



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA  
*IN VITRO* DE LOS DERIVADOS DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE LAS FLORES DE *Chiranthodendron*  
*pentadactylon* Larreat (Sterculiaceae).

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA  
P R E S E N T A:  
ANGÉLICA SOLÍS CRUZ

A



MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a los miembros de su comunidad por hacer realidad mis sueños y aspiraciones como profesionalista dándome una educación de calidad y la oportunidad de ser una mejor persona.

A la Facultad de Química y sus profesores por compartir generosamente sus conocimientos y brindarme todas las facilidades a lo largo de estos años de formación académica.

Al Dr. Fernando Calzada Bermejo, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales de la UMAE Hospital de Pediatría CMN S XXI IMSS, por brindarme todos los recursos, asesoría y paciencia en la realización de esta tesis.

A la B. Amparo Tapia y a la Dra. Lilian Yépez de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de la UMAE Hospital de Pediatría CMN S XXI IMSS, por su apoyo en las determinaciones de la actividad antiprotozoaria.

Al Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda y al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su tiempo y comentarios que lograron enriquecer esta tesis.

A mi familia por todo su amor y apoyo incondicional.

A todos ustedes gracias

## DEDICATORIAS

A mi Madre: Lourdes Cruz

Todo lo que soy, te lo debo a ti y atribuyo todos mis éxitos en esta vida a tus enseñanzas. Te quiero eternamente.

A mi Padre: Juan Manuel Solís

Gracias por darme el ejemplo de trabajo y constancia, no lo hubiera logrado sin tu apoyo y protección.

A mis hermanos: Juan Manuel y Alejandra

Los quiero mucho y doy gracias a la vida porque son unas maravillosas personas con las que siempre contare

A mi sobrina: Quetzalli Odett

Tu nacimiento vino a iluminar mi vida eres una personita muy especial.

A mi cuñada y su padre: Anahid y Mario

Gracias por ser parte de esta familia los estimo mucho.

A todos mis amigos, pero especial a Silvia, Jonathan, Deny, Idalia, Erick, Hector y Juan.

Por su amistad y compañía en la Facultad. Nunca voy a olvidar las experiencias que viví junto a ustedes.

## ÍNDICE.

Lista de abreviaturas.....	iii
Lista de cuadros.....	v
Lista de figuras.....	v
Lista de gráficas.....	vi
Resumen.....	vii
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II MARCO TEORICO.....</b>	<b>5</b>
II.1 Generalidades de la diarrea y de la disentería.....	5
II.2 <i>Entamoeba histolytica</i> como agente causal de diarrea con sangre (disentería).....	7
II.3 <i>Giardia lamblia</i> como agente causal de diarrea persistente y crónica .....	10
II.4 Fármacos utilizados para tratar la amibiasis y la giardiasis .....	12
II.5 Generalidades de <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat.....	16
<b>III JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>23</b>
<b>V OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>24</b>
V.1 Objetivos específicos.....	24
<b>VI HIPOTESIS .....</b>	<b>24</b>

<b>VII METODOLOGÍA</b> .....	25
VII.1 Preparación del extracto metanólico de las flores de <i>Ch. pentadactylon</i> .....	25
VII.2 Ensayos biológicos .....	25
VII.2.1 Protozoarios.....	25
VII.2.2 Determinación de la actividad antiprotozoaria .....	25
VII.3 Análisis cromatográficos.....	26
VII.4 Fraccionamiento del extracto .....	27
VII.5 Identificación del $\beta$ -sitosterol.....	29
VII.6 Aislamiento e identificación del tilirósido.....	29
VII.7 Aislamiento y purificación de astragalina y la isoquercitrina .....	30
VII.8 Fraccionamiento de la fracción primaria F6.....	30
<b>VIII RESULTADOS</b> .....	34
<b>IX DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....	36
<b>X CONCLUSIONES</b> .....	41
<b>XI BIBLIOGRAFIA</b> .....	42

## Lista de abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
Ác.	Ácido
CH <sub>3</sub> COOH	Ácido acético
HCOOH	Ácido fórmico
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10%)	Ácido sulfúrico al 10%
H <sub>2</sub> O	Agua
β	Beta
cm	Centímetro
CMN S XXI	Centro Médico Nacional Siglo XXI
NaCl	Cloruro de sodio
<i>et al.</i> ,	Colaboradores
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CCA	Cromatografía en columna abierta
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
DMSO	Dimetilsulfóxido
F1/F10	Fracciones primarias uno a diez
FS1/FS8	Fracciones secundarias uno a ocho
G	Glucorónido
Glu	Glucosa
°C	Grado centígrado

g	Gramo
h	Horas
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IMSSM	Herbario Instituto Mexicano del Seguro Social México
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática
Kg	Kilogramo
L	Litro
M. en C.	Maestra en Ciencias
MeOH	Metanol
m	Metro
µg	Microgramo
µg/mL	Microgramo por cada mililitro
µL	Microlitro
mg	Miligramo
mg/Kg	Miligramo por cada kilogramo
mg/mL	Miligramo por cada mililitro
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por cada minuto
mm	Milímetro
min	Minuto
nm	Nanómetro
%	Por ciento
UV	Ultravioleta



## Lista de cuadros

Cuadro 1. Algunos compuestos utilizados en la terapéutica obtenidos de las plantas medicinales .....	2
Cuadro 2. Compuestos con utilidad terapéutica recientemente introducidos en el mercado que son obtenidos a partir de plantas medicinales .....	3
Cuadro 3. Fármacos utilizados en el tratamiento de la amibiasis y la giardiasis .....	14
Cuadro 4. Compuestos aislados de <i>Ch. pentadactylon</i> .....	19
Cuadro 5. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina .....	27
Cuadro 6. Resumen del fraccionamiento mediante CCA del extracto .....	28
Cuadro 7. Resumen del fraccionamiento mediante CCA de la fracción primaria F6 .....	31
Cuadro 8. Programa de elución utilizado en la CLAR para separar la fracción FS3 .....	33
Cuadro 9. Actividad antiprotozoaria de las fracciones primarias del extracto .....	34
Cuadro 10. Actividad antiprotozoaria de los compuestos puros .....	35

## Lista de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	9
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i> .....	11
Figura 3. <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat .....	17

## Lista de gráficas

Grafica 1. Actividad de las fracciones primarias sobre <i>E. histolytica</i> .....	37
Grafica 2. Actividad de las fracciones primarias sobre <i>G. lamblia</i> .....	37
Gráfica 3. Actividad antiamibiana de los compuestos puros .....	38
Gráfica 4. Actividad anti giardia de los compuestos puros .....	39

## Resumen.

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

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

Lo anterior permitió el aislamiento y la identificación de seis compuestos, cinco flavonoides que fueron identificados como: tilirosido, (-) epicatequina, (+) catequina, astragalina, e isoquercitrina; y de un estero: el  $\beta$ -sitosterol. La caracterización de estos compuestos se llevó a cabo mediante cocromatografía en capa fina empleando muestras de referencias disponibles en el laboratorio y por la determinación de su punto de fusión mixto.

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiprotozoaria de las fracciones primarias y de las fracciones secundarias, así como de los compuestos puros aislados del extracto metanólico, sobre dos protozoarios causantes de diarrea: *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.

La (-) epicatequina resultó ser el compuesto con mayor actividad antiamebiana y anti $giardia$  con una  $CI_{50}$  de 1.9  $\mu\text{g/mL}$  y 1.6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

## I INTRODUCCIÓN

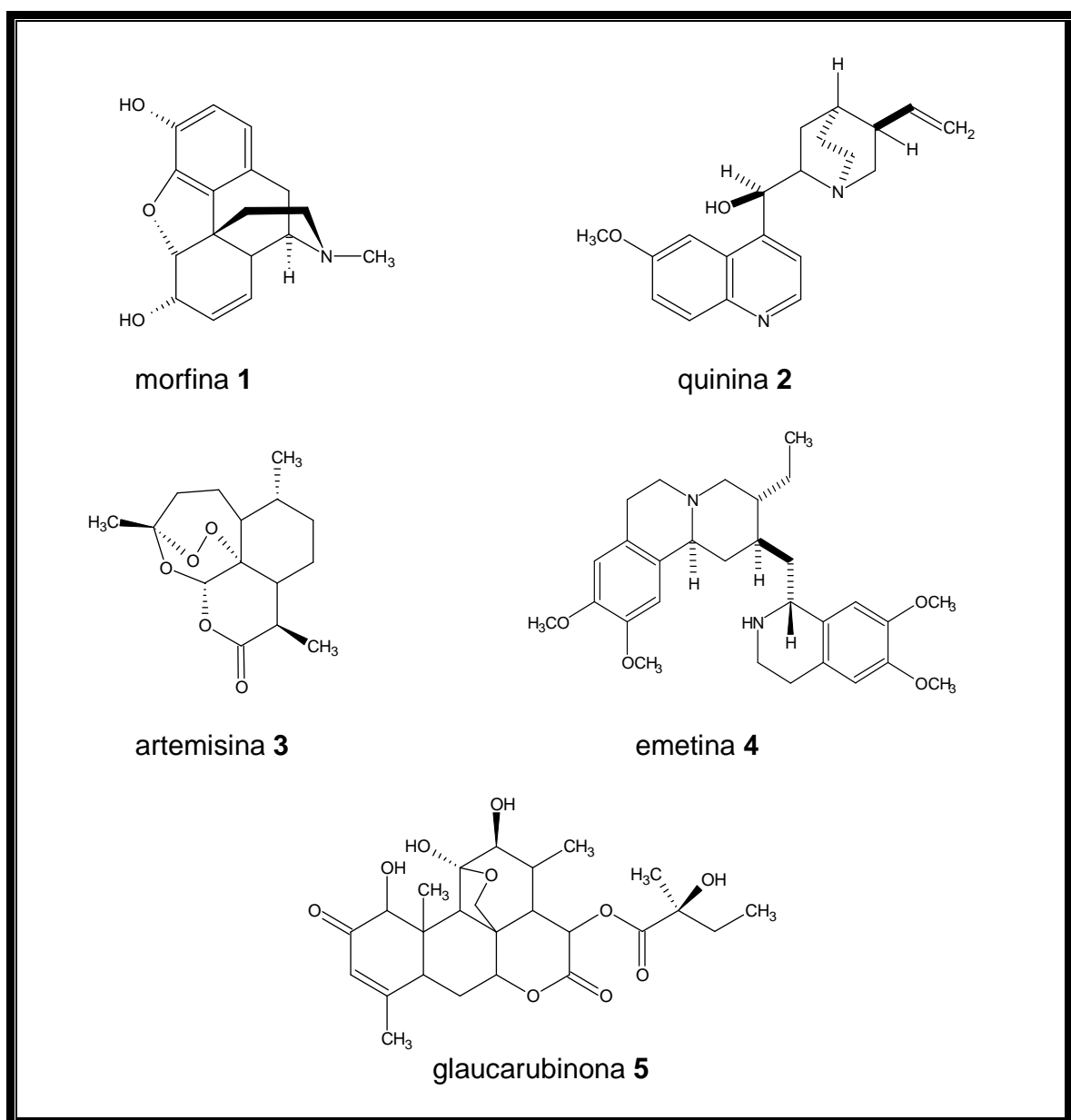
Desde la antigüedad el hombre se fue capacitando para determinar que plantas poseían valor alimenticio y cuales debían ser evitadas por su mal sabor o toxicidad, a lo largo de esta actividad empírica fueron descubiertas las propiedades curativas de ciertas plantas, que una vez aprendidos fueron tan importantes como para ser olvidados. La especificidad de las plantas usadas y su forma de administración para una enfermedad en particular fueron transmitidas oralmente y de forma escrita. En consecuencia por siglos el hombre ha usado con éxito las plantas para prevenir, controlar y curar enfermedades (Evans, 1991; Balunas y Kinghorn, 2005).

Inicialmente las plantas se usaron en forma de tinturas, infusiones, cataplasmas, polvos y otros preparados. Más tarde el conocimiento de las plantas medicinales progreso hasta aislar y caracterizar los compuestos responsables de la actividad biológica, algunos de los cuales en la actualidad son empleados como principios activos en diversos medicamentos de la terapéutica internacional. Por ejemplo, la morfina **1** (Cuadro 1) aislada de *Papaver somniferum* es un potente analgésico; la quinina **2** y la artemisina **3** son compuestos antipalúdicos aislados de *Cinchona succirubra* y *Artemisia annua*, respectivamente. La emetina **4** aislada de *Cephaelis ipecacuana* y la glaucarubinona **5** obtenida de *Simarouba glauca* son agentes antiamebianos (Balunas y Kinghorn, 2005; Raskin *et al.*, 2002; Mata y Rivero, 2000; Velázquez, 2006).

En la actualidad, las plantas son muy utilizadas para prevenir, tratar y curar enfermedades en el hombre, especialmente en los países en desarrollo, donde la mayor parte de la población continua dependiendo de sus remedios herbolarios como la base de su terapéutica. Se estima que aproximadamente del 64% al 80% de la población mundial hace uso de las plantas medicinales para resolver sus problemas de

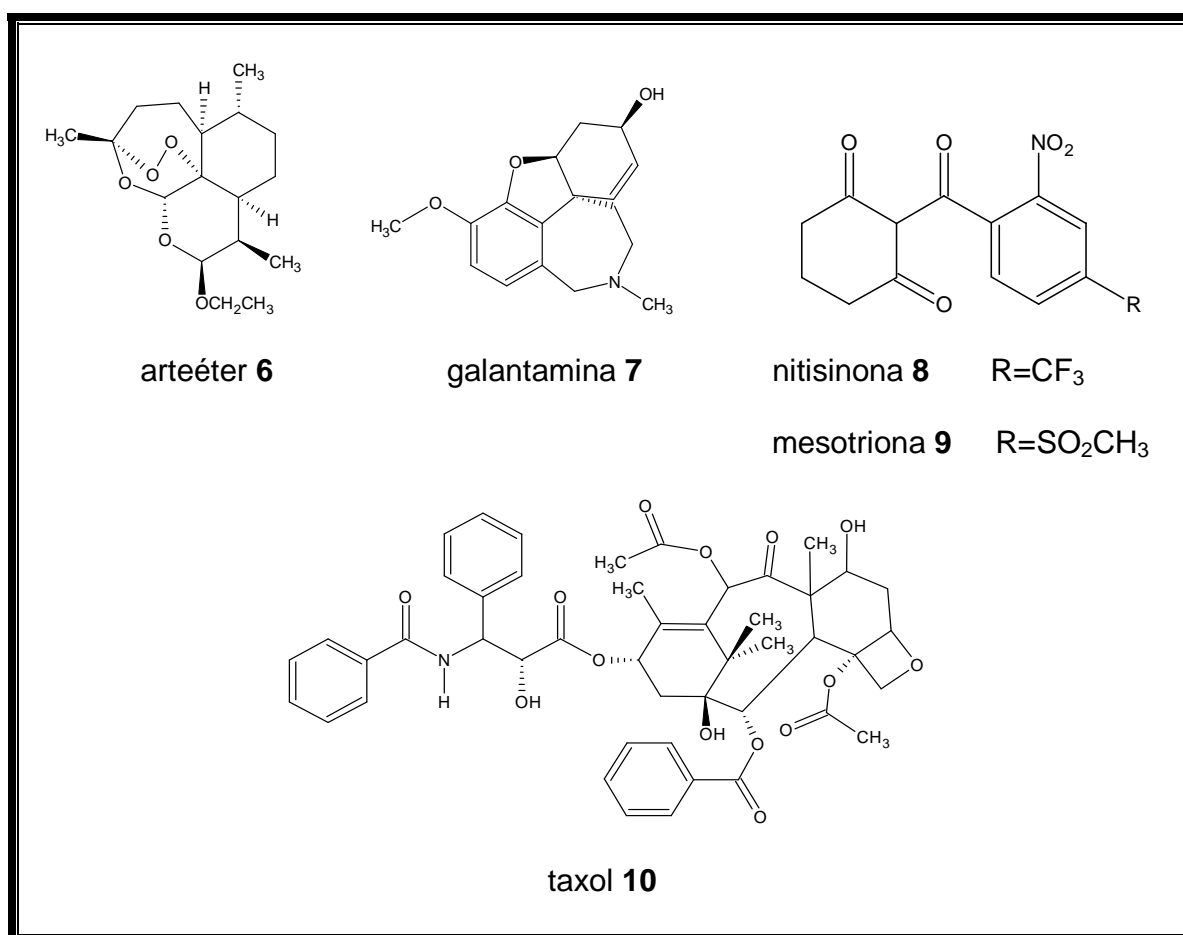
salud. También, en los países industrializados las plantas medicinales tienen una gran importancia como fuente de nuevas sustancias con utilidad terapéutica como lo muestra la introducción al mercado, de algunos medicamentos cuyo principio activo tiene su origen en los vegetales.

**Cuadro 1.** Algunos compuestos utilizados en la terapéutica obtenidos de las plantas medicinales.



Por ejemplo: el arteéter **6** (Cuadro 2), compuesto antipalúdico derivado de la artemisina **3**; la galantamina **7** aislada de *Galanthus woronowii*, utilizada en el tratamiento del Alzheimer; la nitisinona **8** empleada para tratar la tirosinemia, la cual es una modificación de la mesotriona **9** un herbicida aislado de *Callistemon citrinus* y el anticancerígeno taxol **10** obtenido de *Taxus brevifolia*, entre otros (Raskin *et al.*, 2002; Velázquez, 2006; Kuklinski, 2000; Balunas y Kinghorn, 2005; Mata y Rivero, 2000).

**Cuadro 2.** Compuestos con utilidad terapéutica recientemente introducidos en el mercado que son obtenidos a partir de plantas medicinales.



En todo el territorio nacional, desde la época prehispánica, el uso de las plantas medicinales está muy arraigado. Se estima que se cuenta con una riqueza vegetal de aproximadamente 26,500 especies, ubicándolo en el cuarto lugar en biodiversidad a nivel mundial, de dichas especies a cerca de 4000 (15%) se les atribuyen propiedades medicinales. Es importante mencionar que a pesar del uso tan difundido de las plantas medicinales son pocos los estudios químicos y farmacológicos dirigidos a la validación de sus propiedades medicinales que se les atribuyen. Se estima que alrededor del 5% de estas especies tienen estudios químicos y farmacológicos (Velázquez, 2006).

En este sentido, a partir de la década de los setentas varios grupos de investigación en México se han enfocado al estudio químico y farmacológico de las plantas medicinales con el objetivo de aportar evidencias que apoyen la validación de las propiedades medicinales de nuestra flora. Por lo anterior, es importante continuar con el estudio de la flora medicinal nacional y así apoyar la búsqueda de soluciones a los problemas de salud de México. El conocimiento acerca de los productos derivados de la flora medicinal podría contribuir al fortalecimiento de la industria farmacéutica nacional y a la economía mexicana.

## **II MARCO TEORICO**

### **II.1 Generalidades de la diarrea y de la disentería**

La diarrea se define como un aumento de la frecuencia y una disminución de la consistencia de las evacuaciones, constituye un mecanismo de respuesta del organismo ante un agente agresor, este último puede ser de naturaleza no infecciosa (dietéticos, tóxicos, psicosomáticos, inmunológicos y hormonales) e infecciosa (bacterias, virus y parásitos). En el caso de los agentes infecciosos se transmiten habitualmente por la vía fecal-oral, lo cual incluye la ingestión de agua y alimentos contaminados con heces (Velázquez, 2006; Kumate *et al.*, 1994; Olarte, 1992).

Actualmente, las diarreas de origen infeccioso son las responsables de la muerte de entre 3 a 4 millones de individuos en el mundo, la mayoría de los cuales son niños menores de cinco años, aunque también afecta a adultos mayores (Farthing, 2002; Lipsky, 2000). El número de episodios de diarrea por persona al año es en promedio de 3.5 para los menores de cinco años, lo que significa aproximadamente entre 1.3 a 1.7 miles de millones de episodios de diarrea al año (Herrera y Hernández, 2002; Kumate *et al.*, 1994).

En México, la última cifra disponible en el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) en la base de datos de sus estadísticas vitales del año 2005 reportaron 2363 muertes por enfermedades infecciosas intestinales (INEGI, 2005).

La diarrea se puede clasificar en los siguientes tipos: diarrea aguda, diarrea con sangre, diarrea persistente y diarrea crónica. La diarrea aguda es la más frecuente en el mundo y en México, se caracteriza por un incremento en el número de evacuaciones de consistencia líquida, acompañada o no de fiebre y vómito.



Los dos agentes que se aíslan con más frecuencia son: *Rotavirus* y *Escherichia coli* enterotoxigénica.

La diarrea con sangre es el resultado de la invasión inflamatoria de la mucosa del colón debida a bacterias, parásitos y/o acción de citotóxicas. Puede haber dos formas: el síndrome disentérico y el síndrome diarreico con sangre. El primero de ellos se caracteriza por evacuaciones de escaso volumen, compuestas por poca materia fecal, moco, sangre, en ocasiones pus, acompañada de cólico abdominal, pujo, tenesmo y fiebre; el segundo se asocia con evacuaciones de materia fecal líquida, estrías de sangre, moco y poca afectación al estado general.

La diarrea con sangre es ocasionada principalmente por: *Shigella flexneri*, *Sh. Sonnei*, *Sh. dysenteriae*, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroinvasiva, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica* y *Entamoeba histolytica*, entre otros.

La diarrea persistente es aquella que se inicia de forma aguda y se prolonga por más de 14 días. Dentro de sus agentes causantes podemos mencionar a *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides* y *Necator americanus*, entre otros.

La diarrea crónica con o sin mala absorción intestinal es causada por diversos mecanismos, a menudo simultáneos, tanto infecciosos como por intolerancia a nutrientes (azúcares y proteínas) y desnutrición. Los agentes más comunes responsables de la diarrea crónica son *G. lamblia* y algunos helmintos (Herrera y Hernández, 2002; Kumate *et al.*, 1994; Ávila, 2006).

## **II.2 *Entamoeba histolytica* como agente causal de diarrea con sangre (disentería).**

*Entamoeba histolytica* es un protozoo intestinal cuyo ciclo de vida (Figura 1) involucra las fases de trofozoito (a), prequiste (b), quiste (c), metaquiste (d) y trofozoito metaquístico. El quiste maduro es la forma infectante y se compone de una masa esférica u ovoide con cuatro núcleos y una cubierta resistente. Los quistes son expulsados en la materia fecal del portador y pueden permanecer viables por periodos variables de tiempo (8 a 30 días) en las heces, el agua, el aire y el suelo. Pueden resistir el cloro a las concentraciones empleadas para purificar el agua, aunque pueden ser destruidos con yodo a concentraciones de 200 ppm o a temperaturas superiores a 68°C (Faust *et al.*, 2003; Kumate *et al.*, 1994).

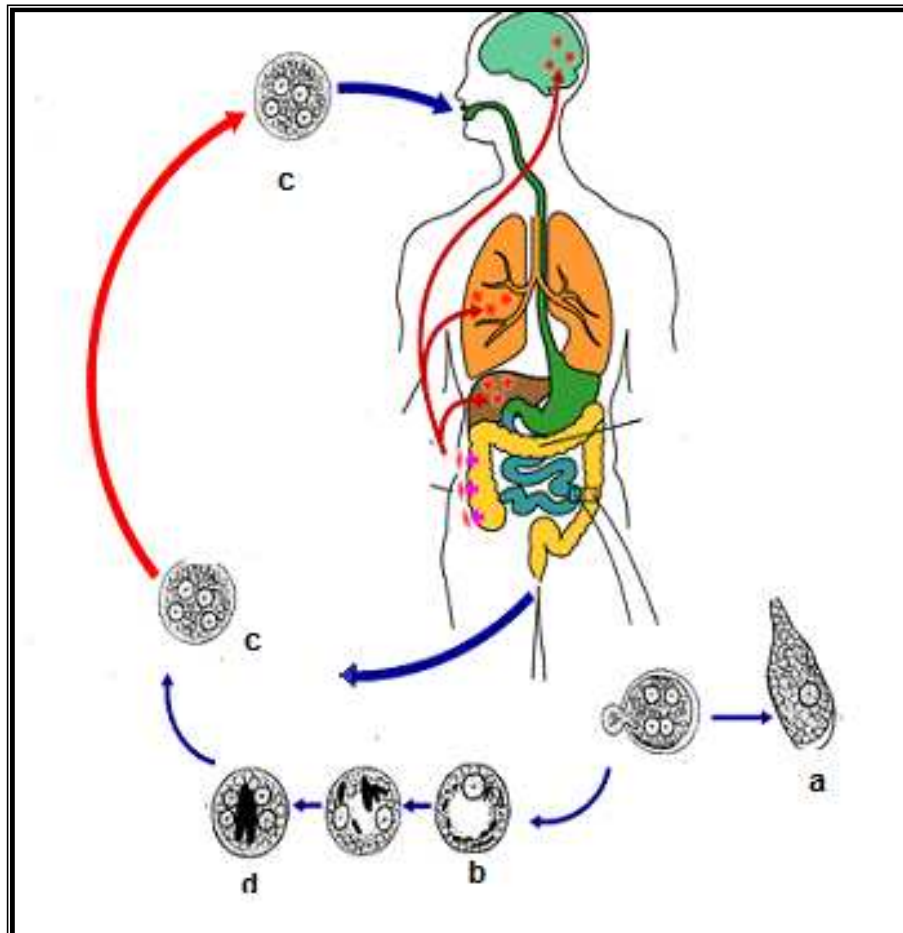
Generalmente, la vía de infección es la boca debido a que los alimentos y bebidas pueden contaminarse con quistes de *E. histolytica* a través del agua, la manipulación por individuos infectados, deyecciones de moscas y otros insectos, condiciones sanitarias no favorables, inadecuada eliminación de excretas y otros aspectos que se asocian a la pobreza y la marginalidad social (Faust *et al.*, 2003).

Cuando el quiste llega a la boca y es deglutido pasa por el estomago y penetra en el intestino delgado. El quiste es tan resistente que no experimenta cambios aparentes mientras se encuentra en lugares en donde el medio es ácido, pero tan pronto como el medio cambia a neutro o ligeramente alcalino adquiere una gran actividad y se debilita la pared del quiste permitiendo que la amiba se libere. El citoplasma se divide en tantas partes como núcleos tiene el quiste, dando lugar a 4 pequeñas amibas o trofozoitos de un sólo quiste (Faust *et al.*, 2003).

Los trofozoitos son la forma causante de la enfermedad y se propicia sólo cuando se conjugan ciertos factores relativos al parásito (tipo de cepa, virulencia de las cepas, magnitud del inóculo), el huésped (edad, sexo, estado nutricional e inmunológico) y factores ambientales. De otra manera, la persona puede permanecer como portador asintomático y no desarrollar la enfermedad.

El proceso de invasión amibiana se inicia con la adhesión del trofozoito a la mucosa colónica y continúa con la destrucción de la barrera intestinal por la producción de proteasas y otros factores que aún no han sido aclarados totalmente. El objetivo de *E. histolytica* al invadir la mucosa del colón es alimentarse de sangre y tejidos, se ha observado que necesita grandes cantidades de hierro y puede utilizar el presente en la hemoglobina. Las lesiones son llamadas úlceras primarias y están separadas por zonas de tejido sano formando un ligero relieve con un centro puntiforme por el que sale moco sanguinolento con vénulas necróticas y amibas, esto provoca la licuación de las heces y genera la llamada disentería amibiana. La amibiasis es frecuentemente una infección gastrointestinal, pero pueden ocurrir manifestaciones extraintestinales muy agresivas como el absceso hepático y en casos menos frecuentes, puede infectar órganos como los pulmones, la piel y el cerebro lo que incrementa el interés por combatir a este microorganismo (Kumate *et al.*, 1994; Faust *et al.*, 2003).

La disentería amibiana tiene como síntomas: evacuaciones mucosanguinolentas, con escasa materia fecal, acompañada de cólico abdominal, pujo y tenesmo. El diagnóstico se establece en pacientes con evacuaciones mucosanguinolentas y sin fiebre, se corrobora con la observación de trofozoitos de *E. histolytica* en el moco fecal (Kumate *et al.*, 1994).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. **a:** trofozoito, **b:** prequiste, **c:** quiste, **d:** metaquiste.

### **II.3 *Giardia lamblia* como agente causal de diarrea persistente y crónica.**

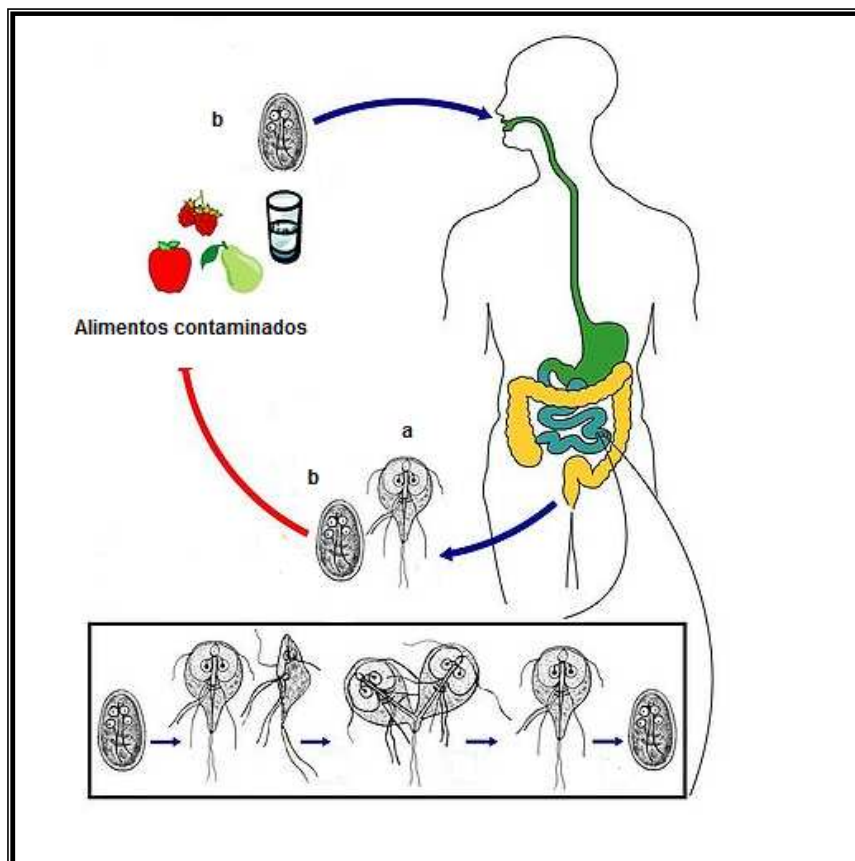
*Giardia lamblia* es un protozoo flagelado (Figura 2) que puede existir como trofozoito binucleado (a) o como quiste (b). La forma infectante es el quiste maduro que se forma cuando las materias fecales líquidas, de un humano infectado, se comienzan a deshidratar gradualmente en su tránsito hacia el colón. El quiste es resistente al medio ambiente y puede sobrevivir en el agua varios meses (Faust *et al.*, 2003; Kumate *et al.*, 1994).

La vía de infección es fecal-oral, de forma directa de persona a persona o a través de agua y alimentos contaminados. Cuando el quiste se ingiere, los ácidos estomacales lo activan y una vez que llega al intestino delgado se lleva a cabo el proceso de desenquistamiento que produce dos trofozoitos flagelados por cada quiste maduro, la ingestión de sólo 10 quistes causa infección. Cuando los trofozoitos de *Giardia lamblia* se encuentran en el intestino delgado, utiliza su disco suctorio para adherirse al epitelio mucoso duodenal, causando daño por irritación mecánica a las microvellosidades de los enterocitos en el duodeno y la parte proximal del yeyuno.

Cuando la función de las microvellosidades se altera puede producir una disminución en la producción de disacaridasas, hidrolasa péptica y enteropeptidasa, así como trastornos en la absorción de grasas, vitaminas liposolubles y vitamina B<sub>12</sub>. Cuando *G. lamblia* cubre grandes extensiones del segmento superior del intestino delgado puede actuar como una barrera para la absorción de las grasas. La infección por *G. lamblia* es asintomática en la mayor parte de los casos, en algunas ocasiones se puede presentar un episodio agudo de pocos días de duración que se caracteriza por diarrea, vómito, sensación de malestar, flatulencia y distensión abdominal. La enfermedad crónica se caracteriza por la alternancia de periodos de diarrea y malestares leves, con periodos

prácticamente asintomáticos.

Los síntomas que sugieren giardiasis son: la persistencia de diarrea por más de una semana, los síntomas de absorción intestinal deficiente, intolerancia a la lactosa que se manifiesta por eritema glúteo, distensión abdominal, flatulencia y diarrea, asociados a la ingestión de leche. El diagnóstico se establece mediante el hallazgo de trofozoitos o quistes de *G. lamblia* en el examen coproparasitológico. Como el parásito se excreta en forma intermitente, debe realizarse cuando menos una serie de tres exámenes consecutivos (Kumate *et al.*, 1994).



**Figura 2.** Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. **a:** trofozoito binucleado, **b:** quiste.

#### **II.4 Fármacos utilizados para tratar la amibiasis y la giardiasis.**

El fármaco de elección para el tratamiento de la disentería y la diarrea causada por *E. histolytica* y *G. lamblia* es el metronidazol **11** (Cuadro 3), el compuesto es un nitroimidazol de acción mixta que interfiere en la síntesis de los ácidos nucleicos del protozoario. El fármaco es efectivo, sin embargo cuando se administra por vía oral a dosis altas y en tratamientos prolongados induce dolor abdominal, diarrea, náuseas, cefaleas, vómito, peculiar sabor metálico y oscurecimiento en la orina. Entre los efectos neurotóxicos que obligan a interrumpir su consumo están: mareos, vértigo, en ocasiones encefalopatía, convulsiones, incoordinación y ataxia. Al ser ingerido con alcohol induce el denominado efecto antabuse. Se ha descrito su efecto carcinogénico después de la administración oral crónica en roedores, en administración a largo plazo en ratas hubo un incremento en la incidencia de neoplasias mamarias y tumores hepáticos. También es mutagénico en roedores y bacterias (PLM, 2005; Goodman y Gilman, 1996).

Existen otros fármacos con actividad amebicida cuya efectividad varía dependiendo de su sitio de acción, pueden clasificarse en lumbinales, sistémicos y mixtos. Los primeros actúan exclusivamente en la luz intestinal; los amebicidas sistémicos son eficaces sólo contra las formas invasoras del microorganismo y los mixtos poseen tanto acción sistémica como en luz intestinal (Goodman y Gilman, 1996; Kretschmer, 1994).

El tinidazol **12** es un antiprotozoario que tiene el mismo mecanismo de acción que el metronidazol y sus efectos secundarios incluyen: náuseas, vómito, anorexia, diarrea, sabor metálico y dolor abdominal. En casos raros pueden ocurrir reacciones de hipersensibilidad, prurito y urticaria (PLM, 2005; Kretschmer, 1994).

La emetina **4** es un fármaco amebicida mixto en desuso que es más efectivo sobre las formas móviles. Su mecanismo de acción se basa en bloquear la síntesis de proteínas al inhibir la traslocación de la enzima peptidil-RNA<sub>t</sub>, del lugar del receptor al del donador, en el ribosoma. Dentro de sus efectos adversos se encuentran: dolor en el lugar de la inyección, hipotensión, taquicardia, dolor precordial, disnea y alteraciones electrocardiográficas. La deshidroemetina **13** es un derivado de la emetina, posee menor toxicidad porque se elimina más rápido lo cual resulta en efectos menores sobre el músculo y el corazón.

El yodoquinol **14** es un fármaco luminal que tiene acción tanto en los quistes como en los trofozoitos del parásito y su actividad amebicida se atribuye a las propiedades de quelación del hierro. Sus efectos adversos incluyen toxidermatitis yódica, prurito anal y ocasionalmente náuseas y cólicos intestinales.

El furoato de diloxanida **15** tiene acción exclusivamente contra los quistes y hasta el momento no se han informado efectos secundarios importantes, excepto la flatulencia, que se presenta en un número considerable de los pacientes.

La quinfamida **16**, es una hidroxiquinolona halogenada que ejerce su efecto amebicida al inmovilizar los trofozoitos y evitar su propagación, es un fármaco luminal y sus efectos adversos más comunes son: cefalea, náusea, dolor abdominal, flatulencia, cólicos abdominales, siendo estos trastornos transitorios y de leve intensidad (O'Nel, 2001; Kretschmer, 1994; PLM, 2005; Goodman y Gilman, 1996).

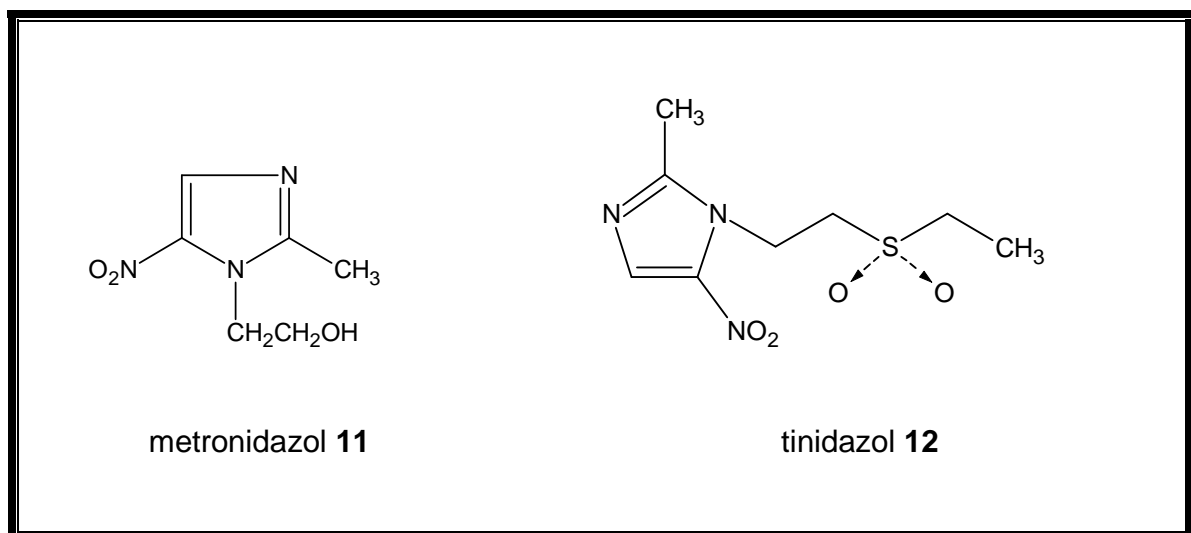
Otro fármaco comúnmente utilizado en el tratamiento de la diarrea causada por *G. lamblia* es la furazolidona **17** esta última es un nitrofurano cuyo mecanismo de acción consiste en interferir con los sistemas enzimáticos del protozoo, principalmente a nivel del ciclo de Krebs. Como efectos adversos comunes se han reportado náuseas,



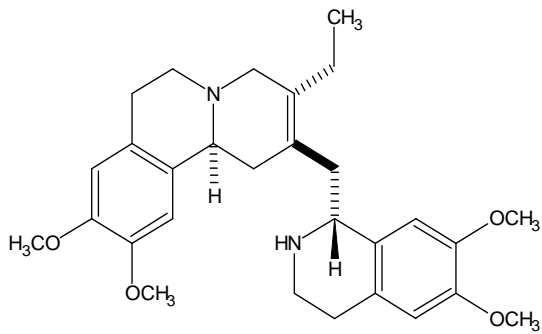
vómito y cefalea. La administración crónica y de altas dosis orales a roedores, ha demostrado evidencia de actividad tumorigénica y se ha demostrado que promueve el desarrollo de neoplasias mamarias (O'Neil, 2001; PLM, 2005).

A pesar de que se tienen fármacos para tratar las enfermedades causadas por *E. histolytica* y *G. lamblia*, la mayoría de ellos inducen diversos efectos secundarios, además del riesgo constante de la aparición de cepas resistentes a estos fármacos. En este sentido, la búsqueda permanente de compuestos antiprotozoarios más eficientes y mejor tolerados está justificada. Las plantas medicinales usadas en la herbolaria mexicana son una fuente de compuestos con potencial para ser usados en el desarrollo de medicamentos antiamebianos y anti-giardia.

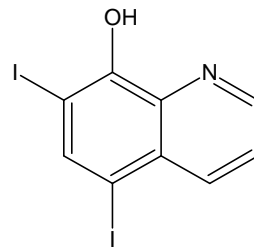
**Cuadro 3.** Fármacos utilizados en el tratamiento de la amibiasis y la giardiasis.



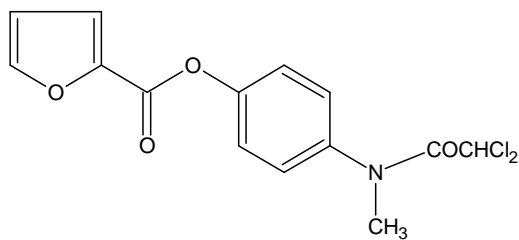
**Cuadro 3.** Fármacos utilizados en el tratamiento de la amibiasis y la giardiasis (continuación).



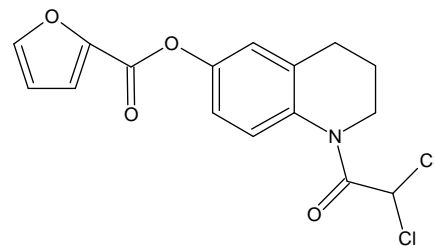
**deshidroemetina 13**



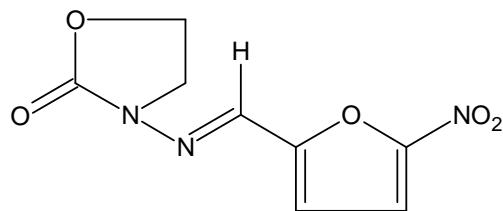
**yodoquinol 14**



**Furoato de diloxanida 15**



**quinfamida 16**



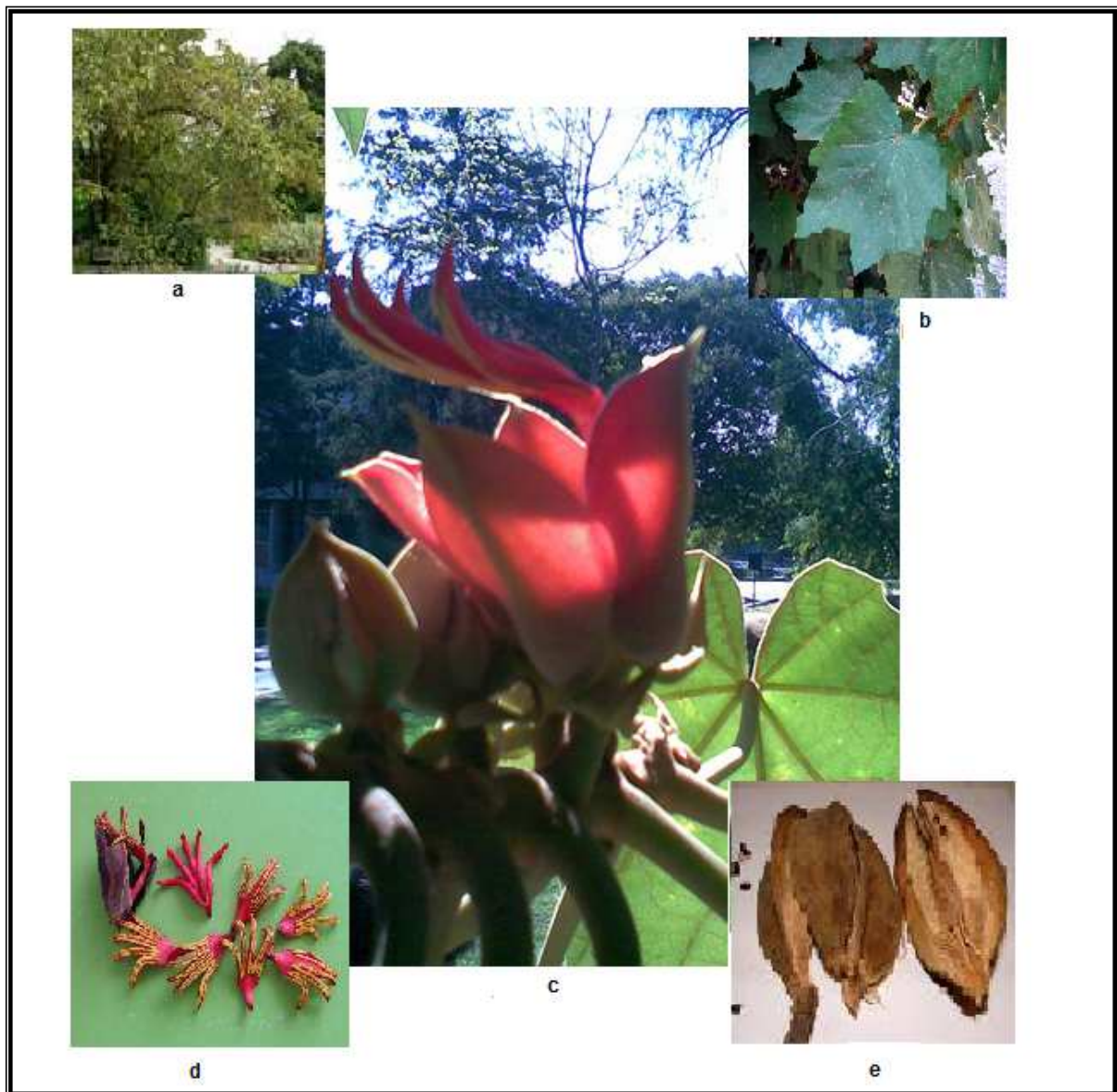
**furazolidona 17**

## II.5 Generalidades de *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat.

*Ch. pentadactylon* (Figura 3) pertenece a la familia Sterculiaceae, se le conoce ampliamente como: "flor de manita, árbol de las manitas, manita, mano de león, mano de dragón, palo de tabuco, palo de yaco, mapilxochitl, macpalxochitl, macpalxochicuahuitl, ita nada y tundakua". La planta crece en climas cálido, semicálido y templado desde los 200 y hasta los 2600 m sobre el nivel del mar, principalmente en el bosque mesófilo de la montaña. Es una planta originaria de México y se le encuentra en los estados de Oaxaca, Chiapas, Guerrero, Michoacán y el Estado de México. También se le puede localizar en Centro América principalmente en Guatemala (Lara y Márquez, 1996; Argueta *et al.*, 1994; Linares *et al.*, 1988).

*Ch. pentadactylon* es un árbol (**a**) de 10 a 15 m de altura, que florece entre mayo y junio, con un tronco a menudo de 40 cm de diámetro; de ramas tomentosas con pelos estrellados, cuyo conjunto presenta un color ferruginoso; hojas (**b**) anchamente ovadas largo pecioladas de 12 a 30 cm de largo, agudas a acuminadas, cordadas en la base, irregularmente lobuladas (5 a 8 lóbulos), estipuladas, estrellado tomentosas en el envés y con el pecíolo largo, con bordes puntiagudos, lisas en el anverso y vellosas en el reverso; con flores (**c**) solitarias de unos 15 cm, angulosas y hermafroditas, sin corola, su cáliz es campulado, grueso y coriáceo, mide unos 3.5 a 4.5 cm de largo, con cinco lóbulos y protegido de tres brácteas; por fuera es tomentoso y de color café rojizo y por dentro de un color rojo intenso; no posee pétalos; cinco estambres (**d**) de color rojo que están unidos en una base formando una columna y que se prolongan hacia fuera arqueándose, ofreciendo la forma de una mano; el ovario se oculta en la base de la columna; el fruto (**e**) es de una cápsula leñosa de unos 10 a 15 cm, quinquelocular, revestido de pelos rígidos de color leonado, con cinco valvas, con espina por dentro;

semillas numerosas, pequeñas, negras, brillantes y con espinas (Lara y Márquez, 1996; Argueta *et al.*, 1994; Linares *et al.*, 1988).



**Figura 3.** *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat. **a:** árbol; **b:** hojas; **c:** flor; **d:** estambres; **e:** fruto

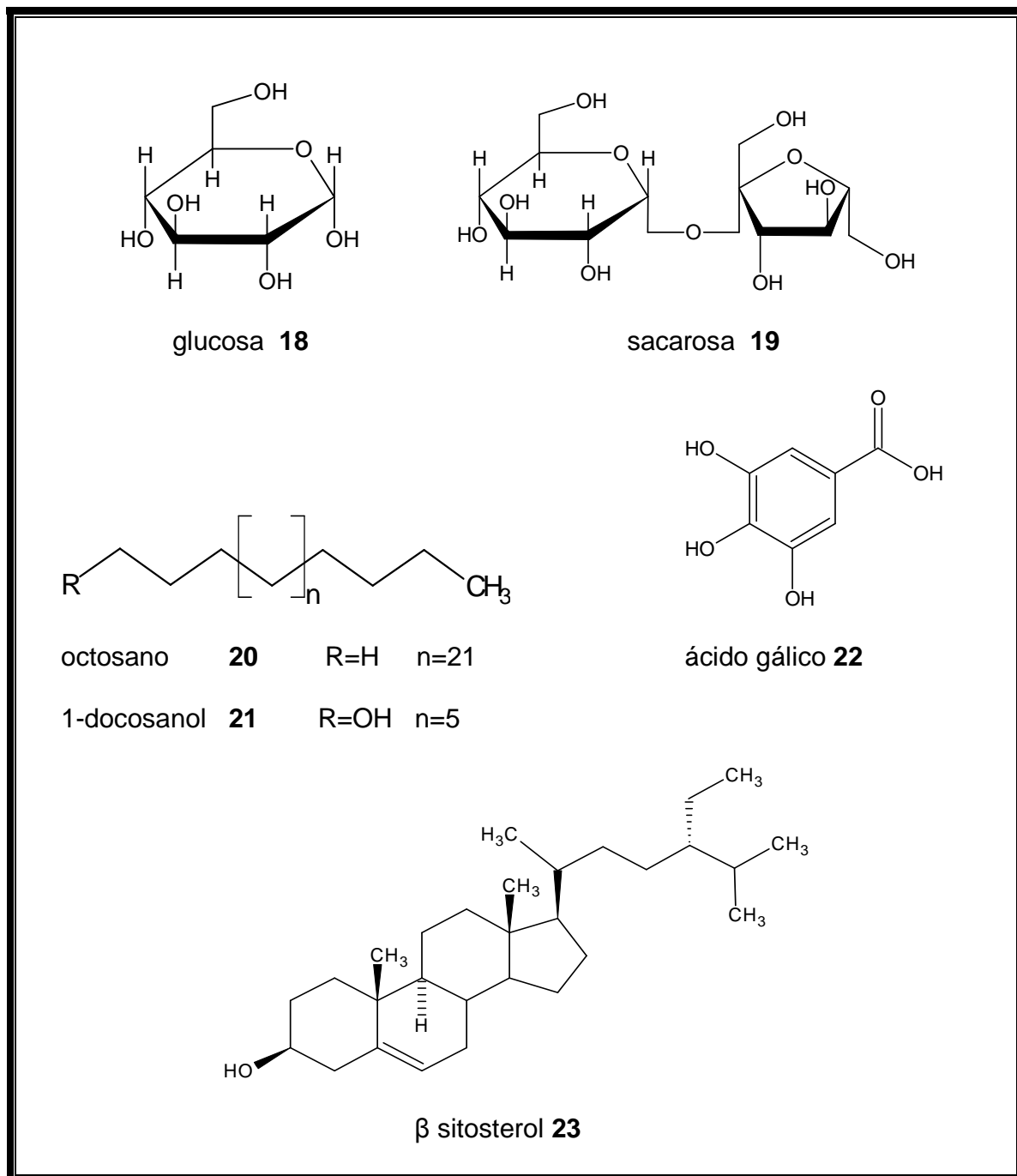
La infusión de las flores de *Ch. pentadactylon* se han utilizado desde la época de los aztecas para tratar úlceras crónicas, hemorroides, para el dolor y la inflamación de los ojos. Actualmente, se utiliza contra las afecciones del corazón como cardiotónico y para regular la presión arterial. Otros usos menos frecuentes son para el control de la diarrea y la disentería, la epilepsia, en el dolor de cabeza, mareos posparto y como tranquilizante. Se usa también como planta de sombra y ornato, por su follaje y la belleza de sus flores (Sánchez, 2001; Lara y Márquez, 1996; Argueta, 1994; Martínez, 1944; Niembro, 1990; Linares *et al.*, 1988).

Desde el punto de vista farmacológico, diversos extractos de las flores de *Ch. pentadactylon* han sido objeto de varios estudios donde se han demostraron las propiedades anticolinérgicas, relajantes, catatónicas, midriáticas, vasoactivas moderadas, antiespasmódicas, antibacterianas, antiprotozoarias y actividad antisecretora intestinal inducida por la toxina de *V. cholerae* (Argueta *et al.*, 1994; Perusquia *et al.*, 1995; Arellano, 2004; Alanis *et al.*, 2005; Calzada *et al.*, 2006; Velázquez *et al.*, 2006). Las últimas cuatro actividades están asociadas al uso de las flores en el tratamiento de la diarrea y la disentería, lo que permite proponerla como una fuente potencial de productos (extractos, fracciones y compuestos puros) para el desarrollo de fitomedicamentos.

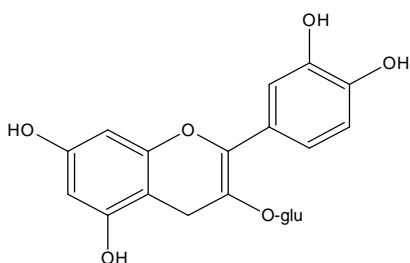
En relación a los estudios fitoquímicos de las flores de *Ch. pentadactylon* se han realizado tres. El primero condujo al aislamiento e identificación de dos azúcares (glucosa **18** y sacarosa **19**), dos hidrocarburos (octosano **20** y 1-docosanol **21**), un fenol simple (ácido gálico **22**), un esteroide ( $\beta$ -sitosterol **23**) y ocho flavonoides (cianidina 3-O-glucósido **24**, leucocianidina **25**, luteolina 7-O-glucósido **26**, luteolina 7-O-

glucorónido **27**, quercetina 3-O-glucósido **28**, gopipetina **29**, gopipetina 3-O-glucorónido **30** y apigenidina 5,7,4'-tri-O-glucósido **31** (Cuadro 4) (Lara y Márquez, 1996).

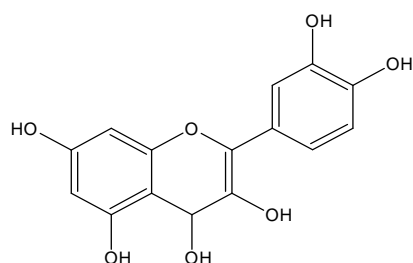
**Cuadro 4.** Compuestos aislados de *Ch. pentadactylon*.



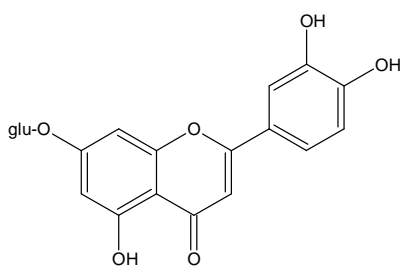
**Cuadro 4.** Compuestos aislados de *Ch. pentadactylon* (continuación).



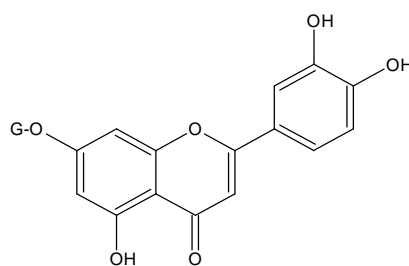
**cianidina 3-O-glucósido 24**



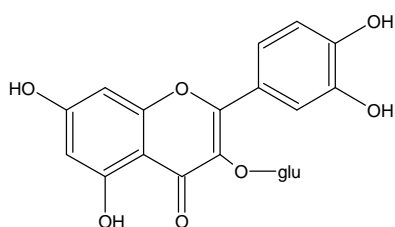
**leucocianidina 25**



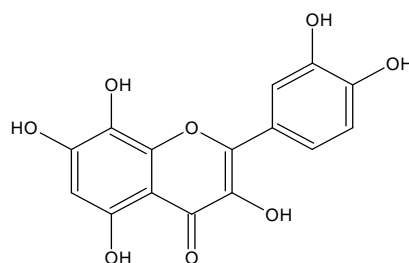
**luteolina 7-O-glucósido 26**



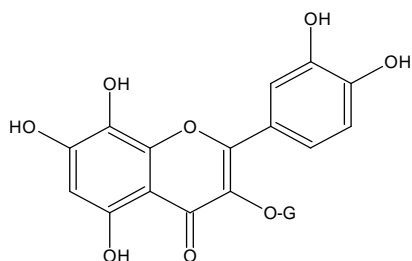
**luteolina 7-O-glucorónido 27**



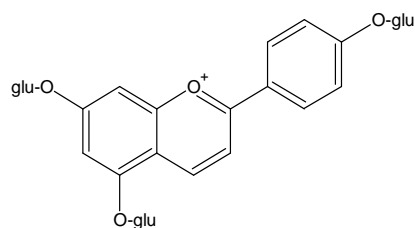
**quercetina 3-O-glucósido 28**



**gospetina 29**



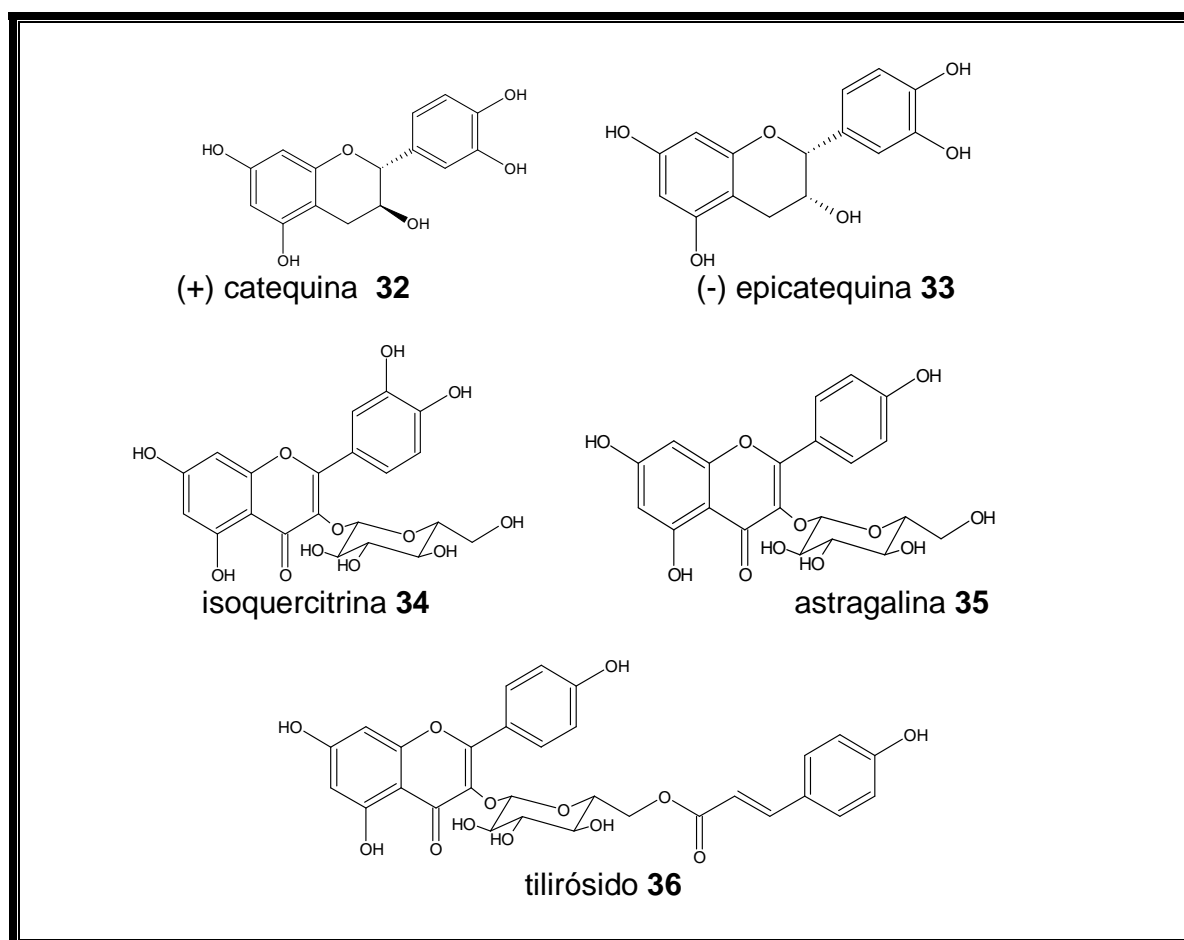
**gospetina 3-O-glucorónido 30**



**apigenidina 5,7,4' tri-O-glucósido 31**

Los dos estudios restantes se condujeron de manera biodirigida con la finalidad de aislar los principios que inhiben la secreción intestinal inducida por la tóxina de *Vibrio cholerae* y antibacterianos del vegetal, los estudios permitieron el aislamiento de cinco flavonoides: (+) catequina **32**, (-) epicatequina **33**, isoquercitrina **34**, astragalina **35** y tilirósido **36**. Los compuestos **32-34** resultaron ser los compuestos responsables de la actividad antisecretora. En el caso de la actividad antibacteriana el tilirósido **36** es el compuesto que presentó mayor actividad antibacteriana (Ávila, 2006; Velázquez, 2006).

**Cuadro 4.** Compuestos aislados de *Ch. pentadactylon* (continuación).





### III JUSTIFICACIÓN

En México el conocimiento químico y farmacológico de su flora medicinal es escaso, lo que conduce a una falta de información para validar su uso en la herbolaria mexicana como agentes terapéuticos potenciales. Por otro lado, las enfermedades infecciosas, en particular las causadas por protozoarios como *E. histolytica* y *G. lamblia*, son un problema de salud pública que afecta a un gran número de la población y que para hacerle frente a este tipo de padecimientos una porción considerable de los mexicanos utilizan las plantas medicinales.

Por lo anterior, los estudios que estén enfocados a demostrar las propiedades medicinales de la herbolaria mexicana están justificados, colateralmente la información derivada de las investigaciones sobre los efectos farmacológicos y químicos de las plantas medicinales de México son un aporte muy valioso para el desarrollo de nuevos fitomedicamentos.

#### IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Partiendo de un estudio realizado a 26 plantas medicinales mexicanas utilizadas en el tratamiento de problemas gastrointestinales como la diarrea y la disentería, en el que se cuantificó la actividad antiprotozoaria de sus extractos metanólicos, contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Se encontró que el extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon* fue el de mayor actividad antiprotozoaria sobre *Entamoeba histolytica* ( $CI_{50} = 2.5 \mu\text{g/ml}$ ) y moderada actividad sobre *Giardia lamblia* ( $CI_{50} = 44.2 \mu\text{g/ml}$ ). Sin embargo, no se han obtenido productos derivados de este extracto responsables de esta propiedad, por lo que la presente investigación está conducida a la obtención de productos con propiedades antiprotozoarias derivados de las flores de *Ch. pentadactylon*.

## **V OBJETIVO GENERAL**

Obtener los compuestos responsables de la actividad antiprotozoarias del extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon*, con la finalidad de contribuir al proceso de validación de la planta.

### **V.1 Objetivos específicos**

V.1.1 Realizar el estudio químico biodirigido del extracto metanólico de las flores para aislar los compuestos activos.

V.1.2 Identificar los compuestos químicos aislados.

V.1.3 Determinar la actividad antiprotozoaria de las fracciones y compuestos.

## **VI HIPOTESIS**

Si el extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon* presenta actividad antiprotozoaria, entonces posee uno o más compuestos químicos responsables de dicha actividad que pueden ser aislados mediante la aplicación de una estrategia de investigación química biodirigida.

## **VII METODOLOGÍA**

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

Las flores de *Ch. pentadactylon* se adquirieron en el mercado de Sonora de la Ciudad de México en octubre del 2001, una muestra de referencia se depositó en el Herbario IMSSM y fue identificada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras (Voucher 14 256).

Las flores fueron secadas a temperatura ambiente y trituradas con un molino Tor-rey, posteriormente se extrajeron por maceración con metanol (20 L x 2 semanas) a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró y se concentró en un rotaevaporador a presión reducida a una temperatura de 30°C, obteniéndose 1.42 kg de un extracto de color rojo.

### **VII.2 Ensayos biológicos**

#### **VII.2.1 Protozoarios**

Las cepas utilizadas para el ensayo biológico fueron *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS y *Giardia lamblia* IMSS: 1090:1; *E. histolytica* se mantuvo en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino. Los trofozoitos de *G. lamblia* se cultivaron en medio TYI-S-33 modificado y suplementado con 10% de suero de ternera y bilis bovina. Para el ensayo biológico las cepas se emplearon en fase logarítmica de crecimiento.

#### **VII.2.2 Determinación de la actividad antiprotozoaria**

La determinación de la actividad antiprotozoaria se realizó con el método de subcultivo descrito por Calzada y sus colaboradores (Calzada *et al.*, 1998). Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma. El extracto, la fracción o el compuesto puro se disolvió en 1mL de DMSO y 19 mL de medio de cultivo TYI-S-33. De la solución

resultante, se transfirieron 20, 40, 80, 120 y 160  $\mu\text{L}$ , 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 de la muestra incorporada se inocularon con *E. histolytica* y *G. lamblia* para obtener un inóculo de  $6 \times 10^3$  trofozoitos/mL y  $5 \times 10^4$  trofozoitos/mL, respectivamente. Las muestras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 hr. Cada prueba incluyó metronidazo I (Sigma) y emetina (Sigma) como controles positivos, un control (medio de cultivo, DMSO y trofozoitos) y un blanco (medio de cultivo).

Después de la incubación, 50  $\mu\text{L}$  de cada tubo de cultivo se subcultivaron por otras 48 horas en medio fresco sin la presencia de las muestras (extracto, fracciones y compuestos puros) y los controles positivos (metronidazol y emetina). El número final de protozoarios fue determinado por cuenta directa con microscopio. Para el cálculo de la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) se utilizó un programa de análisis probit.

### **VII.3 Análisis cromatográficos**

Las cromatografías de adsorción en columna abierta (CCA) se realizaron sobre gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm, Merck). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF), tanto analítico como preparativo, se llevaron a cabo siguiendo las técnicas convencionales empleándose placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (20 x 20 cm Sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck) y diversos sistemas de elución. Los agentes cromógenos que se emplearon se muestran en el Cuadro 5 (Stahl, 1969; Wagner *et al.*, 1984). Antes de llevar a cabo el revelado de las placas se visualizaron con luz UV, con ayuda de una lámpara modelo UV gL-58 a longitudes de onda de 254 y 365 nm.

La cromatografía de líquidos de alta resolución se realizó en un cromatógrafo marca Perkin Elmer 250 Binary LC Pump, equipado con un detector de UV con arreglo de diodos. El control del equipo, la adquisición de los datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Omega.

**Cuadro 5.** Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

<b>Agente cromógeno</b>	<b>Composición</b>
Vainillina-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico al 5% en etanol 100 mL Vainillina 1 g
Tricloruro de aluminio	Cloruro de aluminio 5 g Agua 100mL
Tricloruro férrico	Cloruro de fierro III 10g Agua 100mL
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10%)	Ácido sulfúrico 9.8mL Agua 100mL
Fast blue (0.5% H <sub>2</sub> O)	Fast blue 0.5g Agua 99.5 mL

#### **VII.4 Fraccionamiento del extracto**

El fraccionamiento del extracto metanólico de *Ch. pentadactylon* se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta, se emplearon 152 g de extracto metanólico. Como fase estacionaria se empleó 1 kg de sílica gel. Los eluyentes empleados fueron acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) en diferentes

proporciones. Se obtuvieron 270 fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron agrupadas en 10 fracciones primarias (F1/F10) de acuerdo con sus similitudes cromatográficas (Cuadro 6). El concentrado de las fracciones individuales y agrupadas se llevó a cabo en un rotaevaporador a presión reducida y a una temperatura de 40°C.

**Cuadro 6.** Resumen del fraccionamiento mediante CCA del extracto

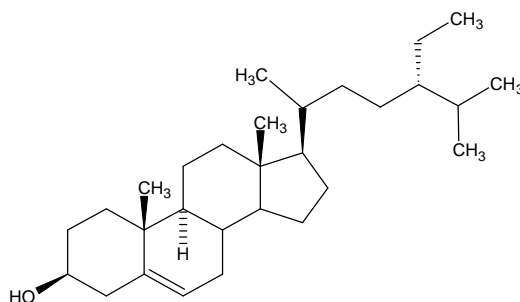
FRACCIÓN	FRACCIONES AGRUPADAS	SISTEMA DE ELUCIÓN	CANTIDAD OBTENIDA (g)	RENDIMIENTO* (%)
F1	1/7	AcOEt 100%	0.175	0.016
F2	8/10,11/15	AcOEt 100%	0.529	0.048
F3	16/37;38/52	AcOEt 100%	2.010	0.193
F4	53/78;79/101	AcOEt 100% AcOEt:MeOH (95:5)	3.581	0.326
F5	102/128;129/146	AcOEt:MeOH(95:5);(90:10)	3.543	0.322
F6	147/155;156/166	AcOEt:MeOH(90:10)	3.761	0.342
F7	167/175;176/185	AcOEt:MeOH(90:10);(80:20)	9.192	0.836
F8	186/194;195/203; 204/216	AcOEt:MeOH(80:20)	25.480	2.318
F9	217/229;230/236; 237/245;246/256	AcOEt:MeOH(80:20);(70:30)	61.800	5.622
F10	257/270	AcOEt:MeOH (50:50)	52.060	4.736

\*Referido al peso seco de la planta



## VII.5 Identificación del $\beta$ -sitosterol

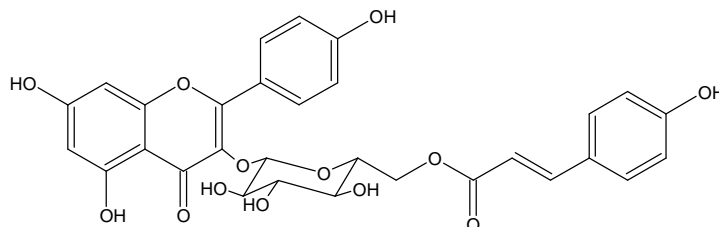
De la fracción primaria F1 se obtuvo un sólido de color blanco que por análisis en CCF y empleando una referencia disponible en el laboratorio, fue identificado como  $\beta$ -sitosterol **23**. Como eluyente se utilizó una mezcla de Hexano: AcOEt (8:2) y sílica gel como fase estacionaria.



$\beta$ -sitosterol **23**

## VII.6 Aislamiento e identificación del tilirósido

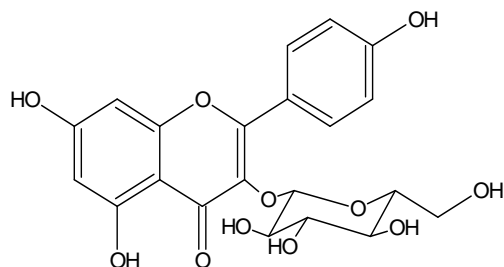
Las fracciones F2 y F3 se recrystalizaron con AcOEt para obtener 7.2 mg y 162.4 mg, respectivamente de un sólido color amarillo, soluble en MeOH, con un punto de fusión de 207-208°C, el cual se identificó como tilirósido **36** por comparación con una referencia en CCF empleando un sistema de elución constituido por AcOEt:CH<sub>3</sub>COOH:HCOOH:H<sub>2</sub>O(10:1.1:1.1:2.7). El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher Johns.



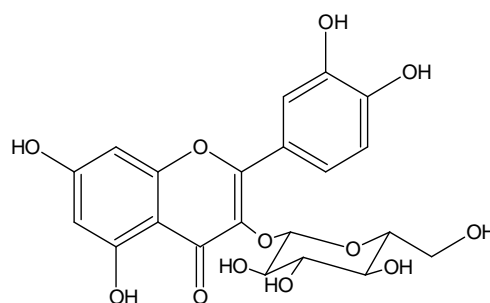
tilirósido **36**

## VII.7 Aislamiento y purificación de astragalina y la isoquercitrina

La fracción F5 (10 mg) se sometió a una CCFP. La fase móvil que se empleó estuvo constituida por AcOEt:CH<sub>3</sub>COOH:HCOOH:H<sub>2</sub>O (10:1.1:1.1:2.7). La fase estacionaria fue la misma que para los casos anteriores. Se obtuvieron dos sólidos de color amarillo, solubles en MeOH, que fueron identificados por cromatografía en capa fina comparativa como astragalina **35** e isoquercitrina **34**. Sus puntos de fusión fueron 205°C y 189-190°C , respectivamente.



astragalina **35**



isoquercitrina **34**

## VII.8 Fraccionamiento de la fracción primaria F6

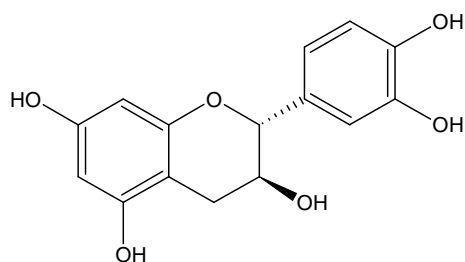
La fracción primaria F6 (3.761 g) se sometió a un fraccionamiento secundario mediante CCA, como fase estacionaria se emplearon 123.8 g de sílice gel 60 (0.063 – 0.200 mm Merck) para cromatografía en columna. Los eluyentes empleados fueron AcOEt y MeOH en diferentes proporciones. En el proceso se obtuvieron 214 fracciones de 20 mL cada una, las cuales fueron agrupadas en 8 fracciones secundarias (FS1/FS8) de acuerdo a sus similitudes cromatográficas (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Resumen del fraccionamiento mediante CCA de la fracción primaria F6.

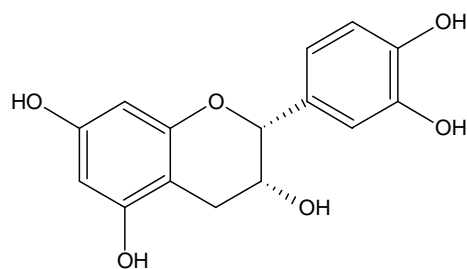
FRACCIÓN	FRACCIONES AGRUPADAS	SISTEMA DE ELUCIÓN	CANTIDAD OBTENIDA (g)	RENDIMIENTO* (%)
FS1	1/15	AcOEt: MeOH (9:1)	0.0500	0.005
FS2	16/23	AcOEt: MeOH (9:1)	0.1000	0.009
FS3	24/31,32/41	AcOEt: MeOH (9:1)	0.2364	0.022
FS4	42/51	AcOEt: MeOH (9:1)	0.2189	0.020
FS5	52/65,66/91	AcOEt: MeOH (9:1)	0.6048	0.055
FS6	92/104	AcOEt: MeOH (8:2)	0.4234	0.039
FS7	105/132,133/152, 153/189	AcOEt: MeOH (8:2); (7:3)	0.8220	0.075
FS8	190/205,206/214	AcOEt: MeOH (6:4);(5:5)	0.4704	0.043

\*Referido al peso seco de la planta

De las fracciones FS2 y FS3 se logró detectar a la mezcla de (+) catequina **32** y (-) epicatequina **33** mediante CCF. El sistema de elución empleado fue AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (10:1.6:1.3).



(+) catequina **32**



(-) epicatequina **33**

Las aguas madres de la fracción FS3 se evaporaron a sequedad y una porción (10 mg) se purificó mediante CCFP, empleando como fase móvil AcOEt:MeOH:H<sub>2</sub>O (10:1.6:1.3) y como fase estacionaria sílica gel sobre placas de aluminio. Se obtuvieron 2.4 mg de una mezcla de la (+) catequina **32** y (-) epicatequina **33**, por cada 10 mg de esta fracción. Esta mezcla se purificó por CLAR para obtener 1.2 mg de (-) epicatequina **33** y 1.2 de (+) catequina **32**. La separación de los flavan 3-oles se llevó a cabo empleando una columna de fase reversa, un gradiente de elución (Cuadro 8) y un flujo de 3.2 mL/min. La detección se realizó a 280 nm y el tiempo total de elución fue de 34 min.

**Cuadro 8.** Programa de elución utilizado en la CLAR para separar la fracción FS3.

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

La (-) epicatequina **33** se aisló como un sólido de color café claro con un punto de fusión de 242-244 °C y un tiempo de retención de 14.6 minutos. La (+) catequina **32** se aisló como un sólido color café claro con un punto de fusión de 183-185°C y un tiempo de retención de 10.5 minutos.

## VIII RESULTADOS

Después de llevar a cabo el fraccionamiento del extracto mediante cromatografía en columna abierta se obtuvieron 10 fracciones primarias (F1/F10). A cada una de ellas se evaluó su actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* y *G. lamblia* (Cuadro 9).

De la fracción F1 se obtuvo un rendimiento bajo por lo que no fue sometida al ensayo de actividad antiprotozoaria.

**Cuadro 9.** Actividad antiprotozoaria de las fracciones primarias del extracto

<b>FRACCIONES</b>	<b>Cl<sub>50</sub> (µg/mL) <i>E. histolytica</i></b>	<b>Cl<sub>50</sub> (µg/mL) <i>G. lamblia</i></b>
F2	159.77(160.89-158.18)	198.52 (199.01-198.03)
F3	81.08 (82.34-81.33)	107.83 (108-107.68)
F4	63.64 (63.89-63.43)	97.61 (97.70-97.51)
F5	38.23 (38.58-37.95)	44.68(44.74-44.62)
<b>F6</b>	<b>1.97 (2.36-1.61)</b>	<b>6.20(6.27-6.15)</b>
F7	49.37 (49.62-49.12)	59.39(59.45-59.33)
F8	92.04 (92.50-91.53)	85.48(85.5785.41)
F9	112.72( 113.37-112.06)	96.05(96.17-95.94)
F10	70.84 (71.22-70.47)	87.46(87.55-87.37)
F11	27.58 (28.14-27.43)	28.13(28.16-28.09)

El estudio fitoquímico del extracto metanólico condujo al aislamiento y la purificación de un esteroide ( $\beta$ -sitosterol) y cinco flavonoides: (+) catequina **32**, (-) epicatequina **33**, isoquercitrina **34**, astragalina **35** y tilirosido **36**.

Los compuestos identificados fueron sometidos a un estudio de actividad antiprotozoaria contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 10.

**Cuadro 10.** Actividad antiprotozoaria de los compuestos puros

<b>COMPUESTO PURO</b>	<b>CI<sub>50</sub> <math>\mu</math>g/ml (IC)<sup>b</sup> <i>Entamoeba histolytica</i></b>	<b>CI<sub>50</sub> <math>\mu</math>g/ml (IC)<sup>b</sup> <i>Giardia lamblia</i></b>
(-) Epicatequina	1.9 (2.0-1.3)	1.6 (1.7-1.4)
(+) Catequina	65.5 (67.3-62.2)	34.0 (35.1-31.5)
Isoquercitrina	14.7 (14.9-14.5)	47.5 (47.6-47.4)
Astragalina	61.2 (61.5-60.9)	47.5 (47.6-47.4)
Tilirósido	17.5 (22.1-13.8)	17.4(22.3-13.5)
$\beta$ -sitosterol	52.3(52.7-52.1)	71.0 (71.3-71.0)
Emetina <sup>a</sup>	1.05 (1.1-1.03)	0.41 (0.42-0.40)
Metronidazol <sup>a</sup>	0.04 (0.010-0.03)	0.21 (0.27-0.14)

<sup>a</sup> Control Positivo

<sup>b</sup> Intervalo de confianza 95%

## IX DISCUSIÓN DE RESULTADOS

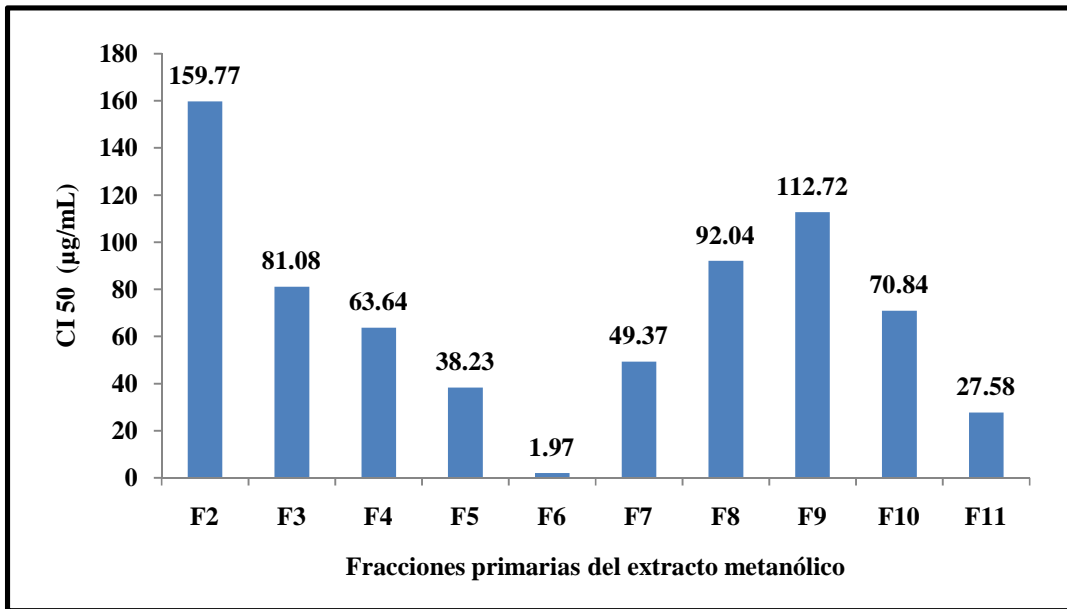
La presente investigación se basa en los resultados de un estudio realizado a los extractos metanólicos de 26 plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diarrea y la disentería, con el fin de cuantificar su actividad *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. lamblia* (Calzada *et al.*, 2006). En dicho estudio, el extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon* fue el de mayor actividad antiamebiana con un  $CI_{50}$  de 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , muy cercana a la actividad de la emetina y una moderada actividad anti giardia con un  $CI_{50}$  de 44.2  $\mu\text{g/ml}$ . Lo anterior justificó la selección de *Ch. pentadactylon* como candidato importante para la obtención de compuestos con actividad antiprotozoaria que pudieran tener utilidad terapéutica.

Además de su actividad antiprotozoaria, el extracto metanólico de esta especie, ha mostrado propiedades antibacterianas, antiespasmódicas y antisecretora intestinal, teniendo cuatro evidencias farmacológicas que permiten explicar el uso tradicional de las flores de *Ch. pentadactylon* en el tratamiento de la diarrea y la disentería. Con estas evidencias se puede utilizar esta especie para el desarrollo de fitofármacos, ya que no presenta toxicidad aguda en ratas, no ocasiona mortandad ni daño macroscópico en estómago, intestino, hígado, pulmón y corazón a la dosis de 4800 mg/kg (Velázquez, 2006).

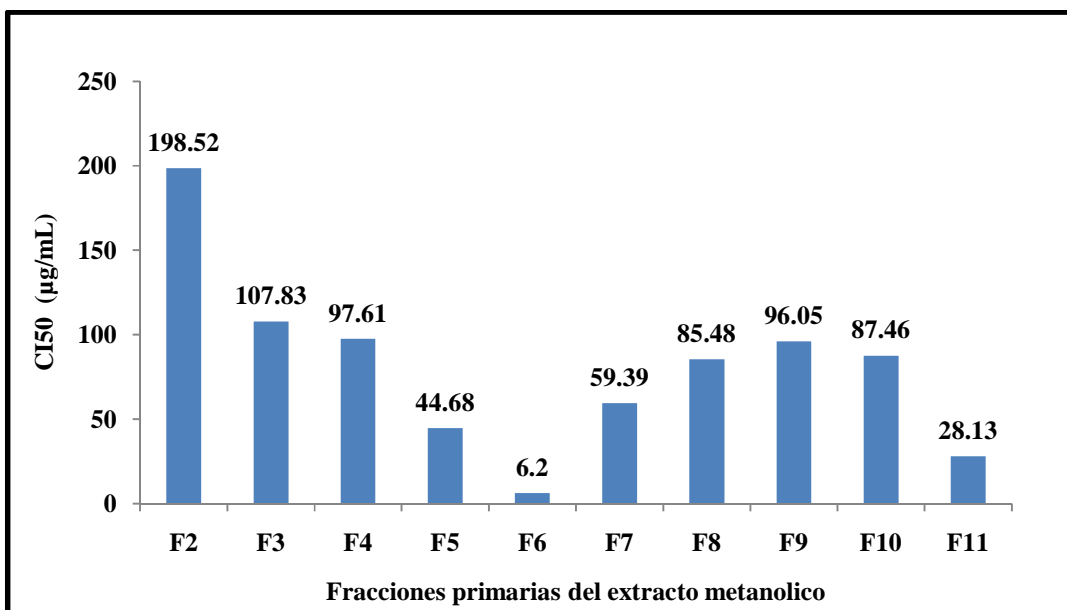
El fraccionamiento del extracto metanólico mediante CCA permitió obtener 10 fracciones primarias (F1/F10), con excepción de F1 las fracciones fueron sometidas a un estudio de actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* (Gráfica 1) y *G. lamblia* (Gráfica 2).



**Grafica 1.** Actividad de las fracciones primarias sobre *E. histolytica*.



**Grafica 2.** Actividad de las fracciones primarias sobre *G. lamblia*.

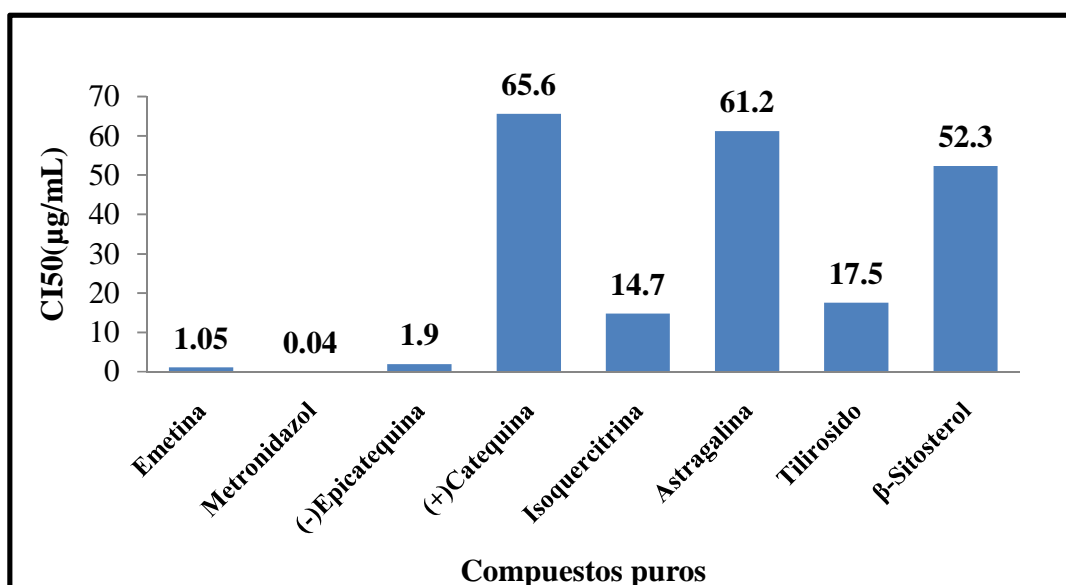


La fracción primaria F6 resultó ser la fracción con mayor actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* ( $CI_{50} = 1.97\mu\text{g/mL}$ ) y *G. lamblia* ( $CI_{50} = 6.20\mu\text{g/mL}$ ) por lo que fue sometida a un fraccionamiento secundario en donde se obtuvieron los compuestos (-) epicatequina **33** y (+) catequina **32**.

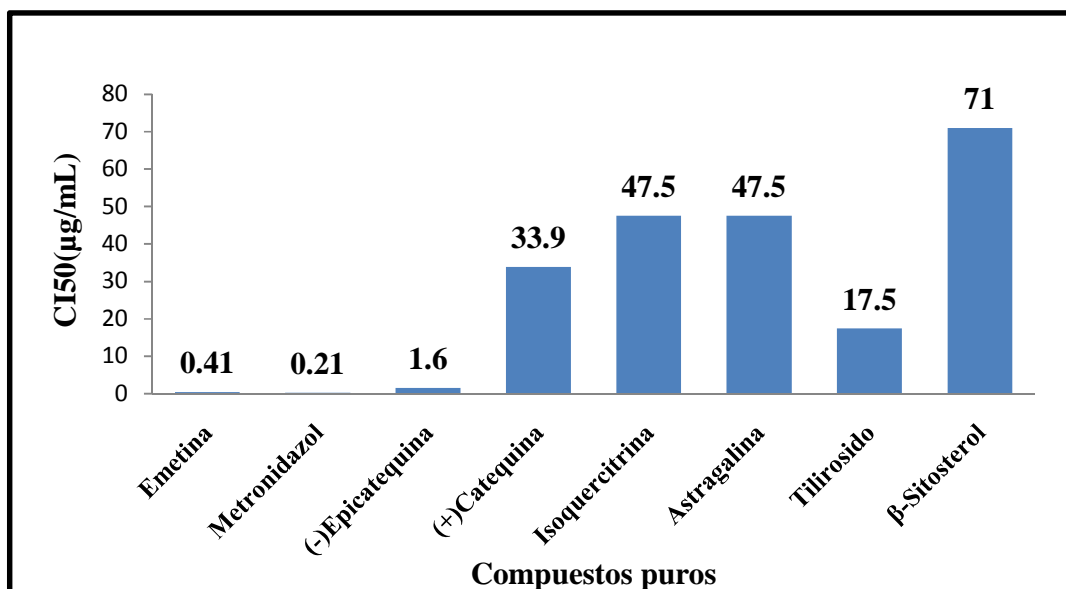
La fracción primaria F5 fue la tercera con mayor actividad antiprotozoaria y de esta se obtuvieron los compuestos astragalina **35** e isoquercitrina **34**. También se aislaron e identificaron compuestos de las fracciones con menor actividad antiprotozoaria, de la fracción primaria F1 se aisló el  $\beta$ -sitosterol **23** y de las fracciones F2 y F3 se obtuvo el tilirosido **36**.

Se cuantificó la actividad antiprotozoaria de los compuestos puros (Gráficas 3 y 4) aislados del extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon*.

**Gráfica 3.** Actividad antiamebiana de los compuestos puros.



**Gráfica 4.** Actividad anti-giardia de los compuestos puros.



La (-) epicatequina **33** resultó ser el compuesto con mayor actividad anti-giardia ( $CI_{50} = 1.9 \mu\text{g/ml}$ ), su actividad es muy similar a la de la emetina **4** ( $CI_{50} = 1.05 \mu\text{g/ml}$ ), pero menor a la del metronidazol **11** ( $CI_{50} = 0.04 \mu\text{g/ml}$ ). También es el compuesto con mayor actividad anti-giardia con una  $CI_{50} = 1.6 \mu\text{g/ml}$ .

La actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* es alta por parte de isoquercitrina **34** ( $CI_{50} = 14.7 \mu\text{g/mL}$ ) y contra *G. lamblia* es moderada con un  $CI_{50}$  de  $47.5 \mu\text{g/mL}$ . El tilirósido **36** tiene una alta actividad ( $CI_{50} = 17.5 \mu\text{g/mL}$ ) anti-giardia y anti-giardia ( $CI_{50} = 17.4 \mu\text{g/mL}$ ). La astragalina **35** y la (+) catequina **32** resultaron tener actividad moderada contra ambos protozoarios y el  $\beta$ -sitosterol **23** es el compuesto con menor actividad antiprotozoaria de los seis compuestos obtenidos en el estudio.

La obtención de estos compuestos concuerda con los estudios fitoquímicos realizados anteriormente por Ávila y Velázquez (2006).

La presencia de los compuestos identificados explica la actividad antiprotozoaria del extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon* y de la fracción primaria F6.

La (-) epicatequina también ha sido aislada e identificada en otras plantas como en *Rubus coriifolius* y *Geranium mexicanum* especies, cuyos extractos también tienen actividad antiprotozoaria (Calzada *et al.*, 2005; Alanís *et al.*, 2003).

La (-) epicatequina **33** tiene reportadas otras actividades biológicas como la antiviral con un CE<sub>50</sub> de 2 µg/ml contra el virus VIH-1; la antioxidante inhibiendo al radical alquil peróxido de *E. coli* y la antisecretora con un 57.8% de inhibición de la secreción gastrointestinal inducida por la toxina de *Vibrio cholerae* (Mahmood *et al.*, 1993; Nakao *et al.*, 1998; Velázquez, 2006)

La actividad antiprotozoaria y antisecretora mostrada por la (-) epicatequina **33** permite proponerla como una estructura prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la diarrea.

## X CONCLUSIONES

- ❖ El estudio químico biodirigido del extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon* permitió el aislamiento de un esteroide ( $\beta$ -sitosterol) y de cinco flavonoides: tilirosido, isoquercitrina, (-) epicatequina, (+) catequina y astragalina.
- ❖ La fracción primaria F6 fue la que tiene mayor actividad antiprotozoaria.
- ❖ La (-) epicatequina es el compuesto con mayor actividad antiamebiana ( $CI_{50} = 1.9 \mu\text{g/ml}$ ) y anti giardia ( $CI_{50} = 1.6 \mu\text{g/ml}$ ), lo cual permite explicar que su presencia en el extracto metanólico de las flores de *Ch. pentadactylon* le confiere esa actividad antiprotozoaria, justificando el uso que se le da a esta planta en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de la diarrea.
- ❖ La epicatequina es un candidato como molécula prototipo para el desarrollo de fármacos antidiarreicos y al extracto metanólico para el desarrollo de fitofármacos.

## XI BIBLIOGRAFÍA

- Alanís, A., Calzada, F., Cedillo-Rivera, R., Meckes, M. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus coriifolius*. *Phytoterapy Research* 17, 681-682.
- 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.
- Arellano, J. 2004 Evaluación de la actividad antiespasmódica de algunas plantas medicinales mexicanas en íleon aislado de rata: Estudio del *Zanthoxylum liebmannianum* (Colophate). Tesis de licenciatura. FES Zaragoza. UNAM, p. 45.
- Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México, Pp. 644-645.
- Ávila, O. 2006. Estudio antibacteriano y químico de las flores de *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat (Sterculiaceae). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM, Pp. 17-21; 27-33.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* 78, 431-434.
- Calzada, F., Meckes, M., Cedillo Rivera, R., Tapia-Contreras, A., Mata, R., 1998. Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology* 36, 305-309.
- Calzada, F., Cervantes-Martinez, J., Yépez-Mulia, L. 2005. *In vitro* antiprotozoal activity from the rotos of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 191-193.
- Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Aguilar, A. 2006. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 367-370.
- Evans, W.Ch. 1991. Trease y Evans. Farmacognosia. 13<sup>a</sup> edición. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México, Pp 3-4.
- Farthing, M. 2002. Novel targets for the control of secretory diarrhea *Gut* 50. iii15-iii18.

- Faust, G., Chester, P., Clifton, R., Wayne, E. 2003. Parasitología Clínica de Gray Faust. 3ª edición. Ed. Masson Dogma México, Pp. 51-53;108;110;112-114;116;125;128-129.
- Hardman J, y Limbird, L. 1996. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición. Vol I. Ed. Mc Graw Hill Interamericana. México, Pp. 1050-1051,1058-1060.
- Herrera, I.F. y Hernández, J.F. 2002, Epidemiología de la enfermedad diarreica. En: Herrera I.F. y Romero, R. (Eds). Síndrome diarreico infeccioso. Ed. Medica Panamericana, Pp. 1-7.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática ([http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/vitales/vitales/2005bis1/mex/1505def.xls](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/vitales/vitales/2005bis1/mex/1505def.xls)).
- Kretschmer, R.R. 1994. Amibiasis. Infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Ed. Trillas. México, Pp. 264-270.
- Kuklinski, C. 2000. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ediciones Omega. España, p. 46.
- Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O., Santos, J. 1994. Manual de Infectología Clínica. 14ª edición. Méndez Editores. México, Pp. 65-68, 72, 73, 137-140, 117, 118, 120-126, 129-131.
- Lara, F., Márquez, C. 1996. Plantas Medicinales de México: Composición, usos y actividad biológica. UNAM. México, p.57.
- Linares, E., Flores, B., Bye, R. 1988. Selección de Plantas Medicinales de México. Ed. Limusa. México, Pp. 44-45.
- Lipsky, M. 2000. Gastrointestinal problems. The academy collection quick reference guides for family physicians. Lippincott Williams and Wilkins. USA. Pp 155 - 164
- Mahmood, N., Pizza, C., Aquino, R., De Tommasi, N., Piacente, S., Colman, S., Burke, A., Hay, A. 1993. Inhibition of HIV infection by flavonoids. *Antiviral Reserch* 22. 189-199.
- Mata, R., Rivero, F. 2000. Curso teórico de farmacognosia. Facultad de Química. UNAM, Pp.100,101, 104, 106, 116.
- Martínez, M., 1944. Las plantas medicinales de México. Ed Botas. México, Pp. 394-395.

- Nakao, M., Takio, S., Ono, K. 1998. Alfyl peroxy radical-scavenging activity of catechins. *Phytochemistry* 49. 2379-2383.
- Niembro, A. 1990. Árboles y arbustos útiles de México. Ed. Limusa Noriega. México, p. 80.
- O'Neil, M., Smith, A., Heckelman, P., The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs and biological. 2001. 13<sup>a</sup> edición, Merck Research Laboratories, Pp.8150, 4324.
- Olarte, J. 1992. Etiología de las diarreas infecciosas: viejos y nuevos agentes. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 49:3 Pp. 143-150.
- Perusquia, M., Mendoza., Bye, R., Linares, E., Mata, R.1995. Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 63-69.
- PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 2005. 51<sup>a</sup> edición Ed. Thomson. México, Pp. 2086, 3012.
- Raskin, I., Ribnicky, D.M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., Brinker, A., Moreno, D.A., Ripoll, C., Yakoby, N., O'Neal, J.M., Cornwell, T., Pastor, I., Fridlender, B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 12, 522-524.
- Sánchez, R. 2001. Guía México desconocido, plantas medicinales. Ed. México desconocido. México, p. 45.
- Stahl, E. 1969. Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Springer-Verlag, New York.
- Velázquez, C. 2006. Evaluación *in vivo* de la actividad inhibidora de la secreción intestinal inducida por la toxina de *Vibrio cholerae* de 26 plantas medicinales: Estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de las flores de *Chirantodendron pentadactylon* (Sterculiaceae). Tesis de doctorado. Escuela Superior de Medicina. IPN, Pp.1-6.
- Velazquez, C., Calzada, F., Torres, J.; Gonzáles, F., Cevallos, G. 2006. Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in México *Journal of Ethnopharmacology* 103, 66-70.
- Wagner, H., Bladt, S., Zganki, E:M: 1984. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York Tokio. Printed in Germany, Pp 299-304.