cromatografía en placa preparativa), condujo al aislamiento de cinco flavonoides: el tilirósido **3**, el camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido **7**, la astragalina **8**, la quercitrina **9** y la isoquercetina **10**. De los cinco compuestos aislados el tilirósido fue el compuesto más activo contra ambos protozoarios. Los valores de  $CI_{50}$  fueron de 17.45  $\mu\text{g/mL}$  para *E. histolytica* y de 17.36  $\mu\text{g/mL}$  para *G. lamblia*. La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y por comparación directa con muestras disponibles en el laboratorio.

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el estudio multidisciplinario de las plantas medicinales ha recibido un gran apoyo por organizaciones como la OMS, OPS, INC y NHI. Los compuestos obtenidos en estas investigaciones juegan un papel muy importante en el desarrollo de nuevos fármacos clínicamente útiles en la terapéutica para el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer, paludismo, tuberculosis, diabetes y VIH, entre otros,<sup>1</sup> en la actualidad, aproximadamente un 80 % de los medicamentos considerados en los programas de salud primaria, provienen de plantas por lo que resulta evidente que las plantas medicinales siguen siendo una fuente importante de principios activos de interés terapéutico.<sup>2-4</sup>

En el caso particular de México, el uso de plantas medicinales para tratar una gran variedad de enfermedades tiene sus orígenes en la época prehispánica.<sup>5</sup> El estudio de la flora nacional resulta interesante si consideramos que el sistema de salud

(IMSS, ISSSTE, SSA) no tiene la cobertura total de su población y por consecuencia, varias enfermedades constituyen un problema de salud pública tales como las diarreas, el paludismo, la enfermedad de chagas, la tuberculosis, etc. El conocimiento y la validación de las propiedades terapéuticas de sus recursos vegetales puede ser una alternativa para la obtención de compuestos bioactivos, útiles en el desarrollo de fármacos que permitan resolver estos problemas de salud. La abundancia y diversidad de los recursos naturales del país, son fuente potencial para el hallazgo de estos compuestos con aplicación en la terapéutica.<sup>6,7</sup>

Con base en lo antes expuesto, la presente tesis profundiza en los estudios químico y farmacológico de las partes aéreas de *H. glomeratum*, especie a la cual se le han demostrado anteriormente propiedades antiprotozoarias.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de *Helianthemum glomeratum* Lag.

*Helianthemum glomeratum* Lag. (Sin: *Halimium glomeratum*) (Figura 1), es una planta perteneciente a la familia *Cistaceae* la cual está constituida por ocho géneros y 200 especies. Los miembros de esta familia son hierbas o arbustos que crecen sobre gredas.<sup>8,9</sup>

La planta es conocida con los nombres populares de cenicilla, cenicillo, chinilla, hierba del loro, hierba de la gallina, tacato, "tan vomol", "takare yoxi", "tantan wamol", "tan bak wamal lit", "K'anal nick te", "k'anal nich wach", "vach't'ul momol", "vach'te'vomol", "vach'vomol", pata de paloma, "wach' wach' wamal", "wach o ijk al alajch te'", "lumil wajch'te", juanita, cenicillo amarillo, cenicillo negro, cilantrillo de monte, damiana, flor del golpe, hierba ceniza, hierba del moro, Juana-Juana, palo cenizo, Santa Martha, tomillo de monte, "takari", "nehnexicxihuitl" y "cachanowa".<sup>8-10</sup>

*H. glomeratum*, es una especie endémica de México, se encuentra distribuida en los estados de Querétaro, Estado de México, Michoacán, Aguascalientes, Chihuahua, Nayarit y Chiapas. En este último, la especie crece en los bosques mixtos de pino-ébanos con climas templados a 1750-3900 m sobre el nivel del mar.<sup>9-10</sup>

*H. glomeratum* es un pequeño arbusto de 30 cm de alto con hojas alternantes de color verde pubescente de 7-15 mm de longitud, las flores son amarillas, efímeras, de 5 mm de longitud, el fruto es una cápsula de 3 válvulas con numerosas semillas café lenticulares.<sup>8-11</sup>

Se utiliza en las prácticas médicas populares para tratar desórdenes del aparato digestivo como disentería, diarrea, diarrea con moco, dolor de la boca del estómago, refrescar los intestinos, cólicos y vómitos. Con menor frecuencia se le utiliza para eliminar granos en la piel, la biliosidad, los corajes, el dolor de parto, la tos, la calentura y para hacerles estómago a los recién nacidos.<sup>9,10</sup>

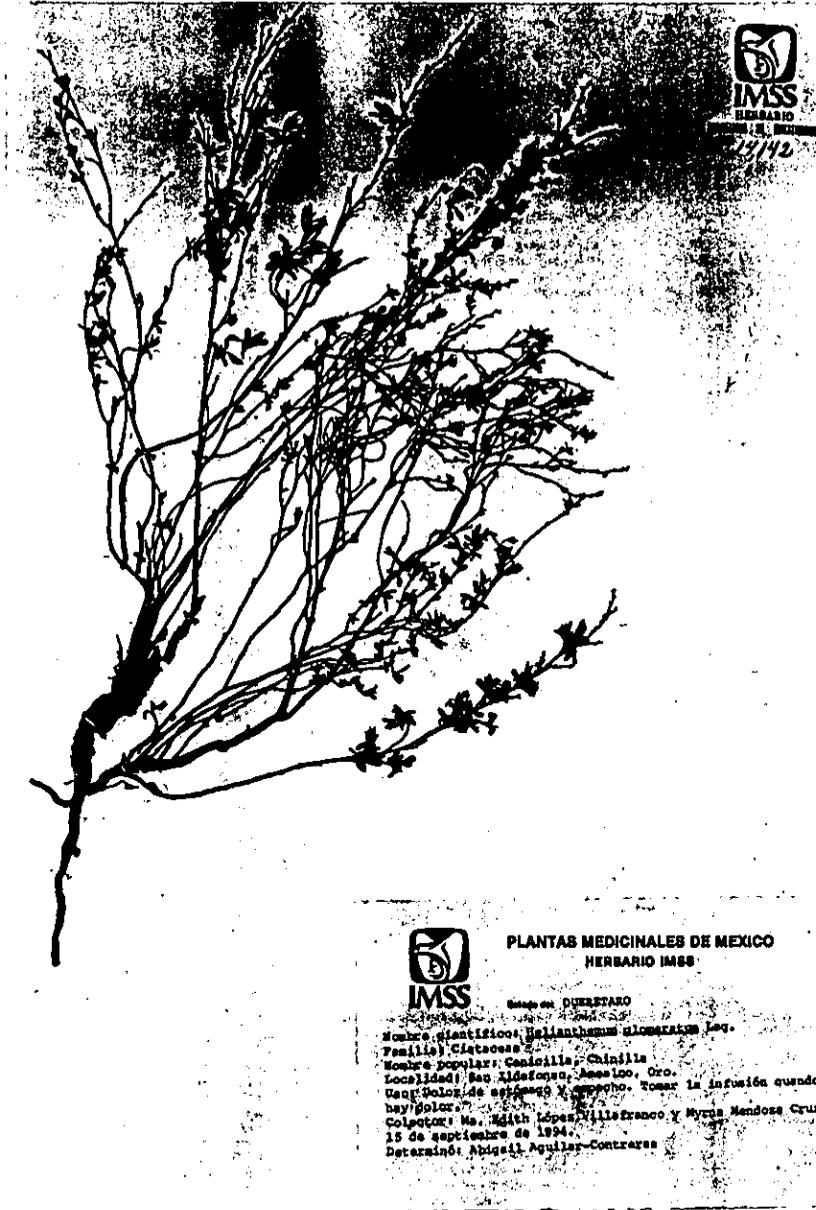


Figura 1. *Helianthemum glomeratum* Lag.

*H. glomeratum* esta incluida dentro de las 38 especies representativas de la medicina tradicional maya de los altos de Chiapas para tratar las enfermedades gastrointestinales habituales de la población. Es una de las seis especies que utilizan con frecuencia los "Tzotziles" para tratar la diarrea, y para los "Tzeltales" constituye el segundo recurso en importancia como vermífugo.<sup>8</sup>

Los indígenas "Tzeltales y Tzotziles" toman como agua de uso el té de las hojas o la raíz, para tratar la diarrea con moco; la planta entera para la diarrea crónica y disentería. Frecuentemente para lograr una mejor efectividad mezclan a *H. glomeratum* con otras plantas como *Baccharis serraefolia*, *B. trinervis*, *Lantana camara*, *L. hispida*, *Cyperus hermaphroditas*, *Psidium guajava*, *Ageratina sp.*, *Lepechinia sp.* o *Calliandra sp.* Cuando se emplea como remedio antiparasitario, la planta se combina con *Chenopodium ambrosioides* o semillas de *Cucurbita ficifolia*.<sup>8</sup>

Estudios farmacológicos previos del extracto metanólico de *H. glomeratum* han demostrado sus propiedades antiprotozoarias, antibacterianas y antifúngicas.<sup>12-16</sup> En el primer caso el extracto resultó activo contra los protozoarios *E. histolytica* y *G. lamblia* ( $CI_{50}$ = 158.22  $\mu$ g/mL y 62.92  $\mu$ g/mL, respectivamente). En el segundo estudio el extracto demostró efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella sp*, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*. En el último caso el extracto resultó activo contra *Candida albicans*.

Desde el punto de vista fitoquímico *H. glomeratum* ha sido objeto de tres investigaciones realizadas por Calzada y col.<sup>17-19</sup> El primer estudio se efectuó sobre un extracto de las partes aéreas de la planta empleando como guía biológica la prueba de la letalidad para la *Artemia salina*, esta investigación permitió el aislamiento e identificación de los flavonoides, camperol 1, quercetina 2 y tilirósido 3. Siendo el camperol el compuesto activo (TAS  $CI_{50}$ = 6.16  $\mu$ g/mL). En este mismo trabajo se demostraron las propiedades

antiprotozoarias del camperol y tilirósido contra *E. histolytica* ( $CI_{50} = 9.7 \mu\text{g/mL}$  y  $19.5 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente). El segundo trabajo realizado con la raíz y empleando como ensayo biológico la determinación de la actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* y *G. lamblia* permitió el aislamiento de (-) epigalocatequina **4** como principio activo (*E. histolytica*  $Cl_{50} = 6.89 \mu\text{g/mL}$  y *G. lamblia*  $Cl_{50} = 8.06 \mu\text{g/mL}$ ). La última investigación se realizó con las partes aéreas de la planta y permitió el aislamiento de, tilirósido **3**, gluco- $\beta$ -sitosterol **5** y la galocatequina-( $4\beta \rightarrow 8$ )-epigalocatequina **6**, (Figura 2). El último compuesto mostró actividad contra varias cepas enteropatógenas causantes de diarrea: *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* ogawa, *V. cholerae* inaba, *Shigella flexneri* T<sub>2</sub>, *S. dysenteride* T<sub>3</sub>, *Escherichia coli* ATCC, *E. coli* LT++/ST-, *Salmonella typhi*, *S. gpo* B<sub>1</sub>, *S. gpo* B<sub>2</sub> y *S. gpo* D.<sup>19</sup>

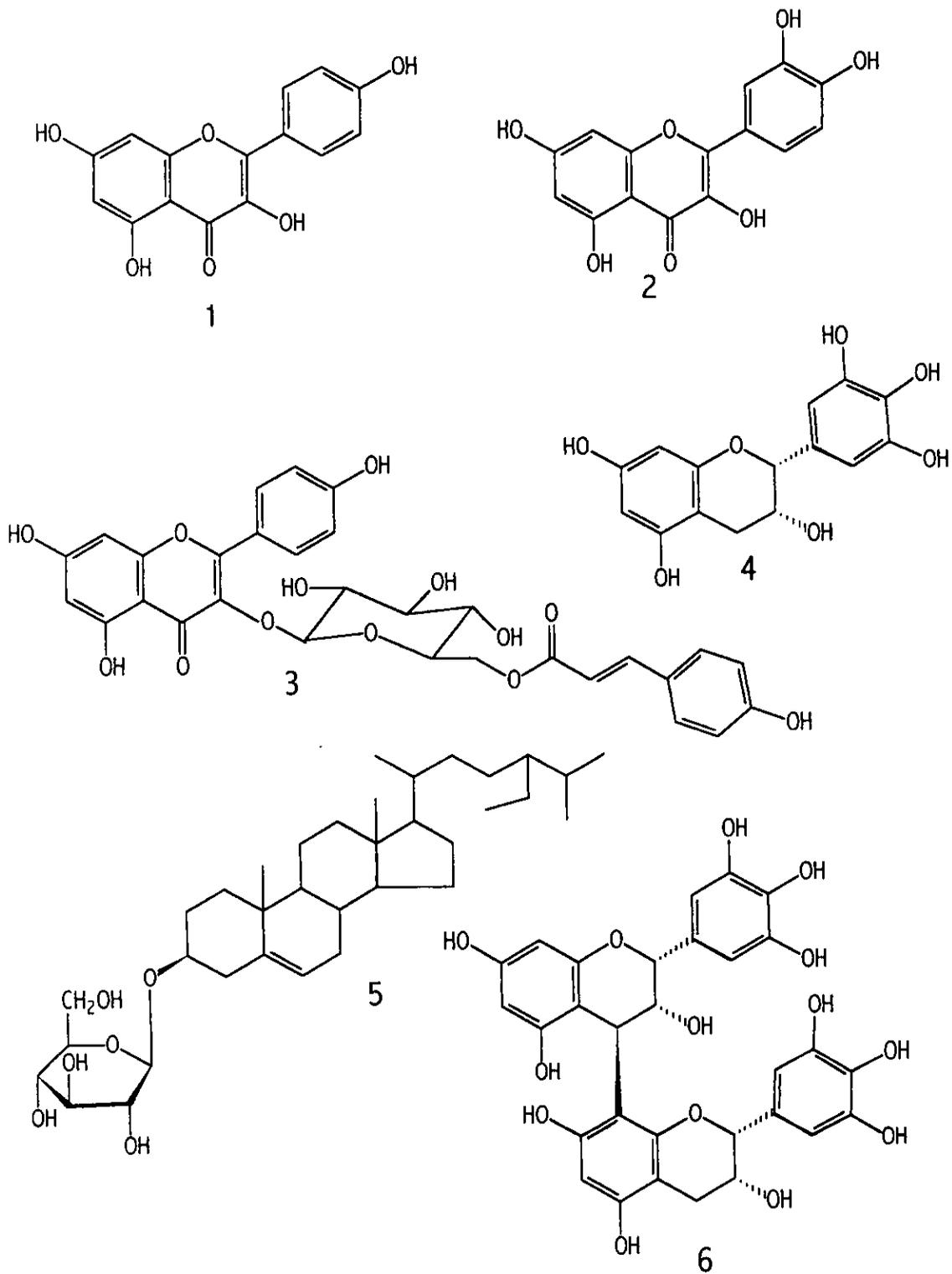


Figura 2. Compuestos aislados de *H. glomeratum*.

## 2.2. Generalidades sobre el metabolismo microbiano intestinal de los flavonoides.

Los escasos estudios del metabolismo microbiano intestinal de los flavonoides han demostrado: a) que los flavonoides son biotransformados a varios derivados fenólicos; b) que los glicósidos de flavonoides son hidrolizados a su aglicona. En el primer caso la degradación ocurre por ruptura del anillo C para dar origen a derivados del fluoroglucinol y derivados del ácido cinámico (Figura 3).<sup>20-22</sup>

Los experimentos de metabolismo han sido realizados incubando el flavonoide con bacterias del tipo *Bacteroides fragilis ssp*, *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum*, *B. longum*, *B. pseudolongum*, *Clostridium butyricum*, *Cl. innocuum*, *Cl. perfringens*, *Escherichia coli*, *Fussobacterium nucleatum*, *Gaffkya anaerobia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. xylosus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *P. intermedius*,

*Proteus mirabilis*, *Ruminococcus sp*, *Streptococcus faecalis* y *Veillonella parvula ssp.*<sup>23,24</sup>

En el caso de la hidrólisis, tanto los C-glicósidos como los O-glicósidos dan origen a la aglicona correspondiente (Figura 4).<sup>21,23,25</sup>

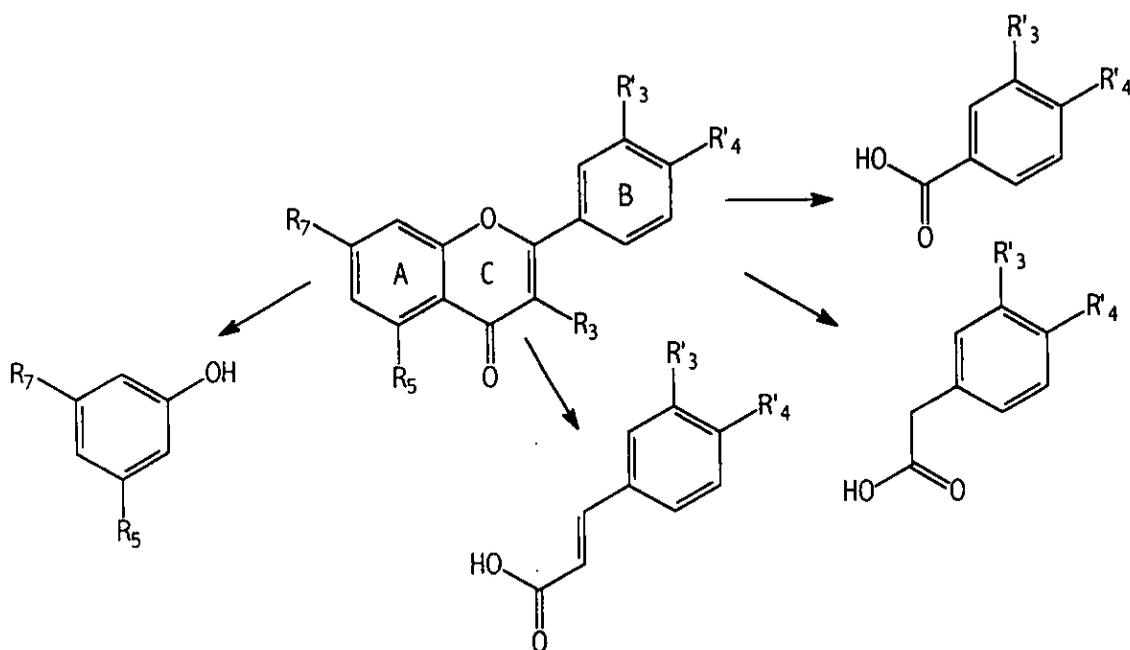


Figura 3. Degradación de flavonoides por la flora intestinal bacteriana

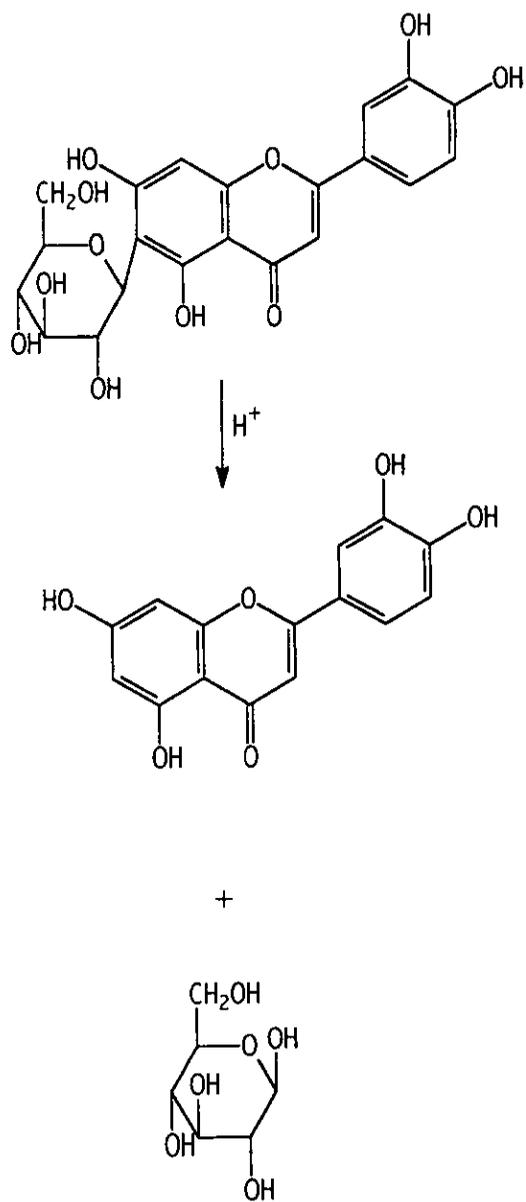


Figura 4. Hidrólisis de flavonoides por la flora intestinal bacteriana.

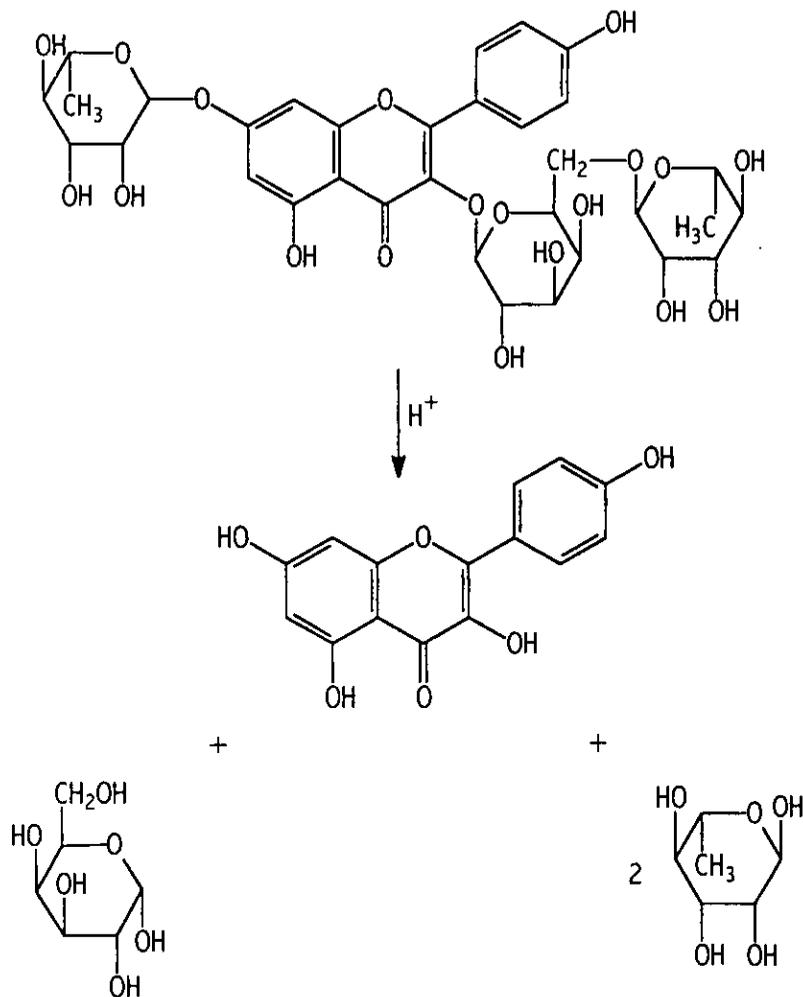


Figura 4. Hidrólisis de flavonoides por la flora intestinal bacteriana (continuación).

### 3. OBJETIVO GENERAL

Obtener e identificar los compuestos con actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* del extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag.

#### 3.1. Objetivos específicos

Con la finalidad de dar cumplimiento al objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos.

**3.1.1** Realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de *H. glomeratum*, empleando como prueba de monitoreo la determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra trofozoitos de *E. histolytica* y *G. lamblia*.

**3.1.2** Identificar estructuralmente, los compuestos con propiedades antiprotozoarias presentes en el extracto metanólico, mediante técnicas espectroscópicas, espectrométricas y químicas.

#### 4. METAS

4.1 Contribuir al conocimiento fitoquímico y farmacológico de la especie vegetal *H. glomeratum* Lag.

4.2 Formación de recursos humanos en el área de la investigación química y farmacológica de las plantas medicinales.

#### 5. HIPÓTESIS

Si *Helianthemum glomeratum* Lag, es una planta con propiedades amebicidas y giardicidas *in vitro* por lo tanto debe ser una fuente de compuestos con propiedades inhibitorias contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.

## **6. PARTE EXPERIMENTAL**

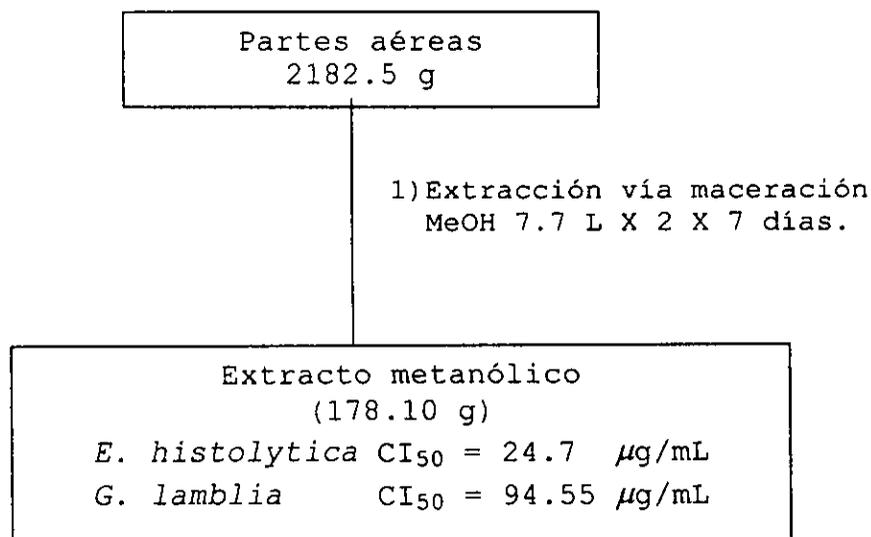
### **6.1. Material vegetal.**

Las partes aéreas del material vegetal utilizado (2182.5 g) fueron recolectadas en el estado de Querétaro, México, en Septiembre de 1994. Una muestra de referencia (voucher-14142) se depositó en el Herbario IMSSM y fue identificada por la M. en C. Abigaíl Aguilar Contreras.

### **6.2. Preparación del extracto metanólico de las partes aéreas de *H. glomeratum* Lag.**

El material vegetal se desecó a temperatura ambiente y posteriormente se molió en un molino manual.

El extracto de las partes aéreas se preparó mediante maceración, utilizando MeOH como disolvente de extracción (7.7 L x 2) obteniéndose 178.10 g de extracto metanólico (Esquema 1).



Esquema 1. Obtención del extracto metanólico de las partes aéreas de *H. glomeratum* Lag.

### 6.3. Ensayo biológico.

La determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra los trofozoítos de *Entamoeba histolytica* y/o *Giardia lamblia* del extracto, fracciones combinadas y compuestos puros, se realizó siguiendo el bioensayo descrito por Calzada y col.<sup>26</sup>

Las cepas de los microorganismos utilizados en el ensayo fueron *Entamoeba histolytica* (HMI-IMSS) y *Giardia lamblia* (IMSS:0989:1). La cepa de *Entamoeba histolytica* fue mantenida en medio TYI-S-33 adicionado

con 10 % de suero de bovino y *Giardia lamblia* fue cultivada en medio modificado TYI-S-33 adicionado con 10 % de suero de ternera. Ambas cepas fueron mantenidas axénicamente y para el ensayo fueron empleadas en fase de crecimiento logarítmico.

Las muestras (extracto, fracciones y compuestos puros), se disolvieron en DMSO y se ajustaron con medio TYI-S-33 a concentraciones adecuadas. Posteriormente se transfirieron a 5 tubos (con 4 mL de medio c/u) de manera independiente 20, 40, 80, 120, 160  $\mu$ L de la solución a evaluar; los cuales correspondían a concentraciones de 25, 50, 100, 150, 200  $\mu$ g/mL del compuesto, respectivamente. Cuando fue necesario se realizaron las diluciones requeridas.

A los tubos anteriormente preparados, se les adicionó el inóculo del trofozoito en prueba, *Entamoeba histolytica* o *Giardia lamblia* (aproximadamente  $6 \times 10^3$  trofozoitos/mL y  $5 \times 10^4$  trofozoitos/mL, respectivamente). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 48 hrs. Cada prueba incluyó metronidazol (Sigma) y

emetina (Sigma) como controles positivos, un control (medio de cultivo más DMSO y trofozoitos) y un blanco (medio de cultivo).

Transcurrido el tiempo de incubación, 50  $\mu\text{L}$  de cada tubo de cultivo se subcultivaron en medio fresco y se determinó la viabilidad de las células por cuenta directa al microscopio. Los resultados se procesaron mediante un análisis probit para calcular la concentración inhibitoria cincuenta ( $\text{CI}_{50}$ ). La prueba se realizó por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces.

#### **6.4. Análisis cromatográfico.**

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice, (Kieselgel 60 Merck, 0.063-0200 mm, 70-230 mesh ASTM). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) tanto analíticos como preparativos se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (cromatofolios Merck

Alugram sil F<sub>250</sub> 6/UV); placas de vidrio (20 x 20 con gel de sílice 60, Merck, F<sub>254</sub>) y los agentes cromógenos que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente cromógeno	Composición
Sulfato cérico <sup>27</sup>	12g de sulfato cérico 22.2 mL de ac. sulfúrico conc. 350g de hielo.
Tricloruro de aluminio <sup>28</sup>	5g de AlCl <sub>3</sub> y agua cbp 100 mL
Vainillina-ac.sulfúrico <sup>29</sup>	5 mL de ac. sulfúrico conc. y EtOH cbp 100 mL (Sol.I) 1 g de vainillina y EtOH cbp 100 mL (Sol.II)
Fast blue salt <sup>29</sup>	0.5 g de dicloruro de 3,3'- dimetoxi-4,4'-bis difenilo diazonio en 100 mL de agua.

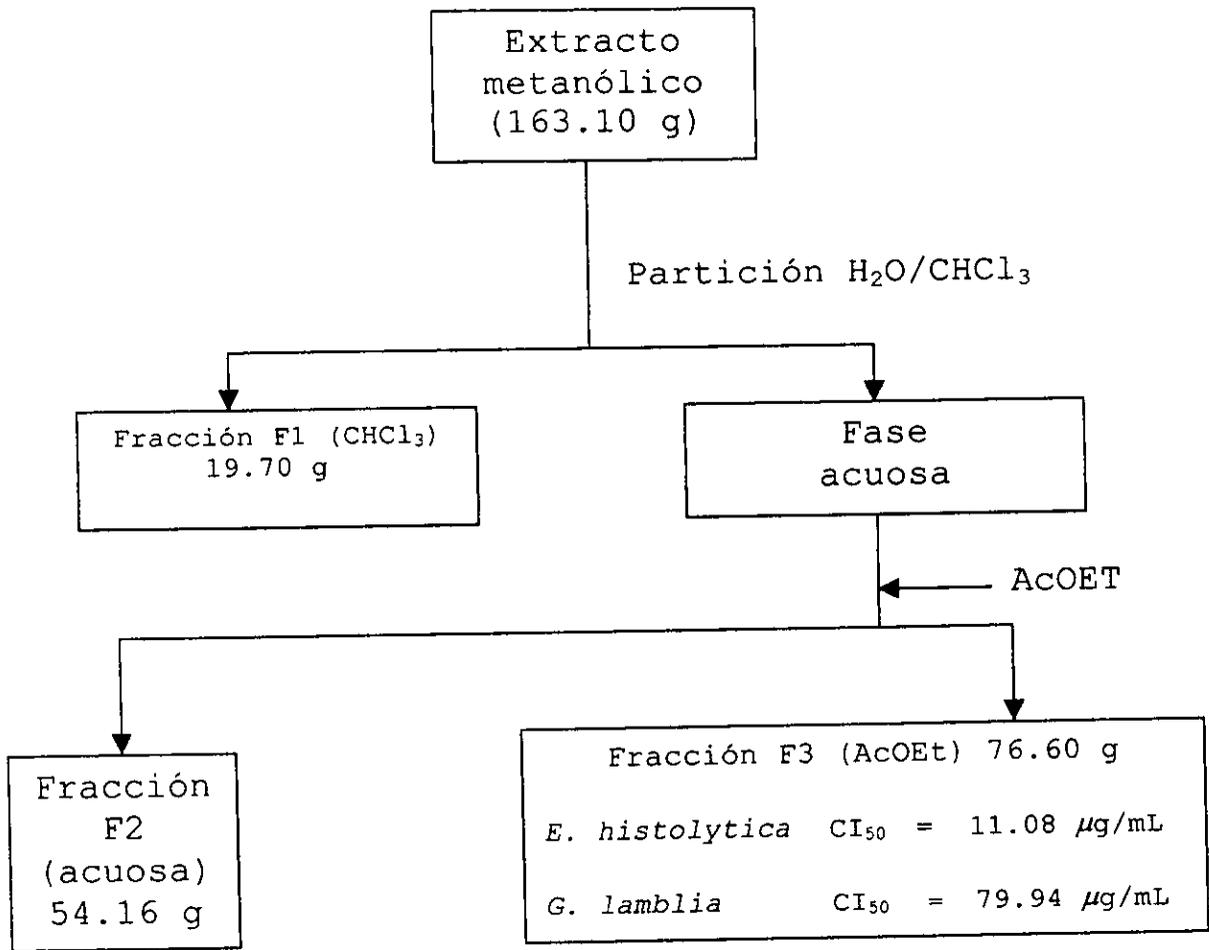
\*En todos los casos, antes de revelar con el agente cromógeno se procedió a visualizar las placas con luz UV con ayuda de una lámpara modelo UV gL-58 a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

## 6.5. Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.

Una parte (163.10 g) del extracto metanólico activo (*E. histolytica*,  $CI_{50} = 24.70 \mu\text{g/mL}$  y *G. lamblia*,  $CI_{50} = 94.55 \mu\text{g/mL}$ ) se disolvió con una mezcla de metanol acuoso al 25 % y se fraccionó mediante un proceso de repartos sucesivos con  $\text{CHCl}_3$  y AcOEt. Como resultado de este proceso se obtuvieron tres fracciones (F1-F3): F1 (cloroformo, 19.70 g, 600 mL x 5), F2 (acuosa, 54.16 g, 932 mL) y F3 (AcOEt, 76.60 g, 900 mL x 3 *E. histolytica*,  $CI_{50} = 11.08 \mu\text{g/mL}$  y *G. lamblia*,  $CI_{50} = 79.94 \mu\text{g/mL}$ ) (Tabla 2 y Esquema 2).

Tabla 2.- Resultados de actividad antiprotozoaria del fraccionamiento del extracto metanólico.

Extracto y fracciones	<i>E. histolytica</i> $CI_{50} (\mu\text{g/mL})$	<i>G. lamblia</i> $CI_{50} (\mu\text{g/mL})$
Extracto MeOH	24.70 (25.05-25.50)	94.55 (94.66-94.47)
Fracción F1 ( $\text{CHCl}_3$ )	88.67 (89.01-88.53)	155.52 (155.75-155.29)
Fracción F2 (acuosa)	41.84 (42.32-41.37)	232.16 (232.66-231.60)
Fracción F3 (AcOEt)	11.08 (22.07-13.80)	79.94 (88.02-79.86)
Metronidazol	0.04 (0.10-0.03)	0.21 (0.27-0.14)
Emetina	1.051 (1.036-1.068)	0.416 (0.415-0.417)



Esquema 2. Fraccionamiento del extracto metanólico  
Obtenido de las partes aéreas de *H. glo-*  
*meratum* Lag.

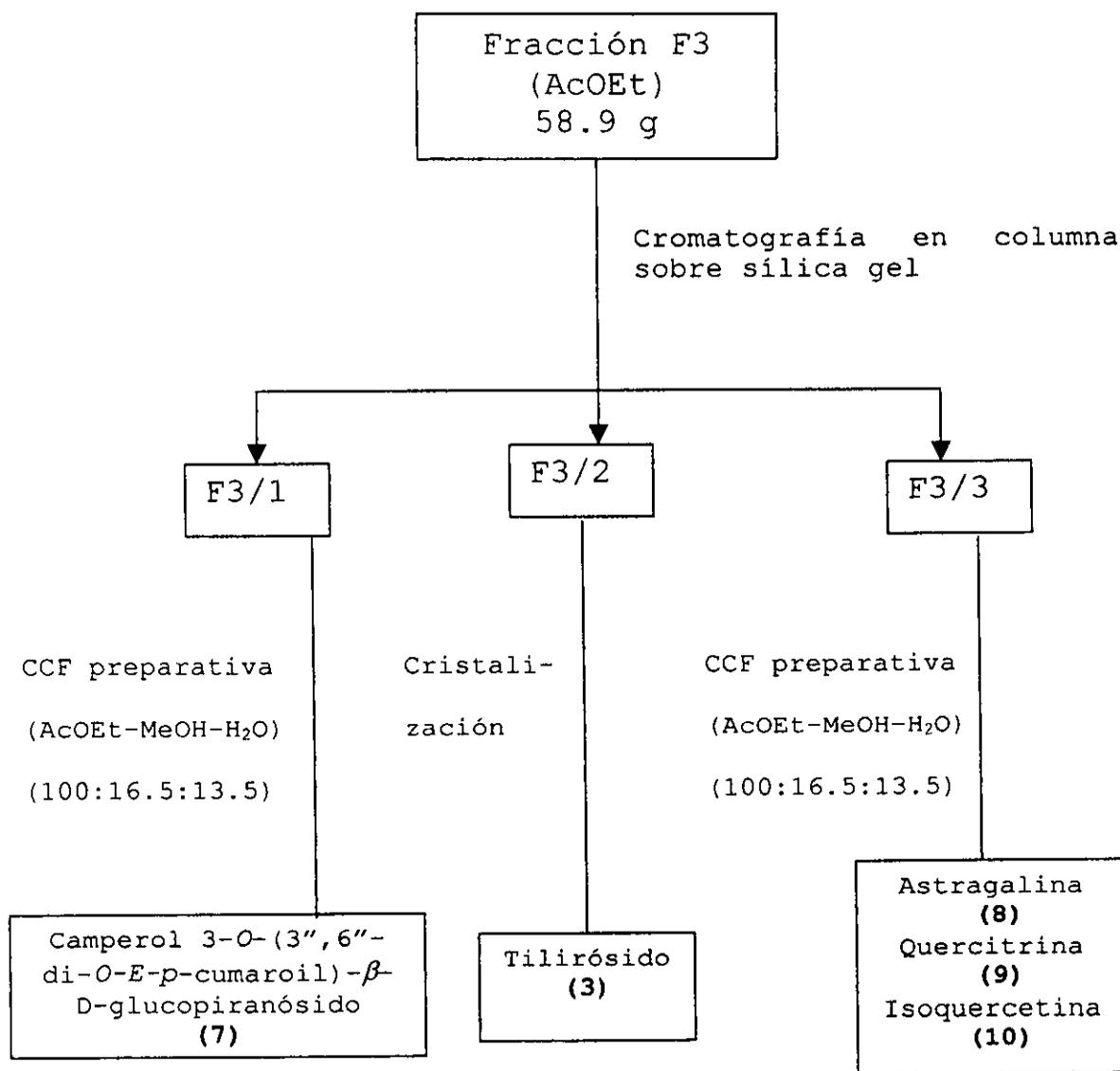
### 6.6. Fraccionamiento secundario de la fracción F3.

Una parte (58.9 g) de la fracción F3 se sometió a un fraccionamiento secundario (Esquema 3) por cromatografía en columna abierta utilizando como fase estacionaria gel de sílice (589 g) y como eluyente mezclas de  $\text{CHCl}_3$ -AcOEt (1:1, 0:1) y AcOEt-MeOH (8:2).

Se obtuvieron un total de 220 fracciones de 50 mL c/u, se reunieron aquellas que mostraron una similitud cromatográfica y se concentraron a presión reducida a 40 °C, obteniéndose un total de tres fracciones secundarias (F3/1-F3/3) (Tabla 3 y Esquema 3).

Tabla 3.- Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de la fracción F3.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas
$\text{CHCl}_3$ - AcOEt	50:50	1-92	F3/1 (1-115)
AcOEt	100	93-126	F3/2 (116-126)
AcOEt-MeOH	80:20	127-220	F3/3 (127-220)



Esquema 3. Separación y purificación de la fracción de F3 (AcOEt).

### 6.6.1 Purificación de camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranósido 7.

La fracción secundaria F3/1 se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa utilizando como fase móvil una mezcla de AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:16.5:13.5). Se obtuvo el camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranósido (102.44 mg) como un sólido amorfo de color verde claro y de punto de fusión de 138 °C.

### 6.6.2 Purificación de tilirósido 3.

De la fracción secundaria F3-2 cristalizó de manera espontánea el tilirósido (1.3528 g) como un sólido amorfo de color amarillo y de punto de fusión de 207-208 °C.

### **6.6.3 Purificación de los compuestos astragalina 8, quercitrina 9 e isoquercetina 10.**

La fracción combinada F3/3 se purificó mediante una cromatografía en capa fina preparativa utilizando como fase móvil una mezcla de AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:16.3:13.5). Se obtuvieron: astragalina (41.72 mg), quercitrina (46.41 mg) e isoquercetina (44.56 mg) como sólidos amarillos con puntos de fusión de 205 °C, 235 °C y 188-190 °C, respectivamente.

### **6.7. Caracterización de los compuestos aislados.**

#### **6.7.1. Equipos utilizados.**

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

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

Los espectros de RMN se obtuvieron en los equipos: Varian UNITY PLUS 300 y Bruker DMX 500, utilizando CD<sub>3</sub>OD y DMSO como disolventes y TMS como referencia interna. RMN-<sup>1</sup>H (500 MHz) y RMN-<sup>13</sup>C (125 MHz).

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

#### **6.7.2. Hidrólisis ácida de los flavonoides.**

Por cada 3 mg de producto se utilizaron 5 mL de una solución de MeOH-HCl<sub>conc</sub> (1:1). La mezcla de reacción resultante se sometió a reflujo por 1 hora y al cabo del tiempo señalado la mezcla de reacción se trabajó de acuerdo a los procesos convencionales.<sup>30</sup>

Las agliconas (camperol **(1)**, quercetina **(2)**, ác. p-cumárico **(11)**) y gliconas (glucosa **(12)** y ramnosa **(13)**) se identificaron por comparación en ccf con estándares Sigma y Merck, respectivamente (Figura 5 y 6).

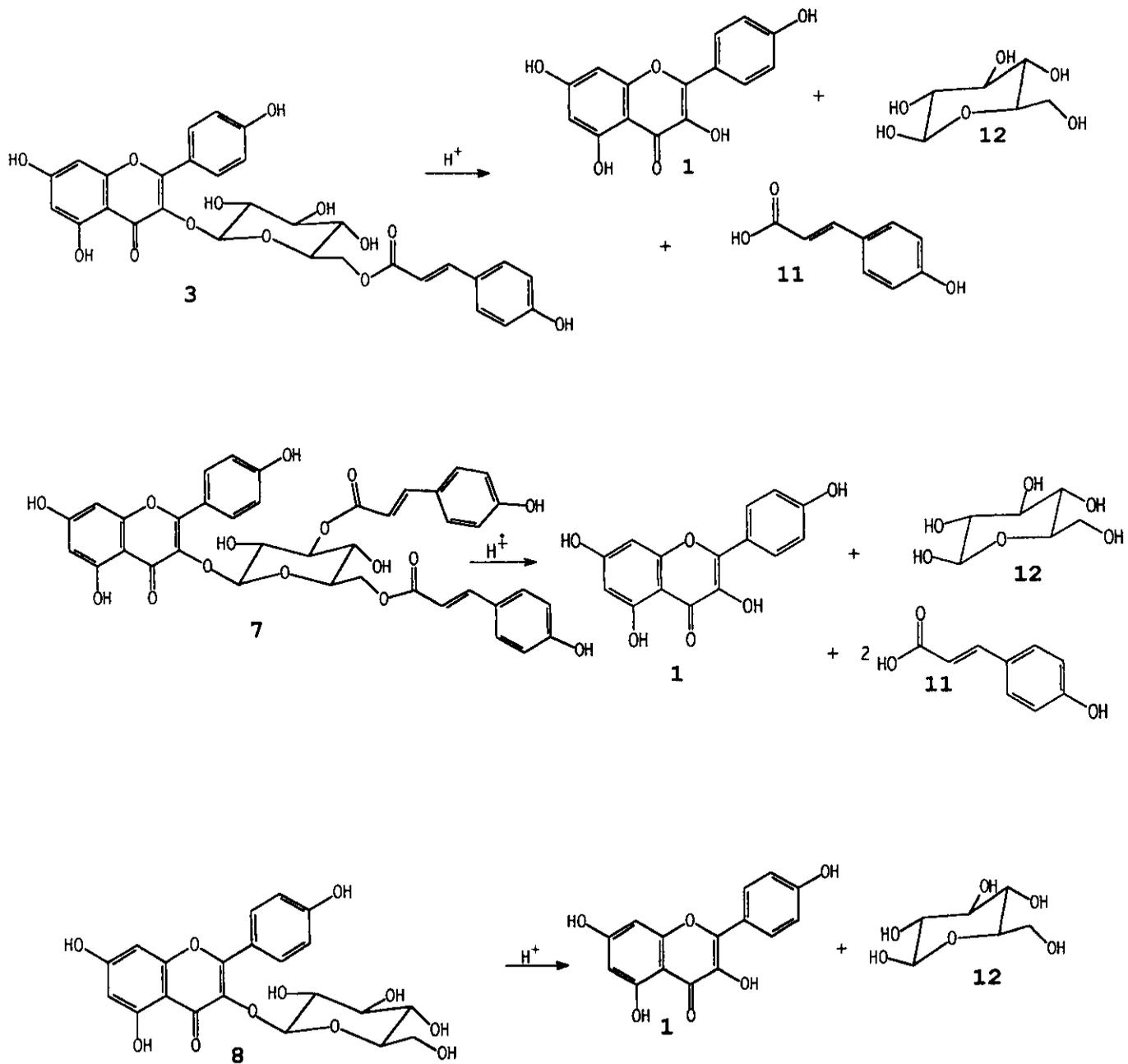


Figura 5. Hidrólisis ácida de los compuestos 8, 3 y 7.

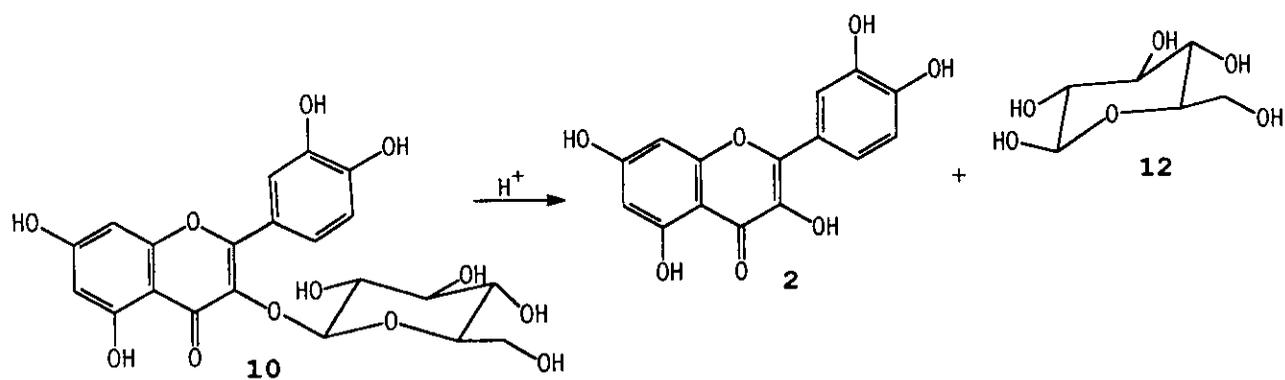
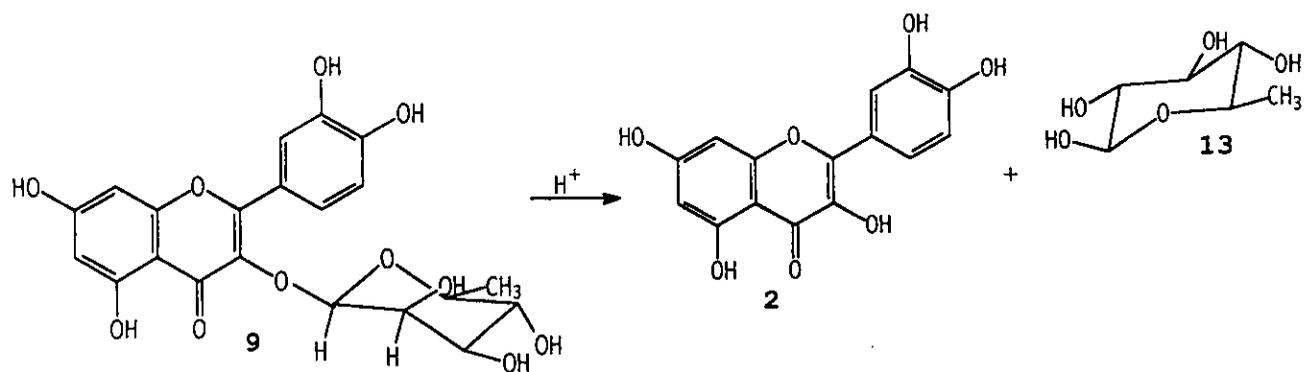


Figura 6. Hidrólisis ácida de los compuestos 9 y 10.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* mediante la determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. lamblia* condujo al aislamiento e identificación de cinco flavonoides tilirósido **3**, camperol 3-O-(3''6''-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido **7**, astragalina **8**, quercitrina **9** e isoquercetina **10**.

Los compuestos aislados fueron identificados mediante el análisis y comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con las descritas en la literatura. A continuación se describe el proceso de identificación de cada uno de los compuestos aislados.

## 7.1. Identificación de los compuestos obtenidos.

### 7.1.1. Identificación de tilirósido 3, camperol 3-O-(3'',6''-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranósido 7 y astragalina 8.

Los compuestos 7, 3 y 8 se aislaron de las fracciones F3/1, F3/2 y F3/3, respectivamente. Se obtuvieron como sólidos de color amarillo 8, 3 y verde claro 7. Los compuestos fueron solubles en MeOH y revelaron de color amarillo intenso con  $AlCl_3$  en los análisis de ccf. Sus constantes físicas y espectroscópicas se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Constantes físicas y espectroscópicas de los compuesto 8, 3 y 7.

CONSTANTES	COMPUESTO 8	COMPUESTO 3	COMPUESTO 7
Fórmula molecular	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$C_{30}H_{26}O_{13}$	$C_{39}H_{32}O_{15}$
Peso molecular	448 uma	584 uma	740 uma
p.f.	205 °C	207-208 °C	138 °C
UV MeOH $\lambda$ (nm) (Espectros 1-3)	266, 348	268, 312	268, 312
IR $\nu_{max}$ (Pastilla) $cm^{-1}$ (Espectros 4-6)	3417, 1652, 1575, 1507	3457, 1684, 1606, 1502	3399, 1699, 1604, 1513
RMN $^1H$ y $^{13}C$ (Espectros 7-12)	Tabla 5	Tabla 5	Tabla 5

Los espectros en el UV (Espectros 1-3) de los compuestos **3**, **7** y **8** mostraron máximos de absorción característicos de cromóforos fenólicos [(268,312), (268, 312) y (266, 348), respectivamente].

Los espectros en el IR (Espectros 4-6) de los compuestos **3**, **7** y **8** presentaron bandas de absorción para grupos hidroxilo (3417, 3457 y 3399, respectivamente), para carbonilos  $\alpha$  y  $\beta$  insaturados (1652, 1684 y 1699, respectivamente) y para anillos aromáticos [(1575, 1507), (1606, 1502) y (1604, 1513), respectivamente].

La información anterior en conjunto con el análisis de los espectros unidimensionales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Espectros 7-12) permitieron establecer que los compuestos obtenidos eran flavonoles derivados de camperol.<sup>31-33</sup>

A continuación se describen las características relevantes de los espectros de RMN:

1) Las señales en  $\delta_{\text{H}}$  5.95, 6.04, 6.84 y 7.98 para el compuesto **8**; a  $\delta_{\text{H}}$  6.14, 6.37, 6.77 y 8.0 para el

compuesto **3**; y a  $\delta_H$  6.13, 6.31, 6.8 y 8.0 para el compuesto **7** fueron asignadas a la unidad camperol. Las señales correspondientes a los carbonos aparecen en  $\delta_C$  100.66, 94.63, 114.97 y 130.46 en **8**; en  $\delta_C$  98.78, 93.67, 115.08 y 130.16 para el compuesto **3** y en  $\delta_C$  100.74, 95.33, 116.10 y 132.15 para el compuesto **7**.

2) Las señales en  $\delta_H$  5.34 en el compuesto **8**; en  $\delta_H$  5.44 en el compuesto **3** y en  $\delta_H$  5.37 en el compuesto **7**, corresponden al hidrógeno anomérico de una molécula de azúcar, el valor de la constante de acoplamiento en los tres casos permitió conocer que el azúcar era tipo  $\beta$ . El carbono correspondiente aparece en  $\delta_C$  100.66 en **8**; en  $\delta_C$  100.97 en **3** y en  $\delta_C$  103.88 en **7**.

3) La hidrólisis ácida de **8**, **3** y **7** permitió establecer que el azúcar era la  $\beta$ -D-glucosa en los tres compuestos. El enlace glicosídico en los tres compuestos se establece entre el C-3 del camperol y C-1 de la glucosa, de acuerdo a desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN de  $^{13}C$  (Tabla 5).

4) En el caso de los compuestos **3** y **7** se observaron señales adicionales para uno y dos residuos de ácido-*p*-hidroxi cumárico, respectivamente.

5) En el caso del compuesto **3** el residuo del ácido *p*-cumárico se ubicó en la posición C-6 de la glucosa por el valor de desplazamiento de este carbono ( $\delta_c$  62.97). En el caso del compuesto **7** los residuos se ubicaron en la posición C-3'' y C-6'' de la glucosa por los valores del desplazamiento de los carbonos ( $\delta_c$  78.66 y 64.03, respectivamente).

En resumen las evidencias espectroscópicas presentadas permitieron identificar a los compuestos como astragalina **8**, tilirósido **3** y camperol 3-*O*-(3'',6''-di-*O*-*E*-*p*-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido **7** (Figura 7).<sup>30-33</sup>

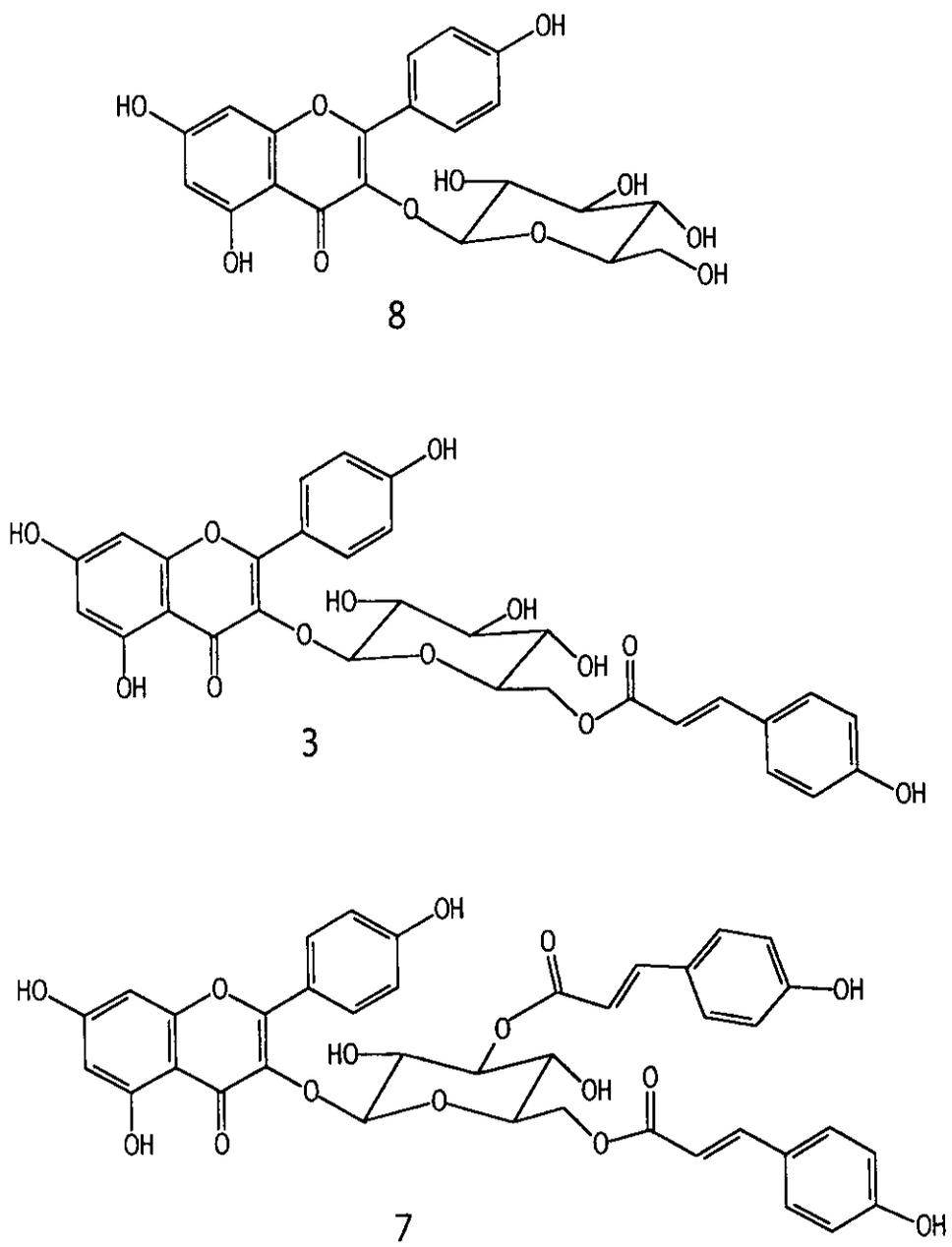
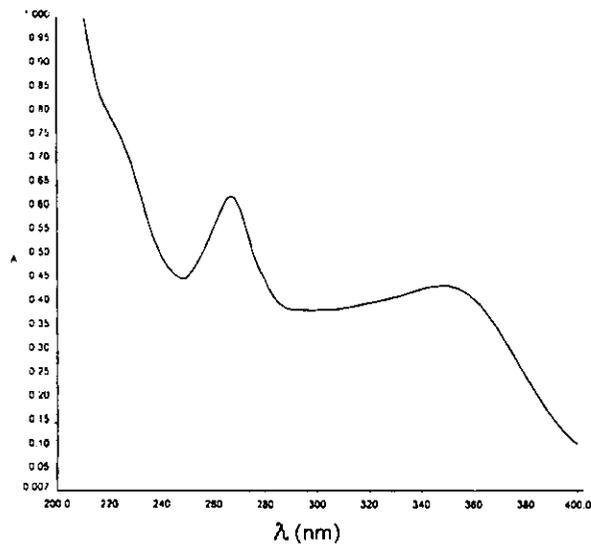


Figura 7. Estructuras de los compuestos 8, 3 y 7.

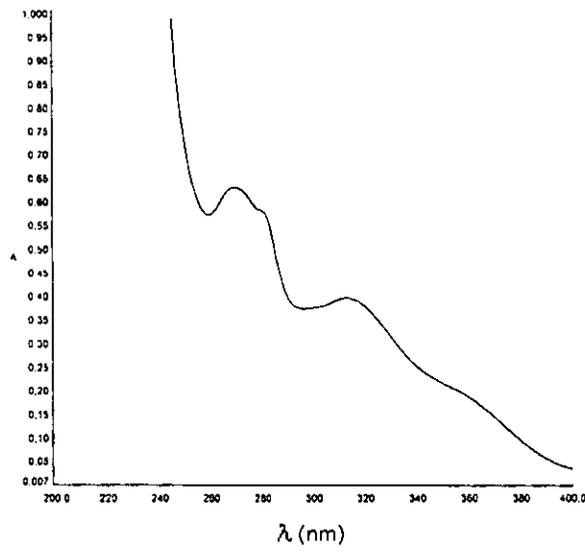
Tabla 5. Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , de astragalina **8**, tilirósido **3** y camperol 3-O-(3''6''-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido **7**.

C/H	astragalina <b>8</b>		tilirósido <b>3</b>		camperol 3-O-(3''6''-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido <b>7</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	159.93	-	156.43	-	159.02
3	-	132.68	-	133.06	-	135.01
4	-	175.81	-	177.4	-	179.06
5	-	160.74	-	161	-	162.87
6	5.95 s	100.66	6.14 d (1.8)	98.78	6.13 d (2.1)	100.74
7	-	167.37	-	164.24	-	168.45
8	6.04 s	94.63	6.37 d (1.8)	93.67	6.31 d (2.1)	95.33
9	-	154.53	-	156.36	-	158.6
10	-	101.60	-	103.85	-	104.96
1'	-	120.85	-	120.76	-	122.68
2'	7.98 d (9)	130.46	8.0 d (9)	130.16	8.0 d (9)	132.15
3'	6.84 d (9)	114.97	6.77 d (9)	115.08	6.8 m	116.10
4'	-	150.93	-	160.01	-	161.59
5'	6.84 d (9)	114.97	6.80 d (9)	115.08	6.8 m	116.10
6'	7.98 d (9)	130.46	8.0 d (9)	130.16	8.0 d (9)	132.15
1''	5.34 d (7.5)	100.66	5.44 d (7.5)	100.97	5.37 d (7.8)	103.88
2''	3.2-4.2 m	74.12	3.1-4.3 m	74.23	3.2-4.4 m	74.08
3''	3.2-4.2 m	76.23	3.1-4.3 m	76.22	3.2-4.4 m	78.66
4''	3.2-4.2 m	69.70	3.1-4.3 m	69.96	3.2-4.4 m	70.11
5''	3.2-4.2 m	74.41	3.1-4.3 m	74.13	3.2-4.4 m	75.69
6''	3.2-4.2 m	60.72	3.1-4.3 m	62.97	3.2-4.4 m	64.03
1'''	-	-	-	124.93	-	127.23
2'''	-	-	6.1 d (15.9)	130.83	6.08 d (15.9)	131.23
3'''	-	-	7.3 d (15.9)	115.76	7.4 d (15.9)	116.84
4'''	-	-	-	159.8	-	161.35
5'''	-	-	7.36 d (8.7)	115.76	7.48 d (8.7)	116.8
6'''	-	-	6.8 d (8.7)	130.83	6.8 m	131.23
7'''	-	-	-	144.61	-	146.79
8'''	-	-	6.8 d (8.7)	113.63	6.8 m	115.33
9'''	-	-	7.4 d (8.7)	166	7.48 d (8.7)	168.98
5-OH	-	-	12.57	-	-	-
1''''	-	-	-	-	-	127.02
2''''	-	-	-	-	6.42 d (15.9)	131.23
3''''	-	-	-	-	7.68 d (15.6)	116.8
4''''	-	-	-	-	-	161.35
5''''	-	-	-	-	7.3 d (8.7)	116.84
6''''	-	-	-	-	6.8 m	131.23
7''''	-	-	-	-	-	146.70
8''''	-	-	-	-	6.8 m	114.79
9''''	-	-	-	-	7.3 d (8.7)	168.74

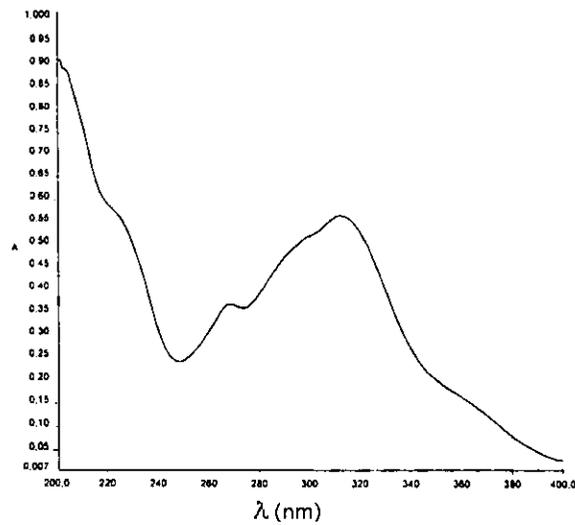
DMSO  $^1\text{H}$  500 MHz (J en Hz),  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\delta$  ppm



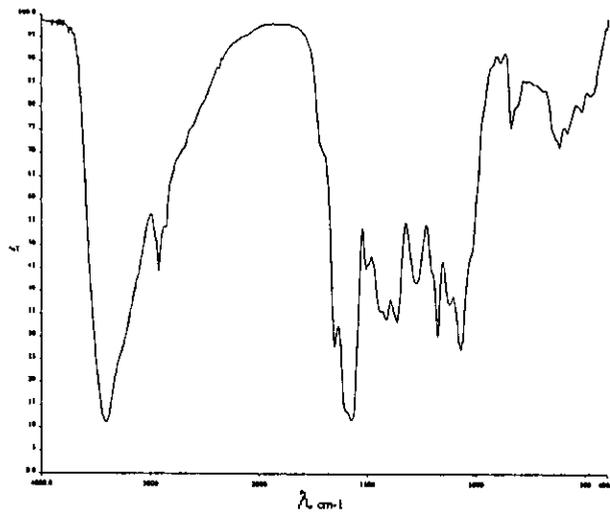
Espectro 1.



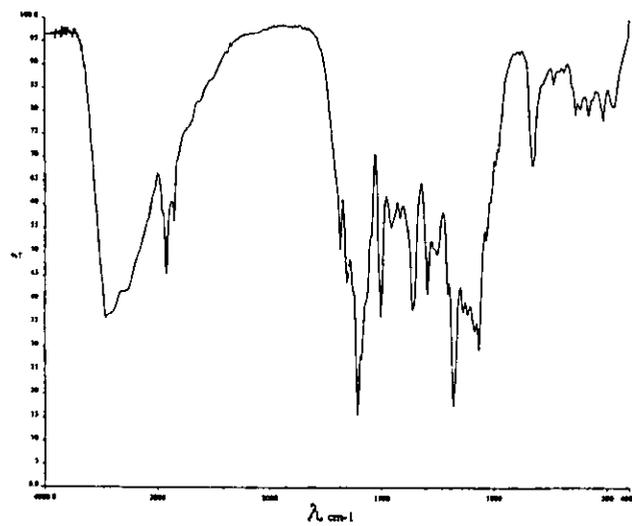
Espectro 2.



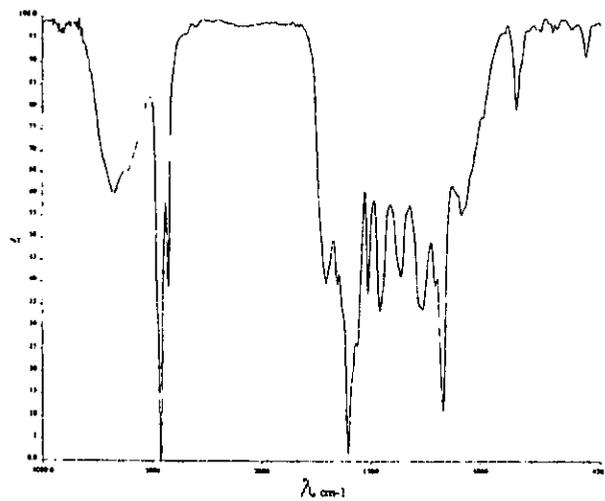
Espectro 3.



Espectro 4.

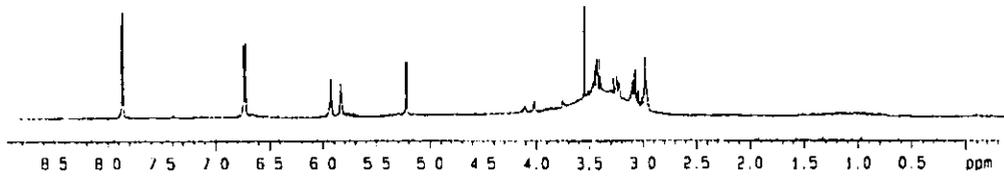


Espectro 5.



Espectro 6.

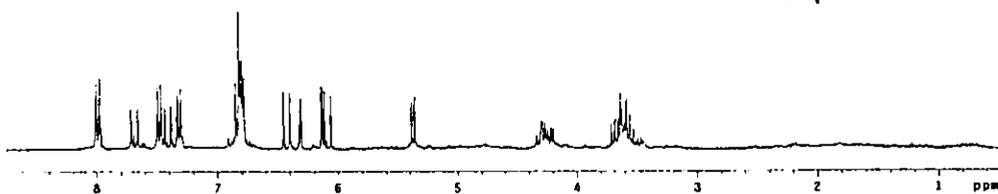
Espectro 7.

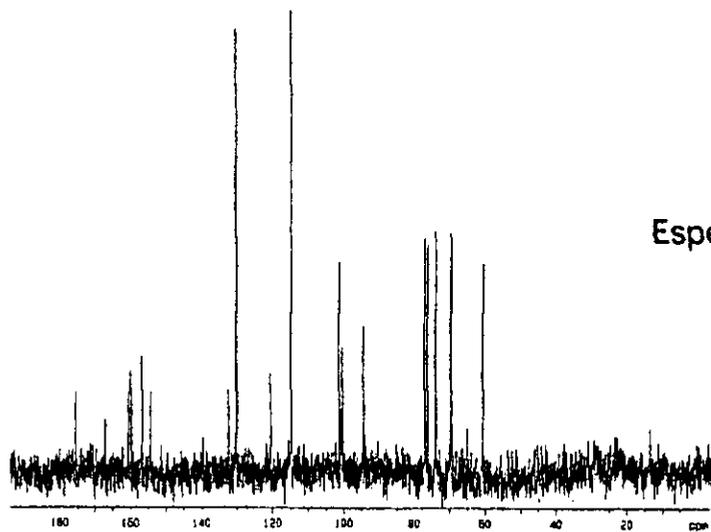


Espectro 8.

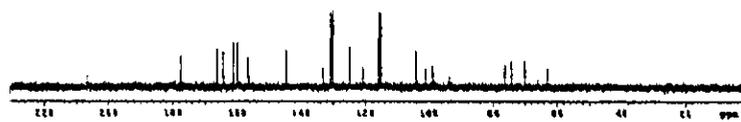


Espectro 9.

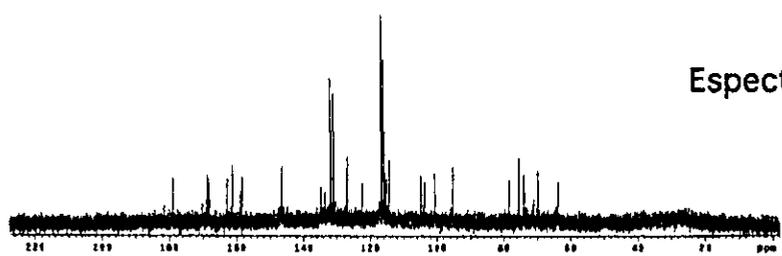




Espectro 10.



Espectro 11.



Espectro 12.

**7.1.2. Identificación de quercitrina 9 e isoquercetina 10.**

Los compuestos **9** y **10** se aislaron de la fracción F3/3. Ambos se obtuvieron como sólidos de color amarillo. El análisis de los espectros IR, UV y RMN en conjunto con el comportamiento cromatográfico al ser revelados con AlCl<sub>3</sub> permitieron establecer que los compuestos eran flavonoides Tabla 6.

Tabla 6. Constantes físicas y espectroscópicas de los compuestos **9** y **10**

CONSTANTES	COMPUESTO <b>9</b>	COMPUESTO <b>10</b>
Fórmula molecular	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>
Peso molecular	448 uma	464 uma
p.f.	235 °C	188-190 °C
UV MeOH λ (nm) (Espectros 13-14)	263, 352	261, 352
IR ν <sub>max</sub> (Pastilla) cm <sup>-1</sup> (Espectros 15-16)	3404, 1753, 1596, 1490	3421, 1653, 1602, 1492
RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C (Espectros 17-20)	Tabla 7	Tabla 7

La información anterior en conjunto con el análisis de los espectros unidimensionales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Espectros 17-20) permitieron establecer que los compuestos eran flavonoles derivados de quercetina.<sup>31-34</sup>

A continuación se describen las características relevantes de los espectros de RMN:

1) Las señales observadas en  $\delta_{\text{H}}$  5.94, 6.10, 7.25, 6.78 y 7.20 en **9**; y en  $\delta_{\text{H}}$  6.20, 6.42, 7.56, 6.84 y 7.56 en **10**, respectivamente, se asignaron a la unidad quercetina. Las señales correspondientes a los carbonos aparecen a  $\delta_{\text{C}}$  100.11, 94.32, 114.97, 115.27 y 120.82 en **9**; y a  $\delta_{\text{C}}$  98, 94, 115, 116 y 120 en **10** (Tabla 7).

2) La hidrólisis ácida de los compuestos permitió identificar a la  $\beta$ -D-glucosa como el azúcar del compuesto **10** y a la ramnosa el del compuesto **9**. La ubicación de los azúcares en los compuestos **9** y **10** se realizó aplicando el mismo criterio que para los compuestos **8**, **3** y **7**.

Las evidencias espectroscópicas presentadas permitieron identificar a los compuestos como quercitrina **9** e isoquercetina **10** (Figura 8).<sup>33-36</sup>

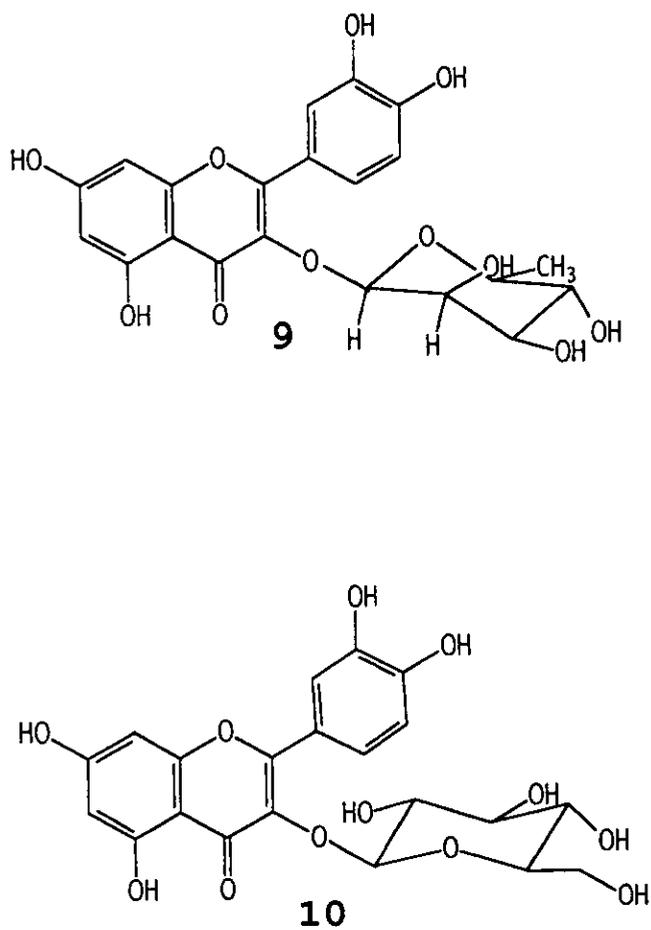
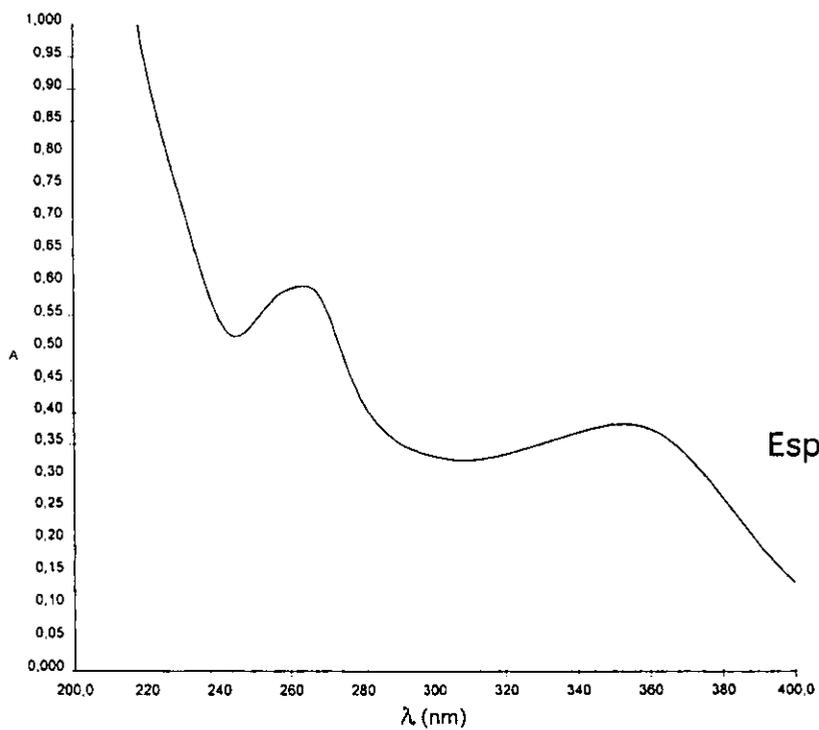
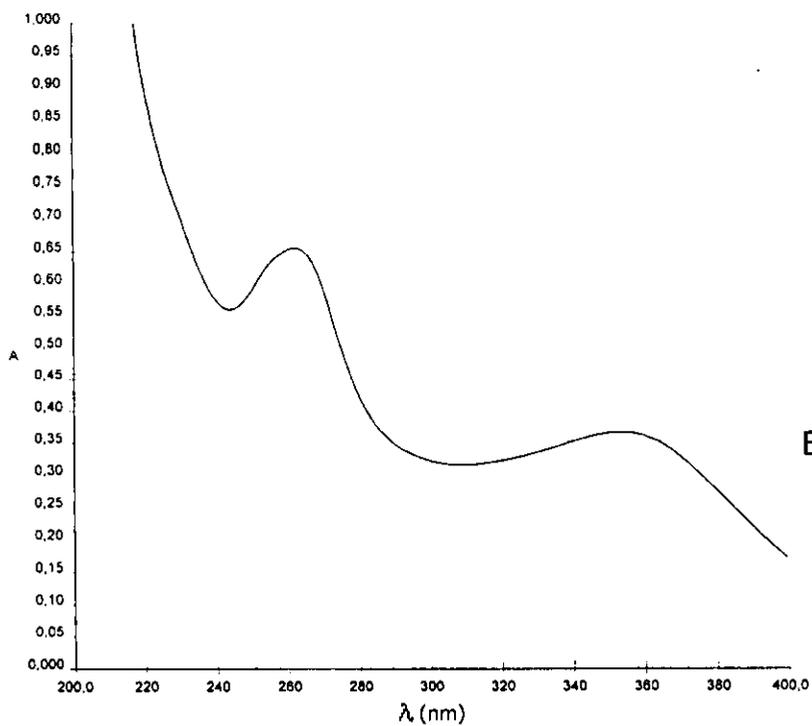


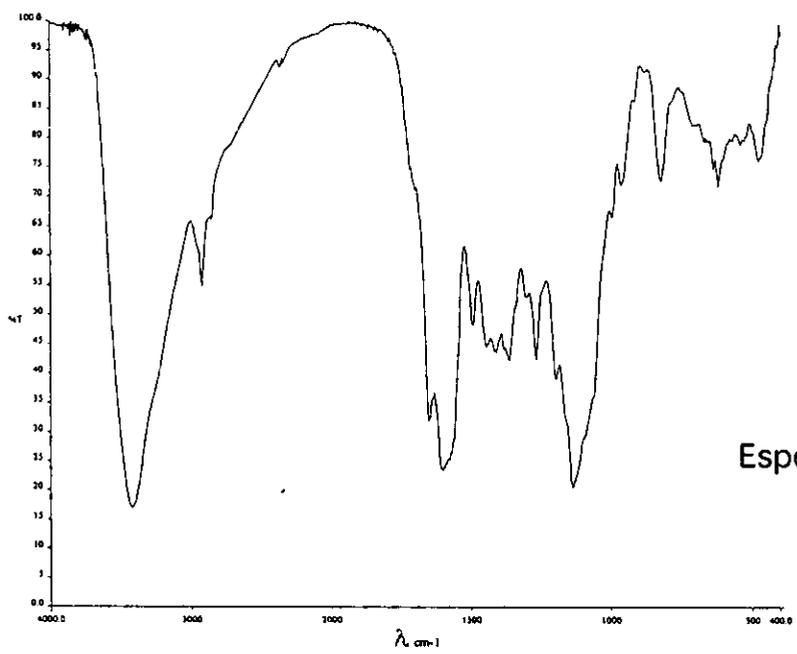
Figura 8. Estructuras de los compuestos **9** y **10**.

Tabla 7. Desplazamientos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la quercitrina **9** y la isoquercetina **10**.

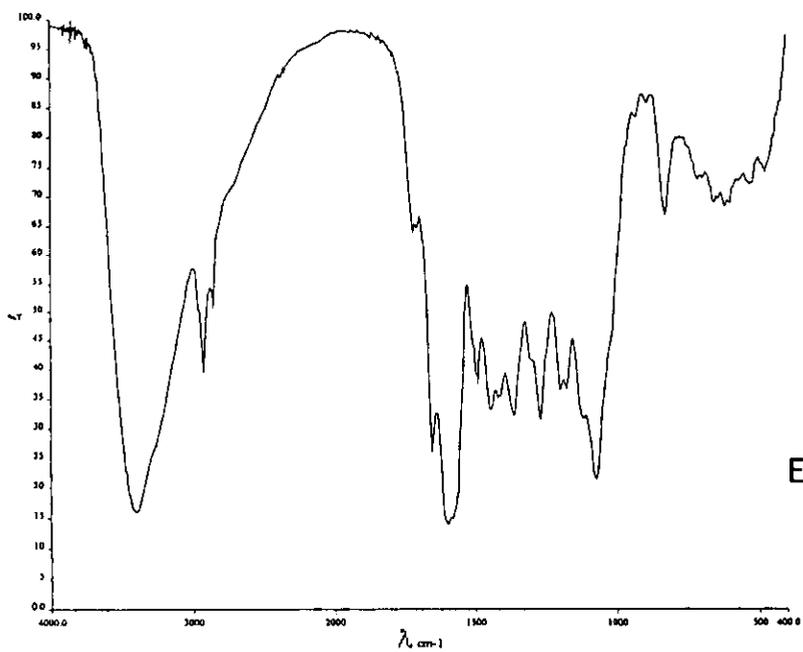
C/H	Quercitrina <b>9</b>		isoquercetina <b>10</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	-	156.78	-	156
3	-	133.43	-	133
4	-	176.45	-	178
5	-	160.93	-	161
6	5.94 s	100.11	6.20 s	98
7	-	167.38	-	165
8	6.10 s	94.32	6.42 s	94
9	-	155.92	-	155
10	-	101.58	-	104
1'	-	120.83	-	123
2'	7.25 d (2)	114.97	7.56 m	115
3'	-	145.55	-	145
4'	-	145.55	-	148
5'	6.78 d (8)	115.27	6.84 d (9)	116
6'	7.20 dd (8, 2)	120.82	7.56 m	120
1''	5.25 s	101.58	5.4 d (7.2)	101
2''	3.1-4.2 m	70.34	3.0-4.0	74
3''	3.1-4.2 m	70.25	3.0-4.0	76
4''	3.1-4.2 m	71.19	3.0-4.0	70
5''	3.1-4.1 m	70.0	3.0-4.0	77
6''	1.14 s	17.43	3.0-4.0	60

DMSO  $^1\text{H}$  500 MHz (J en Hz),  $^{13}\text{C}$  125 MHz,  $\delta$  ppm

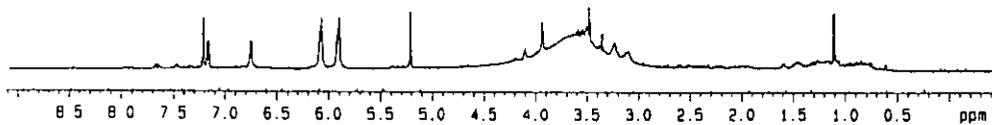




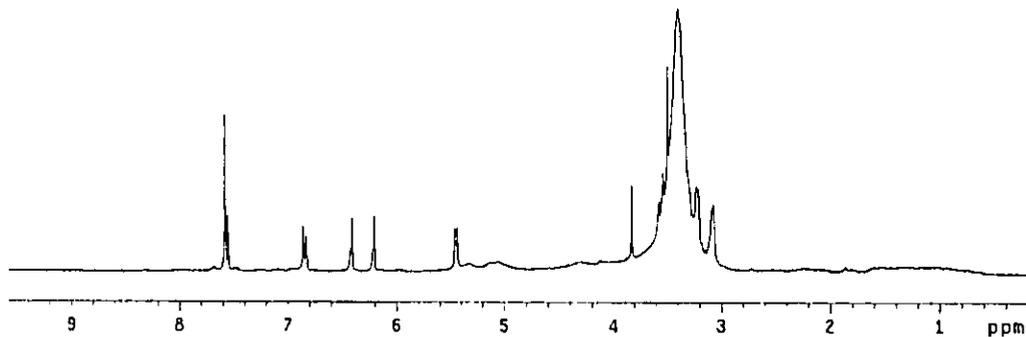
Espectro 15.



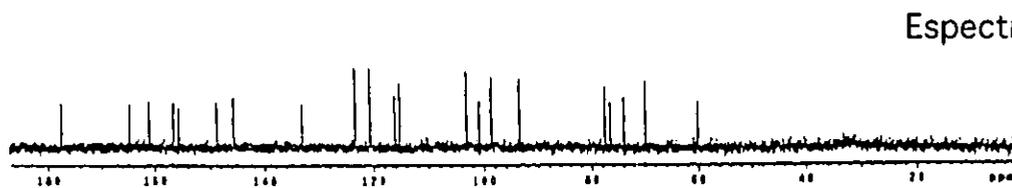
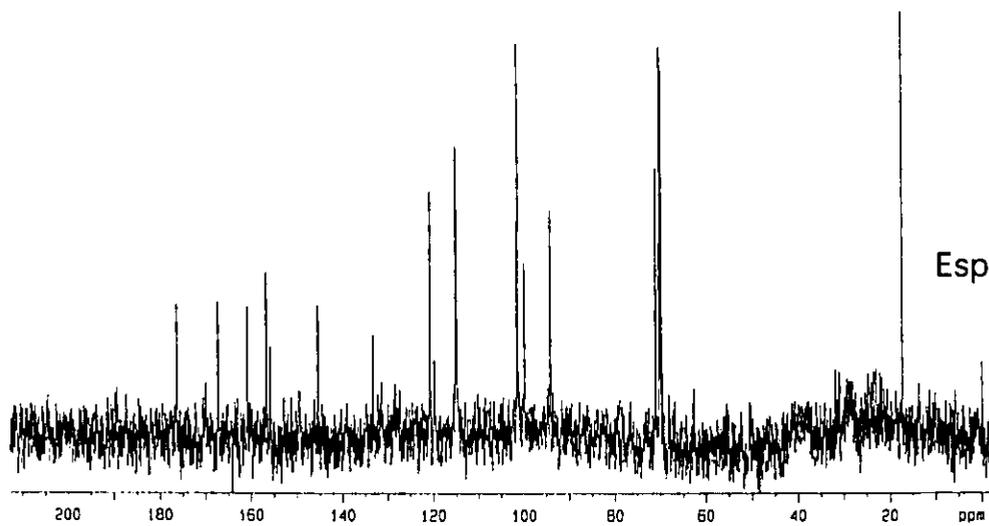
Espectro 16.



Espectro 17.



Espectro 18.



## 7.2 Resultados de la actividad antiprotozoaria de los compuestos aislados de *Helianthemum glomeratum* Lag.

De los cinco compuestos aislados el tilirósido **3** fue el compuesto que presentó la mayor actividad antiprotozoaria contra los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* (CI<sub>50</sub>= 17.45) y *Giardia lamblia* (CI<sub>50</sub>= 17.36 µg/mL). La astragalina **8** mostró actividad moderada contra *E. histolytica* y la quercitrina **9** contra *G. lamblia*.

De los compuestos aislados (Tabla 8) ninguno supera en actividad a los controles positivos (metronidazol y emetina). Sin embargo, en el caso de los compuestos **3**, **7** y **8** existe la posibilidad de que su producto de hidrólisis sea el responsable de la efectividad antiprotozoaria de la planta, considerando que esta clase de compuestos, son hidrolizados por la flora intestinal bacteriana, tanto *in vivo* como *in vitro*, dando origen a su aglicona. En el caso de los compuestos **3**, **7** y **8** el producto de hidrólisis es el

camperol, compuesto al que se le han demostrado propiedades antiprotozoarias significativas.<sup>14, 17, 18</sup>

Tabla 8. Resultados de actividad antiprotozoaria de los compuestos **3** y **7-10**.

COMPUESTO	CI <sub>50</sub> µg/mL	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
Tilirósido <b>3</b>	17.45 (22.07-13.80)	17.36 (22.34-13.48)
camperol 3-O-(3",6"-di-O-E-p-cumaroil)-β-D-glucopiranosido <b>7</b>	107.84 (108.34-107.36)	81.53 (81.98-81.53)
Astragalina <b>8</b>	27.59 (27.82-27.37)	76.13 (76.21-76.08)
Quercitrina <b>9</b>	98.02 (98.49-97.55)	24.26 (24.31-24.20)
isoquercetina <b>10</b>	101.95 (102.45-101.48)	122.8 (122.95-122.63)
Camperol	7.93 (7.98-7.89)	8.73 (8.75-8.71)
Metronidazol	0.04 (0.10-0.03)	0.21 (0.27-0.14)
Emetina	1.051 (1.036-1.068)	0.416 (0.415-0.417)

## 8.0 CONCLUSIONES

8.1. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag permitió el aislamiento de cinco flavonoides (tilirósido 3, camperol 3-O-(3",6"-di-O-E-p-cumaroil)- $\beta$ -D-glucopiranosido 7, astragalina 8, quercitrina 9 e isoquercetina 10).

8.2. De los cinco compuestos aislados el tilirósido 3 fue el compuesto más activo contra ambos trofozoitos.

8.3. Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan un soporte experimental sobre el uso en la medicina tradicional de *Helianthemum glomeratum* en el tratamiento de trastornos gastrointestinales como la disentería.

8.4. La presente investigación es una contribución al conocimiento fitoquímico y farmacológico de la especie *H. glomeratum*.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Dier, H.B. (1995). La colección de plantas medicinales más importante de América Latina. *Ciencias*. **39**, pp 46-47.
2. Lozoya, X. (1989). Función de las plantas medicinales en la medicina del siglo XXI. Secretaria de Salud, edición conmemorativa, México. pp 255-270.
3. Cox, P. y Balick, M. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*. pp 60-65.
4. Houghton, P.J. (1999). Roots of remedies: plants, people and pharmaceuticals. *Chemistry and Industry*. 15-19.
5. Guevara, I. (1997). Qué curan las plantas. *Guía México desconocido*. **34**, pp 9-13.
6. Shu, Y-Z. (1998). Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *Journal Natural Products*. **61**, 1053-1071.

7. Robers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E. (1996). *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*, Williams & Wilkins, U.S.A. pp 1-14, 138-139.
8. Berlin, E.A., Berlin B. (1996). Medical ethnobiology of the highland Maya of Chiapas, México. The gastrointestinal diseases. Princeton University Press, USA. pp 149-153.
9. Instituto Nacional Indigenista, Tomo I, INI. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana I, pp 375.
10. Aguilar, A., Camacho, J., Jácquez, P., y López, M. (1994). Herbario medicinal del IMSSM. Información etnobotánica. pp 34.
11. Sánchez, O. (1980). La Flora del Valle de México. Ed La Prensa. 6° edición. pp 83.
12. Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A., Mata, R. (1998). Screening of mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmac. Biol.* **36**, 1-5.

13. Calzada, F., Alanis, A.D., Meckes, M., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R. (1998). In vitro susceptibility of *Entamoeba histolitica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of southern Mexico. *Phytother. Res.* **12**, 70-72.
14. Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R. (1999). Antiamoebic and anti giardial activity of plant flavonoids. *Planta Med.* **65**, 1-3.
15. Meckes, M., Villareal, M.L., Tortoriello, J., Berlin, B., Berlin, E.A. (1995). A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of southern México. *Phytother. Res.* **9**, 244-250.
16. Meckes, M., Torres, J., Calzada, F., Rivera, J., Camolinga, M., Lemus, H., Rodríguez, G. (1997). Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytother. Res.* **11**, 128-131.
17. Calzada, F., López, R., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R. (1995) Flavonoids of the aerial parts of

- Helianthemum glomeratum*. *Int. J. Pharmacog.* **34**, 351-352.
18. Meckes, M., Calzada, F., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R. (1999). Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res.* **13**, 102-105.
19. Aguilar, M. (1998). Compuestos con propiedades antimicrobianas de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum*. Tesis de licenciatura UNAM-FES Zaragoza. pp 13-14, 32-37 y 44-51.
20. Yan, L., Meselhy, R. y Li-Quan, W. (2000). Biotransformation of a C-glycosylflavone, abrusin 2''-O- $\beta$ -D-apioside, by human intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.* **48**(8), 1239-1241.
21. Masao, H., Yue-Zhong, S. y Adel. I. (1988) Metabolism of hommorientin by human intestinal bacteria. *J. Nat. Prod.* **51**(5), 874-878.
22. Limasset, B., Ojasoo, T., Le Doucen, C. y Dore, J.C. (1999). Inhibition of chemiluminescence in human

- PMNs by monocyclic phenolic acids and flavonoids. *Planta Med.* **65**, 23-29.
23. Che, T., Akao, M. y Hattori, M. (1991). Metabolism of aloesin and related compounds by human intestinal bacteria: A bacterial cleavage of the C-glucosyl bond and the subsequent reduction of the acetyl side chain. *Chem. Pharm. Bull.* **39**(3), 704-708.
24. Hattori, M., T., Kanda, T., y Shu, Y.Z. (1988). Metabolism of barbaloin by intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.* **36**(11), 4462-4466.
25. Griffiths, L.A., y Smith, G.E. (1972). Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. *Biochem* **128**, 901-911.
26. Calzada, F. (2000). Proantocianidinas del tipo A-1 de *Geranium niveum*, flavonoides de *Coniza filaginoides* y estudio relación estructura química-actividad antiprotozoaria de flavonoides selectos de origen natural. UNAM, Facultad de química, México, D.F., Tesis de Doctorado, pp 87.

27. Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography, A laboratory handbook. Springer-Verlag, New York, pp 861-874.
28. Markham, K.R. (1982). Techniques of flavonoid identification. Ed, Academic Press, London, New York, pp 36-51, 63 y 65.
29. Wagner, H., Bladt, S. y Zgainski, E.M. (1984). Plant drug analysis, A thin layer chromatography atlas; Springer-Verlag, New York, pp 301,304.
30. Sen, S., Sabu, N. P., y Mahato, S.B. (1992). Flavonol glycosides from *Calotropis gigantea*. *Phytochemistry*. **31**, 2919-2921.
31. Liu, H., Orjala, J., y Sticher, O. (1999). Acylated Flavonol glycosides from leaves of *Stenochlaena palustris*. *J. Nat. Prod.* **62**, 70-75.
32. Kuroyanagi, M., Fukuoka, M., y Yoshihira, K. (1978). Confirmation of the structure of tiliroside, an acylated kaempferol glycoside, by <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance. *Chem. Pharm. Bull.* **26**(11), 3593-3596.

33. Funayama, S., y Hikino, H. (1979). Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. *Chem. Pharm. Bull.* **27**(11), 2865-2868.
34. Noreen, Y., Serrano, G., y Perera, P. (1998). Flavan-3-ols isolated from some medicinal plants inhibiting COX-1 and COX-2 catalysed prostaglandis biosynthesis. *Planta Med.* **64**, 520-524.
35. Fukunaga, T., Nishiya, K., y Kajikawa, I. (1989). Studies on the constituents of japanese mistletoes from different host trees, and their antimicrobial and hypotensive properties. *Chem. Pharm. Bull.* **37**(6), 1543-1546.
36. Galvez, J., y Zarzuelo, A. (1993). Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.* **59**, 333-336.