



DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA
DE PLANTAS

**Estudio de la corteza de *Cupania dentata*
D.C. para la obtención de metabolitos
bioactivos contra *Giardia lamblia***

**Tesis para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:**

IBQ. Luis Ignacio Hernández Chávez

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN, A.C.**

Mérida, Yucatán, México

2011



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

Mérida, Yucatán, México; a de de .

Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales y de Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.


Luis Ignacio Hernández Chávez

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**



CICY

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado Estudio de la corteza de *Cupania dentata* D.C. para la obtención de metabolitos bioactivos contra *Giardia lamblia* fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, dentro de la Opción Doctorado directo, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez.

Las evaluaciones de la actividad antiprotozoaria se realizaron en las instalaciones de la Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la supervisión de la Dra. Rosa Esther Moo Puc y el Dr. Roberto Cedillo Rivera.

La colecta del material vegetal se realizó con el apoyo del técnico Paulino Simá Polanco de la Unidad de Recursos Naturales, CICY.

Durante el desarrollo del proyecto, el trabajo en el laboratorio se realizó con apoyo del técnico M. en C. Luis W. Torres Tapía de la Unidad de Biotecnología, CICY.

Este trabajo se desarrollo gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca de Doctorado CONACYT-170695 a Luis Ignacio Hernández Chávez.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, por la confianza y el apoyo que me brindo durante todo momento, gracias por creer en mí en los momentos difíciles y alentarme siempre a superarme personal y profesionalmente.

A los integrantes de mi comité tutorial y revisores de tesis: Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, Dra. Laura Alvarez Berber, Dra. Rosario García Miss, Dra. Rocío Borges Argáez, Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, Dr. Oscar Moreno Valenzuela, Dr. Felipe Barahona Pérez, Dr. Felipe Vázquez Flota y Dr. Roberto Cedillo Rivera.

A la Dra. Rosa Esther Moo Puc por recibirme en su laboratorio y el adiestramiento recibido para poder llevar a cabo los bioensayos contra *Giardia lamblia*, al Dr. Roberto Cedillo Rivera por su asesoría e instalaciones prestadas para la realización de los bioensayos.

A la Dra. Susana de la Rosa, Dra. Manuelita Reyes, M. en C. José Alfredo de la Fuente, M en C. Teresita Sosa, Dra. Claudia González, M. en C. Montserrat Capdevielle, Dra. Dafne Domínguez, M. en C. Cecilia Guizár, M. en C. Nuvia Kantún, Dra. Norma Rodríguez, Dr. Gustavo Dávila, por la amistad y confianza compartida dentro y fuera del posgrado, mil gracias

A mis amigos y compañeros del CICY, Arely, Abril, Ana, Lulú, Alejandra, Gloria, Andrés, Manuel, Carlos, Ángel, Edgar, Jesús Alejandro, por su amistad y apoyo compartidos en todo momento.

A mis amigos Frank y Cecy, por su apoyo a pesar de las distancias y múltiples ocupaciones de cada uno.

A mis padres Ignacio Hernández y Ma. Refugio Chávez, que con su amor y confianza me dan la fuerza para seguir cada día persiguiendo mis sueños. A mis hermanas, Norma, Marcela y Rocío, que me apoyan en todo momento, gracias por su amistad.

A la familia de mi esposa por su apoyo y confianza a lo largo de todo este tiempo, gracias.

A mi esposa Mariel por su amor y apoyo y por ser la madre de nuestro hijo Yoel, que ha venido a llenar nuestras vidas de bendiciones. Junto a ustedes la letra "Tantos siglos, tantos mundos, tanto espacio... y coincidir" adquiere su significado, gracias.

DEDICATORIA

"Hay hombres que luchan un día y son buenos. Hay otros que luchan un año y son mejores. Hay quienes luchan muchos años y son muy buenos. Pero hay los que luchan toda la vida: esos son los imprescindibles."

Bertolt Brecht

A la memoria de mi abuelo José Chávez
A mis padres y hermanas
A mi esposa Mariel
A mi hijo Yoel

ÍNDICE

	Página
Reconocimientos	I
Agradecimientos	III
Dedicatoria	V
Índice	VII
Lista de figuras	XI
Lista de cuadros	XIII
Lista de abreviaturas	XV
Resumen	XVII
Abstract	XIX
Introducción	1
Capítulo 1. Antecedentes	3
1.1. Protozoarios patógenos al ser humano	3
1.2. El género <i>Giardia</i>	4
1.3. <i>Giardia lamblia</i>	4
1.3.1. Biología celular	6
1.3.1.1. Trofozoito	6
1.3.1.2. Quiste	7
1.3.1.3. Desenquistamiento y enquistamiento.	7
1.4. Giardiasis	8
1.4.1. Epidemiología de la giardiasis	8
1.5. Tratamiento de la giardiasis	11
1.6. La medicina tradicional y los productos naturales	16
1.6.1. Productos naturales de origen vegetal con importancia biológica	17
1.7. Extractos vegetales con actividad contra <i>Giardia lamblia</i>	18
1.8. Productos naturales con actividad contra <i>Giardia lamblia</i>	21
1.9. Estudio previo de plantas de la península de Yucatán con actividad contra <i>Giardia lamblia</i>	27
1.10. <i>Cupania dentata</i> D.C.	27
1.10.1. Clasificación taxonómica de <i>Cupania dentata</i>	27
1.10.2. Descripción botánica de <i>Cupania dentata</i>	28
1.10.3. Estudios previos del género <i>Cupania</i>	29
1.11. Géneros taxonómicamente relacionados al género <i>Cupania</i> .	29
1.11.1. Género <i>Blighia</i>	30
1.11.2. Género <i>Guioa</i>	30
1.12. Importancia del estudio	33
1.13. Objetivos	35
1.13.1. Objetivo general	35

1.13.2. Objetivos particulares	35
1.14. Estrategia experimental	37
1.15. Referencias	38
Capítulo 2. Parte experimental	47
2.1. Procedimientos generales	47
2.2. Evaluación <i>in vitro</i> contra los trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	48
2.3. Bioensayo de citotoxicidad	50
2.3.1. Cultivo celular	50
2.3.2. Bioensayo con MTT: Citotoxicidad	51
2.4. Extracción metanólica de la corteza de <i>Cupania dentata</i>	51
2.5. Partición líquido-líquido	51
2.6. Compuestos aislados de la fracción hexánica de <i>Cupania dentata</i>	52
2.6.1. Aislamiento del compuesto I (taraxerona, CDC-6B1)	54
2.6.2. Aislamiento del compuesto II (taraxerol, CDC-6B2)	54
2.6.3. Aislamiento de la mezcla A (estigmasterol - β -sitosterol, 2:1; CDC-6E1)	55
2.7. Compuestos aislados de la fracción de diclorometano	55
2.7.1. Obtención del compuesto III (CDC-23D1)	55
2.7.2. Obtención del compuesto IV (CDC-24J1)	56
2.7.3. Aislamiento del compuesto V (escopoletina, CDC-27E1)	56
2.7.4. Obtención del compuesto VI (CDC-36E1)	57
2.8. Compuestos aislados de la fracción de acetato de etilo	57
2.8.1. Obtención del compuesto VII (CDC-17B1)	57
2.8.2. Obtención del compuesto VIII (CDC-17C1)	58
2.9. Aislamiento de los compuestos presentes en la fracción butanólica	58
2.9.1. Aislamiento de la mezcla B (glucósido de estigmasterol - glucósido de β -sitosterol, CDC-45D1)	58
2.10. Síntesis del derivado acetilado de taraxerol (Compuesto IX)	59
2.11. Referencias	59
Capítulo 3. Resultados y discusión	61
3.1. Evaluación biológica del extracto crudo y de polaridades ascendentes de <i>C. dentata</i>	61
3.2. Determinación estructural de los compuestos aislados de <i>Cupania dentata</i>	62
3.2.1. Aislamiento de los compuestos de la fracción hexánica	62

3.2.1.1. Aislamiento e identificación de taraxerona (Compuesto I, CDC-6B1)	62
3.2.1.2 Aislamiento e identificación de taraxerol (Compuesto II, CDC-6B2)	68
3.2.1.3. Aislamiento e identificación de la mezcla A (estigmasterol - β -sitosterol, CDC-6E1)	72
3.2.2. Aislamiento de los compuestos de la fracción de diclorometano	73
3.2.2.1. Obtención del compuesto III (CDC-23D1)	73
3.2.2.2. Obtención del compuesto IV (CDC-24J1)	74
3.2.2.3. Aislamiento e identificación de escopoletina (compuesto V, CDC-27E1)	74
3.2.2.4. Obtención del compuesto VI (CDC-36E1)	78
3.2.3. Aislamiento de los compuestos de la fracción de acetato de etilo	78
3.2.4. Aislamiento de los compuestos presentes en la fracción butanólica	78
3.2.4.1. Aislamiento e identificación de la mezcla B (glucósido de estigmasterol – glucósido de β -sitosterol, CDC-45D1)	78
3.3. Obtención del derivado acetilado de taraxerol (Compuesto IX)	82
3.4. Evaluación biológica contra los trofozoítos de <i>G. lamblia</i>	84
3.5. Referencias	87
Capítulo 4. Conclusiones generales y perspectivas	91
4.1. Conclusiones generales	91
4.2. Perspectivas	92
4.3. Referencia	92
Anexos	93
Anexo 1. Composición del medio TYI-S-33	93
Anexo 2. Antigiardial activity of <i>Cupania dentata</i> bark and its constituents	95

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1.	Microscopía electrónica del parásito protozooario <i>Giardia lamblia</i> .	6
Figura 1.2.	Esquema de la morfología de <i>G. lamblia</i> .	7
Figura 1.3.	Prevalencia seroepidemiológica de giardiasis en México de acuerdo al desarrollo económico de las diferentes regiones, siendo A) Estados con desarrollo alto. B) Estados con desarrollo medio-alto. C) Estados con desarrollo medio-bajo. D) Estados con desarrollo bajo.	10
Figura 1.4.	Fármacos empleados para el tratamiento de la giardiasis.	14
Figura 1.5.	Metabolitos secundarios con actividad <i>in vitro</i> contra <i>G. lamblia</i> .	22
Figura 1.6.	Corteza y hojas de <i>Cupania dentata</i> .	28
Figura 1.7.	Metabolitos secundarios aislados de especies vegetales del género <i>Cupania</i> : Cupaniósido (20), <i>C. glabra</i> ; cupaniol (21), <i>C. latifolia</i> ; vernanolido (22), <i>C. vernalis</i> .	29
Figura 1.8.	Estructura de la hipoglicina A (23) aislada de <i>B. sapida</i> .	30
Figura 1.9.	Metabolitos secundarios aislados de especies del género <i>Guioa</i> : Crenulatósidos A (24), B (25), C (26) y D (27), <i>G. crenulata</i> ; crenulatósidos E (28), F (29) y G (30), <i>G. villosa</i> ; proantocianidina (31), betulina (32), lupeol (33) y soycerebrósido (34), <i>G. villosa</i> .	31
Figura 1.10.	Esquema de la estrategia experimental desarrollada.	37
Figura 2.1.	Esquema de desarrollo del bioensayo de inhibición de crecimiento contra los trofozoitos de <i>G. lamblia</i> .	49
Figura 2.2.	Esquema de fraccionamiento de la partición líquido-líquido del extracto metanólico de <i>C. dentata</i> .	52
Figura 3.1.	Metabolitos con esqueleto de tipo taraxerano.	63
Figura 3.2.	Espectro de RMN ¹ H de taraxerona.	64
Figura 3.3.	Espectro de RMN ¹³ C de taraxerona.	65
Figura 3.4.	Fragmentos observados en el espectro de masas de taraxerona.	66
Figura 3.5.	Espectro de RMN ¹ H de taraxerol.	68
Figura 3.6.	Espectro de RMN ¹³ C de taraxerol.	69
Figura 3.7.	Fragmentos observados en el espectro de masas de taraxerol.	71

Figura 3.8.	Esteroles componentes de la mezcla A .	72
Figura 3.9.	Espectro de RMN ^1H de escopoletina.	75
Figura 3.10.	Espectro de RMN ^{13}C de escopoletina.	76
Figura 3.11.	Espectro de RMN ^{13}C de la mezcla B .	79
Figura 3.12.	Espectro de RMN ^{13}C del derivado acetilado de taraxerol.	82

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.1. Especies reconocidas del género <i>Giardia</i> en el período 1952-2007.	5
Cuadro 1.2. Morbilidad correspondiente a giardiasis en el estado de Yucatán durante los años 2001-2010 (Servicios de Salud de Yucatán).	11
Cuadro 1.3. Fármacos empleados en el tratamiento de la giardiasis.	12
Cuadro 1.4. Ejemplos de plantas medicinales con actividad anti-giardiasis.	19
Cuadro 1.5. Productos naturales evaluados <i>in vitro</i> contra <i>Giardia lamblia</i> con valores $\leq 15 \mu\text{g/mL}$, clasificados de acuerdo a la familia y especie vegetal de la que se aislaron.	24
Cuadro 1.6. Especies vegetales evaluadas contra los trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	27
Cuadro 2.1. Sistemas de elución de la CLV de la fracción hexánica.	53
Cuadro 2.2. Separación cromatográfica de la fracción diclorometánica.	55
Cuadro 3.1. Resultados de actividad frente al bioensayo de inhibición de crecimiento contra los trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	61
Cuadro 3.2. Evaluación de citotoxicidad contra la línea celular MDCK.	61
Cuadro 3.3. Comparación del compuesto I con los datos reportados en la literatura de taraxerona.	64
Cuadro 3.4. Comparación del compuesto II con los datos de taraxerol reportados en la literatura.	70
Cuadro 3.5. Comparación de los desplazamientos del compuesto V con los reportados para escopoletina.	74
Cuadro 3.6. Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos de la mezcla B con los de los glucósidos de estigmasterol y β -sitosterol. Las señales se obtuvieron en piridina- d_5 .	80
Cuadro 3.7. Actividad biológica de fracciones y compuestos puros de <i>C. dentata</i> .	83
Cuadro 3.8. Índices de efectividad de los compuestos y fracciones de <i>C. dentata</i> .	84

Cuadro A.1. Componentes necesarios para la elaboración del medio TYI-S-33.

93

LISTA DE ABREVIATURAS

Δ^{14}	Doble enlace en la posición 14
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
An	Acetona
BuOH	Butanol
°C	Grados Celsius
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCEM	Columna cromatográfica de exclusión molecular
CCF	Columna cromatográfica flash
CCG	Columna cromatográfica por gravedad
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDC	<i>Cupania dentata</i> corteza
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CEM	Columna de exclusión molecular
CG	Cromatografía de gases
CG-EM	Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrofotómetro de masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de la población
Cl ₉₀	Concentración inhibitoria del 90% de la población
CLV	Cromatografía líquida al vacío
D.C.	De Candolle
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
DL ₅₀	Dosis letal del 50% de la población
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Doble de triples
EMS	Espectrometría de masa secuencial
EPA	Environmental Protection Agency
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros)
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
G6PDH	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
Hx	Hexano
Hz	Hertz

J	Constante de acoplamiento
KDa	KiloDalton
Kg	Kilogramo
Km	Kilómetro
L	Litro
m	Metro
m/z (rel. int.)	Relación masa-carga (intensidad relativa)
MAO	Monoamino oxidasa
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
$[\text{M}]^+$	Ión molecular
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
Mg_2SO_4	Sulfato de magnesio
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
MT	Medicina Tradicional
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Nicotinamina adenina dinucleótido
NaOH	Hidróxido de sodio
NAPRALERT	Natural Products Alert Database
nm	nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.f.	Punto de fusión
<i>P1 strain</i>	Cepa Portland-1
PFOR	Piruvato ferredoxin oxidorreductasa
pH	Potencial de hidrógeno
piridina- d_5	Piridina deuterada
PMS	Phenazine methosulfate
POR	Piruvato oxidorreductasa
ppm	Partes por millón
R_f	Factor de retención
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear protónica
s	Singlete
TMS	Tetrametilsilano
T_R	Tiempo de retención
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Cupania dentata (*xkanka*, en lengua maya) es empleada en la medicina tradicional maya para el tratamiento de enfermedades diarreicas. El extracto metanólico de *C. dentata* posee actividad inhibitoria contra los trofozoítos de *Giardia lamblia*, y durante el presente trabajo se confirmó esta actividad con una $CI_{50} = 8.17 \mu\text{g/mL}$. No se conocen otros reportes acerca de esta especie, siendo éste el primer estudio fitoquímico y biológico de sus componentes evaluados contra este protozoario. Del extracto metanólico de *C. dentata* se logró el aislamiento de los metabolitos taraxerona (I), taraxerol (II), escopoletina (V), la mezcla de los esteroides estigmasterol y β -sitosterol (mezcla A), así como la de los glucósidos de estos mismos esteroides (mezcla B). La taraxerona fue el metabolito puro más activo con una $CI_{50} = 11.33 \mu\text{g/mL}$, teniendo el resto de los metabolitos actividad moderada, mientras que la mezcla A presentó la mayor inhibición de los trofozoítos de *G. lamblia* con una $CI_{50} = 5.23 \mu\text{g/mL}$. Del extracto hexánico se obtuvieron subfracciones muy activas, como ejemplo, CDC-8F que posee una $CI_{50} = 3.51 \mu\text{g/mL}$ y $CI_{90} = 13.49 \mu\text{g/mL}$. Sin embargo, éstas contenían mezclas complejas y un bajo rendimiento, por lo que no pudieron ser aislados sus compuestos. Los resultados sugieren que *C. dentata* posee varios compuestos con actividad anti-giardiasica, ya que se observa actividad en los diferentes extractos (hexano, diclorometano, acetato de etilo, butanol), siendo el conjunto de los compuestos de todos ellos los que confieren la actividad observada en el extracto metanólico.

ABSTRACT

Cupania dentata (*xkanka*, maya language) is used in the Mayan traditional medicine for the treatment of diarrheal diseases. The methanolic extract of *C. dentata* displays growth inhibitory activity against the *Giardia lamblia* trophozoites. This activity was confirmed in the present study, showing an $IC_{50} = 8.17 \mu\text{g/mL}$. Until now, no previous phytochemical reports on this plant were found, being the present work the first study on the phytochemical aspects and the biological activity of its compounds against *G. lamblia*. From the methanol extract of *C. dentata* the metabolites taraxerone (**I**), taraxerol (**II**), and scopoletin (**V**) were isolated, along with the mixture of the sterols stigmasterol and β -sitosterol (mixture **A**), as well as that of the glucosides of the same sterols (mixture **B**). The triterpene taraxerone was the more active metabolite, with an $IC_{50} = 11.33 \mu\text{g/mL}$, showing the other metabolites moderate activity. The mixture **A** showed a greater inhibitory effect against *G. lamblia* trophozoites, with an $IC_{50} = 5.23 \mu\text{g/mL}$. The hexane extract was the most active, as well as its subsequent fractions, such as CDC-8F with an $IC_{50} = 3.51 \mu\text{g/mL}$ and $IC_{90} = 13.49 \mu\text{g/mL}$; nevertheless, these fractions were obtained with low yield and contained complex mixtures, the reason why their metabolites could not be isolated. The results obtained in this work suggest that *C. dentata* contains several metabolites with anti-giardial activity, since this was observed in the different extracts (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol), being the compounds present in all of them those that confer the observed activity in the methanolic extract.

INTRODUCCIÓN

El ser humano ha estado ligado a las plantas, empleándolas para diversos fines, como la alimentación, vestido, construcción y salud. Existen evidencias sobre el uso de plantas con fines medicinales que datan de hace 60,000 años. También hay registros de la farmacopea del emperador Shen Nung de China, alrededor de los años 3000-2730 A.C., la cual describe el uso de plantas medicinales como el opio; la farmacopea Egipcia de Ebers Papyrus escrita alrededor de 1500 A.C., que documenta el uso de extractos de plantas; la obra "*De Materia Medica*" escrita por el médico, farmacólogo y botánico griego Dioscórides, que documenta plantas usadas en la actualidad como *Papaver somniferum*, *Mentha piperita*, *Artemisia vulgaris*, entre otras (Gossell-Williams *et al.*, 2006).

En la actualidad, existen drogas de origen natural, las cuales han sido obtenidas de plantas, animales y microorganismos; sin embargo, los productos naturales con más amplio espectro de aplicaciones terapéuticas se han aislado del reino vegetal (Nolan & Labbe, 2004).

Los productos naturales o principios activos poseen una amplia variedad de esqueletos carbonados, todos ellos pudiendo estar sustituidos por otra gran diversidad de grupos funcionales, lo que repercute en la gran cantidad de aplicaciones que poseen. Sólo en la industria farmacéutica, y durante el período 1981-2006, el 5% de las drogas nuevas fueron elaboradas a partir de productos naturales, el 23% obtenidas de derivados de productos naturales, 4% fueron sintéticas basadas en productos naturales y alrededor de un 20% de productos sintéticos que de alguna u otra forma se relacionan con algún producto natural o lo imitan. De lo anterior, se infiere que alrededor del 48% de las nuevas drogas son productos naturales o se encuentran relacionadas con ellos (Newman & Cragg, 2007).

Como un ejemplo de la importancia de los productos naturales podemos decir que, dentro de los veinte fármacos no proteicos más vendidos en 1999, se encuentran nueve derivados de productos naturales, o desarrollados como resultado de líderes generados de un producto natural (simvastatina, lovastatina, enalapril, pravastatina, atorvastatina, augmentina, ciprofloxacina, clarithromycina y ciclosporina), los cuales en conjunto generaron una venta anual mayor a \$16 mil millones de dólares (Harvey, 2000).

Aunque los protozoarios son el mayor grupo de parásitos que afecta a los seres humanos y animales domésticos alrededor del mundo, existe un

número limitado de drogas para su terapia o profilaxis de enfermedades causadas por protozoarios, además de que no existen vacunas. Los protozoarios conforman un grupo diverso que muestra una enorme variación en morfología, ciclo de vida, genoma y bioquímica (Croft & Sutherland, 2002).

El presente trabajo pretende realizar una aportación al estudio de uno de estos padecimientos, la giardiasis, causada por el protozoario *Giardia lamblia*, mediante la búsqueda de metabolitos que posean actividad en su contra. Para esto se ha seleccionado para su estudio a *Cupania dentata* D.C., cuyo extracto metanólico de la corteza mostró ser activo en el bioensayo de inhibición de crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* (Peraza-Sánchez et al., 2005), pero de cuya especie se desconocen el o los metabolitos responsables de dicha actividad biológica.

REFERENCIAS

- Croft, S. L. and C. Sutherland (2002). "Antiprotozoal Drugs", in *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd., Londres, pp. 1-9.
- Gossell-Williams, O. R. Simon and M. E. West (2006). *The past and present use of plants for medicines*. West Indian Medicinal Journal, 55(4), 217-218.
- Harvey, Alan (2000). *Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products*. Drugs Discovery Today, 5(7), 294-300.
- Newman, D. J. and G. M. Cragg (2007). *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. Journal of Natural Products, 70(3), 461-477.
- Nolan, L. L. and R. G. Labbe, Ronald (2004). *Future of natural products from plants in the struggle with emerging diseases: case of food-borne pathogens and leishmaniasis*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 11(1/2), 161-190.
- Peraza-Sánchez, S. R., S., Poot-Kantún, L. W. Torres-Tapia, F. May-Pat, P. Simá-Polanco and R. Cedillo-Rivera (2005). *Screening of native plants from Yucatán for anti-Giardia lamblia activity*. Pharmaceutical Biology, 43(7), 594-598.

Capítulo 1

Antecedentes

A lo largo de su historia, el ser humano ha incrementado sus requerimientos de alimentación, vivienda, y agua potable, entre otros. Para satisfacer esas demandas, cada vez con mayor frecuencia invade zonas inexploradas exponiéndose a nuevos patógenos. Paralelamente, otros patógenos que se consideraban controlados han resurgido ante la falta de medidas de higiene, tanto en los países desarrollados como subdesarrollados, facilitándose su propagación gracias a los medios de transporte actuales.

1.1. PROTOZOARIOS PATÓGENOS AL SER HUMANO

Entre estos patógenos encontramos a los parásitos protozoarios, los cuales son los agentes causales de un gran número de padecimientos en el hombre, como la malaria, causada por *Plasmodium* spp.; la leishmaniasis en sus diferentes formas, debida a los protozoarios del género *Leishmania* spp; la llamada enfermedad del sueño, ocasionada por *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*; la enfermedad de Chagas (en Sudamérica), causada por *Trypanosoma cruzi*; la disentería amibiana, producida por *Entamoeba histolytica*; y la toxoplasmosis, ocasionada por *Toxoplasma gondii*. Estas enfermedades afectan, en conjunto, aproximadamente a un 25% de la población mundial. Adicionalmente, las enfermedades parasitarias causadas por los protozoarios *Trichomonas vaginalis*, que ocasiona vaginitis o uretritis, y *Giardia lamblia*, que produce diarrea, son consideradas como las más ampliamente distribuidas alrededor del mundo, reflejándose su importancia en algunas pérdidas de vidas, pero sobre todo en un descenso en la productividad de personas y animales tanto domésticos como de trabajo (Borst & Ouellette, 1995).

La Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (EPA, por sus siglas en inglés) clasifica al protozoario *Giardia lamblia* como el agente causal predominante de las enfermedades infecciosas relacionadas con el agua (Marshall *et al.*, 1997), con una afectación cercana al 20% de la población en países en desarrollo y hasta en un 5% en países desarrollados, estimándose que la incidencia anual en los Estados Unidos de América es de entre 100,000 y 2.5 millones de casos (Ford, 2005).

1.2. EL GÉNERO *Giardia*

Los protozoarios del género *Giardia* poseen un ciclo de vida simple, que implica una rápida multiplicación de su forma no invasiva (trofozoitos) en la mucosa del intestino delgado y la producción de quistes resistentes a las condiciones ambientales, los cuales son excretados en las heces, para ser transmitidos de forma directa o indirecta a otro hospedero (Monis *et al.*, 2009). Durante mucho tiempo se consideró que los trofozoitos de *Giardia* se reproducían únicamente de manera asexual, por fisión binaria, pero en los últimos años se han incrementado las evidencias a partir de estudios epidemiológicos y de genética molecular sobre la capacidad de este protozoario de reproducirse sexualmente. Sin embargo, se desconoce la frecuencia de estas recombinaciones, así como su impacto en la epidemiología de la giardiasis y de la diversidad genética de las especies que infectan a los mamíferos (Birky, 2005; Logsdon, 2008).

En la actualidad, existen sólo unas cuantas especies reconocidas de este género, clasificadas principalmente por el tipo de hospedero al que parasitan, el fenotipo del trofozoito, así como sus dimensiones (Cuadro 1.1) (Thompson, 2004).

1.3. *Giardia lamblia*

El protozoario *G. lamblia* (Figura 1.1) posee las sinonimias *G. duodenalis* y *G. intestinalis*. Sin embargo, en la gran mayoría de la literatura médico-científica no se le refiere con ninguna de estas dos (Gardner & Hill, 2001).

Este protozoario fue descrito originalmente por Van Leeuwenhoek en 1681, pero fue hasta 1859 que Lambl lo describió a gran detalle; en 1882 y 1883 Kunstler describió un organismo en un renacuajo al que llamó *Giardia*, siendo esta la primera ocasión en la que el nombre de *Giardia* se empleaba como género. Finalmente en 1915 Kofoid y Christiansen propusieron el nombre de *Giardia lamblia*, el cual no fue ampliamente aceptado sino hasta la década de los 70's (Rodney, 2001).

Cuadro 1.1. Especies reconocidas del género *Giardia* en el período 1952-2007 (Monis *et al.*,

Espece	Hospedero	Características morfológicas	Tamaño de los trofozoítos: Largo/ancho (μm)
<i>G. lamblia</i>	Un amplio rango de mamíferos domésticos y silvestres, humanos	Trofozoítos en forma de pera y su cuerpo medio en forma curva	12-15/6-8
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Trofozoítos alargados y delgados, con un cuerpo medio en forma de basto	20-30/4-5
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoítos redondeados con un cuerpo medio redondo	9-12/5-7
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoítos redondeados con una prominente muesca en su disco ventral y flagelos rudimentarios	~10/~6.5
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoítos en forma de pera, sin borde ventro-lateral. Cuerpo medio en forma curva	~14/~6
<i>G. microti</i>	Roedores	Trofozoítos similares a <i>G. lamblia</i> . Quistes maduros con trofozoítos completamente diferenciados	12-15/6-8

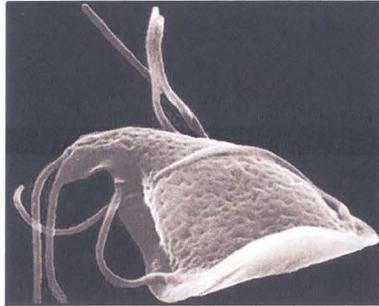


Figura 1.1. Microscopía electrónica del parásito protozoario *Giardia lamblia*. •Dr. Stanley L. Erlandsen.

1.3.1. Biología celular de *Giardia lamblia*

El ciclo de vida de *G. lamblia* consiste en una fase infectiva conocida como quiste y una fase vegetativa llamada trofozoíto. El quiste es relativamente resistente a la desecación ambiental, así como al ácido gástrico del estómago del hospedero. El desenquistamiento se da en el intestino delgado, dando origen a dos trofozoítos. Los trofozoítos se dividen por fisión binaria y son los responsables de la sintomatología de la enfermedad conocida como giardiasis. Algunos de estos trofozoítos son inducidos a enquistarse y expulsados al exterior, en donde el ciclo se completa al ser ingeridos por otro hospedero (Rodney, 1991)

1.3.1.1. Trofozoíto

El trofozoíto tiene una forma de pera, mide entre 10 y 12 μm de largo y de 5 a 7 μm de ancho. Posee un citoesqueleto conformado por el cuerpo medio, un disco ventral y cuatro pares de flagelos (Figuras 1.1 y 1.2). Dentro de los organelos se encuentran un par de núcleos y una vacuola lisosomal; también se ha reportado la presencia de gránulos ribosomales y de glucógeno en el citoplasma (Rodney, 1991; Croft *et al.*, 2002).

1.3.1.2. Quiste

El quiste es la forma infectiva y relativamente resistente a las condiciones ambientales externas, así como a los ácidos gástricos de los hospederos. Contiene cuatro núcleos, los quistes miden entre 5-8 μm , poseen forma ovalada y se encuentra rodeado con una pared de 0.38 μm de espesor, cuyo principal azúcar es la galactosamina en su forma de N-acetilgalactosamina, además de cuatro proteínas de 29, 75, 88 y 102 KDa. Solamente entre el 10 y 20% de los quistes logran su desenquistamiento para dar lugar a trofozoítos (Rodney, 2001).

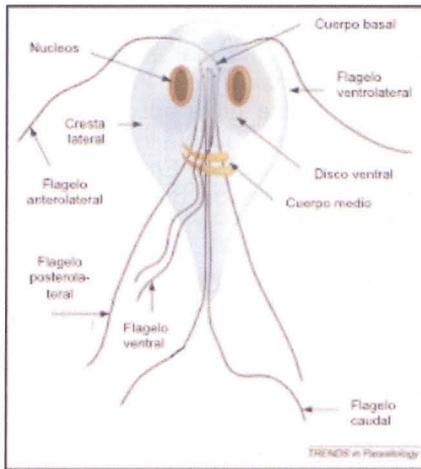


Figura 1.2. Esquema de la morfología de *G. lamblia* (Monis *et al.*, 2009).

1.3.1.3. Desenquistamiento y enquistamiento

El desenquistamiento de los trofozoítos se produce en los hospederos una vez que los quistes son expuestos al contenido del intestino delgado, después de pasar por el ambiente ácido del estómago. Una vez que los quistes se exponen a las condiciones de desenquistamiento, éste se lleva a cabo en un corto periodo, aproximadamente 10 min, en el caso de *G. lamblia* (Rodney, 2001).

Una vez que los trofozoítos se han duplicado y colonizado la superficie intestinal, algunos de ellos proceden a enquistarse después de atravesar

por el yeyuno, en donde se exponen a las secreciones biliares. Dentro de las condiciones específicas que promueven el enquistamiento se encuentra un pH alcalino de alrededor de 7.8 y la conjugación de las sales biliares con ácidos grasos (Rodney, 1991).

1.4. GIARDIASIS

1.4.1. Epidemiología de la giardiasis

La infección causada por este protozooario es usualmente asintomática en alrededor del 70% de los hospederos, pero puede llegar a ocasionar una serie de síntomas intestinales como diarrea crónica, esteatorrea, cólicos abdominales, sensación de distensión y expulsión frecuente de heces laxas, pálidas y grasosas; así como una mala absorción de grasas y vitaminas liposolubles. Por lo general, no se presenta invasión extraintestinal, pero en algunas ocasiones surge artritis reactiva. En la giardiasis grave se produce lesión de las células de las mucosas del duodeno y del yeyuno (Benenson, 1997).

En un estudio realizado por Díaz-Cinco *et al* (2002), quienes evaluaron el impacto de la dieta sobre la inducción de infección con quistes de *G. lamblia* en ratas, observaron que son necesarios seis quistes para establecer infección en dietas deficientes en nitrógeno (deficiencia proteica), y se establece una clara relación entre la deficiencia de proteína en la dieta y esta enfermedad. Más aún, el yeyuno y el íleon fueron las regiones del intestino delgado afectadas durante la infección. En estas regiones se absorben nutrimentos como glucosa, galactosa, fructosa, vitamina C, tiamina, riboflavina, piridoxina y ácido fólico; así como proteínas, vitaminas liposolubles, grasas y colesterol (Chandra-Ranjit, 1997). De este modo, el daño que este parásito ocasiona también disminuye, de manera indirecta la obtención de estos nutrientes.

Este padecimiento se encuentra ampliamente distribuido alrededor del mundo. Se estima que existen 280 millones de casos clínicos por año (Shant *et al.*, 2004). Tan sólo en Asia, África y Latinoamérica se estima que existen alrededor de 200 millones de personas con giardiasis sintomática y un aproximado de 500,000 casos nuevos reportados por año (Traub *et al.*, 2004).

En un estudio realizado en el Hospital Dos de Mayo (Lima, Perú), se recibieron muestras de 20,116 pacientes, encontrándose en 1,297 casos (6.44%) al parásito *G. lamblia*. En 1,240 de éstos *Giardia* se presentaba

asociada a otros enteropatógenos, mientras que otros 57 estaban infectados únicamente con *G. lamblia*. Estos últimos, presentaron anorexia (77.2%), diarrea (81.0%), dolor abdominal (75.4%), náuseas (52.6%), además de observarse en un estudio radiológico la deformación y engrosamiento de la válvulas conniventes (repliegues mucosos transversos del duodeno y del intestino delgado). De estos casos, la población predominante perteneció a un medio urbano-marginal (70.2%), urbano (21.0%) y rural (9.0%), resultando la época primaveral la de mayor incidencia de giardiasis (Elizalde *et al.*, 2002).

En México, las incidencias de giardiasis no son muy diferentes. Un ejemplo es un estudio realizado a niños de zonas de alta marginación en Chiapas, en donde se encontró una prevalencia de 18.2% de giardiasis. El estudio fue realizado a 1,478 niños (de entre 1 y 4 años) de 32 comunidades de la frontera chiapaneca, observándose que el 60% de los niños estaban multi-parasitados (Morales-Espinosa *et al.*, 2003).

Otro estudio realizado en comunidades indígenas y mestizas de la Sierra Nayarita mostró una prevalencia mayor en niños de entre 5-14 años, siendo la giardiasis la protozoosis intestinal de mayor prevalencia en este rango de edad con un 22.2% en las comunidades indígenas y un 14.0% para el grupo de personas mestizas (Guevara *et al.*, 2003).

Recientemente en México se realizó un estudio seroepidemiológico en el que se determinaron anticuerpos contra *G. lamblia*, observándose una sero-prevalencia de 55.3%. En este estudio se dividió el país en cuatro grandes regiones de acuerdo a su desarrollo económico (alto, medio alto, medio bajo y bajo). Sin embargo, los resultados no arrojaron una diferencia estadísticamente significativa entre la prevalencia de giardiasis y el nivel de desarrollo económico (Figura 1.3) (Cedillo-Rivera *et al.* 2009).

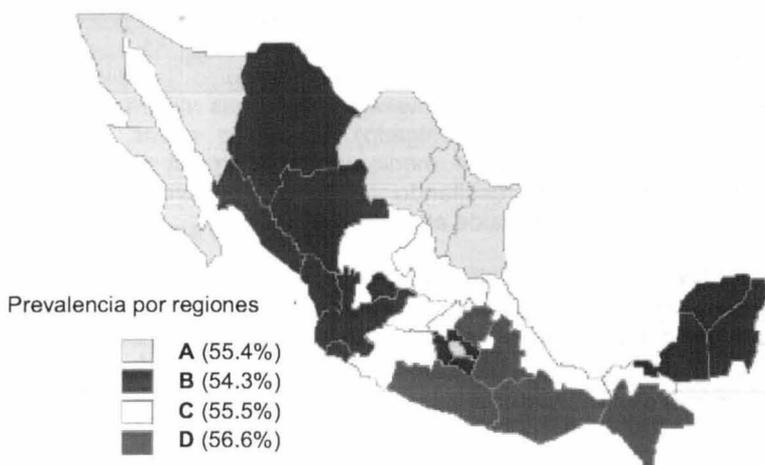


Figura 1.3. Prevalencia seroepidemiológica de giardiasis en México de acuerdo al desarrollo económico de las diferentes regiones, siendo **A)** Estados con desarrollo alto. **B)** Estados con desarrollo medio-alto. **C)** Estados con desarrollo medio-bajo. **D)** Estados con desarrollo bajo (Tomado de Cedillo-Rivera *et al.* 2009).

Del mismo modo que en el resto del país, el estado de Yucatán presenta una gran incidencia de esta parasitosis. La Secretaría de Salud del estado de Yucatán reportó que durante el período 2001-2010 se presentaron 24,048 casos de giardiasis (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Morbilidad correspondiente a la giardiasis en el estado de Yucatán durante los años 2001-2010 (Servicios de Salud de Yucatán).

Año	Casos	Tasa[†]
2001	3224	188.2
2002	3512	202.2
2003	3160	180.4
2004	2813	157.7
2005	2249	126.1
2006	2010	112.7
2007	1829	102.6
2008	2003	112.3
2009	1891	106.1
2010	1357	76.1

[†] Tasa por 100,000 habitantes.

1.5. TRATAMIENTO DE LA GIARDIASIS

En México, el medicamento más empleado para el tratamiento de la giardiasis es el metronidazol (1) (Cuadro 1.3 y Figura 1.4), el cual posee una vida media en suero de 7-8 h, a concentraciones de 70-100 μM usando las dosis recomendadas. Los efectos secundarios que ocasiona están el dolor de cabeza, sabor metálico y náuseas, entre otros; además la FDA no lo ha aceptado para el tratamiento de esta protozoosis (Gardner & Hill, 2001).

El metronidazol es por sí mismo inactivo, activándose mediante la acción de la enzima piruvato-ferredoxin oxidorreductasa (POR o PFOR), que lo reduce a su forma activa. El radical resultante interacciona con el ADN del parásito, ocasionándole la muerte. La resistencia al metronidazol se presenta cuando existe una baja regulación de POR, lo que ocasiona una disminución en la concentración de metronidazol reducido. La enzima POR es sustituida por la acción de otras tres oxidorreductasas que no poseen la capacidad de reducir al metronidazol (Samuelson 1999; Upcroft & Upcroft, 2001).

Otro nitroimidazol comúnmente empleado es el tinidazol (2) (Fasigyn[®]), el cual posee una vida media mayor que el metronidazol, por lo que es más favorable su uso en ciertas situaciones clínicas. Su mecanismo de acción es semejante al metronidazol (Sangster *et al.*, 2002) (Cuadro 1.3 y Figura 1.4).

Cuadro 1.3. Fármacos empleados en el tratamiento de la giardiasis (Gardner & Hill, 2001; Fox & Saravolatz, 2005).

Droga	Dosis en adultos	Dosis pediátrica	Efectos adversos
Metronidazol ^a (1)	250 mg (3 veces al día × 5-7 días)	5 mg/Kg (3 veces al día × 5-7 días)	Dolor de cabeza, vértigo, náusea, urticaria, sabor metalizado. Reacción similar al disulfiram con la ingestión de alcohol. Raro: pancreatitis, toxicidad del sistema nervioso central, neutropenia reversible, neuropatía periférica, disminución de la señal T con su uso prolongado. Mutagénico/Cancerígeno
Tinidazol ^b (2)	2 g, dosis única	50 mg/Kg, dosis única (máx, 2 g)	Como el metronidazol
Quinacrina ^c (3)	100 mg (3 veces al día × 5-7 días)	2 mg/Kg (3 veces al día × 7 días)	Náusea y vómito, vértigo y dolor de cabeza. Decoloración de la piel, amarilla/naranja y de las membranas mucosas Raro: psicosis tóxica
Ornidazol ^c (4)	2 g, dosis única	40-50 mg/Kg, dosis única (máx, 2 g)	Como el metronidazol
Furazolidona ^d (5)	100 mg (4 veces al día × 5-10 días)	2 mg/Kg (4 veces al día × 10 días)	Náusea, vómito y diarrea. Coloración marrón de la orina; reacción similar al disulfiram con la ingestión de alcohol. Reacciona desfavorablemente con los inhibidores MAO. Hemólisis suave en deficiencia de G6PDH. Cancerígeno

Paromomicina ^a (6)	500 mg (3 veces al día × 5-10 días)	30 mg/Kg/día (3 dosis × 5- 10 días)	Ototoxicidad y nefrotoxicidad en administración sistémica
Albendazol ^a (7)	400 mg (Una vez al día × 5 días)	15 mg/Kg/día 5-7 días (máx., 400 mg)	Anorexia, constipación. Raro: neutropenia reversible y una elevación en las funciones del hígado. Teratogénico
Nitazoxanida (8)	500 mg (dos veces al día × 3 días)	100 mg (dos veces al día × 3 días)	Dolor abdominal, diarrea y náuseas.
Bacitracina zinc ^e	120,000 U (2 veces al día × 10 días)	No evaluado en niños menores de 10 años	Náusea, vómito y malestar estomacal. Nefrotoxicidad con absorción sistémica

^a No se encuentra aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) para esta indicación.

^b No disponible en los Estados Unidos de América (EUA).

^c No ampliamente producido en EUA., probablemente obtenido de Farmacia Panorama, Panorama City, California.

^d Disponible en presentación líquida.

^e No es aceptada por la FDA para esta indicación.

La quinacrina (3) (Cuadro 1.3 y Figura 1.4) fue el primer anti-giardiasico efectivo en emplearse. Se introdujo en la década de los años 30's como antimalárico, y posteriormente se empleó para tratar la giardiasis hasta que fue desplazado por el metronidazol. En la actualidad su uso está restringido en países como Australia por sus efectos secundarios (ver Cuadro 1.3), los cuales van desde náuseas, vómitos y dolor de cabeza hasta decoloración de la piel y membranas mucosas y, en algunos casos raros, ocasiona psicosis tóxica (Upcroft & Upcroft, 2001; Gardner & Hill, 2001). Se ha sugerido que su modo de acción primario es mediante la unión con el ADN, interfiriendo con la lectura del mismo. Sin embargo, se ha podido observar mediante la fluorescencia natural de la quinacrina (3) que no tiene como blanco los núcleos de *Giardia*. Adicionalmente, se demostró que las cepas resistentes generan multi-resistencia a furazolidona (5) por inhibición de la NADH oxidasa que es la enzima que activa a la furazolidona (Upcroft & Upcroft, 2001; Gardner & Hill, 2001).

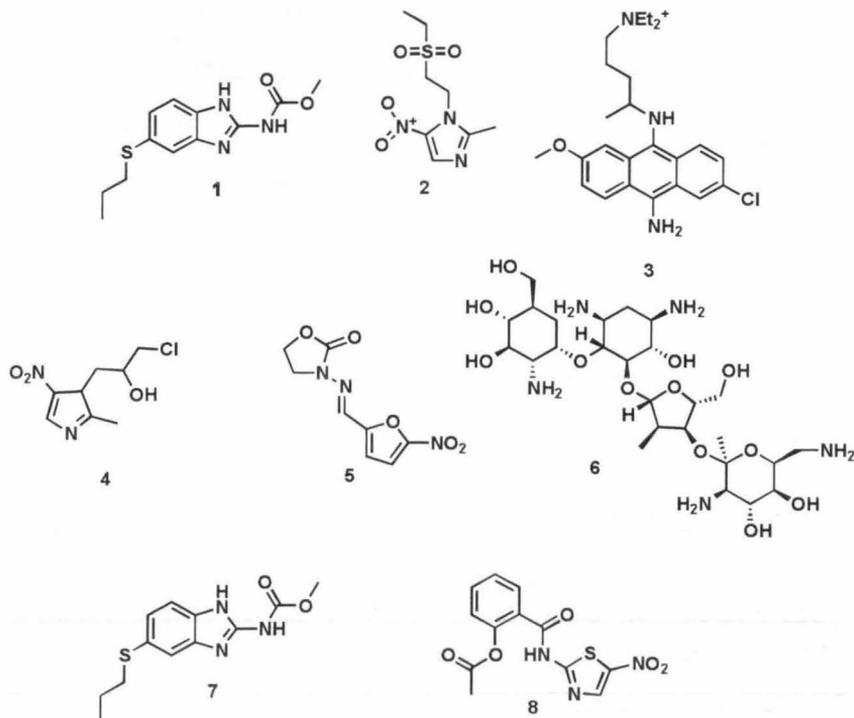


Figura 1.4. Fármacos empleados para el tratamiento de la giardiasis (Ver nomenclatura en Cuadro 1.3).

La furazolidona (5) (Cuadro 1.3 y Figura 1.4) es otra droga que se ha empleado contra esta protozoosis. Su modo de acción es semejante al del metronidazol, siendo necesaria la activación de la furazolidona por acción de la NADH oxidasa que lo reduce a su forma activa. Como se mencionó anteriormente, la multiresistencia a furazolidona y quinacrina es fácil de obtener *in vitro*, ya que la baja regulación de la NADH oxidasa facilita la resistencia a quinacrina y de igual modo esta baja expresión de la NADH oxidasa se da como resultado de la resistencia a quinacrina (Campanati & Monteiro-Leal, 2002; Upcroft & Upcroft, 2001)

El albendazol (7) (Cuadro 1.3 y Figura 1.4) es también un efectivo agente giardicida, pertenece al grupo de los bencimidazoles junto con el mebendazol. La toxicidad de ambos se debe en parte a interacciones con la

β -tubulina del citoesqueleto de *G. lamblia*, causando inhibición en la polimerización de los microtúbulos. Aunque todavía no se ha determinado el sitio exacto de interacción, se postula que sea el mismo sitio de unión a la colchicina (Gardner & Hill, 2001). Entre los efectos secundarios que presenta se encuentran trastornos gastrointestinales, vértigo, erupciones cutáneas y alopecia. Posterior a un uso prolongado, un 15% de los pacientes desarrolla aumentos reversibles de las transaminasas hepáticas en suero, siendo necesario el monitoreo o la interrupción del medicamento. Este bencimidazol es teratogénico en animales, por lo que su uso debe ser evitado durante el embarazo y lactancia. Sin embargo, se emplea cada vez más sin problemas en niños mayores (Venkatesan, 1998).

La nitazoxanida (**8**) (Cuadro 1.3 y Figura 1.4) ha sido empleada exitosamente en casos que presentan resistencia a otras drogas, como el metronidazol (Jiménez-Cardoso *et al.*, 2004). En un estudio *in vitro*, nitazoxanida mostró una $CI_{50} = 0.004 \mu\text{g/mL}$, la cual es menor con respecto al metronidazol ($CI_{50} = 0.210 \mu\text{g/mL}$) y al albendazol ($CI_{50} = 0.010 \mu\text{g/mL}$); de igual forma, la nitazoxanida mostró una mejor CI_{90} que el metronidazol; los datos anteriores demuestran el potencial terapéutico de este medicamento (Cedillo-Rivera *et al.*, 2002). En estudios realizados en México con este medicamento se observó una eliminación total de *G. lamblia* en cuatro aislados diferentes. Sin embargo, señalan como efecto secundario dolor abdominal en un porcentaje de 4% (Ponce-Macotela *et al.*, 2001). Por otro lado, en un estudio clínico en niños realizado por Díaz *et al.* (2003), fue necesario hasta un tercer tratamiento de nitazoxanida para obtener una reducción del 81% de *G. lamblia*.

A pesar de que existen varias drogas que pueden ser empleadas para el tratamiento de la giardiasis, en la actualidad se encuentra un gran número de reportes que mencionan la presencia de aislados clínicos con resistencia a estos medicamentos, sobretodo con metronidazol, por ser éste el medicamento de mayor empleo. Un ejemplo son los niveles de resistencia *in vitro* de hasta un 91% en Sudáfrica, además de que se ha establecido que comúnmente se presentan de un 10-12% de aislados con resistencia *in vitro* (Sangster *et al.*, 2002).

La resistencia a metronidazol y furazolidona ha sido reportada en niveles del 20%, llegando en ciertos países a un 90%. Además, se ha demostrado la existencia de resistencia cruzada entre metronidazol (**1**) y tinidazol (**2**) (Upcroft, 1998).

En conjunto, considerando los efectos secundarios adversos que presentan las drogas sintéticas para esta protozoosis, y sumando éstos a

los crecientes reportes que muestran elevadas incidencias de cepas resistentes en aislados clínicos, ha surgido un creciente interés por encontrar alternativas naturales para el tratamiento de esta y otras protozoosis (Harris *et al.*, 2001).

1.6. LA MEDICINA TRADICIONAL Y LOS PRODUCTOS NATURALES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la medicina tradicional (MT) como aquellas prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados en forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir enfermedades (OMS, 2002).

En términos generales, el uso de la MT está bastante extendido en países en desarrollo, tal es el caso de África, en donde hasta un 80% de la población utiliza la MT. En economías emergentes como China, la MT contabiliza alrededor de un 40% de la atención sanitaria; mientras que en países desarrollados se ha vuelto cada vez más popular, así, en Australia un 48% de la población emplea o ha empleado la MT, en Canadá un 70%, en EUA un 42%, en Bélgica un 38% y en Francia hasta un 75% (OMS, 2002).

El término “productos naturales” se refiere por lo general a los metabolitos secundarios, los cuales son moléculas pequeñas con un peso menor a 2,000 uma, que son producidas por organismos (bacterias, hongos, plantas y animales) y que no son estrictamente necesarias para la supervivencia de dicho organismo (Sarker *et al.*, 2006).

En la actualidad existe una creciente demanda de productos naturales en el mercado; sin embargo, los productos naturales como posibles fármacos han venido a la baja ante un creciente uso de químicos sintéticos. Tal ha sido el caso que un gran número de compañías farmacéuticas ha disminuido o eliminado su investigación en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de fuentes naturales, enfocándose en el desarrollo de bibliotecas de compuestos como la fuente de moléculas líderes; sin embargo, algunas otras compañías siguen apostando por los productos naturales como fuente de los nuevos fármacos del futuro (Gullo & Hughes, 2005).

Durante el siglo pasado los productos naturales cedieron parte del terreno a las moléculas sintéticas, debido al reciente desarrollo de esta

área, ya que a principios de los años 1900's alrededor del 80% de los fármacos se obtenían de productos naturales, mientras que en la actualidad alrededor del 44% de los nuevos fármacos son productos naturales o derivados de estos (Newman & Cragg, 2007; McChesney *et al.*, 2007). Este avance de los sintéticos obedece principalmente al desarrollo de nuevas técnicas de evaluación *in vitro* que permiten el análisis de cientos o miles de compuestos en un corto periodo de tiempo y a cuestiones económicas, ya que se produce un gran número de moléculas en poco tiempo, pero con un muy bajo nivel de efectividad, por lo que es necesario decidir qué tan conveniente es sacrificar calidad por cantidad (Paterson & Anderson, 2005).

Pese a lo anterior, se puede decir que los productos naturales mantendrán su importancia por al menos cuatro razones (Walsh & Fischbach, 2010):

1. Los productos naturales continúan inspirando a los químicos analíticos y sintéticos.
2. Se mantienen como la mayor fuente de medicamentos para humanos.
3. Son líderes para encontrar importantes blancos biológicos.
4. Existen muchos metabolitos más por descubrir, junto con los obtenidos de la manipulación en la expresión de sus enzimas.

1.6.1. Productos naturales de origen vegetal con importancia biológica

Existe un gran número de ejemplos de la importancia biológica de los productos naturales. Un ejemplo es el paclitaxel (Taxol™), inicialmente aislado de la corteza de *Taxus brevifolia*; varias partes de esta planta y de otras especies de *Taxus* son empleadas por las tribus nativas de Norteamérica para tratar condiciones no cancerosas. Las hojas de *T. baccata* poseen un reporte de uso en la medicina tradicional indú para el tratamiento de cáncer. Actualmente, el paclitaxel se emplea para el tratamiento de varios tipos de cáncer como el de seno, ovario, pulmón y también ha demostrado su eficacia contra el sarcoma de Kaposi. De igual forma, resulta atractivo su empleo para tratar otros padecimientos como la esclerosis múltiple, la psoriasis y la artritis reumatoide (Cragg & Newman, 2008).

Por otro lado, la artemisinina fue aislada por primera vez en 1972 a partir de *Artemisia annua*. En China se emplea para tratar pacientes con malaria resistente a la cloroquina. Se ha reportado un extenso número de trabajos sobre la actividad antimalárica de la artemisinina, así como de

algunos de sus derivados sintéticos, determinándose a su grupo funcional endoperóxido como el responsable de su actividad; cabe resaltar que ninguno de los derivados sintéticos resultó ser tan activo como la artemisinina (Schwikkard & Heerden, 2002).

1.7. EXTRACTOS VEGETALES CON ACTIVIDAD CONTRA *Giardia lamblia*

De igual forma, se han buscado compuestos en plantas que son empleadas como antidiarreicas o antiparasitarias en la medicina tradicional, siendo éstas una alternativa en la obtención de moléculas activas contra la giardiasis (Ponce-Macotella *et al.*, 2006). Con base en estos conocimientos etnobotánicos, se ha llevado al cabo un estudio para la evaluación de los extractos clorofórmicos de extractos de plantas con actividad giardicida, incluyendo *Acalypha phleoides*, *Alpinia galanga*, *Geranium niveum*, *Piper betle*, *Piper chava* y *Zingiber zerumbet*; todos ellos fueron considerados activos al presentar valores de CI_{50} menores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Cuadro 1.4; Sawangjaroen *et al.*, 2005).

Cuadro 1.4. Ejemplos de plantas medicinales con actividad anti-giardíasis.

Nombre científico	Familia	Parte usada	CI ₅₀ µg/mL	Referencia
<i>Acalypha phleoides</i> Cav.	Euphorbiaceae	Planta entera (MeOH)	9.45	Calzada <i>et al.</i> , 1998
<i>Alpinia galanga</i> (L.) Willd.	Zingiberaceae	Rizoma (CHCl ₃)	37.33	Sawangjaroen <i>et al.</i> , 2005
<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) Kunth	Malpighiaceae	Hojas (MeOH)	15.55	Peraza-Sánchez <i>et al.</i> , 2005
<i>Cupania dentata</i> D.C.	Sapindaceae	Corteza (MeOH)	7.59	Peraza-Sánchez <i>et al.</i> , 2005
<i>Geranium niveum</i> S.	Geraniaceae	Raíz (MeOH)	20.64	Calzada <i>et al.</i> , 2001
<i>Hellianthella quinquenervis</i>	Asteraceae	Raíz (MeOH)	2.60	Calzada <i>et al.</i> , 1998
<i>Hovenia dulcis</i> Thunb.	Rhamnaceae	Hojas (MeOH)	23	Gadelha <i>et al.</i> , 2005
<i>Justicia spicigera</i> Schltld.	Acanthaceae	(CH ₂ Cl ₂) Hojas	12 ---- ^a	Ponce-Macotela <i>et al.</i> , 1994

Continuación...

<i>Lippia berlandieri</i> Schauer.	Verbenaceae	Hojas	---- ^a	Ponce-Macotela <i>et al.</i> , 1994
<i>Piper betle</i> L.	Piperaceae	Hoja (CHCl ₃)	51.57	Sawangjaroen <i>et al.</i> , 2005
<i>Piper chaba</i> Hunter.	Piperaceae	Fruto (CHCl ₃)	45.47	Sawangjaroen <i>et al.</i> , 2005
<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	Hojas	---- ^a	Ponce-Macotela <i>et al.</i> , 1994
<i>Rubus coriifolius</i> L.	Rosaceae	Parte aérea (CH ₂ Cl ₂ - MeOH) (Acuosa)	55.6 56.1	Alanís <i>et al.</i> , 2003
<i>Teloxys graveolens</i> (Willd.) W.A. Weber	Chenopodiaceae	Planta entera (MeOH)	8.13	Calzada <i>et al.</i> , 1998
<i>Tridax procumbens</i> L.	Asteraceae	Planta entera (MeOH)	6.34	Peraza-Sánchez <i>et al.</i> , 2005
<i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Roscoe ex Sm.	Zingiberaceae	Rizoma (CHCl ₃)	69.02	Sawangjaroen <i>et al.</i> , 2005

^a Especies vegetales reportadas como inhibición de crecimiento en el bioensayo con MTT, observándose como viabilidad de los trofozoítos.

La evaluación *in vitro* de la actividad anti-*Giardia* de los extractos de estas plantas es una manera de encontrar moléculas candidatas a convertirse en nuevos fármacos para el tratamiento de esta parasitosis. Para esto, algunos autores han establecido ciertos parámetros, considerando como activos a aquellos extractos con un valor de CI_{50} entre 20 y 100 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los extractos con valores de $CI_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ son considerados muy activos (Sawangjaroen *et al.*, 2005).

1.8. PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD CONTRA *Giardia lamblia*

Algunos ejemplos de estudios realizados con extractos de plantas con actividad anti $giardi$ ásica se reseñan en el Cuadro 1.4. Así también, ya se han podido identificar algunas moléculas que presentan una muy buena actividad anti $giardi$ ásica (Figura 1.5), como son las isoflavonas formononetina (**9**), con una $CI_{50} = 30 \text{ ng/mL}$; daidzeína (**10**) con una $CI_{50} = 3.75 \mu\text{g/mL}$; biochanina A (**11**), con una $CI_{50} = 3.50 \mu\text{g/mL}$; pseudodaptogenina (**12**), $CI_{50} = 0.56 \mu\text{g/mL}$; y la fujikinetina (**13**), $CI_{50} = 1.5 \mu\text{g/mL}$, todas ellas aisladas de la corteza de *Dalbergia frutescens* (Khan *et al.*, 2000).

Otro ejemplo de moléculas con actividad anti $giardi$ ásica es la alicina (**14**), con una $CI_{50} = 14 \mu\text{g/mL}$, la cual afecta la morfología celular del parásito (Harris *et al.*, 2001). Del extracto de *Conyza filagenoides* se logró el aislamiento de la isorhamnetina (**15**), que presentó una $CI_{50} = 15.3 \mu\text{g/mL}$ (Calzada *et al.*, 2001a).

El extracto metanólico de la parte aérea de *Teloxys graveolens*, también mostró ser activo, por lo que su estudio biodirigido condujo al aislamiento del melilotósido (**16**) como el compuesto más activo, con una $CI_{50} = 16.8 \mu\text{g/mL}$ (Calzada *et al.*, 2003).

De la parte aérea de *Helianthemum glomeratum* se han aislado algunos compuestos con moderada actividad como el tilirósido (**17**), siendo éste el más activo, con una $CI_{50} = 17.4 \mu\text{g/mL}$, mientras que la quercitrina (**18**) mostró una actividad selectiva contra *G. lamblia* con una $CI_{50} = 24.3 \mu\text{g/mL}$ (Calzada & Alanis, 2007). Otra especie estudiada ha sido *Zanthoxylum liebmannianum*, cuyo extracto etanólico de hojas presentó una actividad con una $CI_{50} = 58.0 \mu\text{g/mL}$ y del cual se logró el aislamiento de asarinina (**19**) como la molécula más activa con una $CI_{50} = 35.45 \mu\text{g/mL}$ contra los trofozoítos de *G. lamblia* (Arrieta *et al.*, 2001).

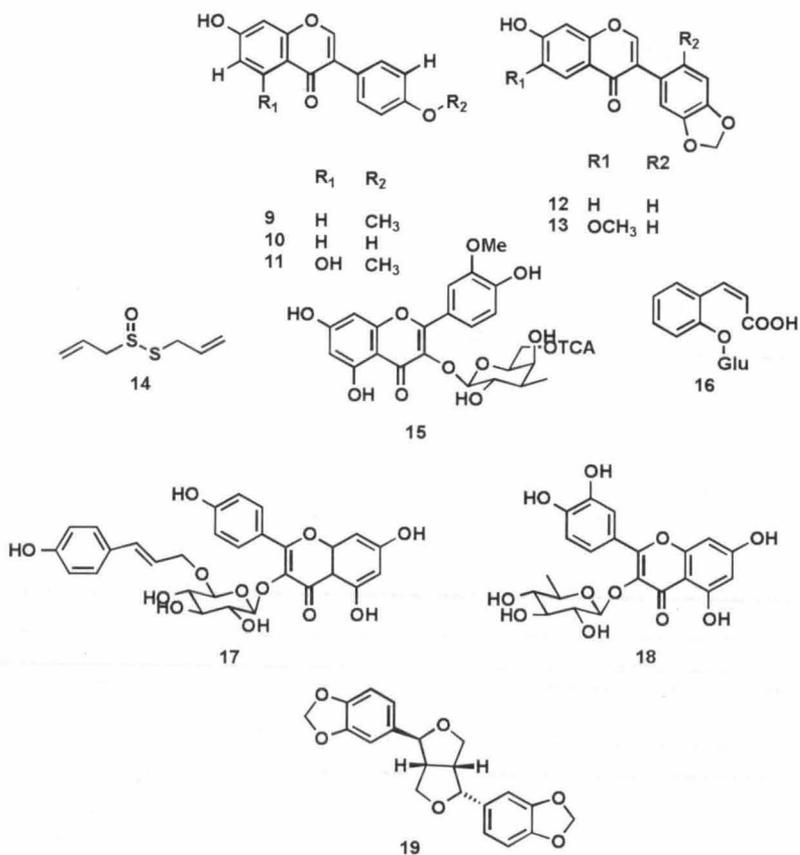


Figura 1.5. Metabolitos secundarios con actividad *in vitro* contra *G. lamblia*.

En una revisión publicada por Amaral *et al.* (2006) se identificaron 101 productos naturales a los que se les evaluó su actividad giardicida. De los compuestos activos aislados, fueron identificados: 40 flavonoides, principalmente flavanoles e isoflavonas; 28 triterpenos, siendo los quassinoides los más representativos; 18 alcaloides, especialmente alcaloides indólicos; además de cuatro sesquiterpenos, cuatro esteroides, tres ácidos fenólicos y ésteres, un lignano y una amina. De estas 101

moléculas, sólo un bajo porcentaje posee un valor de $Cl_{50} \leq 15 \mu\text{g/mL}$, las cuales se enlistan en el Cuadro 1.5.

Cuadro 1.5. Productos naturales evaluados *in vitro* contra *Giardia lamblia* con valores de $CI_{50} \leq 15$ $\mu\text{g/mL}$, clasificados de acuerdo a la familia y especie vegetal de la que se aislaron (Tomado de Amaral *et al.*, 2006).

Especie vegetal	Compuesto	Clase	CI_{50}	Referencia
ASTERACEAE				
Centipeda minima	Brevilina A	Sesquiterpén-lactona	5.57 $\mu\text{g/mL}$	Yu <i>et al.</i> , 1994
Conyza flaginoides	Isorhamnetina 3-O-(6"-O-E-caffeoyl)- β -D-galactopiranosido	Flavonoide	15.3 $\mu\text{g/mL}$	Calzada <i>et al.</i> , 2001a
Neurolaena oaxacana	Neurolenina B	Sesquiterpén-lactona	MIC: 3.8 μM	Passreiter <i>et al.</i> , 1999
	Neurolenina C + D	Sesquiterpén-lactona	MIC: 8.4 μM	Passreiter <i>et al.</i> , 1999
CISTACEAE				
<i>Helianthemum glomeratum</i>	(-)-Epigallocatequina	Flavonoide	8.06 $\mu\text{g/mL}$	Meckes <i>et al.</i> , 1999
	Kaempferol	Flavonoide	8.73 $\mu\text{g/mL}$	Calzada <i>et al.</i> , 1999
FABACEAE				
<i>Dalbergia frutescens</i>	Biochanina A	Flavonoide	3.50 $\mu\text{g/mL}$	Khan <i>et al.</i> , 2000

Cuadro 1.5. (Continuación)

Especie vegetal	Compuesto	Clase	CI₅₀	Referencia
	Castanina	Flavonoide	>5.0 µg/mL	Khan <i>et al.</i> , 2000
	Daidzeína	Flavonoide	3.75 µg/mL	Khan <i>et al.</i> , 2000
	Formononetina	Flavonoide	0.03 µg/mL	Khan <i>et al.</i> , 2000
	Fujikinetina	Flavonoide	1.5 µg/mL	Khan <i>et al.</i> , 2000
	Genisteína	Flavonoide	>5.0 µg/mL	Khan <i>et al.</i> , 2000
	Pseudobaptogenina	Flavonoide	0.56 µg/mL	Khan <i>et al.</i> , 2000
<i>Machaerium aristulatum</i>	7,3-Dihidroxi-4- metoxisoflavona	Flavona	1.9 µg/mL	El-Shoy <i>et al.</i> , 1999
GERANIACEAE				Calzada <i>et al.</i> , 1999
<i>Geranium niveum</i>	Geranina A	Flavonoide	2.4 µg/mL	
	Geranina B	Flavonoide	0.28 µg/mL	Calzada <i>et al.</i> , 1999

Cuadro 1.5. (Continuación)

Especie vegetal	Compuesto	Clase	IC ₅₀	Referencia
LOGANIACEAE				
<i>Strychnos usambarensis</i>	3',4'- Dihydroxiusambarensina	Alcaloide	5.14 µg/mL	Wright <i>et al.</i> , 1994
	Usambarensina	Alcaloide	3.89 µM	Wright <i>et al.</i> , 1994
<i>Strychnos variabilis</i>	Strychnopentamina	Alcaloide	7.30 µM	Wright <i>et al.</i> , 1994
ROSACEAE				
<i>Rubus coriifolius</i>	(-)-Epicatequina	Flavonoide	1.6 µg/mL	Alanís <i>et al.</i> , 2003
SIMAROUBACEAE				
<i>Brucea javanica</i>	Bruceatina	Triterpeno	1.20 µM	Wright <i>et al.</i> , 1993
	Bruceína A	Triterpeno	8.84 µM	Wright <i>et al.</i> , 1993

1.9. ESTUDIO PREVIO DE PLANTAS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN CON ACTIVIDAD CONTRA *Giardia lamblia*

En la península de Yucatán ya se han realizado estudios en la búsqueda de plantas activas contra *G. lamblia*, aprovechando el conocimiento en el uso popular de ciertas plantas para el tratamiento de enfermedades diarreicas. De esta forma, en la Unidad de Biotecnología del CICY previamente se realizó un escrutinio de plantas con actividad anti $giardiásica$, tomando como base los reportes existentes en la literatura, así como los conocimientos etnobotánicos de la región. En este estudio se evaluaron las especies enlistadas en el Cuadro 1.6 (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005).

Cuadro 1.6. Especies vegetales evaluadas contra los trofozoitos de *G. lamblia* (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005).

Especie vegetal	Parte usada	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Hojas	15.55
<i>Cupania dentata</i>	Corteza	7.59
<i>Diphysa carthagenensis</i>	Hojas	11.53
<i>Dorstenia contrajerva</i>	Planta entera	34.38
<i>Gliricidia sepium</i>	Hojas	62.66
<i>Justicia spicigera</i>	Parte aérea	117.41
<i>Pluchea odorata</i>	Parte aérea	59.81
<i>Spigelia anthelmia</i>	Planta entera	113.17
<i>Tridax procumbens</i>	Planta entera	6.34
<i>Triumfetta semitriloba</i>	Hojas	46.41
Metronidazol ^a		0.21

^a Medicamento empleado como control positivo (+).

Tomando como base este estudio, se realizó una preselección de tres especies (*Cupania dentata*, *Clusia flava* y *Triumfetta semitriloba*), reevaluando su actividad contra los trofozoitos de *G. lamblia*, para finalmente seleccionar el extracto metanólico de la corteza de *C. dentata* al mostrar una mejor actividad en el bioensayo de inhibición de crecimiento de los trofozoitos de *G. lamblia*.

1.10. *Cupania dentata* D.C.

1.10.1. Clasificación taxonómica de *Cupania dentata*

La planta *C. dentata* se conoce con los nombres comunes de "cola de pava" en Chiapas; "cuasal-cuáhuil", en Hidalgo; "cuasel" y "rabo de cojolí" y

"tzan", en lengua huasteca en el sureste de San Luis Potosí (Martínez, 1979); así como "canilla de venado" y "xkanka", en lengua maya. Entre sus usos populares se cita que una infusión de las hojas es tomada contra la disentería (Zamora-Martínez *et al.*, 1992). Está clasificada taxonómicamente de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Sapindaceae

Subfamilia: Sapindoideae

Tribu: Cupanieae

Género: *Cupania*

Especie: *Cupania dentata* D.C.

1.10.2. Descripción botánica de *Cupania dentata*

Cupania dentata D.C. (Figura 1.6), es un árbol perteneciente a la familia Sapindaceae y que crece hasta una altura aproximada de 30 m; posee hojas pinadas, compuestas, de 7-14 hojuelas dentadas, con pequeños hoyos en las axilas de las nervaduras; flores blancas pequeñas; fruto capsular con tres ángulos (Martínez, 1979). El género *Cupania* cuenta con alrededor de 138 especies.



Figura 1.6. Corteza y hojas de *Cupania dentata*.

1.10.3. Estudios previos del género *Cupania*

Una revisión de *C. dentata* en la base de datos NAPRALERT (Universidad de Illinois en Chicago, Chicago, IL., 2011) para obtener información etnobotánica, biológica y química, arrojó como resultado que no ha sido sometida a estudios químicos previos, sin embargo, existen reportes de otras especies del mismo género, como *C. glabra* de cuya corteza se aisló el compuesto conocido como cupaniósido (1-O-[2",3",4"-tri-O-acetil- α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]-hexadecanol) (**20**), obtenido a partir del extracto diclorometánico (Setzer *et al.*, 2005); de *C. latifolia* se aisló cupaniol (**21**), a partir del extracto metanólico de las hojas de esta especie (Sakane *et al.*, 2005); y del extracto metanólico de la corteza de *C. vernalis* se obtuvo el diterpeno glicosilado conocido como vernanólido (**22**) (Cavalcanti *et al.*, 2001) (Figura 1.7). En cuanto a lo que actividad biológica se refiere, el extracto hexánico de las hojas de *C. vernalis* posee una CI_{50} de entre 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ contra promastigotes de *Leishmania donovani* (Laundry de Mesquita *et al.*, 2005).

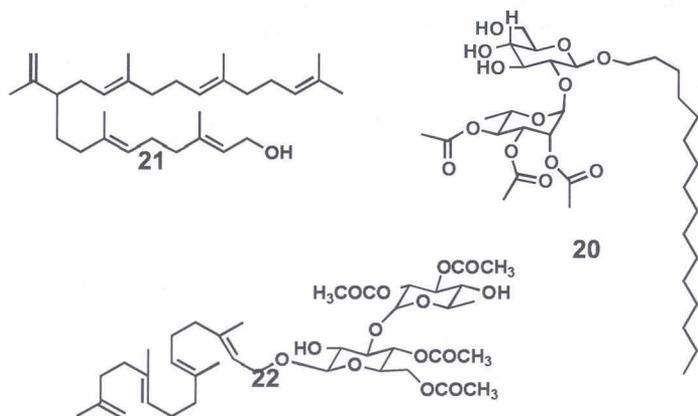


Figura 1.7. Metabolitos secundarios aislados de especies vegetales del género *Cupania*: cupaniósido (**20**), aislado de *C. glabra*; cupaniol (**21**), *C. latifolia*; vernanólido (**22**), *C. vernalis*.

1.11. GÉNEROS TAXONÓMICAMENTE RELACIONADOS AL GÉNERO *Cupania*

Debido a la poca información fitoquímica existente de la especie *C. dentata*, así como de su género, se llevó al cabo una búsqueda de los

géneros taxonómicamente relacionados al género *Cupania*. Con la colaboración del Dr. Rodrigo Duno, de la Unidad de Recursos Naturales del CICY, se determinó que los géneros relacionados pertenecientes a la Tribu *Cupanieae* son: *Blighia*, el cual posee tres especies; *Cupania*, con al menos 138 especies y subespecies; y *Guioa*, con un total de 15 especies.

1.11.1 Género *Blighia*

Una búsqueda en la base de datos NAPRALERT del género *Blighia*, que incluye información etnomédica, lista de compuestos y cualquier tipo de evaluación biológica, entre los años 1900-2011, arrojó un total de 38 citas, con 12 reportes etnomédicos, 36 pruebas biológicas realizadas y un total de 26 compuestos.

De las tres especies del género *Blighia*, la especie más estudiada es *B. sapida*, la cual está reportada con actividades hipoglucemiante y antioxidante, además de un alto valor nutricional de su fruto (Barbosa-Filho *et al.*, 2005; Einbond *et al.*, 2004). La hipoglicina A (**23**) (Figura 1.8) fue identificada como el compuesto responsable de la actividad hipoglucemiante, observándose un alto grado de toxicidad al causar hipoglucemia severa que muchas veces termina con la muerte del animal. En ratas se determinó una DL₅₀ de 98 y 97 mg/kg de peso, administrándose de manera oral o intraperitonealmente, respectivamente (Feng & Patrick, 1958).

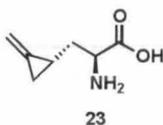


Figura 1.8. Estructura de la hipoglicina A (**23**) aislada de *B. sapida*.

1.11.2 Género *Guioa*

El otro género relacionado con *C. dentata* es el género *Guioa*, el cual cuenta con alrededor de 15 especies. Una búsqueda del género en la base de datos NAPRALERT durante el periodo de 1900 a 2008, arrojó un total de cuatro citas, sin ningún reporte etnomédico, 10 pruebas biológicas realizadas y únicamente dos compuestos reportados.

Sin embargo, los dos compuestos reportados no representan la totalidad de los compuestos aislados de las especies pertenecientes a este género, ya que en 2005 se reportó el aislamiento de cuatro farnesil diglicosilados, los crenulatósidos A (**24**), B (**25**), C (**26**) y D (**27**); así como tres flavonoles glicosilados ya conocidos y una proantocianidina trimérica ya conocida, todos ellos del extracto metanólico de las hojas de *G. crenulata* (Abdulmagid-Alabdul *et al.*, 2005).

De las hojas de *G. villosa* se ha reportado el aislamiento de siete farnesil diglicosilados, siendo los crenulatósidos E (**28**), F (**29**) y G (**30**), nuevos sesquiterpén diglicósidos acíclicos; así como cinco flavonoides, un trímero de proantocianidina (**31**), dos triterpenos [betulina (**32**) y lupeol (**33**)] y un cerebrósido [soyacerebrósido (**34**)] (Abdulmagid-Alabdul *et al.*, 2008) (Figura 1.9).

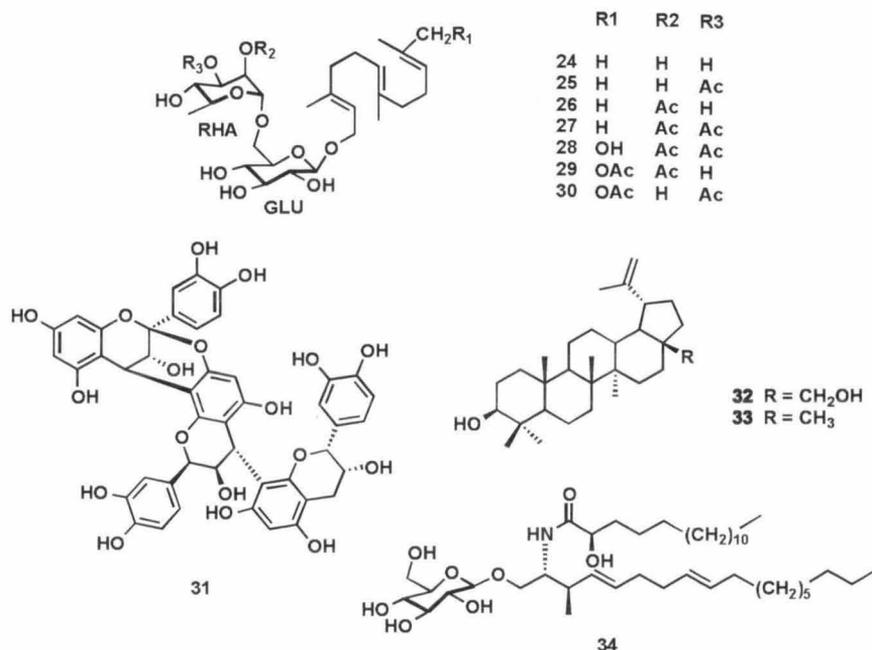


Figura 1.9. Metabolitos secundarios aislados de especies del género *Guioa*: crenulatósidos A (**24**), B (**25**), C (**26**) y D (**27**), *G. crenulata*; crenulatósidos E (**28**), F (**29**) y G (**30**), *G. villosa*; proantocianidina (**31**), betulina (**32**), lupeol (**33**) y soyacerebrósido (**34**), *G. villosa*.

1.12. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

La incidencia de la giardiasis observada en el Cuadro 1.2 no necesariamente refleja los datos reales, ya que aproximadamente el 70% de las personas infectadas son asintomáticas, es decir, que no presentan síntoma alguno pero que sí son transmisores potenciales del parásito. A esto, se añade que una gran parte de los afectados por esta parasitosis son niños, que en su mayoría son tratados tanto en consultas en clínicas públicas como por médicos particulares, y cuyo diagnóstico no se refleja en las estadísticas del sector salud del Estado.

Los medicamentos disponibles son muy agresivos para los infantes, siendo algunos de sus efectos secundarios la pérdida del cabello, náuseas, vómito o dolor abdominal, por lo que la búsqueda de nuevas fuentes de medicamentos es muy importante para el progreso en el tratamiento de esta parasitosis. Las plantas proveen una diversidad estructural de metabolitos cuyos modos de acción son muy amplios y en algunos casos menos agresivos con el paciente.

Adicionalmente, el estudio de la flora de la península enriquece el conocimiento etnobotánico que se tiene de la misma y provee una posible fuente de metabolitos activos contra el protozoario *G. lamblia*. Para el caso particular de *C. dentata*, el presente trabajo representa el primer estudio químico y farmacológico de esta especie, por lo que enriquece en gran medida el conocimiento fitoquímico del género.

1.13. OBJETIVOS

1.13.1. Objetivo general

Aislar, purificar y caracterizar espectroscópicamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de la corteza de *Cupania dentata* D.C., responsables de la actividad inhibitoria *in vitro* contra los trofozoítos de *Giardia lamblia*.

1.13.2. Objetivos particulares

1. Determinar la actividad de los extractos, fracciones y metabolitos puros de *C. dentata* mediante el bioensayo de inhibición de crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia*.
2. Aislar los metabolitos causantes de la actividad anti-giardiasica, utilizando diversos métodos cromatográficos, en conjunto con el bioensayo de inhibición contra los trofozoítos de *G. lamblia*.
3. Identificar y elucidar las estructuras de los metabolitos puros obtenidos de *C. dentata* mediante el empleo de las diversas técnicas espectroscópicas existentes.

1.14. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El presente trabajo fue desarrollado mediante un modelo semi-biodirigido, tomando en cuenta la actividad biológica de los diferentes extractos de la partición líquido-líquido, para el posterior aislamiento de sus respectivos metabolitos (Figura 1.10).

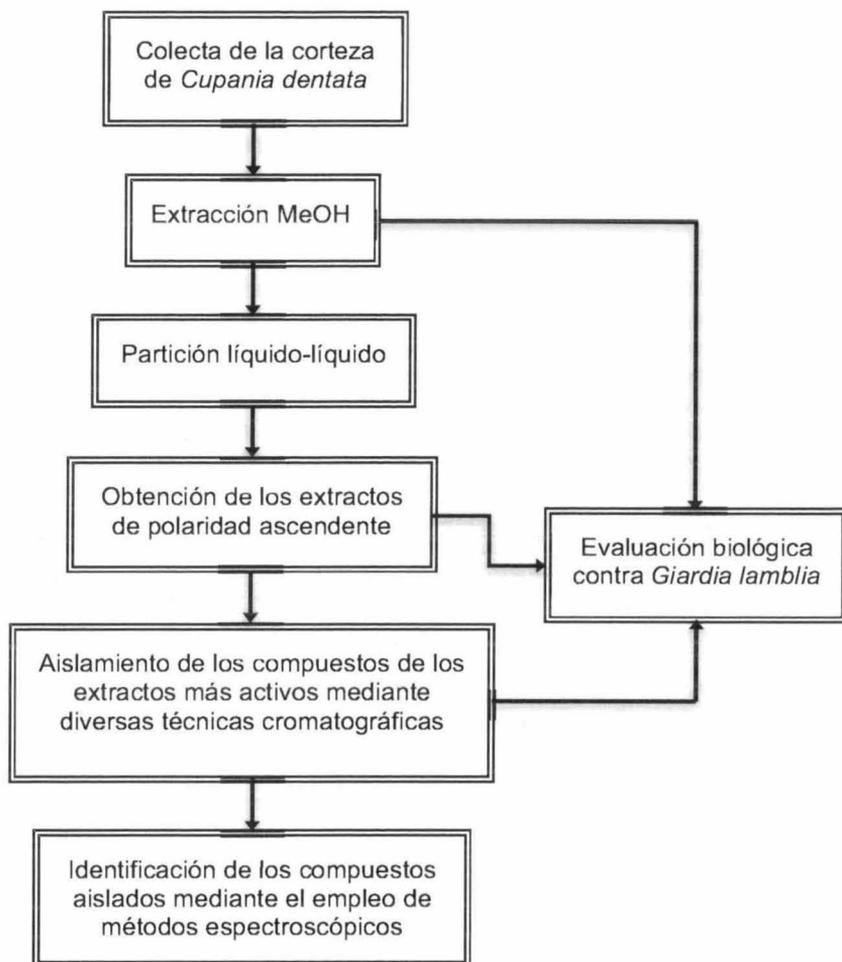


Figura 1.10. Esquema de la estrategia experimental desarrollada.

1.15. REFERENCIAS

- Abdulmagid Alabdul, M., L. Voutquenne-Nazabadioko, M. Litaudon and C. Lavaud (2005). *Acylated farnesyl diglycosides from Guioa crenulata*. *Phytochemistry*, 66(23), 2714-2718.
- Abdulmagid Alabdul, M., L. Voutquenne-Nazabadioko, G. Bontemps, M. Litaudon and C. Lavaud (2008). *Tyrosinase inhibitors and sesquiterpene diglycosides from Guioa villosa*. *Planta Medica*, 74(1), 55-60.
- Alanís, A. D., F. Calzada, R. Cedillo-Rivera and M. Meckes (2003). *Antiprotozoal activity of the constituents of Rubus coriifolius*. *Phytotherapy Research*, 17(6), 681-682.
- Amaral, F. M. M., M. N. S. Ribeiro, J. M. Barbosa-Filho, A. S. Reis, F. R. F. Nascimento and R. O. Macedo (2006). *Plants and chemical constituents with giardicidal activity*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(suppl.), 696-720.
- Arrieta, J., B. Reyes, F. Calzada, R. Cedillo-Rivera and A. Navarrete (2001). *Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of Zanthoxylum liebmannianum*. *Fitoterapia*, 72(3), 295-297.
- Barbosa-Filho, J. M., T. H. C. Vasconcelos, A. A. Alencar, L. M. Batista, R. A. G. Oliveira, D. N. Guedes, H. S. Falcão, M. D. Moura, M. F. F. M. Diniz and J. Modesto-Filho (2005). *Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 15(4), 392-413.
- Benenson, A.S. (1997). *Manual para el control de las enfermedades transmisibles*. Organización Panamericana de la Salud. 541 p.
- Birky, C. W. Jr. (2005). *Sex: is giardia doing in the dark?* *Current Biology*, 15(2), R56-58.
- Borst, P. and M. Ouellette (1995). *New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa*. *Annual Reviews of Microbiology*, 49(1), 427-460.
- Calzada, F., M. Meckes, R. Cedillo-Rivera, A. Tapia-Contreras and R. Mata (1998). *Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity*. *Pharmaceutical Biology*, 36(5), 305-309.

- Calzada, F., M. Meckes and R. Cedillo-Rivera (1999). *Antiamoebic and anti-giardial activity of plant flavonoids*. *Planta Medica*, 65(1), 78-80.
- Calzada, F., R. Cedillo-Rivera and R. Mata (2001a). *Antiprotozoal activity of the constituents of Conyza filaginoides*. *Journal of Natural Products*, 64(5), 671-673.
- Calzada F., R. Cedillo-Rivera, R. Bye and R. Mata (2001b). *Geranins C and D, additional new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from Geranium niveum*. *Planta Medica*, 67(7), 677-680.
- Calzada, F., C. Velázquez, R. Cedillo-Rivera and B. Esquivel (2003). *Antiprotozoal activity of the constituents of Teloxys graveolens*. *Phytotherapy Research*, 17(7), 731-732.
- Calzada, F. and A. D. Alanis (2007). *Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research*, 21(1), 78-80.
- Campanati, L. and L. H. Monteiro-Leal (2002). *The effects of the antiprotozoal drugs metronidazol and furazolidone on trophozoites of Giardia lamblia (P1 strain)*. *Parasitology Research*, 88(1), 80-85.
- Cavalcanti, S. B. T., H. L. Teles, D. H. S. Silva, M. Furlan, M. C. M. Young and V. S. Bolzani (2001). *New tetra-acetylated oligosaccharide diterpene from Cupania vernalis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(3), 413-416.
- Cedillo-Rivera, R., B. Chávez, A. González-Robles, A. Tapia and L. Yépez-Mulia (2002). *In vitro effect of nitazoxanide against Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis and Trichomonas vaginalis trophozoites*. *The Journal of Eukaryotic of Microbiology*, 49(3), 201-208.
- Cedillo-Rivera, R., Y. A. Leal, L. Yépez-Mulia, A. Gómez-Delgado, G. Ortega-Pierres, R. Tapia-Conyer and O. Muñoz (2009). *Seroepidemiology of giardiasis in Mexico*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(1), 6-10.
- Chandra-Ranjit, K. (1997). *Nutrition and immune system: An introduction*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66(2), 460S-463S.
- Cragg, G. M. and D. J. Newman (2008). *Anticancer drug discovery and development from Natural Products*, in *Bioactive Natural Products*.

- Detection, Isolation & Structural Determination*, Colegate, S. M. and R. J. Molyneux (ed). CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 323-370.
- Croft, S.L. and C. Sutherland (2002). "Antiprotozoal Drugs", in *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillan Publishers Ltd., Londres. pp. 1-9.
- Díaz-Cinco, M. E., M. N. Ballesteros-Vázquez, R. Pérez-Morales and V. Mata-Haro (2002). *Impacto de la dieta sobre la inducción de infección con quistes de Giardia lamblia en ratas Sprague-Dawley*. Salud Pública de México, 44(4), 315-322.
- Díaz, E., J. Mondragon, E. Ramirez and R. Bernal (2003). *Epidemiology and control of intestinal parasites with nitazoxanide in children in Mexico*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 68(4), 384-385.
- Einbond, L. S., K. A. Reynertson, X. D. Luo, M. J. Basile and E. J. Kennelly (2004). *Anthocyanin antioxidants from edible fruits*. Food Chemistry, 84(1), 23-28.
- El-Shoy, H. N., A. S. Joshi and A. C. Nimrod (1999). *Antigiardial isoflavones from Machaerium aristulatum*. Planta Medica, 65(5), 490-490.
- Elizalde, G. M., N. Álvaro, and G. Elizalde (2002). *Enfermedad diarreica aguda por Giardia lamblia*. Anales de la Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Marcos, 63(1), 25-31.
- Feng, P. C. and S. J. Patrick (1958). *Studies of action of hypoglycin-A, a hypoglycaemic substance*. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 13(2), 125-130.
- Ford, B. J. (2005). *The discovery of Giardia*. Microscope, 53(4), 147-153.
- Fox, L. A. and L. D. Saravolatz (2005). *Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent*. Clinical Infectious Diseases, 40(8), 1173-1180.
- Gadelha, A. P. R., F. Vidal, T. M. Castro, C. S. Lopes, N. Albarello, M. G. P. Coelho, S. F. L. Figueiredo and L. H. Monteiro-Leal (2005). *Susceptibility of Giardia lamblia to Hovenia dulcis extracts*. Parasitology Research, 97(5), 399-407.
- Gardner, T. and D. Hill (2001). *Treatment of Giardiasis*. Clinical Microbiology Reviews, 14(1), 114-128.

- Guevara, Y., I. de Haro, M. Cabrera, G. García de la Torre and P. M. Salazar-Schettino (2003). *Enteroparasitosis en poblaciones indígenas y mestizas de la Sierra de Nayarit, México*. Parasitología Latinoamericana, 58(1-2), 30-34.
- Gullo, V. P. and D. H. Hughes (2005). *Exploiting new approaches for natural product drug discovery in the biotechnology industry*. Drug Discovery Today: Technologies, 2(3), 281-286.
- Harris, J. C., S. L. Cottrell, S. Plummer and D. Lloyd (2001). *Antimicrobial properties of Allium sativum (garlic)*. Applied Microbiology of Biotechnology, 57(3), 282-286.
- Jiménez-Cardoso, E., A. Flores-Luna and J. Pérez-Urizar (2004). *In vitro activity of two phenyl-carbamate derivatives, singly and in combination with albendazole against albendazole-resistant Giardia intestinalis*. Acta Tropica, 92(3), 237-244.
- Khan, I. A., M. A. Avery, C. L. Burandt, D. K. Goinst, J. R. Mikell, T. E. Nash, A. Azadegan, and L. A. Walker (2000). *Antigiardial activity of isoflavones from Dalbergia frutescens Bark*. Journal of Natural Products, 63(10), 1414-1416.
- Laundry de Mesquita, M., J. Desrivot, C. Bories, A. Fournet, J. E. de Paula, P. Grellier and L. S. Espindola (2005). *Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100(7), 783-787.
- Logsdon Jr., J. M. (2008). *Evolutionary Genetics: Sex Happens in Giardia*. Current Biology, 18(2), R66-68.
- Marshall, M. M., D. Naumovitz, Y. Ortega and C. R. Sterling (1997). *Waterborne Protozoan Pathogens*. Clinical Microbiology Reviews, 10(1), 67-85.
- Martínez, M., 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. 279 p.
- McChesney, J. D., S. K. Venkataraman and J. T. Henri (2007). *Plant natural products: Back to the future or into extinction?* Phytochemistry, 68(14), 2015-2022.

- Meckes, M., F. Calzada, A. Tapia-Contreras and R. Cedillo-Rivera (1999). *Antiprotozoal properties of Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy Research*, 13(2), 102-105.
- Monis, P. T., S. M. Caccio and A. Thompson (2009). *Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus*. *Trends in Parasitology*, 25(2), 93-100.
- Morales-Espinoza E. M., H. J. Sánchez-Peréz, M. M. García-Gil, G. Vargas-Morales, J. D. Méndez-Sánchez and M. Pérez-Ramírez (2003). *Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico*. *Salud Pública de México*, 45(5), 379-388.
- Newman, D. J. and G. M. Cragg (2007). *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. *Journal Natural Products*, 70(3), 461-477.
- Organización Mundial de la Salud (2002). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. pp. 1-19.
- Passreiter, C. M., J. Sandoval-Ramírez and C. W. Wright (1999). *Sesquiterpene lactones from Neurolaena oaxacana*. *Journal of Natural Products*, 62(8), 1093-1095.
- Paterson, I. and E. A. Anderson (2005). *The renaissance of natural products as drug candidates*. *Science*, 310(5747), 451-453.
- Peraza-Sánchez, S. R., S. Poot-Kantún, L. W. Torres-Tapia, F. May-Pat, P. Simá-Polanco and R. Cedillo-Rivera (2005). *Screening of native plants from Yucatán for anti-Giardia lamblia activity*. *Pharmaceutical Biology*, 43(7), 594-598.
- Ponce-Macotela, M., I. Navarro-Alegria, M. N. Martínez-Gordillo and R. Alvarez-Chacón (1994). *Efecto antigiardiasico de 14 extractos de plantas*. *Revista de Investigación Clínica*, 46(5), 343-347.
- Ponce-Macotela, M., J. Gómez-Garduño, A. González-Maciél, R. Reynoso-Robles, V. Anisaldo-Tolentino and M. N. Martínez-Gordillo (2001). *In vitro determination of Giardia duodenalis susceptibility to nitazoxanide in four isolates from different hosts*. *Revista de Investigación Clínica*, 53(1), 41-45.

- Ponce-Macotela, M., Y. Rufino-González, A. González-Maciel, R. Reynoso-Robles and M. N. Martínez-Gordillo (2006). *Oregano (Lippia spp.) kills Giardia intestinalis trophozoites in vitro: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage*. Parasitology Research, 98(6), 557-560.
- Rodney, A. (1991). *The biology of Giardia spp.* Microbiological Reviews, 55(4), 706-732.
- Rodney, A. (2001). *Biology of Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews, 14(3), 447-475.
- Sakane, W., N. Hara, Y. Fujimoto, Y. Takaishi, R. Acuña, C. Osorio and C. Duque (2005). *Cupaniol, a new branched polyprenol from Cupania latifolia*. Chemical Pharmaceutical Bulletin, 53(8), 1037-1039.
- Samuelson, J. (1999). *Why metronidazol is active against both bacteria and parasites*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43(7), 1533-1541.
- Sangster, N., P. Batterham, H. D. Chapman, M. Duraisingh, L. L. Jambre, M. Shirley, J. Upcroft and P. Upcroft (2002). *Resistance to antiparasitic drugs: The role of molecular diagnosis*. International Journal for Parasitology, 32(5), 637-653.
- Sarker, S. D., Z. Latif and A. I. Gray (2006). "Natural Product Isolation. An Overview" in *Natural Product Isolation*, Sarker, S. D., Z. Latif and A. I. Gray (ed). Humana Press, Totowa, New Jersey. pp. 1-25.
- Sawangjaroen, N., S. Subhadhirasakul, S. Phongpaichit, C. Siripanth, K. Jamjaroen and K. Sawangjaroen (2005). *The in vitro anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in Southern Thailand*. Parasitology Research, 95(1), 17-21.
- Schwikkard, S. and F. R. van Heerden (2002). *Antimalarial activity of plant metabolites*. Natural Products Report, 19(6), 675-692.
- Setzer, W. N., B. Vogler, J. M. Schmidt, J. L. Petty and W. A. Haber (2005). *Isolation of cupanioside, a novel cytotoxic and antibacterial long-chain fatty alcohol glycoside from the bark of Cupania glabra*. Planta Medica, 71(7), 686-688.

- Shant, J., S. Ghosh, S. Bhattacharyya, N. K. Ganguly and S. Majumdar (2004). *The relation in signal transduction parameters induced by the excretory-secretory product from Giardia lamblia*. Parasitology, 129(4), 421-430.
- Thompson, A. (2004). *The zoonotic significance and molecular epidemiology of Giardia and giardiasis*. Veterinary Parasitology, 126(1-2), 15-35.
- Traub, R. J., P. T. Monis, I. Robertson, P. Irwin, N. Mencke and R. C. A. Thompson (2004). *Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of Giardia among humans and dogs living in the same community*. Parasitology, 128(3), 253-262.
- Upcroft, P. and J. Upcroft (2001). *Drug Targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa*. Clinical Microbiology Reviews, 14(1), 150-164.
- Upcroft, P. (1998). *Drug resistance in Giardia: Clinical versus laboratory isolates*. Drug Resistance Updates, 1(3), 166-168.
- Venkatesan, P. (1998). *Albendazole*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 41(2), 145-147.
- Walsh, C. T. and M. A. Fischbach (2010). *Natural products versión 2.0: Connecting genes to molecules*. Journal of the American Chemical Society, 132(8), 2469-2493.
- Wright, C. W., D. Allen, Y. Cai, Z. P. Chen, J. D. Phillipson, G. C. Kirby, D. C. Warhurst, M. Tits and L. Angenot (1994). *Selective antiprotozoal activity of some Strychnos alkaloids*. Phytotherapy Research, 8(3), 149-152.
- Wright, C. W., M. M. Anderson, D. Allen, J. D. Phillipson, G. C. Kirby, D. C. Warhurst and H. R. Chang (1993). *Quassinoids exhibit greater selectivity against Plasmodium falciparum than against Entamoeba histolytica, Giardia intestinalis or Toxoplasma gondii in vitro*. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 40(3), 244-246.
- Yu H. W., C. W. Wright, Y. Cai, S. L. Yang, J. D. Phillipson, G. C. Kirby and D. C. Warhurst (1994). *Antiprotozoal activities of Centipeda minima*. Phytotherapy Research, 8(7), 436-438.

Zamora-Martinez, M. C. and C. N. de Pascual Pola (1992). *Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Mexico*. *Journal of Ethnopharmacology*, 35(3), 229-257.

Capítulo 2

Parte Experimental

2.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

La colecta del material vegetal se llevó al cabo a 22 Km al oeste de Bacalar, camino a Carrillo Puerto, Quintana Roo. En una primera colecta se obtuvieron 983 g de material vegetal seco. La segunda colecta se obtuvo de tallos de alrededor de ocho plantas en estado juvenil, los cuales fueron descortezados en el laboratorio y posteriormente secados a la sombra por espacio de una semana y finalmente en estufa a una temperatura no mayor de 50 °C durante 72 h en ausencia de luz, para dar un total de 3,350 g. En ambos casos, el material vegetal, ya seco, fue molido en un molino marca Pagani, modelo 1520, pasándose por un tamiz No. 2.

El monitoreo de las fracciones y metabolitos se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD), empleándose cromatofolios de aluminio impregnados con gel de sílice 60 F₂₅₄ (E. M. Merck DC-Alufolien, de 0.25 mm de espesor) e indicador fluorescente. Como adsorbente para las purificaciones en columna líquida al vacío (CLV) se empleó gel de sílice 60 GF₂₅₄. Para la adsorción de las muestras se utilizó gel de sílice 60 de 70-230 mallas. Las columnas cromatográficas por gravedad (CCG), fueron empacadas con gel de sílice 60 de 70-230 mallas, empleándose este mismo tipo de gel para adsorber la muestra. Para la cromatografía por exclusión molecular (CEEM) se empleó como soporte la resina Sephadex LH-20 y la muestra fue adicionada líquida disuelta con el sistema seleccionado.

Las placas de CCD fueron visualizadas primero bajo luz ultravioleta de ondas corta (254 nm) y larga (365 nm) y para el revelado de las placas se sumergieron en una disolución preparada con 20 g de ácido fosfomolibdico y 2.5 g de sulfato cérico en 500 mL de H₂SO₄ acuoso al 5%, posteriormente se secaron y calentaron con una pistola de aire caliente tipo industrial durante 1-2 min hasta visualizar los metabolitos presentes. Para los diferentes procesos de extracción y purificación se emplearon disolventes grado técnico, destilados en el laboratorio, así como disolventes grado analítico (Fermont). La evaporación de los disolventes se llevó al cabo a presión reducida con baño de agua a una temperatura no mayor de 35 °C en un evaporador rotatorio.

Para los espectros de RMN, tanto de ¹H como de ¹³C en una o dos dimensiones, se utilizó un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz),

empleando como referencia interna la señal residual del tetrametilsilano (TMS). Las muestras fueron disueltas en CDCl_3 (Aldrich), piridina- d_5 o CD_3OD y los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).

Para el análisis de cromatografía de gases-masas se empleó un cromatógrafo de gases, modelo 6890N, acoplado a un detector másico, modelo 5975B, ambos de marca Agilent Technologies.

2.2. EVALUACIÓN *in vitro* CONTRA LOS TROFOZOITOS DE *Giardia lamblia*

Para la evaluación de la actividad contra *G. lamblia* se utilizó la cepa de trofozoitos IMSS:0696:1, que originalmente fue obtenida de un individuo mexicano con giardiasis sintomática. Las fracciones fueron evaluadas frente a *G. lamblia* por el método de subcultivos (Cedillo & Muñoz, 1992; Cedillo-Rivera *et al.*, 2003) (Figura 2.1). Los trofozoitos se cultivaron en medio TYI-S-33 modificado por Keister (Anexo 1), los cuales fueron incubados durante 48 h y se refrigeraron a 4 °C durante 2 h para desprender los trofozoitos de las paredes del tubo. Por último, se homogeneizó la suspensión de trofozoitos mediante un agitador vórtex y se cuantificaron con un hematocitómetro (Cedillo-Rivera *et al.*, 1991).

Las muestras a evaluar (extractos, fracciones o compuestos puros) fueron preparadas a partir de una disolución madre con una concentración de 5 mg/mL en DMSO (Figura 3.1), posteriormente se diluyeron en proporción 1:10 con medio de cultivo estéril en dos ocasiones, para obtener las disoluciones A y B, cuyas concentraciones son 0.5 y 0.05 mg/mL, respectivamente. De la disolución B se tomaron 50 μL , equivalentes a 2.5 μg de la muestra; este volumen se completó a 1,400 μL con medio de cultivo estéril y finalmente se añadieron 100 μL de inóculo a una densidad aproximada de 5×10^4 trofozoitos/mL, para obtener un volumen final de 1.5 mL con una concentración final de 1.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La adición de una diferente cantidad de disolución A o B da como resultado las concentraciones de 1.67, 3.37, 6.67 y 13.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cada concentración se preparó por duplicado y la prueba se repitió en tres ocasiones en días sucesivos (Figura 2.1).

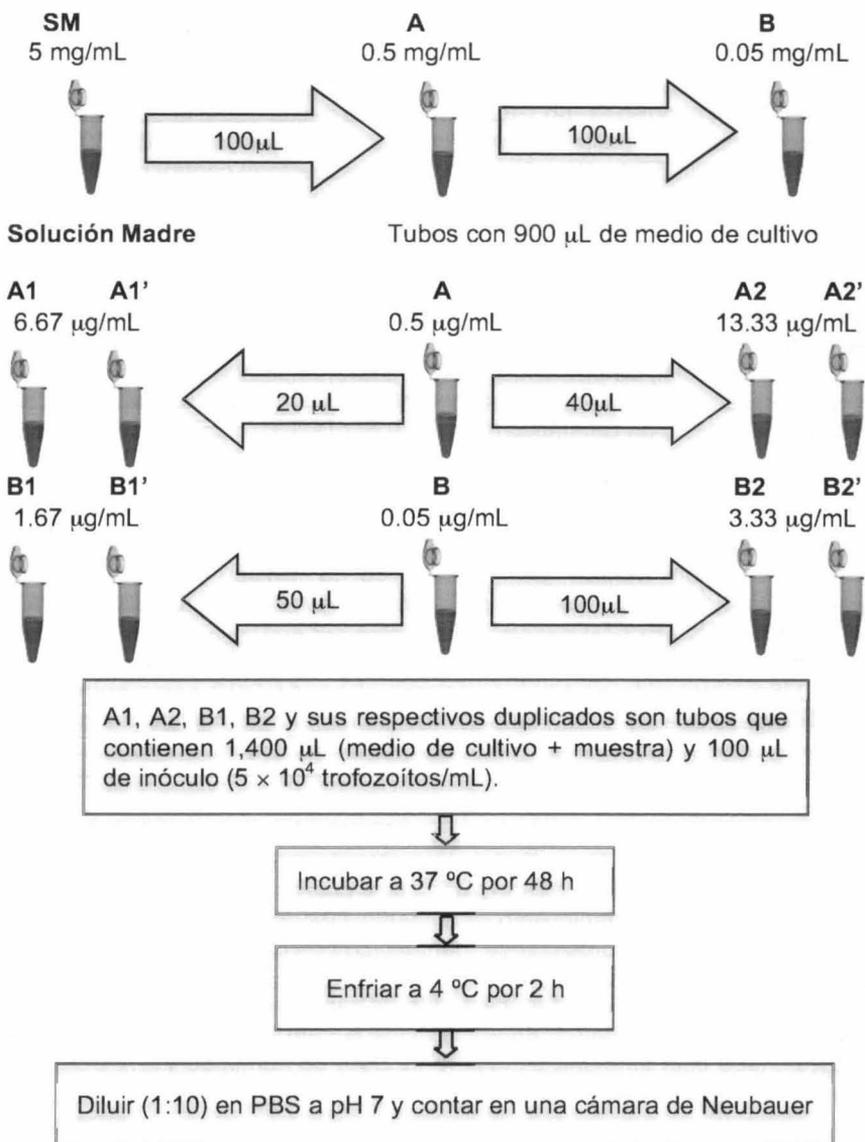


Figura 2.1. Esquema de desarrollo del bioensayo de inhibición de crecimiento contra los trofozoitos de *G. lamblia*.

El porcentaje de inhibición de crecimiento fue calculado por comparación con los controles y se determinaron las concentraciones inhibitorias del 50 y 90% (CI_{50} y CI_{90} , respectivamente) por medio de un análisis Probit (Cedillo *et al.*, 1992). La CI_{50} se define como la concentración necesaria del metabolito o fracción a la cual se inhibe el 50% del crecimiento de la población microbiana, con respecto al control negativo. De igual forma, la CI_{90} se refiere a la inhibición del 90% de la población de trofozoítos en el cultivo con respecto al control negativo. El cociente de la CI_{90} y la CI_{50} , conocido como índice de eficacia, proporciona una estimación de si el producto analizado es citostático o citocida. Un índice de eficacia cercano a uno señala que solo es necesario elevar un poco la dosis para eliminar al 90% los trofozoítos y esta molécula posee un efecto citocida. Por otro lado, un índice de efectividad mayor a uno, implica la aplicación de una gran cantidad del metabolito para obtener el mismo efecto, por lo que se dice que su efecto es citostático (Cedillo *et al.*, 1992).

El bioensayo de cada muestra se realiza por duplicado y se repite durante tres días consecutivos (Cedillo *et al.*, 1992). El bioensayo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la UADY y en la Unidad de Investigación Médica de Yucatán de la Unidad Médica de Alta Especialidad del IMSS, bajo la supervisión del Dr. Roberto Cedillo Rivera y la Dra. Rosa Moo Puc.

2.3. BIOENSAYO DE CITOTOXICIDAD

2.3.1. Cultivo celular

Las líneas celulares normales (MDCK) fueron crecidas bajo la supervisión de la Dra. Rosa Esther Moo Puc de la Unidad de Investigación Clínica y Epidemiológica IMSS/UADY. Las células fueron mantenidas en fase logarítmica de crecimiento con medio DMEM y 10% de suero fetal bovino (SFB). El cultivo celular se mantuvo con medio DMEM y 5% de SFB. Se aplicaron 10,000 U de penicilina y 10 mg/mL de estreptomina para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas y positivas, respectivamente y 5 mg/mL de anfotericina B para inhibir el crecimiento de hongos, todo esto bajo una atmósfera de 95% de humedad y 5% CO_2 a 37 °C.

2.3.2. Bioensayo con MTT: Citotoxicidad

Las células fueron incubadas en placas para cultivo celular de 96 pozos y a cada pozo se le adicionó 100 μL de medio con una densidad celular de 50,000 células/mL, 24 horas después se retiró el medio y se adicionaron 100 μL de medio sin suero fetal bovino (SFB). Posteriormente, se añadieron 100 μL de la disolución de trabajo y se realizó las respectivas diluciones seriadas (50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g/mL}$) con una pipeta multicanal. Las placas se incubaron por 48 h, al término de las mismas se desechó el medio y se adicionaron 100 μL de medio con 10 μL de MTT (0.5%) y 20 μL de PMS (fenil fenazona) (0.5%) como catalizador. Se incubó durante una hora más a 37 °C. A continuación se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 100 μL de DMSO (100%). Por último, se midió la densidad óptica de la disolución a 540 nm usando un espectrofotómetro (Denizot & Lang 1986). La inhibición del crecimiento se determinó usando la siguiente fórmula: $[(D.O \text{ control} - D.O \text{ extracto})/D.O \text{ control}] \times 100$.

2.4. EXTRACCIÓN METANÓLICA DE LA CORTEZA DE *Cupania dentata*

Para la primera extracción de *C. dentata* se emplearon 983 g de material vegetal seco, que fue extraído por maceración con 2 L de MeOH en tres ocasiones por 24 h, obteniéndose un total de 166.4 g de extracto, que se nombró como CDC-1A; en la segunda colecta se obtuvieron 3,350 g de material vegetal y fueron extraídos con 10 L de MeOH en tres ocasiones por 24 h cada una, sumando un total de 600.5 g de extracto vegetal. Para las maceraciones se utilizaron disolventes destilados en el laboratorio.

2.5. PARTICIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

Una vez obtenidos los extractos metanólicos, se procedió a particionarlos mediante una extracción líquido-líquido, para la cual se disolvió el extracto metanólico inicial en la mínima cantidad de MeOH, y luego con agua, para formar una mezcla MeOH:H₂O (1:3). Esta mezcla fue extraída con disolventes de polaridad ascendente: hexano, diclorometano y acetato de etilo, tres veces cada uno, en proporción 1:2, 1:1, 1:1 (Figura 2.2). Los disolventes empleados en esta sección fueron destilados en el laboratorio.

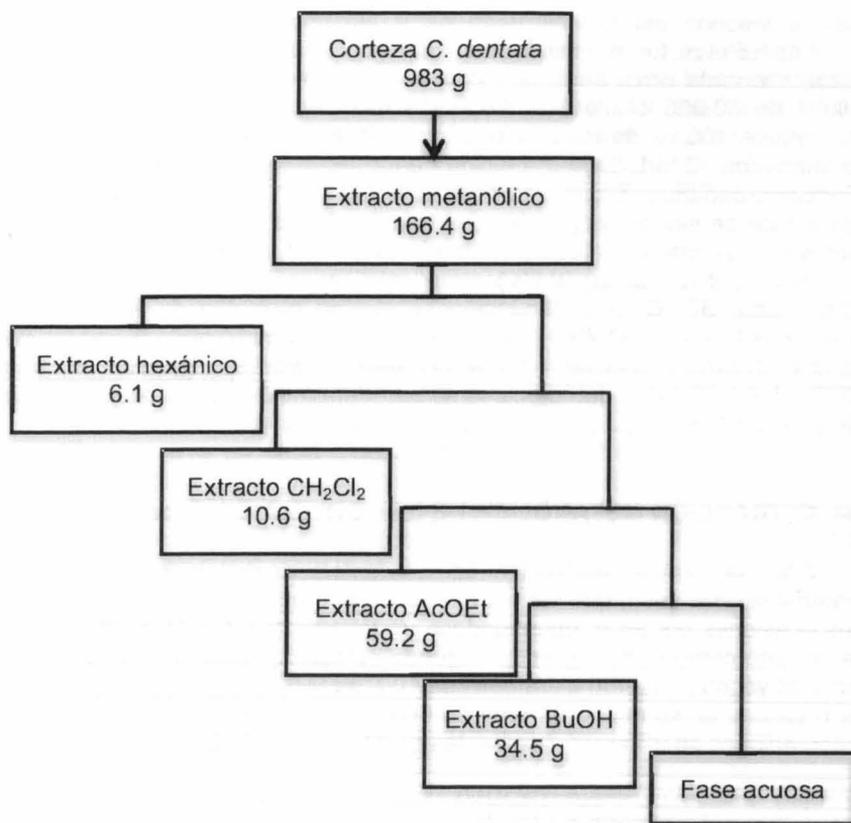


Figura 2.2. Esquema de fraccionamiento de la partición líquido-líquido del extracto metanólico de *C. dentata*.

2.6. COMPUESTOS AISLADOS DE LA FRACCIÓN HEXÁNICA DE *Cupania dentata*

La fracción hexánica CDC-2A se purificó mediante una CLV de 5 cm de diámetro y 6 cm de altura. Para esto se emplearon 60 g de gel de sílice 60 GF₂₅₄ como fase estacionaria y 6 g de muestra que se adsorbieron en 13.5 g de gel de sílice 60 (70-230 mallas), para la elaboración de la cabeza de la columna. Se colectaron 30 fracciones de 250 mL cada una. Los sistemas utilizados fueron mezclas de hexano/AcOEt y AcOEt/acetona de polaridad

ascendente. Las fracciones se reunieron en un total de 10 fracciones (CDC-6A - CDC-6J) (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Sistemas de elución de la CLV de la fracción hexánica.

# Fracción	Sistema 250 mL c/u	Nombre fracción	Peso fracción (g)
1	Hx 100%		
2	Hx 100%		
3	Hx 100%	CDC-6A	0.0775
4	Hx/AcOEt 99:1		
5	Hx/AcOEt 98:2		
6	Hx/AcOEt 96:4		
7	Hx/AcOEt 94:6	CDC-6B	1.947
8	Hx/AcOEt 92:8		
9	Hx/AcOEt 88:12		
10	Hx/AcOEt 88:12	CDC-6C	0.0622
11	Hx/AcOEt 86:14	CDC-6D	1.0122
12	Hx/AcOEt 84:16		
13	Hx/AcOEt 84:16	CDC-6E1	0.0519
14	Hx/AcOEt 80:20		
15	Hx/AcOEt 76:24	CDC-6F	0.5416
16	Hx/AcOEt 72:28		
17	Hx/AcOEt 64:36		
18	Hx/AcOEt 50:50		
19	Hx/AcOEt 30:70	CDC-6G	1.4534
20	Hx/AcOEt 10:90		
21	AcOEt 100%	CDC-6H	0.3316
22	AcOEt/An 80:20		
23	AcOEt/An 60:40	CDC-6I	0.1291
24	AcOEt/An 40:60		
25	AcOEt/An 20:80		
26	An 100%		
27	An/MeOH 95:5		
28	An/MeOH 90:10	CDC-6J	0.1432
29	An/MeOH 85:15		
30	An/MeOH 80:20		

Las fracciones 6 y 8, antes de juntarse, presentaron precipitados, que fueron lavados con hexano de manera independiente, para dar origen a las fracciones CDC-6B1 y CDC-6B2, descritas a continuación.

2.6.1. Aislamiento del compuesto I (taraxerona, CDC-6B1)

El compuesto I se obtuvo con la clave CDC-6B1 como cristales blancos (16.0 mg); p.f. = 240.4-243.0 °C (p.f. = 240-243 °C, Van Kiem *et al.*, 2004); R_f = 0.50 [hexano/acetona (96:4)]; soluble en CHCl_3 ; por CG mostró un T_R = 21.57 min. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.56 (1H, dd, J = 3.2, 8.2 Hz, H-15), 2.58 (1H, m, H-2a), 2.33 (1H, m, H-2b), 2.07 (1H, dt, J = 3.3, 12.9 Hz, H-7a), 1.92 (1H, dd, J = 3.1, 15.1 Hz, H-16a), 1.88 (1H, m), 1.14 (3H, s, H-25), 1.09 (3H, s, H-26), 1.08 (3H, s, H-23), 1.07 (3H, s, H-24), 0.95 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, s, H-27), 0.91 (3H, s, H-30), 0.83 (3H, s, H-28); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 217.7 (C-3), 157.6 (C-14), 117.2 (C-15), 55.8 (C-5), 48.7 (C-18), 48.7 (C-9), 47.6 (C-4), 40.6 (C-19), 38.9 (C-8), 38.3 (C-1), 37.7 (C-13), 37.7 (C-17), 37.5 (C-10), 36.7 (C-16), 35.8 (C-12), 35.1 (C-7), 34.1 (C-2), 33.5 (C-21), 33.3 (C-29), 33.1 (C-22), 29.9 (C-28), 29.8 (C-26), 28.8 (C-20), 26.1 (C-23), 25.6 (C-27), 21.5 (C-24), 21.3 (C-30), 19.9 (C-6), 17.4 (C-11), 14.8 (C-25). EMS m/z (rel. int.): 424 $[\text{M}]^+$ (25), 300 (87), 285 (70), 204 (100), 133 (67).

2.6.2. Aislamiento del compuesto II (taraxerol, CDC-6B2)

El compuesto II se aisló con la clave CDC-6B2, obteniéndose en forma de cristales blancos (52.2 mg); p.f. = 279.2-280.4 °C (281-282 °C, Takasaki *et al.*, 1999); R_f = 0.40 [tolueno/acetona (96:4)]; soluble en CHCl_3 ; por CG mostró un T_R = 22.22 min. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.53 (1H, dd, J = 3.2, 8.2 Hz, H-15), 3.24 (1H, dd, J = 4.7, 13.0 Hz, H-3), 2.03 (1H, dt, J = 3.1, 12.6 Hz, H-7a), 1.92 (1H, dd, J = 3.0, 14.7 Hz, H-16a), 1.09 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-29), 0.93 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, s, H-27), 0.82 (3H, s, H-28), 0.80 (3H, s, H-24); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.1 (C-14), 116.9 (C-15), 79.1 (C-3), 55.5 (C-5), 49.2 (C-18), 48.7 (C-9), 41.3 (C-19), 39.0 (C-4), 38.7 (C-8), 38.0 (C-1), 37.7 (C-17), 37.6 (C-13), 37.5 (C-10), 36.6 (C-16), 35.8 (C-12), 35.1 (C-7), 33.7 (C-21), 33.3 (C-29), 33.1 (C-22), 29.9 (C-28), 29.8 (C-26), 28.8 (C-20), 28.0 (C-23), 27.1 (C-2), 25.9 (C-27), 21.3 (C-30), 18.8 (C-6), 17.5 (C-11), 15.4 (C-24), 15.4 (C-25). EMS m/z (rel. int.): 426 $[\text{M}]^+$ (9), 302 (25), 287 (25), 204 (100), 133 (40).

2.6.3. Aislamiento de la mezcla A (estigmasterol - β -sitosterol, 2:1; CDC-6E1)

La mezcla **A** se obtuvo de la CLV de la fracción hexánica con la clave CDC-6E1 (Cuadro 2.1). Se obtuvieron 51.9 mg de cristales blancos, los cuales se identificaron mediante CG-EM como la mezcla de los esteroides stigmasterol y β -sitosterol en proporción 2:1. Ambos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

2.7. COMPUESTOS AISLADOS DE LA FRACCIÓN DE DICLOROMETANO

La fracción diclorometánica se fraccionó mediante dos metodologías. Una mediante el empleo de cromatografía por permeación en gel con gradiente de polaridad y la otra a partir de una CLV.

Como una primera metodología de fraccionamiento se llevó a cabo una CCEM, empleando Sephadex LH-20. La columna se realizó con gradiente de polaridad siguiendo la metodología de Cardellani II (1983). Esta columna se repitió en tres ocasiones probando diferentes gradientes.

Los sistemas de disolventes y los gradientes usados para este fraccionamiento se pueden observar en la Cuadro 2.2.

Cuadro 2.2. Separación cromatográfica de la fracción de diclorometano.

Vial	Sistema	Fracciones	Clave
1-20	Hx/CHCl ₃ /MeOH 1:2:2	1-13	CDC-20A
		14-23	CDC-20B
21-40	CHCl ₃ /An/MeOH 3.5:3:3.5	24-29	CDC-20C
		30-34	CDC-20D
41-60	CHCl ₃ /An/MeOH 3:4:3	35-90	CDC-20E
61-80	CHCl ₃ /ACN/MeOH 3:4:3		
81-90	CHCl ₃ /MeOH 1:1		

La fracción mayoritaria CDC-20B se empleó para la obtención de los metabolitos CDC-23D1 y CDC-24J1.

2.7.1. Obtención del compuesto III (CDC-23D1)

Se aislaron 2.1 mg de un compuesto con aspecto ceroso con un R_F de 0.49 en el sistema CH₂Cl₂/MeOH (85:15). Por CG presentó un T_R de 3.44

min con la columna Ultra 2. RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.30 (s), 4.65 (s), 3.91 (sa), 3.73 (dd, $J = 2.8, 9.2$ Hz), 3.6 (m), 3.53 (s), 3.44 (t, $J = 9.4$ Hz), 2.51 (sa), 1.31 (d, $J = 6.0$ Hz), 1.25 (s).

2.7.2. Obtención del compuesto IV (CDC-24J1)

Se obtuvieron 15.5 mg de cristales claros. Por CG no se observó señal alguna por lo que se infiere que se trata de un compuesto polar. Las pruebas adicionales para conocer su identidad no fueron concluyentes. Sin embargo, fue evaluado contra los trofozoítos de *G. lamblia*.

2.7.3. Aislamiento del compuesto V (escopoletina, CDC-27E1)

En el extracto diclorometánico se observó la presencia de un metabolito fluorescente azul bajo luz ultravioleta de onda corta y onda larga, por lo que se procedió con su purificación.

Se fraccionaron 9.2 g del extracto diclorometánico mediante una CLV, con mezclas en polaridad ascendente de hexano, diclorometano y metanol, para obtener siete fracciones (CDC-25A - CDC-25G). La fracción enriquecida con este compuesto fluorescente fue la CDC-25D con 538.1 mg, la cual se purificó mediante una CCG en polaridad ascendente con mezclas de diclorometano/metanol, reuniéndose un total de 11 fracciones (CDC-26A - CDC-26K). En la fracción CDC-26C (136.9 mg) se observó la presencia de este metabolito azul, por lo que se purificó en una CCG con mezclas de cloroformo/metanol en polaridad ascendente.

El compuesto **V** se obtuvo con la clave CDC-27E1, como cristales amarillos, con un peso de 18.3 mg; p. f. = 199.0-201.0 °C (202.0-203.0, Ishii *et al.*, 2008); R_F de 0.49 en el sistema cloroformo/metanol (98:2); T_R de 10.54 min en el CG-EM. RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.86 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-4), 7.13 (1H, s, H-8), 6.78 (1H, s, H-5), 6.21 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 3.91 (3H, s, 6- OCH_3). RMN ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz): δ 164.1 (C-2), 152.9 (C-7), 151.4 (C-9), 147.1 (C-6), 146.1 (C-4), 112.6 (C-3), 112.5 (C-10), 109.9 (C-5), 103.9 (C-8), 56.8 (6- OCH_3). EMS m/z (rel. int.): 192 $[\text{M}]^+$ (100), 177 (65), 164 (28), 149 (59), 121 (27), 69 (42).

2.7.4. Obtención del compuesto VI (CDC-36E1)

La fracción CDC-25E (1.8 g) fue sometida a CCEM empleándose Sephadex LH-20 activada con el sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1). Se obtuvieron 13 fracciones finales, entre ellas CDC-33D.

La fracción CDC-33D con un peso de 987.5 mg fue purificada con una CLV con mezclas de hexano/ CH_2Cl_2 y $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, obteniéndose como resultado siete fracciones finales, entre ellas la fracción semipura CDC-36E.

El compuesto VI se obtuvo como un precipitado blanco, que fue lavado con acetona, con un peso final de 14.8 mg. RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.74 (1H, d, $J = 15.2$ Hz), 5.42 (1H, d, $J = 3.6$ Hz), 5.28 (1H, s), 4.33 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 4.27 (1H, d, $J = 7.5$ Hz), 4.23 (1H, m), 4.12 (1H, m), 3.99 (1H, m), 3.94 (1H, m), 3.82 (1H, d, $J = 3.6$ Hz), 3.80 (1H, d, $J = 3.2$ Hz), 3.66 (3H, m), 3.49 (3H, m), 3.39 (1H, m), 1.61 (3H, m), 1.10 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 0.90 (9H, t, $J = 6.8$ Hz).

2.8. COMPUESTOS AISLADOS DE LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO

La fracción de acetato de etilo fue purificada mediante CLV con mezclas de hexano/acetona, acetona/metanol, obteniéndose un total de 12 fracciones (CDC-3A - CDC-3L).

2.8.1. Obtención del compuesto VII (CDC-17B1)

La fracción CDC-3G (500 mg) fue purificada mediante CCF con el sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (14:7:1), obteniéndose cuatro fracciones (CDC-17A - CDC-17D). El metabolito CDC-17B1 se obtuvo como un sólido amorfo de coloración amarilla (80 mg). Presentó un $R_f = 0.48$ en el sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (14:7:1). RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.08 (1H, d, $J = 3.7$ Hz), 4.92 (1H, s), 4.82 (1H, s), 4.60 (1H, s), 4.45 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 4.09 (1H, t, $J = 3.5$ Hz), 4.02 (1H, dt, $J = 2.1, 4.4$ Hz), 3.98 (1H, d, $J = 1.4$ Hz), 3.92 (1H, t, $J = 3.6$ Hz), 3.82 (2H, dd, $J = 1.6, 11.8$ Hz), 3.74 (4H, m), 3.63 (8H, m), 3.56 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 3.53 (1H, s), 3.51 (1H, s), 3.3 (8H, m), 3.10 (1H, dd, $J = 7.8, 9.0$ Hz).

2.8.2. Obtención del compuesto VIII (CDC-17C1)

El compuesto VIII se obtuvo a partir de la columna descrita anteriormente como un sólido amorfo de coloración ligeramente amarilla. Inicialmente, se obtuvieron 40 mg y en posteriores purificaciones se obtuvieron 60.3 mg más de una parte de la fracción butanólica con clave CDC-48D1. Presentó un $R_f = 0.38$ en el sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (14:7:1). RMN ^1H (piridina- d_5 , 400 MHz): δ 9.87 (s), 7.84 (s), 7.70 (s), 7.51 (s), 7.38 (d, $J = 3.8$ Hz), 7.16 (s), 6.86 (s), 6.23 (m), 5.94 (m), 5.87 (t, $J = 9.2$ Hz), 5.68 (dd, $J = 3.3, 8.2$ Hz), 5.51 (td, $J = 3.6, 14.6$ Hz), 5.44 (m), 5.41 (s), 5.35 (dd, $J = 3.8, 9.6$ Hz), 4.76 (s), 3.15 (m), 2.46 (dd, $J = 6.4, 7.6$ Hz). RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 100 MHz): δ 106.1, 93.8, 84.6, 80.0, 75.8, 75.3, 75.2, 73.7, 72.0, 65.0, 63.2, 62.6.

2.9. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS PRESENTES EN LA FRACCIÓN BUTANÓLICA

La fracción butanólica se obtuvo como fracción final de la partición líquido-líquido del extracto metanólico.

2.9.1. Aislamiento de la mezcla B (glucósido de estigmasterol - glucósido de β -sitosterol, CDC-45D1)

La fracción butanólica fue purificada por CEM con Sephadex LH-20, empleándose un gradiente de elución con mezclas de metanol/butanol/agua, obteniéndose nueve fracciones (CDC-43A - CDC-43I). La fracción CDC-43D, soluble en piridina, fue purificada mediante una CCG con el sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{ácido fórmico}$ (20:2:1), aislándose la fracción CDC-45D1, que resultó ser una mezcla de los esteroides glucosilados estigmasterol y β -sitosterol. Se obtuvieron 100.4 mg de un sólido blanco amorfo. RMN ^1H (piridina- d_5 , 400 MHz): δ 5.37 (d, $J = 3.48$ Hz), 5.23 (dd, $J = 8.7, 15.0$ Hz), 5.09 (d, $J = 7.6$ Hz), 4.61 (dd, $J = 1.8, 10.8$ Hz), 4.46 (dd, $J = 5.2, 11.7$ Hz), 4.33 (t, $J = 4.4$ Hz), 4.10 (t, $J = 8.2$ Hz), 4.0 (m), 2.76 (d, $J = 12.9$ Hz), 2.50 (t, $J = 12.0$ Hz), 2.15 (m), 1.98 (m), 1.75 (t, $J = 11.2$ Hz), 1.56 (m), 1.40 (m), 1.28 (m), 1.09 (d, $J = 6.5$ Hz), 1.00 (d, $J = 6.3$ Hz), 0.95 (s), 0.91 (d, $J = 5.9$ Hz), 0.88 (s), 0.87 (s), 0.68 (d, $J = 6.0$ Hz). RMN ^{13}C (piridina- d_5 , 100 MHz): δ 141.2, 139.2, 129.8, 122.3, 102.9, 79.0, 78.9, 75.7, 72.0, 63.2, 56.6, 56.4, 50.7, 42.8, 42.7, 40.3, 39.7, 39.4, 37.3, 36.8, 36.5, 34.3, 32.5, 32.4, 32.0, 28.9, 26.1, 24.9, 23.7, 21.7, 21.6, 21.1, 19.8, 19.5, 19.3, 12.5, 12.3.

2.10. SÍNTESIS DEL DERIVADO ACETILADO DE TARAXEROL (COMPUESTO IX)

De la fracción hexánica de *C. dentata* se obtuvieron 10 mg de taraxerol, a los que se les añadieron 1 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de piridina. La mezcla se agitó durante 72 h a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se le añadieron 20 mL de agua destilada y la suspensión resultante se extrajo en dos ocasiones con acetato de etilo (2:1, v/v). La fracción orgánica se lavó sucesivamente con volúmenes iguales de HCl al 5%, NaOH al 3% y una disolución saturada de NaCl y finalmente se secó con ayuda de Mg₂SO₄ anhidro. Una vez filtrado y evaporado el disolvente, se obtuvieron 6.6 mg del producto acetilado identificado como acetato de taraxerol.

2.11. REFERENCIAS

- Cedillo-Rivera, R. and O. Muñoz (1992). *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazol, mebendazol and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal Microbiology*, 37(3), 221-224.
- Cedillo-Rivera, R., A. Ramírez and O. Muñoz (1992). A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*, 23(2), 59-61.
- Cedillo-Rivera, R. (2001). "Parasitosis Intestinales" in *Manual de Infectología Clínica*, Kumate J. (ed). 16th ed. Méndez Editores, México City. pp. 201-209.
- Cedillo-Rivera, R., J. M. Darby, J. A. Enciso-Moreno, G. Pierres and P. L. Ey (2003). Genetic homogeneity of axenic isolates of *Giardia intestinalis* derived from acute and chronically infected individuals in Mexico. *Parasitology Research*, 90(2), 119-123.
- Denizot, F. and R. Lang (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271-277.
- Ishii, H., Y. Okada, M. Baba and T. Okuyama (2008). *Studies of coumarins from the Chinese drug Qianhu, XXVII¹⁾: Structure of a new simple*

coumarin glycoside from Bai-Hua Qianhu, Peucedanum praeruptoem.
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 56(9), 1349-1351.

Takasaki, M., T. Konoshina, H. Tokuda, K. Masuda, Y. Arai, K. Shiojima and H. Ageta (1999). *Anti-carcinogenic activity of Taraxacum plant. II.* Biological Pharmaceutical Bulletin, 22(6), 606-610.

Van Kiem, P., C. Vn Minh, H. Thanh Houng, N. Hoai Nam, J. Joon Lee and Y. Ho Kim (2004). *Pentacyclic triterpenoids from Mallotus apelta.* Archives Pharmacal Research, 27(11), 1109-1113.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL EXTRACTO CRUDO Y DE POLARIDADES ASCENDENTES DE *C. dentata*

Como primer paso de purificación, se empleó una partición líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad para purificar el extracto crudo; el extracto y las fracciones resultantes fueron evaluados en el bioensayo de inhibición contra los trofozoítos de *G. lamblia*, empleándose como controles el extracto metanólico de *C. dentata*, previamente reportado como activo (Peraza *et al.*, 2005), y el metronidazol (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Resultados de actividad frente al bioensayo de inhibición de crecimiento contra los trofozoítos de *G. lamblia*.

Fracción	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₉₀ (µg/mL)
Metanol (CDC-1A)	8.17 (8.17-8.22) ^a	1573.26 (1514.86–1634.63) ^a
Hexano (CDC-2A)	4.43 (4.44-4.42)	76.21 (77.01–75.43)
CH ₂ Cl ₂ (CDC-2B)	2.12 (2.13-2.11)	135.52 (138.06–133.02)
AcOEt (CDC-2C)	9.52 (9.56-9.48)	311.39 (317.72–305.25)
BuOH (CDC-2D)	6.50 (6.52-6.48)	102.31 (103.52–101.12)
Acuosa (CDC-2E)	N.E. ^b	N.E. ^b
Metronidazol (MTZ)	0.021	0.01

^a 95% de intervalo de confianza.

^b N.E. = Fracción no evaluada

Una vez determinada la actividad *in vitro* contra los trofozoítos de *G. lamblia*, el extracto metanólico fue evaluado ante la línea celular MDCK, para determinar la posible toxicidad del extracto. Los resultados de esta evaluación se muestran en el Cuadro 3.2

Cuadro 3.2. Evaluación de citotoxicidad contra la línea celular MDCK.

Fracción	CC ₅₀ (µg/mL)	CC ₉₀ (µg/mL)
Metanol (CDC-1A)	214.2 (212.2-216.4) ^a	1359.6 (1335.1–1384.7) ^a

^a 95% de intervalo de confianza.

Este resultado es indicativo de la baja toxicidad que presenta el extracto con respecto a la dosis necesaria para inhibir al 50% de la población de trofozoítos de *G. lamblia* (CI₅₀ = 8.17 µg/mL), ya que para afectar al mismo

porcentaje de células normales se requieren de 214.2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que para los trofozoítos de *G. lamblia* se requiere una dosis 26 veces menor, lo que confiere un amplio margen de seguridad.

3.2. DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE *Cupania dentata*

El aislamiento de los compuestos del extracto de *C. dentata* se llevó a cabo mediante el empleo de diversas técnicas cromatográficas de presión baja y media.

3.2.1. Aislamiento de los compuestos de la fracción hexánica

Tomando como base los resultados de la actividad biológica, se comenzó con la purificación de los componentes de la fracción de hexano, al poseer una mejor $\text{CI}_{90} = 76.21 \mu\text{g/mL}$, lo que indica una mayor toxicidad contra los trofozoítos de *G. lamblia* que el resto de las fracciones.

El extracto hexánico (6 g) fue purificado mediante una CLV, utilizándose mezclas en polaridad ascendente de hexano/acetato de etilo y acetato de etilo/acetona, colectándose un total de 30 fracciones de 250 mL c/u. El análisis por CCF permitió la reunión de 12 fracciones.

3.2.1.1. Aislamiento e identificación de taraxerona (Compuesto I, CDC-6B1)

En la fracción 6 (Cuadro 3.1), se obtuvo un precipitado, el cual fue lavado con hexano, para dar 16.0 mg del compuesto I en forma de cristales blancos.

En su espectro de RMN ^1H se observa la presencia de ocho señales atribuibles a grupos metilo a δ 1.14 (3H, s), 1.09 (3H, s), 1.08 (3H, s), 1.07 (3H, s), 0.95 (3H, s), 0.92 (3H, s), 0.91 (3H, s), 0.83 (3H, s) y un protón vinílico a δ 5.56 (1H, dd, $J = 3.2, 8.2$ Hz). En el espectro de RMN ^{13}C se observaron un total de 30 señales, destacando una señal a δ 217.7, correspondiente a un carbonilo como grupo funcional, así como un par de señales a δ 157.6 y 117.2, que corresponden a carbonos con hibridación sp^2 . Estas señales se tomaron como base para cotejarlas con diversos esqueletos de triterpenos, deduciéndose que el esqueleto de CDC-6B1 es semejante al derivado 3-oxo-28-hidroxi-taraxerol (**35**) (Mahato & Kundu,

1994). Sin embargo, como hacía falta la asignación de un grupo de señales y la de un grupo hidroxilo, que no se observaban en los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C , se analizaron las señales de otro derivado del taraxerol, el taraxeril *cis-p*-hidroxicinamato (**36**) (Kokpol *et al.*, 1990) (Figura 3.1). Partes de ambas estructuras explican la totalidad de las señales observadas en el compuesto I, como lo es la señal del carbonilo presente en **35** y los ocho metilos presentes en **36**. La combinación de estos datos da como resultado la identificación del compuesto I como taraxerona, lo que se confirma al cotejar los datos del compuesto I con los reportados en la literatura para la taraxerona.

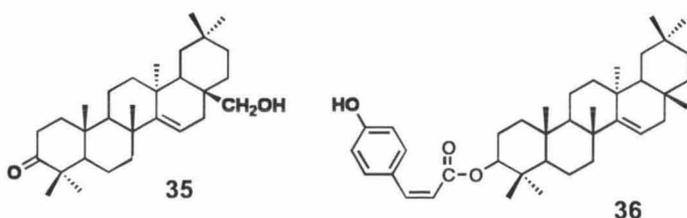


Figura 3.1. Metabolitos con esqueleto de tipo taraxerano.

Los desplazamientos de carbono correspondientes al compuesto I se muestran en el Cuadro 3.3, los cuales fueron comparados con los reportados en la literatura para la taraxerona, también conocida como skimmiona o 3-oxo-D-friedoolean-14-eno, con lo que se pudo confirmar la estructura. Los desplazamientos de la taraxerona fueron realizados a 25.0 MHz en CDCl_3 con TMS como señal estándar (Ahmad & Rahman, 1994; Sakurai *et al.*, 1987) (Cuadro 3.3, Figura 3.2, Figura 4.3).

Cuadro 3.3. Comparación del compuesto I con los datos reportados en la literatura de taraxerona (Ahmad & Rahman, 1994; Sakurai *et al.*, 1987).

Carbono	Compuesto I (ppm)	TARAXERONA (ppm)
C-1	38.3	38.4
C-2	34.1	34.1
C-3	217.7	217.3
C-4	47.6	47.6
C-5	55.8	55.8
C-6	19.9	20.0
C-7	35.1	35.2
C-8	38.9	38.9
C-9	48.7	48.7
C-10	37.5	37.6
C-11	17.4	17.5
C-12	35.8	35.8 ^a
C-13	37.7	37.7
C-14	157.6	157.6
C-15	117.2	117.2
C-16	36.7	36.7 ^a
C-17	37.7	37.7
C-18	48.7	48.8
C-19	40.6	40.7
C-20	28.8	28.8
C-21	33.5	33.6
C-22	33.1	33.1
C-23	26.1	26.2
C-24	21.5	21.5
C-25	14.8	14.8
C-26	29.8	29.9
C-27	25.6	25.6
C-28	29.9	29.9
C-29	33.3	33.4
C-30	21.3	21.4

^a Estos valores pueden ser intercambiados.

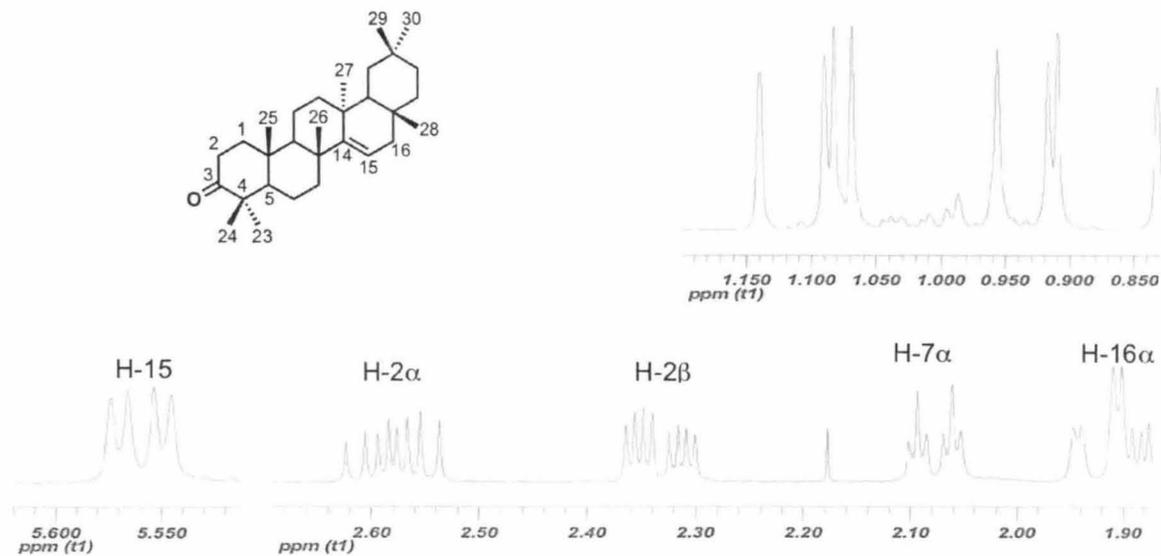


Figura 3.2. Espectro de RMN ^1H de taraxerona.

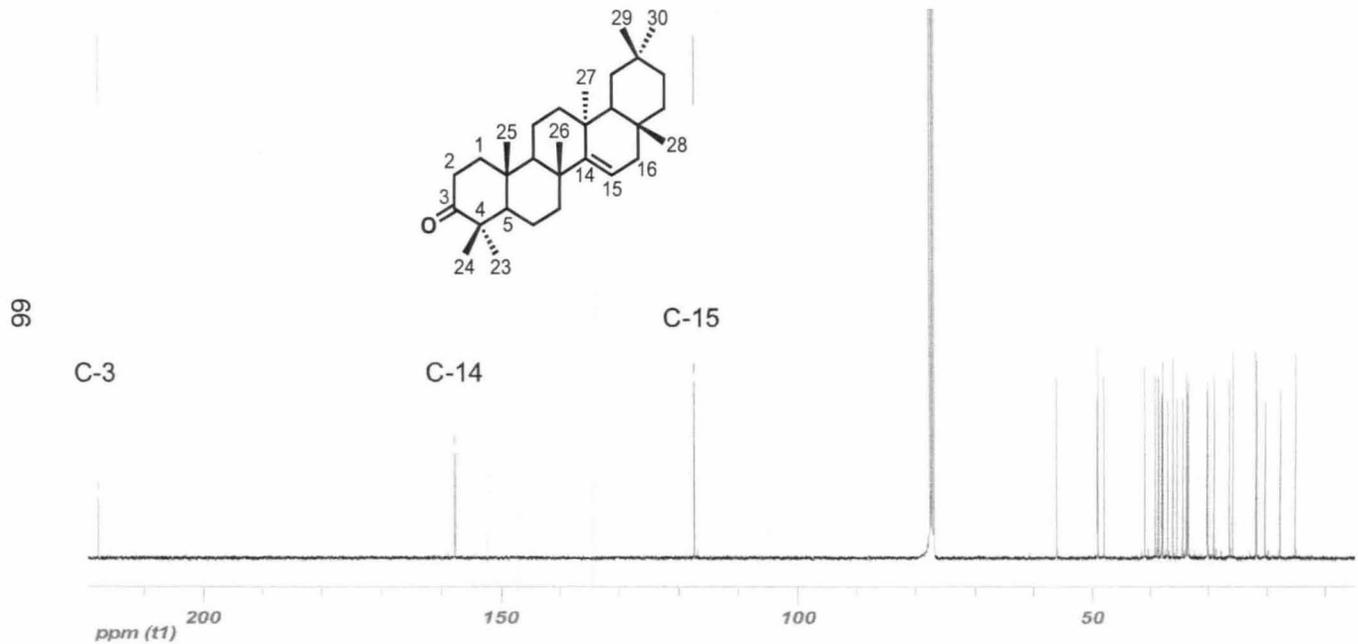


Figura 3.3. Espectro de RMN ^{13}C de taraxerona

La identificación como taraxerona se corroboró mediante el análisis del patrón de fragmentación del compuesto I, en donde se identificaron los fragmentos a m/z 300, 285, 204 y 133 (Figura 3.4), que son característicos de este tipo de esqueleto (Branco *et al.*, 2004), con un pico base a m/z 204 que se forma del anillo D y E por el Δ^{14} -taraxereno y un fragmento a m/z 300 originado mediante una descomposición tipo retro Diels-Alder, generándose una ruptura en el anillo D (Branco *et al.*, 2004; Villegas *et al.*, 1997).

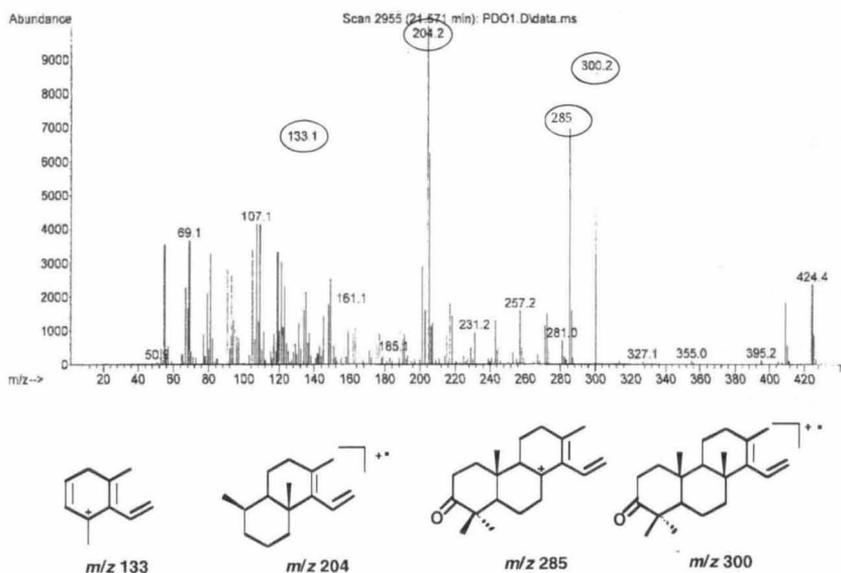


Figura 3.4. Fragmentos observados en el espectro de masas de taraxerona.

La taraxerona es un metabolito ampliamente distribuido en plantas, se ha aislado de especies como *Crossostephium chinense* Makino (Compositae) (Sasaki *et al.*, 1965) y *Taraxacum officinalis*, llamada diente de león, a partir de la cual se han aislado triterpenos del tipo taraxerano y taraxasterano, además de esteroleos, lactonas y flavonoides. Entre sus usos medicinales, se incluye el tratamiento de infecciones del tracto urinario, molestias del hígado y la vesícula, además de promover el apetito (Hall Ramírez *et al.*, 2002). De forma pura la taraxerona ha sido reportada con actividad alelopática y antifúngica, entre otras (Macías-Rubalcava *et al.*, 2007; Magadula & Erasto, 2009).

3.2.1.2. Aislamiento e identificación de taraxerol (Compuesto II, CDC-6B2)

En la fracción 8 (Cuadro 2.2) se obtuvo un precipitado, el cual fue lavado con hexano, para dar 52.2 mg del compuesto II en forma de cristales blancos.

El análisis de sus espectros de RMN ^{13}C y RMN ^1H mostró una gran similitud con los de la taraxerona: se observaron 30 señales de carbono, así como ocho singuletes correspondientes a ocho metilos. El espectro de RMN- ^1H del compuesto II (Figura 3.5) se distingue principalmente del de taraxerona en las señales de los protones H-2 y H-5, que ya no se observan debido a su traslapamiento con las señales de los demás metileno de la molécula. Adicionalmente, a δ 3.20 se observa una señal doble de dobles del protón en C-3 sustituido con un hidroxilo, siendo este H-3, cuyas J 's de 4.7 y 13.0 Hz indican una orientación β -ecuatorial del grupo hidroxilo. La señal del protón en H-15 aparece a δ 5.53 al igual que en la taraxerona. En el espectro de RMN ^{13}C se observó una nueva señal a δ 79.1 (Figura 3.6), que es característica de carbonos secundarios que soportan un grupo hidroxilo, mientras que la señal a δ 217.0, que se observa en la taraxerona, desaparece; estos datos coinciden con la presencia de un grupo hidroxilo en C-3, resultando en la molécula conocida como taraxerol (**37**) (Mahato & Kundu, 1994; Sakurai *et al.*, 1987) (Cuadro 3.4).

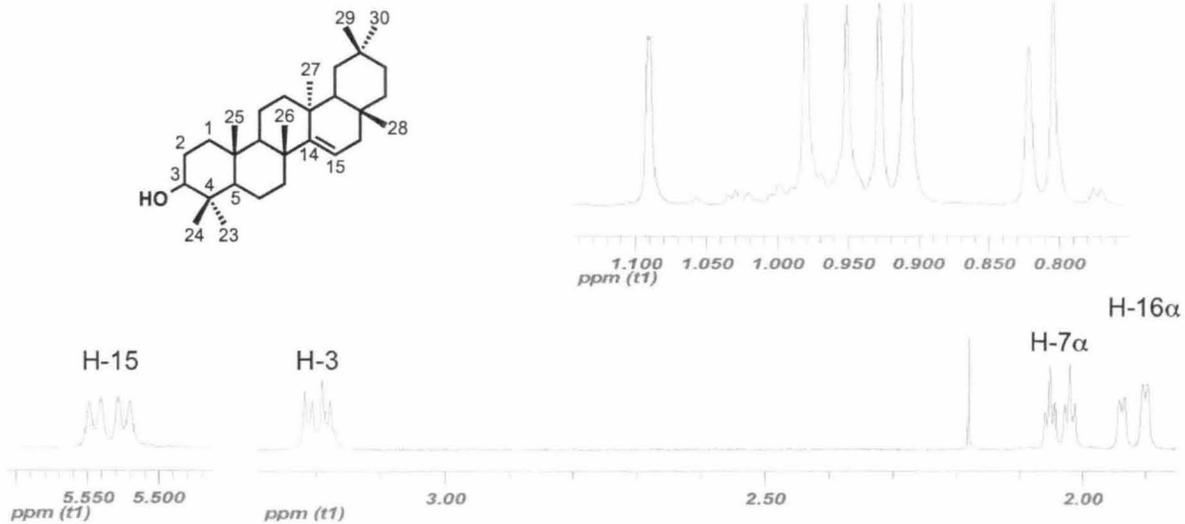


Figura 3.5. Espectro de RMN ^1H de taraxerol.

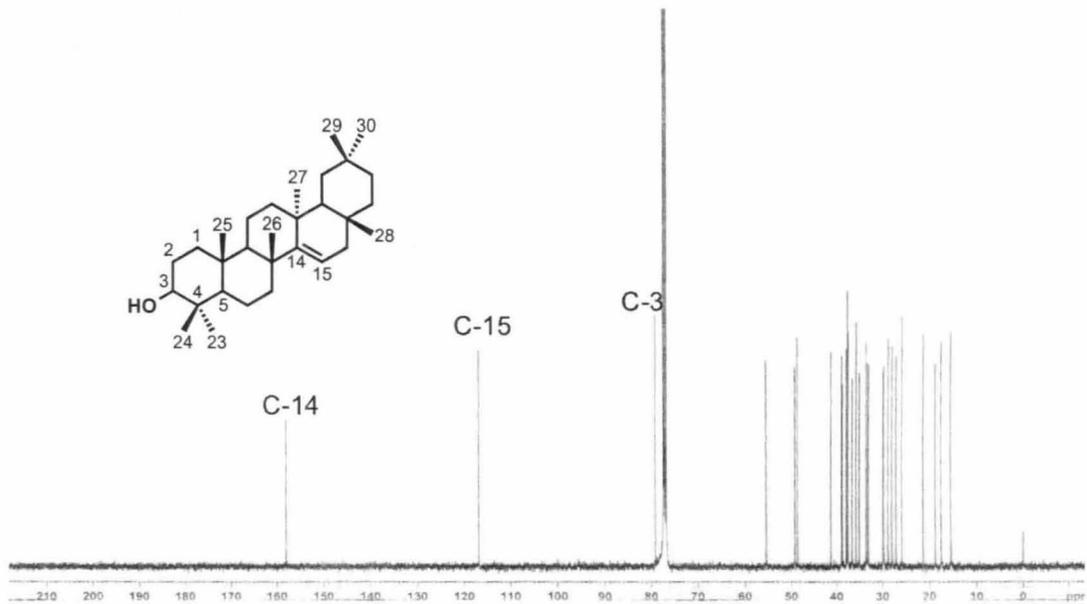


Figura 3.6. Espectro de RMN ^{13}C del taraxerol.

Cuadro 3.4. Comparación del compuesto II con los datos de taraxerol reportados en la literatura (Mahato & Kundu, 1994; Sakurai *et al.*, 1987).

Carbono	Compuesto II (ppm)	TARAXEROL (ppm)
C-1	38.0	38.1
C-2	27.1	27.3
C-3	79.1	79.2
C-4	39.0	39.1
C-5	55.5	55.7
C-6	18.8	19.0
C-7	35.1	35.3
C-8	38.7	38.9
C-9	48.7	48.9
C-10	37.5	37.9
C-11	17.5	17.7
C-12	35.8	35.9 ^a
C-13	37.6	37.9
C-14	158.1	158.1
C-15	116.9	117.0
C-16	36.6	36.9 ^a
C-17	37.7	38.1
C-18	49.2	49.4
C-19	41.3	41.4
C-20	28.8	29.0
C-21	33.7	33.9
C-22	33.1	33.2
C-23	28.0	28.1
C-24	15.4	15.6
C-25	15.4	15.6
C-26	29.8	30.1
C-27	25.9	26.0
C-28	29.9	30.1
C-29	33.3	33.5
C-30	21.3	21.5

^a Estos valores pueden ser intercambiados

Al igual que en la taraxerona, en el espectro de masas del taraxerol se pueden observar cuatro señales intensas correspondientes a los fragmentos *m/z* 302, 287, 204 y 135 (Figura 3.7), con un pico base a *m/z* 204 que se forma del anillo D y E por el Δ^{14} -taraxereno; el fragmento a *m/z*

302 es originado mediante una descomposición tipo retro Diels-Alder que genera una ruptura en el anillo D (Branco *et al.*, 2004; Villegas *et al.*, 1997).

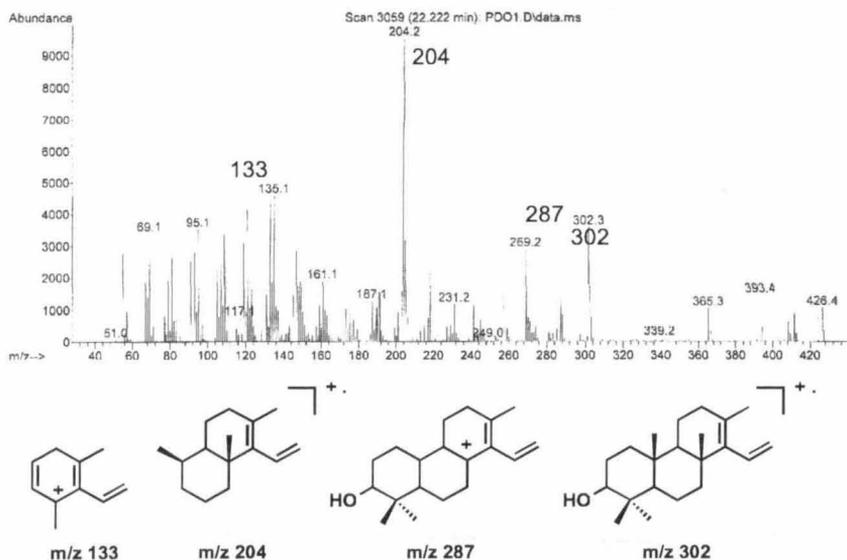


Figura 3.7. Fragmentos observados en el espectro de masas de taraxerol.

El taraxerol fue aislado por primera vez de la corteza de *Alnus incana* L., nombrándosele anulina. Más adelante se demostró la coincidencia de anulina con taraxerol aislado de la raíz de *Taraxacum officinale*. Otro nombre con el que se relaciona al taraxerol es skimmiol, siendo en la actualidad mejor conocido como taraxerol (Beaton *et al.*, 1955). Entre las actividades biológicas que se han descrito para este metabolito, se encuentran la de ser analgésico y anti-inflamatorio (Biswas *et al.*, 2009a; Biswas *et al.*, 2009b).

3.2.1.3. Aislamiento e identificación de la mezcla A (estigmasterol - β -sitosterol, CDC-6E1)

La fracción CDC-6E1 se identificó por CG-EM como una mezcla de los esteroleos stigmasterol (**38**) y β -sitosterol (**39**), en proporción 2:1, mediante el uso de la base de datos del equipo (Figura 3.8). Esta mezcla está ampliamente distribuida en el reino vegetal. El β -sitosterol posee

actividad antibacteriana, antimicótica y como inhibidor de la carcinogénesis (Raicht *et al.*, 1990), mientras que el estigmasterol se ha encontrado que inhibe la promoción de tumores en etapa II de carcinogénesis en ratones (Kasahara *et al.*, 1994) y posee efecto inhibitorio contra la transcriptasa reversa en VIH (Akihisa *et al.*, 2001); ambos esteroides tienen actividad anti-inflamatoria en aplicaciones tópicas (Gómez *et al.*, 1999) (Figura 3.8).

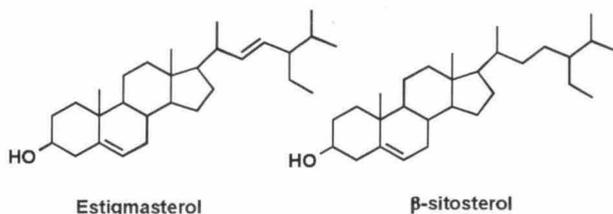


Figura 3.8. Esteroides componentes de la mezcla **A**

3.2.2. Aislamiento de los compuestos de la fracción de diclorometano

Al igual que la fracción de hexano, la fracción diclorometánica (CDC-2B) resultó activa en el bioensayo de inhibición de crecimiento contra *G. lamblia*, con un valor de Cl_{50} de 2.12 $\mu\text{g/mL}$ y un Cl_{90} de 135.52 $\mu\text{g/mL}$.

En la fracción diclorometánica se detectó un metabolito fluorescente azul bajo luz UV a onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm), por lo que se procedió a su purificación.

3.2.2.1. Obtención del compuesto III (CDC-23D1)

El compuesto III se obtuvo mediante una CCEM de la fracción de diclorometano, empleando el polímero Sephadex-LH20. La columna se realizó con gradiente de polaridad siguiendo la metodología descrita por Cardellani II *et al.* (1983), con una posterior purificación mediante una cromatografía por gravedad con mezclas de diclorometano/metanol. Los 2.1 mg del compuesto III se emplearon en diferentes comparaciones por placa fina y otros análisis para determinar su identidad. Sin embargo, ésta no pudo ser determinada al igual que la actividad biológica del mismo.

3.2.2.2. Obtención del compuesto IV (CDC-24J1)

El compuesto **IV** se obtuvo de otra fracción de la CCEM descrita anteriormente, a la cual le siguió una CCG. Este compuesto presentó una naturaleza polar y mediante los experimentos realizados no se logró la elucidación de su estructura, debido a la complejidad de las señales observadas.

3.2.2.3. Aislamiento e identificación de escopoletina (Compuesto V, CDC-27E1)

La fracción de diclorometano fue purificada mediante una CLV en polaridad ascendente con mezclas de hexano, diclorometano y metanol, obteniéndose siete fracciones finales (CDC-25A – CDC-25F).

En la fracción CDC-25D (538.1 mg) se detectó la presencia de un compuesto fluorescente, por lo que se continuó con su fraccionamiento con una CCG en polaridad ascendente con mezclas de diclorometano/metanol, reuniéndose un total de 11 fracciones (CDC-26A – CDC-26K). En la fracción CDC-26C (136.9 mg) se observó la presencia de este metabolito azul, por lo que se purificó en una CCG con mezclas de cloroformo/metanol en polaridad ascendente, para dar origen a un total de 11 fracciones finales. En dos de estas fracciones se detectó la presencia de cristales amarillos que se lavaron con hexano y las aguas madres se separaron del precipitado, obteniendo así el compuesto **V** (18.3 mg).

El compuesto **V** se analizó por RMN ^1H y RMN ^{13}C . En el espectro de RMN ^1H se puede observar un par de dobletes a δ 6.21 y 7.86, los cuales se acoplan uno al otro, ya que ambos presentan una $J = 9.5$ Hz y cuya naturaleza es vinílica; se observan también dos singuletes pertenecientes a dos protones vinílicos, los cuales se encuentran aislados el uno del otro y que poseen desplazamientos de δ de 6.78 y 7.13, así como un singulete que integra para tres protones a δ 3.91, que concuerda con una señal de un grupo metoxilo. El espectro de RMN ^{13}C , en conjunto con el espectro de RMN ^1H y la fluorescencia azul del compuesto **V**, nos confirman la identidad del mismo como escopoletina (Öksüz *et al.*, 2002), observándose un desplazamiento a δ 164.1, correspondiente al carbonilo lactónico α,β -insaturado en C-2; ocho carbonos con hibridación sp^2 , que conforman el anillo bencénico; el doble enlace α al carbonilo lactónico; y una señal a δ 56.8, correspondiente al carbono del metoxilo, cuyos protones también se observan en el espectro de RMN ^1H (Cuadro 3.5, Figura 3.9, Figura 3.10).

Cuadro 3.5. Comparación de los desplazamientos del compuesto **V** con los reportados para escopoletina (Öksüz *et al.*, 2002).

	Compuesto V	Escopoletina
H-3	6.21 (d, $J = 9.4$ Hz)	6.28 (d, $J = 9.5$ Hz)
H-4	7.86 (d, $J = 9.5$ Hz)	7.61 (d, $J = 9.5$ Hz)
H-5	6.78 (s)	6.84 (s)
H-8	7.13 (s)	6.92 (s)
OMe	3.91 (s)	3.96 (s)

La escopoletina posee un potente efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria (Okada *et al.*, 1995), también es activa como inhibidor de la liberación de eicosanoides en macrófagos peritoneales de ratón (Silvan *et al.*, 1996), además se ha encontrado que inhibe a la prostaglandina sintasa de una manera dosis-dependiente, teniendo una acción inhibitoria cinco veces mayor a la de la aspirina (Mohamed-Hussein and Gunnar, 1992). Otra actividad biológica es su interacción en la relación planta-patógeno, actuando como un antibiótico de amplio espectro, además de ser un excelente sustrato de peroxidasa, fungiendo como capturadora de especies reactivas de oxígeno, previniendo o reduciendo de esta manera el daño oxidativo de las células en las plantas (Bednarek *et al.*, 2005).

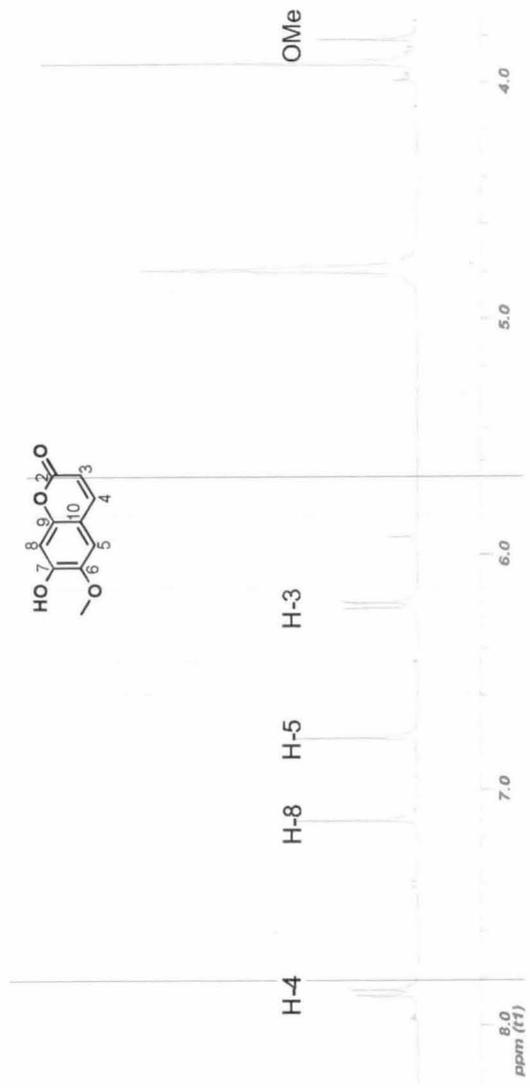


Figura 3.9. Espectro de RMN ¹H de escopoletina

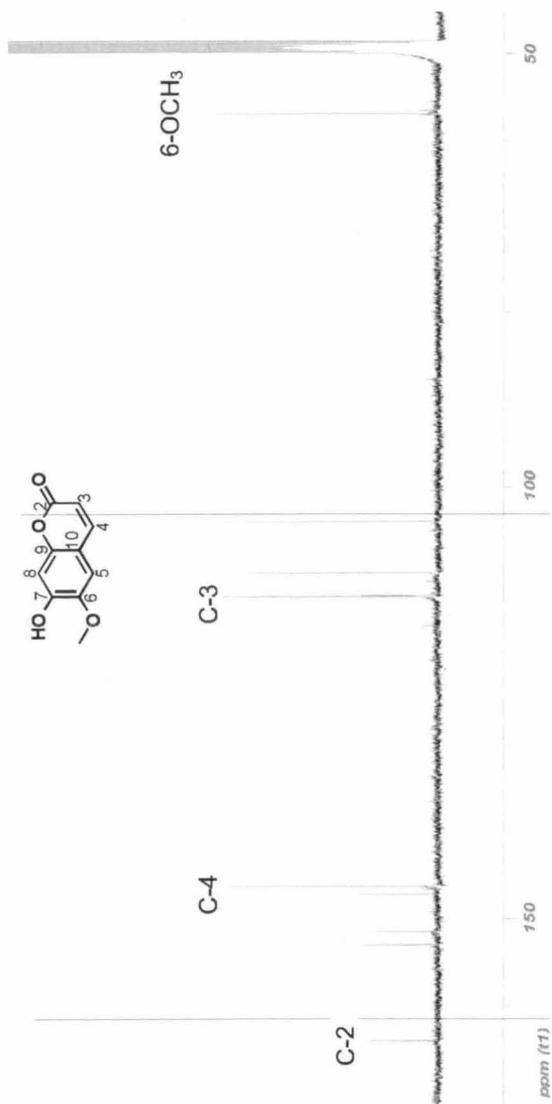


Figura 3.10. Espectro de RMN ^{13}C de escopoletina.

3.2.2.4. Obtención del compuesto VI (CDC-36E1)

El compuesto **VI** es de naturaleza polar y la complejidad de las señales observadas en su espectro de RMN ^1H , indicó la presencia de posibles impurezas, por lo que su estructura no pudo ser determinada.

3.2.3. Aislamiento de los compuestos de la fracción de acetato de etilo

De la fracción de acetato de etilo (CDC-2C) se obtuvo un par de compuestos (CDC-17B1 y CDC-17C1), que representan en conjunto alrededor del 26% de esta fracción. Sin embargo, en los experimentos de RMN ^1H se observaron impurezas, por lo que la identidad de ambos compuestos no pudo ser determinada.

3.2.4. Aislamiento de los compuestos presentes en la fracción butanólica

La fracción butanólica (CDC-2D) se obtuvo como fracción final de la partición líquido-líquido del extracto metanólico.

3.2.4.1. Aislamiento e identificación de la mezcla B (glucósido de estigmasterol – glucósido de β -sitosterol, CDC-45D1)

La fracción butanólica fue purificada mediante una CEM con Sephadex LH-20, empleándose un gradiente de elución con mezclas de metanol/butanol/agua, obteniéndose nueve fracciones (CDC-43A - CDC-43I). La fracción CDC-43D, soluble en piridina, fue purificada mediante una CCG con el sistema $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{ácido fórmico}$ (20:2:1), resultando en el aislamiento de la mezcla B (CDC-45D1). Se obtuvieron 100.4 mg de un sólido blanco amorfo.

Algunas de las señales que destacan en RMN ^{13}C son: δ 102.9, 79.0, 78.9, 75.7, 72.0 y 63.2 (Figura 4.11), que en conjunto conforman las señales de un carbohidrato. La señal a δ 102.9 corresponde al carbono anomérico del azúcar; δ 79.0, 78.9, 75.7 y 72.0, a carbonos secundarios sustituidos con grupos hidroxilo y, por último, δ 63.2 es la señal de un carbono primario sustituido por un grupo hidroxilo. Debido a la gran cantidad de señales que se observan en el espectro de RMN ^{13}C , se sospechó que esta fracción correspondía a una mezcla de metabolitos con un esqueleto común. A partir de las señales observadas a δ 141.2, 139.2, 129.8 y 122.3, se realizó una

búsqueda bibliográfica para encontrar el esqueleto base de la estructura, y como resultado de esta búsqueda se determinó que esta mezcla correspondía a los glucósidos de los esteroides β -sitosterol y estigmasterol (Kojima *et al.*, 1990) (Cuadro 3.6).

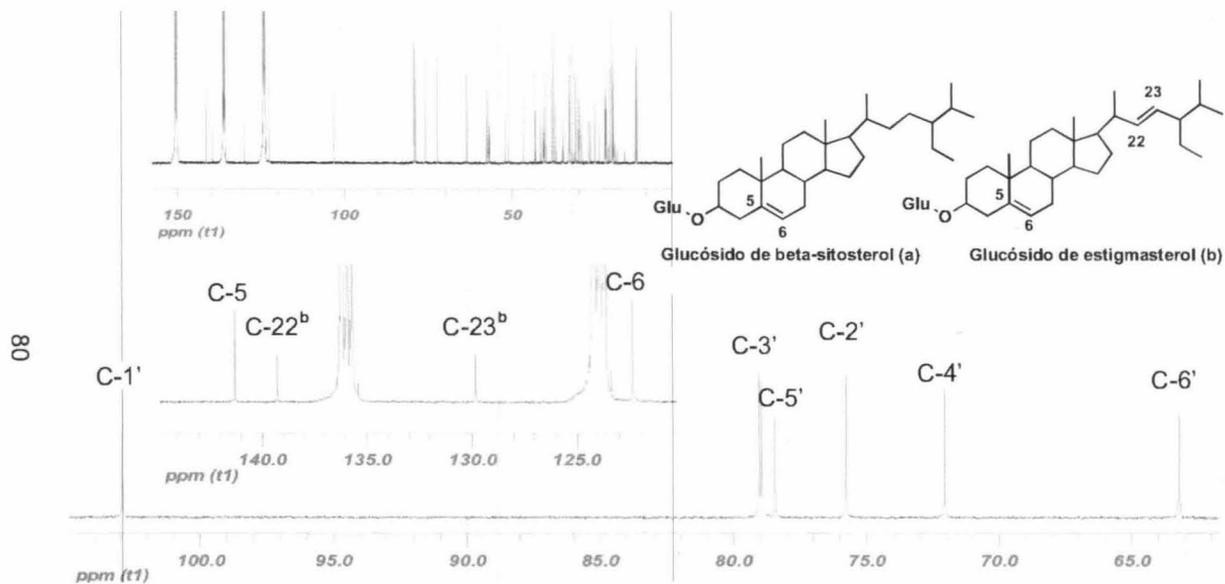


Figura 3.11. Espectro de RMN ^{13}C de la mezcla B.

Cuadro 3.6. Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos de la mezcla **B** con los de los glucósidos de estigmasterol y β -sitosterol. Las señales se obtuvieron en piridina- d_5 (Kojima *et al.*, 1990).

Mezcla B δ (ppm)	β -Sitosterol ^a δ (ppm)	Estigmasterol ^b δ (ppm)
37.8 (C-1)	37.6 (C-1)	37.6 (C-1)
30.6 (C-2)	30.3 (C-2)	30.3 (C-2)
78.4 (C-3)	78.3 (C-3)	78.3 (C-3)
39.4 (C-4)	39.4 (C-4)	39.4 (C-4)
141.2 (C-5)	141.0 (C-5)	141.0 (C-5)
122.3 (C-6)	122.0 (C-6)	122.0 (C-6)
32.4 (C-7)	32.2 (C-7)	32.2 (C-7)
32.0 (C-8)	32.1 (C-8)	32.1 (C-8)
50.7 (C-9)	50.4 (C-9)	50.4 (C-9)
37.3 (C-10)	37.0 (C-10)	37.0 (C-10)
21.6 (C-11)	21.4 (C-11)	21.4 (C-11)
40.2 (C-12) ^a	40.0 (C-12)	
39.7 (C-12) ^b		39.9 (C-12)
42.8 (C-13) ^a	42.6 (C-13)	
42.7 (C-13) ^b		42.4 (C-13)
57.3 (C-14) ^b		57.1 (C-14)
57.2 (C-14) ^a	57.0 (C-14)	
24.9 (C-15) ^b		24.4 (C-15)
24.9 (C-15) ^a	24.3 (C-15)	
29.7 (C-16) ^b		29.4 (C-16)
28.9 (C-16) ^a	28.7 (C-16)	
56.6 (C-17) ^a	56.3 (C-17)	
56.4 (C-17) ^b		56.2 (C-17)
12.5 (C-18) ^b		12.3 (C-18)
12.3 (C-18) ^a	12.0 (C-18)	
19.3 (C-19)	19.3 (C-19)	19.3 (C-19)
41.2 (C-20) ^b		40.9 (C-20)
36.5 (C-20) ^a	36.5 (C-20)	
21.8 (C-21) ^b		21.7 (C-21)
18.7 (C-21) ^a	19.1 (C-21)	
139.2 (C-22) ^b		138.9 (C-22)
34.5 (C-22) ^a	34.3 (C-22)	
129.8 (C-23) ^b		129.5 (C-23)
26.7 (C-23) ^a	26.4 (C-23)	
51.8 (C-24) ^b		51.5 (C-24)
46.7 (C-24) ^a	46.1 (C-24)	
32.5 (C-25) ^b		32.2 (C-25)

3.4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA CONTRA LOS TROFOZOÍTOS DE *G. lamblia*

La actividad biológica de las fracciones y compuestos puros se evaluó en el bioensayo de inhibición de crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* (Cuadro 3.7), empleándose como control positivo el metronidazol. Las fracciones evaluadas fueron el extracto metanólico (CDC-1A), así como los extractos subsecuentes de hexano (CDC-2A), diclorometano (CDC-2B), acetato de etilo (CDC-2C) y de butanol (CDC-2D).

Cuadro 3.7. Actividad biológica de fracciones y compuestos puros de *C. dentata*.

Fracción o compuesto	CI ₅₀ (µg/mL)	CI ₉₀ (µg/mL)
Extracto MeOH	8.17 (8.17-8.22) ^a	1573.26 (1514.9–1634.6)
Extracto Hx	4.43 (4.44- 4.42)	76.21 (77.01–75.43)
Taraxerona (I)	11.33 (11.30-11.36)	63.31 (62.90-63.72)
Taraxerol (II)	16.11 (16.05-16.17)	102.40 (101.51-103.31)
Mezcla A	5.23 (5.22-5.24)	32.74 (32.57-32.91)
Extracto CH ₂ Cl ₂	2.12 (2.13-2.11)	135.52 (138.06–133.02)
Compuesto III	ND ^b	ND
Compuesto IV	31.33 (31.07-31.60)	1568.9 (1525.93-1613.36)
Escopoletina (V)	33.60 (33.4-33.8)	282.55 (279.2-286.0)
Compuesto VI	ND	ND
Extracto AcOEt	9.52 (9.56-9.48)	311.39 (317.72–305.25)
Compuesto VII	17.82 (17.66-17.99)	9770.12 (9223.0-10349.7)
Compuesto VIII	35.73 (35.60-35.85)	517.49 (512.62-522.41)
Extracto BuOH	6.50 (6.52-6.48)	102.31 (103.52–101.12)
Mezcla B	26.77 (26.69-26.86)	386.63 (383.47-389.88)
Compuesto IX	NA ^c	NA
Metronidazol	0.21 (0.15-0.27)	1.28 (0.88-1.68)

^a En paréntesis intervalo de confianza 95%.

^b ND = No determinado.

^c NA = No activo.

Los metabolitos secundarios aislados de *C. dentata* resultaron con actividad media, siendo la taraxerona el metabolito más activos con una CI₅₀ = 11.33 µg/mL y un índice de efectividad de 5.60 (Cuadro 3.8), mucho mayor que el metronidazol, empleado como control positivo. Sin embargo, en comparación con otros productos naturales encontrados en la literatura, su actividad puede considerarse buena. En los últimos años, las moléculas más activas encontradas contra *G. lamblia* han sido la 21β-hidroxiolcano-

12-en-3-ona ($Cl_{50} = 0.11 \mu M$) y la dzununcanona ($Cl_{50} = 0.74 \mu M$); sin embargo, estos metabolitos fueron igualmente tóxicos en el bioensayo de citotoxicidad con células normales (Mena-Rejón *et al.*, 2007). Otro metabolito aislado recientemente es el galacto-glicerolípido con una $Cl_{50} = 3.7 \mu g/mL$, aislado de *Oxalis corniculata* (Manna *et al.*, 2010).

Cuadro 3.8. Índices de efectividad de los compuestos y fracciones de *C. dentata*.

Fracción o compuesto	Índice de efectividad Cl_{90}/Cl_{50}
CDC-1A	192.56
CDC-2A	17.20
Taraxerona (I)	5.60
Taraxerol (II)	6.36
Mezcla A	6.26
CDC-2B	63.92
Compuesto IV	50.08
Escopoletina (V)	8.40
CDC-2C	32.71
Compuesto VII	548.27
Compuesto VIII	14.48
CDC-2D	15.74
Mezcla B	14.44
Compuesto IX	ND
Metronidazol	6.09

En una revisión en la literatura (Amaral *et al.*, 2006), se pudieron encontrar 22 metabolitos con actividad comparable a la taraxerona con una $Cl_{50} = 11.33 \mu g/mL$, entre los que podemos mencionar el flavonoide kaempferol aislado de *Helianthemum glomeratum*, con una $Cl_{50} = 8.73 \mu g/mL$ (Calzada *et al.*, 1999); isorhamnetina, otro flavonoide aislado de *Conyza flaginoides*, con una $Cl_{50} = 15.3 \mu g/mL$ (Calzada *et al.*, 2001); mientras que de *Teloxys graveolens*, el compuesto más activo aislado fue el melilotósido con una $Cl_{50} = 16.8 \mu g/mL$, inclusive menor que la encontrada para taraxerol que presentó una $Cl_{50} = 16.11 \mu g/mL$, siendo esta actividad comparable con la encontrada para el tilirósido, que fue el componente más activo aislado de la parte aérea de *Helianthemum glomeratum*; mientras que la quercitrina, aislada de la misma planta mostró una $Cl_{50} = 24.3 \mu g/mL$ (Calzada & Alanis, 2007); de la especie vegetal *Zanthoxylum liebmannianum* se obtuvo como molécula más activa la asarina con una $Cl_{50} = 35.45 \mu g/mL$ (Arrieta *et al.*, 2001). La comparación estructural entre la taraxerona, taraxerol y su derivado acetilado implica cambios en el grupo

funcional de C-3, siendo importante la oxidación de esta posición para la actividad, mientras que la sustitución por un grupo funcional de mayor tamaño vuelve inactivo al derivado acetilado, posiblemente debido a un impedimento estérico.

La mezcla **A** que contiene a los esteroides estigmasterol y β -sitosterol (2:1) mostró la mayor actividad, con un $CI_{50} = 5.23 \mu\text{g/mL}$ y un índice de efectividad de 6.26, contrastando su valor de CI_{50} con lo reportado para el β -sitosterol con un $CI_{50} = 71.1 \mu\text{g/mL}$ (Arrieta *et al.*, 2001; Calzada, 2005). La mayor actividad puede deberse a la mayor concentración del estigmasterol en la mezcla y a un posible efecto sinérgico entre ambos esteroides, siendo necesarios más análisis para poder confirmar esta hipótesis.

La mezcla **B**, compuesta por los glucósidos de los esteroides ya mencionados, presentó una menor actividad, con un $CI_{50} = 26.77 \mu\text{g/mL}$ y un índice de efectividad de 14.44, más del doble que la mezcla **A**. Esta diferencia de actividad se debe a las diferentes proporciones de los esteroides y la sustitución del hidroxilo en C-3 por el carbohidrato glucosa. En algunos casos como los antibióticos, la adición de carbohidratos como sustituyentes favorece la actividad al facilitar la disponibilidad de la molécula en un medio más acuoso, mejorando así factores farmacocinéticos como la biodisponibilidad del fármaco (Kren & Martinkova, 2001)

La escopoletina (compuesto **V**) mostró una actividad moderada con una $CI_{50} = 33.60 \mu\text{g/mL}$ y un índice de efectividad de 8.40. Del mismo modo, otros metabolitos aislados (**IV**, **VII** y **VIII**) presentaron actividad moderada, pero estos aún no han sido identificados.

El fraccionamiento del extracto metanólico ($CI_{50} = 8.17 \mu\text{g/mL}$) mejoró la actividad, ya que las fracciones obtenidas presentan mayor actividad. La fracción hexánica fue la más activa, con un $CI_{50} = 4.43 \mu\text{g/mL}$ y un índice de efectividad de 17.20, superando a la fracción de diclorometano, en especial al comparar su índice de efectividad de 63.92, indicando la mayor toxicidad para los trofozoítos de la primera fracción. El aumento de la actividad de las fracciones subsecuentes del extracto hexánico nos demuestra el potencial de esta especie vegetal para su empleo en el tratamiento de la giardiasis.

3.5. REFERENCIAS

- Ahmad, V. U. and A. U. Rahman. (1994). Handbook of Natural Products Data: *Pentacyclic triterpenoids*. Elsevier Science Publishers. 509 p.
- Akihisa, T., J. Ogihara, J. Kato, K. Yasukawa, M. Ukiya, S. Yamanouchi and K. Oishi (2001). *Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase*. Lipids, 36(5), 507-512.
- Amaral, F. M. M., M. N. S. Ribeiro, J. M. Barbosa-Filho, A. S. Reis, F. R. F. Nascimento and R. O. Macedo (2006). *Plants and chemical constituents with giardicidal activity*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 16(suppl.), 696-720.
- Arrieta, J., B. Reyes, F. Calzada, R. Cedillo-Rivera and A. Navarrete (2001). *Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of Zanthoxylum liebmannianum*. Fitoterapia, 72(3), 295-297.
- Beaton, J. M., F. S. Spring, R. Stevenson and J. L. Stewart (1955). *Triterpenoids part. XXXVIII. The constitution of Taraxerol*. Journal of the Chemical Society (Resumed), 2131-2137.
- Bednarek P., B. Schneider, A. Svatos, N. J. Oldhan and K. Hahlbrock (2005). *Structural complexity, differential response to infection, and tissue specificity of indolic and phenylpropanoid secondary metabolism in Arabidopsis roots*. Plant Physiology, 138, 1058-1070.
- Biswas, M., K. Biswas, A. K. Ghosh and P. K. A. Haldar (2009a). *Pentacyclic triterpenoid possessing anti-inflammatory activity from the fruits of Dregea volubilis*. Pharmacognosy Magazine, 5(19), 64-68.
- Biswas, M., K. Biswas, A. K. Ghosh and P. K. A. Haldar (2009b). *Pentacyclic triterpenoid possessing anti-inflammatory activity from the fruits of Dregea volubilis*. Pharmacognosy Magazine, 5(19), 90-92.
- Branco, A., A. C. Pinto and R. B. Filho (2004). *Chemical constituents from Vellozia graminifolia (Velloziaceae)*. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 76(3), 505-518.
- Calzada, F., M. Meckes and R. Cedillo-Rivera (1999). *Antiamoebic and anti-giardial activity of plants flavonoids*. Planta Medica, 65(1), 78-80.

- Calzada, F., R. Cedillo-Rivera and R. Mata (2001). *Antiprotozoal activity of the constituents of Conyza filaginoides*. Journal of Natural Products, 64(5), 671-673.
- Calzada F. (2005). *Additional antiprotozoal constituents from Cuphea pinetotum, a plant used in Mayan tradicional medicine to treat diarrhea*. Phytotherapy Research 19, 725-727.
- Calzada, F. and A. D. Alanis (2007). *Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of Helianthemum glomeratum*. Phytotherapy Research, 21(1), 78-80.
- Gómez, M. A., M. T. Sáenz, M. D. García and M. A. Z. Fernández (1999). *Study of the topical anti-inflammatory activity of Achillea ageratum on chronic and acute inflammation models*. Zeitschrift für Naturforschung C, 54c(11), 937-941.
- Hall-Ramírez, V., M. Rocha-Palma and E. Rodríguez-Vega (2002). *Plantas Medicinales Volumen II*. Centro Nacional de Información de Medicamentos, Universidad de Costa Rica. 40 p.
- Kasahara, Y., K. Kumaki, S. Katagiri, K. Yasukawa, S. Yamonouchi, M. Takido, T. Akihisa and T. Tamuta, (1994). *Carthami flos extract and its component, stigmasterol, inhibit tumour promotion in mouse skin two-stage carcinogenesis*. Phytotherapy Research, 8(6), 327-331.
- Kojima, H., N. Sato, A. Hatano and H. Ogura, (1990). *Sterol glucosides from Prunella vulgaris*. Phytochemistry, 29(7), 2351-2355.
- Kokpol, U., and W. Chavasiri, W. (1990). *Taraxeryl cis-p-hydroxycinnamate, a novel taraxeryl from Rhizophora apiculata*. Journal of Natural Products, 53(4),953-955.
- Kren V. and L. Martinkova (2001). *The role of glycosidic residue in biological activity*. Current Medicinal Chemistry, 8(11), 1303-1328.
- Macías-Rubalcava, M. L., B. E. Hernández-Bautista, M. Jiménez-Estrada, R. Cruz-Ortega and A. L. Anaya (2007). *Pentacyclic Triterpenes with Selective Bioactivity from Sebastiania adenophora Leaves, Euphorbiaceae*. Journal of Chemical Ecology, 33(1), 147-156.

- Magadula, J. J. and P. Erasto (2009). *Bioactive natural products derived from the East African flora*. Natural Product Reports, 26(12), 1535-1554.
- Mahato, S.B. and A. S. Kundu (1994). ¹³C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids. A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37(6), 1517-1575.
- Manna, D., P. K. Dutta, B. Achari and A. Lohia (2010). A novel galactoglycerolipid from *oxalis corniculata* kills *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4825-4832.
- Mena-Rejón, G. J., A. R. Pérez-Espadas, R. E. Moo-Puc, R. Cedillo-Rivera, I. L. Bazzocchi, I. A. Jiménez-Díaz and L. Quijano (2007). *Antigiardial activity of triterpenoids from root bark of Hippocratea excelsa*. *Journal of Natural Products*, 70(5), 863-865.
- Mohamed-Hussein, F. and S. Gunnar (1992). *Pharmacologically active phenylpropanoids from Senra incana*. *Planta Medica*, 58(1), 14-18.
- Okada, Y., N. Miyauchi, K. Suzuki, T. Kobayashi, C. Tsutsui, S. Nishibe and T. Okuyama (1995). *Search for naturally occurring substances to prevent the complications of diabetes. II. Inhibitory effect of coumarin and flavonoid derivatives on bovine lens aldose reductase and rabbit platelet aggregation*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43(8), 1385-1387.
- Öksüz, S., A. Ulubelen, A. Barla and W. Voelter (2002). *Terpenoids and aromatic compounds from Euphorbia heteradena*. *Turkian Journal of Chemistry* 26, 457-463.
- Raicht, R. F., B. I. Cohen, E. P. Fazzini, A. N. Sarwal and M. Takahashi (1980). *Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats*. *Cancer Research*, 40(2), 403-405.
- Sakurai, N., Y. Yaguchi and T. Inoue (1987). *Triterpenoids from Myrica rubra*. *Phytochemistry*, 26, 217-219.
- Sasaki, S., S. Aoyagi and H. Y. Hsü (1965). *The isolation of taraxerol, taraxeryl acetate, and taraxerone from Crossostephium chinense Makino (Compositae)*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 13(1), 87-88.

- Silvan, A. M., M. J. Abad, P. Bermejo, M. Soulhuber and A. Villar, (1996). Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *Journal of Natural Products*, 59(12), 1183-1185.
- Villegas, J. H. Y., F. M. Lanças, W. Villegas, and G. L. Pozetti (1997). *Further triterpenes, steroids and furocoumarins from Brazilian medicinal plants of Dorstenia genus (Moraceae)*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 8, 529-535.

Capítulo 4

Conclusiones generales y perspectivas

4.1. CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo representa el primer estudio fitoquímico de la especie *Cupania dentata*. En este estudio se logró el aislamiento e identificación de los triterpenos taraxerol y taraxerona, la cumarina conocida como escopoletina, dos mezclas de los esteroides estigmasterol y β -sitosterol. Una de estas mezclas compuesta por los glucósidos de ambos esteroides. También se preparó el derivado acetilado del taraxerol, cuya actividad se comparó con la de los demás taraxeranos. Se obtuvieron tres metabolitos cuya identificación no se logró debido a la complejidad de las señales al presentar rastros de otros compuestos.

Las fracciones principales y los metabolitos fueron evaluados contra los trofozoítos de *G. lamblia* (Cuadro 4.6). La taraxerona fue el metabolito más activo aislado con un $CI_{50} = 11.33 \mu\text{g/mL}$, seguido por el taraxerol con un $CI_{50} = 16.11 \mu\text{g/mL}$ y la escopoletina con un $CI_{50} = 33.60 \mu\text{g/mL}$. Cabe destacar que este es el primer reporte de estos metabolitos con actividad biológica en el modelo de *Giardia lamblia*.

La modificación en el C-3 del taraxerol adicionando un grupo acetato inactivó la molécula, mientras que el carbonilo encontrado naturalmente en la taraxerona confiere una mayor actividad.

La actividad biológica de la mezcla **A** es muy probable que se deba a un efecto sinérgico entre ambos esteroides, presumiendo un mayor efecto del estigmasterol al ser el mayoritario. Por el contrario, la mezcla **B** posee una proporción diferente a la mezcla **A**, por lo que la menor actividad observada se debe tanto a la diferencia en proporción como a la acción de la glucosa en C-3 en ambos esteroides.

La actividad biológica del extracto metanólico y de los extractos resultantes de la partición cromatográfica observada corrobora el uso de esta especie para el tratamiento de afecciones diarreicas.

4.2. PERSPECTIVAS

Dado que el extracto hexánico presentó la mayor actividad contra los trofozoítos de *G. lamblia*, pero debido a la complejidad de sus fracciones y a la imposibilidad de aislar todos los componentes responsables de su actividad, debido al bajo rendimiento de éstos, una perspectiva para el empleo de esta especie es la preparación de un extracto enriquecido del extracto hexánico para su aplicación como fitomedicamento. Para dicho paso son necesarios cumplir los siguientes requisitos (Ahmad *et al.*, 2006):

1. Estandarizar químicamente el o los extractos, para su diferenciación de extractos provenientes de otras plantas. Esto se lleva al cabo por medio de la identificación de sus componentes mayoritarios y de los activos, en caso de conocerse, evitando así la adulteración y/o contaminación del extracto.
2. Reproducibilidad de la actividad biológica con relación al perfil químico, lo cual implica estudios de cómo afectan el estado fenológico de la planta o la estación de cosecha, entre otras, a la actividad biológica.
3. Toxicidad y efectos adversos. Es necesario estudiar el posible efecto tóxico al igual que cualquier medicina, ya que pueden presentarse toxicidad o efectos adversos debido a sobremedicación, interacción con otras plantas o medicamentos, etc.

4.3. REFERENCIA

Ahmad, I., F. Aqil, F. Ahmad and M. Owais (2006). "Herbal Medicines: Prospects and Constraints" in *Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs*, Ahmad, I., F. Aqil and M. Owais (Ed.). Wiley-VCH, Federal Republic of Germany. pp. 59-76.

Anexos

Anexo 1.

Composición del medio TYI-S-33

Para la elaboración de un litro de medio de cultivo se emplean las siguientes cantidades de reactivos.

Cuadro A.1. Componentes necesarios para la elaboración del medio TYI-S-33.

Reactivo	Cantidad ^a	Reactivo	Cantidad ^a
Fosfato dibásico de potasio	1.00 g	Bilis bovina	0.75 g
Fosfato monobásico de potasio	0.60 g	Ácido ascórbico	0.20 g
Cloruro de sodio	2.00 g	Citrato de amonio férrico	22.80 g
Caseína digerida	20.00 g	Suero de ternera	100.00 mL
Extracto de levadura	10.00 g	Anfotericina B	0.50 mL
Dextrosa	10.00 g	Ceftazidina	1.00 mL
L-cisteína HCl monohidratada	2.00 g		

^a Cantidad requerida para preparar un litro de medio de cultivo.

Anexo 2.

Antigiardial activity of *Cupania dentata* bark and its constituents

Ignacio Hernández-Chávez,^a Luis W. Torres-Tapia,^a Paulino Simá-Polanco,^a Roberto Cedillo-Rivera,^b Rosa Moo-Puc,^b Sergio R. Peraza-Sánchez^a.

^a Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México. speraza@cicy.mx

^b Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Calle 41 No. 439, Col. Industrial, Mérida 97150, Yucatán, México.

Abstract

The MeOH extract of *Cupania dentata* bark (Sapindaceae) as well as its hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, and BuOH fractions showed high activity against *Giardia lamblia* trophozoites (IC₅₀ = 2.12-9.52 µg/mL). The phytochemical study of fractions resulted in the isolation of taraxerone (**1**), taraxerol (**2**), scopoletin (**3**), and two mixtures of steroidal compounds. Taraxerone was the metabolite with the highest giardicidal activity (IC₅₀ = 11.33 µg/mL).

Resumen

El extracto MeOH de *Cupania dentata* corteza (Sapindaceae) así como sus fracciones de hexano, CH₂Cl₂, AcOEt y BuOH mostraron gran actividad contra los trofozoítos de *Giardia lamblia* (CI₅₀ = 2.12-9.52 µg/mL). El estudio fitoquímico de estas fracciones resultó en el aislamiento de taraxerona (**1**), taraxerol (**2**), escopoletina (**3**) y dos mezclas esteroidales. Taraxerona tuvo la más alta actividad giardicida (CI₅₀ = 11.33 µg/mL).

Keywords: *Cupania dentata*; Sapindaceae; giardicidal activity; taraxerone; taraxerol; scopoletin; sterols.¹

¹ Manuscrito aceptado en el Journal of the Mexican Chemical Society.

Palabras clave: *Cupania dentata*; Sapindaceae; actividad giardicida; taraxerona; taraxerol; escopoletina; esteroides.

Introduction

The protozoan *Giardia lamblia* is the more frequently isolated intestinal parasite around the world and is the causal agent of the disease known as giardiasis [1]. In Latin America the prevalence of giardiasis is 3.7-22.3% [2] and a recent seroepidemiologic study in Mexico found an incidence of 55.3%, without any significant differences between geographic regions according to their economic development [3]. The pharmacological treatment of giardiasis is based mainly in the use of nitroimidazoles, benzimidazoles, and nitrofurans; nevertheless, these drugs produce severe side effects and their indiscriminate use has generated a selection of resistant strains to these drugs [4,5]. Due to this situation, the search for new drugs becomes necessary.

The *Cupania* L. genus comprises 45 species growing around warm places of the American continent [6]. *C. belizensis* is useful in treating diarrhea [7], *C. americana* leaves and seeds are used to treat pain and diarrhea, respectively [8], while *C. vernalis* leaves show antileishmanial activity [9]. Chemical compounds have been reported from some species, such as vernanolide, a glycosyl diterpene isolated from *C. vernalis* [9], a long-chain fatty alcohol glycoside named cupanoside from *C. glabra* [7], and a polyprenol named cupaniol from *C. latifolia* [8].

Taking advantage of the ancestral knowledge on the medical use of some plant species growing in the Yucatan peninsula and the giardicidal activity described for the MeOH extract of *Cupania dentata* bark [10], we studied the hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, and BuOH fractions of the MeOH extract of *C. dentata* bark in order to obtain those metabolites responsible of the giardicidal activity of the plant. Not any phytochemical or biological study has been reported for this species.

Results and Discussion

The methanol extract as well as the hexane, CH₂Cl₂, EtOAc, and BuOH fractions obtained by chromatographic partitioning were all evaluated against *G. lamblia* trophozoites (Table 1). The biological activity of the methanol extract (IC₅₀ = 8.17 µg/mL) was similar to that obtained previously (IC₅₀ = 7.59 µg/mL) [10] and can be considered highly active according to the classification criteria established by Amaral *et al.* [11], who established

extracts with $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ as highly actives. The biological activity of *C. dentata* fractions remained similar to that of the crude methanol extract (Table 1), in some cases stronger, such as the hexane and dichloromethane fractions ($IC_{50} = 4.43$ and $2.12 \mu\text{g/mL}$, respectively).

Compounds **1** and **2** were isolated from the hexane fraction. Compounds **1** and **2** were identified as taraxerone and taraxerol, respectively, by comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature [12-14]. Both compounds are ubiquitous metabolites found in a large number of plants. Compounds **1** and **2** have been reported with different biological activities, such as allelopathic and antifungal [15,16]; taraxerol has been reported with analgesic and anti-inflammatory activities [17,18].

Also, from the hexane fraction a mixture (**A**) of stigmasterol and β -sitosterol in a ratio 2:1 was obtained. The sterols were identified by comparison of their MS data with the database of the equipment and to those reported in the literature [19]. The ratio was determined by inspection of the gas chromatogram. Both are ubiquitous compounds of plants. β -Sitosterol possesses different activities, such as antibacterial, antimicrobial, and as an inhibitor of the carcinogenesis [20], while stigmasterol was found to inhibit tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mice [21]. The mixture of both sterols has shown anti-inflammatory activity in topical application [22]. Compound **3** was isolated from the CH_2Cl_2 fraction and was identified as scopoletin, a 6,7-dioxygenated coumarin, by comparison of its spectroscopic data with those reported in the literature [23,24]. Scopoletin exhibited a potent inhibitory effect on rabbit platelet aggregation [25] and showed activity as inhibitor of eicosanoid-release from ionophore-stimulated mouse peritoneal macrophages [26].

The mixture (**B**) was isolated from the BuOH fraction and was identified as a combination of β -sitosterol-3-O- β -D-glucopyranoside and stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranoside (1:1.5). The ratio was determined by inspection of the ^1H NMR spectrum. The components of this mixture were identified by comparison of their spectroscopic data, mainly ^{13}C NMR, with those reported in the literature [27].

None of the metabolites mentioned above has been reported in the literature as having antiangiogenic activity, except for two reports on β -sitosterol and its glucoside [28,29] with an $IC_{50} = 71.1 \text{ mg/mL}$ and 61.5 mg/mL , respectively, but not reported as the mixture of stigmasterol- β -sitosterol (2:1). In the present work, the two triterpenes taraxerone (**1**) and taraxerol (**2**) showed an $IC_{50} = 11.33$ and 16.11 mg/mL , respectively, while the coumarin scopoletin (**3**) had an $IC_{50} = 33.60 \text{ mg/mL}$ in the growth inhibition bioassay. In the

literature there are 31 metabolites reported as having anti-giardial activity with an $IC_{50} \leq 25.0$ mg/mL [11], then the anti-giardial activity of **1** and **2**, in comparison, is considered outstanding on this aspect, but moderate with respect to the drug of election, metronidazole, which showed an $IC_{50} = 0.02$ mg/mL. Taraxerol acetate did not show anti-giardial activity in the same model. Scopoletin (**3**) showed only a weak activity against *G. lamblia*, but this is the first report of scopoletin as having this activity. The mixture of sterols (**A**) showed a stronger activity, with an $IC_{50} = 5.23$ mg/mL, which, perhaps, depends on the synergism that there might be within stigmasterol and β -sitosterol together, but more studies are necessary to probe this hypothesis. The mixture (**B**) of stigmasterol and β -sitosterol glucosides showed less activity ($IC_{50} = 26.77$ mg/mL) than the mixture (**A**). In other bioassay models, some works have demonstrated activity of various mixtures, such as that formed of the stilbene pinosylvin and the flavonoid galangin that worked in concert to provide anti-feedant activity, while they were not active individually [30].

General Experimental Procedures

EIMS data were determined on an Agilent Technologies 6890N chromatograph connected to a mass detector 5975B. The 1H and ^{13}C NMR data were obtained on a Bruker Avance 400 instrument (400 MHz). Chemical shifts were referred to TMS (δ 0) as internal standard. Vacuum liquid chromatography (VLC) separations were carried out using TLC-grade silica gel (Merck); open-column chromatography separations were run using silica gel 60 (70-230 mesh, Merck); and flash columns were run using silica gel 60 (230-400 mesh, Merck). Sephadex LH-20 (GE Healthcare) was used for gel permeation column chromatography. Preparative TLC (PTLC) separations were performed on glass-coated (1 mm thickness) 20 × 20 cm plates (Aldrich). TLC analyses were carried out using aluminum-backed silica gel 60 F₂₅₄ (0.20 mm thickness) plates (Merck); spots on TLC plates were first visualized under a UV lamp (254 and 365 nm) and then by spraying with 4% phosphomolibdic acid containing a trace of ceric sulfate in 5% H₂SO₄, followed by heating at 100 °C.

Plant Material

The bark of *Cupania dentata* DC. (Sapindaceae) was collected 22 Km west of Bacalar on the road to Carrillo Puerto, Quintana Roo, Mexico, and identified by the experienced taxonomist Paulino Simá Polanco. A voucher specimen (PSimá 2587) was deposited on the herbarium of the Unidad de

Extraction and Isolation

Dried-ground bark (983 g) was extracted with methanol three times at room temperature, for 48 h each time. After filtration, the extracts were combined and the solvent was evaporated under reduced pressure to give 166.4 g of organic extract. The extract was suspended in a mixture of water/methanol (3:1, 500 mL) and the resulting aqueous suspension was successively partitioned between Hx (2:1, 3×), CH₂Cl₂ (2:1, 3×), EtOAc (2:1, 3×), and BuOH (2:1, 3×), to afford the Hx (6.1 g), CH₂Cl₂ (11.0 g), EtOAc (59.2 g), and BuOH (30.2 g) fractions.

The hexane fraction was purified by VLC using elution gradients of hexane/ethyl acetate, ethyl acetate/acetone and acetone/methanol to produce nine fractions (3A-3I) and one precipitate, who was washed with methanol and then recrystallized from a small amount of chloroform to give 51.9 mg of a mixture (**A**) of the sterols stigmasterol and β -sitosterol (ratio 2:1). The fractions 3B and 3C presented two different precipitates, both were washed with methanol and then recrystallized from a small amount of chloroform, to give taraxerone (**1**, 16.0 mg), with m.p. = 241-243 °C and $[\alpha]_D = + 11.9^\circ$ in chloroform [31]; and taraxerol (**2**, 52.2 mg), with m.p. = 279-280 °C and $[\alpha]_D = + 2.9^\circ$ in chloroform [31].

The CH₂Cl₂ fraction was purified by VLC, using gradient elutions of hexane/dichloromethane and dichloromethane/methanol to produce seven fractions (4A-4G). Open-column chromatography purification of fraction 4D (538.1 mg) eluting with dichloromethane and gradient mixtures of dichloromethane/methanol produced 11 fractions (5A-5K). Further purification of fraction 5C (136.9 mg), using an open chromatography column with chloroform/methanol (98:2) afforded fractions 6D and 6E, which were washed with hexane and then recrystallized from a small amount of methanol to give 37.7 mg of compound **3**, with m.p. = 199-201 °C [32].

The BuOH fraction was purified by a Sephadex-LH-20 column using a gradient elution of methanol/butanol/water to produce nine fractions (7A-7I). Fraction 7B was further purified using a Sephadex-LH-20 column in methanol to obtained 58.7 mg of crystals of mixture (**B**), constituted by stigmasterol glucoside and β -sitosterol glucoside.

Taraxerol acetate (**4**). A mixture of taraxerol (10 mg), acetic anhydride (1 mL) and pyridine (0.5 mL) was allowed to stir at room temperature for 72 h. After the usual work up 7.3 mg (66.4%) of crude acetylated product,

identified as taraxerol acetate (**4**), were obtained, with m.p. = 296-298 °C [31].

Taraxerone (1): ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.56 (1H, dd, J = 3.2, 8.2, H-15), 2.58 (1H, m, H-2a), 2.33 (1H, m, H-2b), 2.07 (1H, dt, J = 3.3, 12.9, H-7a), 1.92 (1H, dd, J = 3.1, 15.1, H-16a), 1.88 (1H, m), 1.14 (3H, s, H-25), 1.09 (3H, s, H-26), 1.08 (3H, s, H-23), 1.07 (3H, s, H-24), 0.95 (3H, s, H-29), 0.92 (3H, s, H-27), 0.91 (3H, s, H-30), 0.83 (3H, s, H-28); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 217.7 (C-3), 157.6 (C-14), 117.2 (C-15), 55.8 (C-5), 48.7 (C-18), 48.7 (C-9), 47.6 (C-4), 40.6 (C-19), 38.9 (C-8), 38.3 (C-1), 37.7 (C-13), 37.7 (C-17), 37.5 (C-10), 36.7 (C-16), 35.8 (C-12), 35.1 (C-7), 34.1 (C-2), 33.5 (C-21), 33.3 (C-29), 33.1 (C-22), 29.8 (C-26), 29.9 (C-28), 28.8 (C-20), 26.1 (C-23), 25.6 (C-27), 21.5 (C-24), 21.3 (C-30), 19.9 (C-6), 17.4 (C-11), 14.8 (C-25). EIMS m/z (rel. int.): 424 $[\text{M}]^+$ (25), 300 (87), 285 (70), 204 (100), 133 (67). m.p. = 241-243 °C; $[\alpha]_{\text{D}} = + 11.9^\circ$ in chloroform.

Taraxerol (2): ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 5.53 (1H, dd, J = 3.2, 8.2, H-15), 3.24 (1H, dd, J = 4.7, 11.0, H-3), 2.03 (1H, dt, J = 3.1, 12.6, H-7a), 1.92 (1H, dd, J = 3.0, 14.6, H-16a), 1.09 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-29), 0.93 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, s, H-27), 0.90 (3H, s, H-30), 0.82 (3H, s, H-28), 0.80 (3H, s, H-24); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 158.1 (C-14), 116.9 (C-15), 79.1 (C-3), 55.5 (C-5), 49.2 (C-18), 48.7 (C-9), 41.3 (C-19), 39.0 (C-4), 38.7 (C-8), 38.0 (C-1), 37.7 (C-17), 37.6 (C-13), 37.5 (C-10), 36.6 (C-16), 35.8 (C-12), 35.1 (C-7), 33.7 (C-21), 33.3 (C-29), 33.1 (C-22), 29.9 (C-28), 29.8 (C-26), 28.8 (C-20), 28.0 (C-23), 27.1 (C-2), 25.9 (C-27), 21.3 (C-30), 18.8 (C-6), 17.5 (C-11), 15.4 (C-24), 15.4 (C-25). EIMS m/z (rel. int.): 426 $[\text{M}]^+$ (9), 302 (25), 287 (25), 204 (100), 133 (40). m.p. = 279-280 °C; $[\alpha]_{\text{D}} = + 2.9^\circ$ in chloroform.

Scopoletin (3): ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.86 (1H, d, J = 9.5, H-4), 7.13 (1H, s), 6.78 (1H, s), 6.21 (1H, d, J = 9.6,), 3.81 (3H, s, 6- OCH_3). ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ 164.1 (C-2), 152.9 (C-7), 151.4 (C-9), 147.1 (C-6), 146.1 (C-4), 112.6 (C-3), 112.5 (C-10), 109.9 (C-5), 103.9 (C-8), 56.8 (6- OCH_3). EIMS m/z (rel. int.): 192.1 $[\text{M}]^+$ (100), 177 (64), 164 (29), 149 (60), 121 (27), 69 (43), 79 (21). m.p. = 296-298 °C.

Biological evaluation

Giardia lamblia trophozoites

Giardia lamblia IMSS:0696:1 isolate, obtained from an individual with symptomatic giardiasis, was used [33]. Trophozoites were cultured in TYI-S-

33 modified medium, supplemented with 10% calf serum, and subcultured twice a week; for the assay, trophozoites were tested in their log phase of growth [34].

Antiprotozoal assay

The assay has been described in the literature [35-37]. Stock solutions of extracts, fractions, or pure compounds were prepared with DMSO (5 mg/mL), from which, by means of two-folded serial dilutions with TYI-S-33 modified medium, four final solutions in a range of 1-50 µg/mL were obtained. This solution was inoculated with *G. lamblia* to achieve an inoculum of 5×10^4 trophozoites/mL. The test included metronidazole (Sigma-Aldrich) as the drug of reference, a control (culture medium with trophozoites and DMSO), and a blank (culture medium). After 48 h at 37 °C, parasites were detached by chilling, and 50 µL of each culture tube were subcultured in fresh medium without extracts or drug and incubated for 48 h at 37 °C. Cell proliferation was measured with a hemocytometer, and the percentage of trophozoite growth inhibition was calculated by comparison with the controls. The percentage of inhibition calculated for each concentration was transformed into Probit units. The plot of Probit against log concentration was made; the best straight line was determined by regression analysis, and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were calculated. The experiments were done in duplicate and repeated at least three times.

Acknowledgements

This work was supported by the International Foundation for Science (IFS), Stockholm, Sweden, and the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW), The Hague, Netherlands, through a research grant to Dr. Sergio R. Peraza-Sánchez (Agreement No. F/3278-2F). Ignacio Hernández-Chávez thanks CONACYT for a thesis scholarship (170695).

References

1. Smith, H. V.; Paget, T., in: *Foodborne Diseases: Infectious Diseases*, Simjee, S., Ed., Humana Press, Inc., Totowa, N.J., **2007**, 303-336.
2. Davila-Gutierrez, C. E.; Vasquez, C.; Trujillo-Hernandez, B.; Huerta, M. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, 66, 251-254.

3. Cedillo-Rivera, R.; Leal, Y. A.; Yépez-Mulia, L.; Gómez-Delgado, A.; Ortega-Pierres, G.; Tapia-Conyer, R.; Muñoz, O. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, 80, 6-10.
4. Jiménez-Cardoso, E.; Flores-Luna, A.; Pérez-Urizar, J. *Acta Trop.* **2004**, 92, 237-244.
5. Campanati, L.; Monteiro-Leal, L. H. *Parasitol. Res.* **2002**, 88, 80-85.
6. Schutles, R. E.; Raffaut, R. F., in: *The healing forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia*, Dioscorides Press, Portland, Oregon, 1990, 406.
7. Setzer, W. N.; Vogler, B.; Schmidt, J. M.; Petty, J. L.; Haber, W. A. *Planta Med.* **2005**, 71, 686-688.
8. Sakane, W.; Hara, N.; Fujimoto, Y.; Takaishi, Y.; Acuña, R.; Osorio, C.; Duque, C. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 1037-1039.
9. Cavalcanti, S. B. T.; Teles, H. L.; Silva, D. H. S.; Furlan, M.; Young, M. C. M.; Bolzani, V. S. *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, 12, 413-416.
10. Peraza-Sánchez, S. R.; Poot-Kantún, S.; Torres-Tapia, L. W.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Cedillo-Rivera, R. *Pharm. Biol.* **2005**, 43, 594-598.
11. Amaral, F. M. M.; Ribeiro, M. N. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Reis, A. S.; Nascimento, F. R. F.; Macedo, R. O. *Braz. J. Pharmacogn.* **2006**, 16, 696-720.
12. Ahmed, Y.; Sohrab, Md. H.; Al-Reza, S. M.; Tareq, F. S.; Hasan, C. M.; Sattar, M. A. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48, 549-552.
13. Bates, R. B.; Jacobsen, N. E.; Setzer, W. N.; Stessman, C. C. *Magn. Reson. Chem.* **1998**, 36, 539-541.
14. Mahato, S. B.; Kundu, A. S. *Phytochemistry* **1994**, 37, 1517-1575.
15. Macías-Rubalcava, M. L.; Hernández-Bautista, B. E.; Jiménez-Estrada, M.; Cruz-Ortega, R.; Anaya, A. L. *J. Chem. Ecol.* **2007**, 33, 147-156.
16. Magadula, J. J.; Erasto, P. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26, 1535-1554.
17. Biswas, M.; Biswas, K.; Ghosh, A. K.; Haldar, P. K. *Phcog. Mag.* **2009**, 5, 90-92.
18. Biswas, M.; Biswas, K.; Ghosh, A. K.; Haldar, P. K. *Phcog. Mag.* **2009**, 5, 64-68.
19. András, N.; Helenkár, A.; Záray, Gy.; Vasánits, A.; Molnár-Perl, I. *J. Chromatogr.* **2011**, 1218, 1878-1890.
20. Raicht, R. F.; Cohen, B. I.; Fazzini, E. P.; Sarwal, A. N.; Takahashi, M. *Cancer Res.* **1980**, 40, 403-405.
21. Kasahara, Y.; Kumaki, K.; Katagiri, S.; Yasukawa, K.; Yamonouchi, S.; Takido, M.; Akihisa, T.; Tamuta, T. *Phytother. Res.* **1994**, 8, 327-331.
22. Gómez, M. A.; Sáenz, M. T.; García, M. D.; Fernández, M. A. *Z. Naturforsch. C* **1999**, 54c, 937-941.
23. Öksüz, S.; Ulubelen, A.; Barla, A. *Turk. J. Chem.* **2002**, 26, 457-463.

24. Wu, Y. B.; Zheng, C. J.; Qin, L. P.; Sun, L. N.; Han, T.; Jiao, L.; Zhang, Q. Y.; Wu, J. Z. *Molecules* **2009**, *14*, 573-583.
25. Okada, Y.; Miyauchi, N.; Suzuki, K.; Kobayashi, T.; Tsutsui, C.; Nishibe, S.; Okuyama, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1385-1387.
26. Silvan, A. M.; Abad, M. J.; Bermejo, P.; Soulhuber, M.; Villar, A. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1183-1185.
27. Kojima, H.; Sato, N.; Hatano, A.; Ogura, H. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2351-2355.
28. Arrieta, J.; Reyes, B.; Calzada, F.; Cedillo-Rivera, R.; Navarrete, A. *Fitoterapia* **2001**, *72*, 295-297.
29. Calzada, F. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 725-727.
30. Russell, G. B.; Bowers, W. S.; Keesing, V.; Niemeyer, H. M.; Sevenet, T.; Vasanthavarni, S.; Wratten, S. D. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 41-56.
31. Sasaki, S.; Aoyagi, S.; Hsui, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1965**, *12*, 87-88.
32. Ishii, H.; Okada, Y.; Baba, M.; Okuyama, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 1349-1351.
33. Cedillo-Rivera, R.; Darby, J. M.; Enciso-Moreno, J. A.; Ortega- Pierres, G.; Ey, P. L. *Parasitol. Res.* **2003**, *90*, 119-123.
34. Cedillo-Rivera, R.; Enciso, J.; Ortega-Pierres, G.; Martínez-Palomo, A. *Arch. Med. Res.* **1991**, *22*, 79-85.
35. Cedillo-Rivera, R.; Muñoz, O. *J. Med. Microbiol.* **1992**, *37*, 221-224.
36. Cedillo-Rivera, R.; Ramírez, A.; Muñoz, O. *Arch. Med. Res.* **1992**, *23*, 59-61.
37. Calzada, F.; Cerda-García Rojas, C.M.; Meckes, M.; Cedillo-Rivera, R.; Bye, R.; Mata, R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 705-709.

Table 1. Antigiardial activity of methanol extract of *C. dentata* bark, its fractions and pure isolates.

Sample	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₀ (µg/mL)
Methanol extract	8.17 (8.17-8.22) ^a	1,573.26 (1,514.86-1,634.63)
Hexane fraction	4.43 (4.42-4.44)	76.20 (75.43-77.01)
CH ₂ Cl ₂ fraction	2.12 (2.11-2.13)	135.52 (133.02-138.06)
EtAcO fraction	9.52 (9.48-9.56)	311.39 (305.25-317.72)
Butanol fraction	6.50 (6.48-6.52)	102.31 (101.12-103.52)
Taraxerone (1)	11.33 (11.30-11.36)	63.31 (62.90-63.72)
Taraxerol (2)	16.11 (16.05-16.17)	102.40 (101.51-103.31)
Scopoletin (3)	33.60 (33.4-33.8)	282.55 (279.2-286.0)
Taraxerol acetate (4)	NA ^b	NA
Mixture A	5.23 (5.22-5.24)	32.74 (32.57-32.91)
Mixture B	26.77 (26.69-26.86)	386.63 (383.47-389.88)
Metronidazole	0.021 (0.020-0.022)	

^a 95% Confidence Interval in parentheses.

^b NA = Not active.

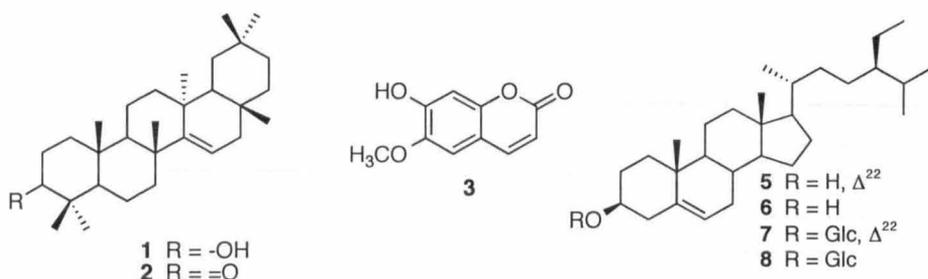


Figure 1. Structures of the metabolites isolated from *C. dentata*. Taraxerone (1), taraxerol (2), scopoletin (3), stigmasterol (5), β-sitosterol (6), stigmasterol glucoside (7) and β-sitosterol glucoside (8).

