



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE
LOS PRODUCTOS DERIVADOS DE LAS
PARTES AÉREAS DE *Rubus liebmannii*
FOCKE**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA**

PRESENTA:

SANDRA ROMERO VALDEZ



MEXICO, D.F.

2008



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
Vocal
Secretario
1er. Suplente
2do. Suplente

Dra. Rachel Mata Essayag
Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents
Dr. Fernando Calzada Bermejo
Dr. José Fausto Rivero Cruz
M en C. Isabel del Carmen Rivero
Cruz

Sitio donde se realizo la tesis:

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

Dr. Fernando Calzada Bermejo
Asesor.

Sandra Romero Valdez
Sustentante

Dedicatorias:

A mi Madre:

Por la confianza, el apoyo y el gran amor que siempre me ha demostrado.

A mi Hermana:

Por el apoyo y el cariño que siempre me ha tenido, por ser confidente y amiga
todos estos años.

A mi Hermano:

Por vivir hombro con hombro, todos los triunfos y fracasos, y sobre todo por
que gracias a ti puedo decir que no nací sola gracias.

A mi tía:

Cristina por ser mi ejemplo a seguir en la vida, te admiro y respeto mucho.

A mi Abuelita:

A través de toda mi vida siempre estas presente en mis pensamientos y
acciones.

Madrina:

A una de las mujeres que más admiro, quiero y respeto. Gracias por tus
consejos y por que con la forma en la que vives la vida es un ejemplo para
muchos.

Agradecimientos:

Colegas y amigos

Al Dr. **Fernando Calzada Bermejo**, por todo el apoyo brindado, dejarme ser tal cual soy, por no limitar mi forma de pensar y permitirme plasmar mi esencia en este trabajo de tesis.

A la Jefa del Herbario IMSS M en C **Abigail Aguilar** por la identificación de las plantas utilizadas en este trabajo.

A la Dr. **Lilian Yopez** y la Bióloga **Amparo Tapia Contreras** de la UIM en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del hospital de pediatría del CMN S XXI Por las evaluaciones antiprotozoarias.

A la Jefa UIM Farmacología de Productos Naturales Dra **Mariana Meckes** por permitirte laborar en la Unidad.

Al Hospital de Pediatría del CMN S XXI, IMSS, por el apoyo de instalaciones y alimentos

A mis compañeros de Laboratorio: **Arlene, Edgar y Jorge** por haber pasado momentos buenos y saber compartir sus conocimientos .

A **Angélica, Yola, Raúl y Claudia**, por ser más que unos compañeros, se convirtieron en unos grandes amigos, por haber compartido sus ideas y sentimientos.

A los de la jardinera: por todos los momentos, comidas, risas y haber compartido más que horas libres.

A las Chochas: **Bety, Sonia, Angélica, Silvia, Margarita y Alejandra**, por haber tocado con ustedes la gloria del triunfo, de ser campeonas en la facultad y mas por ser mis amigas del alma. Gracias por haberme dado la oportunidad de conocerlas y darme su confianza, las quiero mucho.

A **Sandra Luz**: Tú y Yo llevamos el mismo nombre, pero no las misma ideas ni los mismos sentimientos sin embargo, muchas veces parece como si compartiéramos mas que un simple momento, compartimos el alma, gracias amiga, por tu amistad tan valiosa y tu cariño.

A **Mauricio**, por ser como eres, por mostrarme que no basta con soñar, que tienen que luchar por lo que uno desea y que cuando se quiere se puede, eres una de las personas que más quiero y admiro mucho. Y por estar siempre cuando más lo necesito.

Iván León: Por que a pesar que me conoces poco tiempo, me has brindado tu confianza y cariño, tu apoyo y comprensión. Gracias por ser un gran amigo aunque sea online.

Dr. **Alfonso Lira Rocha**. Por brindarme gentilmente sus conocimientos, sus consejos y darme lecciones de vida, por haber encontrado en él mas que un excelente profesor; un AMIGO.

*...En estos días pensé en mis amigos y amigas y,
entre ellos, apareciste tú.
No estabas arriba, ni abajo ni en medio.
No encabezabas ni concluías la lista.
No eras el número uno ni el número final.
Lo que sé es que te destacabas por alguna cualidad que transmitías
y con la cual desde hace tiempo se ennoblece mi vida...
Jorge Luis Borges*

ÍNDICE.

Lista de abreviaturas.....	iii
Lista de cuadros.....	v
Lista de esquemas.....	v
Lista de figuras.....	v
Lista de tablas.....	vi
I. INTRODUCCION.....	1
I.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
I.2. OBJETIVO GENERAL.....	2
I.2.1. Objetivos específicos.....	2
I.3. HIPÓTESIS.....	3
II. MARCO TEÓRICO.....	4
II.1. Generalidades de la Amibiasis.....	7
II.2 Generalidades del protozoario <i>Entamoeba histolytica</i>	8
II.3 Tratamiento de la amibiasis.....	12
II.4 Generalidades del protozoario <i>Giardia lamblia</i>	15
II.5 Generalidades de la giardiasis.....	15
II.6 Patogénesis de la giardiasis.....	17
II.7 Tratamiento de la giardiasis.....	17
II.8 Generalidades del género <i>Rubus</i>	22
II.8.1 Generalidades de <i>Rubus liebmannii</i> Focke	27

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
III.1 Selección y preparación del material vegetal.....	29
III.2 Extracción.....	29
III.3 Evaluación biológica.....	30
III.4 Preparación del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Rubus liebmannii</i> Focke a gran escala.....	31
III.5 Fraccionamiento fitoquímico del extracto etanólico de <i>Rubus</i> <i>liebmannii</i> Focke.....	32
III.6 Fraccionamiento fitoquímico.....	33
III.6.1 Separación de la fracción de acetato de etilo con mayor actividad contra <i>E. histolytica</i>	34
III.6.2 Obtención del escualeno.....	35
III.6.3. Obtención del ácido 3,4-dihidroxibenzoico y del β -sitoesterol	36
III.6.4. Obtención de la (-) - epicatequina y de la (+) - catequina.....	37
III.6.5. Obtención del nigachigósido F1.....	39
IV. RESULTADOS.....	41
V. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	43
VI. CONCLUSIONES.....	49
VII. BIBLIOGRAFIA.....	51

I. INTRODUCCIÓN.

I.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Cuatro especies de la familia Rosáceae fueron preseleccionadas tomando en cuenta criterios etnomédicos y quimiotaxonómicos con el objetivo de realizar un cernimieto farmacológico y determinar cual especie presenta mayor actividad contra los trofozoitos de *E. histolytica* y/o *G. lamblia in vitro*.

De las cuatro especies evaluadas *Rubus liebmannii* fue la que presentó la mejor actividad contra ambos protozoarios. Por otro lado después de realizar una extensiva revisión bibliográfica, se encontró que no se conocen los compuestos responsables de la actividad contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Con el propósito de contribuir al conocimiento químico y propiedades farmacológicas de las partes aéreas de la especie *R. liebmannii*, es necesario que se lleve a cabo un estudio fitoquímico del extracto etanólico crudo para aislar e identificar los compuestos químicos responsables de la actividad antiprotozoaria y con ello contribuir en el proceso de validación de la planta.

I.2 OBJETIVO GENERAL.

Obtener al menos uno de los principios activos con propiedades antiprotozoarias de *R. liebmannii* con la finalidad de contribuir al proceso de validación de la planta.

I.2.1 Objetivos específicos.

Con el objeto de dar cumplimiento al objetivo general se plantean los siguientes objetivos particulares.

- Preparar los extractos etanólicos de las cuatro especies vegetales selectas de la medicina tradicional de México.
- Determinar la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los cuatro extractos preparados a partir de las especies preseleccionadas y expresar como CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$).
- Realizar el estudio fitoquímico de la especie *Rubus liebmanni* que presento la mejor actividad antiprotozoaria.

I.3 HIPÓTESIS.

Si después de realizar los estudios de actividad antiprotozoaria a las cuatro especies seleccionadas y *Rubus liebmanni* resulta ser la más activa contra los trofozoitos de *E. histolytica* y *G. lamblia* entonces posee uno o más compuestos químicos responsable de dicha actividad. Los cuales pueden ser aislados por un método fitoquímico.

II. MARCO TEÓRICO.

El uso de las plantas como recursos medicinales para el tratamiento, prevención y cura de enfermedades viene desde tiempos remotos de la humanidad. Indudablemente civilizaciones como la China, la India, y la mexicana entre otras han proporcionado evidencias escritas de la ingeniosidad del hombre en utilizar las plantas para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades (Phillipson, 2001; Navarro, 1992).

Actualmente el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades es una práctica muy extendida en varios países del mundo. Muchas de estas plantas son usadas para tratar padecimientos gastrointestinales, del tracto urinario y del tracto respiratorio, entre otros. También las plantas son utilizadas como fuentes de materias primas para el descubrimiento de nuevos principios activos y ser usados en el desarrollo de fármacos y tratar diversas enfermedades (Romero *et al.*,2005).

El estudio de las plantas y sus metabolitos secundarios, ha conducido al hallazgo de moléculas que sirven como prototipo para la síntesis de nuevos compuestos o directamente como principios activos de medicamentos mas eficaces contra bacterias, protozoarios y virus. Por ejemplo la quinina **(1)** aislada de *Cinchona calisaya*; morfina **(2)** obtenida a partir del *Papever somniferum*; digoxina **(3)** aislada de las hojas de *Digitalis purpurea*; la vinblastina **(4)** y vincristina **(5)** obtenidas de *Catharanthus roseus*, los cuales son principios activos que continúan siendo utilizados en la clínica (Phillipson, 2001).

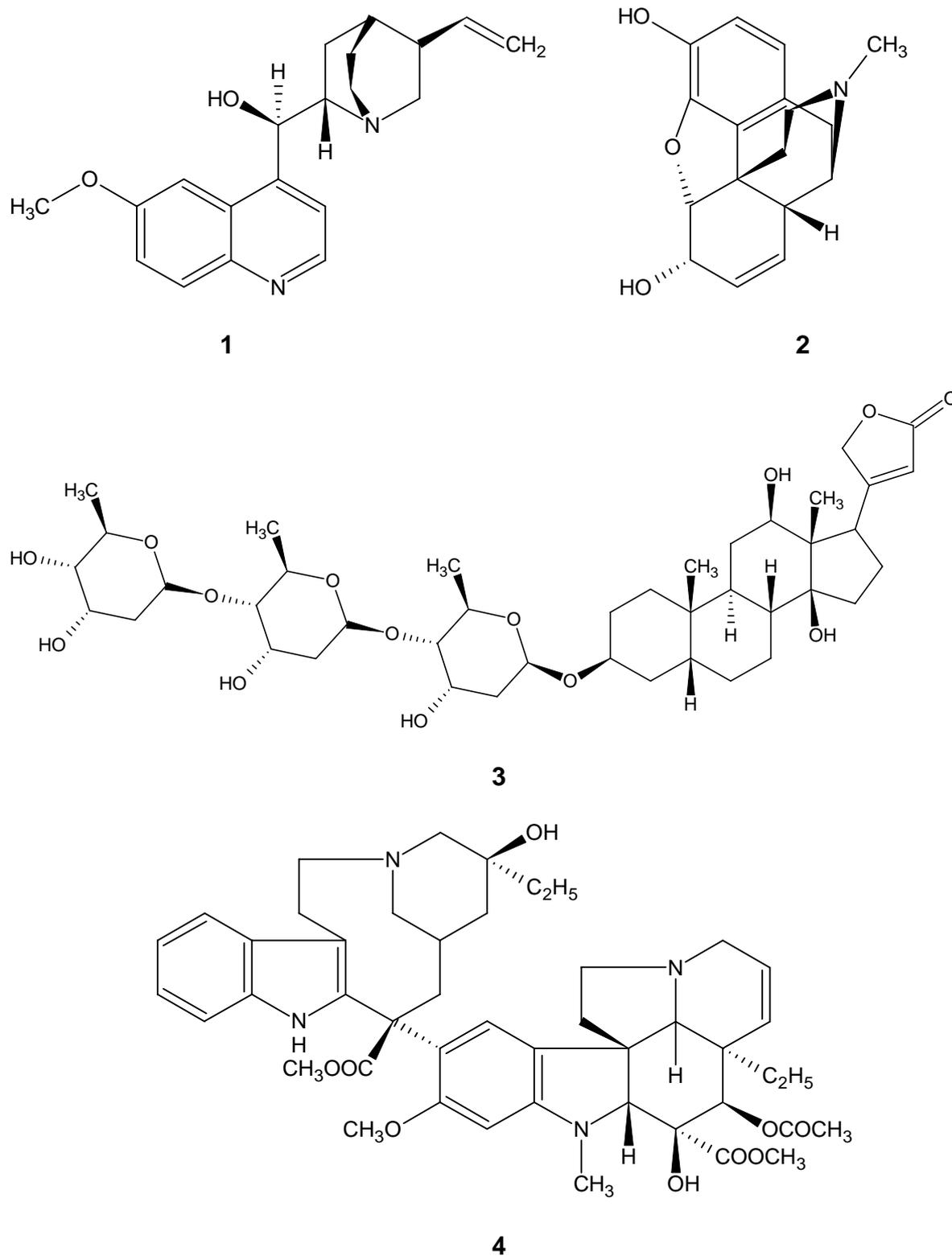
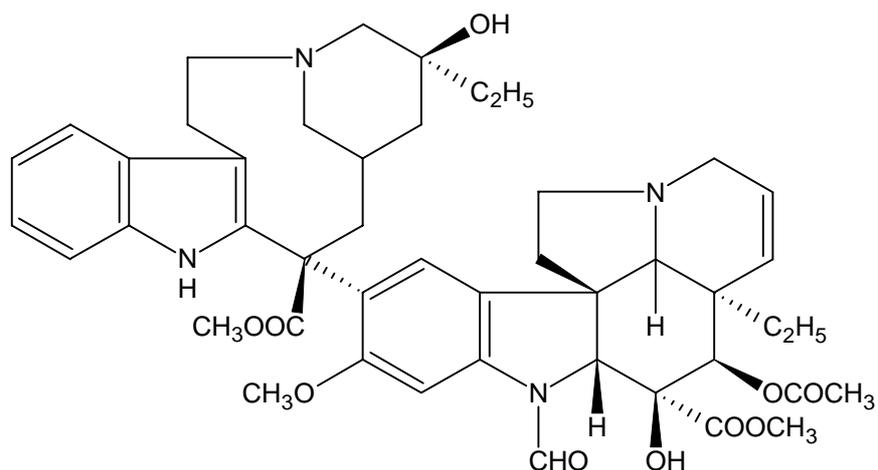
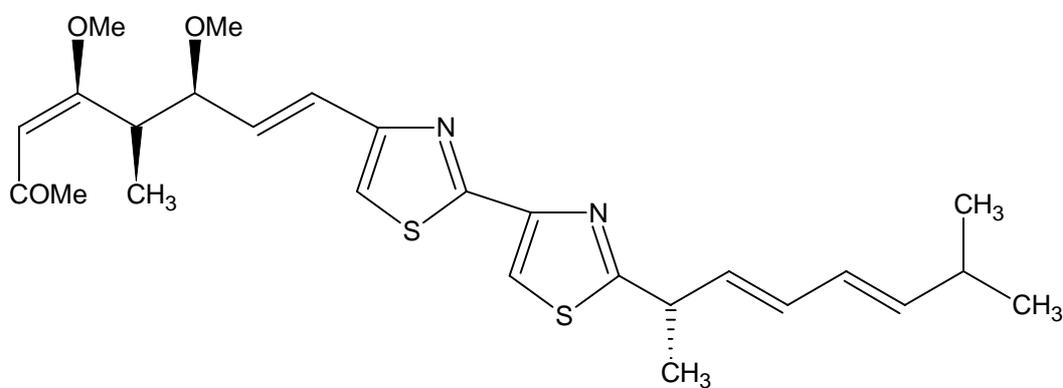


Figura 1. Estructura de algunos compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales y actualmente utilizados en la clínica.



5



6

Figura 1 (continuación). Estructura de algunos compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales y actualmente utilizados en la clínica.

Recientemente se han hecho descubrimientos de nuevas moléculas derivadas de productos naturales con propiedades antibióticas un ejemplo de estos compuestos es el β -metoxiacrilato (**6**) que es un inhibidor potente de la respiración celular al unirse al Citocromo b y así interrumpir la cadena transportadora de electrones (Nisbet y Moore, 1997).

Los productos naturales, es una de las fuentes mas viables y fértiles para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos que permitan tener nuevas alternativas para el tratamiento de diversas enfermedades.

En el caso de México es bien sabido que a lo largo y ancho del país el uso de plantas medicinales para tratar diferentes padecimientos es muy común. Su diversidad florística, es una de las mas grandes del mundo, se estima que entre 3000 y 5000 son especies medicinales, sin embargo su estudio es muy limitado, se considera que solo el 5% se ha estudiado (Rzedowski, 1978; Aguilar, 1999; Lozoya, 1994).

En la República Mexicana, el principal protozooario causante de infecciones intestinales es *Entamoeba histolytica*, la cual ha ocupado el quinto lugar de morbilidad a nivel nacional durante el periodo 2003-2006. En el caso de *Giardia lamblia*, durante el mismo periodo esta dentro de las 20 principales causas que provocan enfermedades gastrointestinales (SINAVE, 2006). Las enfermedades causadas por estos protozoarios producen la pérdida de aproximadamente de 1.6 millones de años de vida potencial. Este tipo de infecciones son persistentes, debido a la diversidad climática, socioeconómica e infraestructura del país (Sánchez *et al.*, 2000).

II.1 Generalidades de la Amibiasis.

La amibiasis es una infección gastrointestinal del ser humano causada por el protozooario *Entamoeba histolytica*, un parásito que es capaz de invadir la mucosa intestinal y puede penetrar a otros órganos, principalmente el hígado.

La amibiasis intestinal es más común en países en vías de desarrollo. En áreas donde la infección es endémica, una variedad de condiciones influyen en su

prevalencia incluyendo, la ignorancia, pobreza, hacinamiento, saneamiento pobre, transmisión fecal-oral de persona a persona por malos hábitos higiénicos, así como abastecimientos de agua inadecuados y contaminados (Espinosa *et al.*, 2000).

La amibiasis a nivel mundial es responsable de aproximadamente 70 mil muertes anuales, ocupando el cuarto lugar después del paludismo, enfermedad de Chagas y la leishmaniasis. En el caso de la morbilidad ocupa el tercer lugar después del paludismo y de la trichomoniasis (Espinosa *et al.*, 2000).

En México hasta el mes de octubre de 2007 se reportaron 451,935 mil casos de amibiasis intestinal (SINAVE, 2007)

II.2 Generalidades del protozooario *Entamoeba histolytica*.

La amibiasis se inicia cuando se consumen alimentos y agua contaminada con quistes (Esquema 1). La forma móvil de *E. histolytica* es el trofozoíto **3**, el cual vive en el lumen del intestino grueso **A**, donde se multiplica y se transforma a la fase de quiste **4**, la forma resistente responsable de la transmisión de la infección. Los trofozoitos pueden invadir la mucosa colónica causando la disentería, posteriormente pueden irse hacia la circulación sanguínea provocando lesiones extraintestinales **C**, causando principalmente abscesos en el hígado (Espinosa *et al.*, 2000).

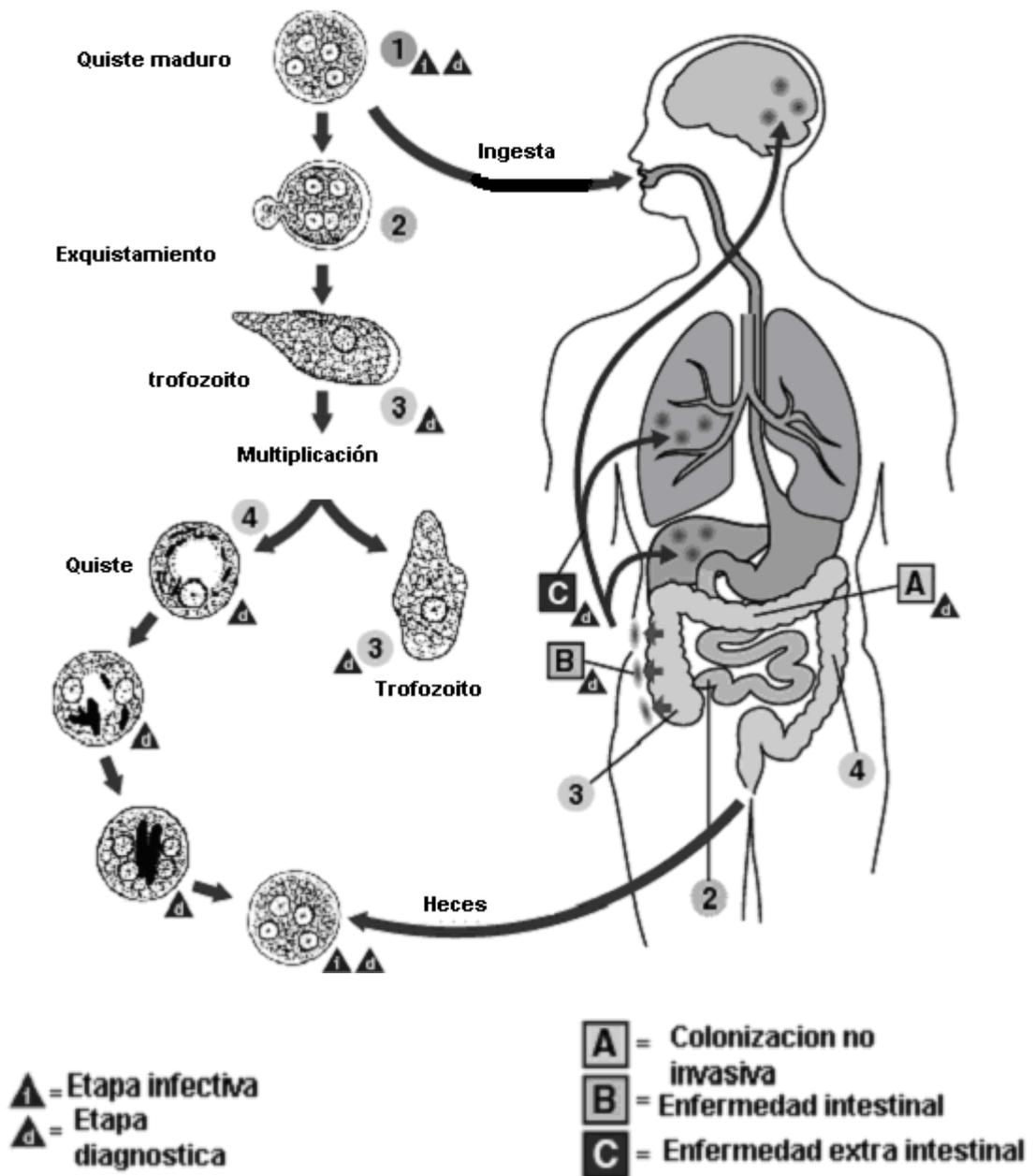
Los trofozoitos con movimiento rápido y unidireccional, miden entre 10 y 60 μm de diámetro. Si se obtienen de lesiones intestinales o hepáticas su tamaño es de entre 20 y 40 μm ; mientras que si se observan en heces no disentéricas o en cultivos miden entre 10 y 30 μm . El citoplasma presenta dos zonas sin clara diferenciación, una región periférica denominada ectoplasma y una zona interna llamada

endoplasma. A diferencia de otras células eucariotas, los trofozoitos de estas especies no poseen los organelos citoplasmáticos clásicos como mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso o aparato de Golgi. Sin embargo, posee múltiples estructuras de diferente tamaño, morfología y función denominadas vacuolas fagocíticas, cuerpos residuales y lisosomas. Las vacuolas pueden contener en su interior bacterias, detritus y hematíes más o menos digeridos. Los trofozoitos de *E. histolytica* ³ poseen un único núcleo con un tamaño entre 4 y 7 μm , un cariosoma central pequeño y denso. La membrana nuclear es doble y está interrumpida por numerosos poros nucleares de 65 nm de diámetro (Pérez *et al.*, 2002).

Los quistes ¹ son esféricos, miden entre 10 y 16 μm de diámetro, poseen una pared de aproximadamente 0,5 μm y contienen habitualmente 4 núcleos cuando están maduros. Los quistes jóvenes poseen además vacuolas con glucógeno y cuerpos cromatoides que disminuyen durante la maduración. Los quistes de *E. histolytica*, constituyen la principal forma infectiva, ya que son resistentes al cloro y al pH ácido del estómago, pudiendo sobrevivir en ambientes húmedos varias semanas, sobre todo si la temperatura es baja (Perez *et al.*, 2002).

La patogenicidad amibiana depende de la adherencia a células blanco donde su primer barrera es el moco intestinal, posteriormente daña las células epiteliales del intestino y continua con el proceso de invasión de la membrana a través de la degradación de proteínas de colágena tipo 1 (Avalos *et al.*, 2005).

Esquema 1. Ciclo de vida del protozoo *Entamoeba histolytica*.



Los síntomas de la amibiasis van desde un dolor abdominal hasta la diarrea con sangre, presentándose en algunos casos complicaciones extraintestinales que se citan en la Cuadro1.

Cuadro 1. Clasificación de la amibiasis

Clasificación clínica de la amibiasis	Mecanismos fisiopatológicos
Infección asintomática	Colonización del intestino sin invasión a los tejidos
Infección sintomática	Infección invasiva extraintestinal
Amibiasis intestinal	
A. Disentería amibiana	Enfermedad con ulceración fulminante
B. Gastroenteritis no disentérica	Enfermedad intestinal ulcerante
C. Ameboma	Enfermedad progresiva intestinal
D. Complicación de la amibiasis intestinal	Perforación, hemorragia y fístula
E. Colitis amibiana	Mecanismo desconocido
Amibiasis extra intestinal	
A. Hepatomegalia no específica	Infección intestinal con invasión no demostrable
B. Infección aguda no específica	Amibas en hígado sin absceso
C. Absceso amibiano	Lesión estructural localizada
D. Absceso amibiano complicado	Extensión directa hacia la pleura, pulmón o pericardio
E. Amibiasis cutánea	Extensión directa hacia la piel
F. Amibiasis visceral	Infección metástica del pulmón, bazo y cerebro

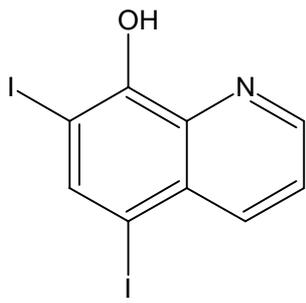
Las lesiones amebianas pueden observarse en casi todos los tejidos humanos; sin embargo se localizan mas frecuentemente en intestino grueso e hígado. Dependiendo del órgano afectado, las manifestaciones clínicas de la amibiasis son intestinales o extraintestinal (Cuadro 1). Los pacientes con disentería tienen un promedio diario de tres a cinco evacuaciones acompañadas de sangre y moco, con descarga precedente de cólicos, y tenesmo rectal, también presentan material fecal con líquido manchado con sangre. La fiebre y las manifestaciones sistémicas están generalmente ausentes. Estos síndromes constituyen la disentería ambulatoria clásica y pueden fácilmente ser distinguidos del origen bacteriano, donde el paciente se queja con frecuencia de los síntomas sistémicos tales como fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, malestar, anorexia, náusea, vómito, dolor abdominal y tenesmo (Espinosa *et al.*, 2000).

II.3 Tratamiento de la amibiasis.

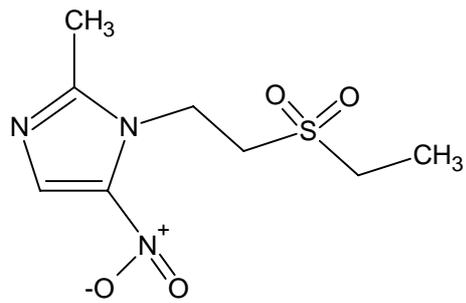
La forma disentérica de la amibiasis se trata en principio como cualquier diarrea infecciosa en niños, esto es, a base de hidratación oral y dieta normal; se corta la fiebre y el vómito cuando se presente, este ultimo con periodos cortos de ayuno. En la tabla 1 se muestra algunos fármacos utilizados en la clínica así como sus dosis, mecanismo de acción y efectos adversos (García, 2001; Pacheco, 1972; PLM, 2005).

Tabla 1. Algunos fármacos usados en el tratamiento en la amibiasis.

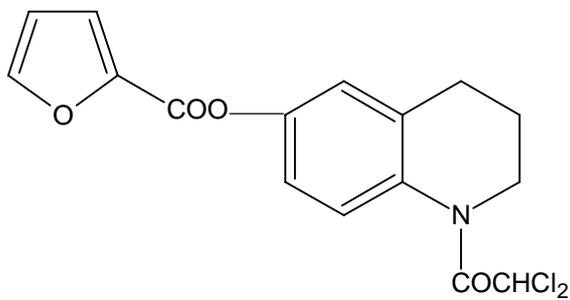
Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Efectos adversos.
Diydohidroxiquinoleína 7	No se conoce con exactitud el mecanismo de acción.	Oral: Adultos: 650 mg cada 8 horas por 20 días. Niños: 30mg/Kg/día, administrar cada 8 horas por 20 días.	Agranulocitos, neurosis óptica, atrofia, gastritis y estreñimiento.
Tinidazol 8	Inhibe síntesis de DNA y produce pérdida de la forma helicoidal del DNA.	Adultos: 1 sola dosis oral de 2 g según el caso Niños: 50 a 60 mg/Kg/día en una sola dosis según sea el caso.	Vértigo, náusea, cefalea, vómito, anorexia y cólicos.
Quinfamida 9	Favorece la destrucción de los trofozoitos en la luz intestinal y elimina la formación de quiste.	Oral: Adultos: 100mg cada 8 horas por un día. Niños 4.3mg/Kg/día repartido en 2 tomas.	Cefalea, náuseas y flatulencias.
Emetina 10	Bloquea irreversiblemente la síntesis de proteínas.	1 mg/Kg/Peso. Al día por 10 días en la forma extraintestinal o hasta que se logre omitir los síntomas agudos.	Puede provocar dolor y debilidad muscular, formación de abscesos e inducción de náuseas.
Deshidroemetina 11	Actúa sobre el núcleo y retículo endoplasmico.	1 - 1.5 - 2 mg Kg/ Peso. al día (Preferiblemente 1 mg Kg/Peso al día) durante 10 días en la forma extraintestinal.	Menos tóxica que la emetina, causa menos dolor.
Metronidazol. 12	Interactúa con el DNA y produce una pérdida de la estructura helicoidal, rotura de la cadena e inhibición resultante de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular.	Dosis de 30 a 40 mg/día, por vía oral, cada 8 horas durante 7 a 10 días sin exceder 2.0 g diarios.	Dolor de cabeza, vértigo, náusea, y pancreatitis, así como toxicidad a nivel de sistema nervioso central en altas dosis.



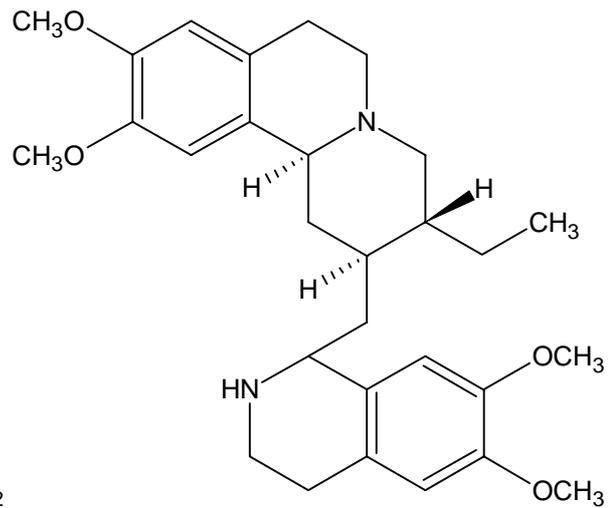
7



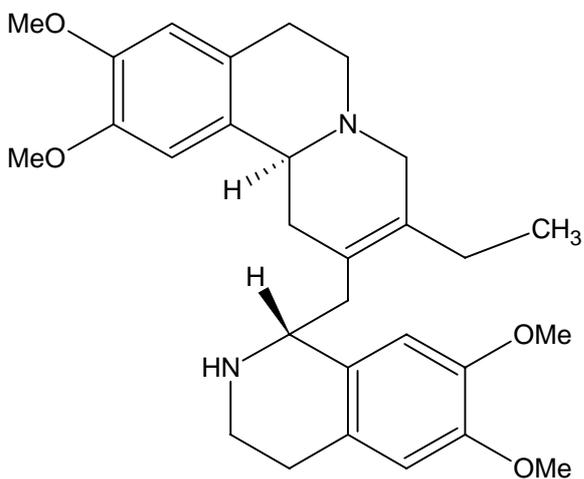
8



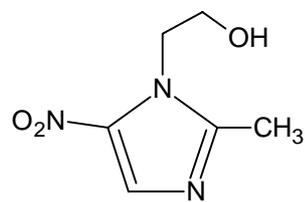
9



10



11



12

Figura 2. Estructuras de algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la amibiasis.

II.4 Generalidades del protozooario *Giardia lamblia*.

El trofozoíto³ (Esquema 2), tiene forma de pera, posee dos núcleos y cuatro pares de flagelos, un disco suctorio en la mitad anterior de la superficie ventral. Es la forma patógena y se destruye rápidamente en el medio ambiente. La forma de resistencia e infectiva es el quiste⁵ que es ovoide, de 8 a 14 μm de largo por 7 a 10 μm . de ancho, con cuatro núcleos y el doble de estructuras flagelares que el trofozoíto. No resiste la desecación ni temperaturas por encima de los 50°C.

En el suelo los quistes[▲] son viables por encima de tres meses a la sombra. Con respecto al agua son resistentes a la cloración y por su flexibilidad a la filtración en las plantas potabilizadoras, pero no a la floculación. Se mantienen viables por encima de los dos meses (Lujan,2006).

La infección se inicia (Esquema 2) con la ingesta de los quistes², posteriormente los que se desenquistan en la parte superior del intestino delgado liberando los trofozoítos³, que prolifera en el intestino⁴, los cuales son los responsable de los síntomas de la enfermedad. Al descender por la luz intestinal, algunos trofozoitos comienzan a enquistarse, lo cual se manifiestan por la aparición de gránulos de secreción específicos, que transportan los materiales, luego forman la pared del quiste maduro que protegen al parásito fuera del intestino del hospedero^{5 ▲}.

II.5 Generalidades de la giardiasis.

La giardiasis, es una patología que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes. La infección con *G. lamblia* es una de las

enfermedades parasitarias más comunes en el mundo y se inicia por la ingestión de los quistes del parásito, los cuales se desenquistan por el contenido ácido del estómago, liberando los trofozoitos. Estos colonizan el intestino delgado superior y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal mediante un organelo característico llamado disco ventral.

Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias, en los países en vías de desarrollo es mayor la prevalencia que en los países industrializados. No obstante, en estos últimos las infecciones se hallan en turistas, homosexuales y personas en asilos o guarderías. En algunos países en desarrollo, la giardiasis en niños afecta a cerca del 100% de la población. Grandes epidemias han ocurrido por contaminación fecal de alimentos y reservorios de agua. La infección por *G. lamblia* es asintomática en la mayor parte de los casos, especialmente en regiones endémicas (Lujan, 2006). El periodo de incubación de la giardiasis es de aproximadamente de 12 a 20 días. La giardiasis puede confundirse con la enteritis viral, disentería causada por bacterias, amibiasis y diarrea del viajero. Sin embargo, el tipo de diarrea con moco y exudado celular es consistente con giardiasis (García, 2001).

El organismo se alimenta de las secreciones de la mucosa pero no la penetra. En pacientes sintomáticos muestran irritación del revestimiento de la mucosa, con aumento de la secreción de moco y deshidratación.

El inicio puede estar acompañado por náusea, anorexia, malestar, fiebre moderada y escalofríos, dolor epigástrico, flatulencias, y diarrea acompañada de grasa y moco (García, 2001).

La enfermedad crónica se caracteriza por la alternancia de periodos de diarrea, malestar leve, con periodos prácticamente asintomáticos. Hay dos síntomas que sugieren giardiasis: la persistencia de diarrea por más de una semana y los

síntomas de absorción intestinal deficiente, particularmente la intolerancia a la lactosa, distensión abdominal, flatulencia y diarrea asociados a la ingestión de leche (Kumate *et al.*, 1998).

II.6 Patogénesis de la giardiasis.

Uno de los principales factores que describen la giardiasis es el daño producido por irritación mecánica, a través del disco succionario, a las microvellosidades de los enterocitos en el duodeno y la parte proximal del yeyuno, que es su hábitat natural. La unión de los trofozoitos a las microvellosidades obstruye el metabolismo de los ácidos biliares y la producción de sustancias con acción citotóxica. Ello puede producir disminución en la producción de disacaridasas, hidrolasa péptica y enteropeptidasas, así como trastornos en la absorción de grasas, vitaminas liposolubles y vitamina B12, causados por alteraciones en la función de las microvellosidades (Kumate *et al.*, 1998).

II.7 Tratamiento de la giardiasis.

Para el tratamiento de la giardiasis se utilizan diferentes fármacos que pueden tener diversos efectos adversos en la siguiente Tabla se resumen la dosis, mecanismo de acción y reacciones secundarias (Tabla 2) (Gardener *et al.*, 2001; Kumate *et al.*, 1998; PLM, 2005; Wolfe, 1972).

Esquema 2. Ciclo de vida del protozoo flagelado *Giardia lamblia*.

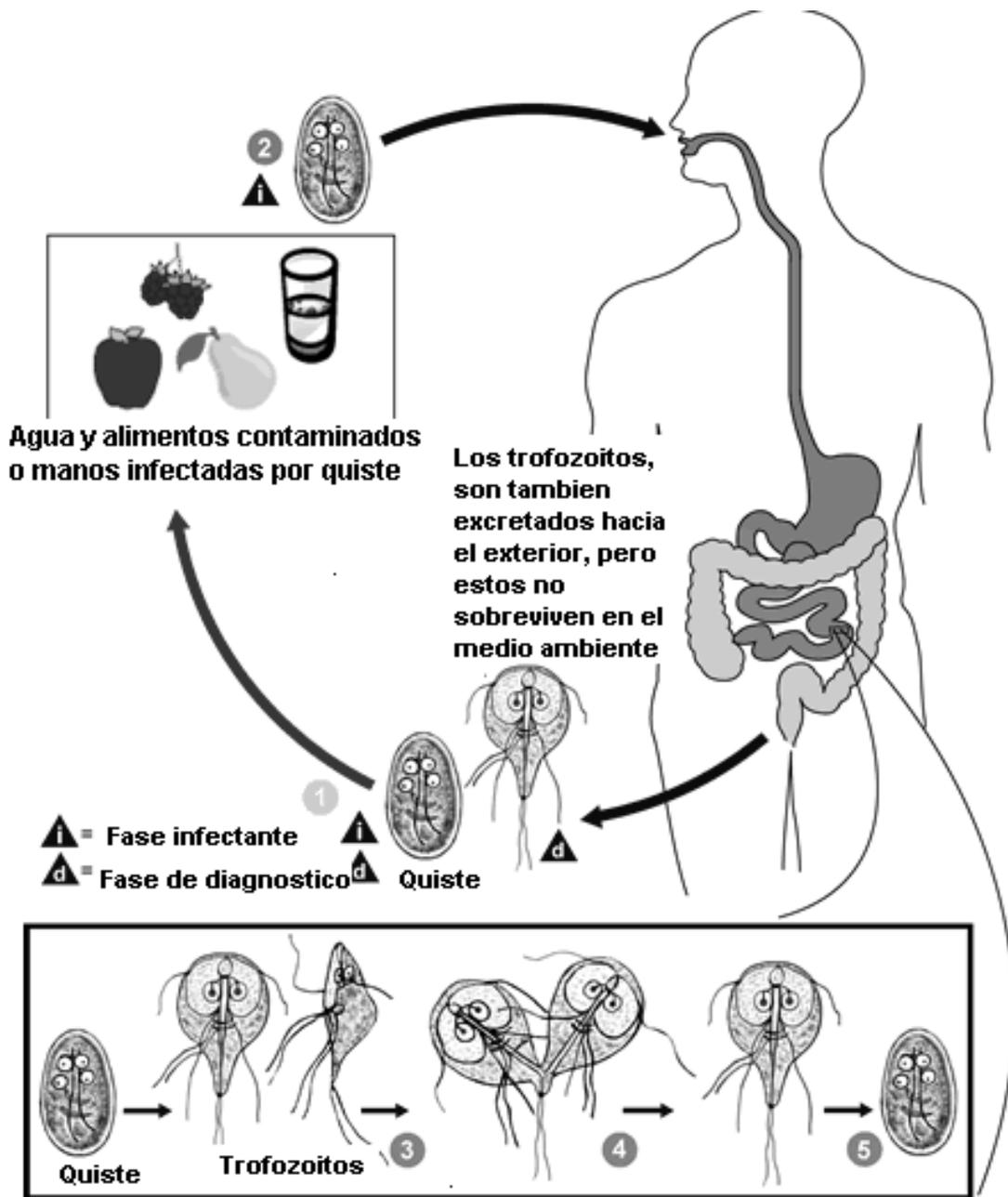
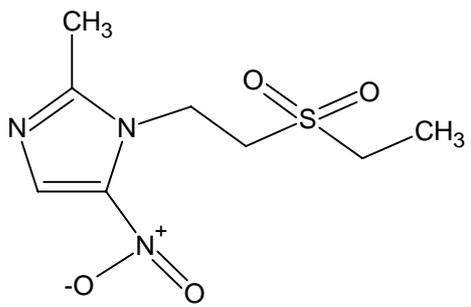
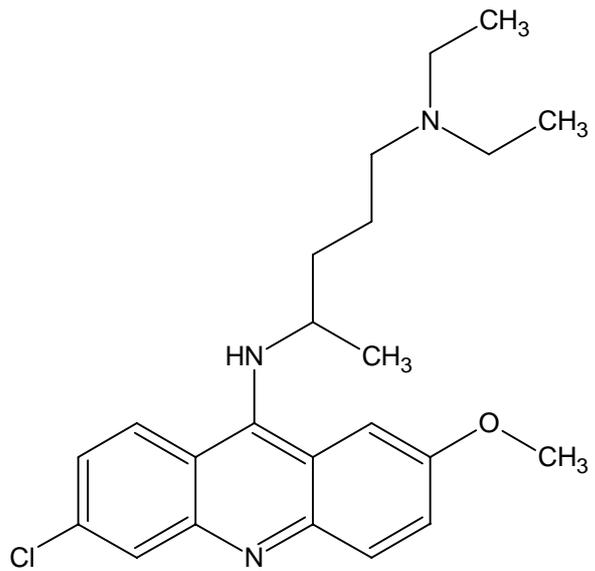


Tabla 2. Algunos fármacos usados en el tratamiento contra la giardiasis

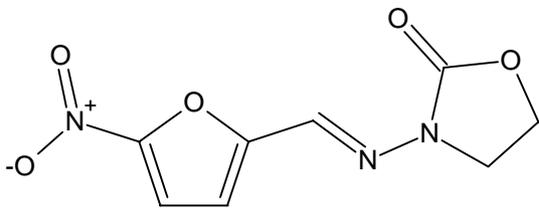
Fármaco	Mecanismo de acción	Dosis	Efectos adversos.
Metronidazol 12	Interactúa con el DNA y produce una pérdida de la estructura helicoidal, rotura de la cadena e inhibición resultante de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular.	500-750 mg /día x 5 a 10 días.	Dolor de cabeza, vértigo, náusea y pancreatitis, así como toxicidad a nivel sistema nervioso central en altas dosis.
Tinidazol 13	Daño a nivel genético, por interacción con el DNA.	300mg/ día x 7 días.	Intolerancia gástrica, náuseas, vómito, rash cutáneo y oscurecimiento de la orina.
Quinacrina 14	Inhibición en la síntesis de Ácidos nucleicos.	300 mg / día 5-7 días.	Nausea, vómito, vértigo, decoloración de la piel y coloración amarilla de la orina.
Furazolidona 15	Interviene en la fase anaeróbica del metabolismo del piruvato, y también en varios pasos del ciclo de Krebs.	400mg/día x 7-10 días.	Nauseas, vómito, urticaria y cefalea.
Nitazoxanida 16	Interviene en la respiración aeróbica inhibiendo la enzima PFOR.	100-500 mg dos veces al día x 7-10 días.	Cefalea, anorexia, náuseas, vómitos y malestar epigástrico.
Paromicina 17	Actúa a nivel ribosomal inhibiendo síntesis de proteínas.	10-50 mg /Kg. /día o 1,500 mg/día x 5-10 días.	Ototóxico y nefrotóxico a dosis muy altas.
Bacitracin 18	Inhibe síntesis de membrana.	240,000 U/día x 10 días.	Nefrotóxico si se usa un largo periodo de tiempo y causa problemas gastrointestinales.



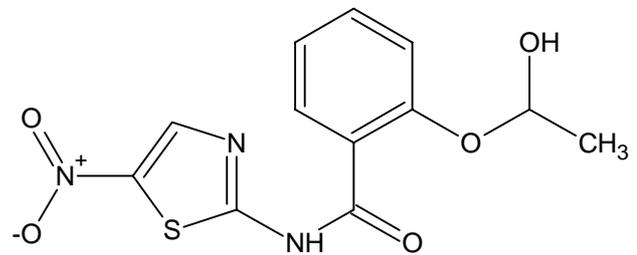
13



14

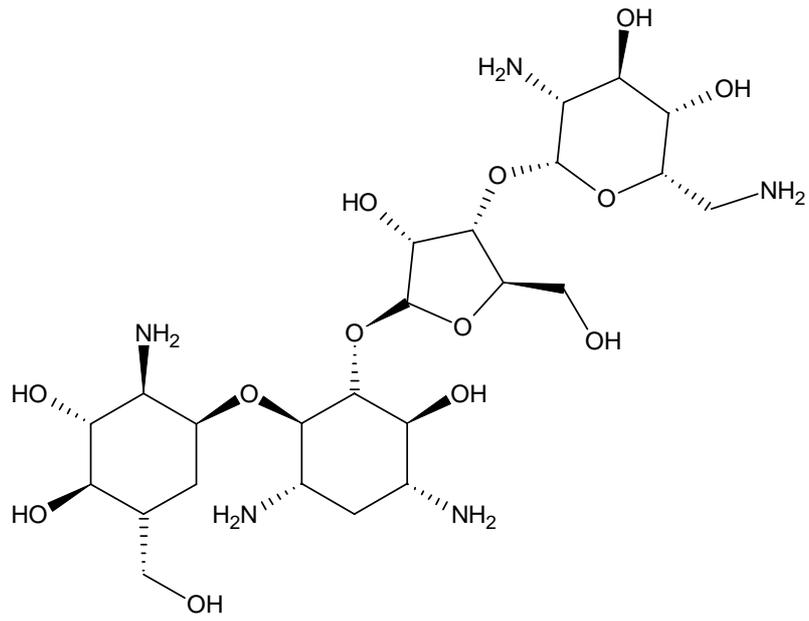


15

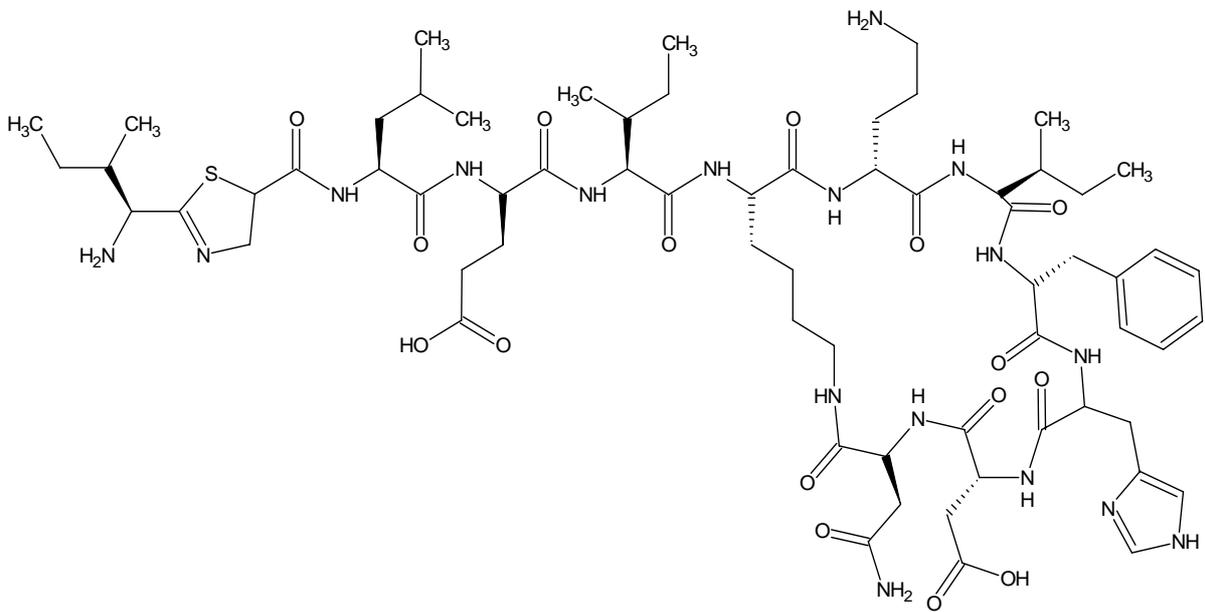


16

Figura 3. Estructuras de algunos fármacos usados en el tratamiento de la giardiasis.



17



18

Figura 3 (continuación) Estructuras de algunos fármacos usados en el tratamiento de la giardiasis.

A pesar de contar con fármacos útiles para el tratamiento de la amibiasis y de la giardiasis, estos presentan efectos colaterales indeseables, son tóxicos y caros.

Por lo que hay necesidad de hallar nuevos principios activos que en lo ideal no tengan efectos colaterales indeseables y sean más accesibles a la población. En este aspecto se debe aprovechar la diversidad florística de México y el conocimiento de la medicinal tradicional para investigar y encontrar principios activos con las características antes mencionadas.

Por lo que esta investigación esta dirigida al estudio químico y farmacológico de ejemplares silvestres de la especie *Rubus liebmannii*.

II.8 Generalidades del género *Rubus*.

Hierbas frecuentemente arbustos o subarbustos, erectos, rastreros o trepadores, generalmente espinosos; hojas alternadas o saliendo en fascículo, pecioladas, estipulas unidas a la base del pecíolo, laminas simples a lobadas o compuestas con 3 a 7 foliolos; flores generalmente perfectas, dispuestas en racimos o espigas, a veces solitarias; sépalos y pétalos generalmente 5; estambres numerosos; carpelos numerosos sobre un receptáculo convexo, estilos subterminales; carpelos maduros en forma de drupillas que forman frutos agregados, óvulos 2, uno abortivo. Se estima que hay entre 250 y 700 especies, principalmente en la región templada del hemisferio norte y los Andes (Rydber, 1913).

La distribución de las especies de genero *Rubus* en la Republica Mexicana se muestran en el Cuadro 2 (Rzedowski, 2001; Sánchez, 1974; Lozoya, 1989; Campos, 1986; IEB,2004; MEXU,2007).

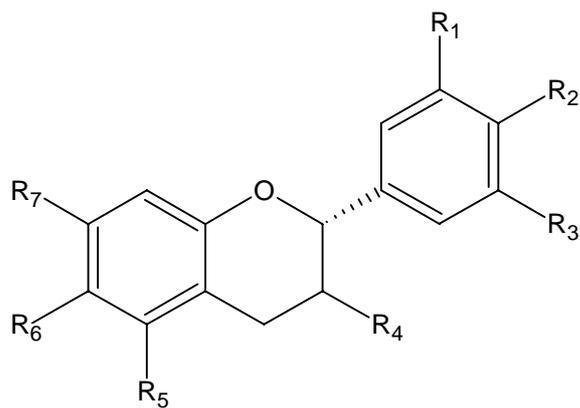
Cuadro 2. Distribución de especies de *Rubus* en México.

Especie	Distribución	Especie	Distribución
<i>R. aboriginum</i>	Nuevo León	<i>R. palmeri</i>	Veracruz, Guerrero, Hidalgo, Durango y Sinaloa
<i>R. adenotrichus</i>	Michoacán Oaxaca Estado de Méx., Jalisco, Morelos, Hidalgo, Pueblay Colima	<i>R. parviflorus</i>	Hidalgo
<i>R. arizonensis</i>	Nuevo León, Hidalgo, Sonora, Durango y Chihuahua	<i>R. pringleri</i>	Chihuahua, Tamaulipas, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, D.F., Morelos, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas
<i>R. cariocarpus</i>	Hidalgo	<i>R. pumilus</i>	Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, D.F., Morelos y Tlaxcala
<i>R. caudatisepalus</i>	D.F.	<i>R. philyrophyllus</i>	Querétaro, Aguascalientes, Veracruz y Oaxaca
<i>R. coriifolius</i>	Durango, Guerrero Sinaloa, Hidalgo, Puebla, Veracruz y Chiapas	<i>R. sapidus</i>	Oaxaca, Puebla, Veracruz y Chiapas Hidalgo
<i>R. cymosus</i>	D.F., Michoacán, Estado de Méx. y Morelos	<i>R. scandens</i>	Oaxaca
<i>R. eriocarpus</i>	Veracruz, Durango, Hidalgo, Puebla, Guerrero, San Luis Potosí, Oaxaca, Chiapas y Querétaro	<i>R. shiedeanus</i>	Oaxaca, Veracruz y Puebla
<i>R. fagifolius</i>	Veracruz	<i>R. scolaocaulan</i>	Sonora y San Luis Potosí
<i>R. glaucus</i>	Jalisco	<i>R. strigosus</i>	Nuevo León, Durango, Chihuahua y Tamaulipas
<i>R. huministratus</i>	Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Puebla y Veracruz	<i>R. trichomallus</i>	Morelos
<i>R. idaeus</i>	Chihuahua, Nuevo León y Coahuila	<i>R. trilobus</i>	Oaxaca y Veracruz
<i>R. liebmannii</i>	Estado Méx., Durango, Morelos, Hidalgo, Guerrero, Michoacán, D.F. y Oaxaca	<i>R. urticaefolius</i>	Oaxaca
<i>R. macvaughianus</i>	Querétaro	<i>R. verae-crucis</i>	Puebla, Veracruz e Hidalgo
<i>R. neomexicanus</i>	Sonora		

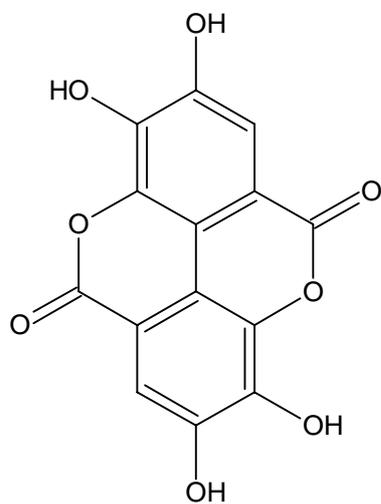
Desde el punto de vista farmacológico el genero *Rubus* a sido objeto de varios estudios, para validar su uso en la medicina tradicional; los cuales se muestran en el cuadro 3, también se muestran los productos que son responsables de la actividad farmacológica de cada especie sujeta a estudio.

Cuadro 3. Actividad farmacológica de los productos y compuestos aislados de las especies del genero *Rubus* localizadas en América.

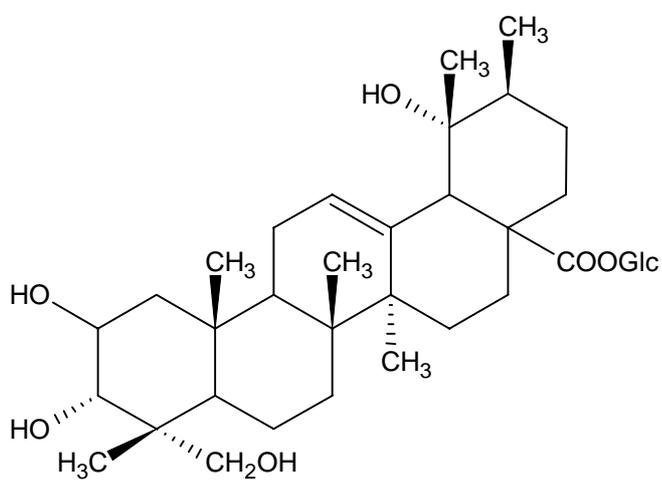
Especie de Rubus	Actividad farmacológica	Producto responsable	Referencia
<i>Rubus coriifolius</i>	Actividad antiprotozoaria (<i>G. lamblia</i> y <i>E. hystolitica</i>)	(+) Catequina 19 y (-) Epicatequina 20	Alanis <i>et al.</i> , 2003; Barbosa <i>et al.</i> , 2006
<i>Rubus coriifolius</i>	Actividad antibacteriana (<i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>)	Extracto metanólico	Berlin <i>et al.</i> , 1996 .
<i>Rubus coriifolius</i>	Antiinflamatorio	Extracto metanólico	Meckes <i>et al.</i> , 2004.
<i>Rubus idaeus</i>	Inhibición de proteínas y oxidación lipídica	Antocianidinas, Procianidinas 21	Viljanen <i>et al.</i> , 2004
<i>Rubus idaeus</i>	Relajante del músculo liso	Extracto metanólico	Rojas-Vera <i>et al.</i> , 2002
<i>Rubus imperialis</i>	Antioxidante	Ácido elágico, 22 Antocianidinas, Procianidina.	Beekwilder <i>et al.</i> , 2005
<i>Rubus imperialis</i>	Antiinflamatorio	Nigaichigósido F1 23	Niero <i>et al.</i> , 1999
<i>Rubus imperiales</i>	Actividad hipoglucémica	Extracto metanólico	Kanegusuku <i>et al.</i> , 2002
<i>Rubus laciniatus</i> <i>Rubus ursinus</i> <i>Rubus ursinus x idaeus</i> <i>Rubus idaeus</i> <i>Rubus occidentalis</i>	Antioxidante	Antocianidinas Isoquercitina 24 y Ácido elágico	Wada <i>et al.</i> , 2002; Zafrilla <i>et al.</i> , 2001
<i>Rubus parvifolius</i>	Efectos protectivos contra isquemia cerebral y antioxidante.	Glucósidos	Wang <i>et al.</i> , 2006.
<i>Rubus ulmifolius.</i>	Actividad antimicrobiana (<i>S. aureus</i>)	Rubantrona 26	Flamini <i>et al</i> , 2002
<i>Rubus ulmifolius</i>	Actividad hipoglucémica	Extracto de éter de petróleo.	Lemus <i>et al.</i> , 1999
<i>Rubus chamaemorus</i>	Anti protozoario (<i>Acanthamoeba sp</i>)	Extracto metanólico	Derda <i>et al.</i> , 2004



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
(+) Catequina 19	H	OH	OH	OH	OH	H	OH
(-) Epicatequina 20	H	OH	OH	OH	OH	H	OH
Cianidina 21	OH	OH	H	OH	OH	H	OH
Procianidina 21	H	OH	OH	OH	OH	H	OH

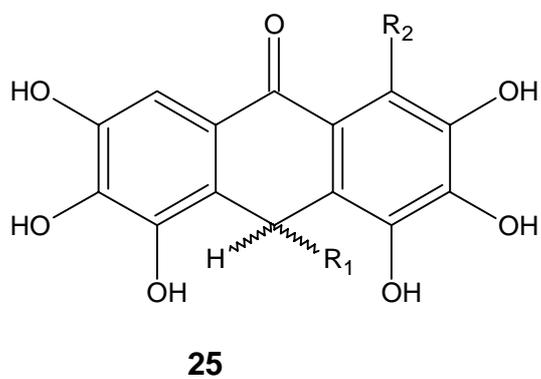
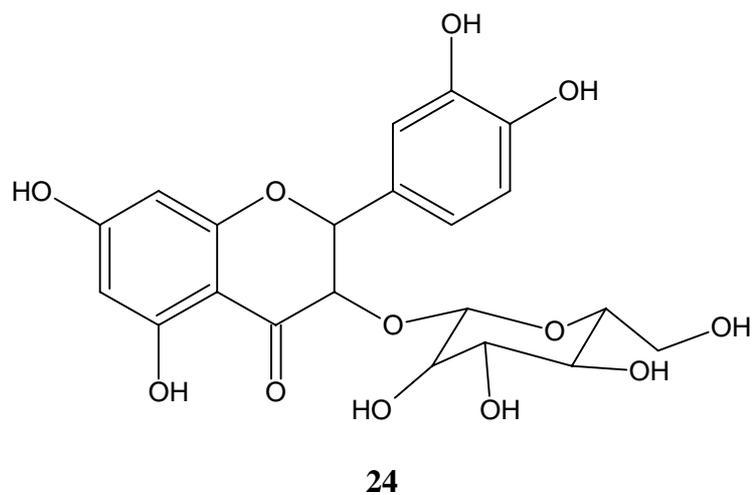


22



23

Figura 4. Estructura de los compuestos aislados del genero *Rubus* en América con actividad biológica.



Rubantrona A	$R_1 = \text{COOCH}_3$	$R_2 = \text{OH}$
Rubantrona B	$R_1 = \text{CH}_3$	$R_2 = \text{H}$
Rubantrona C	$R_1 = \text{H}$	$R_2 = \text{OH}$

Figura 4 (continuación) Estructura de los compuestos del genero *Rubus* en América con actividad biológica.

II.8.1 Generalidades de *Rubus liebmannii* Focke.

Rubus liebmannii Focke (Esquema 3) es un arbusto de 1 a 4 m de alto, semitrepador, con espinas cortas, algo curvadas, pubescencia de pelos largos y cortos, a veces ausentes en tallos maduros, especialmente densa de las partes jóvenes (inclusive hojas), donde a veces se presenten pequeñas glándulas rojas sésiles o cortamente estipitadas; estipulas cetáceas, de 7 a 10 mm de largo, pecíolos pubescentes, espinosos, de 4 a 6 cm de largo, hojas por lo general trifolioladas, a veces simples o 5-folioladas, foliolos ovados a lanceolados, en ocasiones con tendencia a lobularse, de 3 a 15 cm de largo por 2 a 6 cm de ancho, acuminados, borde con dientes irregulares, doblemente aserrado, laminas por lo general poco pubescentes en ambas caras, pero a veces llegando a ser blanco tormentosas en el envés, peciólulo del foliolo terminal de 2 a 3 cm de largo, foliolos laterales mas chicos y subsésiles; ramas florales densamente pubescentes, con espinas muy pequeñas, curvadas; cimas umbeliformes, cortas terminales y axilares, por lo común de 1 a 6 flores, pedicelos y cálices tormentosos y con glándulas rojizas sésiles o cortamente estipitadas; sépalos extendidos o reflejos, ovado-lanceolados, acuminados, de 5 a 8 mm de largo; pétalos blancos (a veces color de rosa en ejemplares secos), ovales, de mas o menos el mismo largo que los sépalos; fruto agregado globoso- comprimido, hasta 1.5 cm de diámetro, drupillas numerosas, tormentosas (Calderón ,2001).



Esquema 3. *Rubus liebmannii* Focke a: arbusto; b: fruto y hojas ; c: flor

En la republica Mexicana *Rubus liebmannii* se distribuye principalmente en los estados de Durango, Morelos, Hidalgo, Guerrero, Michoacán, D.F., Oaxaca y el Estado de México. El nombre común de esta Rosáceae es el de “zarzamora”. En las prácticas médicas alternativas se usa el retoño junto con el corazón de membrillo para el tratamiento de la disentería, la infusión de las hojas se usan contra la tos, para los nervios y el insomnio, se toma en té (Monte, 1996).

Desde el punto de vista farmacológico el material de la planta micropropagada fue objeto de estudio en el cual se demostró una débil actividad del extracto etanólico contra *Giardia intestinales*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, en este mismo estudio se demostró que no es tóxica a los roedores a dosis de 5g/Kg (Cornejo *et al.*, 2006)

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

III.1 Selección y preparación del material vegetal.

Las especies seleccionadas fueron recolectadas en Ozúmba, Edo. de México y en la delegación de Tláhuac, D. F. La parte de la planta recolectada fueron las partes aéreas que corresponde a las utilizadas en la medicina tradicional, en cantidades suficientes para obtener material seco y molido en un mínimo de 20 g. Los cuatro ejemplares de referencia se depositaron en el herbario IMSSM del IMSS.

III.2 Extracción.

III.2.1 Preparación de los extractos etanólicos a pequeña escala.

Para la selección de la especie con el potencial antiprotozoario se prepararon los extractos etanólicos a partir de 20 g de material seco y molido de cada una de las cuatro especies preseleccionadas. La extracción se realizó por maceración con 300 mL de EtOH por dos ocasiones a intervalos de una semana, a los extractos resultantes se les eliminó el disolvente por destilación a presión reducida hasta obtener los extractos etanólicos a peso constante.

Los cuatro extractos resultantes se colocaron en frascos viales que fueron sellados y almacenados en refrigeración a - 4° C hasta su evaluación.

III.3 Evaluación biológica.

El ensayo biológico utilizado para la determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los diferentes extractos, fracciones y compuestos puros se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Calzada y colaboradores (1998).

III.3.1 Protozoarios.

Los microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antiprotozoaria fueron *E. histolytica* (HM1-IMSS) y *G. lamblia* (IMSS:0989:1). La cepa de *E. histolytica* se mantuvo en el medio TYI-S-33 suplementado con suero bovino al 10%. La cepa de *G. lamblia* se cultivó en el medio TYI-S-33 modificado y enriquecido con suero de ternera al 10%. Ambas cepas se mantuvieron axénicamente y para el bioensayo se utilizaron los parásitos en fase logarítmica de crecimiento.

III.3.2 Determinación de la actividad antiprotozoaria.

Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma. El extracto, la fracción o el compuesto puro se disolvió en 1 mL de DMSO y 19 mL de medio de cultivo TYI-S-33. De la solución resultante, se transfirieron 20, 40, 80, 120, y 160 μL a cinco tubos de manera independiente y c/u se aforó a un volumen de 4 mL con medio de cultivo, para obtener así una concentración final de 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. De manera adicional, cuando fue necesario, se realizaron diluciones subsecuentes para obtener concentraciones de 2.5, 0.25 y 0.025 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada concentración se ensayó por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces. Los tubos con la muestra incorporada se inocularon con *E. histolytica* o *G. lamblia* para obtener un inóculo de 6×10^3 trofozoitos/ mL y 5×10^4 trofozoitos /mL, respectivamente. Las muestras se incubaron a 37°C durante 48 hr. Cada prueba incluyó metronidazol (Sigma) y emetina (Sigma) como controles positivos, un control (medio de cultivo, DMSO y trofozoitos) y un blanco (medio de cultivo). Transcurridos el tiempo de incubación, 50 μL de cada tubo de cultivo se subcultivaron en medio fresco y el número final de parásitos sobrevivientes se

determinó por cuenta directa al microscopio. Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) se utilizó un programa de análisis probit.

III.4 Preparación del extracto etanólico de las partes aéreas de *Rubus liebmannii* Focke a gran escala.

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación antiprotozoaria se seleccionó del grupo de plantas a la especie *R. liebmannii* para realizar su fraccionamiento fitoquímico.

La planta se recolectó en el paraje denominado el “embarcadero” ubicado en la delegación Tláhuac, D.F., por el Dr. Fernando Calzada. Una muestra de referencia se depositó en el herbario del IMSS (Voucher: 15216) y su identificación botánica corrió a cargo de la M. en C. Abigail Aguilar Contreras

El material vegetal se sometió a un proceso de secado a temperatura ambiente para después ser triturada en un molino Tor-Rey. Se obtuvo 1.2 Kg de la partes aéreas de la planta. El material seco y molido se extrajo a temperatura ambiente por maceración con etanol (22 L x 2) a intervalos de una semana. El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida en un rota evaporador a una temperatura de 40 ° C, obteniéndose 155 g del extracto de color verde.

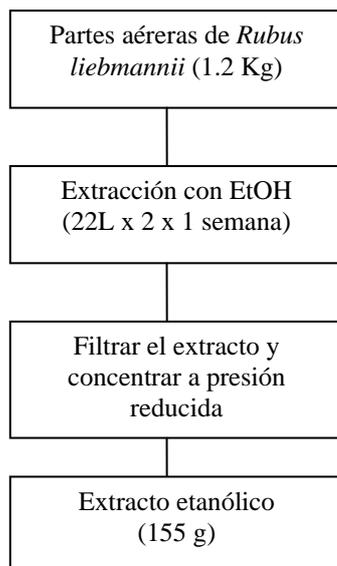


Figura 5. Preparación del extracto etanólico de las partes aéreas de *R. liebmannii*

Focke

III.5 Fraccionamiento fitoquímico del extracto etanólico de *Rubus liebmannii*

Focke.

III.5.1 Material cromatográfico.

La cromatografía de absorción en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice, (Kiesel gel 60 Merck tamaño de partícula 0.063 mm, 70-230 mesh ASTM).

La cromatografía de alta resolución (CLAR) se realizó en un cromatógrafo de marca Beckman System Gold, equipado con un detector de UV Beckman System Gold 166. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa System Gold 810. La purificación de los compuestos se efectuó empleando una columna semipreparativa fase reversa (Waters, Sepherisorb, S50DS2 de 10 x 250mm)

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) analítica y preparativa se llevaron acabo siguiendo las técnicas convencionales. Se emplearon placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (20 x 20 cm Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) y diversos sistemas de elución. Los agentes cromógenos que se emplearon se muestran en

la tabla 3. Antes de llevar a cabo el revelado se visualizaron las placas con luz UV, con una lámpara modelo UV gL-58 a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

Tabla 3. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente cromógeno	Composición	Referencia
H ₂ SO ₄ (10%)	Ácido sulfúrico 9.8 mL Agua 100 mL	Wagner <i>et al.</i> , 1984
Tricloruro férrico	Cloruro de fierro III 10g Agua 100mL	Wagner <i>et al.</i> , 1984
Tricloruro de aluminio	Cloruro de aluminio 5g Agua 100mL	Wagner <i>et al.</i> , 1984
Vainillina- H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico al 5% en etanol 100mL Vainillina 1g	Wagner <i>et al.</i> , 1984

III.6 Fraccionamiento fitoquímico.

Una porción del extracto etanólico (89.7g) activo (CI₅₀ 51.3 µg/mL para *E. histolytica* y 56.12 µg/mL para *G. lamblia*) se suspendió en metanol acuoso al 10 % (360 mL) y se fraccionó mediante un proceso de partición con AcOEt (300mL x 2).

Como resultado de este proceso se obtuvieron 2 fracciones: fracción de Acetato de etilo y fracción Acuosa (Tabla 4, Figura 6)

Tabla 4. Rendimientos de la partición por par de disolventes

Fracción	Cantidad obtenida(g)	Rendimiento ⁺ (%)
Acuosa	15	0.7233
AcOEt	71.6	3.4529

⁺Referido al peso seco de la planta.

III.6.1 Separación de la fracción de acetato de etilo con mayor actividad contra *E. histolytica*.

La fracción de AcOEt se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria 1 Kg de gel de sílice. Los eluyentes empleados fueron CHCl_3 , AcOEt y MeOH, en varias proporciones (Tabla 5). Se obtuvieron 153 fracciones de 260 mL cada una, las cuales, fueron agrupadas en 10 fracciones secundarias (FS1/FS10) de acuerdo a sus similitudes cromatográficas (Tabla 5). El concentrado de las fracciones se llevó a cabo a presión reducida en un rota evaporador y a una temperatura de 40 ° C.

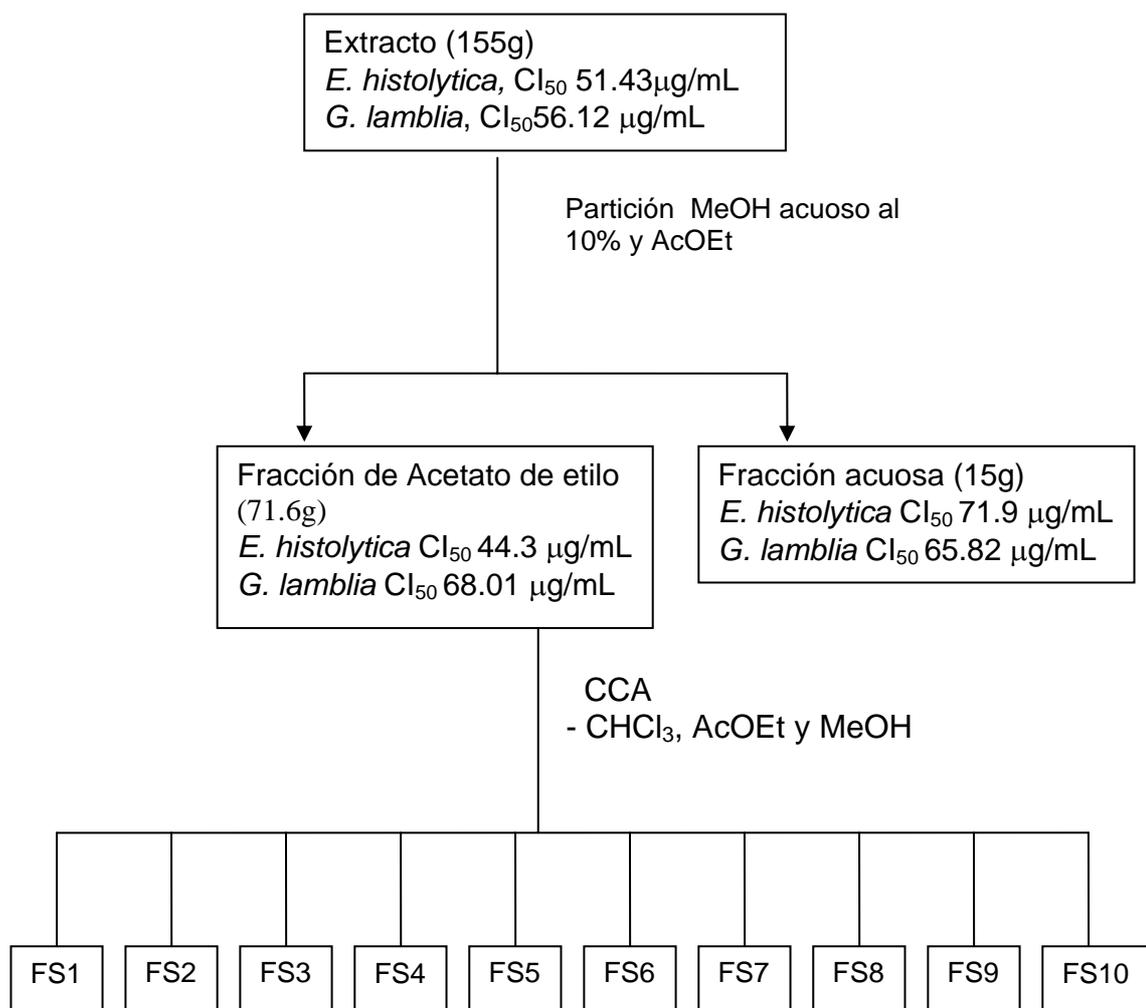


Figura 6. Extracción y fraccionamiento del extracto etanólico de las partes aéreas de *Rubus liebmannii*.

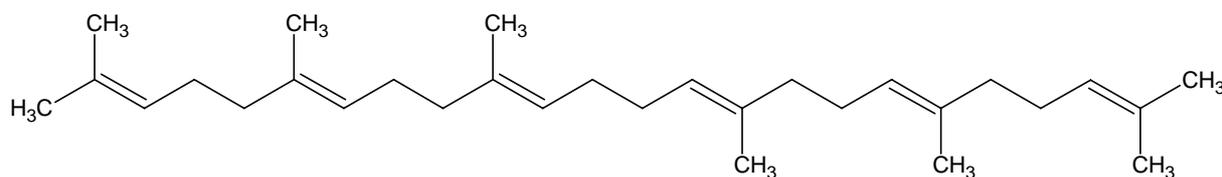
Tabla 5. Resumen del fraccionamiento mediante CCA de la fase de AcOEt derivada del extracto etanólico de las partes aéreas de *R. liebmannii*

Fracción	Fracciones agrupadas	Sistemas de elución	Cantidad obtenida (g)	Rendimiento ⁺ (%)
FS1	1/9	CHCl ₃ 100%	1.9724	0.2905
FS2	10	CHCl ₃ 100%	0.2746	0.0404
FS3	11/23	CHCl ₃ - AcOEt 90:10	6.9451	1.0229
FS4	24/50	CHCl ₃ - AcOEt 80:20	0.8975	0.1322
FS5	51/71 72/87	CHCl ₃ - AcOEt 70:30 CHCl ₃ - AcOEt 50:50	2.6939	0.3968
FS6	88/93	CHCl ₃ - AcOEt 30:70	2.6166	0.3854
FS7	94/108	AcOEt 100%	2.5471	0.3751
FS8	108/113	AcOEt-MeOH 70:30	12.4189	1.8291
FS9	114/119	AcOEt-MeOH 70:30	5.462	0.8045
FS10	120/153	AcOEt-MeOH 50:50	4.7216	0.6954

⁺Referido al peso seco de la planta

III.6.2 Obtención del escualeno.

La fracción secundaria FS1 se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCP) utilizando como fase móvil hexano (100%). Por cada 20 mg de la fracción se obtuvieron 2 mg de un aceite incoloro que se identificó por cromatografía en capa fina analítica como escualeno **27**, comparándolo contra un estándar disponible en el laboratorio (Calzada *et al.*, 2005)



27

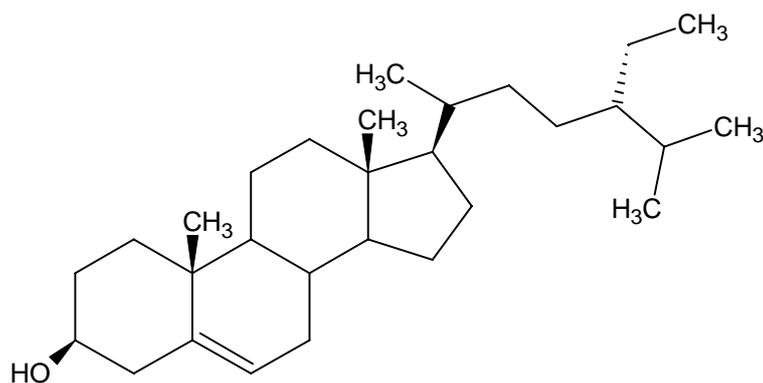
III.6.3. Obtención del ácido 3,4-dihydroxibenzoico y del β - sitoesterol

La fracción secundaria FS3 (6.0g) se sometió a un fraccionamiento por CCA, usando como fase estacionaria gel de sílice (625g). Se emplearon como eluyentes CHCl_3 y AcOEt en diferentes proporciones (Tabla 6). Se obtuvieron 250 fracciones de 30 mL cada una, las cuales se reunieron en 10 fracciones terciarias (FS3TI/FS3TX) de acuerdo a sus similitudes cromatográficas (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de la separación mediante CCA de la fracción secundaria FS3 derivada de la fase orgánica del extracto etanólico de *R. liebmannii*

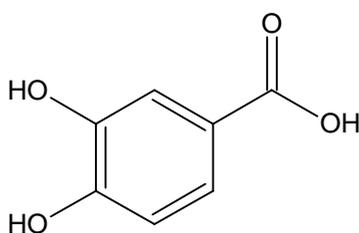
Fracciones	Fracciones agrupadas	Sistema de elución	Cantidad obtenida	Redimiendo ⁺
FS3TI	1/2	CHCl_3 100%	0.4338	0.1601
F S3TII	3/2	CHCl_3 100%	0.2375	0.0877
F S3TIII	13/21	CHCl_3 100%	0.1313	0.0485
F S3TIV	22/43	CHCl_3 100%	0.379	0.1399
F S3TV	44/58	CHCl_3 100%	0.1067	0.0394
F S3TVI	59/93	CHCl_3 100%	0.7206	0.2659
F S3TVII	94/103	CHCl_3 100%	1.0792	0.3983
F S3TVIII	104/207	CHCl_3 100%	1.4848	0.5480
F S3TIX	208/223	CHCl_3 100%	0.3069	0.1133
F S3TX	224/250	CHCl_3 : AcOEt(95:5)	0.1907	0.0704

La totalidad de la fracción terciaria FS3TVI (0.72 g), se lavó con heptano para obtener un sólido de color blanco (0.153 g), que por análisis en cromatografía en capa fina (CHCl_3 -AcOEt (95:5); gel de sílice) y empleando una referencia disponible en el laboratorio, fue identificado como β -sitoesterol **26** (Calzada *et al.*, 2005)



26

La fracción terciaria FS3TVII se purificó mediante CCFP, utilizando como fase móvil, una mezcla de AcOEt-MeOH (50:50). Por cada 20 mg de la fracción se obtuvieron 2 mg de un sólido color blanco que se identificó como ácido 3,4-dihidroxibenzoico **28** por comparación con un estándar (Sigma).



28

III.6.4. Obtención de la (-) epicatequina y de la (+) catequina.

Una parte de la fracción secundaria FS6 (2.5g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante CCA. Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (150 g). Los eluyentes empleados fueron CHCl₃, MeOH, AcOEt y H₂O, en diferentes proporciones (Tabla 7), obteniéndose 352 fracciones terciarias de 25 mL cada una,

las cuales, fueron agrupadas en 11 fracciones (FS6TI/FTS6XI) de acuerdo a sus similitudes cromatográficas (Tabla 7).

La fracción terciaria FS6TVI (428 mg) se purificó mediante cromatografía de líquido de alta resolución (CLAR) empleando una columna en fase reversa, el método empleado fue de gradientes (Tabla 8), un flujo de 1 mL/min, la detección se realizó a 280 nm y el tiempo total de elución fue de 25 min.

Tabla 7. Resumen del fraccionamiento mediante CCA de la fracción secundaria FS6 derivada de la fase de Acetato de etilo.

Fracción	Fracciones reunidas	Sistema de elución	Cantidad obtenida	Rendimiento ⁺
FS6TI	1-26	CHCl ₃ (100)	0.0416	0.0003
FS6TII	27-60	CHCl ₃ - MeOH (95:5)	0.6753	0.0002
FS6TIII	51-86	CHCl ₃ - MeOH (95:5)	0.3614	0.0001
FS6TIV	87-91	CHCl ₃ - MeOH (90:10)	0.4132	0.0003
FS6TV	92-111	CHCl ₃ - MeOH (90:10)	0.1179	0.0001
FS6TVI	112-175	CHCl ₃ - MeOH (90:10)	0.4283	0.0006
FS6TVII	176-230	CHCl ₃ - MeOH (80:20)	0.0615	0.0008
FS6TVIII	231-258	CHCl ₃ - MeOH (80:20)	0.2132	0.0012
FS6TIX	259-330	CHCl ₃ - MeOH (70:30);(60:40);(50:50)	0.3453	0.0002
FS6TX	331-350	CHCl ₃ - MeOH (50:50)	0.0584	0.0001
FS6TXI	352	CHCl ₃ - MeOH (50:50)	0.1033	0.0003

+Referido al peso seco de la planta.

La (+)-catequina **19** se aisló como un sólido color café claro (142 mg) y un tiempo de retención 13.6 min.

La (-)-epicatequina **20** se aisló como un sólido de color café claro (285 mg) y un tiempo de retención de 14 min. Ambos compuestos revelaron de color rojo intenso en los análisis de cromatografía en capa fina al utilizar vainillina como agente cromógeno (Calzada *et al.*, 2005)

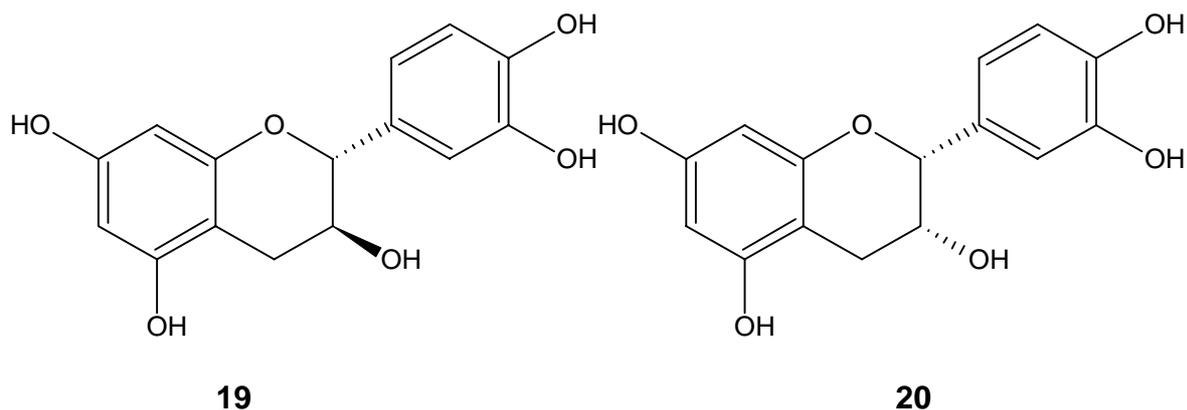


Tabla 8. Programa de elución utilizado en la CLAR para separar la fracción terciaria FS6TVI.

Tiempo (min)	Flujo (min/mL)	Composición	
		MeOH (%)	Acido fórmico al 5 % (%)
0	1.00	0	100
1	1.00	10	90
2	1.00	10	90
3	1.00	20	80
4	1.00	20	80
9	1.00	50	50
10	1.00	50	50
15	1.00	100	0
16	1.00	100	0
25	1.00	100	0

III.6.5. Obtención del nigachigósido F1

La fracción secundaria FS9 (1.0994g) se sometió a una purificación por CCA. Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (179g), y como fase móvil se utilizaron, AcOEt, MeOH y H₂O en diferentes proporciones (Tabla 9).

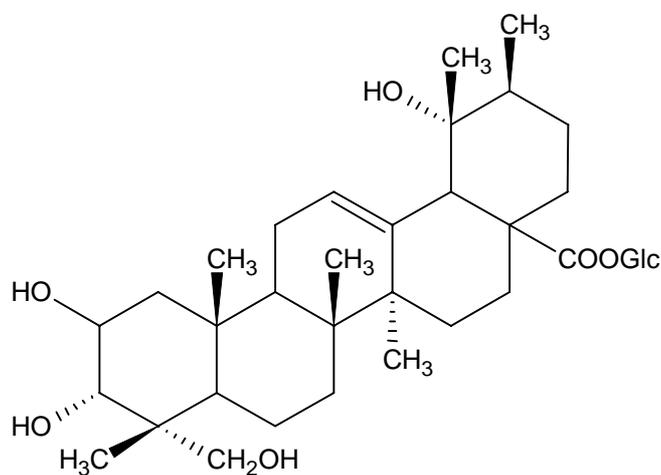
De este fraccionamiento resultaron 120 fracciones terciarias de 30 mL cada una, las cuales se agruparon en siete fracciones (FS9I/FS9VII) de acuerdo a su similitud cromatográfica (Tabla 9).

Tabla 9. Resumen del fraccionamiento mediante CCA de la fracción secundaria FS9 derivada del la Fase de Acetato de etilo.

Fracción	Fracciones reunidas	Sistema de elución	Cantidad obtenida (g)	Rendimiento ⁺ x 10 ⁻⁵
FS9TI	1-4	AcOEt 100%	0.0277	9.2692
FS9TII	5-34	AcOEt 100%	0.2578	86.267
FS9TIII	35-44	AcOEt 100%	0.0532	17.802
FS9TIV	45-54	AcOEt-MeOH (95:5); (90:10)	0.0054	1.807
FS9TV	55-65	AcOEt-MeOH (90:10)	0.198	66.256
FS9TVI	66-76	AcOEt-MeOH-H ₂ O (10:1.6:1.3)	0.1971	65.955
FS9TVII	77-120	AcOEt-MeOH-H ₂ O (10:1.6:1.3)	0.3896	130.371

⁺ Referido al peso seco de la planta

En la fracción FS9TVI precipitó un sólido de color café claro (197.1 mg), que se identificó como nigachigósido F1 **23** por CCF, comparándolo con un estándar disponible en el laboratorio (Alanís *et al.*, 2003). Como sistema de elución se empleo AcOEt-MeOH-H₂O (10:1.6:1.3).



23

IV. RESULTADOS.

Los resultados de la presente tesis se divide en dos partes: la primera, comprende los resultados de la actividad antiprotozoaria obtenida de la evaluación de los cuatro extractos etanólicos derivados de las cuatro rosáceas sometidos a estudio. La segunda parte se refiere al estudio fitoquímico de las partes aéreas de ejemplares silvestres de *Rubus liebmannii*.

IV.1 Resultados de la actividad antiprotozoaria de los extractos etanólicos de las cuatro especies preseleccionadas

En la primera fase de la investigación se determino la CI_{50} de los cuatro extractos etanólicos contra los trofozoitos de *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Actividad de los cuatro extractos etanólicos de las especies preseleccionadas.

Extracto etanólico	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Rubus coriifolius</i> ¹	72.42	77.82
<i>Rubus coriifolius</i> ²	170.55	240.99
<i>Rubus liebmannii</i>	51.43	56.12
<i>Rosa gallica</i>	127.02	107.64
<i>Rubus trivialis</i>	98.17	132.92
Emetina*	1.05	0.42
Metronidazol*	0.04	0.21

*controles positivos ¹ ejemplar recolectado en Chiapas y valores tomados de Alanís *et al.*, 2003

²ejemplar recolectado en Ozúmba, Edo. de México.

IV.2 Resultados de la actividad antiprotozoaria del extracto etanólico, fracciones primarias, secundarias y compuestos puros obtenidos a partir de las partes aéreas de ejemplares silvestres de *Rubus liebmannii* Focke.

Los resultados de la evaluación biológica del extracto etanólico, fracciones y compuestos puros derivados del estudio fitoquímico del ejemplar silvestre de *Rubus liebmannii* se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 5. Actividad del extracto, fracciones y compuesto puros.

Muestra	CI ₅₀ (µg/mL)	
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>
Extracto etanólico	51.43	56.1
Fracción de acetato de etilo (FAcOEt)	44.3	68.0
Fracción acuosa (FA)	71.9	65.8
FS1	37.5	26.3
FS2	31.6	1.2
FS3	17.9	25.2
FS4	27.2	79.2
FS5	35.9	45.9
FS6	26.2	72.2
FS7	43.9	60.2
FS8	68.5	81.4
FS9	59.7	62.9
FS10	107.7	91.8
Catequina	65.5	33.9
(-)-Epicatequina	1.6	1.9
Ácido 3,4- dihidroxibenzoico	178.7	33.1
β- sitoesterol	52.3	71.0
Escualeno	270.1	99.1
Nigachigósido F1	111.9	123.6
Emetina*	1.05	0.42
Metronidazol*	0.04	0.21

*controles positivos.

V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Se realizó una preselección de cuatro especies que se usan en la medicina tradicional mexicana tomando en cuenta criterios etnomédicos, quimiotaxonómicos así como la actividad antiprotozoaria descrita para alguna de ellas.

En el primer caso, se consideró la información del uso medicinal que se le da a cada una de las especie preseleccionadas, para el tratamiento de desordenes gastrointestinales ente ellos la diarrea y la disentería.

En el criterio quimiotaxonómico, se tomo en cuenta la cercanía taxonómica ya que especies del mismo género presentan metabolitos secundarios similares.

Por último la actividad farmacológica descrita tanto para *R. liebmannii* como para *R. coriifolius* que han sido objeto de estudio para encontrar una actividad antiprotozoaria fue el criterio farmacológico que apoyo la preselección de estas especies.

Una vez que se llevo acabo la preselección de las especies se realizo la colecta de las plantas en el poblado de Ozúmba, Estado de México y Tláhuac, D.F., posteriormente se realizaron los extractos etanólicos de cada uno por maceración. Se eligió como disolvente el etanol ya que con el podemos extraer compuestos de alta, mediana y baja polaridad, además de que es un disolvente empleado en la preparación de formulaciones farmacéuticas.

Para la evaluación biológica se seleccionó la prueba de determinación de la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. lamblia* ya que es un ensayo que permite determinar la CI_{50} de las especies evaluadas. Los protozoarios elegidos fueron *G. lamblia* y *E. histolytica* por que son los dos protozoarios mas comunes causantes de disentería y diarrea y forman parte de las 20 causas

principales de morbilidad en México. Las cepas utilizadas fueron aisladas de pacientes con disentería o diarrea.

La actividad antiprotozoaria de los extractos evaluados se muestran en el cuadro 4, en este estudio se encontró que el extracto etanólico de *Rubus liebmannii* fue el más activo contra ambos protozoarios con valores de CI_{50} de 51.43 y 56.12 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y *G. lamblia*, respectivamente. En esta investigación la especie vegetal *R. coriifolius* fue la que mostró menor efecto contra ambos protozoarios. El valor de CI_{50} en este caso fue de 170.55 y 240.99 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y *G. lamblia*, respectivamente.

Los extractos etanólicos de *Rosa gallica* y *Rubus trivialis* mostraron un rango de actividad entre 127.02 - 98.17 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y para *G. lamblia* de 132.92-107.64 $\mu\text{g/mL}$, cabe destacar que en investigaciones previas se ha establecido como un criterio de selección para continuar con un estudio fitoquímico de la especie en estudio, que la actividad antiprotozoaria de extractos muestren valores de CI_{50} entre el rango de 2.5 a 284.7 $\mu\text{g/mL}$ (Calzada *et al.*, 2006).

En este sentido podemos decir que todos los extractos etanólicos evaluados están dentro del rango por lo que son materias primas idóneas para el hallazgo de nuevos principios activos contra *G. lamblia* y *E. histolytica*.

La actividad del extracto etanólico de *R. coriifolius* recolectado de Ozúmba, Edo. de México muestra una menor actividad que la especie vegetal recolectada en el estado de Chiapas, esto puede ser causado por el estado de desarrollo de la planta, las condiciones climáticas, tipo de suelo, y época de recolección. Además de que se utilizó otro disolvente en la preparación del extracto.

Con respecto a los valores obtenidos de los extractos comparados contra los controles positivos, ninguno de los extractos superan las actividades del

metronidazol y la emetina, fármacos usados en el tratamiento de enfermedades provocadas por estos protozoarios.

Al comparar los valores de CI_{50} (Cuadro 4) del extracto etanólico de *R. liebmannii* y del extracto CH_2Cl_2 : MeOH de *R. coriifolius* podemos decir que *R. liebmannii* es una buena alternativa para la búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios.

Debido a que la especie *Rubus liebmannii* presentó una actividad ligeramente superior sobre las otras especies fue seleccionada para su estudio fitoquímico con el fin de identificar y aislar el o los compuestos responsables de su actividad antiprotozoaria, Sin embargo de ninguna manera se descarta el estudio de las demás especies ya que presentan una actividad considerable sobre los protozoarios estudiados.

Hasta este punto los criterios quimiotaxonómicos y etnomédicos sobre *R. liebmannii* se cumplen.

Una vez que se decidió realizar el estudio fitoquímico de la especie vegetal *R. liebmannii*, al extracto se le realizaron pruebas preliminares en CCF encontrándose que era factible realizar una partición por par de disolventes entre AcOEt y MeOH acuoso al 10 %.

Al revelar la CCF con vainillina, se mostraban compuestos de color rosa-naranja lo que sugiere la presencia de flavan 3-oles; cuando la CCF se reveló con $FeCl_3$ las manchas se observaron de color azul lo cual indica la presencia de compuestos de tipo fenólico. En la fracción acuosa solo resulto positiva al $FeCl_3$ por lo que solo hay la presencia de compuestos fenólicos.

Los resultados demuestran que ambas fracciones presentan actividades similares contra *G. lamblia* y por otro lado para *E. histolytica* es más susceptible a la fracción

de AcOEt, lo que sugiere que hay compuestos responsables de la actividad contra los dos protozoarios en ambas fracciones.

Como la fracción de AcOEt presentó una mayor actividad contra *E. histolytica* y considerando que en el estudio fitoquímico de la especie relacionada *R. coriifolius*, los principios activos se aislaron de la fase de AcOEt, se decidió separar esta fracción, el análisis cromatográfico reveló la presencia de flavan 3-oles. Esto es congruente con resultados de investigaciones anteriores del género, ya que este tiene altas concentraciones de compuestos fenólicos, y de flavonoides, por lo que se les atribuye sus propiedades antioxidantes (Häkkinen *et al.*, 1999; Ivanova *et al.*, 2005; Viljanen *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2002; Kähkönen *et al.*, 2001; Mullen *et al.*, 2002). Se sugieren que la actividad antiprotozoaria en las rosáceas es debido a la presencia de flavan 3-oles y compuestos polifenólicos como la (-)-epicatequina, la (+)-catequina, los ácidos gálico y elágico, que poseen propiedades antiprotozoarias, antibacterianas y antifúngicas (Alanís *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2007; Rauha *et al.*, 2000).

Una vez que se fraccionó la fase orgánica resultaron 10 fracciones secundarias (FS1/FS10), la fracción secundaria que presentó un mayor efecto contra *E. histolytica* fue la FS3 con un valor de CI_{50} de 17.9 $\mu\text{g/mL}$. La fracción que mostró una menor actividad fue la fracción FS10 con una CI_{50} de 107.7 $\mu\text{g/mL}$. Casi todas las fracciones presentan actividades similares tanto para *E. histolytica* y *G. lamblia* sin embargo la fracción secundaria FS2 muestra un gran efecto contra *Giardia lamblia* siendo ligeramente más activa que la (-) epicatequina (cuadro 5), no obstante de esta fracción se obtuvo muy poca cantidad por lo que no se trabajó con ella. Con respecto a los controles positivos la actividad no fue rebasada por ninguna de las fracciones.

De la fracción secundaria FS3 se separó mediante cromatografía en columna, aislándose el ácido 3,4-dihidroxibenzoico y el β -sitosterol, la evaluación de ambos compuestos demuestran que el ácido posee una actividad débil contra *E. histolytica*, y tienen un efecto moderado contra *G. lamblia* (cuadro 5). El β -sitosterol muestra una actividad moderada para ambos protozoarios. Los criterios usados para las actividades mostradas de las fracciones y compuestos puros se tomaron de investigaciones previas de extractos con actividad antiprotozoaria (Calzada *et al.*, 1998; 1999; 2006). Comparando el efecto de la fracción contra ambos protozoarios y los compuestos puros, la actividad de la fracción de origen es mayor que la de los compuestos puros, lo que sugiere los productos aislados podrían estar actuando de manera sinérgica.

De la fracción secundaria FS6 después de ser purificada por CLAR se aislaron (+) catequina y (-) epicatequina cuya actividad ya ha sido descrita previamente, lo que nos permite establecer que parte del efecto antiprotozoario de *R. liebmanni* es causa de la presencia de los flavan-3-oles (-)-epicatequina y (+)-catequina.

De la fracción secundaria FS9 se aisló el triterpeno nigachigosido F1 **24**, el cual tiene un efecto moderado y débil para *E. histolytica* y para *G. lamblia*, respectivamente (Calzada *et al.*, 1998; 1999; 2006). Sin embargo son bien conocidos sus efectos antiinflamatorios y antirreumáticos. También muestran actividad de protección de daño gástrico que los antiinflamatorios de tipo AINES provocan, aumentando la actividad de la súper oxido dismutasa (Choi *et al.*, 2002). Los estudios de toxicidad del nigachigosido F1 muestran que no es tóxico a dosis de 1000 μ g/mL (Kanegusuku *et al.*, 2001)

Finalmente se aisló el escualeno el cual también se evaluó contra los protozoarios mostrando una actividad débil y moderada para *E. histolytica* y *G. lamblia*,

respectivamente, lo que sugiere que tal vez el efecto de las fracciones FS3, que es la que presenta la mayor actividad, se debe no solo a la presencia del ácido 3,4-dihidroxibenzoico si no a una mecanismo sinergista entre el escualeno, el β -sitosterol, el ácido y otros compuestos responsables no aislados.

VI. CONCLUSIONES.

- La actividad demostrada para las cuatro rosáceas evaluadas permite proponerlas como candidatas para ser objeto de estudio fitoquímico y farmacológico con el objeto de hallar nuevos principios activos contra los protozoarios *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*.
- Los criterios quimiotaxonómicos y etnomédicos empleados en la selección de vegetales como fuentes potenciales de agentes antiprotozoarios permitieron seleccionar a la especie *Rubus liebmannii* y de esta manera demostrar que la especie representa una buena alternativa que puede sustituir a *R. coriifolius* en la obtención de compuestos con efecto antiprotozoario.
- El estudio fitoquímico de las partes aéreas de *R. liebmannii* condujo al aislamiento e identificación de dos flavan-3-oles ((+)-catequina y (-) -epicatequina), dos terpenoides (nigachigosido F1 y escualeno) , un ácido fenólico (3,4-dihidroxibenzoíco) y un esteroles (β -sitoesterol).
- El compuesto mas activo fue la (-) epicatequina con una CI_{50} de 1.6 y 1.9 $\mu\text{g /mL}$ para *E. histolytica* y *G. lamblia* respectivamente.
- Este estudio permite concluir que el extracto y las fracciones de las partes aéreas de *R. liebmannii* tienen un gran potencial contra los protozoarios

Giardia lamblia y *Entamoeba histolytica* y son productos idoneos para el desarrollo de fitofármacos.

- Finalmente con este estudio se aporta información para la validación del uso de *Rubus liebmannii* en el tratamiento de la diarrea y la disentería

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ✦ Adam, R. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**, 447-475
- ✦ Aguilar, A., Camacho, R. Chino, S., Jáquez, P., Lopez, E. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. IMSS. p. 35
- ✦ Alanís, A., Calzada, F., Cervantes, J., Torres, J., Ceballos, G. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, **100**, 153-157
- ✦ Alanís, A. Calzada, F. Cedillo, R. Meckes, M. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus coriifolius*. *Phytotherapy Research*, **17**,681-682
- ✦ Alanís, A. 2000. (-) Epicatequina, principio con actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* obtenida de las partes aéreas de *Rubus coriifolius* Focke (Rosaceae). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Tesis de maestría. México, p.10-40
- ✦ Avalos, C. Albarran, J. Cruz, J. 2005. *Entamoeba histolytica*: Caracterización del factor trascricional AP-1 y su relación con la degradación de la matriz extracelular. Disponible en: <http://www.smb.org.mx/RamaBioenergetica>
- ✦ Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R. 2006. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *Journal of Ethnopharmacology*, **108**,395-397
- ✦ Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R. 2007. *In vivo* antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhoea. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 552-554
- ✦ Beekwilder, J., Jonker, H., Meesters, P., Hall, R., Van der, I., Ric, C. 2005. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 3313-3320
- ✦ Berlin, B. y Berlin, E. (1996). *Medical ethnobiology of the highland Maya of Chiapas, Mexico: the gastrointestinal diseases*. Princeton University, New Jersey.

- ✦ Bruneton, J. 2001. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. Ed. Acribia S.A. Zaragoza España, P, 250-256
- ✦ Calderón, G., Rzedowski, J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. México, p. 248-250
- ✦ Calzada, F. 2000. Proantocianidinas de tipo A y Flavonoles con actividad antiprotozoaria de *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Conyza filaginoides* (D.C.) Hieron (Asteraceae). Universidad Nacional Autónoma de Mexico. Facultad de Química. Tesis de doctorado en farmacia. México, p. 20-23, 89-91
- ✦ Calzada, F., Cervantes, A., Yépez, L. 2005. In vitro antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Journal of Ethnopharmacology, **98**, 191-193
- ✦ Calzada, F. 2005. Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhoea. Phytotherapy Research, **19**, 725-727
- ✦ Calzada, F; Yépez, L; Aguilar, A. 2006. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *G. lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology, **108**,367-370.
- ✦ Campos, L. 1985. Bibliografía sobre la flora medicinal del estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México, coordinación de investigación científica. P.36-40
- ✦ Cornejo, J., Jiménez, A., Meckes, M., Rojas, G., Nicasio, P., Tortoriello, J., Mata, B. 2006. Pharmacological potential from *Rubus liebmanii* micropropagated and the callus biomass. Pharmacologyonline, **3**, 454-461.
- ✦ Derda, M., Hadas, E., Thiem, B., Sulek, A. 2004. Amebicidal plants extracts. Wiad Parazytol, **50**, 715-721.
- ✦ DGE. Dirección General de Epidemiología. 2006 disponible en <http://www.dgepi.salud.gob.mx>
- ✦ Espinosa, M., Martínez, A. 2000. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Clinical Microbiology Reviews, **13**, 318-331
- ✦ Evans, W.Ch. 1991. Trease y Evans. Farmacognosia. 13ª edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México, p 440-455
- ✦ Flamini, G., Catalano, S., Caponi, C., Panizii, L., Morelli, I. 2002. Three anthrones from *Rubus ulmifolius*. Phytochemistry, **59**, 873-876

- ✦ Garcia, A., Suthanthangjai, W., Kajda, P, Zabetakis I. 2004 The effects of high hydrostatic pressure on β -glucosidase, peroxidase and polyphenoloxidase in red raspberry (*Rubus idaeus*) and strawberry (*Fragaria x ananassa*). Food Chemistry, **88**,7-10
- ✦ García, L. 2001. Diagnostic medical parasitology 4th ed. American Society for Microbiology Washinton D.C. p.47-60
- ✦ Gardener, T., Hill D. 2001. Treatment of giardia. Clinical Microbiology Reviews **14**, 114-128
- ✦ Gillespie, S., Hawkey,P. 1995. Medical Parasitology a practical approach. Oxford University Press, p. 86-92
- ✦ **IEB**. Herbario del Instituto de Ecología, A.C., México (IE-Bajío).2004. disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/checklist/17-32.html>
- ✦ **INEGI**. Instituto Nacional de Estadística, Geográfica e Informática.2003 Estadística del Sector Salud y seguridad Social. Cuaderno num. 20. México, DF.
- ✦ **INI**. Instituto Nacional Indigenista.1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Vol. I, II y III. México, DF.
- ✦ Ivanova, D., Gerova, D., Cherevenkov, T., Yankova, T. 2005. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, **96**, 145-150.
- ✦ Häkkinen S., Heinonen, M., Kärenlampi, S., Mykkänen., Ruuskanen., Törrönen. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. Food Research International, **32**, 345-353.
- ✦ Jouad, H., Maghrani, M., Eddouks, M. 2002. Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin – induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, **81**, 351-356.
- ✦ Kähkönen, M., Hopia, A., Heinonen, M. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **49**, 4076-4082
- ✦ Kanequsuku, M., Benassi, J., Pedrosa, R., Yunes, R., Filho, V., Maia, A., De Souza, M., Delle, F., Niero, R. 2002. Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). Journal of Biosciences, **57**, 272-276
- ✦ Kumate, J., Muñoz, O., Gutiérrez, G., Santos, J. 1998. Manual de infectología clínica. Méndez Editores. México.

- ✦ Lemus, I., Garcia, R., Delvillar, E., Knop, G. 1999. Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. *Phytotherapy Research*, **13**, 91-94
- ✦ Lozoya, L. 1982. *Flora medicinal de México*. IMSS. México, p. 66-67
- ✦ Lujan, H. 2006. Giardía y Giardiasis. *Medicina Buenos Aires*, **66**,(1) 70-74
- ✦ **MEXU**. Herbario Nacional. 2007. Sala Bletia.
- ✦ Meckes, M., Rivera, AD., Nava, V., Jimenez, A. 2004. Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paws edema. *Phytomedicine*, **11**, 446-451
- ✦ Monte, J. 1996. Plantas medicinales de Jesús del Monte. Disponible en : <http://www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/plantas/medicinal/tabla2.html>
- ✦ Mullen, W., Yokota, T., Lean, E. Crozier, A. 2003. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry*, **64**, 617-624.
- ✦ Muller, W., McGinn, J., Lean, M., MacLean, M., Gardener, P., Duthie, G., Yokota, T., Crozier. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 5191-5196.
- ✦ Navarro J. *Historia natural o Jardín Americano*. México: Editado por UNAM, IMSS, ISSSTE; 1992: 66-67.
- ✦ Niero, R., Cechinel, V., Souza, M., Yunes, R., Delle, F. 1999. Antinociceptive activity of niga-ichigoside F1 from *Rubus imperialis*. *Journal of Natural products*, **62**, 1145-1146
- ✦ Nisbet, J., More, M. 1997. Will natural products remain an important source of drug research for the future?. *Current Opinion in Biotechnology*, **8**, 708-712.
- ✦ Pacheco, J. 1972. *Etamoeba histolytica*. Revisión para su tratamiento. *Revista Médica Hondureña*, **40**, 202-210
- ✦ Panizzi, L., Capón, C., Catalano., Cioni., Morelli. 2002. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal Ethnopharmacology*, **79**, 165-168.

- ✦ Pérez, J., Muro, A., Hernández, M., Martín, A. 2002. Definición de amebosis: “una nueva enfermedad”. *Medicine* 08 (70) 3731-3741
- ✦ Phillipson, J. 2000. Phytochemistry and medical plants. *Phytochemistry*, **56**, 237-243
- ✦ PLM Diccionario de especialidades farmacéuticas. Edición 51, México 2005
- ✦ Rauha, J., Remes, S., Heinonen, M., Copia, A., Kähkönen, M; Kujala, T., Pihlaja., Vuorela, H., Vuorela. 2000. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compound. *International Journal of Food Microbiology*. 56, 3-12.
- ✦ Rey, A., Hopia, A., Kivikari, R., Kahkonen, M. 2005. Use of natural food/ plant extracts: cloudberry (*Rubus Chamaemorus*), Beetroot (*Beta vulgaris* “vualgaris”) or willow herb (*Epilobium angustifolium*) to reduce lipid oxidation of cooked pork patties. *Food Science and Technology*, **38**, 363-370.
- ✦ Rojas, J., Patel, V., Dacke, G. 2002. Relaxant activity of raspberry (*Rubus ideaeus*) leaf extract in guinea-pig ileum in vitro. *Phytotherapy Research* **16**, 665-668
- ✦ Romero, D., Fontenelle, S., Buck, G., Martinez, E., Garcia, M., Bixby, L. 2005. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *Journal of Ethnopharmacology*, **99**, 253-25
- ✦ Rzedowski J.1978. Vegetación de México. Limusa, DF, p. 5-10
- ✦ Sánchez, J., Tay, J., Robert, L., Romero, R., Ruiz, D. 2000. Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, **43** (3), 80-83
- ✦ Sánchez, S. 1974. La flora del valle de México. Ed Herrero. México, p. 194
- ✦ **SINAVE**. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2007 disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/sinave>
- ✦ Thiem, B., Goslinska O. 2004. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. *Fitoterapia*, **75**, 93-95.
- ✦ Viljanen, K., Kylli P., Kivikari, R., Heinonen, M. 2004. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7419-7424

- ✦ Wada, L., Ou, B. 2002. Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **5**, 3495-3500
- ✦ Wang, J., Qiu, Z., Xia, Y., Li, H., Ren, L., Zhang, L. 2006. The protective effects of total glycosides *Rubus parvifolius* on cerebral ischemic in rat. *China Journal of Chinese Materia Medica* **31**, 138-141
- ✦ Warner, H. Blatt, S., Zgainiki, E.M. 1984. *Plant Drugs Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York Tokio. Printed in Germany, p. 299-304.
- ✦ William A. Sodeman, Jr. *Intestinal protozoa: Amebas. Disponible en <http://gsbs.utmb.edu/micobook/ch079.htm>*
- ✦ Wolfe, M. 1992. Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* **5**, 93-100
- ✦ Zafrilla, P., Ferrer, F., Tomas, F. 2001. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 3651-3655