



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIDIARREICA DE *Phytolacca icosandra*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN QUÍMICA

P R E S E N T A

JORGE ARTURO SANTOS LÓPEZ

A S E S O R E S :

DRA. CLAUDIA VELÁZQUEZ GONZÁLEZ

DR. JOSÉ ROBERTO VILLAGÓMEZ IBARRA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Química **Jorge Arturo Santos López**, quien presenta el trabajo de titulación "**Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antidiarreica de *Phytolacca icosandra***" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:	Dra. Maricruz Sánchez Zavala
PRIMER VOCAL:	Dra. Claudia Velázquez González
SEGUNDO VOCAL:	Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia
TERCER VOCAL:	Dra. Susana Rojas Lima
SECRETARIO:	Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
PRIMER SUPLENTE:	Dr. Juan Antonio Gayosso de Lucio
SEGUNDO SUPLENTE:	Dra. Mirandeli Bautista Ávila

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 9 de febrero de 2012.

M. en C. Araceli Sierra Zenteno.
Coordinadora Adjunta de la Lic. en Química.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE HIDALGO



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería.
Carretera Pachuca-Tlaxiaco Km. 4.5, Ciudad Universitaria,
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts 2230, 2231. Fax 2109
asierra@uaeh.edu.mx



El presente trabajo se desarrolló en las instalaciones del Área Académica de Farmacia y del Bioterio del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, como parte del proyecto CONACyT “Evaluación de la actividad antidiarreica de los extractos metanólico, acuoso y clorofórmico de tres plantas medicinales mexicanas” Ref.: 95616. Se contó con la beca de estudiantes del proyecto “Plantas medicinales del Estado de Hidalgo como fuente de obtención de compuestos con actividad antidiarreica” PROMEP/103.5/10/7313

Parte del presente trabajo se presentó en el XV Congreso Científico Internacional CNIC, julio 2010. Ciudad de La Habana, Cuba. Bajo la modalidad de presentación en sesión oral.

Dedicatorias

A Dios, porque me dio la vida y la oportunidad de llegar hasta aquí.

A mis padres, de quienes he aprendido los valores que me acompañan en el día a día. Gracias por darme la base de mi futuro, por apoyarme en cada momento de pena y alegría, por darme una familia maravillosa y llena de amor, por creer en mí y no dejarme caer nunca. Los amo, los admiro y he alcanzado esta meta gracias a ustedes.

A mi hermana, por compartir conmigo todos los momentos de felicidad y tristeza, por apoyarme siempre y enseñarme a mostrar una gran sonrisa, por ser mi cómplice y amiga. Te quiero muchísimo. Gracias, porque formaste una familia y ahora viene en camino un rayito de luz que nos traerá más dicha, prometo guiarla por el camino del bien... ;)

A mis abuelos, tíos y primos, por integrar una familia maravillosa de quienes siempre recibo palabras de aliento. Gracias por confiar en mí y sobre todo quererme y aceptarme como soy. No tengo palabras para describir qué tan afortunado soy de tenerlos a todos ustedes.

A mis amigos, que a lo largo de este camino me han acompañado incondicionalmente:

Alex, bro, por todos los consejos que me has dado y por estar siempre dispuesto a ayudarme. Gracias por entenderme y creer en mí. Sólo te puedo decir que todo el mundo quiere tener un amigo, pero pocos se toman la molestia de serlo.

Gaby, porque simplemente la convivencia contigo me contagia de alegría, tus ocurrencias y tu optimismo siempre hacen el día más llevadero. Gracias por llenarme con tu buena vibra, tus consejos, enseñanzas y por tantos momentos que hemos compartido.

Laura, porque aprendí a disfrutar las interminables horas de estudio y a sacar el lado cómico de los problemas. Gracias porque contigo aprendí que no importa cuánto lo intentes, si tienes un objetivo hay que luchar hasta alcanzarlo.

Al que siempre me acompañó en mis desvelos y enfermedades...

Agradecimientos

Debo agradecer de manera muy especial a quienes me guiaron durante el desarrollo de este trabajo,

Dra. Claudia Velázquez: Una de las personas a quien más admiro y debo mi mayor gratitud, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y brindarme todo el apoyo posible. Por hacerme crecer como profesionista y como persona, compartiendo experiencias y conocimientos. Por contagiarme su convicción de disfrutar la vida en cada momento. Por los innumerables consejos académicos y personales. Pero sobre todo, porque con usted aprendí que hacer tu trabajo con optimismo y entrega es la clave del éxito laboral, pero no se logra sin el éxito personal. Gracias por la confianza, paciencia, aliento, dedicación y amistad.

Dr. Roberto Villagómez: Gracias por haberme integrado al mundo de los productos naturales y apoyarme en la realización de este trabajo. Por formar un gran equipo de trabajo y sobre todo, por mantenerlo no sólo con lo académico, sino con la amistad y solidaridad entre todos. Le agradezco los conocimientos que ha compartido conmigo desde el primer día en el aula de clases y las experiencias personales que han enriquecido mi formación. Trabajar bajo su dirección fue una experiencia que superó lo académico y me brindó la oportunidad de aprender a ser emprendedor y perseverante.

Quiero expresar mi gratitud con todos los maestros y personal administrativo del Área Académica de Farmacia, porque son el ejemplo de un gran equipo de colaboradores y amigos. Creo no haber podido encontrar un mejor lugar para realizar este trabajo. Gracias, especialmente a las Dras. Mirandeli, Minarda y Gina, por brindarme el apoyo que necesité y por recibirme siempre con la mejor actitud.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Juan Gayosso, por enseñarme que con los pequeños detalles se logran grandes resultados. Gracias por los consejos, por compartir tu experiencia y conocimientos y sobre todo por contagiarme de tu entusiasmo y perseverancia en el trabajo de laboratorio.

A los compañeros con quienes compartí laboratorio, porque el trabajo diario se vuelve más llevadero con las buenas compañías. Gracias por los buenos momentos y enseñanzas que me dejaron.

Agradezco también al personal del Bioterio-UAEH por las facilidades otorgadas para la realización de las pruebas biológicas.

Al Sr. Alfredo Velázquez y Sra. María González por la recolección del material vegetal.

Al M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez y Dra. Beatriz Quiroz García (IQ-UNAM) por la obtención de los espectros de RMN.

A mis sinodales, por su dedicación y valiosa ayuda en la realización de esta tesis. Gracias también por los conocimientos y experiencias que me brindaron a lo largo de mi formación.

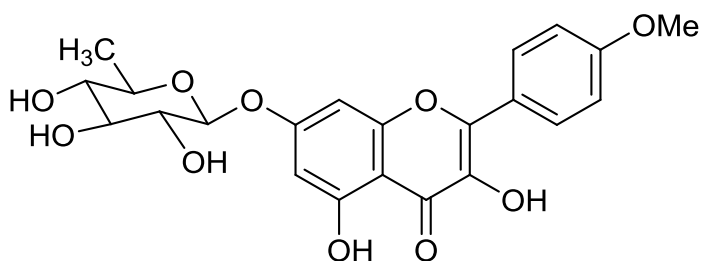
Resumen

En el presente trabajo se realizó la evaluación del efecto antidiarreico de los extractos clorofórmico y metanólico de las partes aéreas (hojas y flores) de *Phytolacca icosandra*, empleando como ensayo biológico los modelos de motilidad gastrointestinal, acumulación de fluido intestinal y aceite de ricino.

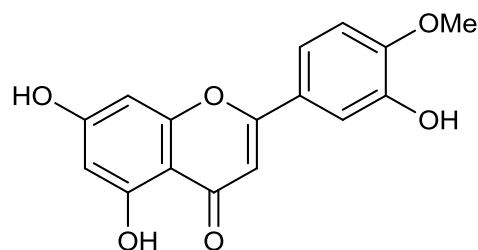
El extracto metanólico de las hojas resultó ser el de mejor efecto antidiarreico a la dosis de 300 mg/kg en los modelos del aceite de ricino y de motilidad gastrointestinal. Su actividad se comparó con la del fármaco control, Loperamida (2.5 mg/kg).

El estudio fitoquímico del extracto metanólico de las hojas condujo al aislamiento de dos compuestos de tipo flavonoide, 7-O- β -D-ramnósido de campferido (**27**) y diosmetina (**28**).

Las sustancias fueron caracterizadas mediante RMN ^1H y es la primera vez que se describen en esta especie.



(**27**)



(**28**)

Índice

1. Introducción	1
1.1 Plantas medicinales y productos naturales	3
1.2 Biosíntesis de flavonoides	6
2. Antecedentes	8
2.1 Generalidades de la diarrea	8
2.1.1 Clasificación de la diarrea	8
2.1.2 Tratamiento	12
2.1.3 Fármacos utilizados	12
2.2 Generalidades de la familia Phytolaccaceae	17
2.3 Generalidades de <i>Phytolacca icosandra</i>	17
2.3.1 Compuestos aislados y actividad biológica	19
3. Justificación	21
4. Planteamiento del problema	22
5. Objetivos	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos específicos	24
6. Hipótesis	25

7. Parte experimental	26
7.1 Material vegetal	26
7.2 Identificación del material vegetal	26
7.3 Operaciones preliminares	26
7.4 Obtención de extractos a pequeña escala	26
7.5 Obtención del extracto metanólico de la hojas a gran escala	27
7.6 Análisis cromatográfico y equipos utilizados	27
7.7 Determinación de la actividad antidiarreica	28
7.7.1 Modelo de motilidad gastrointestinal	28
7.7.2 Modelo de acumulación de fluido intestinal	29
7.7.3 Modelo del aceite de ricino	30
7.8 Separación de compuestos del extracto activo	31
8. Resultados y discusión	36
8.1 Determinación del extracto biológicamente activo	36
8.1.1 Resultados del modelo de motilidad gastrointestinal	36
8.1.2 Resultados del modelo de acumulación de fluido intestinal	37
8.1.3 Resultados del modelo del aceite de ricino	38
8.2 Elucidación estructural de 7-O- β -D-ramnósido de campferido	40
8.3 Elucidación estructural de diosmetina	43
9. Conclusiones	46
10. Perspectivas	46
11. Referencias	47

Lista de abreviaturas

cm	Centímetros
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
COSY	Correlated spectroscopy
CCF	Cromatografía en Capa Fina
δ	Desplazamiento químico
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
<i>d</i>	Doble
<i>dd</i>	Doble de dobles
DL₅₀	Dosis letal media
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i> EA	<i>Escherichia coli</i> enteroadhesiva
<i>E. coli</i> EH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
<i>E. coli</i> EI	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
<i>E. coli</i> EP	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica
<i>E. coli</i> ET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ECF	Extracto clorofórmico de las flores
ECH	Extracto clorofórmico de las hojas
EMF	Extracto metanólico de las flores
EMH	Extracto metanólico de las hojas
Hz	Hertz
HETCOR	Heteronuclear correlated spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
INEPT	Insensitive nuclei enhanced by polarization transfer
Kg	Kilogramos
L	Litros
C-	Lote control negativo
C+	Lote control positivo (lote de fármaco control)
MHz	Megahertz
m	Metros

mg	Miligramos
mL	Mililitros
ppm	Partes por millón
%	Por ciento
% R	Por ciento de rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Simple
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

1. Introducción

México es uno de los países con mayor biodiversidad en vegetales, también es uno de los que tienen arraigada la tradición de usar las plantas antes de recurrir a la medicina alopática.

La medicina tradicional es considerada como un recurso que se modifica de acuerdo con las tendencias internas de la cultura local y como resultado de los vínculos del hombre con la naturaleza. Este concepto designa la combinación resultante de toda una popularidad de creencias, técnicas y prácticas en torno a la salud, a la enfermedad, a la vida y a la muerte, que a lo largo del tiempo en nuestro país, aluden a un remoto pasado indígena; pero a la vez refiere a los conocimientos que en la actualidad representan un acervo en cuestiones de salud pública (Gallardo, 2006).

La protección de la salud a través del uso de plantas medicinales está asumiendo un alto valor económico en el mundo. Se calcula que los medicamentos elaborados a base de plantas son utilizados por el 60 % de la población mundial y en algunos países están ampliamente incorporados al sistema público de salud. El uso de plantas medicinales es el medio de tratamiento más común en la medicina tradicional y la medicina complementaria en todo el mundo. Las plantas medicinales se obtienen mediante la recolección de variedades silvestres o el cultivo de variedades domesticadas. Muchas comunidades dependen de los productos recolectados en los ecosistemas para fines medicinales y culturales, además de alimentarios (OMS, 2011).

Existe una gran cantidad de plantas medicinales en todo el mundo, tan solo en México hay cerca de 1000 especies medicinales localizadas en el centro del país (Puebla, San Luis Potosí, Querétaro, Tlaxcala e Hidalgo). Nuestro Estado, debido a la gran diversidad de climas y a las características geográficas de su territorio posee gran parte de éstas (Villaseñor *et al.*, 2003).

Se sabe que muchas plantas han sido útiles por la variedad de sustancias que producen o por la variedad de síntomas que pueden tratar, por esta razón es importante estudiar y conocer más acerca de sus componentes y determinar cuáles son los que tienen actividad biológica. El Gráfico 1 muestra cifras aproximadas de las especies medicinales utilizadas por padecimiento. Las empleadas para el tratamiento de enfermedades del sistema digestivo son las más comunes.

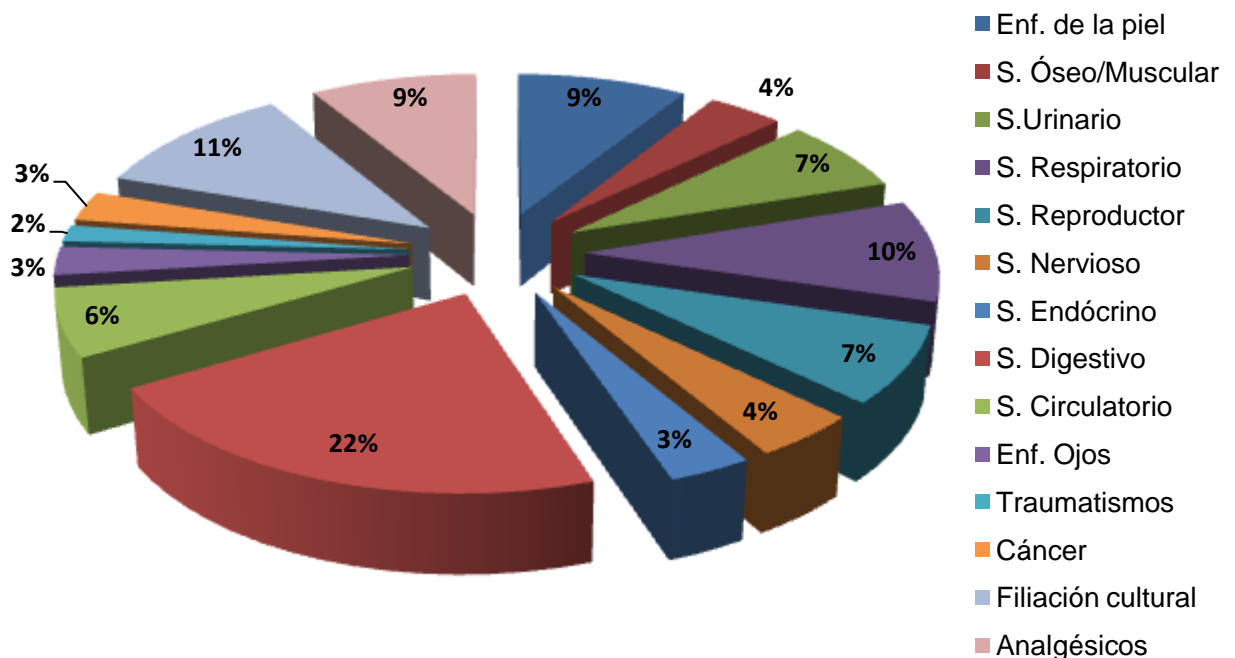


Gráfico 1. Especies medicinales empleadas por padecimiento.

Dentro de las afecciones del sistema digestivo, la diarrea es la más común, pues se presenta en todas las razas, sexos, edades y regiones geográficas del mundo. Afecta a más de 2000 millones de personas al año y causa la muerte de 1.5 millones de niños (OMS, 2010). Además de la gran pérdida de agua que suponen las evacuaciones diarreicas, los pacientes pierden cantidades peligrosas de electrolitos y otros nutrientes (Behrman et al., 2006).

1.1 Plantas medicinales y productos naturales

Las plantas medicinales son extensamente usadas en las culturas tradicionales de todo el mundo y han llegado a ser cada vez más populares en las sociedades modernas como una nueva alternativa natural para evitar los productos sintéticos. Debido a que día con día más remedios naturales son comercializados, surge la necesidad de recurrir a la investigación científica para analizar con detenimiento las características biomédicas y químicas de cada uno de ellos (Kuklinski, 2000).

Los productos naturales son todas aquellas sustancias de origen orgánico o inorgánico que se encuentran en la naturaleza. Las plantas contienen sustancias en cada una de las partes que la conforman (flor, fruto, raíz, tallo, hojas, etc.), a las cuales se les denomina metabolitos y comúnmente se les conoce como productos naturales. Los metabolitos pueden ser primarios o secundarios, los primarios son aquellos que forman parte del metabolismo esencial de una planta para su existencia y los secundarios son compuestos químicos que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta (Dewick, 1998; Kuklinski, 2000).

La mayoría de la población a lo largo del mundo es muy apegada al uso de productos naturales para el cuidado de su salud diaria y, es probable que el conocimiento de los remedios herbales se haya obtenido por prueba y error y que de manera verbal fue transmitido de generación en generación hasta nuestros días. El uso de la medicina tradicional frecuentemente era relacionado con brujería o superstición, esto debido a que la gente no tenía el conocimiento suficiente para explicar el poder curativo de las plantas que utilizaban (Wiermuth, 2001).

Los productos naturales y sus derivados representan cerca del 57 % de todos los fármacos utilizados en la actualidad. Se conocen numerosos ejemplos de sustancias que han sido usadas desde hace mucho tiempo y que son derivados de plantas, tales como: la quinina, morfina, codeína, cocaína, etcétera (Kuklinski, 2000; OMS 2011).

Actualmente sólo se ha estudiado cerca del 40 % del total de plantas medicinales conocidas, dentro de las cuales se han caracterizado cientos de metabolitos secundarios haciendo uso de técnicas espectroscópicas como; espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear o técnicas cromatográficas. Los principios activos encontrados han sido clasificados en tres grandes grupos: alcaloides, terpenos y policétidos (Van Wyk y Wink, 2004).

Más de 4000 compuestos han sido registrados y estudiados de manera farmacológica y química. En la tabla 1 se muestran cifras aproximadas de productos naturales encontrados y estudiados, clasificados de acuerdo a la familia de compuestos a la que pertenecen (Van Wyk y Wink, 2004).

Tabla 1. Número aproximado de productos naturales estudiados química y farmacológicamente

Compuestos nitrogenados	
Alcaloides	12000
Aminoácidos no proteicos	700
Aminas	100
Glucósidos cianogénicos	60
Glicósidos	100
Alcamidas	150
Compuestos no nitrogenados	
Monoterpenos	2500
Sesquiterpenos	5000
Diterpenos	2500
Triterpenos, saponinas, esteroides	5000
Tetraterpenos	500
Fenilpropanoides	2000
Flavonoides	4000
Poliacetilenos, ceras, ácidos grasos	1000
Policetonas	750
Carbohidratos	>200

Fuente: Van Wyk y Wink (2004)

En el presente trabajo se lograron identificar dos flavonoides, por lo que a continuación se describe brevemente la biosíntesis de este tipo de compuestos.

1.2 Biosíntesis de flavonoides

Los flavonoides son un grupo de polifenoles naturales que están ampliamente distribuidos en las plantas y son ingeridos por humanos y animales con la dieta regular.

La hipótesis aceptada para la biosíntesis de los flavonoides propone que estos compuestos se biosintetizan a partir de la ruta mixta acetato malonato-ácido shikímico (Figura 1).

Ésta se inicia con la condensación de una molécula de malonil-CoA (**1**) con una molécula de cinamoil-CoA (**2**), la cual da origen a la chalcona (**3**), ésta se cicla por la enzima chalcona isomerasa y forma la flavona (**4**) la cual es hidroxilada en las posiciones 3 y 3' por medio de las enzimas flavona 3-hidroxilasa y flavona 3'-hidroxilasa para obtener los flavanoles (**5**) y (**6**).

El flavanol (**6**) puede ser reducido en el carbonilo en la posición 4 por la enzima flavonol reductasa y formar el flavan 3,4-diol (**7**), que sufre una reducción por la enzima flavonol reductasa y de esta forma da origen a los flavan-3-oles (**8**). Por otra parte, el flavanol (**6**) puede sufrir reacciones de deshidrogenación y glicosidación por la enzima flavanol 3-glicosidasa para formar los derivados glicosidados de flavanol (**9**) (Mata, 2000; Harborne, 1982; Markham, 1982).

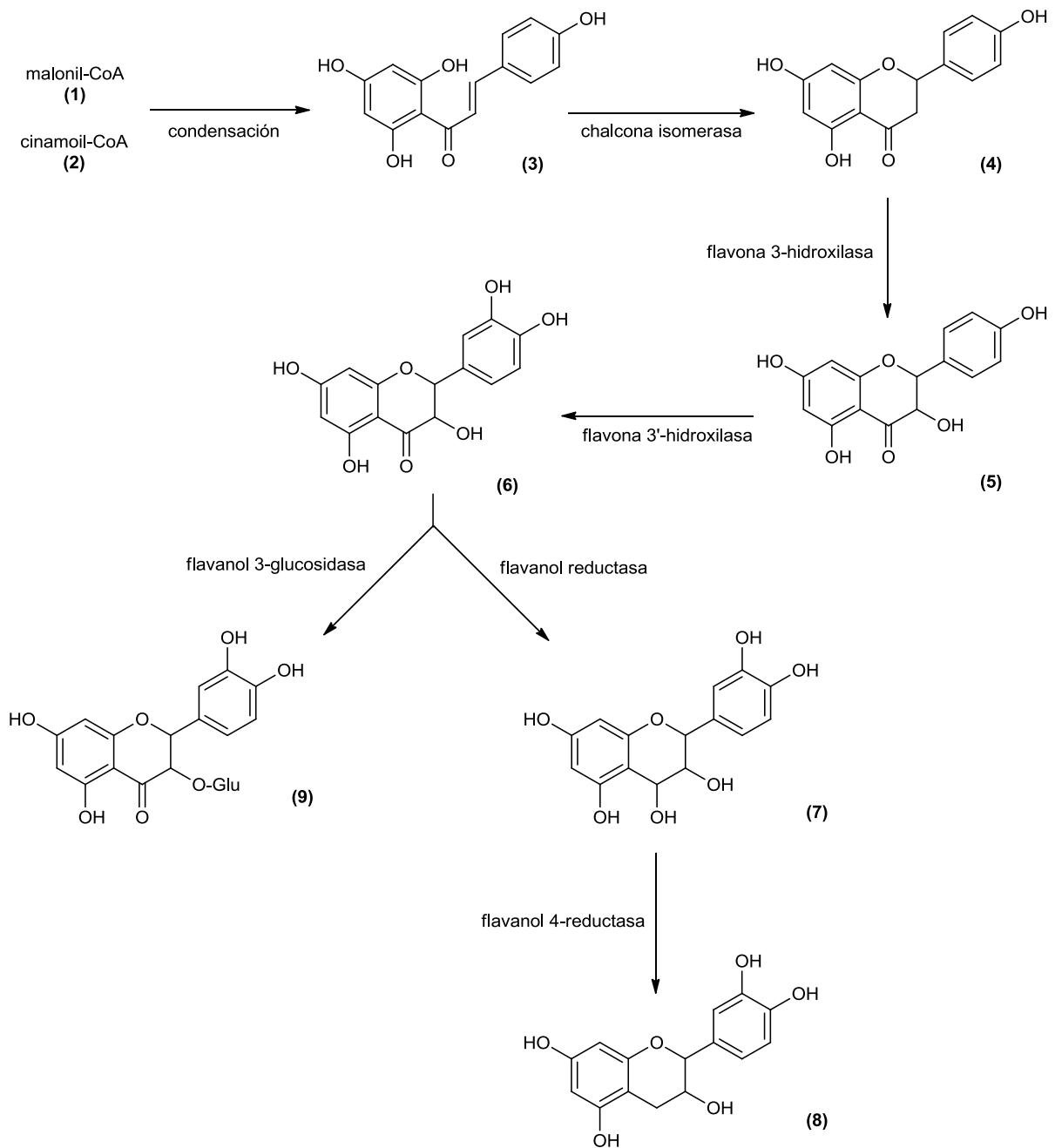


Figura 1.
Biosíntesis de flavonoides, (Mata, 2000; Harborne, 1982; Markham, 1982).

2. Antecedentes

2.1 Generalidades de la diarrea

Se conoce como diarrea cuando las defecaciones son demasiado frecuentes y con una composición con poca presencia de sólidos. Más que por el número de deposiciones, la diarrea puede definirse por el porcentaje de agua de la materia fecal. Se considera como tal cuando esta presenta más del 85 % de agua, siendo entre el 60 y el 85 % el porcentaje de una materia fecal normal. El número de deposiciones de una persona con diarrea puede variar y llegar a ser de hasta 20. La diarrea en adultos generalmente es leve y se resuelve rápidamente sin complicación, mientras que en bebés y niños (especialmente menores de 2 años) es más preocupante debido a que se pueden deshidratar muy rápido (Behrman et al., 2006).

2.1.1 Clasificación de la diarrea

De acuerdo a la afección al paciente y origen etiológico:

- Diarrea aguda: Es la que afecta al individuo como consecuencia de alguna causa puntual. Generalmente en periodos de más de dos días.

Este tipo de diarrea que, en la mayoría de los casos, suele tener una causa viral o bacteriológica, es responsable en los países subdesarrollados de la muerte de muchas personas, especialmente niños por debajo de los 5 años (Turnberg, 1986; Merk 2008).

- Diarrea crónica: Es una afección en la que el individuo presenta episodios de diarrea constante. Se considera una condición crónica cuando perdura durante cuatro o más semanas, de manera continua o en episodios abundantes. En este caso responde a algún tipo de enfermedad corporal o agente invasor (Proctor, 2007).

En función al mecanismo de producción:

- Diarrea osmótica: Se caracteriza por un aumento del componente no absorbible en el tubo digestivo debido a una inadecuada absorción de las sustancias nutritivas presentes en el intestino. Como consecuencia, los líquidos tampoco se reabsorben y permanecen en la luz intestinal. Se observa principalmente en síndromes de malabsorción o en trastornos pancreáticos, en los que la secreción de enzimas digestivas está alterada. Otra causa posible es el uso de laxantes osmóticos (que actúan aliviando el estreñimiento reteniendo agua en el intestino) o intolerancia a ciertas sustancias (Merk, 2008).
- Diarrea secretora: Se produce un aumento de la secreción de electrolitos (especialmente Na^+ y Cl^-) hacia la luz intestinal arrastrando consigo agua, debido a una alteración en el transporte de agua y de iones a través del epitelio del intestino. En la mayoría de los casos predomina una disminución de la absorción y un aumento inadecuado en la secreción de líquidos hacia la luz intestinal. Causada principalmente por malabsorción de agentes como grasas, aceites, ácidos biliares y laxantes (Merk, 2008).

- Diarrea inflamatoria: Con aumento de permeabilidad de la mucosa intestinal. A menudo debido a enfermedades del tracto gastrointestinal, como el cáncer de colon, colitis ulcerosa, etcétera; o en patologías donde no se absorben los ácidos biliares, que entrarán en el colon con un aumento de la afluencia de electrolitos. Puede producirse incluso con el hipertiroidismo (Merk, 2008).
- Diarrea debida a motilidad: Se produce por un aumento de la motilidad intestinal (hipermotilidad). Si el alimento se mueve demasiado rápido a través del intestino, no hay tiempo suficiente para la absorción de los nutrientes y el agua. Se observa por ejemplo en el síndrome de colon irritable, después de una cirugía, en el caso de trastornos hormonales (hipertiroidismo), o una neuropatía diabética (Baldi *et al.*, 2009). También aparece en pacientes a los que se les ha retirado una parte del intestino. Este tipo de diarrea puede tratarse con agentes que reduzcan el peristaltismo (Merk, 2008).
- Diarrea infecciosa: Es el tipo más frecuente. La etiología del 70% de los casos de diarrea infecciosa es la viral. Todos los años, las causas principales de gastroenteritis infantil son los rotavirus, generando de 600.000 a 800.000 muertes en todo el mundo (OMS, 2011). Los virus infectan los enterocitos del intestino, disminuyen la actividad de las enzimas que digieren los azúcares, y disminuyen la reabsorción del ión Na^+ y del agua en el intestino. Además producen activación del sistema nervioso entérico y la secreción de iones Cl^- . Todo ello produce un exceso de fluidos en la luz intestinal, que tiene como consecuencia una diarrea acuosa (Baldi *et al.*, 2009). Entre 1,5 % a 5,6 % del total de los casos registrados la infección es de etiología bacteriana, siendo las más frecuentes *Campylobacter*

(2,3 %), *Salmonella* (1,8 %), *Shigella* (1,1 %) o *Escherichia coli* (0,4 %). En este caso, las bacterias adquiridas por vía oral superan las defensas inmunológicas y atacan los enterocitos, de forma directa o mediante la producción de toxinas (Baldi *et al.*, 2009; Riverón *et al.*, 1996). Tanto las bacterias como las toxinas pueden provocar la muerte celular y pasar a la circulación sanguínea, generando síntomas sistémicos, como fiebre, escalofríos, náuseas o vómitos (Merk, 2008). En la Figura 2 se presentan algunos agentes infecciosos causantes de diarrea.

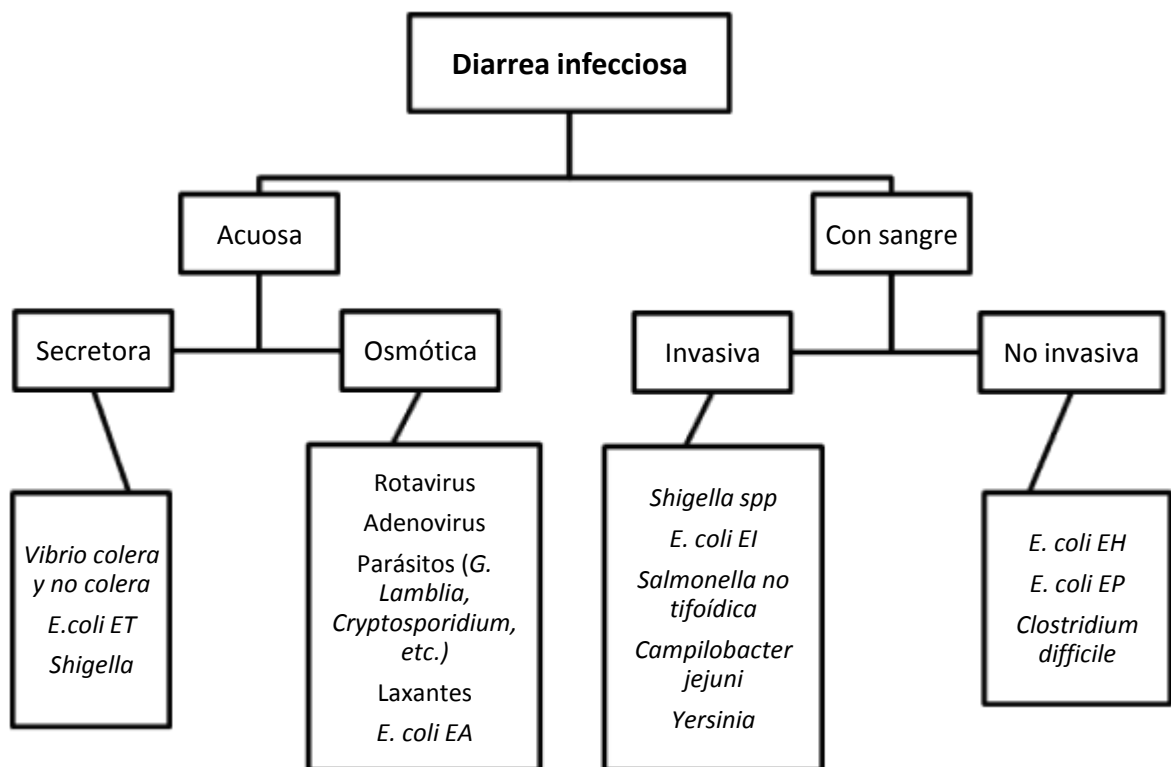


Figura 2. Causales de diarrea infecciosa, (Riverón *et al.*, 1996).

2.1.2 Tratamiento

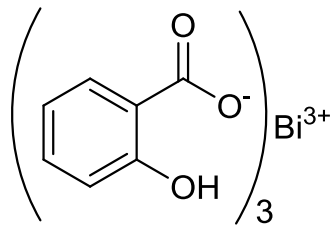
En la mayor parte de los casos la reposición de los líquidos perdidos suele ser el único tratamiento requerido. Los medicamentos antidiarréicos pueden ser de ayuda en algunos casos, pero no son recomendables para la gente cuya diarrea es causada por infección bacteriana o por parásitos puesto que parar la diarrea ocasiona un alojamiento de los microorganismos dentro del intestino, prolongando el problema. En lugar de éstos el médico prescribe antibióticos. Las causas virales son otras que pueden ser tratadas con medicamentos o dejarlas evolucionar espontáneamente, dependiendo de la severidad y el tipo de virus (Rodés *et al.*, 2002).

2.1.3 Fármacos utilizados

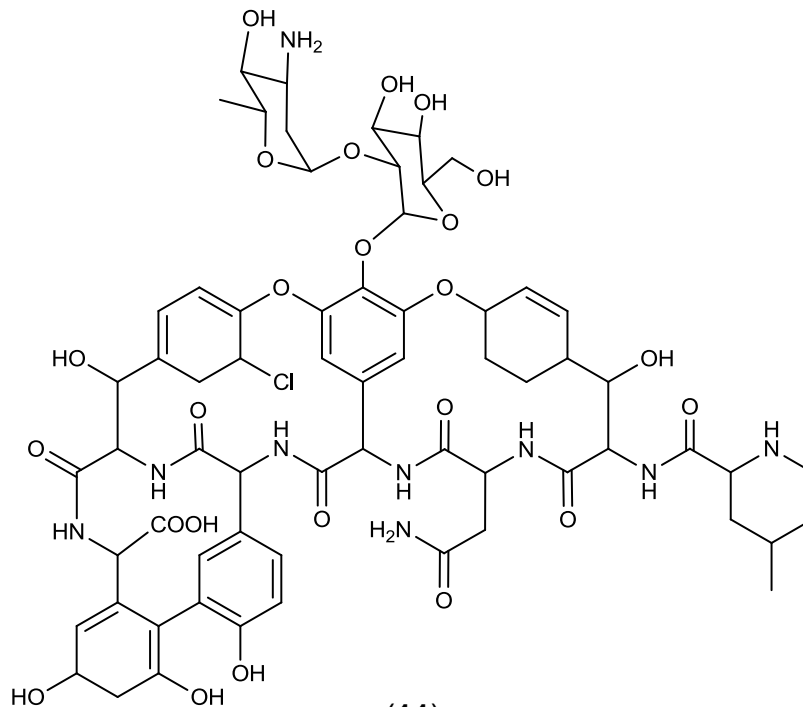
Los fármacos empleados en el control de la diarrea se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción en:

- Adsorbentes y protectores de mucosa: Inactivan toxinas y microorganismos adsorbiendo partículas en la luz del intestino, disminuyen la secreción intestinal y forman una capa protectora sobre la mucosa. Los más comunes son el subsalicilato de bismuto (**10**), albúmina, compuestos de aluminio y calcio, caolín y taninos (Flores *et al.*, 2004).
- Antimicrobianos: Empleados en el tratamiento de diarrea infecciosa causada por bacterias. El uso específico de estos fármacos generalmente se sustenta en un análisis clínico que determine el tipo de infección bacteriana. En este grupo

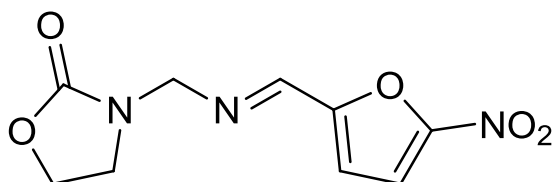
podemos encontrar: vancomicina (11), furazolidona (12), sulfametoxazol (13), trimetoprima (14), penicilinas (amoxicilina (15), ampicilina (16)), tetraciclina (17), cloranfenicol (18), etc. (Flores *et al.*, 2004).



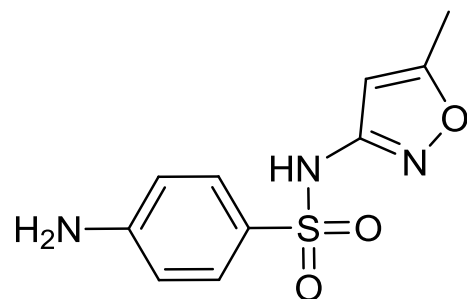
(10)



(11)

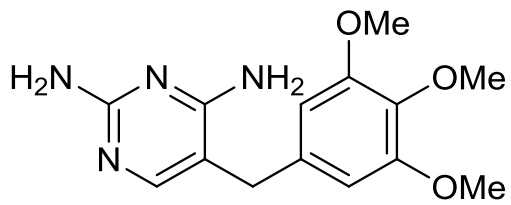


(12)

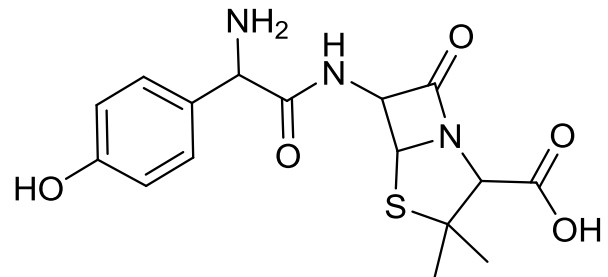


(13)

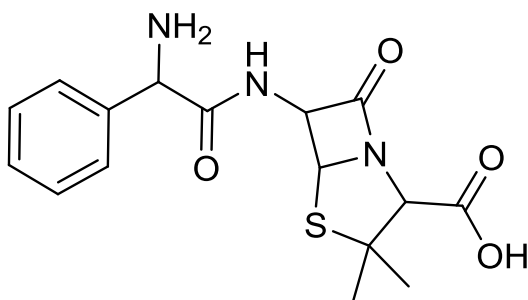
Figura 3. Fármacos empleados en el tratamiento de diarrea.



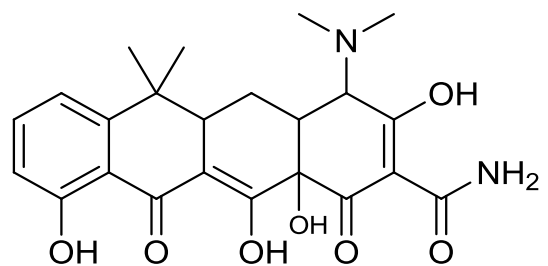
(14)



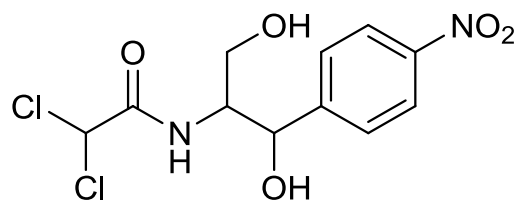
(15)



(16)



(17)



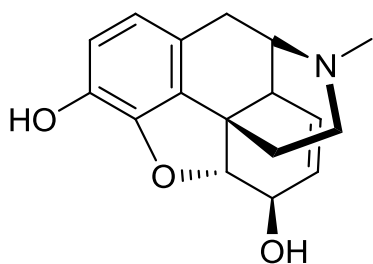
(18)

Figura 3. Fármacos empleados en el tratamiento de diarrea (continuación).

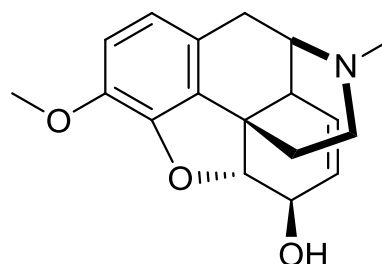
- * Inhibidores de la motilidad intestinal: Trabajan cesando la actividad del plexo mientérico lo que hace que disminuya la motilidad tanto circular como longitudinal del músculo liso de las paredes del intestino, esto hace que se aumente el tiempo de permanencia de las sustancias en el intestino y que se absorba más agua en la materia fecal (Katzung *et al.*, 2004). En este grupo podemos encontrar a la morfina (**19**), codeína (**20**), loperamida (**21**) y el difenoxilato (**22**). Actualmente la loperamida es el fármaco más empleado en el tratamiento de la diarrea no infecciosa (Flores *et al.*, 2004).

La loperamida (**21**) es un opioide receptor agonista y actúa sobre los receptores μ -opioides en el plexo mientérico del intestino, no afecta al sistema nervioso central como lo hacen otros opioides. Trabaja disminuyendo los movimientos en la masa colónica y suprime la respuesta gastrocólica. En la mayoría de los países se encuentra disponible bajo medicamentos con nombres comerciales como Fortasec, Lopex, Imodium, Dimor y Pepto Diarrea Control (Katzung *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2004; Merk 2008).

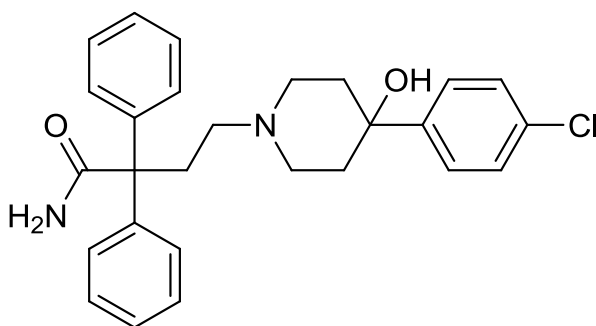
En los adultos se puede hacer un tratamiento inicialmente durante los ataques diarreicos de 4 mg por dosis, seguido de 2 mg después de cada deposición hasta alcanzar un máximo de 16 mg al día (Katzung *et al.*, 2004).



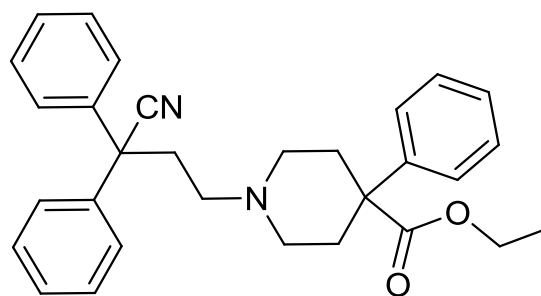
(19)



(20)



(21)



(22)

Figura 4. Fármacos inhibidores del tránsito intestinal empleados en el tratamiento de diarrea.

Los fármacos empleados en el tratamiento de la diarrea, dependiendo del mecanismo de acción y la dosis, pueden presentar reacciones adversas como cefaleas, daños neurológicos, afecciones al sistema nervioso, colitis, parálisis intestinal, disfunción hepática, náuseas, vómito, estreñimiento, etcétera (Merk, 2008; Katzung *et al.*, 2004); por tal razón es necesaria la búsqueda de compuestos que idealmente estén libres de éstas.

2.2 Generalidades de la familia Phytolaccaceae

Phytolaccaceae es una familia de fanerógamas perteneciente al orden Caryophyllales. La familia comprende cerca de dieciocho géneros, totalizando poco más de una centena de especies, ampliamente distribuidas, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales de América (Villaseñor *et al.*, 2003).

Las especies del género *Phytolacca* son hierbas de 1 hasta 3 m de altura. Perennes que crecen en bosque de pino-encino y bosque mesófilo. Tienen hojas simples alternadas, con punta, con bordes rugosos. El tallo es frecuentemente rosa o rojo, hueco y anguloso. Las flores son blanco verdosas o rosa intenso, en largas vainas al final de las ramas, desarrollan frutos púrpuras negruzcos (Villaseñor *et al.*, 2003).

2.3 Generalidades de *Phytolacca icosandra*

Phytolacca icosandra, conocida como jaboncillo, marzorquilla, ñamole, conguerán (Michoacán), quelite (Veracruz) (Martínez, 1979). Tiene usos en la medicina tradicional mexicana y en las costumbres de diferentes regiones de nuestro país, como analgésico, antiartrítico, purgante, para inducir el vómito, como jabón y la infusión de las hojas como antidiarreico (Rzedowski *et al.*, 2000).

Se distribuye en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí,

Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Yucatán (Villaseñor y Espinosa, 1998).



Figura 5. *Phytolacca icosandra*, CONABIO (2011).

Esta especie ha sido estudiada química y farmacológicamente debido a sus aplicaciones como purgante (frutos), analgésico (hojas y tallos) y emética (raíz). A través de estudios de citotoxicidad en líneas celulares de músculo y neuronales, se ha comprobado el efecto tóxico de los frutos y raíces. La toxicidad se debe a una saponina triterpénica, la fitolacagenina (**23**), y un alcaloide llamado fitolacagina (**24**). Los síntomas de intoxicación incluyen irritación oral con salivación profusa (debido al contenido de cristales de oxalato), vómitos, cólico, diarrea sanguinolenta, depresión, postración, y en casos raros puede ocurrir la muerte (Liyang *et al.*, 2008).

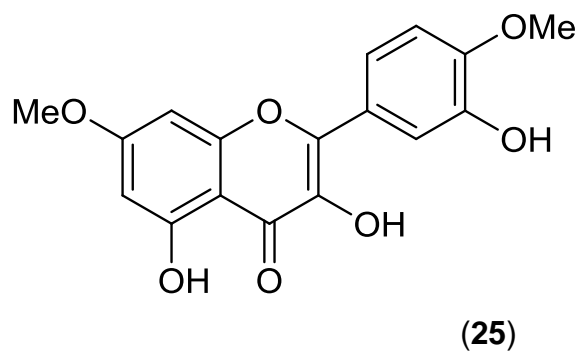
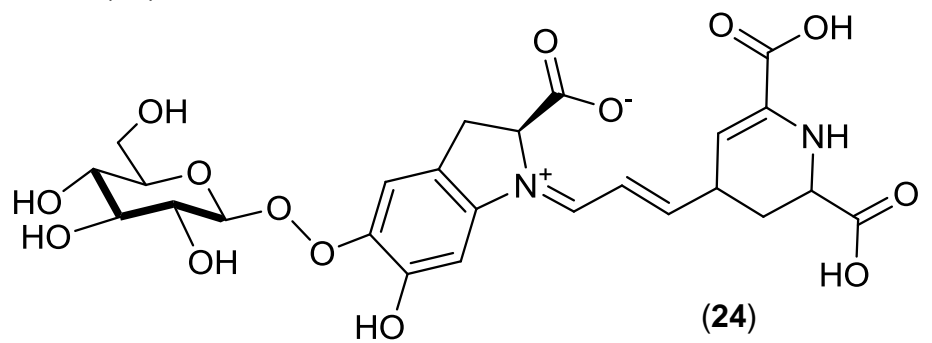
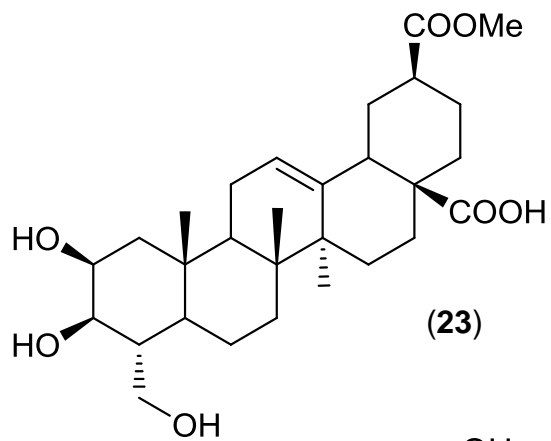
Generalmente estos compuestos tóxicos son un tipo de resina amarga, purgante y colagoga (estimulante de la expulsión de bilis), por lo que en la mayoría de los casos afectan de manera similar al organismo.

2.3.1 Compuestos aislados y actividad biológica

Los metabolitos que se han aislado de *Phytolacca icosandra* corresponden principalmente a compuestos de tipo saponinas triterpénicas (fitolacagenina (**23**)), de los frutos y raíz. Sin embargo se han aislado también alcaloides como la fitolacagina (**24**) de los frutos y flores, y flavonoides como el ombuinol (**25**) de las hojas (Stout *et al.*, 1964; Woo *et al.*, 1975/1978; Bruce *et al.*, 1981).

En la estructura de las saponinas triterpénicas (**26**) aisladas de *Phytolacca icosandra* encontramos que R se sustituye por un azúcar para formar los derivados glicosidados.

Se han descrito actividades farmacológicas para estos compuestos. En general, para las saponinas triterpénicas y sus derivados, tanto glicosidados como ácidos, se han comprobado propiedades hemolíticas, antimicrobianas (*Bacillus subtilis*, *Mycobacterium intracellulare*), antivirales (herpes, VIH e influenza), espermicidas, insecticida y molusquicida (*Biomphalaria glabrata*) (Treyvaud *et al.*, 2000). Para la fitolacagina (**24**) se determinaron características antiinflamatorias, analgésicas y se han hecho pruebas de citotoxicidad. A *Phytolacca icosandra* además se le atribuye la capacidad de generar pérdida de peso, aunque esta característica no ha sido completamente estudiada (Sparg *et al.*, 2004; Oda, 2000).



R^(1,2,3) = Glucosa
Xilosa
Ramnosa
Arabinosa

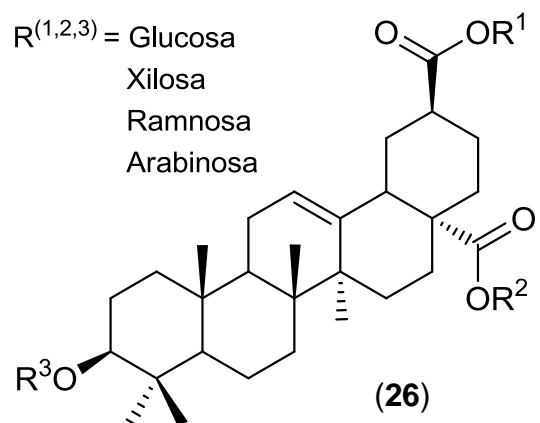


Figura 6. Compuestos aislados de *Phytolacca icosandra*.

3. Justificación

La realización de este proyecto proporcionará conocimiento sustentado en la experimentación e investigación científica acerca de los compuestos aislados de *Phytolacca icosandra* en el tratamiento de diarrea. De este modo se beneficiará a la sociedad porque ayudará a resolver algunas problemáticas que cotidianamente se presentan.

Esta investigación busca ampliar el conocimiento existente acerca de las plantas medicinales que podemos encontrar en nuestro país y con esta información, se abre la posibilidad a otros investigadores de explorar más a fondo los tratamientos que los principios activos encontrados puedan dar para distintas enfermedades.

Los estudios fitoquímicos biodirigidos y la evaluación de la actividad biológica de nuevos compuestos deben orientarse hacia el cumplimiento de los criterios farmacológicos y etnobotánicos, lo cual significa que deben ajustarse a la manera en que comúnmente se hace uso de las plantas medicinales. Por lo tanto, esta investigación hará uso de estos criterios en el análisis de los resultados.

4. Planteamiento del problema

La diarrea, a pesar de ser una de las afecciones del sistema digestivo más comunes, es un problema serio que puede ser tratado de diferentes formas, haciendo uso de la medicina de patente o de la medicina tradicional.

México es uno de los países con mayor incidencia de cuadros sintomáticos con diarrea causados por diversas etiologías (OMS, 2011), es por esto que surge la necesidad de investigar vías nuevas de tratamientos eficaces para contrarrestar sus efectos. Haciendo uso de técnicas cromatográficas y espectroscópicas, y evaluando los efectos antidiarreicos de los extractos metanólico y clorofórmico de las hojas y flores de la especie *Phytolacca icosandra* se puede obtener sustento científico e información que sirva de base en la generación de nuevos fitomedicamentos.

En el Estado de Hidalgo se registran aproximadamente 23 mil 347 casos de diarrea al año, lo que representa un 17 % de la población, sin embargo, gracias a las medidas de precaución que se han tomado, el consumo de alimentos en buen estado y una adecuada desinfección del agua, los índices de esta enfermedad van a la baja. En las jurisdicciones donde más casos se presentan son Pachuca, con cerca del 20 % y Tula, con poco más de 17 %. Le siguen Tulancingo y Huejutla con cerca del 10 %. Los grupos de edad más afectados son los de 5 a 64 años y los menores de cinco años. El Gráfico 2 resume los casos de diarrea en diferentes municipios de Hidalgo como un porcentaje del total de casos registrados (SSA, 2010).

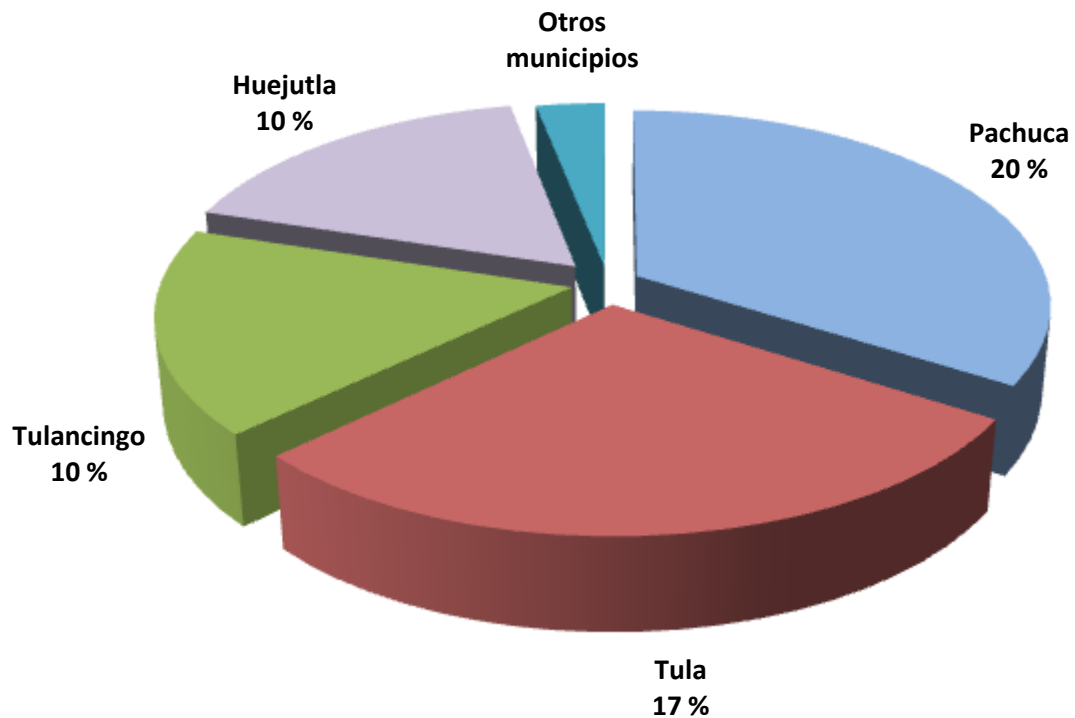


Gráfico 2. Casos de diarrea en el Estado de Hidalgo (SSa, 2010).

Phytolacca icosandra ha sido utilizada en México para muchos fines, anteriormente se utilizaba para lavar, ya que los frutos maduros producen mucha espuma y tienen la capacidad de remover residuos de las fibras. Pero en la medicina tradicional destacan sus aplicaciones para el tratamiento de trastornos del sistema digestivo como la diarrea, además de artritis, reumatismo y pérdida de peso (Villaseñor y Espinoza, 1998).

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la actividad antidiarréica de los extractos metanólico y clorofórmico de las partes aéreas (flores y hojas) de *Phytolacca icosandra* y realizar el estudio fitoquímico del extracto con mejor actividad antidiarreica.

5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Evaluar biológicamente los extractos metanólico y clorofórmico de flores y hojas con la finalidad de reconocer el extracto con mejor actividad, que se ajuste a los criterios farmacológicos y etnobotánicos establecidos.
- 5.2.2 Realizar la separación a través de técnicas cromatográficas del extracto biológicamente activo.
- 5.2.3 Determinar la estructura de los principios activos a partir de la información arrojada por los análisis espectroscópicos.

6. Hipótesis

La infusión de *Phytolacca icosandra* posee propiedades medicinales como antidiarreico. Los extractos crudos y compuestos aislados tendrán potencial antidiarreico en alguno de los modelos empleados en la evaluación biológica.

7. Parte experimental

7.1 Material vegetal

El material vegetal se colectó en la comunidad de Macheros, municipio de El Capulín, Estado de México en junio del 2009.

7.2 Identificación del material vegetal

Un ejemplar se depositó en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social y la identificación se está llevando a cabo por la Dra. Abigail Aguilar Contreras.

7.3 Operaciones preliminares

Del material recolectado una vez seco y limpio, se procedió a realizar la molienda de los órganos por separado, al finalizar este procedimiento se obtuvo un peso de 1.649 kg de hojas y 249 g de flores.

7.4 Obtención de extractos en pequeña escala para el proceso de selección del extracto activo

Los extractos se obtuvieron por maceración con el disolvente (40 g del material vegetal en 500 mL x 3 veces x 1 semana) a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y el exceso de disolvente fue eliminado con ayuda de un rotavapor a presión reducida hasta sequedad. Se obtuvieron los extractos metanólico y clorofórmico de

hojas y flores a los cuales se les determinó el efecto antidiarreico. En la Tabla 2 resume la obtención de extractos y muestra el rendimiento de la extracción.

Tabla 2. Obtención de extractos crudos.

Extracto	g Planta	g Extracto	% R
Metanólico flores	40	3.024	7.56
Metanólico hojas	40	6.802	17.01
Clorofórmico flores	40	1.967	4.89
Clorofórmico hojas	40	0.969	2.42

% R = por ciento de rendimiento

7.5 Obtención del extracto metanólico de las hojas a gran escala

El extracto se obtuvo por maceración de las hojas secas con el disolvente (1.2 kg del material vegetal en 2 L x 3 veces x 1 semana) a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y el exceso de disolvente fue eliminado con ayuda de un rotavapor a presión reducida hasta sequedad. Se obtuvo el extracto metanólico de las hojas (40.16 g, con un rendimiento del 3.35 %), el cual se empleó para el estudio fitoquímico.

7.6 Análisis cromatográfico y equipos utilizados

Las cromatografías en columna se realizaron sobre gel de sílice (60 Merk, malla 70-230 ASTM), las cromatografías en capa fina tanto analítica como preparativa se efectuaron utilizando placas de aluminio y vidrio (cromatofolios soportados en aluminio o vidrio, TLC 20 x 20 cm, sílica gel 60 F₂₅₄ Merk). Como agentes

cromógenos se emplearon soluciones de ácido sulfúrico al 1 % en etanol, cloruro férrico, vainillina y sulfato cérico. Para los análisis de RMN ^1H se emplearon los equipos Varian Unity de 300 MHz y Bruker Ultrashield Advanced III de 400 MHz. Se utilizó TMS como referencia interna.

7.7 Determinación de la actividad antidiarréica

Se utilizaron ratas del tipo Wistar con pesos de entre 100 a 150 g y ratones del tipo ICR con pesos de entre 30 a 40 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio (dieta normal y agua *ad libitum*). Para los ensayos se pusieron en ayuno de 24 horas con acceso libre al agua.

7.7.1 Modelo de motilidad gastrointestinal

Las ratas se dividieron en seis grupos de cinco animales cada uno, el control positivo recibió loperamida (2.5 mg/kg) y el control negativo Tween 80 al 1 % en agua, Los extractos metanólicos y clorofórmicos (300 mg/kg) o el vehículo (Tween 80 al 1% en agua) fueron administrados por vía intragástrica, 60 minutos después, se administró una suspensión al 2 % de carbón activado en una solución al 1.5 % de goma arábica (1 mL/animal), mas 1 mL de aceite de ricino. Transcurridos 60 minutos, los animales fueron sacrificados y el tracto gastrointestinal removido, se midió la distancia recorrida por el carbón activado, los resultados se expresan como un porcentaje de la longitud total del intestino desde el píloro al ciego (Pérez *et al.*, 2005; Agbor *et al.*, 2004; Tangpu y Yadav, 2004).



Figura 7. Modelo de motilidad gastrointestinal.

7.7.2 Modelo de acumulación de fluido intestinal

Las ratas se dividieron en seis grupos de cinco ratas cada uno, el control positivo recibió loperamida (2.5 mg/kg) mientras que el control negativo recibió 1 mL de Tween 80 al 1 % en agua por vía intragástrica. Los extractos metanólicos y clorofórmicos (300 mg/kg) fueron administrados por la misma vía. Después de 30 minutos, las ratas fueron anestesiadas y se procedió a realizar la cirugía, que consistió en suturar el intestino delgado a la altura del ciego para evitar el tránsito de fluido y lograr su acumulación. Se suturó la incisión y se administró 1 mL de aceite de ricino. Transcurridos 60 minutos, los animales fueron sacrificados y el tracto gastrointestinal removido, se midió la cantidad de fluido acumulada en el intestino delgado, los resultados se expresan como un porcentaje de inhibición de producción de fluido intestinal (Mbagwu y Adeyemi, 2008; Adeyemi y Akindele, 2008; Nwafor y Bassey, 2007; Rouf *et al.*, 2007; Teke *et al.*, 2007).



Figura 8. Modelo de acumulación de fluido intestinal.

7.7.3 Modelo del aceite de ricino

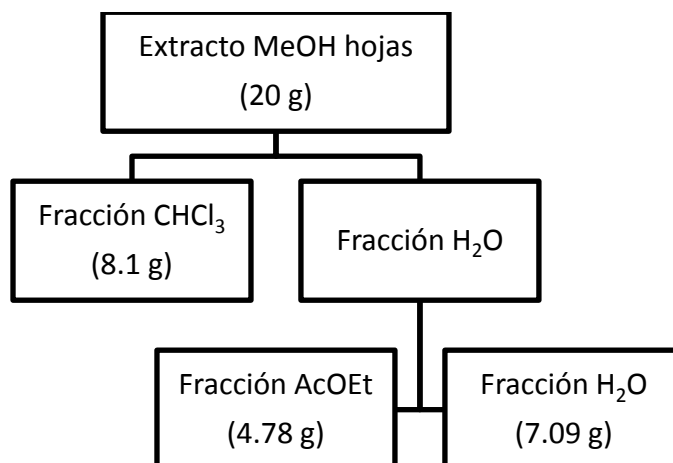
Los ratones se dividieron en seis grupos de seis animales, el control positivo recibió loperamida (2.5 mg/kg), el control negativo recibió vehículo (Tween 80 al 1% en agua), los demás grupos recibieron los extractos metanólicos y clorofórmicos (300 mg/Kg) por vía intragástrica. Transcurridos 30 minutos se les administró por la misma vía 0.5 mL de aceite de ricino y se colocaron individualmente en cajas de plástico con papel filtro en el fondo, mismo que se cambió cada hora durante 4 horas, se registró el número total de heces, clasificándolas como blandas, duras o líquidas. Los resultados se expresan como un porciento en la inhibición de la producción de heces líquidas (Mbagwu y Adeyemi, 2008; Nwafor y Bassey, 2007; Rouf *et al.*, 2007; Teke *et al.*, 2007).



Figura 9. Modelo del aceite de ricino.

7.8 Separación de compuestos del extracto activo

Una parte del extracto activo (metanólico de las hojas, 20 g) se sometió a partición con disolventes (100 mL x 3). Se obtuvieron las fracciones acetato de etilo (AcOEt), cloroformo (CHCl_3) y agua (H_2O), a las cuales se les realizó un análisis de RMN ^1H que mostró señales características de ácidos grasos para la fracción clorofórmica y azúcares en la fracción acuosa. En el caso de la fracción de AcOEt se apreciaron señales típicas de compuestos aromáticos e hidroxilados, lo cual permitió suponer la presencia de compuestos de interés y por tal razón se decidió continuar el estudio químico con esta fracción.



Esquema 1. Fraccionamiento por partición del extracto metanólico de las hojas

El extracto AcOEt (4.78 g) se sometió a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna utilizando 6 pulgadas de gel de sílice como soporte en una columna de 5.0 cm de diámetro y 60 cm de longitud, eluyendo con una mezcla CHCl_3 :Acetona:MeOH (28:55:17). Se obtuvieron 32 fracciones de 20 mL cada una, las cuales se agruparon de acuerdo a sus características cromatográficas para obtener cinco fracciones secundarias (F1'-F5') (Tabla 3).

Tabla 3. Fraccionamiento del extracto AcOEt de la partición.

Fracciones secundarias	Peso (g)
F1' (1)	0.21
F2' (2)	0.24
F3' (fase líquida) (3 – 7)	0.87
F3' (fase sólida) (3 – 7)	1.02
F4' (8 – 22)	0.71
F5' (23 – 32)	0.23

La fracción F3' (fase sólida, 1.02 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna (Tabla 4), usando como fase estacionaria 5 g de gel de sílice en una columna de 1 cm de diámetro y eluyendo por gradiente en incremento de polaridad con CHCl_3 , AcOEt, MeOH. Se colectaron 54 eluatos de 10 mL cada uno y se agruparon en quince fracciones secundarias en función a sus características cromatográficas.

Tabla 4. Fraccionamiento secundario de F3'.

Fracción	Peso (mg)
F1'' (1 – 19)	6.30
F2'' (20)	10.02
F3'' (21)	13.10
F4'' (22)	14.09
F5'' (23)	16.01
F6'' (24)	15.40
F7'' (25)	11.20
F8'' (26)	17.10
F9'' (27)	10.02
F10'' (28)	13.00
F11'' (29)	12.10
F12'' (30)	10.20
F13'' (31)	9.30
F14'' (32 – 40)	32.00
F15'' (41 – 54)	15.00

Después del análisis cromatográfico de las fracciones agrupadas se comenzó la purificación de los compuestos en aquellas que presentaron una mejor separación.

De la fracción F6'' se obtuvo diosmetina (**28**) (4.2 mg), la cual se purificó por cromatografía en capa fina preparativa, eluyendo con una mezcla AcOEt:MeOH:H₂O (100:26:16.5). Se aplicó el mismo procedimiento para las fracciones F14'' y F15'' (32 y 15 mg) de las cuales se aisló 7-O- β -D-ramnósido de campferido (**27**) (5.8 mg).

Se realizó un nuevo fraccionamiento del extracto activo (Tabla 5). Diez gramos del extracto (metanólico de hojas) se sometieron a cromatografía en columna, empleando como fase estacionaria 30 g de gel de sílice en una columna de 2.0 cm de diámetro y como fase móvil CHCl₃, AcOEt y MeOH en incremento de polaridad por gradiente. Se colectaron 21 fracciones primarias de 250 mL, las cuales por afinidad se combinaron en 11 fracciones secundarias.

Tabla 5. Segundo fraccionamiento del extracto activo.

Fracción secundaria	Peso (g)
F1' (1)	0.564
F2' (2)	1.465
F3' (3 – 8)	0.447
F4' (9 – 10)	0.073
F5' (11)	0.061
F6' (12 – 13)	0.352
F7' (14)	1.048
F8' (15)	1.092



F9' (16)	1.120
F10' (17 – 18)	0.063
F11' (19 – 21)	0.021

En función a las características cromatográficas, se procedió a purificar la F7' (150 mg) por medio de cromatografía en capa fina preparativa. De la cual se aisló diosmetina (**28**) (2.1 mg). La Tabla 6 muestra los compuestos purificados y el peso final de los mismos.

Tabla 6. Compuestos purificados.

Fracción	Compuesto	Peso (mg)
F6''	Diosmetina	6.3
F14'' y F15''	7-O- β -D-ramnósido de campferido	5.8

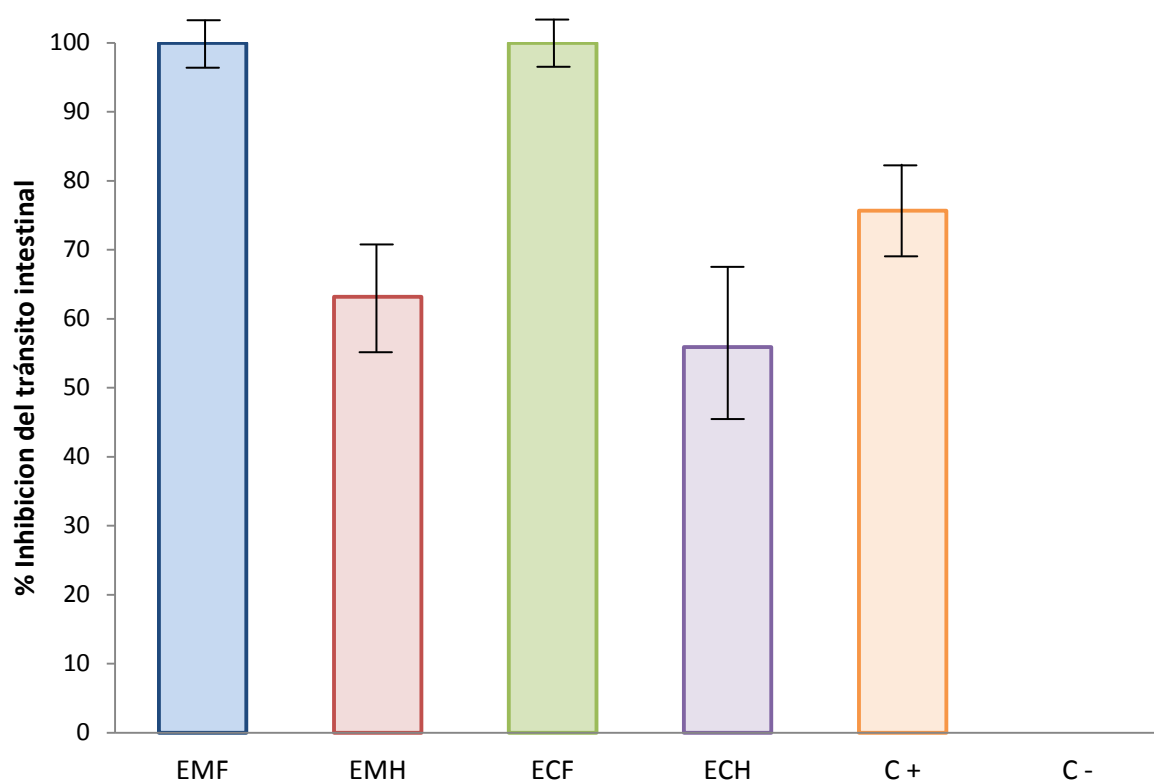


8. Resultados y discusión

8.1 Determinación del extracto biológicamente activo

8.1.1 Resultados del modelo de motilidad gastrointestinal

Los resultados del ensayo indicaron que los extractos EMF y ECF presentaron la mayor actividad antidiarréica. Sin embargo, los extractos clorofórmico y metanólico de las hojas mostraron una actividad comparable con la del fármaco control.



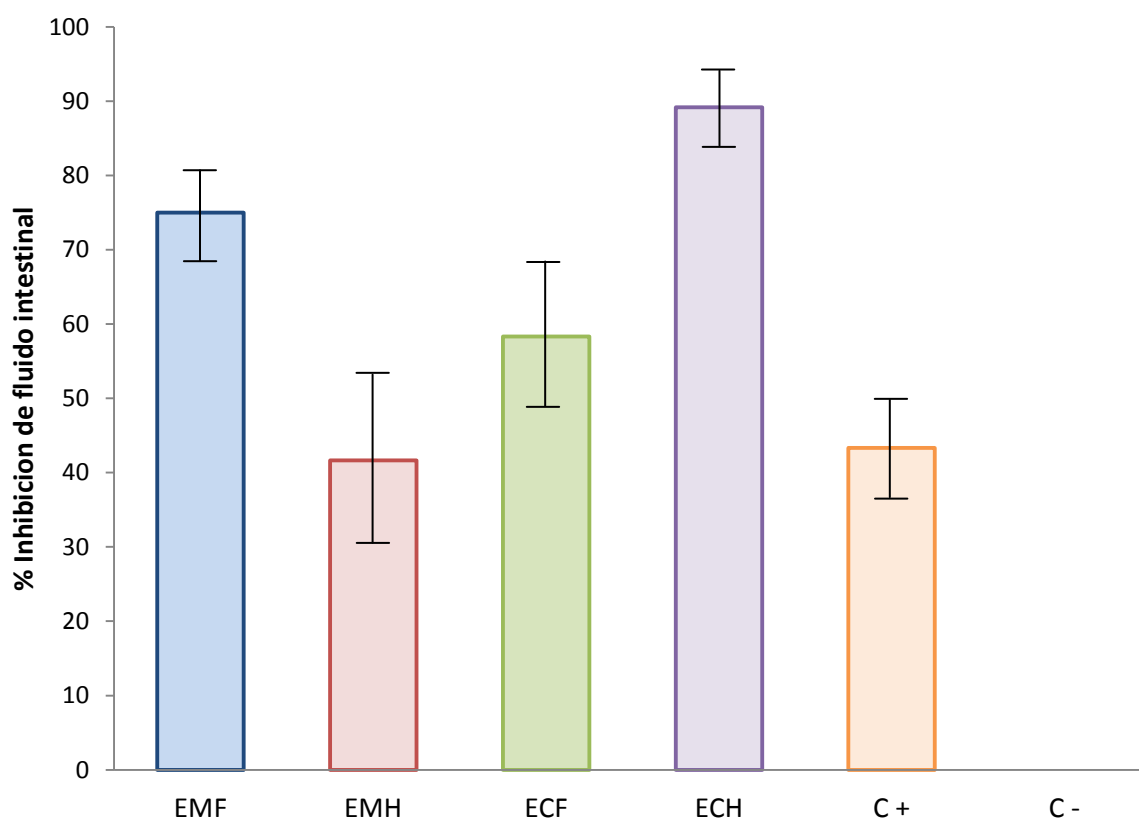
El gráfico muestra los valores promedio de los resultados de la prueba \pm SD, $n = 5$, para la dosis evaluada (300 mg/kg) (X 3). EMF = extracto metanólico de las flores, EMH = extracto metanólico de las hojas, ECF = extracto clorofórmico de las flores, ECH = extracto clorofórmico de las hojas, C+ = control positivo (fármaco control, loperamida), C- = control negativo.

Gráfico 3. Porcentaje de tránsito intestinal



8.1.2 Resultados del modelo de acumulación de fluido intestinal

Los resultados del modelo indican que el extracto que presentó la mayor actividad fue el clorofórmico de las hojas, ya que inhibió en mayor proporción la formación de fluido intestinal. Le siguen el metanólico y clorofórmico de las flores. La actividad del extracto metanólico de las hojas es casi igual que la de la loperamida.



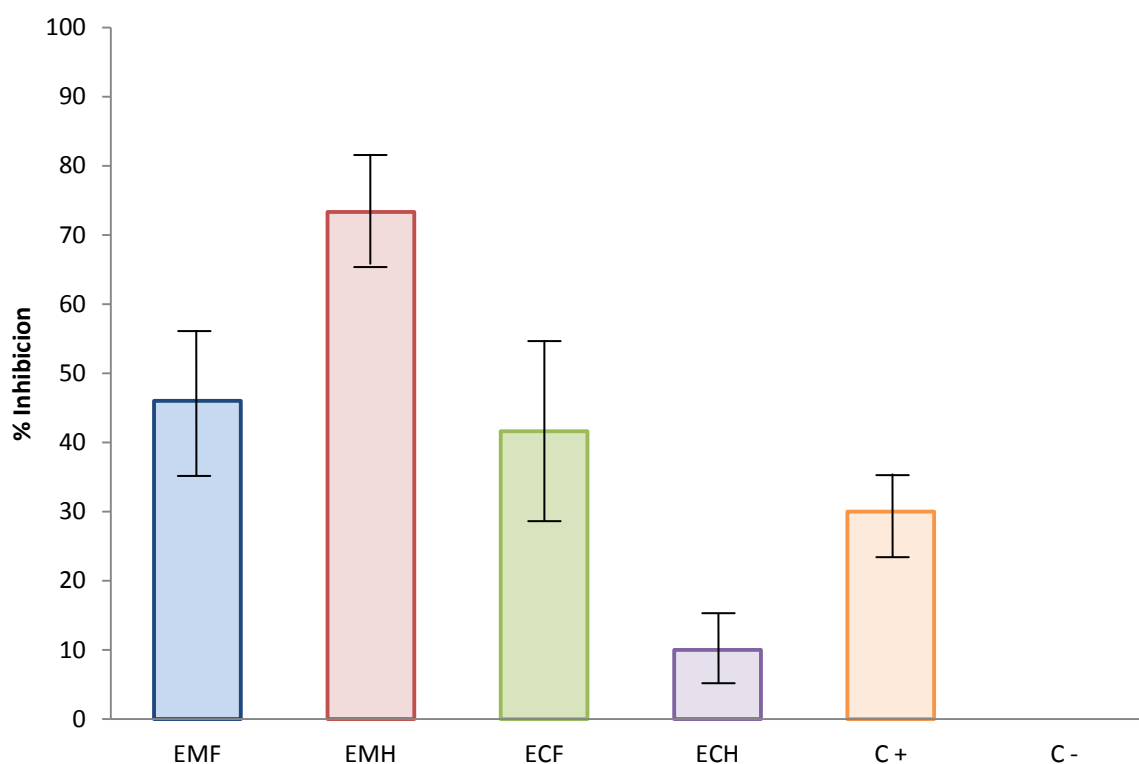
El gráfico muestra los valores promedio de los resultados de la prueba \pm SD, $n = 5$, para la dosis evaluada (300 mg/kg) (X 3). EMF = extracto metanólico de las flores, EMH = extracto metanólico de las hojas, ECF = extracto clorofórmico de las flores, ECH = extracto clorofórmico de las hojas, C+ = control positivo (fármaco control, loperamida), C- = control negativo.

Gráfico 4. Porcentaje de inhibición de fluido intestinal



8.1.3 Resultados del modelo del aceite de ricino

En este modelo el extracto metanólico de las hojas demostró una actividad superior a la de todos los extractos evaluados y se apreciaron valores de su capacidad de inhibición de casi el doble que el fármaco control.



El gráfico muestra los valores promedio de los resultados de la prueba \pm SD, $n = 6$, para la dosis evaluada (300 mg/kg) (X 3). EMF = extracto metanólico de las flores, EMH = extracto metanólico de las hojas, ECF = extracto clorofórmico de las flores, ECH = extracto clorofórmico de las hojas, C+ = control positivo (fármaco control, loperamida), C- = control negativo.

Gráfico 5. Porcentaje de inhibición de diarrea



El uso común de *Phytolacca icosandra* para el tratamiento de la diarrea es a través de la infusión acuosa de las hojas secas. En el presente trabajo se demostró que los extractos clorofórmicos de flores y hojas, así como el metanólico de las flores tienen buena actividad antidiarreica e incluso superan la actividad del fármaco control.

El extracto metanólico de las hojas cumple con los criterios farmacológicos y etnobotánicos para ser utilizado en un estudio biodirigido. Es decir, la polaridad del extracto, así como la parte de la planta que se utilizó son similares a los empleados de manera tradicional. En cuanto a la evaluación biológica del extracto se apreció una actividad equiparable con la de la loperamida, lo cual permitió suponer que los compuestos presentes pudieran tener actividad farmacológica similar a la de éste fármaco.

En función a las consideraciones anteriores es que se decidió continuar el estudio químico con el extracto metanólico de las hojas, del cual se aislaron dos compuestos no reportados previamente para esta especie.



8.2 Elucidación estructural del 7-O- β -D-ramnósido de campferido

El compuesto se aisló como un sólido amarillo amorfo. En el espectro de RMN ^1H en DMSO a 400 MHz (Figura 10) se observó una señal doble en 5.23 ppm ($J = 7.7$ Hz) correspondiente al hidrógeno anomérico del glicósido, que indicó la posición β . En 1.09 ppm ($J = 6.7$ Hz) se apreció una señal doble correspondiente al grupo metilo del azúcar, que confirmó la presencia de ramnosa. Un sistema A_2B_2 se observó en 8.08 ppm ($J = 8.9$ Hz) correspondiente a los protones 2' y 6', y en 6.89 ppm ($J = 8.9$ Hz) para los protones 3' y 5', este sistema confirmó la sustitución del anillo B en la posición 4'. Los hidrógenos 6 y 8 del anillo A se apreciaron en 6.36 y 6.72 ppm como dos señales dobles ($J = 1.8$ Hz), esto permitió determinar las sustituciones del anillo en las posiciones 5 y 7. En 3.87 ppm se apreció una señal simple correspondiente al fragmento metoxilo. La Tabla 7 muestra los datos de RMN ^1H a 400 MHz en DMSO, así como los datos reportados en la literatura (Manguero *et al.*, 2007; Imperato, 1998; Curir *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2008; Andersen, 2006; Long-Ze *et al.*, 2007; Braca *et al.*, 2003).

En estudios previos se ha reportado la posición de los protones H-6 y H-8 a través de las espectroscopias de RMN en una y dos dimensiones (COSY, INEPT, HETCOR, HMQC y HMBC). La comparación de estos datos con los obtenidos experimentalmente permitió asignar los protones a su señal correspondiente (Pandey *et al.*, 2008; Andersen, 2006; Long-Ze *et al.*, 2007; Braca *et al.*, 2003).

Tabla 7. Datos de RMN ^1H del 7-O- β -D-ramnósido de campferido

Posición	δ en ppm		Multiplicidad (J en Hz)	
	Experimental	Literatura *	Experimental	Literatura *
6	6.36	6.44	d (1.8)	d (2.0)
8	6.72	6.76	d (1.8)	d (2.0)
2' / 6'	8.08	8.04	d (8.9)	d (8.8)
3' / 5'	6.89	6.90	d (8.9)	d (8.8)
1''	5.23	5.20	d (7.7)	d (7.5)
6''	1.09	1.15	d (6.7)	d (6.5)
-OMe	3.87	3.90	s	s

* Manguro *et al.*, 2007; Imperato, 1998; Curir *et al.*, 2001; Pandey *et al.*, 2008; Andersen, 2006; Long-Ze *et al.*, 2007; Braca *et al.*, 2003

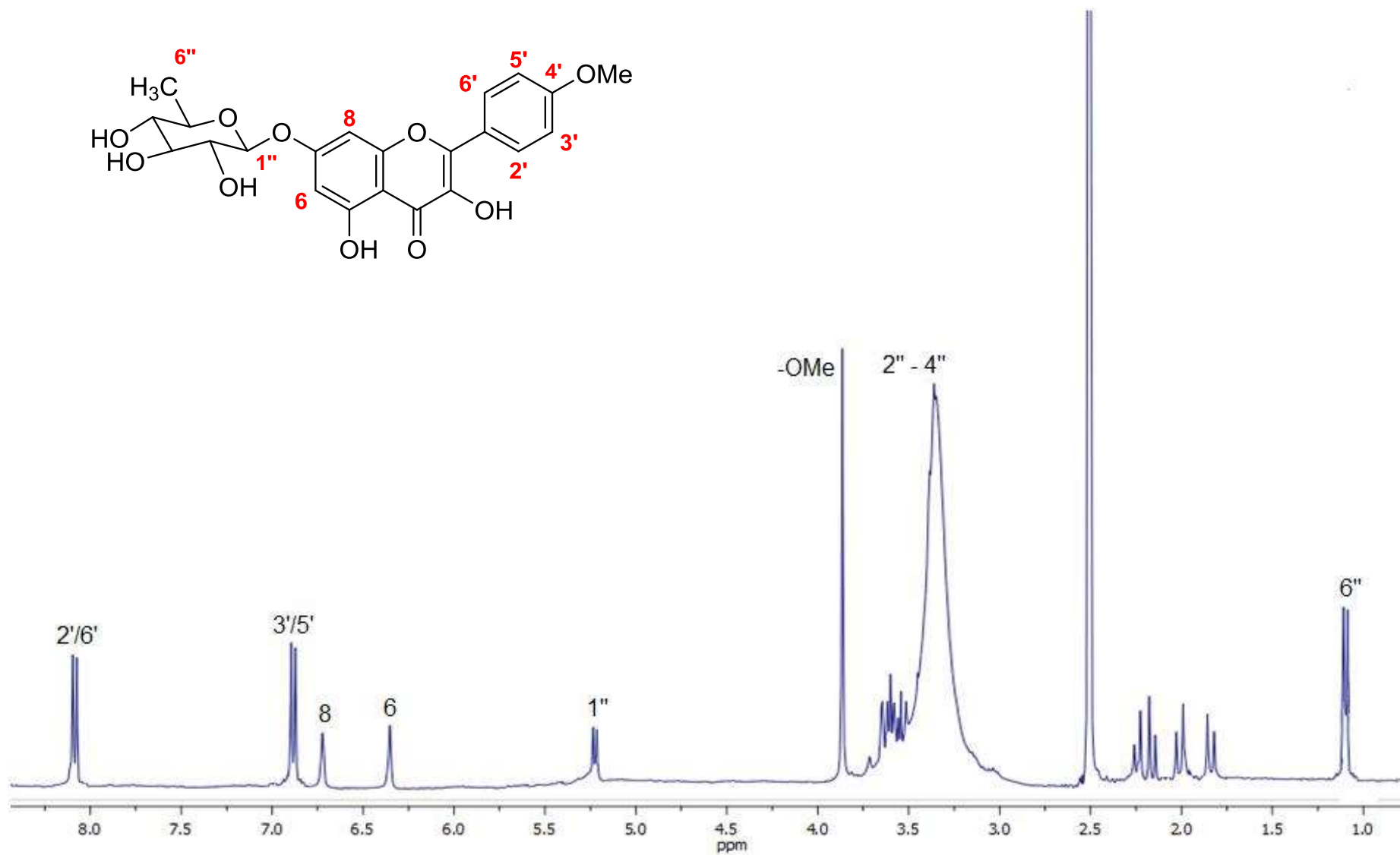


Figura 10. Espectro de RMN ^1H (400 MHz) de 7-O- β -D-ramnósido de campferido en $\text{DMSO}-d_6$.



8.3 Elucidación estructural de diosmetina

El compuesto se aisló como un sólido amorfo amarillo. En el espectro de RMN ^1H en DMSO a 300 MHz (Figura 11) se observó una señal simple en 7.26 ppm correspondiente al H-3 del anillo C. En 6.59 y 6.66 ppm aparecieron dos señales dobles ($J = 1.8$ Hz) de los protones 6 y 8. Se observaron dos señales dobles, en 7.83 ppm ($J = 2.1$ Hz) y en 7.46 ($J = 8.6$ Hz) correspondientes a los protones 2' y 6' respectivamente. En 7.79 ppm apareció la señal doble de dobles ($J = 8.2, 2.1$ Hz) correspondiente al protón H-6'. La señal simple del fragmento metoxilo se observó en 3.63 ppm. La tabla 8 muestra los datos de RMN ^1H a 300 MHz en DMSO, así como los datos reportados en la literatura (Andersen, 2006; Niranjana *et al.*, 1997; Emam *et al.*, 1997; Abourashed *et al.*, 1999; Koukoulitsa *et al.*, 2006; Long-Ze *et al.*, 2007).

Los estudios reportados previamente de este compuesto, espectrometrías UV, RMN en una y dos dimensiones (COSY, HETCOR, HMBC y HMQC), sirvieron de referencia para la asignación de los protones 6 y 8, y de la posición del hidroxilo en el anillo B (Andersen, 2006; Niranjana *et al.*, 1997; Emam *et al.*, 1997; Abourashed *et al.*, 1999; Koukoulitsa *et al.*, 2006; Long-Ze *et al.*, 2007).

Tabla 8. Datos de RMN ^1H de diosmetina

Posición	δ en ppm		Multiplicidad, J en Hz	
	Experimental	Literatura *	Experimental	Literatura *
3	7.26	6.80	s	s
6	6.59	6.47	d (1.8)	d (2.0)
8	6.66	6.70	d (1.8)	d (2.0)
2'	7.83	7.52	d (2.1)	d (2.0)
6'	7.79	7.42	dd (8.2, 2.1)	dd (8.5, 2.0)
5'	7.46	7.10	d (8.6)	d (9.0)
-OMe	3.63	3.88	s	s

* Andersen, 2006; Niranjana *et al.*, 1997; Emam *et al.*, 1997; Abourashed *et al.*, 1999; Koukoulitsa *et al.*, 2006; Long-Ze *et al.*, 2007

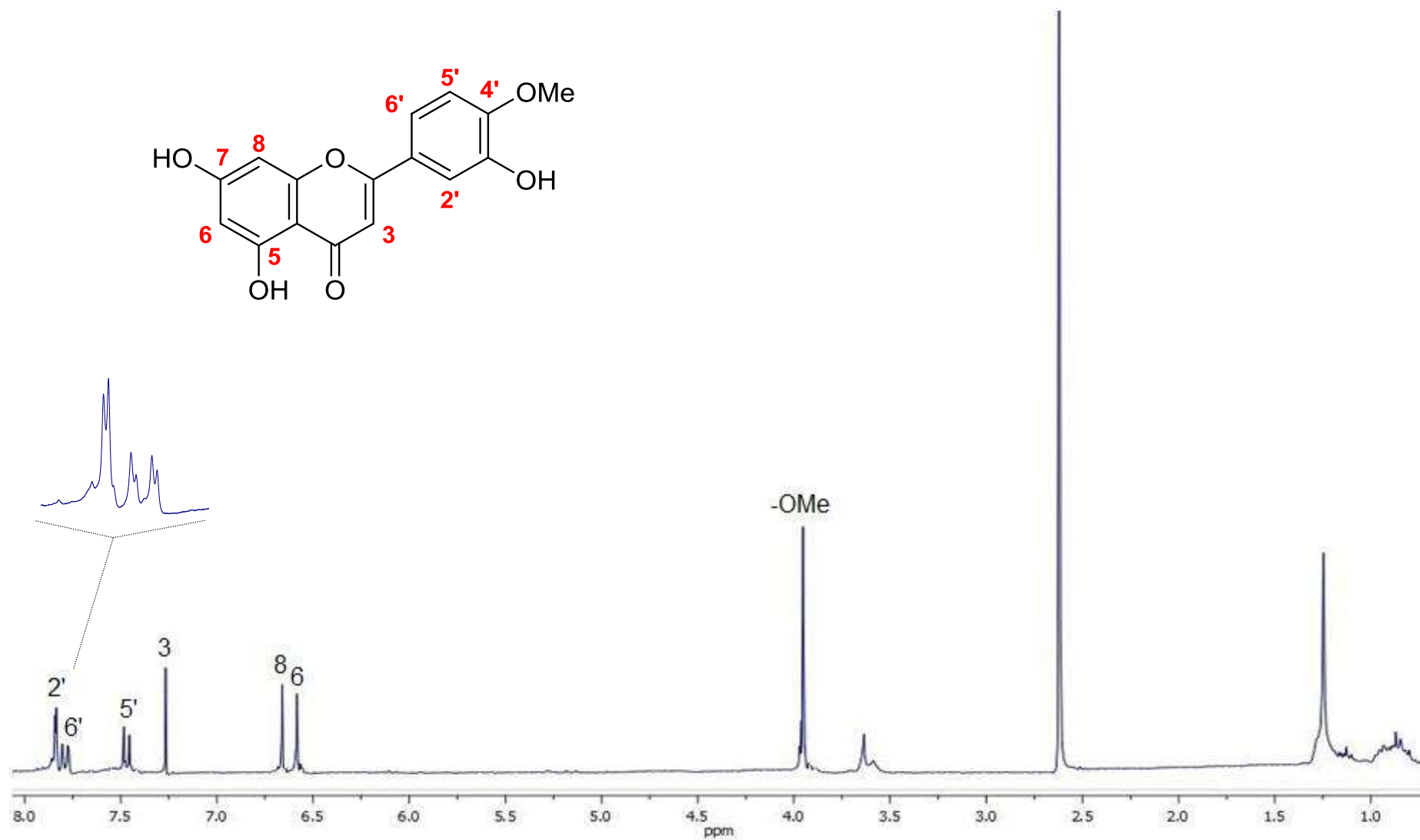


Figura 11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de diosmetina en $\text{DMSO}-d_6$.



9. Conclusiones

- * Se logró comprobar el efecto antidiarreico de los extractos metanólico y clorofórmico de las partes aéreas (hojas y flores) de *Phytolacca icosandra* a una dosis de 300 mg/kg.
- * Del extracto metanólico de las hojas se aislaron e identificaron dos flavonoides: 7-O- β -D-ramnosido de campferido (**27**) y diosmetina (**28**), no reportados previamente para esta especie.
- * El estudio de la actividad antidiarréica de *Phytolacca icosandra* proporciona un sustento científico y valida el uso de dicha especie en la medicina tradicional como agente terapéutico en el tratamiento de diarreas no infecciosas.
- * La presente investigación es una contribución al conocimiento fitoquímico y farmacológico de la especie *Phytolacca icosandra*.

10. Perspectivas

En trabajos futuros se pretende realizar el estudio fitoquímico de los extractos clorofórmicos de las flores y de las hojas, así como del metanólico de las flores, debido a que estos presentaron buena actividad biológica es importante conocer los compuestos activos responsables. Aún cuando dichos extractos no se ajustan a los criterios farmacológico y etnobotánico, los resultados que se obtengan ampliarán el conocimiento fitoquímico y farmacológico de la especie.

Se pretende también comprobar la actividad farmacológica de cada uno de los compuestos aislados y calcular su DL₅₀.

11. Referencias

- Abourashed, E., Ngeh, J., Choinski, J., Khan, I. (1999). Two new flavones glycosides from *Paulliania pinnata*. *J. Nat. Prod.* 62, 1179-1181
- Adeyemi, O., Akindele, A. (2008). Antidiarrhoeal activity of the ethyl acetate extract of *Baphia nitida* (Papilionaceae). *J. of Ethnopharm.* 116, 407-412
- Agbor, G., Léopold, T., Jeanne, N. Y. (2004). The antidiarrhoeal activity of *Alchornea cordifolia* leaf extract. *Phytotherapy.* 18, 873-6.
- Andersen M., Markham, K. (2006). Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications. CRC Press, E.U.
- Baldi, F., Bianco M. A., Nardone, G., Pilotto, A., Zamparo, E. (2009), Enfermedades diarreicas agudas, *World J. Gastroenterol.* 15, 3341–48
- Behrman, R. E., Kliegman, R. M., Jenson, H. B. (2006). Capítulo Trastornos del sistema digestivo y electrolitos. Tratado de Pediatría, 17ª edición, Elsevier, España.
- Braca, A., Politi, M., Sanogo, R., Sanou, H., Morelli, I., Pizza, C., Tommasi, N. (2003). Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* leaves. *J. Agr. Food Chem.* 51, 6689-6695
- Bruce, A., David, W., Phillips, F. (1981). Flavonoids of *Erythroxylum rufum* and *Erythroxylum ulei*. *J. Nat. Prod.* 44, 676-679

CONABIO, Consejo Nacional para el uso y Conocimiento de la Biodiversidad (2011).

Consulta en línea disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/>

Curir, P., Dolci, M., Lanzotti, V., Taglialatela-Scafati, O. (2001). Kaempferide triglycoside: a posible factor of resistance of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) to *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry*. 56, 717-721

Dewick P. M., Medicinal Natural Products a Biosynthetic Aproach. (1998). John Wiley & Sons, E.U.

Emam, A., Elias, A., Moussa, M., Faure, R., Debrauwer, L., Balansard, G. (1997). Two flavonoide triglycosides from *Buddleja madagascariensis*. *Phytochemistry*. 48, 739-742

Flores, J., Armijo, J. A., Mediavilla, A. (2004). Capítulo Farmacología de la motilidad gastrointestinal, Farmacología humana, 4ª edición, Masson, España.

Gallardo-Ruiz, J. (2006). Medicina tradicional. México. Universidad Indígena Intercultural.

Harborne, J., Mabry, T. (1982). The flavonoids; advances in research. Champan and Hall LTD. Londres.

Imperato, F. (1998). Kaempferol 7-O-rhamnoside-4'-Oglucoside from *Pteridium aquilinum*. *Phytochemistry*. 47, 911-913

Katzung, Bertram G. (2004). *Basic and Clinical Pharmacology*, 9th ed. 213-222

- Koukoulitsa, C., Karioti, A., Bergonzi, C., Pescitelli, G., Di Bari, L., Skaltsa, H. (2006). Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. Ssp. *Hirtum* growing in Greece. *J. Agr. And Food Chem.* 54, 5388-5392
- Kuklinski C. (2000). Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona. Editorial Omega.
- Liyang, W., Liming, B., Takashi, N., Toshiaki, H., Xiaoyang, Y., Jun-ichi, S., Yuhua, B., Takao, K., Seiko, O., Katsutoshi, H., Akihiro, T., Takashi, T., Masayoshi, A. (2008). Bioactive Triterpene Saponins from the Roots of *Phytolacca Americana*. *J. Nat. Prod.* 71, 35-40
- Long-Ze, L., Harnly, M. (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *J. Agr. And Food Chem.* 55, 1084-1096
- Manguro, L., Lemmen, P. (2007). Phenolics of *Moringa olifera* leaves. *Nat. Prod. Res.* 21, 56-68
- Markham, K. (1982). Introduction to the flavonoid identification. Ed. Academic Press. Inglaterra.
- Martínez, M., (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Mata, R., Rivero, F. (2000). Curso teórico de farmacognosia. Facultad de química. UNAM.

- Mbagwu, H., Adeyemi, O. (2008). Anti-diarrhoeal activity of the aqueous extract of *Mezoneuron benthamianum* Baill (Caesalpiniaceae). *J. of Ethnopharm.* 116, 16-20.
- Merk, Manual de Información Médica. (2008). Capítulo Trastornos gastrointestinales, Merk Sharp & Dohme, España.
- Niranjan, P., Basudeb, A., Sukdeb B. (1997). 7,3'-dihydroxy-4'-methoxyflavone from seeds of *Acacia farnesiana*. *Phytochemistry.* 49, 1425-1426
- Nwafor, P., Bassey, A. (2007). Evaluation of anti-diarrhoeal and anti-ulcerogenic potential of ethanol extract of *Carpolobia lutea* leaves in rodents. *J. of Ethnopharm.* 111, 619-24.
- Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., Yoshikawa, M. (2000). Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.* 381, 67-74
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2010). Boletín informativo, tasas de mortalidad y causales; Estadísticas de enfermedades diarreicas.
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2011). Informe de estadísticas sanitarias mundiales y regionales; Estadísticas de medicina tradicional en México.
- Pandey M., Singh, A., Singh V., Singh, S., Pandey, V. (2008). A new chalcone glycoside from *Rhamnus nipalensis*. *Nat. Prod. Res.* 28, 1657-1659

- Pérez, S., Pérez, C., Zavala M. (2005). A study of the antidiarrheal properties of *Loeselia mexicana* on mice and rats. *Phytomedicine*. 12, 670-674.
- Proctor DD. (2007). Approach to the patient with gastrointestinal disease. In: *Cecil Medicine*. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders.
- Riverón-Corteguera, R.L., González-Fernández, N.A. (1996) Atención de la diarrea con sangre. *Rev Cubana Med Gen Integral*. 12, 50-8
- Rodés, J., Carné, X., Trilla, A. (2002). *Manual de terapéutica médica*. Elsevier, España.
- Rouf, R., Uddin, S., Shilpi, J., Alamgir, M. (2007). Assessment of antidiarrhoeal activity of the methanol extract of *Xylocarpus granatum* bark in mice model. *J. of Ethnopharm*. 109, 539-543.
- Rzedowski, J. y G. Rzedowski C. de, (2000). Phytolaccaceae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 91. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Sparg S. G., Light M. E., Van Staden J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J. of Ethnopharm*. 94, 219-243
- SSA, Secretaria de Salud (2010). Estadísticas de salud pública y estudios demográficos estatales. Informe de salud pública 2009-2010.

- Stahl, E. (1969). Thin layer chromatography, a laboratory handbook. Spring-Verlag, New York.
- Stout, G. H., Malofsky, B. M., Stout, V. F. (1964) Phytolaccagenin: a light atom X-ray structure proof using chemical information. *J. Am. Chem. Soc.* 86, 957-958
- Tangpu, V., Yadav, A., (2004). Antidiarrhoeal activity of *Rhus javanica* ripen fruit extract in albino mice. *Fitoterapia*. 75, 39-44
- Treyvaud, V., Maston, A., Dyatmiko, W., Hostettmann, K. (2000). Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. *Phytochemistry*. 55, 603-609
- Turnberg, L.A. (1986). Mechanisms of intestinal absorption and secretion of electrolytes and water. In: Development of Vaccines and Drugs against Diarrhoea. Holmgren, J; Lindberg, A, and Mölby, R (Eds.), Lund.
- Van Wyk B.E., Wink M. (2004). Medicinal plants of the world. Portland. Timber Press.
- Villaseñor, J.L., J.A. Meave, Ortiz E., Ibarra-Manríquez G., (2003). Biogeografía y conservación de los bosques tropicales húmedos de México. En: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía* (eds. J.J. Morrone y J. Llorente-Bousquets). *Las prensas de Ciencias*, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Villaseñor, R., Espinosa, G. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Wiermuth C.G. (Ed) (2001). The practice of medicinal chemistry. Londres. *Academic Press*.

Woo, W. S., Kang, S. S. (1975). The occurrence and chemistry of *Phytolacca* triterpenoids. *J. Pharm. Soc.* 19,189-208

Woo, W. S., Kang, S. S. (1978). ^{13}C NMR spectra pf phytolaccagenin and its glycosides. *Arch. Pharm. Res.*1, 21-25