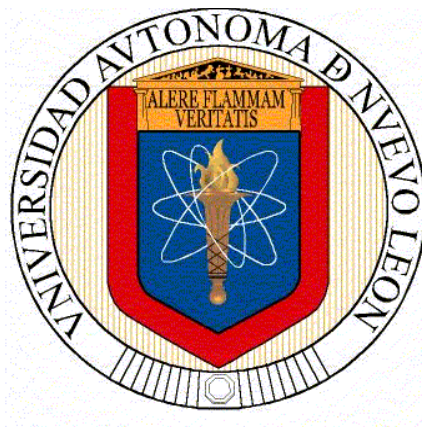


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMEBICIDA EN TROFOZOITOS DE *ENTAMOEB*
HISTOLYTICA (SCHAUDINN, 1903) DE 15 PLANTAS MEDICINALES USADAS EN
EL NORESTE DE MÉXICO**

Por

QBP ALDO FABIO BAZALDÚA RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES**

FEBRERO, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMEBICIDA EN TROFOZOITOS DE *ENTAMOEB*
HISTOLYTICA (SCHAUDINN, 1903) DE 15 PLANTAS MEDICINALES USADAS EN
EL NORESTE DE MÉXICO

Por

QBP ALDO FABIO BAZALDÚA RODRÍGUEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES

FEBRERO, 2015

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMEBICIDA EN TROFOZOITOS DE *ENTAMOEB*
HISTOLYTICA (SCHAUDINN, 1903) DE 15 PLANTAS MEDICINALES USADAS EN
EL NORESTE DE MÉXICO

Comité de Tesis

Dr. Ramiro Quintanilla Licea
Director interno de Tesis

Dr. Benito David Mata Cárdenas
Director externo de Tesis

Dra. María Julia Verde Star
Secretaria

Dr. Javier Vargas Villarreal
Vocal

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Vocal

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a las personas más importantes en mi vida, mi esposa, padres y hermanos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramiro Quintanilla Licea y el Dr. Benito David Mata Cárdenas por su apoyo y asesoría para la realización de la presente investigación.

A la Dra. María Julia Verde Star y a los Drs. Javier Vargas Villareal y Sergio Galindo Rodríguez, no solo por sus valiosas observaciones a ésta tesis sino además por sus enseñanzas para mi formación en el área de Química de Productos Naturales.

A la Dra. Noemí Waksman Minsky, Jefe del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Prof. Harmut Laatsch de la Universidad de Göttingen, Alemania, por la medición y suministro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.

A los compañeros del Laboratorio de Fitoquímica: Dr. Rolando Morado Castillo, QBP Isvar Kavim Ángeles Hernández y QBP Mario Ángel Samaniego Escamilla así como del Laboratorio de Biología Celular del CIBIN: MC Magda Elizabeth Hernández García y MC Jesús Norberto Garza por su valioso apoyo para la terminación de este trabajo de investigación

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo a los proyectos PAICYT CN-422-10 y CN-662-11 otorgados al Dr. Ramiro Quintanilla.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (CVU/Becario: 331996/229062) otorgada a un servidor para la realización de este doctorado.

TABLA DE CONTENIDO

| Sección | Página |
|------------------------------------------------------|--------|
| DEDICATORIA..... | I |
| GRADECIMIENTOS..... | II |
| LISTA DE TABLAS | III |
| LISTA DE FIGURAS | IX |
| NOMENCLATURA | XXI |
| RESUMEN | XXV |
| ABSTRACT | XXVI |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. HIPÓTESIS | 3 |
| 3. OBJETIVOS | 4 |
| 3.1 Objetivo general | 4 |
| 3.2 Objetivos particulares | 4 |
| 4. ANTECEDENTES | 6 |
| 4.1 Amibiasis | 6 |
| 4.2 <i>Entamoeba histolytica</i> | 7 |
| 4.3 Productos naturales con actividad amebicida..... | 9 |
| 4.4 Plantas seleccionadas para este estudio..... | 13 |
| 4.4.1 <i>Artemisia mexicana</i> (Estafiate) | 13 |
| 4.4.2 <i>Capsicum annuum</i> (Chile) | 14 |

| | |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 4.4.3 <i>Castela texana</i> (Chaparro amargoso) | 15 |
| 4.4.4 <i>Cecropia obtusifolia</i> (Guarumbo) | 16 |
| 4.4.5 <i>Cyclolepis genistoides</i> (Palo azul) | 17 |
| 4.4.6 <i>Eryngium heterophyllum</i> (Hierba del sapo) | 17 |
| 4.4.7 <i>Gnaphalium oxyphyllum</i> (Gordolobo) | 18 |
| 4.4.8 <i>Gymnosperma glutinosum</i> (Tata Leoncho) | 19 |
| 4.4.9 <i>Haematoxylon brasiletto</i> (Palo de Brasil) | 19 |
| 4.4.10 <i>Heterotheca inuloides</i> (Árnica) | 20 |
| 4.4.11 <i>Marrubium vulgare</i> (Marrubio) | 20 |
| 4.4.12 <i>Melissa officinalis</i> (Toronjil) | 21 |
| 4.4.13 <i>Persea americana</i> (Aguacate) | 22 |
| 4.4.14 <i>Ruta chalepensis</i> (Ruda) | 23 |
| 4.4.15 <i>Schinus molle</i> (Pirúl) | 23 |

5. MATERIAL Y MÉTODOS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.1 Extracción y aislamiento de compuestos con actividad amebicida de la planta con mayor actividad antiparasitaria..... | 25 |
| 5.1.1 Colecta de material vegetal | 25 |
| 5.1.2 Preparación del material vegetal..... | 28 |
| 5.1.3 Extracción Soxhlet | 29 |
| 5.2. Aislamiento de compuesto con actividad amebicida de la planta con mayor actividad antiparasitaria..... | 30 |
| 5.2.1 Cromatografía en columna con silica gel | 30 |
| 5.2.2 Cromatografía en columna con silica gel fase reversa..... | 32 |
| 5.2.3 Cromatografía por exclusión molecular con Sephadex LH-20 | 33 |
| 5.2.4 Cromatografía en capa fina | 34 |
| 5.2.5 Cristalización | 36 |
| 5.3 Evaluación de la actividad amebicida | 36 |
| 5.3.1 Medio PEHPS | 36 |
| 5.3.2 Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> | 37 |
| 5.3.3 Preparación de los tratamientos | 38 |
| 5.3.4 Tamizaje biológico de plantas con potencial actividad amebicida | 38 |
| 5.3.5 Determinación de la concentración inhibitoria media 50 % (IC ₅₀) | 39 |
| 5.4 Análisis espectroscópico | 40 |
| 5.4.1 Resonancia Magnética Nuclear | 40 |
| 5.4.2 Espectrometría de masas..... | 41 |
| 5.5 Determinación de punto de fusión..... | 42 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6. RESULTADOS | 43 |
| 6.1 Colecta e identificación de las plantas bajo estudio | 43 |
| 6.2 Parámetros de crecimiento de <i>E. histolytica</i> | 44 |
| 6.3 Obtención de los extractos metanolicos y evaluación de actividad amebicida de los extractos crudos..... | 45 |
| 6.4 Extracción I de 60 g de <i>R. chalepensis</i> y evaluación de la actividad amebicida..... | 48 |
| 6.4.1 Partición del extracto metanólico I de <i>R. chalepensis</i> | 48 |
| 6.4.2 Evaluación de la actividad amebicida del extracto metanólico I de <i>R. chalepensis</i> y sus particiones | 50 |
| 6.5 Fraccionamiento cromatográfico biodirigido de la extracción I | 51 |
| 6.5.1 Fraccionamiento cromatográfico de la partición hexánica | 51 |
| 6.5.1.1 Columna 1..... | 51 |
| 6.5.1.2 Columna 2. Fraccionamiento cromatoráfico de FC2 de la columna 1 y aislamiento de C1 | 53 |
| 6.5.1.3 Columna 3. Fraccionamiento cromatográfico de la FC4 de la columna 1 y aislamiento de C2 | 54 |
| 6.5.1.4 Columna 4. Fraccionamiento cromatográfico de la FC5 de la columna 1..... | 55 |
| 6.5.1.5 Columna 5. Fraccionamiento cromatográfico de la FC2 de la columna 4 y aislamiento de C3 ... | 57 |
| 6.5.2 Fraccionamiento cromatográfico de la partición de acetato de etilo I..... | 58 |
| 6.5.2.1 Columna 6 y 7..... | 58 |
| 6.5.2.2 Columna 8. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de las columnas 6 y 7. Obtención de C4 | 60 |
| 6.5.2.3 Columna 9. Fraccionamiento cromatográfico de las fracciones 7 y 8 de las columnas 6 y 7. Obtención de C5 | 62 |
| 6.6 Extacción II de 600 g de <i>R. chalepensis</i> y evaluación de la actividad amebicida..... | 63 |
| 6.6.1 Partición del extracto metanólico II de <i>R. chalepensis</i> | 64 |
| 6.7 Fraccionamiento cromatográfico biodirigido del extracto II | 66 |
| 6.7.1 Fraccionamiento cromatográfico y evaluación de la actividad amebicida de la partición hexánica del extracto II | 66 |

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.7.1.1 | C17, Columnas 10 a 16..... | 66 |
| 6.7.1.2 | Columna 17. Fraccionamiento cromatográfico FC2 de la partición hexánica II..... | 68 |
| 6.7.1.3 | Columna 18. Fraccionamiento cromatográfico de FC2 de la columna 17 y aislamiento de C6 | 70 |
| 6.7.1.4 | Columna 19. Fraccionamiento cromatográfico de FC3 de la columna..... | 72 |
| 6.7.1.5 | Columna 20. Fraccionamiento cromatográfico de la FC4 de la partición hexánica II..... | 73 |
| 6.7.1.6 | Columna 21. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC1 de la columna 20 y aislamiento de C7 | 75 |
| 6.7.1.7 | Columna 22. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna..... | 77 |
| 6.7.1.8 | Columna 23. Fraccionamiento cromatográfico de la FC2 de la columna 22..... | 78 |
| 6.7.1.9 | Columna 24. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC6 de la partición hexánica I y de las fracciones FC6 y FC7 de la partición hexánica-II..... | 80 |
| 6.7.1.10 | Columna 25. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 24..... | 81 |
| 6.7.2 | Fraccionamiento cromatográfico de la partición de acetato de etilo del extracto II y evaluación de la actividad amebicida..... | 83 |
| 6.7.2.1 | Columnas 26-35..... | 83 |
| 6.7.2.2 | Columna 36. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la partición de acetato de etilo de la extracción II..... | 86 |
| 6.7.2.3 | Columna 37. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC1 de la columna 36 y aislamiento de C8 | 88 |
| 6.7.2.4 | Columna 38. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la partición de acetato de etilo II..... | 90 |
| 6.7.2.5 | Columna 39. Fraccionamiento cromatográfico de la FC1 de la columna 38 y aislamiento de C9 .. | 92 |
| 6.7.2.6 | Columna 40. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 38 y aislamiento de C9 y C10 | 93 |
| 6.7.2.7 | Columna 41. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 40..... | 95 |
| 6.7.2.7.1 | Columna 42. Fraccionamiento cromatográfico del sobrenadante y aislamiento de C10 y C11 | 99 |
| 6.7.2.7.2 | Fraccionamiento cromatográfico del sólido blanco..... | 100 |

| | | |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.7.2.8 | Columna 44. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna 38..... | 101 |
| 6.7.2.9 | Columna 45. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción compuesta por las fracciones FC4 de la partición de acetato de etilo I y /FC4 de la partición de acetato de etilo II. Estas fracciones provienen de las columnas 6 y 7 así como de las columnas 26 a 35, respectivamente..... | 103 |
| 6.7.2.10 | Columna 46. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 45 y aislamiento de C12 | 104 |
| 6.7.2.11 | Columna 47. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna 45 y aislamiento del compuesto C13 | 106 |
| 6.7.2.12 | Columna 48. Fraccionamiento cromatográfico de FC4 de la columna 45..... | 107 |
| 6.7.2.13 | Columna 49. Fraccionamiento cromatográfico de FC2 de la columna 48 y aislamiento de C14 | 109 |
| 6.7.2.14 | Columna 50. Fraccionamiento cromatográfico de FC5 de la columna 45..... | 110 |
| 6.7.2.15 | Columna 51. Fraccionamiento cromatográfico de la mezcla conformada por las fracciones FC6, FC7 y FC8 de la partición de acetato de etilo II, provenientes de las columnas 26 a 35..... | 111 |
| 6.7.2.16 | Columna 52. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC5 de la columna 51..... | 113 |
| 6.7.2.17 | Columna 53. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 52..... | 114 |
| 6.7.2.18 | Columna 54. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna 53 y aislamiento de C15 | 116 |
| 6.8 | Resultados espectroscópicos | 118 |
| 6.8.1 | Análisis espectrométrico y espectroscópico del Compuesto C1 | 118 |
| 6.8.1.1 | Análisis de espectrometría de masas | 118 |
| 6.8.1.2 | Análisis de Resonancia Magnética Nuclear | 119 |
| 6.8.2 | Análisis espectrométrico y espectroscópico del compuesto C2 | 129 |
| 6.8.2.1 | Análisis de espectrometría de masas | 129 |
| 6.8.2.2 | Análisis de Resonancia Magnética Nuclear | 131 |
| 6.8.3 | Análisis espectroscópico del compuesto C3 | 140 |
| 6.8.3.1 | Análisis de Resonancia Magnética Nuclear | 140 |
| 6.8.4 | Análisis espectroscópico del compuesto C4 | 148 |
| 6.8.4.1 | Análisis de Resonancia Magnética Nuclear..... | 148 |
| 6.8.5 | Análisis espectroscópico del compuesto C5 | 149 |
| 6.8.5.1 | Espectrometría de masa..... | 149 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.8.5.2. Resonancia Magnética Nuclear..... | 151 |
| 6.8.6 Análisis espectroscópico del compuesto C6 | 159 |
| 6.8.6.1 Análisis de Resonancia Magnética | 159 |
| 6.8.7 Análisis espectroscópico del compuesto C7 | 160 |
| 6.8.7.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear | 160 |
| 6.8.8 Análisis espectroscópico del compuesto C8 | 161 |
| 6.8.8.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear..... | 161 |
| 6.8.9 Análisis espectroscópico del compuesto C9 | 162 |
| 6.8.9.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear | 162 |
| 6.8.10 Análisis espectrométrico y espectroscópico del compuesto C10 | 163 |
| 6.8.10.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear..... | 163 |
| 6.8.11 Análisis espectroscópico del compuesto C11 | 164 |
| 6.8.11.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear..... | 164 |
| 6.8.12 Análisis espectroscópico del compuesto C12 | 165 |
| 6.8.12.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear..... | 165 |
| 6.8.13 Análisis espectroscópico del compuesto C13 | 166 |
| 6.8.13.1 Resonancia Magnética Nuclear..... | 166 |
| 6.8.14 Análisis espectroscópico de C14 | 175 |
| 6.8.14.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear..... | 175 |
| 6.8.15 Análisis espectrométrico y espectroscópico de C15 | 183 |
| 6.8.15.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear..... | 183 |
| 7. DISCUSIÓN | 185 |
| 8. CONCLUSIONES | 195 |
| 9 APÉNDICE | 198 |
| 10. LITERATURA CITADA | 293 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Clasificación taxonómica de <i>Artemisia mexicana</i> | 26 |
| 2. Clasificación taxonómica de <i>Capsicum annuum</i> | 26 |
| 3. Clasificación taxonómica de <i>Casatela texana</i> | 26 |
| 4. Clasificación taxonómica de <i>Cecropia obtusifolia</i> | 26 |
| 5. Clasificación taxonómica de <i>Cyclolepis genistoides</i> | 26 |
| 6. Clasificación taxonómica de <i>Eryngium heterophyllum</i> | 26 |
| 7. Clasificación taxonómica de <i>Gnaphalium oxyphyllum</i> | 27 |
| 8. Clasificación taxonómica de <i>Gymnosperma glutinosum</i> | 27 |
| 9. Clasificación taxonómica de <i>Haematoxylon brasiletto</i> | 27 |
| 10. Clasificación taxonómica de <i>Heterotheca inuloides</i> | 27 |
| 11. Clasificación taxonómica de <i>Marrubium vulgare</i> | 27 |
| 12. Clasificación taxonómica de <i>Melissa officinalis</i> | 27 |
| 13. Clasificación taxonómica de <i>Persea americana</i> | 28 |
| 14. Clasificación taxonómica de <i>Ruta chalepensis</i> | 28 |
| 15. Clasificación taxonómica de <i>Schinus molle</i> | 28 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 16. Componentes del medio PEHPS..... | 37 |
| 17. Características del material vegetal..... | 44 |
| 18. Peso seco y porcentaje de rendimiento del material vegetal..... | 46 |
| 19. Porcentaje de actividad amebicida de extractos crudos ante <i>E. histolytica</i> e IC ₅₀ de los extractos crudos | 47 |
| 20. Rendimientos de la partición con hexano y acetato de etilo del extracto metanólico I de <i>R. chalepensis</i> | 49 |
| 21. Porcentaje de inhibición a 150 g/ml del extracto metanólico y de las particiones hexánica y de acetato de etilo de extracción I de <i>R. chalepensis</i> | 50 |
| 22. Rendimiento de FC de la columna 1..... | 52 |
| 23. Rendimientos de FC de la columna 2..... | 53 |
| 24. Rendimientos de FC de la columna 3..... | 55 |
| 25. Rendimientos de FC de la columna 4..... | 56 |
| 26. Rendimientos de FC de la columna 5..... | 57 |
| 27. Rendimientos de FC de la columna 6 | 59 |
| 28. Rendimientos de FC de la columna 7..... | 59 |
| 29. Rendimiento de FC de la columna 8..... | 61 |
| 30. Rendimientos de FC de la columna 9..... | 62 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 30. Rendimiento del extracto metanólico y las particiones hexánica y de acetato de etilo de la extracción II de <i>R. chalepensis</i> | 66 |
| 31. Rendimiento del extracto metanólico y las particiones hexánica y de acetato de etilo de la extracción II de <i>R. chalepensis</i> | 65 |
| 32. Porcentaje de inhibición a 150 µg/ml del extracto metanólico y de las particiones hexánica y de acetato de etilo de la extracción II de <i>R. chalepensis</i> | 65 |
| 33. Rendimientos de FC de las columnas 10-16 y de la partición hexánica de la extracción II..... | 67 |
| 34. Porcentaje de inhibición de FC de partición hexánica II en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> a 150 µg/ml..... | 68 |
| 35. Rendimientos de FC de la columna 17..... | 69 |
| 36. Rendimientos de FC de la columna 18..... | 71 |
| 37. Rendimiento de FC de la columna 19..... | 73 |
| 38. Rendimientos de FC de la columna 20..... | 74 |
| 39. Rendimientos de FC de la columna 21..... | 76 |
| 40. Rendimientos de FC de la columna 22..... | 78 |
| 41. Rendimientos de FC de la columna 23..... | 79 |
| 42. Rendimientos de FC de la columna 24..... | 81 |
| 43. Rendimientos de FC de la columna 25..... | 82 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 44. Rendimientos de FC de la partición de acetato de etilo de la extracción II..... | 85 |
| 45. Porcentaje de inhibición de FC de la partición de acetato de etilo de la extracción II en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> | 86 |
| 46. Rendimientos de FC de la columna 36..... | 87 |
| 47. Porcentaje de inhibición de FC de la columna 36 tracción II en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> | 88 |
| 48. Rendimientos de FC de la columna 37..... | 89 |
| 49. Rendimientos de FC de la columna 38..... | 91 |
| 50. Porcentaje de inhibición de FC de la columna 38 fracción II en trofozoítos de <i>E. histolytica</i> | 91 |
| 51. Rendimientos de FC de la columna 39..... | 93 |
| 52. Rendimientos de FC de la columna 40..... | 94 |
| 53. Rendimientos de FC de la columna 41..... | 96 |
| 54. Rendimiento de los sólidos recuperados de la cristalización de la fracción FC2 de la columna 41..... | 98 |
| 55. Rendimientos de FC de la columna 42..... | 99 |
| 56. Rendimientos de FC de la columna 43..... | 101 |
| 57. Rendimientos de FC de la columna 44..... | 102 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 58. Rendimientos de FC de la columna 45..... | 104 |
| 59. Rendimientos de FC de la columna 46..... | 105 |
| 60. Rendimientos de FC de la columna 47..... | 107 |
| 61. Rendimiento de FC de la columna 48..... | 108 |
| 62. Rendimientos de FC de la columna 49..... | 109 |
| 63. Rendimientos de FC de la columna 50..... | 111 |
| 64. Rendimientos de FC de la columna 51..... | 112 |
| 65. Rendimientos de FC de la columna 52..... | 114 |
| 66. Rendimientos de FC de la columna 53..... | 115 |
| 67. Rendimientos de FC de la columna 54..... | 116 |
| 68. Resumen de señales del espectro de ^1H -RMN de C1 | 121 |
| 69. Resumen de correlaciones de señales del espectro de COSY del compuesto C1 | 123 |
| 70. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN del compuesto C1 | 125 |
| 71. Resumen de señales del espectro de HSQC y HMBC del compuesto C1 | 128 |
| 72. Resumen de señales de ^1H -RMN de C2 | 133 |
| 73. Resumen de señales de COSY de C2 | 134 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 74. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC de C2 en CHCl_3 | 139 |
| 75. Resumen de señales del espectro de ^1H -RMN de C3 | 142 |
| 76. Resumen de señales del espectro COSY de C3 | 143 |
| 77. Resumen de señales de los espectro ^{13}C -RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC de C3 | 147 |
| 78. Resumen de señales del espectro de ^1H -RMN de C5 | 153 |
| 79. Resumen de señales de COSY de C5 | 154 |
| 80. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN, APT, HSQC y HMBC de C5 . | 158 |
| 81. Resumen de señales de ^1H -RMN de C13 | 167 |
| 82. Resumen de señales de COSY de C13 | 169 |
| 83. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC de C13 | 174 |
| 84. Resumen de señales de ^1H -RMN de C14 | 176 |
| 85. Resumen de señales de COSY de C14 | 178 |
| 86. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC de C14 | 183 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. <i>E. histolytica</i> en medio PEHPS. Vista en un umiento de “40 X”... | 9 |
| 2. Compuestos con actividad aislados de plantas con actividad amebicida..... | 12 |
| 3. Extractor Soxhlet | 30 |
| 4. Componentes de columna cromatográfica de 160 cm de longitud (Silica fase normal..... | 31 |
| 5. Componentes de la cromatografía en columna en fase reversa C ₁₈ ... | 32 |
| 6. Cromatografía en columna de exclusión molecular Sephadex LH-20..... | 34 |
| 7. Desarrollo de una CCF dentro de una cámara cromatográfica..... | 35 |
| 8. Cromatografía en capa fina bajo luz UV (254 nm)..... | 35 |
| 9. Espectro de ¹ H-RMN. | 40 |
| 10. Espectro de (+)-ESI-MS..... | 41 |
| 11. Gráfica de cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> con 120 horas de duración..... | 45 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 12. CCF de fracciones de Columna 1. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc 9.5:0.5 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm | 52 |
| 13. CCF de FC de Columna 2. Eluente empleado: CHCl ₃ (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm | 53 |
| 14. CCF de fracciones de Columna 3. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm | 55 |
| 15. CCF de FC de Columna 4. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm | 56 |
| 16. CCF de FC de C5. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm | 57 |
| 17. CCF de FC de la columna 6. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 8:2 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm | 59 |
| 18. CCF de FC de la columna 7. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en Relación 8:2 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 59 |
| 19. CCF donde se muestra las regiones que comprenden cada una de las FC de la columna 8. Eluente empleado: CHCl ₃ (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 61 |
| 20. CCF de FC de la columna 9. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc 1:1 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 62 |
| 21. CCF de FC de partición hexánica II. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm. | 67 |
| 22. CCF de FC de la columna 17. Eluente empleado: hexano:cloroformo en relación 3:7 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 69 |
| 23. CCF de FC de la columna 18. Eluente empleado: hexano:cloroformo en relación 3:7 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 71 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 24. CCF de FC de la columna 19. Eluente empleado:hexano:cloroformo en relación 3:7 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 73 |
| 25. CCF de FC de la columna 20. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1 (8 ml). Revelado: luz UV a 254 nm | 74 |
| 26. CCF de FC de la columna 21. Eluente empleado:CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5. Revelador: luz UV a 254 nm..... | 76 |
| 27. CCF de FC de la columna 22. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 78 |
| 28. CCF de FC de la columna 23. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 79 |
| 29. CCF de FC de la columna 24. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 81 |
| 30. CCF de FC de la columna 25. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (8 ml). Revelador: luz UV a 254..... | 82 |
| 31. CCF de FC de la partición de acetato de etilo II. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 85 |
| 32. CCF de FC de C36. Eluente empleado: hexano:CHCl ₃ en relación de 3:7 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 87 |
| 33. CCF de FC de columna 37. Eluente empleado: hexano:CHCl ₃ en relación 3:7 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 89 |
| 34. CCF de FC de la columna 38. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (10 ml). Revelador: luz UV 254 nm..... | 91 |
| 35. CCF de FC de la columna 39. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 93 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 36. CCF de FC de la columna 40. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 94 |
| 37. CCF de FC de la columna 41. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (8 ml). Revelador: luz UV a 240 nm..... | 96 |
| 38. Sólidos obtenidos por la técnica de cristalización de la fracción FC2 de la columna 41..... | 97 |
| 39. CCF de sólidos obtenidos por la técnica de cristalización de la fracción FC2 de la columna 41. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 98 |
| 40. CCF de FC de la columna 42. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5. Revelador: luz UV a 240 nm..... | 99 |
| 41. CCF de FC de C43. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 101 |
| 42. CCF de FC de la columna 44. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9.5:0.5 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 102 |
| 43. CCF de FC de la columna 45. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 104 |
| 44. CCF de FC de la columna 46. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 104 |
| 45. CCF de FC de la columna 47. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1. Revelador: luz UV a 254 nm..... | 107 |
| 46. CCF de FC de la columna 48. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación de 9:1. Revelador: luz UV a 254 nm..... | 108 |
| 47. CCF de FC de la columna 49. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm. | 109 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 48. CCF de FC de la columna 50. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 111 |
| 49. CCF de FC de la columna 51. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 9:1. Revelador: luz UV a 254 nm..... | 112 |
| 50. CCF de FC de la columna 52. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 1:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm | 114 |
| 51. CCF de FC de la columna 53. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 1:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 115 |
| 52. CCF de FC de la columna 54. Eluente empleado: CHCl ₃ :EtOAc en relación 1:1 (8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm..... | 116 |
| 53. Espectro de masas (+)-ESI-MS del compuesto C1 | 119 |
| 54. Espectro de masas de alta resolución (+)-HRESI-MS del compuesto C1 . | 119 |
| 55. Espectro general de ¹ H-RMN del compuesto C1 en CDCl ₃ | 120 |
| 56. Espectro general de COSY del compuesto C1 en CDCl ₃ | 122 |
| 57. Ampliación del espectro COSY del compuesto C1 en CDCl ₃ | 123 |
| 58. Espectro de ¹³ C-RMN del compuesto C1 en CDCl ₃ | 124 |
| 59. Espectro de HSQC del compuesto C1 | 126 |
| 60. Estructura del compuesto C1 , chalepentina..... | 128 |
| 61. Espectro de masas ((+)-ESI-MS) de C2 | 130 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 62. Espectro de masas ((+)-HRESI-MS) de C2 | 130 |
| 63. Espectro de ¹ H-RMN de C2 en CDCl ₃ | 132 |
| 64. Espectro general de COSY de C2 en CDCl ₃ | 134 |
| 65. Espectro de ¹³ C-RMN de C2 en CHCl ₃ | 135 |
| 66. Espectro de DEPT-135 de C2 en CDCl ₃ | 136 |
| 67. Espectro de HSQC de C2 en CDCl ₃ | 137 |
| 68. Espectro de HMBC de C2 en CDCl ₃ | 138 |
| 69. Estructura de los compuestos mayoritarios de C2 | 139 |
| 70. Espectro de ¹ H-RMN del compuesto C3 en CDCl ₃ | 140 |
| 71. Espectro de COSY de C3 en CDCl ₃ | 142 |
| 72. Espectro de ¹³ C-RMN de C3 en CDCl ₃ | 143 |
| 73. Espectro de DEPT-135 de C3 en CDCl ₃ | 144 |
| 74. Espectro de HSQC de C3 en CDCl ₃ | 145 |
| 75. Espectro de HMBC de C3 en CDCl ₃ | 147 |
| 76. Rutamarina | 148 |
| 77. Espectro de ¹ H-RMN de C4 en CDCl ₃ | 149 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 78. Espectro de masas (+)-ESI-MS de C5 | 150 |
| 79. Espectro de masas (+)-HRESI-MS de C5 | 151 |
| 80. Espectro de ¹ H-RMN de C5 en CDCl ₃ | 152 |
| 81. Espectro de COSY de C5 en CDCl ₃ | 153 |
| 82. Espectro de ¹³ C-RMN de C5 en CDCl ₃ | 154 |
| 83. Espectro de APT de C5 en CDCl ₃ | 155 |
| 84. Espectro de HSQC de C5 en CDCl ₃ | 156 |
| 85. Espectro de HMBC de C5 en CDCl ₃ | 157 |
| 86. Graveolina..... | 158 |
| 87. Espectro general de ¹ H-RMN del compuesto C6 en CDCl ₃ | 159 |
| 88. Espectro general de ¹ H-RMN del compuesto C7 en CDCl ₃ | 160 |
| 89. Espectro general de ¹ H-RMN del compuesto C8 en CDCl ₃ | 161 |
| 90. Espectro general de ¹ H-RMN del compuesto C9 en CDCl ₃ | 162 |
| 91. Espectro general de ¹ H-RMN del compuesto C10 en CDCl ₃ | 163 |
| 92. Espectro general de ¹ H-RMN del compuesto C11 en CDCl ₃ | 164 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 93. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto C12 en CDCl_3 | 165 |
| 94. Espectro de ^1H -RMN de C13 en CDCl_3 | 166 |
| 95. Espectro de COSY de C13 en CDCl_3 | 168 |
| 96. Espectro de ^{13}C -RMN de C13 en CDCl_3 | 170 |
| 97. Espectro de DEPT-135 de C13 en CDCl_3 | 171 |
| 98. Espectro de HSQC de C13 en CDCl_3 | 171 |
| 99. Espectro de HMBC de C13 en CDCl_3 | 172 |
| 100. Compuestos mayoritarios de la mezcla C13 | 174 |
| 101. Espectro de ^1H -RMN de C14 en CDCl_3 | 176 |
| 102. Espectro de COSY de C14 en CDCl_3 | 177 |
| 103. Espectro de ^{13}C -RMN de C14 en CHCl_3 | 179 |
| 104. Espectro de DEPT-135 de C14 en CDCl_3 | 179 |
| 105. Espectro de HSQC de C14 en CDCl_3 | 181 |
| 106. Espectro de HMBC de C14 en CDCl_3 | 182 |
| 107. Chalepina..... | 183 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 108. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto C15 en CDCl_3 | 184 |
| 109. Compuestos aislado de <i>R. chalepensis</i> | 194 |

NOMENCLATURA

| | |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| °C | Grados Celsius |
| ¹ H-RMN | Resonancia Magnética Nuclear de Protones |
| ¹³ C-RMN | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13 |
| Ac | Adquirido comercialmente |
| APT | Attached Proton Test (técnica 2D de RMN) |
| B | Número de organismos al comienzo del intervalo de tiempo |
| b | Número de organismos al final del intervalo de tiempo |
| CC | Cromatografía en columna |
| CCF | Cromatografía en Capa Fina |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado |
| CHCl ₃ | Cloroformo |
| COSY | Correlation Spectroscopy (técnica 2D de RMN) |
| d (mult.) | Doblete |
| dd (mult.) | Doble doblete |
| dm | Decímetro |
| DEPT | Distortionless Enhancement Polarization Transfer (técnica 2D de RMN) |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| δ | Desplazamiento Químico |

| | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|
| EI | Electron Impact Ionization |
| ESI-HR | Ionización por Electrospray de Alta Resolución |
| EtOAc | Acetato de etilo |
| FC | Fracción Colectiva |
| G | Tiempo de generación |
| g | Gramos |
| h | Horas |
| H | Hidrógeno |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation (técnica 2D de RMN) |
| HMQC | Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (técnica 2D de RMN) |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Coherence (técnica 2D de RMN) |
| Hz | Herz |
| IC ₅₀ | Concentración media inhibitoria |
| IR | Infrarrojo |
| <i>J</i> | Constante de Acoplamiento |
| L | Litros |
| lb | libra |
| m | metro |
| m (mult.) | Multiplete |
| m/z | Relación Masa-Carga |
| MHz | Megahertz |
| ml | Mililitros |

| | |
|----------------|---------------------------------------------|
| mm | Milímetros |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| µg/ml | Microgramos por mililitro |
| µl | Microlitros |
| µm | Micrómetros |
| N | Normal (concentración) |
| NA | Sin actividad amebicida |
| ND | No determinada |
| No. | Número |
| nm | Nanómetro |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| ppm | Partes por millón |
| R_f | Factor de retención |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| S1 | Sólido 1 |
| S2 | Sólido 2 |
| s (mult.) | Singulete |
| SB | Sólido amorfo color blanco |
| SV | Sólido amorfo color verde |
| T | Intervalo de tiempo de la fase experimental |
| t (mult.) | Triplete |
| trofozoitos/ml | Trofozoitos por mililitro |
| UV | Ultravioleta |

RESUMEN

La amibiasis es una de las enfermedades parasitarias de mayor importancia en países subdesarrollados con climas tropicales y subtropicales, siendo México un país en el cual los datos epidemiológicos demuestran que el 20 % de la población se encuentra infectada por el protozooario *Entamoeba histolytica*. La principal quimioterapia para esta enfermedad se basa en el uso de imidazoles principalmente del Metronidazol el cual es la causa de numerosos efectos secundarios producidos tras su administración, por lo que es necesario obtener nuevos compuestos antiprotozoarios que ayuden a lograr mejores tratamientos. La medicina tradicional usada en el noreste de México menciona el empleo de numerosas plantas las cuales pueden ser empleadas para el tratamientos de desordenes intestinales provocados por parásitos tanto protozoarios como helmintos. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad amebicida de 15 plantas medicinales empleadas en la medicina tradicional mexicana y aislar e identificar los compuestos con la principal actividad amebicida del extracto de la planta que presente el mayor porcentaje de inhibición sobre el crecimiento del parásito. *Ruta chalepensis* fue la planta con el mayor porcentaje de inhibición, se utilizaron 660 g de hojas de *R. chalepensis* los cuales fueron sometidos a extracción Soxhlet empleando metanol como solvente de extracción; después de eliminar el solvente, se evaluó la actividad amebicida del extracto metanólico y de sus particiones hexánica y de acetato de etilo. El extracto metanólico mostró una actividad amebicida de 90.50 % a 150 µg/ml, en tanto la partición hexánica fue de 93.47 % y la partición de acetato de etilo de 84.82 % las cuales fueron evaluadas a la misma concentración de 150 µg/ml, debido a que se obtuvieron porcentajes de inhibición sobresaliente en las dos particiones se realizó la separación cromatográfica de los componentes de ambas particiones. Del fraccionamiento cromatográfico se identificaron mediante diversas técnicas de RMN y espectrometría de masas los siguientes compuestos, una mezcla de psoraleno y bergapteno (IC₅₀ de 57.09 µg/ml), una mezcla de xantotoxina-isopimpinellina (IC₅₀ de 26.22 µg/ml), chalepensina (IC₅₀ de 38.71 µg/ml), graveolina, rutamarina (IC₅₀ de 6.54 µg/ml) y chalepina (IC₅₀ de 28.67 µg/ml). Como es posible observar el efecto amebicida de *R. chalepensis* está respaldado por la presencia de furanocumarinas.

ABSTRACT

Amoebiasis disease is one of the most important parasitic diseases in third-world countries with tropical and subtropical weather. Mexico has a prevalence percentage of 20 % of population infected by *Entamoeba histolytica*. The treatment is based on use of imidazole substances, mainly metronidazole, a compound with a lot documented adverse reactions. Therefore new compounds with antiprotozoal activity are needed. The mexican traditional medicine recognizes several that are widely used for intestinal disorders caused by protozoan and helminth. The objective of this research was to evaluate the amebicide activity of 15 medicinal plants used in Mexican traditional medicine, isolate compounds from the most active extract and evaluate individually their amebicide activity. *Ruta chalepensis* was the most active plant against *E. histolytica*, 660 g of leaves were subjected to Soxhlet extraction with methanol, after removing the solvent, the amebicide activity of crude extract and their hexane and ethyl acetate partitions were tested. The methanolic extract showed a growth inhibition of 90.50 % at 150 µg/ml, hexane partition showed 93.0 % and ethyl acetate partition showed 84.82 % at 150 µg/ml both, thus both partitions were subjected to chromatographic techniques to isolate compounds with amebicide activity. From chromatographic partition and by diverse RMN techniques and mass spectrometry were identified the next compounds: a mix of psoralen-bergapten (IC₅₀ of 57.09 µg/ml), a mix of xanthotoxin-isopimpinelline (IC₅₀ of 26.22 µg/ml), chalepensisin (IC₅₀ de 38.71 µg/ml), graveoline, rutamarin (IC₅₀ de 6.54 µg/ml), chalepin (IC₅₀ de 28.67 µg/ml). These compounds could be responsables for the amebicide activity shown by *R. chalepensis* extracts.

1. INTRODUCCIÓN

La utilización de la llamada medicina tradicional en países de América Latina y el Caribe ha entrado en una nueva etapa debido a que representa una opción importante ante las necesidades urgentes de atención a la salud y los altos costos de los medicamentos suministrados por la industria farmacéutica (Nigenda *et al.*, 2001). El conocimiento para emplear las plantas como herramienta medicinal se remonta a miles de años atrás y ha llevado a diferentes civilizaciones a profundizar en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales (Bandaranayake, 2006).

Las infecciones parasitarias constituyen uno de los problemas de salud más ampliamente distribuidos alrededor del mundo. La diseminación de estas enfermedades depende tanto del mal manejo de agua como de alimentos. El intestino humano es por lo tanto el principal objetivo de numerosos agentes patógenos que al ser ingeridos producen grandes infecciones de las cuales la amibiasis es una de las más importantes.

La amibiasis es una enfermedad causada por *Entamoeba histolytica* y es la tercer causa de muerte por enfermedades producidas por protozoarios a nivel mundial. Este protozoario se encuentra presente en regiones tanto de climas tropicales como subtropicales.

Datos epidemiológicos indican que cerca de 500 millones de personas alrededor del mundo están infectadas por *E. histolytica*, de las cuales el 90 % se encuentran en un estado asintomático y el otro 10 % expresan serios problemas intestinales tales como colitis, disentería y posteriormente abscesos hepáticos (Manna *et al.*, 2010).

México es considerado una zona endémica para la amibiasis intestinal, demostrando una seroprevalencia de hasta un 8.4% (Caballero-Salcedo *et al.*, 1994), donde el 20 % de la población son portadores asintomáticos, 2 % de enfermos y entre 0.1 y 0.2 % de muertes, lo que hace que la amibiasis se encuentre entre las primeras causas de morbimortalidad en el país (Conde-Bonfil y Mora-Zerpa *et al.*, 1992). La incidencia de amibiasis para la semana número 49 del año 2013 fue de 318439 casos en todo el país (CENAVECE).

El metronidazol es el tratamiento común para esta etiología, sin embargo recientemente se ha reportado el desarrollo de mecanismos de resistencia en *E. histolytica* al uso de este fármaco. La resistencia en *E. histolytica* al tratamiento regular dificulta el control de la enfermedad trayendo consigo un aumento en la dosis empleada y en el tiempo de tratamiento lo que origina un acentuamiento en los efectos secundarios que el metronidazol produce en el organismo como son cefaleas, náuseas, sequedad en la boca, sabor metálico, vómito, diarrea, mareo, vértigo, encefalopatía, convulsiones, ataxia e incoordinación. Todo lo anterior permite tener una panorámica de la importancia del desarrollo de nuevos tratamientos para la amibiasis.

2. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de 15 plantas medicinales mexicanas presentan actividad inhibitoria contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar actividad contra *E. histolytica* de los extractos metanólicos de 15 plantas medicinales mexicanas así como aislar e identificar los compuestos bioactivos del extracto que presente la mayor actividad.

3.2 Objetivos particulares

1. Obtener extractos metanólicos de 15 plantas medicinales mexicanas.
2. Determinar los parámetros de crecimiento de *E. histolytica* para medir tiempo de duplicación y tiempo de generación.
3. Evaluar el efecto amebicida sobre el trofozoíto de *E. histolytica* de los 15 extractos obtenidos anteriormente.
4. Fraccionamiento del extracto metanólico con mayor actividad contra *E. histolytica* utilizando hexano y acetato de etilo como solventes de partición.
5. Realizar prueba amebicida contra *E. histolytica* de las fracciones obtenidas para continuar con un fraccionamiento biodirigido.
6. Aislar, purificar y determinar la estructura química de los compuestos que exhiban actividad amebicida, utilizando técnicas cromatográficas y técnicas

espectroscópicas como son espectroscopia de IR, RMN (^1H , ^{13}C -RMN, DEPT, HMBC, HMQC) así como espectrometría de masas.

4. ANTECEDENTES

4.1 Amibiasis

La infección con *E. histolytica* es un problema endémico en muchas regiones tropicales y subtropicales en el mundo y junto a la amplia diversidad de culturas y niveles socioeconómicos permite catalogar a la amibiasis como la tercera parasitosis causante de muerte. Alrededor del 10 al 20 por ciento de la población mundial se considera infectada y el 10 por ciento de esta población sufre de la enfermedad, con una letalidad que oscila entre el 0.1 y 0.25 por ciento orillando al fallecimiento de 40000 a 110000 personas cada año debido a complicaciones intestinales y extraintestinales causadas por la amibiasis (Conde-Bonfil and Mora-Zerpa, 1992; González *et al.*, 1995). Por otro lado, tanto en Latinoamérica como en México la amibiasis tiene una presencia que va desde un 24 a un 39 % en la población, con una distribución de 22 % en recién nacidos, 30 % en infantes en edad preescolar y 20 % en niños en edad escolar (Davila-Gutierrez *et al.*, 2002; Romero-Caballero *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2005).

La presencia de *E. histolytica* ha sido documentada desde la antigüedad, donde la disentería fue descrita con el nombre de “flujo de vientre” por Celso e Hipócrates, para después seguir siendo descrita en textos de diferentes culturas e idiomas: hebreo, griego,

chino, sánscrito (Pinilla *et al.*, 2008). *Entamoeba histolytica* fue descubierta por Lösch en 1875 en las heces de un enfermo de disentería en San Petersburgo (Beaver *et al.*, 2003).

El tratamiento farmacológico clásico contra la amibiasis se basa en el uso de metronidazol, tratamiento que desde su introducción como control de esta etiología ha sido modificado en repetidas ocasiones con el surgimiento de otros fármacos con propiedades amebicidas, de los cuales se pueden mencionar el tinidazol, secnidazol y ornidazol, los cuales al igual que el metronidazol son derivados del 5-nitroimidazol, el mebendazol perteneciente al grupo de los benzimidazoles, así como la quinfamida, nitazoxanida, emetina, furoato de diloxanida, diyodohidroxiquina, paromomicina y cloroquina (Adagu *et al.*, 2002; Bansal *et al.*, 2006; Mata-Cárdenas *et al.*, 2008; González-Salazar *et al.*, 2009). Sin embargo aunque el abanico de fármacos disponibles para el tratamiento de esta parasitosis es amplio no es del desconocimiento el hecho de que poseen varios efectos adversos de diferente grado de severidad (Bendesky and Méndez, 2001) por lo que existe la necesidad de nuevos fármacos que presenten menos efectos secundarios adversos.

4.2 *Entamoeba histolytica*

Entamoeba histolytica es un protozooario del orden Amoebida, familia Endamoebidae (Zerpa *et al.*, 2007) y presenta dos estadios en su ciclo biológico: trofozoito, el cual tiene dimensiones fluctuantes que van de 20 a 40 μm de diámetro según el grado de actividad

y otras condiciones, y quiste que va de 10 a 20 μm de diámetro (Beaver *et al.*, 2003, Zerpa *et al.*, 2007), ver figura 1.

E. histolytica es una causa común de diarrea crónica y aguda particularmente en países en desarrollo que infecta alrededor de 500 millones de personas y anualmente mueren 110 000 por complicaciones, por lo que la amibiasis es considerada la tercera parasitosis causante de mortalidad mundial después de la malaria y la esquistosomiasis (Pinilla *et al.*, 2008). El aspecto clínico de la enfermedad puede ir de portador asintomático a enfermedad invasiva ocasionando la destrucción de los órganos y la invasión de los tejidos donde la disentería y los abscesos hepáticos son las más graves manifestaciones clínicas (Mata-Cárdenas *et al.*, 2008). Su ciclo de vida es simple, la amiba vive y se multiplica en el intestino y forma quistes que son expulsados en las heces fecales para posteriormente infectar nuevos individuos cuando éstos consumen alimento o agua contaminada (Cox, 2002, Beaver *et al.*, 2003). El 90 % de las infecciones son asintomáticas en tanto que el 10% son sintomáticas (Pinilla *et al.*, 2008), en los casos donde hay una invasión de la pared del intestino, causando severas ulceraciones. Si la infección avanza causando daño en los vasos sanguíneos, ésta puede ser acarreada a sitios extraintestinales, afectando principalmente al hígado localizando las lesiones comúnmente en el lóbulo derecho, pero también toman importancia las lesiones localizadas en el cerebro, piel y pulmones (Cox, 2002, Beaver *et al.*, 2003, Pinilla *et al.*, 2008).



Fig. 1 *E. histolytica* en medio PEHPS. Vista con un aumento de “40 X”

4.3 Productos naturales con actividad amebicida

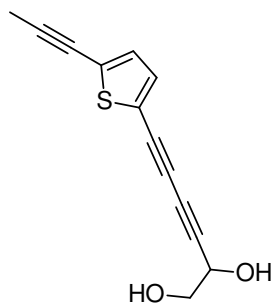
Actualmente la medicina tradicional representa una importante opción ante las necesidades de atención a la salud en los diversos países de Latinoamérica y el Caribe, por lo que anteriormente se ha evaluado la actividad amebicida de extractos crudos de *Chiranthodendron pentadactylon*, *Annona cherimola*, *Punica granatum*, *Allium sativum*, *Artemisa ludoviciana*, *Bocconia frutescens*, *Cocos nucifera*, *Chenopodium murale*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris* (Calzada *et al.*, 2006a), *Syzygium aromaticum* (Bader and Moslen, 2008), *Pterocarpus angolensis*, *Lippia javanica* (Samie *et al.*, 2009) y *Phaseolus vulgaris* (Lara-Díaz *et al.*, 2009). Por otra parte se han aislado compuestos naturales los cuales han presentado una actividad amebicida sobresaliente, de estos se puede mencionar el lípido galacto-glicerol compuesto aislado de *Oxalis corniculata* (Lohia *et al.*, 2008). Del mismo modo ha sido reportada la actividad amebicida del compuesto 2-(prop-1-inil)-5-(5,6-dihidroxihexa-1,3-diinil)-tiofeno (**1**) obtenido de *Pluchea indica* (Biswas *et al.*, 2007), de la antraquinona crisofanol (**2**) aislada de los

extractos de raíz, corteza y hojas de *Sena racemosa* (Moo-Puc *et al.*, 2007) del simaroubolidano X aislado de *Castela texana* (Calzado-Flores *et al.*, 1983), de la conemorquina (**3**) aislada de *Chonemorpha fragrans* (Shah *et al.*, 1987), de los geraninos A, B, C y D (**4-7**) de *Geranium niveum*, de la isoquercitrina (**8**), el eritrodiol (**9**), el quercetin-3-O-(6''-O-E-cafeoil)-D-glucopiranosido (**10**) y narcisina (**11**) obtenidos de *Conyza filaginoides*, de la (-)-epicatequina (**12**), (-)-epigallocatequina (**13**), camferol (**14**) e incomptina A aislados de *Decachaeta incompta* (Calzada *et al.*, 1999ab, 2001a,b, 2009), de las neuroleninas B, C y D (**15-17**) de *Neurolaena oaxacana* (Claus *et al.*, 1999) y la mezcla de los compuestos sulfoquinousildiacilglicerol (**18, 19** y **20**) aislados de *nombre de planta* (Cantillo-Ciau *et al.*, 2010). En la figura 2 se muestra la estructura de algunos de estos compuestos.

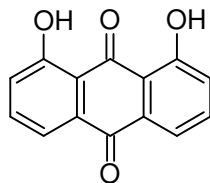
El impacto de los productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos ha tomado importancia, no sólo para contrarrestar el cáncer, sino también para enfermedades microbianas e infecciones parasitarias (Butler, 2008). En la actualidad se mantienen en el mercado dos fármacos antiparasitarios de origen natural de un total de 13 fármacos de diferente origen, la artemisina aislada del *Artemisia annua* y la ivermectina obtenida de *Streptomyces avermitilis* (Klayman *et al.*, 1984; Ñmura 2008; Newman and Cragg, 2012).

Por miles de años, la medicina y los productos naturales han estado estrechamente relacionados a través de la medicina tradicional (Ventura and Solange, 2009), por lo tanto en México, la Secretaria de Salud ha propuesto un proyecto para promover el desarrollo, conocimiento y utilización segura en condiciones adecuadas de la medicina tradicional y las medicinas complementarias promoviendo para ello la validación de la

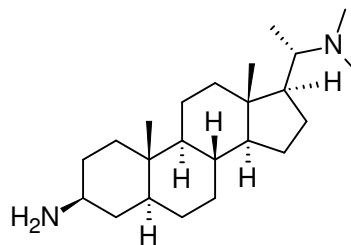
actividad biológica de 60 plantas medicinales mexicanas de amplio uso en nuestra población (Secretaria de Salud, 2007). Dentro de estas plantas se han seleccionado 15 que tiene gran uso en el noreste de México y que se describen a continuación.



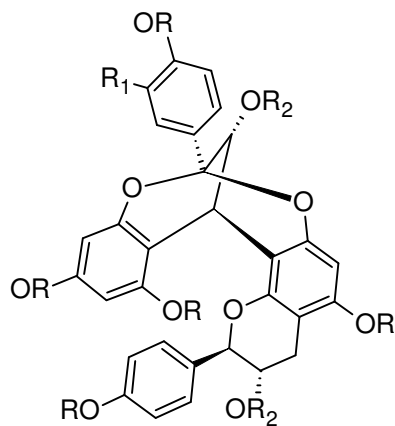
1



2



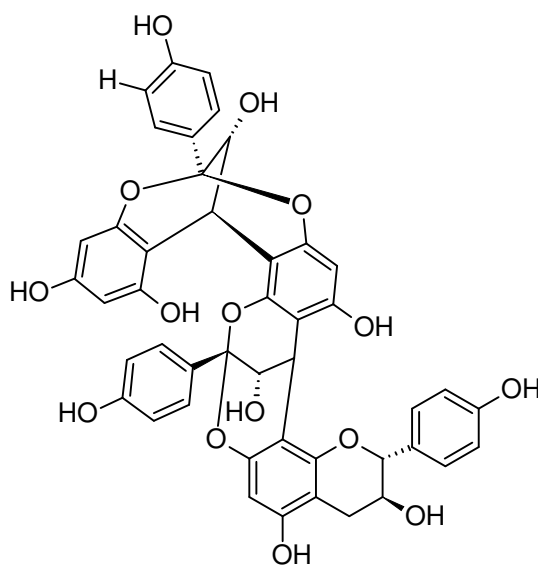
3



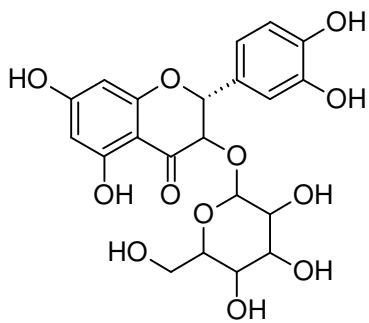
4 R=H, R₁= H, R=H

5 R=H, R₁= OH, R=H

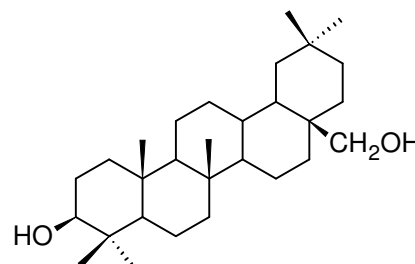
6 R=H, R₁= H, R=OH



7



8



9

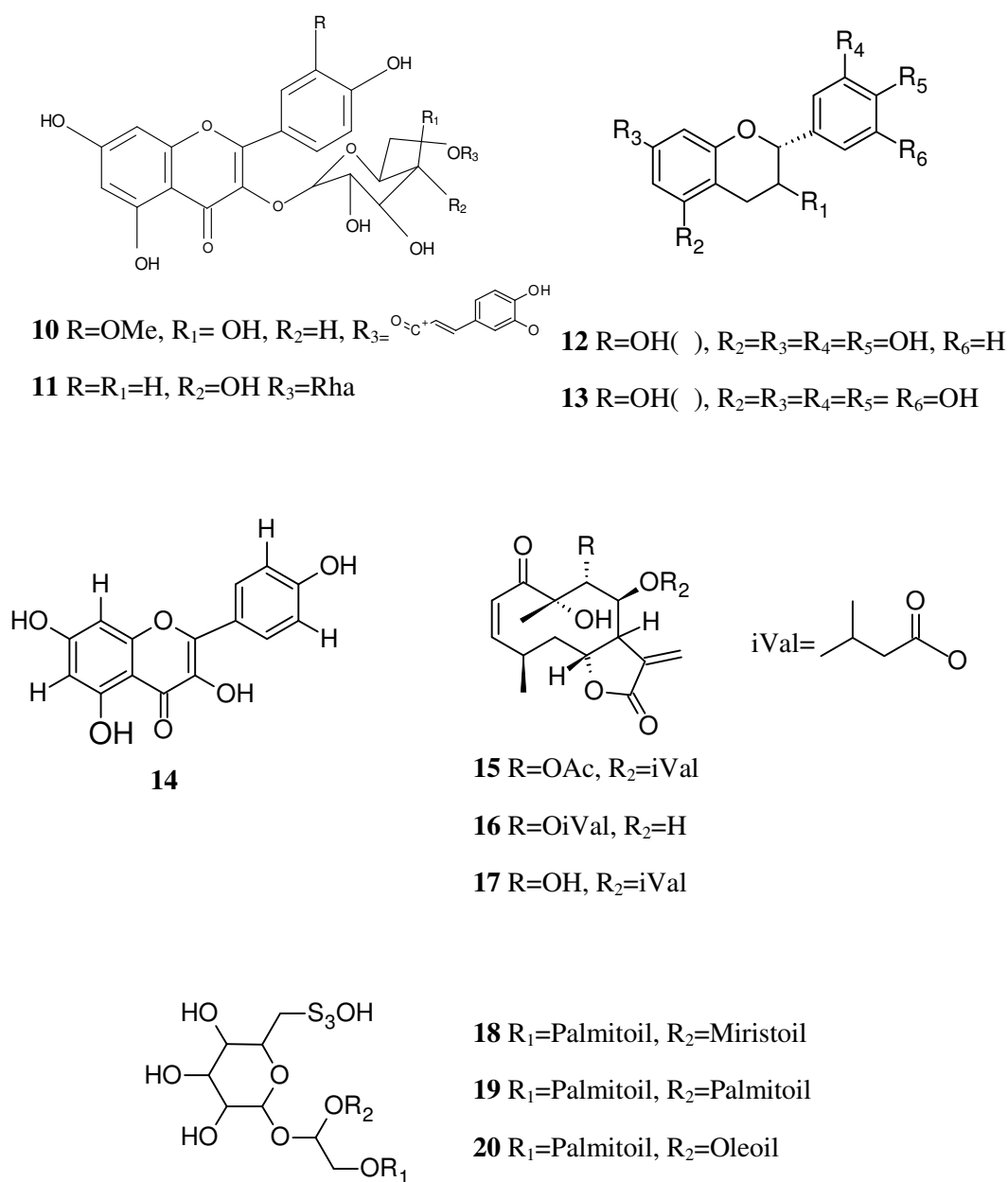


Figura 2. Compuestos con actividad amebicida aislados de plantas con actividad amebicida. 2-(prop-1-inil)-5-(5,6-dihidroxihexa-1,3-diinil)-tiofeno (**1**); crisofanol (**2**); conemorfinina (**3**); geranino A (**4**); geranino B (**5**); geranino C (**6**); geranino D (**7**); isoquercitrina (**8**); eritrodioil (**9**); quercetin-3-O-(6''-O-E-cafeoil)- *D*-glucopiranosido (**10**); norcisinina (**11**); (-)-epicatequina (**12**); (-)-epigalocatequina (**13**); camferol (**14**); neurolenina B (**15**); neurolenina C (**16**); neurolenina D (**17**); sulfoquinosildiácilglicerol 1 (**18**); sulfoquinosildiácilglicerol 2 (**19**); sulfoquinosildiácilglicerol 3 (**20**).

4.4 Plantas seleccionadas para este estudio

4.4.1 *Artemisia mexicana* (Estafiate)

Es originaria de Estados Unidos de América, México y Guatemala y se ubica en 17 estados del país que incluyen Valle de México, Estado de México, Michoacán, San Luis Potosí, Veracruz y Chihuahua, entre otros. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado, crece a las orillas de los caminos, en terrenos de cultivos abandonados y es cultivada en huertos familiares, es una hierba erguida de hasta de 1 m de altura. Tiene sus ramas grisáceas o blanquecinas y sus hojas divididas en tres, con forma de listones alargados, por el envés son peludas y blanquecinas y verdes en el anverso. Las flores son amarillentas acomodadas en cabezuelas numerosas que al estrujarse despiden un olor característico (BDMTM, 2012). *A. mexicana* posee una amplia y variada actividad biológica donde se puede mencionar la actividad antidiarreica en ratas wistar y cepa CD1 debido al nonaldehido aislado de la misma (Zavala-Sánchez et al., 2002); actividad antitumoral debido a los arteminolidos A, B, C y D (Bork et al., 1997; Lee et al., 2003), actividad fungicida contra *Candida albicans*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Mucor circinelloides*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sporothrix schenckii* (Damian-Badillo et al 2008), *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* (Lopes-Lutz et al., 2008) y contra diversas especies del género *Phytophthora* (Damian et al., 2010). Por otro lado ha sido reportada la actividad bactericida de *A. mexicana* ya que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* (Lopes-Lutz et al., 2008), *Vivrio cholerae* (Sánchez et al., 2010) y además inhibe la adherencia y la producción de citotoxina en *Campylobacter jejuni* y *C. coli* (Castillo et al., 2011) por

otra parte también ha sido reportada la actividad antioxidante debido a números compuestos polifenólicos presentes en *A. mexicana* (Carvalho *et al.*, 2011). Sin embargo reportes sobre el género *Artemisia* demuestran que posee actividad antimalárica originada por la artemisina (Celeghini *et al.*, 2009). Con respecto a la investigación fitoquímica realizada en *A. mexicana* hace evidente la presencia de sesquiterpenlactonas y flavonoides (Liu and Mabry, 1982; Ruiz-Cancino *et al.*, 1993; Stermitz *et al.*, 2002) así como la presencia en el aceite esencial de monoterpenos como el alcanfor, α - y β -belandrenos, limoneno, 1,8-cineol, el alcohol *p*-dimetilbenzilo, sesquiterpenos oxigenados con un grupo 5-eteniltetrahydro-5-metil-2-furanil como sustituyente como la davanona (Martínez, 1994; Lopes-Lutz *et al.*, 2008).

4.4.2 *Capsicum annuum* (Chile)

El género *Capsicum* incluye varias especies cultivadas ampliamente alrededor del mundo sin embargo *Capsicum annuum* es una de las especies más representativas y que ha acaparado una mayor atención por su extensa distribución desde Asia, África, el mediterráneo y América de donde es originaria. *C. annuum* es una planta cultivada copiosamente debido a su gran utilidad como alimento, especia y como una herramienta medicinal. *C. annuum* es una planta con numerosos reportes de actividad biológica, resaltando la actividad antioxidante (Guil-Guerrero *et al.*, 2006; De Marino *et al.*, 2008, Jang *et al.*, 2008) de ciertos compuestos presentes como xantina, capsorubina, capsaicina, y demás capsinoides.(Maoka *et al.*, 2001; Ochi *et al.*, 2003). Del mismo modo existen reportes de actividad anticancerígena (Aggarwal *et al.*,2008) y la presencia de compuestos proapoptóticos como el icarisido E₅ (Iorizzi *et al.*, 2001); actividad

antifúngica contra *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium solani* y *F. graminearum* (Kuku *et al.*, 2009) y actividad bacterostática contra *Listeria monocytogenes* por fenilpropanoides aislados de *C. annuu* (Acero-Ortega *et al.*, 2005) y una notable actividad analgésica, poseyendo compuestos que controlan el dolor post-herpético, de artritis reumatoides, neuropatías diabéticas, osteoartritis y de la cefalea en racimos (Constant *et al.*, 1995). Por otra parte el estudio fitoquímico de esta planta ha permitido el aislamiento de glucósidos, carotenoides, flavonoides en fruto y amidas ácidas del tipo vainillilamina en frutos de variedades irritantes, en tanto en frutos de variedades dulces predominan compuestos conocidos como CLS, sustancias tipo capsinoides, como lo son el capsiato, dihidrocapsiato y nordihidrocapsiato los cuales son los más representativos (Kobata *et al.*, 1999; Iorizzi *et al.*, 2001; Maoka *et al.*, 2001; Materska *et al.*, 2005) y de sesquiterpenos aislados de tallos y hojas (Kawaguchi *et al.*, 2004).

4.4.3 *Castela texana* (Chaparro amargoso)

Castela texana es un arbusto leñoso distribuido ampliamente en las regiones áridas del noreste de México y en el sureste de Texas. Esta planta ha sido empleada desde principios del siglo XX para el control de la disentería amibiana además de presentar otras actividades antiprotozoarias como las reportadas ante *Trichomonas vaginalis* y *Plasmodium falciparum*, actividad biológica que fue exhibida por el extracto metanólico y la chaparrina de *C. texana* (Calzado-Flores *et al.*, 1998a; ^bCalzado-Flores *et al.*, 1998); por otro lado los compuestos aislados de la misma como la chaparrinona, glaucarubolona y holacantona poseen actividad citotóxica (Dou *et al.*, 1996). Además a esta planta también se le atribuye actividad antimutagénica, antioxidante, antigenotóxica

y quimioprotectora (Reyes-López *et al.*, 2005). En cuanto a su estudio fitoquímico se ha reportado el aislamiento de un tirucaleno tipo triterpenoide llamado 24-*epi*-piscidinol A (Mcchesney *et al.*, 1997), así como la presencia de un nuevo cuasinoide, llamado 11-*O*-*trans-p*-coumaroil-amarolido en la hojas y del simurobulidano X en raíz (Dou *et al.*, 1996; Calzado-Flores *et al.*, 2000).

4.4.4 *Cecropia obtusifolia* (Guarumbo)

Es una planta que tiene una amplia área de distribución en México desde la vertiente del Golfo en los estados de Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Quintana Roo y Yucatán y en la vertiente del Pacífico en el sur de Sinaloa. *C. obtusifolia* se emplea en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II (Andrade-Cetto y Wiedenfeld, 2001), usado como analgésico, antiinflamatorio, antihipertensivo, relajante muscular aparte de tener un efecto represor en el sistema nervioso central (Pérez-Guerrero *et al.*, 2001; Revilla-Monsalve *et al.*, 2007). Por otro lado tiene una notable actividad inhibitoria sobre epimastigotes de *T. cruzi* (Fumiko *et al.*, 2002). En cuestión de los productos naturales aislados de *C. obtusifolia* se ha obtenido los principales componentes de extractos acuosos, el ácido clorogénico y el isoorientin (Andrade-Cetto and Cárdenas., 2010) además se han identificado azúcares como la ramnosa y xilosa, el 5-(etoxi)-metil-furfural, estigmasterol, 4-etil-5-(N-3-valeroil)-6-hexahidrocumarina y el compuesto 1-(2-metil-1-nonen-O-il)-aziridina (BDMTM).

4.4.5 *Cyclolepis genistoides* (Palo azul)

C. genistoides es una planta originaria de la región de Argentina y se usa tradicionalmente en el tratamiento para enfermedades renales y diabetes (Hasegawa, 2007) además de que se ha comprobado su actividad antiinflamatoria mediada por la carragenina (Sosa *et al.*, 2011). En estudios realizados para analizar los compuestos que componen a *C. genistoides* se han aislado de la parte aérea triterpenos y sesquiterpenos, el ácido 12,13-epoxiolenólico y las sesquiterpenlactonas deacilcinaropirina, dihidroeleagnina e isolipidiol (Heluani *et al.*, 1997).

4.4.6 *Eryngium heterophyllum* (Hierba del sapo)

Esta planta es originaria de México, presente en climas seco, semiseco y templado. Se recomienda ingerir la infusión hecha con toda la planta para padecimientos urinarios, afecciones del hígado, para bajar los niveles de colesterol, contra la bilis, diarrea, dolor de estómago, fiebre y padecimientos pulmonares (BDMTM, 2012), sin embargo la actividad biológica que se atribuye a esta planta no ha sido confirmada ya que no existen estudios previos ni con el fin de confirmar su actividad biológica ni estudios fitoquímicos. Por otra parte el género *Eryngium* posee reportes del aislamiento de diversos productos naturales de los que se puede mencionar el aislamiento de D-manitol de *E. coeruleum*, hexa-acetato de D-manitol y el camferol-7-ramno-3-glucosido de *E. macrocalix*; el flavonoide rutina y las saponinas betulina y A₁-barrigenol de *E. octophyllum* y la gimnospermina y el R₁-barrigenol de *E. biebersteinianum*. Por otra parte también ha sido analizado el aceite esencial de *E. octophyllum* identificando 29

componentes de los cuales los más abundantes son eugenol, timol, isoeugenol, sabineno, limoneno, *dl*-piperitona, piperitona y α -betulenol (Ikramov *et al.*, 1969, 1971a,b, 1973). Más recientemente se analizó el aceite esencial de *E. corniculatum* de donde se identificó sus componentes y se observó que los principales componentes son el 2,4,6-trimetilbenzaldehído con un 50.8%, 50.0% y 29.8 % tanto en tallo, hoja y raíz respectivamente, además del α -pineno, acetato de crisantenilo, 2,4,5-trimetilbenzaldehído, filocladieno, (*E*)-nerolidol y el α -eudesmol (Palá-Paúl *et al.*, 2007).

4.4.7 *Gnaphalium oxypyllum* (Gordolobo)

El origen de *G. oxypyllum* es desconocido, habita en climas cálido, semicálido y templado entre los 20 y los 1875 msnm, es una planta silvestre que crece en terrenos de cultivo, de riego y temporal, y abandonados está distribuida en diversos estados del centro y norte de México, incluyendo los estados de Baja California, Durango, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Puebla, Sonora y Tlaxcala (BDMTM, 2012). *G. oxypyllum* es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana, de donde las infusiones de toda la planta con flores presentan una acción antiespasmódica, emoliente, antiinflamatoria, antitusígena, antiespasmódica, diurética y sudorífica; por otra parte también se ha demostrado que posee actividad bactericida contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* actividad biológica lograda por los compuestos ácido ent-kaur-16-on-19-oico, zoapatlin, 13-*epi*-esclareol, luteolina, 3-metoxiquercetina, β -sitosterol y el estigmasterol los cuales fueron aislados tanto de flor como de hoja (Villagómez-Ibarra *et al.*, 2001).

4.4.8 *Gymnosperma glutinosum* (Tata Lencho)

El empleo de *G. glutinosum* en la medicina tradicional en la zonas rurales es principalmente para tratar diversos padecimientos como los son dolores reumáticos, diarreas y heridas, debido a que se le atribuyen propiedades analgésicas, además de permitir una rápida cicatrización (Martínez, 1959).

El primer compuesto que fue aislado de *G. glutinosum* fue la gimnospermina (Miyakado *et al.*, 1974), posteriormente en el mismo año de 1974 se aislaron 2 flavonoides pentametoxilados (Domínguez and Torre, 1974). En el año 1988 se logró el aislamiento de 21 flavonoides (Yu *et al.*, 1988); así mismo, Maldonado en el año de 1994, continuó con la identificación de los diterpenos *ent*-labdano y *neo*-clerordano, con formula molecular $C_{20}H_{36}O_3$ y $C_{20}H_{34}O_3$ respectivamente (Maldonado *et al.*, 1994). Recientemente, Canales y colaboradores en el 2007, lograron la identificación de dos compuestos, del ácido 17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico y de la 5,7-dihidroxi-3,6,8,2,4,5-hexametoxiflavona, los cuales presentaron actividad antibacteriana y antifúngica (Canales *et al.*, 2007).

4.4.9 *Haematoxylum brasiletto* (Palo de Brasil)

H. brasiletto es conocido comunmente como “palo de Brasil”, siendo utilizado en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de infecciones en boca y riñones, hipertensión, dolor estomacal, úlceras gástricas y diabetes, así como por su actividad bactericida inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli* entero-hemorrágica (Sánchez-

Marroquin *et al.*, 1958; Heredia *et al.*, 2005; Rivero-Cruz, 2008). En el año de 1996 fueron aislados dos flavonoides, 2,6-bis-*O*-digaloil-3-*O*-galoilglucosa y 2-*O*-trigaloil-1,3,4,6-tetrakis-*O*-galoilglucosa, así como cuatro galotaninos (Kandil *et al.*, 1996).

4.4.10 *Heterotheca inuloides* (Árnica)

El uso tradicional de esta planta se basa en sus propiedades anti-inflamatorias (Ogura *et al.*, 2002; Maldonado-López *et al.*, 2008) por los compuestos 7-hidroccadalina, dicadalenal, cariolan-1,9 -diol y la quercetina (Segura *et al.*, 2000; Delgado *et al.*, 2001), así como su actividad analgésica (Ogura *et al.*, 2002), cicatrizante y antioxidante (Coballase-Urrutia *et al.*, 2010). También se han hecho reportes de actividad bactericida sobre diversas especies de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Pseudomonas* de 4 compuestos aislado de *Heterotheca inuloides* el -cariofileno, oxido-4-5 - -cariofileno, 7-hidroxi-3,4-dihidroccadalina y el 7-hidroxicadalina (Kubo *et al.*, 1994). *H. inuloides* posee numerosos reportes de compuestos aislados, donde se puede mencionar el aislamiento de diversos sesquiterpenos (Maldonado-López *et al.*, 2008; Kubo *et al.*, 1996) como la 3-hidroxi- -calacorena (Stipanovic and Puckhaber, 2004), del mismo modo se logró el aislamiento de 10 flavonoides glicosilados y de los ácidos cafeico, protocatecuico y clorogénico (Jerga *et al.*, 1990).

4.4.11 *Marrubium vulgare* (Marrubio)

M. vulgare tiene su origen entre el mar Mediterráneo y Asia central sin embargo está ampliamente distribuida alrededor del mundo, esta planta tiene un amplio historial en su

uso en la medicina debido a que presenta una amplia gama de actividades biológicas como la actividad antiprotozoaria del aceite esencial contra *Schistosoma mansoni* y *S. haematobium* (Saleh and Glombitza, 1989), actividad hipoglucémica (Bardai *et al.*, 2001; Jae y Park, 2006), actividad antioxidante (Weel *et al.*, 1999, Alali *et al.*, 2007), antiespasmódico en células de músculo liso, analgésico e hipotensivo producido por los compuestos marrubina y el marrubenol aislados de la misma (Rodrigues *et al.*, 1998; Knöss and Zapp *et al.*, 1998; Bardai *et al.*, 2003). Del mismo modo existen reportes de actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae* y *Bacillus subtilis* además de presentar actividad inhibitoria contra el hongo *Botrytis cinerea* (Rigano *et al.*, 2007; González and Marioli, 2010; Zarai *et al.*, 2011). Con lo que respecta al estudio fitoquímico de *M. vulgare* existen reportes del aislamiento de triciclono, -pineno, bisabolol, -elemoneno, isomenton-8-tiol, 2-hidroxi- -ciclohogeranion, apoverberon y *cis*-guai-9-en-11-ol (Saleh and Glombitza, 1989) giceraldehído, fosfolípidos y derivados del tocoferol en el aceite esencial (Amer, 1993) además de que el aceite esencial como principales componentes -citronelo, formiato de citronelilo, germacrano-D, -eudesmol (Zarai *et al.*, 2011) y compuestos fenilpropanoides (Martin-Nizard *et al.*, 2004).

4.4.12 *Melissa officinalis* (Toronjil)

Melissa officinalis es una hierba perenne de la familia de las lamiaceae, nativa del sur de Europa y de la región mediterránea. De esta planta se ha reportado ampliamente su actividad antioxidante la cual posiblemente es originada por la gran cantidad de

compuestos fenólicos en sus aceites esenciales y de flavonoides como 2-(3',4'-dihirofenil)-1,3-benzodioxole-5-aldehído, ácido cafeico, ácido rosmarínico (Tagashira and Ohtake, 1998; Yukizaki, 2008; Dastmalchi, 2008; Atanassova *et al.*, 2011). Sin embargo también han sido reportadas la actividad bactericida (Canadanovi-Brunet, 2008;), analgésica, contra el nerviosismo, reumatismo, actividad carminativa, digestiva, diaforética, antiviral y antiprotozoaria contra *Acanthamoeba castellanii*, *Trypanosoma brusei* y *Leishmania major* (Gbolade and Lockwood, 1989; Mikus *et al.*, 2000; Atanassova *et al.*, 2011; Malatyali *et al.*, 2011). Su contenido químico son principalmente terpenos como el citronelal, citronelol, citral y geraniol, -cariofileno, -cubebeno, -cadinal los cuales además constituyen los principales componentes del aceite esencial de *M. officinalis* (Sarer and Kökdil, 1991; Izabela, 2007).

4.4.13 *Persea americana* (Aguacate)

El aguacate (*Persea americana*) es un árbol originario de Guatemala y México perteneciente a la familia de las lauráceas. El uso de la semilla presenta actividad antifúngica debido al compuesto *E-Z-Z*-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-5,12,15-trieno (Domergue *et al.*, 2000). Lo que respecta a reportes de estudios fitoquímicos está el aislamiento de seis compuestos oxigenados, olefínicos y acetilénicos, de 17 carbonos (Kashman *et al.*, 1969) además del aislamiento de los trioles 1,2,4-trihidroxinonadecano y 1,2,4 trihidroxiheptadecano (Fumiko *et al.*, 2002), así como del acetato de (2*R*)-(12*Z*, 15*Z*)-2-hidroxi-4-oxoheneicosa-12-15-dien-1-ilo, el cual posee actividad antioxidante y de los compuestos persenona A y B (Kim *et al.*, 2000).

4.4.14 *Ruta chalepensis* (Ruda)

Es una planta perenne con base leñosa, desnuda y aromática, llegando a medir de 2-6 dm de altura. Se extiende por todo el Mediterráneo, islas Canarias, Cabo Verde, Azores y Madeira en el oeste de la península arábiga además de estar ampliamente distribuida en el continente americano. *R. chalepensis* es una planta que presenta actividad antimicrobiana contra *Clostridium. perfringens* y *Escherichia coli* debido a la presencia de compuestos derivados de quinolinas (Jang-Hee *et al.*, 2005); también exhibe actividad larvicida proporcionada por furanocumarinas y alcaloides quinolínicos (Emam *et al.*, 2009) también se ha demostrado que plantas de la familia Rutaceae presentan actividad tripanocida (Atta-ur-Rahman *et al.*, 1998; López and Wagner, 1997; Biavatti *et al.*, 2002).

4.2.15 *Schinus molle* (Pirul)

Esta planta se encuentra de forma espontánea desde el sur de México hasta el norte de Chile y centro de Argentina, especialmente en el Perú. *S. molle* es una planta de la cual se ha reportado numerosos estudios sobre su actividad biológica resaltando su actividad anticancerígena (Díaz *et al.*, 2008) y antibacterial, destacando la actividad inhibitoria contra *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus Cereus*, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Padín *et al.*, 2007), actividad antifúngica (Dikshit *et al.*, 1986), anti-inflamatoria (Yueqin *et al.*, 2003), así como presentar una actividad de repelencia contra *Blatella germanica* y *Triatoma infestans* (Ferrero *et al.*, 2006, 2007). En el desarrollo de estudios

fitoquímicos se ha logrado el aislamiento e identificación del éster metílico del ácido (13 , 14 , 17 , 20S, 24Z)-3-oxolanosta-8,24-dien-26-oico (Manotti *et al.*, 1975), en extracciones hechas al fruto de *S. molle* ha sido posible aislar sesquiterpenos, terpenos y flavonoides (Ono *et al.*, 2008) así como también biflavononas (Yueqin *et al.*, 2003).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Colecta y extracción de las plantas en estudio.

5.1.1 Colecta de material vegetal

La adquisición del material vegetal se logró por dos medios, en forma comercial y colectada en los municipios de Aramberri, General Escobedo y Salinas Victoria en el estado de Nuevo León (ver tabla 16 en la sección 6.1). Posterior a la colecta del material vegetal, se preparó una muestra para herbario, tomando en cuenta que la muestra tuviera flor, hoja y tallo y en el caso de *C. annuum* el fruto. Las muestras fueron identificadas y depositadas en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

La clasificación taxonómica las plantas bajo estudio es la siguiente.

| | |
|-----------------|------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Asterales |
| Familia | Asteraceae |
| Género | <i>Artemisia</i> |
| Especie | <i>mexicana</i> |

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Artemisia mexicana*

| | |
|-----------------|-----------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliosida |
| Subclase | Asteridae |
| Orden | Solanales |
| Familia | Solanaceae |
| Género | <i>Capsicum</i> |
| Especie | <i>annuum</i> |

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Capsicum annum*

| | |
|-----------------|----------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnolopsida |
| Subclase | Rosidae |
| Orden | Sapindales |
| Familia | Simaroubaceae |
| Género | <i>Castela</i> |
| Especie | <i>texana</i> |

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Castela texana*

| | |
|-----------------|--------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Urticales |
| Familia | Cecropiaceae |
| Género | <i>Cecropia</i> |
| Especie | <i>obtusifolia</i> |

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Cecropia obtusifolia*

| | |
|-------------------|--------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta |
| Filo | Tracheophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Asteridae |
| Orden | Asterales |
| Familia | Asteraceae |
| Subfamilia | Gochnatioideae |
| Tribu | Gochnatieae |
| Género | <i>Cyclolepis</i> |
| Especie | <i>genistoides</i> |

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Cyclolepis genistoides*

| | |
|-----------------|----------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Apiales |
| Familia | Apiaceae |
| Género | <i>Eryngium</i> |
| Especies | <i>heterophyllum</i> |

Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Eryngium heterophyllum*

| | |
|-----------------|-------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Asterales |
| Familia | Asteraceae |
| Género | <i>Gnaphalium</i> |
| Especie | <i>oxyphyllum</i> |

Tabla 7. Clasificación taxonómica de *Gnaphalium oxyphyllum*

| | |
|-----------------|--------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Asteridae |
| Orden | Asterales |
| Familia | Asteraceae |
| Género | <i>Gymnosperma</i> |
| Especie | <i>glutinsum</i> |

Tabla 8. Clasificación taxonómica de *Gymnosperma glutinosum*

| | |
|-----------------|---------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Agiospermae |
| Clase | Eudicotyledoneae |
| Orden | Fabales |
| Familia | Leguminosae |
| Género | <i>Haematoxylon</i> |
| Especie | <i>brasiletto</i> |

Tabla 9. Clasificación taxonómica de *Haematoxylon brasiletto*

| | |
|-----------------|--------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Asteridae |
| Orden | Asterales |
| Familia | Asteraceae |
| Género | <i>Heterotheca</i> |
| Especie | <i>inuloides</i> |

Tabla 10. Clasificación taxonómica de *Heterotheca inuloides*

| | |
|-----------------|------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Lamiales |
| Familia | Lamiaceae |
| Género | <i>Marrubium</i> |
| Especie | <i>vulgare</i> |

Tabla 11. Clasificación taxonómica de *Marrubium vulgare*

| | |
|-------------------|--------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Lamiales |
| Familia | Lamiaceae |
| Subfamilia | Nepetoideae |
| Tribu | Mentheae |
| Género | <i>Melissa</i> |
| Especie | <i>officinalis</i> |

Tabla 12. Clasificación taxonómica de *Melissa officinalis*

| | |
|-----------------|------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Lurales |
| Familia | Lauraceae |
| Género | <i>Persea</i> |
| Especie | <i>americana</i> |

Tabla 13. Clasificación taxonómica de *Persea americana*

| | |
|-----------------|--------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Sapindales |
| Familia | Rutaceae |
| Género | <i>Ruta</i> |
| Especie | <i>chalepensis</i> |

Tabla 14. Clasificación taxonómica de *Ruta chalepensis*

| | |
|-----------------|----------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Sapindales |
| Familia | Anacardiaceae |
| Género | <i>Schinus</i> |
| Especie | <i>molle</i> |

Tabla 15. Clasificación taxonómica de *Schinus molle*

5.1.2 Preparación del material vegetal

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó la parte aérea (compuesta por hojas, tallo y yemas germinales) de *C. obtusifolia*, *E. heterophyllum*, y *H. inuloides*; de las plantas *A. mexicana*, *C. texana*, *C. genistoides*, *G. oxyphyllum*, *G. glutinosum*, *M.*

vulgare, *M. officinalis*, *P. americana*, *R. chalepensis* y *S. molle* se empleó solamente la hoja. Para *H. brasiletto* y *C. annuum* se usó la corteza y el fruto respectivamente.

Una vez que se realizó la colecta y la identificación del material vegetal se procedió a secar las plantas. Se separó el material en hojas y tallos y se extendió sobre mesas para un secado más homogéneo, aplicando calor producido por focos de halógeno de 90 watts para obtener una temperatura constante de 30°C. A lo largo del proceso de secado se fue desechando el material que estaba contaminado con hongos. Al terminar el secado del material vegetal se procedió a realizar el molido de las partes aéreas, hojas, corteza y fruto correspondiente a las especificaciones para cada una de las plantas bajo estudio, para la realización de esta etapa se empleó un molino manual.

5.1.3 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet es un método de extracción líquido-sólido ampliamente utilizado en la extracción de metabolitos de plantas. Este sistema consta de un matraz colector, una cámara de extracción y un condensador (figura 3). Su principal ventaja es que se trata de un proceso continuo, dado que el solvente deja continuamente el matraz como vapor y es condensado en la cámara de extracción para extraer el material vegetal en forma constante, antes de volver al matraz colector mediante el sistema de sifón. El método es práctico sin embargo presenta la desventaja de que, como requiere calentar el solvente a su punto de ebullición puede causar daño a compuestos termolábiles además de formación de artefactos (Seidel, 2006). Se utilizaron 600 mL (por extractor) de metanol como solvente de extracción, durante 40 h respectivamente. Al finalizar la

extracción se filtró la solución utilizando filtros “Whatman” y mediante el uso de un Rotavapor “Büchi” R-3000 se llevaron a sequedad.



Figura 3. Extractor Soxhlet

5.2 Aislamiento de compuestos con actividad amebicida de la planta con mayor actividad antiparasitaria.

5.2.1 Cromatografía en columna con sílica gel

La cromatografía en columna con sílica gel es una técnica que permite la separación de mezclas complejas por medio de la cromatografía por adsorción. Para el desarrollo del proceso cromatográfico es necesario tomar en cuenta la relación que hay entre la fase estacionaria (sílica gel) y la fase móvil para lograr una separación exitosa debido a que esta metodología de separación se lleva a cabo en base al grado de retención que existe entre el analito con la fase estacionaria por medio de puentes de hidrógeno los cuales son formados por los grupos funcionales de las moléculas a separar con los grupos hidroxilos de las partículas de la sílica. Además de la influencia de la fase estacionaria sólida, el grado de afinidad de los compuestos a la fase móvil también juega un rol importante en el fraccionamiento del extracto orgánico, de esta forma es posible obtener

primeramente los compuestos con poca afinidad a la fase estacionaria los cuales generalmente son compuesto de baja polaridad y finalmente obtener los compuesto de una polaridad mayor (Canell, 1998; Colegate and Molyneus, 2008).

Para el desarrollo de esta investigación se emplearon dos tamaños distintos de columnas de vidrio: una de 160 cm de largo por 2.5 cm de diámetro empleada para cantidades de muestra que oscilan entre 3 y 10 g y una segunda de 40 cm de largo por 2 cm de diámetro para muestras menores a 2 g. Como fase estacionaria se utilizó Sílica gel “J. T. Baker” de 60-200 mallas usando hasta 200 g para la columna de mayor longitud y 22 g para la segunda. Como fase móvil se emplearon los siguientes solventes orgánicos: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, con los gradientes de elución que se indican en la sección de resultados.

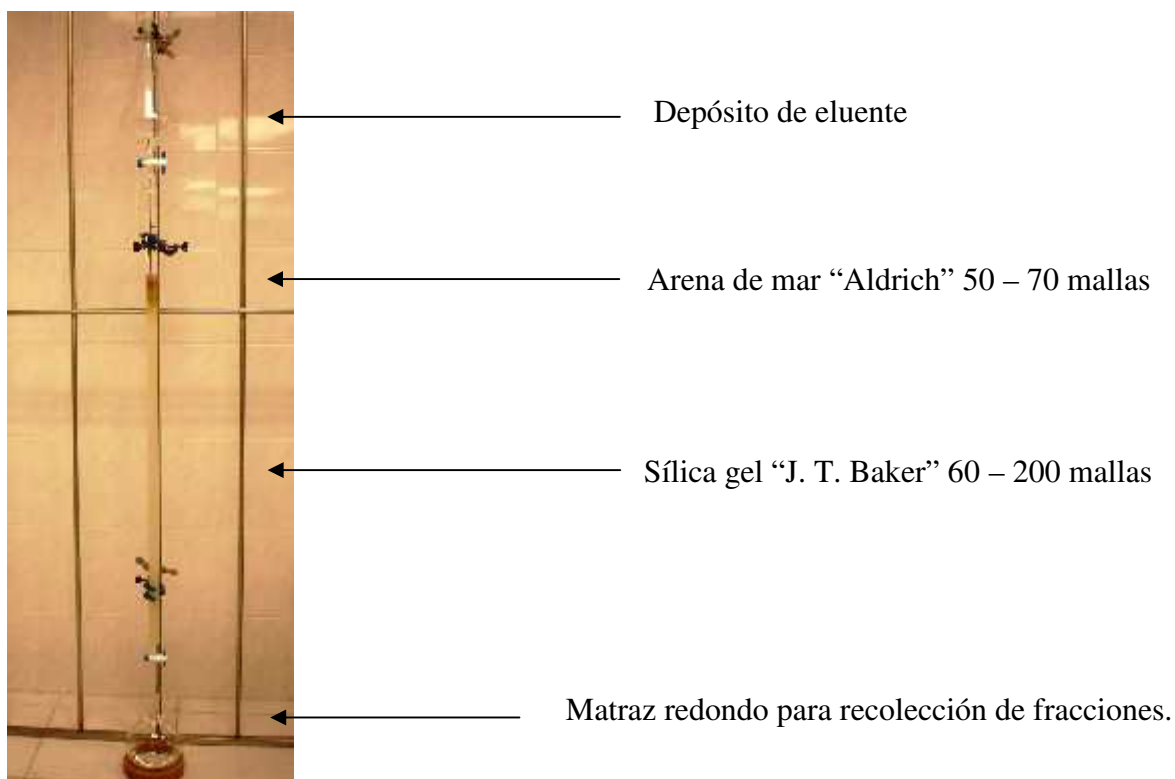


Figura 4. Componentes de columna cromatográfica de 160 cm de longitud (Sílica, fase normal).

En algunos procesos de cromatografía en columna no fue necesario utilizar metanol como eluente, los cambios se especificarán en cada sección.

5.2.2 Cromatografía en columna con sílica gel fase reversa

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad, al igual que con la sílica de fase normal. El principio de la cromatografía en fase reversa es por lo tanto semejante al de la cromatografía en fase normal, sin embargo, aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar y la retención de los compuestos en la fase estacionaria se dará en forma inversa al caso de la sílica de fase normal, es decir los compuestos con grupos funcionales polares serán eluidos primero y compuestos poco polares como los hidrocarburos serán retenidos más fuerte por la afinidad con la fase estacionaria. Para este tipo de cromatografía se emplean eluentes polares como el metanol (Reid y Sarker, 2006). Se colocaron 20 g de sílica gel en fase reversa C-18 “Waters Associates Inc.” suspendidos en 40 mL de metanol en una columna de 40 cm de largo y 2 cm de diámetro y se eluyó con metanol. Las fracciones colectadas fueron de 2 o 2.5 mL, ver figura 5.

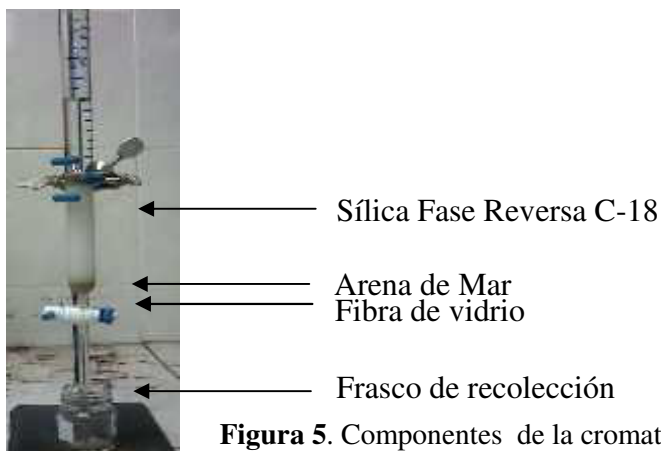


Figura 5. Componentes de la cromatografía en columna en fase reversa C₁₈

5.2.3 Cromatografía por exclusión molecular con Sephadex LH-20

La cromatografía de filtración molecular es un método de cromatografía en columna por el cual las moléculas se separan en solución según su peso o tamaño molecular. En esta cromatografía, la fase estacionaria consiste en largos polímeros entrecruzados que forman una red tridimensional porosa. A los fines prácticos, las columnas se empaquetan con pequeñas partículas esféricas formadas por polímeros entrecruzados. En consecuencia, estas partículas son porosas, y el tamaño de los poros es tal que algunas moléculas (las demasiado grandes) no podrán ingresar a esos poros, en tanto que otras (las suficientemente pequeñas) podrán pasar libremente. Los poros quedan conectados formando una malla o red, lo cual determina una serie de caminos a ser recorridos por las moléculas que acceden al interior de esta (Reid y Sarker, 2006).

El polímero utilizado en ésta investigación fue Sephadex LH-20 25-100 μm , el cual fue preparado mediante la hidroxipropilación de Sephadex G-25. Fue fabricado especialmente para la separación de productos naturales como esteroides, terpenoides y lípidos en solventes orgánicos (Ellingboe *et al.*, 1970).

Para la realización de esta técnica cromatográfica se empleó una columna de 160 cm de largo por 1.5 cm de diámetro y un aproximado de 50 g de Sephadex LH-20 como matriz cromatográfica, la cual se suspendió en 150 ml de metanol. Para la su elución se empleó metanol y se colectaron fracciones de un volumen aproximado de 5 ml hasta completar la elución total de la muestra, ver figura 6.

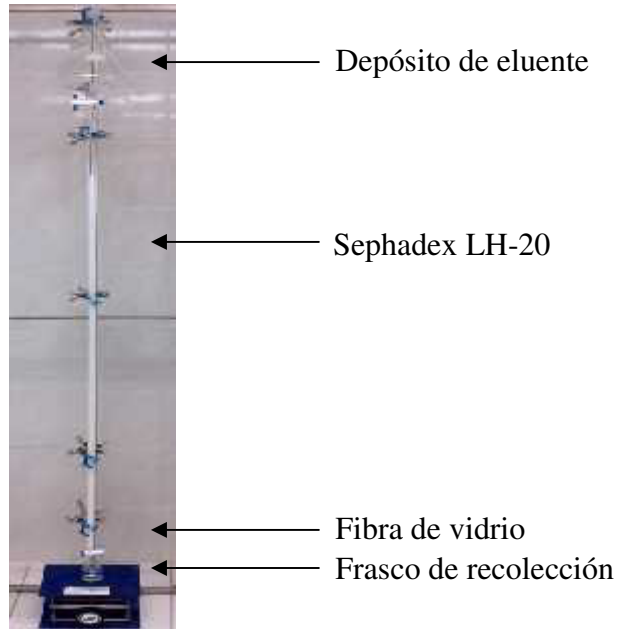


Figura 6. Cromatografía en columna de exclusión molecular Sephadex LH-20

5.2.4 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina es una técnica cualitativa que permite constatar la pureza de los componentes del extracto separados mediante la cromatografía en columna. Ésta consiste de una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica gel, la cual está mezclada con sulfato de calcio como fraguante. La mezcla a separar, disuelta en una pequeña cantidad de solvente, se coloca mediante un capilar en uno de los extremos de la cromatopla. Ésta se introduce a continuación en una cámara cromatográfica la cual contiene una cierta cantidad de la fase móvil (eluente). El eluente sube por capilaridad a través de la cromatopla lográndose la separación de los componentes de la mezcla en base al equilibrio (Dzido y Tuzimski, 2008) entre la adsorción de los componentes sobre la sílica y la solución de los mismos en el eluente (Figura 7).



Figura 7. Desarrollo de una CCF dentro de una cámara cromatográfica

Una vez terminado el proceso de separación, la cromatoplate se revela mediante una lámpara de luz ultravioleta (254 nm) o utilizando una cámara de yodo, con ambos métodos se observan como manchas los diferentes compuestos distribuidos a lo largo de la cromatoplate (Figura 8).

Para nuestra investigaciones se utilizaron cromatoplates “Merck” (Silica gel 60 F₂₅₄, 5 ×10 cm y 4 x 8 cm, 250 μm de grosor de capa) y los extractos y fracciones analizadas se colocaron utilizando un capilar de vidrio. El eluyente en la cámara cromatográfica (10 mL) fue diferente para cada análisis (se especifica en cada imagen).

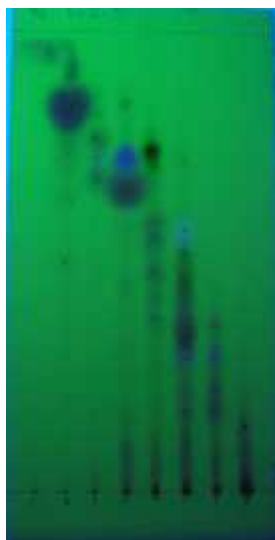


Figura 8. Cromatografía en Capa Delgada bajo luz UV (254 nm).

5.2.5 Cristalización

La cristalización es en esencia un proceso de colisión en el cual un coloide molecular tiende a formar agregados moleculares llamado núcleos, los cuales posteriormente se desarrollan en cristales con una estructura interna y una superficie externa muy características para cada uno de los productos naturales. Por el hecho de ser un proceso de colisión, influyen factores como la concentración de los compuestos y la agitación lo cual determina el grado de colisiones moleculares en solución (Cannell, 1998).

Para la realización de la técnica de cristalización se empleó metanol para solubilizar la mezcla de compuestos. Una vez que se solubilizó la muestra ésta se filtró y el filtrado se concentró hasta el grado de saturación máxima del metanol permitiendo que se evaporara el solvente a temperatura ambiente y posteriormente esta solución saturada se mantuvo en refrigeración a 4 °C.

5.3 Evaluación de la actividad amebicida

5.3.1 Preparación del medio PEHPS

Para la preparación del medio PEHPS se mezclan los componentes (ver tabla 16) en 1 L de agua desionizada y se ajusta el pH del medio a 7.0 con NaOH 10 N. Una vez preparado el medio se deposita en tubos de ensaye de 13 x 100 mm con tapón de rosca (borosilicato, Corning Co., Alemania). Finalmente el medio se esteriliza por calor, empleando una autoclave por espacio de 15 minutos a 121 °C a 15 lb de presión (Saíd-Fernández *et al.*, 1988).

| Componentes | Cantidad (g) | Componentes | Cantidad (g) |
|----------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
| Extracto de levadura | 10 | Cloruro de sodio | 3.3 |
| Peptona de caseína | 20 | Glucosa | 10 |
| Ácido ascórbico | 1 | K ₂ HPO ₄ | 1 |
| Cisteína | 1 | KH ₂ PO ₄ | 0.6 |

Tabla 16. Componentes del medio PEHPS

5.3.2 Obtención de cinética de crecimiento de *E. histolytica*

El procedimiento para determinar la curva de crecimiento se llevó a cabo por 120 h en tubos de ensaye con tapón de rosca de 13 x 100 mm, inoculando 20,000 trofozoítos de *E. histolytica* en 5 mL de medio PEHPS, al cual se le adicionó 10% de suero bovino. Posteriormente se incubaron a 36.5° C durante 120 h y cada 24 h se determinó el número de trofozoítos y se evaluaron los parámetros de crecimiento en el medio. El proceso se realizó en tres experimentos independientes por triplicado.

Una vez que se obtuvieron los datos de crecimiento se determinó el tiempo de generación haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$G = \frac{t}{3.3} \log \frac{b}{B}$$

en la cual G es el tiempo de generación, *t* significa el intervalo de tiempo de la fase exponencial, B es el número de organismos al comienzo del intervalo de tiempo y *b* es el número de organismos al final del intervalo de tiempo.

Del mismo modo, para realizar los cálculos del tiempo de duplicación se empleó la siguiente ecuación:

$$Td = 0.693 G$$

5.3.3 Preparación de los tratamientos

De cada uno de los extractos bajo estudio se preparó una solución “stock” tomando 15 mg de cada uno de éstos y depositándolos en un vial de 1.5 ml para ser disueltos en 250 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) para ayudar a la disolución se hizo uso de un vortex. Una vez disuelto totalmente el extracto se dejó en refrigeración a 4 °C por un espacio mínimo de 4 horas previo a realizar el estudio amebicida.

5.3.4 Tamizaje biológico de plantas con potencial actividad amebicida (Hernández, 2006, Mata-Cárdenas *et al.*, 2008)

Para hacer el tamizaje de las plantas en estudio con respecto a su actividad antiparásita contra *E. histolytica* se evaluó cada uno de los extractos de la siguiente manera.

Se tomaron 50 μ l de cada solución (extractos, fracciones o compuestos puros a una concentración de 150 μ g/ml) y se depositaron en viales cilíndricos de 1 mililitro de capacidad (Vial micro storage Cat. No. 2070-00001, Bellco Biotechnology, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA). A cada vial se añadieron 950 μ l de una suspensión de trofozoitos de *E. histolytica* a una concentración de 2×10^4 trofozoitos/ml en medio PEHPS adicionado con 10 % de suero bovino y a continuación se incubaron a 36 °C por

un espacio de 72 horas. Pasado el tiempo de incubación los viales se enfriaron en agua hielo por 20 minutos para finalmente determinar la cantidad de trofozitos con ayuda de un hemocitómetro. El porcentaje de inhibición se determinó en relación al crecimiento observado en el control negativo, el cual constó sólo de medio más el protozoario. Cada extracto se ensayó por triplicado en tres experimentos independientes.

5.3.5 Determinación de la concentración inhibitoria media 50 % (IC₅₀) (Hernández, 2006, Mata-Cárdenas *et al.*, 2008)

La determinación de la IC₅₀ se realizó sólo en aquellos extractos, fracciones o compuestos que presentaron un porcentaje de inhibición superior a un 50 % a la concentración de 150 µg/ml.

La realización del ensayo para determinar la IC₅₀ se realizó tomando 50 µl de cada solución (150, 75, 37.5 y 18.75 µg/ml) y se depositaron en viales cilíndricos de 1 mililitro de capacidad (Vial micro storage Cat. No. 2070-00001, Bellco Biotechnology, Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, USA). A cada vial se añadieron 950 µl de una suspensión de trofozoitos de *E. histolytica* a una concentración de 2×10^4 trofozoitos/ml en medio PEHPS adicionado con 10 % de suero bovino y a continuación se incubaron a 36 °C por un espacio de 72 horas. Pasado el tiempo de incubación los viales se enfriaron en agua hielo por 20 minutos para finalmente determinar la cantidad de trofozitos con ayuda de un hemocitómetro. Como control negativo se empleó el medio más el protozoario. Una vez recopilados los resultados se analizaron por medio del método estadístico Probit con un intervalo de confianza de 95 %.

5.4 Análisis espectroscópico

5.4.1 Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear ha sido el más importante método físico para la determinación de estructuras moleculares por más de 40 años. Los alcances de esta técnica no sólo permiten conocer el tipo de átomos en la molécula, sino que también describe el ambiente químico de cada uno de estos y lo más importante, la forma en que están interconectados. Básicamente, se trata de otra forma de espectroscopia de absorción, debido a que cuando una muestra es mantenida en un campo magnético los números del spin que son diferentes a cero son capaces de absorber energía del espectro electromagnético del rango de las radiofrecuencias (60-600 MHz). En el estudio de los productos naturales los átomos que realmente toman importancia para esta técnica son ^1H y ^{13}C . Los espectros de RMN se obtienen normalmente en soluciones del 2 al 30 %, en un disolvente aprótico (normalmente cloroformo deuterado, tetracloruro de carbono o sulfóxido de dimetilo) y un pequeño porcentaje del estándar de referencia tetrametilsilano (Silverstein *et al.*, 2005; Colegate *et al.*, 2008) ver figura 9. Para nuestras investigaciones los espectros de RMN fueron obtenidos con un instrumento Bruker DPX (^1H , 300 o 400 MHz; ^{13}C , 100 o 125 MHz).

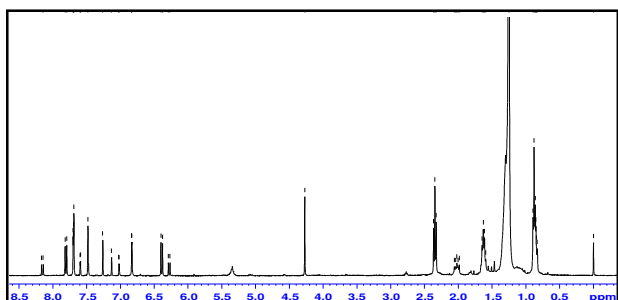


Figura 9. Espectro de ^1H -RMN.

5.4.2 Espectrometría de masas

El principio de la Espectrometría de Masas es generar iones de compuestos orgánicos por diferentes métodos y separar sus iones en base a su relación de masa/carga (m/z). Comúnmente se utilizan el método de ionización de electro impacto (EI), donde se bombardea las moléculas en fase de vapor con electrones de alta energía y posteriormente registrando los resultados en un espectro de iones positivos, los cuales han sido separados en base a m/z (Silverstein *et al.*, 2005). El uso de esta técnica se ha extendido ampliamente en la determinación estructural de los productos naturales debido a su gran sensibilidad permitiéndonos conocer datos cualitativos y cuantitativos de los compuestos que conforman un extracto orgánico.

Un estudio detallado de los espectros mediante el análisis del espectro puede obtenerse la fórmula molecular del compuesto, sin embargo la interpretación es más compleja comparada con RMN y la información de conectividad (importante para la determinación de la estructura) sólo puede obtenerse indirectamente a través de revisión cuidadosa de los fragmentos graficados en el espectro (Gross, 2004). Para nuestras investigaciones se utilizó un instrumento Bruker FTICR 4.7 T para espectros por electrospray y de alta resolución (ESI-HR).

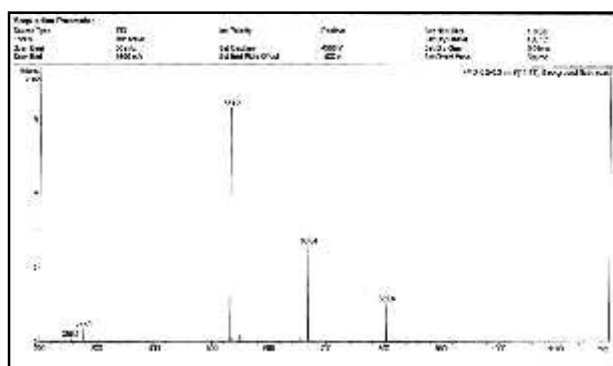


Figura 10. Espectro de (+)-ESI-MS.

5.5 Determinación de punto de fusión

El punto de fusión de un sólido, se define como la temperatura a la cual, a una temperatura dada, las fases sólidas y líquidas están en equilibrio. Ésta característica física se reporta como un intervalo de tiempo, es decir la temperatura a la cual se empieza a observar el primer indicio de fusión y la temperatura a la cual desaparece el último cristal. Por lo que la temperatura, como el intervalo de temperaturas de un punto de fusión observado son datos importantes que reflejan la pureza de una muestra, ya que el intervalo del punto de fusión debe disminuir y el punto de fusión debe aumentar, en tanto se van eliminando las impurezas en las sucesivas etapas de purificación (Pasto and Johnson, 1974)

Para la lectura del punto de fusión se empleó un equipo Electrothermal 9100 (Electrothermal Engineering Ltd., Southend on Sea, Essex, UK) y se usaron capilares sellados en los cuales se depositó la muestra para ser evaluada. Cada una de las lecturas se realizó por triplicado.

6. RESULTADOS

6.1 Colecta e identificación de las plantas bajo estudio

La colecta de las plantas *C. texana*, *G. oxyphyllum*, *G. glutinosum*, *H. inuloides*, *M. vulgare*, *P. americana*, *R. chalepensis* y *S. molle* se realizó en los municipios de Aramberri, General Mariano Escobedo y Salinas Victoria (Estado de Nuevo León, México). *Artemisia mexicana*, *C. annum*, *C. obtusifolia*, *C. genistoides*, *E. heterophyllum*, *H. brasiletto* y *M. officinalis* se obtuvieron en forma comercial con un proveedor en la zona metropolitana de la Cd. de Monterrey (Pacalli®). La identificación de los especímenes vegetales se llevó a cabo por personal del departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y fueron depositadas las muestras correspondientes en el herbario de la misma (ver tabla 17).

| Planta | No. de Vaucher | Parte colectada | Lugar de colecta* Coordenadas |
|--------------------------------|----------------|-----------------|-----------------------------------|
| <i>Artemisia mexicana</i> | 025533 | Hoja | AC |
| <i>Capsicum annuum</i> | 025536 | Fruto | AC |
| <i>Castela texana</i> | 025538 | Hojas | SV: 26°3'6.97" 100°16'54.86" |
| <i>Cecropia obtusifolia</i> | 025539 | Parte aérea | AC |
| <i>Cyclolepis genistoides</i> | 025541 | Hoja | AC |
| <i>Eryngium heterophyllum</i> | 025544 | Parte aérea | AC |
| <i>Gnaphalium oxyphyllum</i> | 025572 | Hoja | AR: 24°17'26.62" 99°56'39.76" |
| <i>Gymnosperma glutinosum</i> | 025547 | Hoja | ES: 25°48'11.43" 100°19'17.80" |
| <i>Haematoxylon brasiletto</i> | 025548 | Corteza | AC |
| <i>Heterotheca inuloides</i> | 025549 | Parte aérea | AR: 24°17'26.62" 99°56'39.76" |
| <i>Marrubium vulgare</i> | 025555 | Hoja | AR: 24°19'51.54" 99°55'37.51" |
| <i>Melissa officinalis</i> | 025557 | Hoja | AC |
| <i>Persea americana</i> | 025563 | Hoja | AR: 24°5'52.36" 99°48'38.15" |
| <i>Ruta chalepensis</i> | 025579 | Hoja | AR: 29°19'12.10" 99°54'54.49" |
| <i>Sschinus molle</i> | 025567 | Hoja | AR: 29°19'12.10" 99°54'54.49" |

Tabla 17. Características del material vegetal. *.AC, adquirido comercialmente; SV, Sabinas Victoria; ES, Escobedo; AR, Aramberri,

6.2 Parámetros de crecimiento de *E. histolytica*

Una vez recopilados los datos de los experimentos de las cinéticas de crecimiento de *E. histolytica* se calculó que el tiempo de generación es de 14.76 horas y el tiempo de duplicación es de 21.30 horas.

El tiempo de crecimiento ideal de *E. histolytica* para evaluar la actividad amebicida de los extractos, fracciones y compuestos puros se fijó en 72 horas, debido a que el

protozoario aún se encuentra en etapa de crecimiento exponencial y sostenido, disminuyendo de ésta manera falsos positivos, ver figura 11.

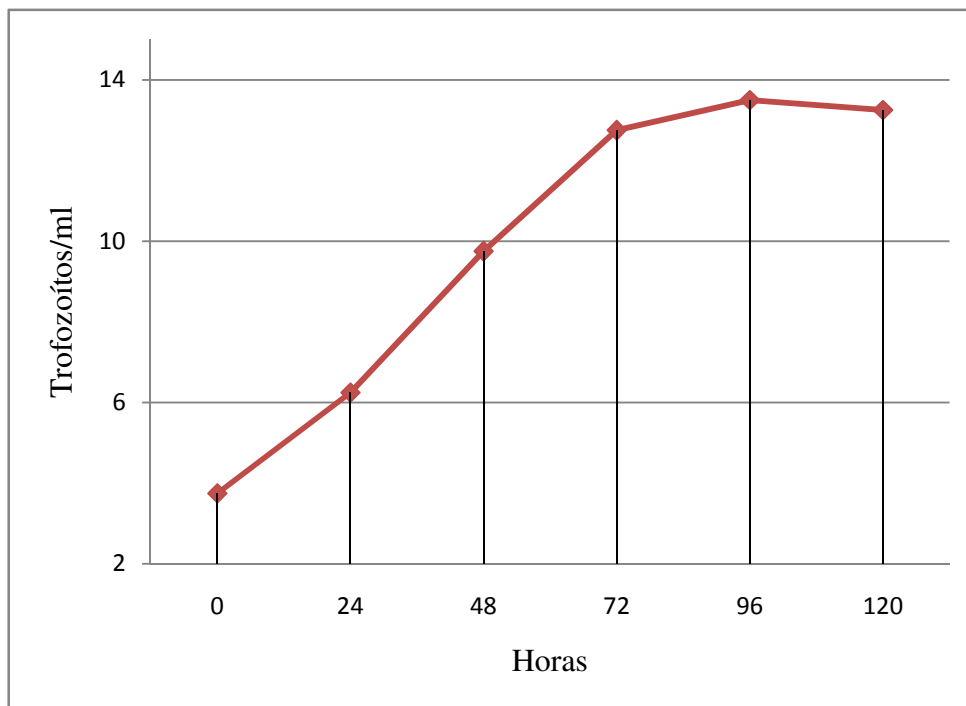


Figura 11. Gráfica de cinética de crecimiento de *E. histolytica* con 120 horas de duración.

6.3 Obtención de los extractos metanólicos y evaluación de actividad amebicida de los extractos crudos

Se realizó extracción Soxhlet durante 40 horas de cada una de las plantas bajo estudio, usando metanol como solvente de extracción. En la tabla 18 se especifica la cantidad usada de cada una de las plantas.

Una vez terminada la extracción Soxhlet se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente para después hacer una filtración simple y eliminar el solvente por medio de

un rotavapor “Büchi” R-3000. Se determinó el porcentaje extracción (Peso/Peso) para cada una de las plantas (tabla 18).

| Material vegetal | Peso seco del material vegetal (g) | Peso del extracto crudo (g) | Rendimiento (% P/P) |
|-------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| <i>A. mexicana</i> | 24 | 3.83 | 15.95 |
| <i>C. annuum</i> | 28 | 10.6 | 37.85 |
| <i>C. texana</i> | 50 | 7.00 | 14.00 |
| <i>C. obtusifolia</i> | 32 | 4.04 | 12.62 |
| <i>C. genistoides</i> | 30 | 4.95 | 16.50 |
| <i>E. heterophyllum</i> | 26 | 3.99 | 15.34 |
| <i>G. oxyphyllum</i> | 13 | 1.46 | 11.23 |
| <i>G. glutinosum</i> | 42 | 16.77 | 39.93 |
| <i>H. brasiletto</i> | 30 | 5.64 | 18.80 |
| <i>H. inuloides</i> | 14 | 2.28 | 16.28 |
| <i>M. vulgare</i> | 32 | 5.01 | 15.65 |
| <i>M. officinalis</i> | 26 | 4.67 | 17.96 |
| <i>P. americana</i> | 40 | 8.41 | 21.02 |
| <i>R. chalepensis</i> | 32 | 4.07 | 12.72 |
| <i>S. molle</i> | 45 | 7.19 | 15.97 |

Tabla 18. Peso seco y porcentaje de rendimiento del material vegetal

Posterior a la obtención de los extractos metanólicos se procedió a evaluar la actividad amebicida empleando la metodología antes descrita en la sección 5.3.4, los resultados se presentan a continuación en la tabla 19.

| Planta | Porcentaje de inhibición (150 g/ml) | IC ₅₀ (g/ml) |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| <i>A. mexicana</i> | NA* | ND** |
| <i>C. annuum</i> | 87.87 | 98.75 |
| <i>C. texana</i> | 73.82 | ND |
| <i>C. obtusifolia</i> | 29.00 | ND |
| <i>C. genistoides</i> | 73.82 | ND |
| <i>E. heterophyllum</i> | NA | ND |
| <i>G. oxyphyllum</i> | 42.15 | ND |
| <i>G. glutinosum</i> | 63.80 | ND |
| <i>H. brasiletto</i> | 84.84 | 96.38 |
| <i>H. inuloides</i> | NA | ND |
| <i>M. vulgare</i> | NA | ND |
| <i>M. officinalis</i> | 76.95 | ND |
| <i>P. americana</i> | 24.65 | ND |
| <i>R. chalepensis</i> | 90.50 | 60.07 |
| <i>S. molle</i> | 81.79 | 32.45 |

Tabla 19. Porcentaje de actividad amebicida de extractos crudos ante *E.histolytica* e IC₅₀ de los extractos crudos. * NA, sin actividad amebicida. ** ND, no determinada.

Solamente los extractos de *C. annuum*, *C. texana*, *C. genistoides*, *G. glutinosum*, *H. brasiletto*, *M. officinalis*, *R. chalepensis* y *S. molle* poseen una actividad antiprotozoaria superior a 50 % a la concentración de 150 /ml. De esta cinco plantas se seleccionó a *Ruta chalepensis*, al presentar el mayor porcentaje de inhibición con un 90.50 %, para realizar extracciones de mayor cantidad de material vegetal e iniciar un fraccionamiento biodirigido con miras a lograr el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad amebicida.

6.4 Extracción I de 60 g de *R. chalepensis* y evaluación de la actividad amebicida

Se realizó una primera extracción de *R. chalepensis* empleando 60 g de material vegetal y 600 ml de metanol como solvente de extracción. La extracción se llevó a cabo empleando un aparato Soxhlet y tuvo una duración de 40 horas. Al término del proceso de extracción y una vez que el solvente alcanzó la temperatura ambiente precipitó un sólido (S1) el cual fue filtrado antes de proceder a la eliminación del metanol por medio de un rotavapor.

Posterior a la obtención del extracto crudo metanólico de *R. chalepensis* y haber determinado los rendimientos totales del extracto (ver tabla 18) se realizó una partición con hexano y con acetato de etilo como se describe a continuación.

6.4.1 Partición del extracto metanólico I de *R. chalepensis* (Pérez-Castorena *et al.*, 2006)

La totalidad del extracto metanólico de 14.97 g se disolvió en un volumen de 200 ml de metanol para posteriormente vértelo a un embudo de separación de 500 ml. A la solución anterior se le añadieron 200 ml de hexano y se agitó vigorosamente, observándose la formación de un sólido insoluble en las paredes del embudo. Una vez que se formaron las dos fases correspondientes se procedió a separar la fase hexánica (fase superior) de la fase metanólica y por raspado se recuperó el sólido unido a las paredes del embudo (S2). Este proceso se realizó por triplicado.

Ya separadas las fases hexánica y metanólica se procedió a eliminar el solvente de la fase hexánica por medio de una destilación al vacío empleando un rotavapor para así

obtener el rendimiento. De la fase metanólica solamente se evaporó el solvente hasta obtener un volumen aproximado de 50 ml, los cuales fueron vertidos gota a gota en un vaso de precipitado de 250 ml conteniendo 150 ml de agua destilada, bajo constante agitación. La solución metanólica-acuosa se transfirió a un embudo de separación de 500 ml y se le añadieron 200 ml de acetato de etilo, se agitó vigorosamente y se esperó a que se formaran las fases de acetato de etilo (fase inferior) y la fase metanólica-acuosa para posteriormente separarlas. Este proceso se realizó por triplicado.

Posterior a la separación de la fase de acetato de etilo y la metanólica-acuosa se evaporó el solvente de la fase de acetato de etilo empleando un rotavapor y se calculó el rendimiento (ver tabla 20). La fase metanol-agua se desechó.

| Extracto I de <i>R. chalepensis</i> | Rendimiento (g) |
|--------------------------------------------|------------------------|
| Extracto metanólico | 14.97 |
| Hexánica | 1.28 |
| Acetato de etilo | 2.58 |
| S1 | 2.54 |
| S2 | 3.64 |

Tabla 20. Rendimientos de la partición con hexano y acetato de etilo del extracto metanólico I de *R. chalepensis*.

6.4.2 Evaluación de actividad amebicida del extracto metanólico I de *R. chalepensis* y sus particiones

Se evaluó la actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* del extracto metanólico, de la partición hexánica y la de acetato de etilo así como también de los sólidos S1 y S2. Se siguió la metodología que se describió con anterioridad en la sección 5.3.4 y los resultados se presentan a continuación, ver tabla 21.

| Extracto I de <i>R. chalepensis</i> | Porcentaje de inhibición a 150 g/ml (%) |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Extracto metanólico | 90.50 |
| Hexánica | 93.47 |
| Acetato de etilo | 84.82 |
| S1 | 31.00 |
| S2 | 33.46 |

Tabla 21. Porcentaje de inhibición a 150 g/ml del extracto metanólico y de las particiones hexánica y de acetato de etilo de extracción I de *R. chalepensis*.

Los resultados confirman de nuevo la actividad antiprotozoaria del extracto metanólico de *R. chalepensis*. La actividad antiprotozoaria de ambas particiones es superior al 80 % lo que significa que los compuestos con la actividad amebicida se encuentran repartidos tanto en la fase hexánica como en la de acetato de etilo. Los sólidos que fueron recuperados en el momento de la extracción y en el proceso de partición presentan una actividad amebicida menor al 50 %. Estos resultados permiten que se continúe con el fraccionamiento biodirigido de las particiones y se descarten los sólidos ya que su actividad biológica no es relevante.

6.5 Fraccionamiento cromatográfico biodirigido de la extracción I

6.5.1 Fraccionamiento cromatográfico de la partición hexánica

6.5.1.1 Columna 1

Para el fraccionamiento de la partición hexánica se empleó una cromatografía en columna con 20 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en hexano para ser empacados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. 1 g de de la partición hexánica se disolvió en una pequeña cantidad de hexano para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: *n*-hexano-cloroformo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml), cloroformo-acetato de etilo (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml). Finalmente se eluyó la columna con 50 ml de metanol para arrastrar los compuestos más polares unidos a la sílica. Se colectaron 110 fracciones de aproximadamente 10 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 8 fracciones las cuales se denominaran fracciones colectivas (FC) y se evaluó su rendimiento, ver tabla 22.

| FC | Fraciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|---------------------|------------------|
| 1 | 1-30 | 106.7 |
| 2 | 31-43 | 56.3 |
| 3 | 44-49 | 46.0 |
| 4 | 50-64 | 284.7 |
| 5 | 65-67 | 328.8 |
| 6 | 68-73 | 199.6 |
| 7 | 74-77 | 14.7 |
| 8 | 78-110 | 96.3 |

Tabla 22. Rendimiento de FC de la columna 1

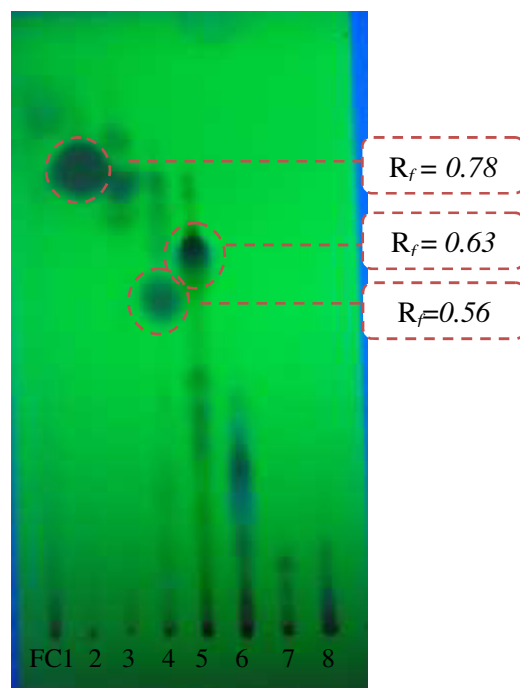


Figura 12. CCF de FC de Columna 1. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 12).

En las FC 2, 4 y 5 se detectaron compuestos con un R_f de 0.78, 0.63 y 0.56 respectivamente, los cuales se encuentran con una pureza parcial y en una concentración adecuada para continuar la purificación de los mismos.

6.5.1.2 Columna 2. Fraccionamiento cromatográfico de FC2 de la columna 1 y aislamiento de **C1**

La FC2 perteneciente a la columna 1 contiene un compuesto con un R_f de 0.78 (CHCl_3 :EtOAc 9.5:0.5) el cual se encuentra con un grado parcial de pureza, además de encontrarse en una concentración adecuada para purificar esta fracción.

Para el desarrollo de esta columna se empleó como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil 100 ml de metanol. Se aplicó la totalidad de la muestra de la FC2 de 56.3 mg. Al final del proceso cromatográfico se recuperaron 20 fracciones, de 5 ml aproximadamente. Una vez que se recuperaron las fracciones, estas fueron evaluadas por medio de CCF (figura 13) y se decidió agrupar las fracciones de acuerdo a su similitud con su R_f en 3 FC para posteriormente evaluar sus rendimientos, ver tabla 23.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-5 | 4.3 |
| 2 | 6 | 5.8 |
| 3 | 7-20 | 24.6 |

Tabla 23. Rendimientos de FC de la columna 2.

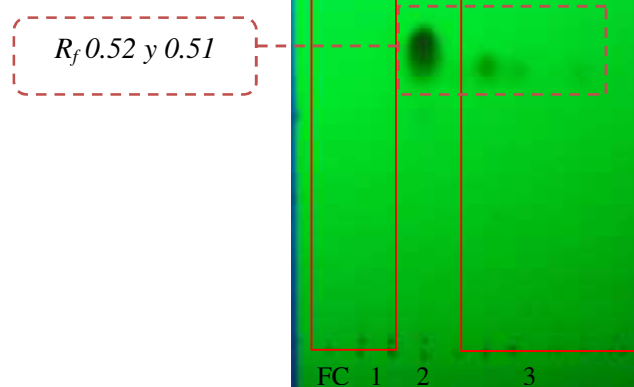


Figura 13. CCF de fracciones correspondientes a Columna 2. Eluente: CHCl_3 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

De las fracciones FC2 y FC3 de la columna 2 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.52 (CHCl_3) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo blanco amorfo, con punto de fusión de 74.82 °C) se le denomina **C1**.

6.5.1.3 Columna 3. Fraccionamiento cromatográfico de la FC4 de la columna 1 y aislamiento de **C2**

Para el fraccionamiento de la FC4 de la columna 1 se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. 284.7 mg de de la FC4 se disolvieron en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml). Se colectaron 55 fracciones de aproximadamente 10 ml cada una, las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 5 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 24.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 14).

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-9 | 2.5 |
| 2 | 10 | 21.5 |
| 3 | 11-12 | 8.5 |
| 4 | 13-15 | 9.1 |
| 5 | 16-55 | 41.3 |

Tabla 24. Rendimientos de FC de la columna 3

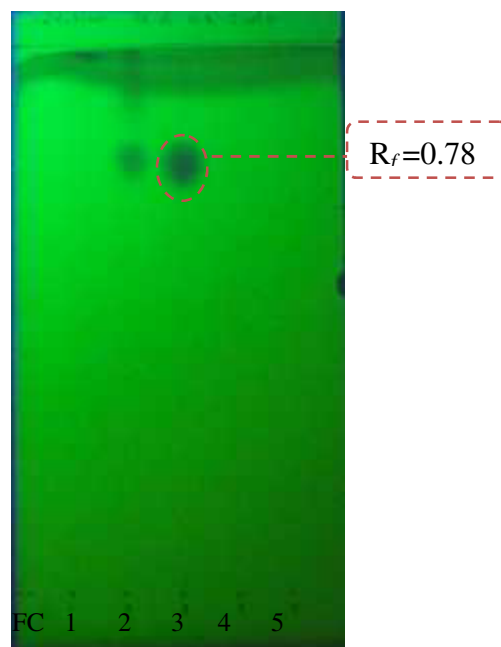


Figura 14. CCF de FC de Columna 3. Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

De la fracción FC3 de la columna 3 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.78 (CHCl_3 /EtOAc; 9.5:0.5) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo blanco amorfo, con punto de fusión de 115.73 °C) se le denomina **C2**.

6.5.1.4 Columna 4. Fraccionamiento cromatográfico de la FC5 de la columna 1

La FC5 perteneciente a la columna 1 contiene un compuesto con un R_f de 0.63 (CHCl_3 :EtOAc; 9.5:0.5) el cual se encuentra con un grado parcial de pureza, además de encontrarse en una concentración adecuada para purificar esta fracción.

Para el desarrollo de esta columna se empleó una cromatografía en columna de 160 cm de longitud empacado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito

en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 328.8 mg disueltos en metanol y se emplearon como eluente 450 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 52 fracciones, las primeras 2 fracciones se recuperaron de 100 ml aproximadamente y las restantes 5 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 5 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 25.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-14 | 160.2 |
| 2 | 15-17 | 106.0 |
| 3 | 18-22 | 6.0 |
| 4 | 23-25 | 4.7 |
| 5 | 26-52 | 4.8 |

Tabla 25. Rendimientos de FC de columna 4.

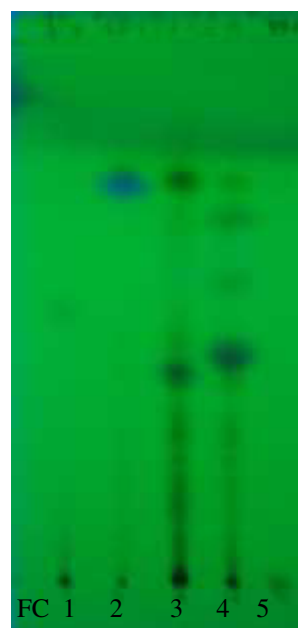


Figura 15. CCF de FC de Columna 4.
Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 15).

Debido a que la fracción FC2 posee un compuesto principal con un R_f de 0.74 a una concentración y una pureza parcial adecuada, se decidió someter dicha fracción a una columna cromatográfica adicional.

6.5.1.5 Columna 5. Fraccionamiento cromatográfico de la FC2 de la columna 4 y aislamiento de **C3**

Para el desarrollo de esta columna se empleó una cromatografía en columna de 160 cm de longitud empaquetado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 106.0 mg disueltos en metanol y se empleó como eluente 350 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 41 fracciones, la primer fracción se recuperó de 150 ml aproximadamente y las restantes de 5 ml aproximadamente, las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 26.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-14 | 20.0 |
| 2 | 15-17 | 75.3 |
| 3 | 18-41 | 4.0 |

Tabla 26. Rendimientos de FC de columna 5

Figura 16. CCF de FC de columna 5.
Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm



Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 16).

De la fracción FC2 de la columna 5 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.90 (CHCl₃/EtOAc 9.5:0.5) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (resina, con punto de fusión de 101.98 °C y una IC₅₀ de 67.71 µg/ml) se le denomina **C3**.

6.5.2 Fraccionamiento cromatográfico de la partición de acetato de etilo I.

6.5.2.1 Columna 6 y 7

Para el fraccionamiento de la partición de acetato de etilo primeramente la muestra se dividió en 2 porciones, la primera de 1 g (Columna 6) y la segunda de 1.5 g (Columna 7) para así lograr una mejor separación cromatográfica. Ambas columnas se realizaron bajo las mismas condiciones. Se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La partición de acetato de etilo se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml), acetato de etilo-metanol (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml). Se colectaron 105 fracciones de aproximadamente 10 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 10 FC para cada columna, ver tabla 27 y 28.

| FC | Rendimiento (mg) |
|----|------------------|
| 1 | 15.6 |
| 2 | 29.3 |
| 3 | 121.2 |
| 4 | 67.3 |
| 5 | 164.3 |
| 6 | 31.2 |
| 7 | 26.6 |
| 8 | 41.5 |
| 9 | 39.3 |
| 10 | 333.8 |

Tabla 27. Rendimientos de FC de columna 6.

| FC | Rendimiento (mg) |
|----|------------------|
| 1 | 28.3 |
| 2 | 35.6 |
| 3 | 181.9 |
| 4 | 141.9 |
| 5 | 84.2 |
| 6 | 47.3 |
| 7 | 43.3 |
| 8 | 67.7 |
| 9 | 52.0 |
| 10 | 546.3 |

Tabla 28. Rendimientos de FC de columna 7.

Posterior a obtener los rendimientos en ambas columnas se realizó una CCF de las FC, para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 17 y 18).

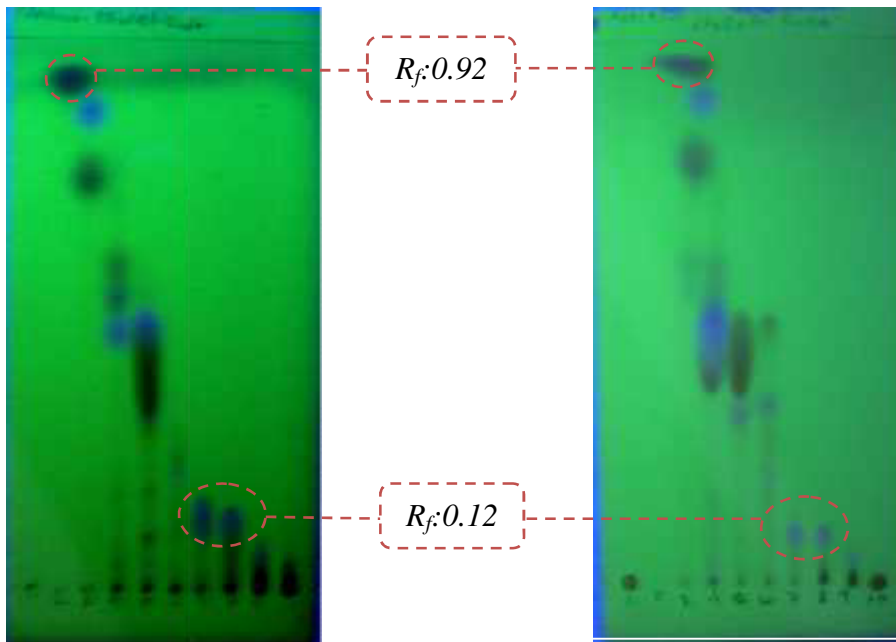


Figura 17. CCF de FC de la columna 6. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (8:2; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Figura 18. CCF de FC de la columna 7. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (8:2; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Al evaluar los resultados de las CCF realizadas tanto a la columna 6 como a la columna 7 se decidió mezclar las 2 FC2 ya que poseen un compuesto de R_f de 0.92 el cual se encuentra en una concentración y pureza aceptable para una posterior purificación. Además se decidió juntar las fracciones FC7 y FC8 de ambas columnas en una sola fracción ya que en las 4 fracciones está presente un compuesto con R_f de 0.12, el cual como en el caso anterior se encuentra en una concentración y pureza adecuada para un posterior fraccionamiento cromatográfico con la finalidad de purificar los compuestos mayoritarios de estas fracciones.

6.5.2.2 Columna 8. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de las columnas 6 y 7. Obtención de **C4**

La mezcla de las FC2 de las columnas 6 y 7 se sometió a un proceso cromatográfico debido a que el compuesto mayoritario presente en la misma se encuentra con un grado de pureza aceptable. Para el desarrollo de esta columna se empleó una cromatografía en columna de 160 cm de longitud empacado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicaron 64.9 mg disueltos en metanol y se empleó como eluente 100 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 20 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una de las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 29.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-5 | 1.6 |
| 2 | 6-9 | 54.1 |
| 3 | 10-20 | 9.2 |

Tabla 29. Rendimiento de FC de la columna 8.

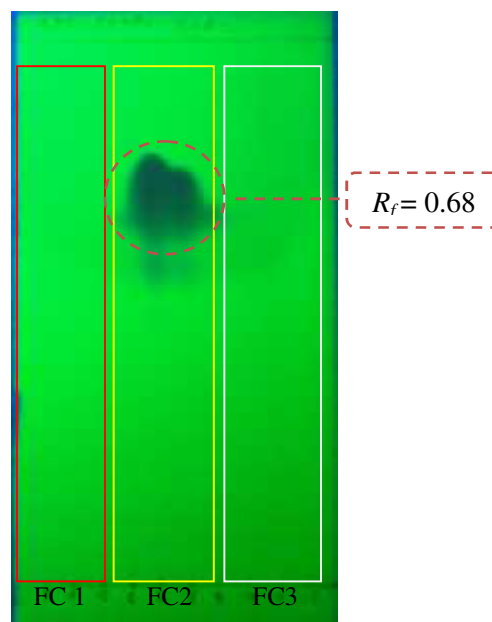


Figura 19. CCF donde se muestra las regiones que comprenden cada una de las FC de la columna 8. Eluyente: CHCl_3 (10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

En este caso no se realizó un CCF de las FC, sin embargo en la figura 19 es posible observar la distribución de los compuestos en varias de las fracciones individuales obtenidas y el R_f del compuesto principal.

De la fracción FC2 de la columna 8 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.68 (CHCl_3) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo blanco, con punto de fusión de 87.37 °C) se le denomina **C4**.

En análisis posteriores se determinó que el compuesto aislado de la fracción FC2 de la columna 8 identificado como **C4** es el mismo compuesto identificado anteriormente como **C1**; esta conclusión surgió al comparar los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN de ambos compuestos, observando que presentan señales similares con el mismo desplazamiento químico.

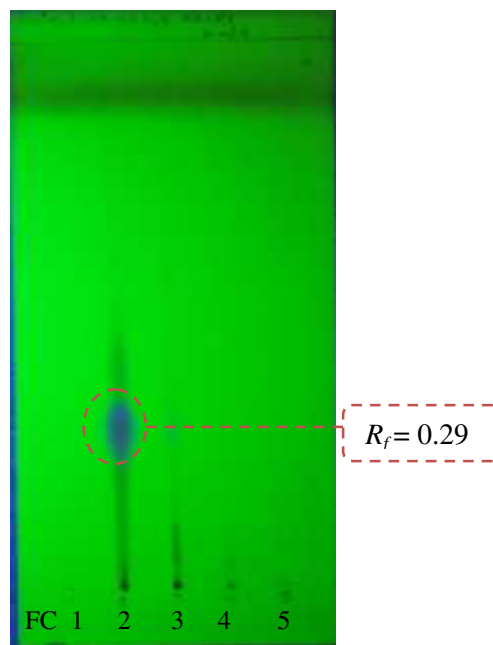
6.5.2.3 Columna 9. Fraccionamiento cromatográfico de las fracciones 7 y 8 de las columnas 6 y 7. Obtención de **C5**.

La mezcla conformada por las fracciones FC7 y FC8 tanto de la columna 6 como de la columna 7, se sometieron a un fraccionamiento cromatográfico con el fin de purificar el compuesto principal con R_f de 0.12 (CHCl_3 :EtOAc; 8:2) presente en las 4 fracciones. Para el fraccionamiento de esta fracción se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel fase reversa, los cuales se suspendieron en metanol para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.5. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 179.1 mg los cuales se disolvieron en metanol para ser aplicados en la columna y se empleó como eluyente 100 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 50 fracciones de 2 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 5 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 30.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-6 | 5.7 |
| 2 | 7-13 | 126.5 |
| 3 | 14-19 | 15.9 |
| 4 | 20-30 | 3.7 |
| 5 | 31-50 | 2.8 |

Tabla 30. Rendimientos de FC de la columna 9.

Figura 20. CCF de FC de la columna 9. Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (1:1; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.



Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 20).

De la fracción FC2 de la columna 9 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.29 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 1:1) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 167.82 °C) se le denomina **C5**.

6.6 Extracción II de 600 g de *R. chalepensis* y evaluación de la actividad amebicida

Se realizó una segunda extracción de *R. chalepensis* empleando 600 g de material vegetal y 12 L de metanol como solvente de extracción. La extracción se llevó a cabo depositando el material vegetal en porciones de 30 g en un extractor Soxhlet con 600 ml de metanol y tuvo una duración de 40 horas este procedimiento se repitió en cada una de las 20 extracciones realizadas. Al término del proceso de extracción y una vez que el solvente alcanzó la temperatura ambiente precipitó un sólido (S1) el cual fue filtrado antes de proceder a la eliminación del metanol por medio de un rotavapor.

Posterior a la obtención del extracto crudo metanólico de *R. chalepensis* y haber determinado los rendimientos totales del extracto se realizó una partición con hexano y con acetato de etilo como se describe a continuación.

6.6.1 Partición del extracto metanólico II de *R. chalepensis* (Pérez-Castorena *et al.*, 2006)

La totalidad del extracto metanólico de 124.0 g se dividió en 5 porciones para ser trabajado con mayor facilidad. Cada porción de 24.8 g se disolvió en un volumen de 200 ml de metanol para posteriormente vértelo a un embudo de separación de 500 ml. A la solución anterior se le añadieron 200 ml de hexano y se agitó vigorosamente, observándose la formación de un sólido insoluble en las paredes del embudo. Una vez que se formaron las dos fases correspondientes se procedió a separar la fase hexánica (fase superior) de la fase metanólica. Este proceso se realizó por triplicado.

Ya separadas las fases hexánica y metanólica se procedió a eliminar el solvente de la fase hexánica por medio de una destilación al vacío empleando un rotavapor para así obtener el rendimiento. De la fase metanólica solamente se evaporó el solvente hasta obtener un volumen aproximado de 50 ml, los cuales fueron vertidos gota a gota en un vaso de precipitado de 250 ml conteniendo 150 ml de agua destilada, bajo constante agitación. La solución metanólica-acuosa se transfirió a un embudo de separación de 500 ml y se le añadieron 200 ml de acetato de etilo, se agitó vigorosamente y se esperó a que se formaran las fases de acetato de etilo (fase inferior) y la fase metanólica-acuosa para posteriormente separarlas. Este proceso se realizó por triplicado.

Posterior a la separación de la fase de acetato de etilo y la metanólica-acuosa se evaporó el solvente de la fase de acetato de etilo empleando un rotavapor y se calculó el rendimiento. La fase metanol-agua se desechó.

Una vez que se realizó la partición a la totalidad del extracto metanólico se procedió a juntar las particiones obtenidas con sus similares así como sus subproductos. Finalmente se calculó el rendimiento total , ver tabla 31.

| Extracto II de <i>R. chalepensis</i> | Rendimiento (g) |
|---------------------------------------------|------------------------|
| Metanólica | 124.00 |
| Hexánica | 8.20 |
| Acetato de etilo | 20.00 |
| Sólido | 24.00 |

Tabla 31. Rendimiento del extracto metanólico y las particiones hexánica y de acetato de etilo de la extracción II de *R. chalepensis*

Posteriormente se evaluó la actividad antiprotozoaria exhibida contra trofozoitos de *E. histolytica* por parte del extracto crudo y de sus particiones, ver tabla 32.

| Extracto II de <i>R. chalepensis</i> | Porcentaje de inhibición a 150 g/ml (%) |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Metanólica | 42.33 |
| Hexánica | 84.66 |
| Acetato de etilo | 83.93 |
| Sólido | NA* |

Tabla 32. Porcentaje de inhibición a 150 g/ml del extracto metanólico y de las particiones hexánica y de acetato de etilo de la extracción II de *R. chalepensis*

6.7 Fraccionamiento cromatográfico biodirigido de la extracción II

6.7.1 Fraccionamiento cromatográfico de la partición hexánica del extracto II y evaluación de actividad amebicida de las fracciones obtenidas.

6.7.1.1 Columnas 10 a 16

Debido a que anteriormente ya se han aislado compuestos como **C1**, **C2**, **C3** de la partición hexánica de *R. chalepensis*, el objetivo de este nuevo fraccionamiento es aislar nuevamente los compuestos ya antes mencionados para confirmar su actividad amebicida y continuar con la búsqueda de más compuestos que presenten actividad inhibitoria contra *E. histolytica*.

Los 8.20 g de la partición hexánica se repartieron en 7 columnas cromatográficas las cuales se realizaron de manera similar, siguiendo las siguientes especificaciones.

Se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en hexano para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra que se aplicó varió en cada una de las columnas de la siguiente forma: columna 10 (1.250 g), columna 11 (1.210 g), columna 12 (1.150 g), columna 13 (1.150 g), columna 14 (1.220 g), columna 15 (1.300 g) y la columna 16 (0.800 g). Para aplicar la muestra en la columna se disolvió en una pequeña cantidad de hexano y la elución se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: *n*-hexano-cloroformo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml), cloroformo-acetato de etilo (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml).

Finalmente se eluyó la columna con 50 ml de metanol para arrastrar los compuestos más polares unidos a la sílica. Se colectaron 110 fracciones de aproximadamente 10 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 8 FC para cada columna y se evaluó su rendimiento. Posteriormente, en base a las CCF de las FC de cada columna se agruparon dichas fracciones con sus similares en el R_f , de lo cual se obtuvieron los siguientes rendimientos totales, ver tabla 33. Cabe mencionar que las 7 columnas se corrieron en condiciones similares, por lo tanto el patrón de elución fue el mismo.

| FC | FC mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|--------------|------------------|
| 1 | 1-22 | 327.6 |
| 2 | 23-30 | 1197.1 |
| 3 | 31-34 | 209.0 |
| 4 | 35-43 | 1184.4 |
| 5 | 44-49 | 700.7 |
| 6 | 50-55 | 648.9 |
| 7 | 56-61 | 493.5 |
| 8 | 62-110 | 1134.0 |

Tabla 33. Rendimientos de FC de las columnas 10-16 y de la partición hexánica de la extracción II.

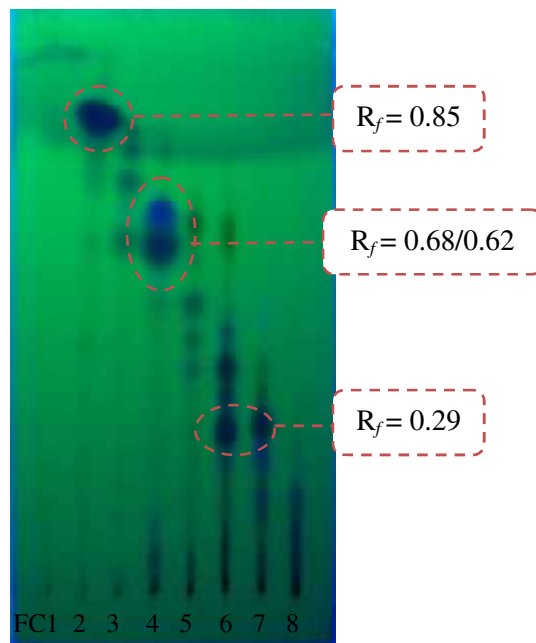


Figura 21. CCF de FC de partición hexánica II. Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 21).

Se evaluó la actividad amebicida de cada una de las FC que se obtuvieron de la partición hexánica. La evaluación de la actividad biológica de las FC se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.2.4. A continuación se muestran los resultados obtenidos del tamizaje biológico, ver tabla 34.

| FC | Porcentaje de inhibición a 150 g/ml |
|----|----------------------------------------|
| 1 | 12.13 |
| 2 | 93.50 |
| 3 | 88.26 |
| 4 | 89.87 |
| 5 | 88.47 |
| 6 | 92.05 |
| 7 | 91.69 |
| 8 | 91.07 |

Tabla 34. Porcentaje de inhibición de FC de partición hexánica II en trofozoítos de *E. histolytica* a 150 g/ml.

Para continuar con el aislamiento de compuestos bioactivos se seleccionó las FC2, FC4, FC6 y FC7 las cuales poseen un porcentaje de inhibición alto (ver tabla 33) y presentan un compuesto principal en CCF (ver figura 21).

6.7.1.2 Columna 17. Fraccionamiento cromatográfico FC2 de la partición hexánica II

Se decidió purificar la fracción FC2 de la partición hexánica ya que es una de las fracciones con mayor actividad inhibitoria de la misma y contiene un compuesto principal en una concentración satisfactoria con un R_f de 0.85 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 9.5:0.5) posiblemente responsable de la actividad antiprotozoaria de esta fracción. Para el fraccionamiento de la FC2 de la partición hexánica II se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser

empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. 1.197 g de la FC2 se disolvieron en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicados en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30 v/v; cada uno de 50 ml). Finalmente se eluyó la columna con 50 ml de metanol. Se colectaron 50 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 5 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 35.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-10 | 14.7 |
| 2 | 11-19 | 456.0 |
| 3 | 20-29 | 465.9 |
| 4 | 30-40 | 67.2 |
| 5 | 41-50 | 42.2 |

Tabla 35. Rendimientos de FC de la columna 17.

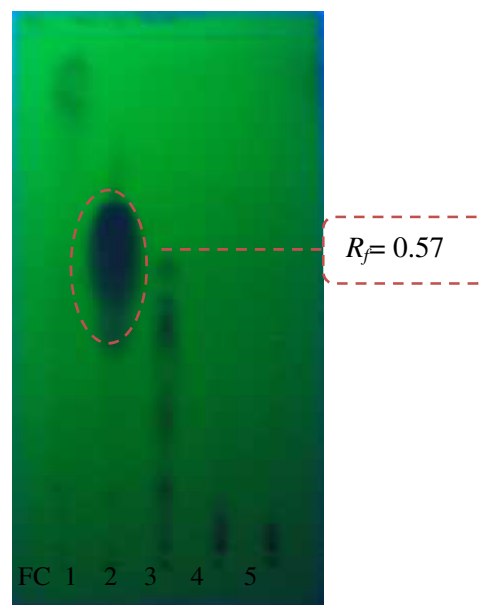


Figura 22. CCF de FC de la columna 17. Eluyente: hexano:cloroformo (3:7; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 22).

En la FC2 de la columna 17 está presente un compuesto principal con un $R_f = 0.57$, el cual tentativamente se considera como responsable de la actividad amebicida. Por lo tanto se realizó una purificación adicional a dicha fracción y así evaluar su actividad amebicida.

6.7.1.3 Columna 18. Fraccionamiento cromatográfico de FC2 de la columna 17 y aislamiento de **C6**

Se decidió purificar la fracción FC2 de la columna 17 ya que esta fracción contiene un compuesto principal con un R_f de 0.57 (hexano/cloroformo 3:7) responsable de la actividad amebicida debido a que es el compuesto más abundante. Para el fraccionamiento de la FC2 de la columna 17 se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 456 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, v/v; la primera elución fue de un volumen de 200 ml y la segunda de 50 ml). Se colectaron 50 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 36.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-11 | 17.0 |
| 2 | 12-17 | 243.2 |
| 3 | 18-44 | 92.3 |
| 4 | 45-50 | 17.8 |

Tabla 36. Rendimientos de FC de la columna 18.

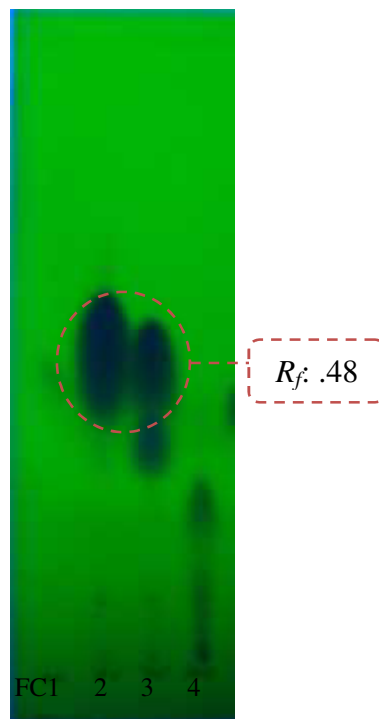


Figura 23 CCF de FC de la columna 18. Eluente: hexano:cloroformo (3:7; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 23).

De la fracción FC2 de la columna 18 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.48 (hexano/ CHCl_3 3:7) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 74.82 °C y una IC_{50} de 45.95 $\mu\text{g/ml}$) se le denomina **C6**.

Mediante el análisis posterior de los espectros de ^1H y ^{13}C -RMN se dedujo que compuesto **C6** es similar al compuesto previamente aislado en la sección 6.5.1.1 identificado como **C1**.

La fracción FC3 de la presente columna, posee una cantidad considerable del compuesto **C6** por lo que se fraccionó para recuperar una mayor cantidad de dicho compuesto.

6.7.1.4 Columna 19. Fraccionamiento cromatográfico de FC3 de la columna 18

Se fraccionó la FC3 con el fin de enriquecer la cantidad del compuesto **C6** el cual es abundante en esta fracción. Para el fraccionamiento de la FC3 de la columna 18 se empleó una cromatografía en columna con 20 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 92.3 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, v/v; la primera elución fue de un volumen de 150 ml y la segunda de 100 ml). Finalmente se eluyó la columna con 50 ml de metanol para arrastrar los compuestos más polares unidos a la sílica. Se colectaron 60 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 37.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 24).

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-27 | 36.9 |
| 2 | 28-47 | 24.3 |
| 3 | 48-60 | 7.6 |

Tabla 37. Rendimientos de FC de la columna 19.

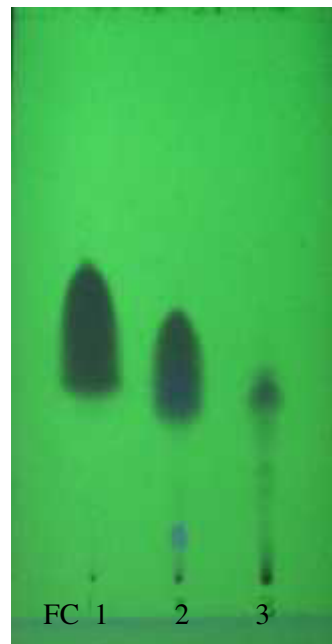


Figura 24. CCF de FC de la columna 19. Eluente: hexano:cloroformo (3:7; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

La fracción FC1 contiene el compuesto **C6** con un alto porcentaje de pureza.

6.7.1.5 Columna 20. Fraccionamiento cromatográfico de la FC4 de la partición hexánica II

La fracción FC4 de la partición hexánica es la segunda fracción que contiene dos compuestos principales ($R_f = 0.68$ y 0.62 en $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$ 9.5:0.5) responsables de la actividad amebicida de esta fracción. Por esta razón se continuó con el fraccionamiento cromatográfico de dicha fracción. Para el fraccionamiento de la FC4 de la partición hexánica II se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 1184.4 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la

columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml). Se colectaron 90 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 38.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-17 | 719 |
| 2 | 18-40 | 171.1 |
| 3 | 41-90 | 102.1 |

Tabla 38. Rendimientos de FC de la columna 20.

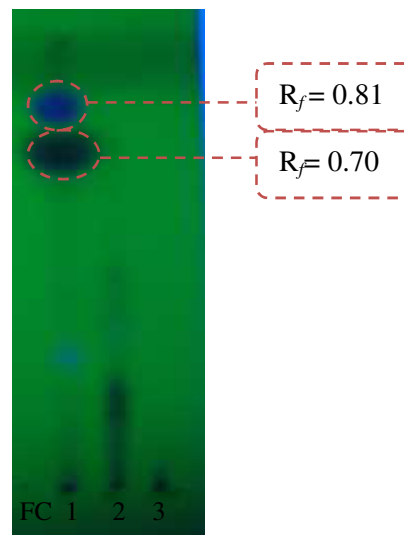


Figura 25. CCF de FC de la columna 20. Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (9:1; 8 ml). Revelado: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 25).

Como se puede observar en la figura 25, la fracción FC1 de la columna 20 contiene 2 compuestos en buena concentración y por lo tanto responsables de la actividad amebicida de la fracción FC4 de la partición hexánica II.

6.7.1.6 Columna 21. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC1 de la columna 20 y aislamiento de C7.

La fracción FC1 de la columna 20 es la fracción que contiene dos compuestos principales ($R_f = 0.81$ y 0.70 en $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$) responsables de la actividad amebicida de esta fracción. Por esta razón se continuó con el fraccionamiento cromatográfico de dicha fracción. Para el fraccionamiento de la FC1 de la columna 20 se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 719 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 0:100 v/v; la primer elución fue de un volumen de 120 ml, la segunda elución fue de 100 ml y la última elución se realizó de 50 ml). Finalmente se emplearon 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la silica. Se colectaron 64 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 39.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 26).

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-19 | 6.9 |
| 2 | 20-26 | 73.8 |
| 3 | 27-32 | 438.1 |
| 4 | 33-64 | 123.6 |

Tabla 39. Rendimientos de FC de la columna 21.

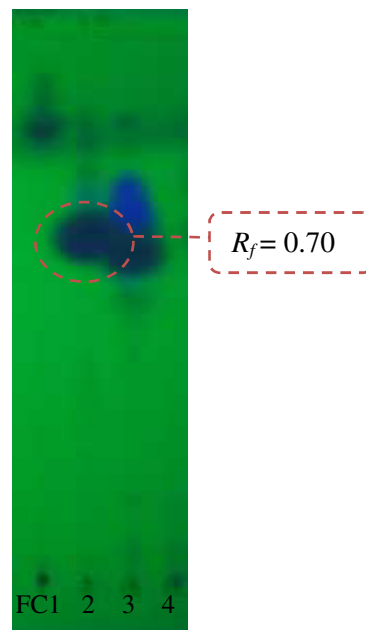


Figura 26. CCF de FC de la columna 21. Eluyente: CHCl₃:EtOAc (9.5:0.5; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

De la fracción FC2 de la columna 21 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.70 (CHCl₃:EtOAc 9.5:0.5) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 115.73 °C) se le denomina **C7**.

Mediante el análisis posterior de los espectros de ¹H y ¹³C-RMN se dedujo que el compuesto **C7** es similar al compuesto previamente aislado en la sección 6.5.1.2 identificado como **C2**.

La fracción FC3 de la presente columna, posee una cantidad considerable del compuesto **C7** por lo que se fraccionó para recuperar una mayor cantidad de dicho compuesto.

6.7.1.7 Columna 22. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna 20

Con el afán de enriquecer la cantidad de **C7** se decidió someter a un fraccionamiento cromatográfico a la fracción FC3 de la columna 21 la cual contiene una abundante concentración del mismo **C7** junto con otros compuestos que son considerados impurezas.

Para el fraccionamiento de la FC3 de la columna 21 se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 438.1 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 0:100 v/v; la primer elución fue de un volumen de 250 ml y la segunda elución fue de 30 ml). Finalmente se emplearon 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la sílica. Se colectaron 66 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 40.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 27).

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-17 | 4.0 |
| 2 | 18-34 | 204.9 |
| 3 | 35-66 | 192.1 |

Tabla 40. Rendimientos de FC de la columna 22.

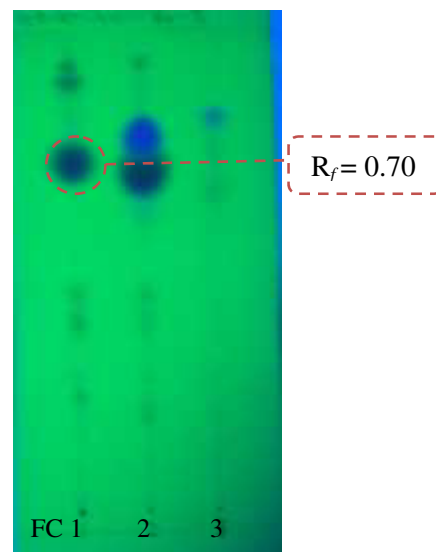


Figura 27. CCF de FC de la columna 22. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

En la FC1 de la presente columna se confirma el aislamiento del compuesto **C7** junto a un cierto grupo de impurezas. Sin embargo en la fracción FC2 aun se encuentra con una presencia importante del compuesto **C7** ($R_f = 0.70$, CHCl_3 :EtOAc 9.5:0.5) por lo que se consideró realizar nuevamente una cromatografía en columna para intentar enriquecer aun más el compuesto **C7** y su compuesto acompañante con un $R_f = 0.81$.

6.7.1.8 Columna 23. Fraccionamiento cromatográfico de la FC2 de la columna 22

Con el afán de enriquecer la cantidad de **C7** se decidió someter a un fraccionamiento cromatográfico a la fracción FC2 de la columna 22 la cual contiene aun una abundante concentración del compuesto **C7**. Para el fraccionamiento de la FC2 de la columna 22 se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento

descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 204.9 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 99:01, 95:05, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40 v/v; con un volumen de elusión de 50 ml). Finalmente se emplearon 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la sílica. Se colectaron 90 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 41.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-26 | 19.0 |
| 2 | 27-31 | 23.4 |
| 3 | 32-39 | 143.8 |
| 4 | 40-90 | 11.4 |

Tabla 41. Rendimientos de FC de la columna 23.

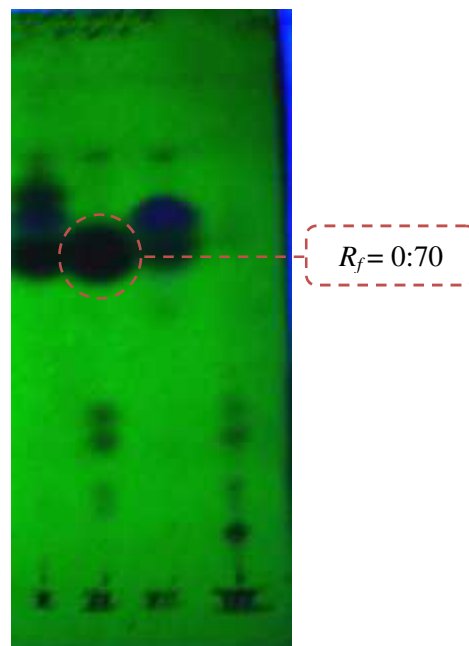


Figura 28. CCF de FC de la columna 23. Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 28).

En la fracción FC2 se logró obtener el compuesto **C7** con un mayor grado de pureza solamente que con la presencia de algunos compuestos mas polares pero en una cantidad inferior al compuesto principal.

6.7.1.9 Columna 24. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC6 de la partición hexánica I y de las fracciones FC6 y FC7 de la partición hexánica-II

Debido a que las fracciones FC6 y FC7 de la partición de hexano-II y la fracción FC6 de la partición de hexano mostraron en CCF la presencia de dos compuestos principales con un R_f de 0.31 y 0.27 (CHCl_3 :EtOAc; 9.5:0.5) así como también similitud en el porcentaje de inhibición ante los trofozoítos de *E. histolytica* se decidió juntar las 3 fracciones para intentar una separación cromatográfica de estos compuestos. La unión de las tres fracciones antes descritas suma un peso de 1.342 g.

Para el fraccionamiento de la mezcla formada anteriormente se empleó una cromatografía en columna con 20 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 1342 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; con un volumen de elusión de 50 ml). Finalmente se emplearon 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la sílica. Se colectaron 120 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de

acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 42.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-15 | 387.6 |
| 2 | 16-27 | 335.9 |
| 3 | 28-120 | 509.9 |

Tabla 42. Rendimientos de FC de la columna 24.

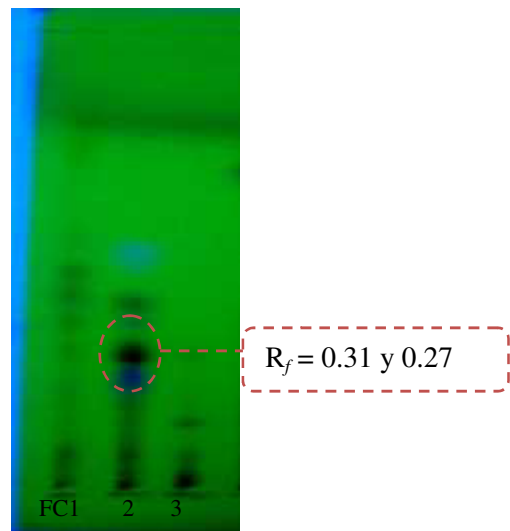


Figura 29. CCF de FC de la columna 24. Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 29).

Se observa que la fracción FC2 de la presente columna contiene los compuestos de interés, por lo tanto se decidió someter a un fraccionamiento cromatográfico adicional a dicha fracción.

6.7.1.10. Columna 25. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 24.

Para el fraccionamiento de la fracción FC2 de la columna 24 se empleó una cromatografía en columna con 20 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en

cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 335.9 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 v/v; cada uno de 50 ml). Finalmente se emplearon 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la sílica. Se colectaron 70 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 43.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-13 | 13.0 |
| 2 | 14-22 | 179.0 |
| 3 | 23-70 | 77.9 |

Tabla 43. Rendimientos de FC de la columna 25.

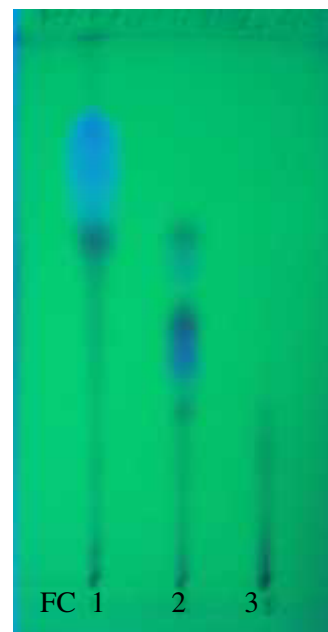


Figura 30. CCF de FC de la columna 25. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 30).

Debido a que los rendimientos de las FC de la columna 25 son limitados se decidió desistir en un fraccionamiento cromatográfico adicional debido a que las fracciones aún son mezclas muy complejas.

6:7.2 Fraccionamiento cromatográfico de la partición de acetato de etilo del extracto II y evaluación de la actividad amebicida.

6.7.2.1 Columnas 26-35

El total del peso de la partición de acetato de etilo la cual consistía de un peso de 20 g, se repartió en 10 columnas cromatográficas (estas 10 columnas cromatográficas corresponden de la columna 26 a la columna 35) con un peso que varió de columna en columna como se muestra a continuación: columna 26 (1.25 g), columna 27 (1.15 g), columna 28 (1.20 g), columna 29 (1.30 g), columna 30 (1.30 g), columna 31 (1.25 g), columna 32 (1.23 g), columna 33 (1.35 g), columna 34 (1.31 g) y la columna 35 (7.50 g). El procedimiento para el fraccionamiento cromatográfico de la columna 26 a la columna 34 se realizó de manera similar, se empleó una cromatografía en columna con 20 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito previamente en la sección 5.1.4. La muestra empleada para cada procedimiento cromatográfico se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml), acetato de etilo-metanol (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 v/v, cada uno de 50 ml).

Finalmente se eluyó la columna con 50 ml de metanol para arrastrar los compuestos más polares unidos a la sílica. Se colectaron 85 fracciones de aproximadamente 10 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 8 fracciones las cuales se denominaron fracciones colectivas (FC) y se evaluó su rendimiento.

Solamente en el caso de la columna número 35 se modificó la metodología para emplear una columna cromatográfica que soportara una cantidad mayor de muestra y que al mismo tiempo permitiera una buena separación de los compuestos, a continuación se describe el procedimiento que se siguió para la realización de la columna número 35.

Para la columna 35 se empleó una cromatografía en columna de 160 cm de largo con 200 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en la mínima cantidad de cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 7 g se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 v/v; cada gradiente de 450 ml). Finalmente se emplearon 450 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la sílica. Se colectaron 315 fracciones de aproximadamente 10 ml cada una. Una vez que se analizó cada columna por separado se procedió a juntar las FC con sus homologas o con aquellas FC que posean compuestos con R_f similar para así conformar las FC de la partición de acetato de etilo de la extracción II. A continuación se muestran los rendimientos de las FC de la partición de acetato de etilo II, ver tabla 44.

| FC | FC mezclas | Rendimiento (mg) |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 1 | $C_{27}FC_1 + C_{28}FC_1 + C_{29}FC_1 + C_{30}FC_1 + C_{31}FC_1$ | 24.0 |
| 2 | $C_{27}FC_2 + C_{28}FC_2 + C_{29}FC_2 + C_{30}FC_2 + C_{31}FC_2 + C_{32}FC_1 + C_{33}FC_1 + C_{34}FC_1 + C_{35}FC_1$ | 460.0 |
| 3 | $C_{26}FC_{1,2} + C_{27}FC_3 + C_{28}FC_3 + C_{29}FC_3 + C_{30}FC_3 + C_{31}FC_3 + C_{32}FC_2 + C_{33}FC_2 + C_{34}FC_3 + C_{35}FC_2$ | 1251.5 |
| 4 | $C_{27}FC_4 + C_{28}FC_4 + C_{29}FC_4 + C_{30}FC_4 + C_{31}FC_4 + C_{33}FC_3 + C_{34}FC_4 + C_{35}FC_3$ | 266.7 |
| 5 | $C_{26}FC_3 + C_{27}FC_5 + C_{28}FC_5 + C_{29}FC_5 + C_{30}FC_5 + C_{31}FC_5 + C_{32}FC_3 + C_{33}FC_{4,5} + C_{34}FC_5 + C_{35}FC_4$ | 2379.1 |
| 6 | $C_{27}FC_6 + C_{28}FC_6 + C_{29}FC_6 + C_{30}FC_6 + C_{31}FC_6 + C_{32}FC_4 + C_{33}FC_6 + C_{34}FC_6 + C_{35}FC_5$ | 707.3 |
| 7 | $C_{26}FC_4 + C_{27}FC_7 + C_{28}FC_7 + C_{29}FC_7 + C_{30}FC_7 + C_{31}FC_7$ | 146.8 |
| 8 | $C_{26}FC_5 + C_{27}FC_8 + C_{28}FC_8 + C_{29}FC_8 + C_{30}FC_8 + C_{31}FC_8 + C_{32}FC_5 + C_{33}FC_7 + C_{34}FC_7 + C_{35}FC_6$ | 648.2 |
| 9 | $C_{26}FC_6 + C_{27}FC_9 + C_{28}FC_9 + C_{29}FC_9 + C_{30}FC_9 + C_{31}FC_9 + C_{32}FC_{6,7} + C_{33}FC_{8,9} + C_{34}FC_{8,9} + C_{35}FC_{7,8}$ | 9350.9 |

Tabla 44. Rendimientos de FC de la partición de acetato de etilo de la extracción II.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 31).

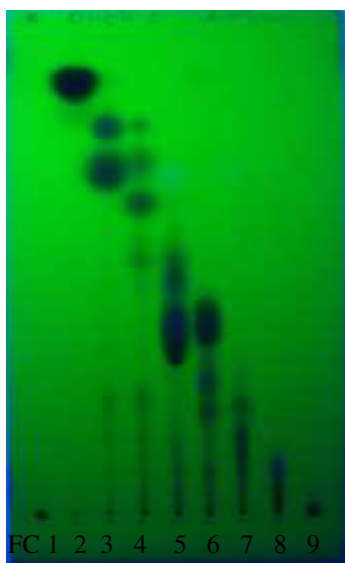


Figura 31. CCF de FC de la partición de acetato de etilo II. Eluente: $CHCl_3$:EtOAc (9:1; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Después de obtener los rendimientos de las FC de la partición de acetato de etilo se procedió a tomar las muestras necesarias para evaluar la actividad amebicida de estas fracciones. La actividad amebicida se determinó siguiendo la metodología previamente descrita en la sección 5.2.4, a continuación se muestran los porcentajes de inhibición de cada una de las FC de la partición de acetato de etilo II (tabla 45).

| FC | Porcentaje de inhibición a 150 g/ml |
|----|-------------------------------------|
| 1 | NA |
| 2 | 93.50 |
| 3 | 95.84 |
| 4 | 94.16 |
| 5 | 82.65 |
| 6 | 88.88 |
| 7 | 91.07 |
| 8 | 92.62 |
| 9 | ND |

Tabla 45. Porcentaje de inhibición de FC de la partición de acetato de etilo de la extracción II en trofozoítos de *E. histolytica*. NA, sin actividad amebicida. ND, no determinada la actividad amebicida.

Como es posible observar en la tabla 44, la mayoría de las fracciones de la partición de acetato de etilo poseen una actividad antiprotozoaria sobresaliente, superior al 80 %. Por lo tanto se tomaron en cuenta como candidatas para fraccionamientos posteriores con el fin de aislar los compuestos que les confieren dicha actividad biológica.

6.7.2.2 Columna 36. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la partición de acetato de etilo de la extracción II.

Para la columna 36 se emplearon 22 g de silica gel, los cuales se suspendieron en la mínima cantidad de cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 460 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la

columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 v/v; cada uno de 50 ml). Finalmente se emplearon 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la sílica. Se colectaron 80 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 46.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-22 | 390.3 |
| 2 | 23-26 | 59.4 |
| 3 | 27-50 | 3.7 |
| 4 | 51-80 | 0.3 |

Tabla 46. Rendimientos de FC de la columna 36

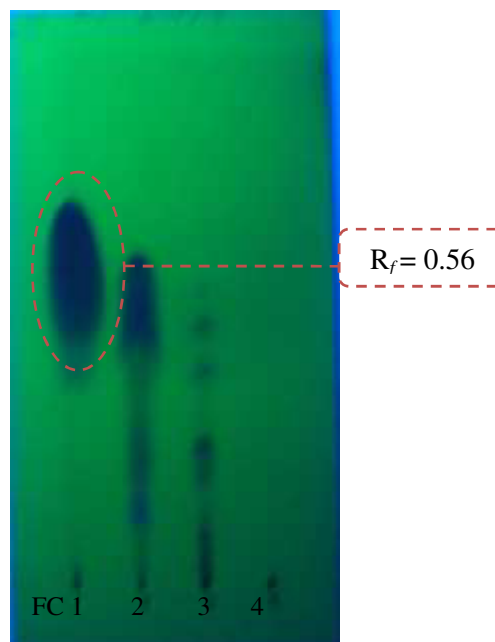


Figura 32. CCF de FC de C36. Eluente: hexano:CHCl₃ (3:7; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 32).

Después de obtener los rendimientos de las FC se realizó una evaluación de la actividad amebicida exhibida por las fracciones obtenidas, a continuación se muestran los porcentajes de inhibición, ver tabla 47.

| FC | Porcentaje de inhibición a 150 g/ml (%) |
|----|--------------------------------------------|
| 1 | 96.77 |
| 2 | 92.12 |
| 3 | ND |
| 4 | ND |

Tabla 47. Porcentaje de inhibición de FC de la columna 36 en trofozoítos de *E. histolytica*. ND, no determinada la

En la fracción FC1 se puede observar que hay un compuesto mayoritario con un R_f de 0.56 el cual es responsable de la actividad amebicida de esta fracción. Por estas razones se decidió someter a un subsiguiente fraccionamiento cromatográfico a FC1.

6.7.2.3 Columna 37. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC1 de la columna 36 y aislamiento de C8

Debido a que en la FC1 se encuentra el compuesto con la mayor actividad amebicida se decidió realizar un fraccionamiento cromatográfico de esta fracción para aislar dicho compuesto. Para el fraccionamiento se empleó una cromatografía en columna con 20 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 390.3 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10 v/v; la primer elución fue de 200 ml y la

segunda de 50 ml). Se colectaron 50 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 48.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-10 | 7.8 |
| 2 | 11-17 | 269.5 |
| 3 | 18-38 | 53.2 |
| 4 | 39-50 | 7.1 |

Tabla 48. Rendimientos de FC de la columna 37.

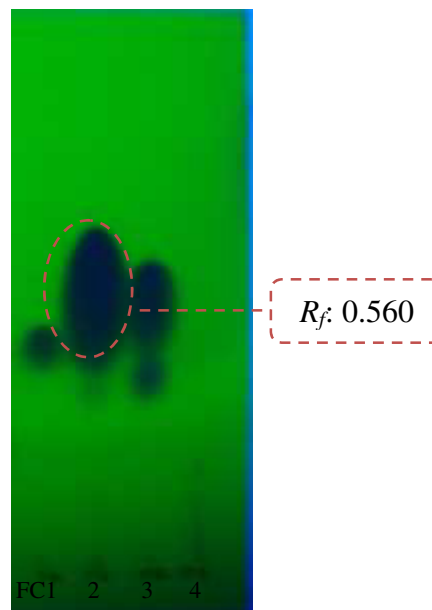


Figura 33. CCF de FC de columna 37. Eluente: hexano:CHCl₃ (3:7; 10 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 33).

De la fracción FC2 de la columna 37 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.56 (hexano/CHCl₃ 3:7) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 87.37 °C y una IC₅₀ de 38.71 µg/ml) se le denomina **C8**.

El compuesto **C8** es el mismo compuesto identificado anteriormente como **C1** debido a que en la comparación de espectros de ^1H y ^{13}C -RMN presentan señales similares con el mismo desplazamiento químico.

6.7.2.4 Columna 38. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la partición de acetato de etilo II.

La fracción FC3 de la partición de acetato de etilo II posee una actividad amebicida de relevancia con un 95.84 % de inhibición ante *E. histolytica*, por lo que justifica el fraccionamiento cromatográfico de la misma, con el fin de lograr aislar los compuestos responsables de dicha actividad. Esta fracción se mezcló con la FC3 de la partición de acetato de etilo de la extracción I la cual posee compuestos similares en concentración adecuada a un R_f de 0.82 y otro de 0.91. Para el fraccionamiento se empleó una cromatografía en columna con 20 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 1554.6 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 v/v; cada uno de 50 ml). Finalmente se emplearon 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares que fueron retenidos por la sílica. Se colectaron 80 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 5 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 49.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-7 | 56.8 |
| 2 | 8-15 | 716.2 |
| 3 | 16-19 | 233.2 |
| 4 | 20-26 | 28.6 |
| 5 | 27-60 | 48.2 |

Tabla 49. Rendimientos de FC de la columna 38.

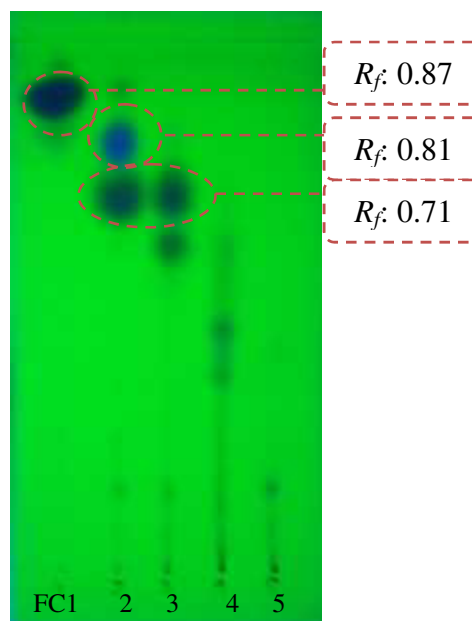


Figura 34. CCF de FC de la columna 38.
Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 10 ml). Revelador: luz UV 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 34).

Posteriormente se analizó la actividad antiprotozoaria contra *E. histolytica* de las FC por medio de la metodología establecida en la sección 5.3.4, ver tabla 50.

| FC | Porcentaje de inhibición a 150 g/ml (%) |
|----|-----------------------------------------|
| 1 | 85.92 |
| 2 | 81.75 |
| 3 | 88.40 |
| 4 | ND |
| 5 | ND |

Tabla 50. Porcentaje de inhibición de FC de la columna 38 fracción II en trofozoítos de *E. histolytica*. ND, no determinada la actividad amebicida.

En las fracciones FC1, FC2 y FC3 se encuentran los compuestos principales que a su vez son responsables de la actividad amebicida de la fracción de la que proceden. Aunado a que se encuentran en una concentración adecuada y con un cierto grado de pureza justifica el que se continúe con el fraccionamiento biodirigido de estas tres fracciones.

6.7.2.5 Columna 39. Fraccionamiento cromatográfico de la FC1 de la columna 38 y aislamiento de **C9**

El objetivo del fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC1 de la columna 38 es aislar el compuesto con R_f de 0.87 (CHCl_3 :EtOAc; 9.5:0.5). Para el desarrollo de esta columna se empleó como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil 300 ml de metanol. Se aplicó la totalidad de la muestra restante de FC1 (45 mg). Al final del proceso cromatográfico se recuperaron 60 fracciones, de 5 ml aproximadamente. Una vez que se recuperaron las fracciones, estas fueron evaluadas por medio de CCF y se decidió agrupar las fracciones de acuerdo a su similitud con su R_f en 4 FC para posteriormente evaluar sus rendimientos, ver tabla 51

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución en base a su polaridad (figura 35).

De la fracción FC4 de la columna 39 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.90 (CHCl_3 /EtOAc 9:1) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 83.10 °C y una IC_{50} superior a 150 $\mu\text{g/ml}$) se le denomina **C9**.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-11 | 3.425 |
| 2 | 12-14 | 4.600 |
| 3 | 15-17 | 4.535 |
| 4 | 18-60 | 32.430 |

Tabla 51. Rendimientos de FC de la columna 39.

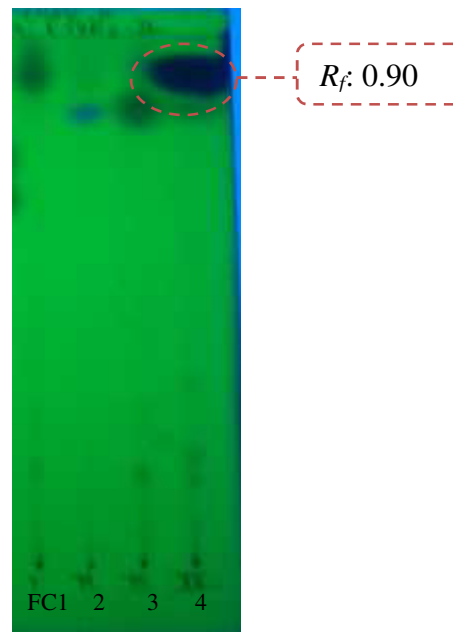


Figura 35. CCF de FC de la columna 39.
Eluyente: CHCl₃:EtOAc (9:1; 8 ml).
Revelador: luz UV a 254 nm.

C9 es el mismo compuesto identificado anteriormente como **C1**; debido a que en la comparación de sus espectros de ¹H y ¹³C-RMN presentan señales similares el mismo desplazamiento químico.

6.7.2.6 Columna 40. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 38 y aislamiento de **C9** y **C10**.

El objetivo del fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 38 es aislar los compuestos con R_f de 0.81 y 0.71 (CHCl₃:EtOAc; 9.5:0.5), los cuales son responsables de la actividad amebicida de la misma. Para el fraccionamiento se empleó una cromatografía en columna con 22 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 716.2 mg se disolvió en una pequeña cantidad de

cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada elución se realizó de 50 ml). Se colectaron 110 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 52.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 36).

El fraccionamiento por cromatografía en columna de la fracción FC2 de la columna 38 nos permitió obtener 2.1 mg adicionales del compuesto **C9** (R_f de 0.81), presentes en la FC1 de esta columna. Por otro lado de la fracción FC3 de la columna 40 se obtuvo un compuesto puro con un R_f de 0.62 (CHCl_3 /acetato de etilo 9.5:0.5) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-10 | 2.1 |
| 2 | 11-13 | 539.9 |
| 3 | 14-20 | 99.3 |
| 4 | 21-110 | 11.4 |

Tabla 52. Rendimientos de FC de la columna 40.

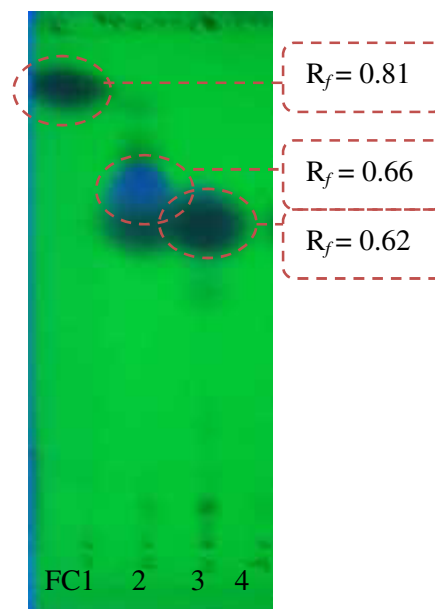


Figura 36. CCF de FC de la columna 40. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

amarillo, con un punto de fusión de 144.73 °C y una IC₅₀ 57.09 µg/ml) se le denomina **C10**.

C10 es el mismo compuesto identificado anteriormente como **C2** debido a que en la comparación de sus espectros de ¹H y ¹³C-RMN presentan señales similares con el mismo desplazamiento químico. Un análisis más detallado de los datos espectroscópicos indican que **C2** y **C10** representan una mezcla de 2 compuestos con estructura muy similar, pero en **C2** encontramos adicionalmente un tercer componente que posee un grupo carbonilo.

Posterior a la obtención de los compuestos aislados se vio la posibilidad de obtener una mayor cantidad del compuesto **C10** y a la vez obtener otro compuesto que posee un R_f muy similar al de **C10**, ambos presentes en las FC2 de esta columna, por lo que se decidió continuar con el fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2.

6.7.2.7 Columna 41. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 40.

La fracción FC2 de la columna 40 contiene dos componentes principales con R_f de 0.66 y 0.62 de los cuales el compuesto de R_f 0.62 corresponde a **C10**, por lo que en esta columna se tiene el objetivo de obtener una mayor cantidad del compuesto **C10** y aislar el compuesto con R_f de 0.66. Para el fraccionamiento se empleó una cromatografía en columna con 22 g de silica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 539.9 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser

aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 99:01, 95:05, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40 v/v; cada uno de 50 ml). Finalmente se agregaron 50 ml de metanol para eluir los compuestos de mayor polaridad retenidos por la sílica. Se colectaron 90 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 53.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 37).

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-21 | 28.8 |
| 2 | 22-38 | 498.6 |
| 3 | 39-90 | 11.3 |

Tabla 53. Rendimientos de FC de la columna 41.



Figura 37. CCF de FC de la columna 41. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 8 ml). Revelador: luz UV a 240 nm.

Los resultados de la CCF indican que no fue posible separar los compuestos que conforman la fracción FC2 de la columna 40 debido a que poseen una polaridad similar. Por lo tanto se decidió realizar una cristalización del sólido obtenido en la FC2 de esta columna como un paso previo a una purificación mayor empleando Sephadex LH-20 el cual nos permite separar en base al tamaño y no a la polaridad de los compuestos.

El proceso de cristalización se realizó como se describió en la sección 5.1.8. Se emplearon los 498.6 mg de la FC2 de esta columna. Pasadas 24 horas de refrigeración se formaron dos sólidos en la base del matraz pudiendo diferenciarlos por el color, uno como un sólido amorfo de color blanco (SB) y el otro un sólido amorfo de color verde (SV), ver figura 38.



Figura 38. Sólidos obtenidos por la técnica de cristalización de la fracción FC2 de la columna 41.

El solvente fue decantado y los dos sólidos fueron recuperados de forma mecánica, recuperando así la fracción original en tres partes, el SB, el SV y el sobrenadante. A continuación se muestran los rendimientos de los sólidos, ver tabla 54.

Obtenidos los rendimientos de los sólidos que se recuperaron se decidió realizar una CCF para ver la forma en cómo quedaron distribuidos los compuestos de interés tanto en los sólidos como en el sobrenadante, ver figura 39.

| Sólido | Rendimiento (mg) |
|--------|------------------|
| SB | 85.2 |
| SV | 30.4 |

Tabla 54. Rendimiento de los sólidos recuperados de la cristalización de la fracción FC2 de la columna 41.



Figura 39. CCF de sólidos obtenidos por la técnica de cristalización de la fracción FC2 de la columna 41. Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm. *S, sobrenadante.

En CCF se observa que los compuestos con R_f de 0.66 y 0.62 aún se encuentran formando una mezcla, tanto en los sólidos como en el sobrenadante, pero con una diferente relación en la concentración aparente de cada uno de estos compuestos. Primeramente se puede observar que en el sólido En el sólido verde se puede observar que la concentración del compuesto de R_f 0.66 está en una mayor proporción, en tanto en el sólido blanco la concentración del compuesto de R_f 0.66 es similar a la del compuesto **C10**. Por otra parte en el sobrenadante el compuesto con R_f de 0.66 está presente en una mayor proporción. Por tal razón se decidió continuar con el

fraccionamiento tanto del sólido blanco y del sobrenadante por medio de cromatografía en columna con Sephadex LH-20.

6.7.2.7.1 Columna 42. Fraccionamiento cromatográfico del sobrenadante y aislamiento de **C10** y **C11**.

Para el desarrollo de esta columna se empleó una cromatografía en columna de 160 cm de longitud empacado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 365 mg disuelta en metanol y se empleó como eluente 350 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 70 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 5 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 55.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-44 | 185.2 |
| 2 | 45-50 | 6.7 |
| 3 | 51-52 | 2.8 |
| 4 | 53-63 | 37.9 |
| 5 | 64-70 | 5.1 |

Tabla 55. Rendimientos de FC de la columna 42.

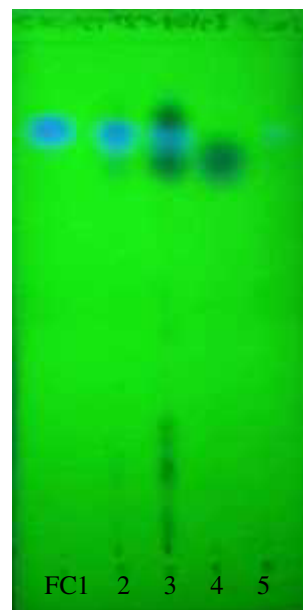


Figura 40. CCF de FC de la columna 42. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:05). Revelador: luz UV a 240 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución en base a su polaridad (figura 40).

Como se puede observar en la figura 64 en las fracciones FC1 y FC4 se encuentran en forma pura los dos compuestos de interés. En la fracción FC1 de la columna 42 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.66 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 9.5:0.5) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 104.13 °C y una IC_{50} 6.54 $\mu\text{g/ml}$) se le denomina **C11**.

C11 es el mismo compuesto identificado anteriormente como **C3** debido a que en la comparación de sus espectros de ^1H y ^{13}C -RMN presentan señales similares con el mismo desplazamiento químico.

De la FC4 de esta columna se recuperaron 37.9 mg adicionales de **C10**.

Se continuó con el fraccionamiento del sólido blanco para obtener mayores cantidades de los compuestos **C10** y **C11**.

6.7.2.7.2 Columna 43. Fraccionamiento cromatográfico del sólido blanco

Para el desarrollo de esta columna se empleó una cromatografía en columna de 160 cm de longitud empacado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad del sólido blanco recuperado (85.2 mg) disuelto en metanol y se empleó como eluyente 400 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 80 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una de las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la

similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 56.

| F | Fracciones | Rendimiento |
|---|------------|-------------|
| C | mezcladas | s (mg) |
| 1 | 1-49 | 1.8 |
| 2 | 50-62 | 67.5 |
| 3 | 63-72 | 6.3 |
| 4 | 73-80 | 1.0 |

Tabla 56. Rendimientos de FC de la columna 43.



Figura 41. CCF de FC de C43. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9.5:0.5; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución en base a su polaridad (figura 41).

El fraccionamiento cromatográfico del sólido blanco permitió obtener cantidades adicionales de los compuestos **C10** en FC3 y **C11** en FC2.

6.7.2.8 Columna 44. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna 38.

El fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna 38 se realizó con la finalidad de obtener una mayor cantidad del compuesto **C10**, el cual se encuentra

presente en esta fracción. Para el fraccionamiento se empleó una cromatografía en columna con 22 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 233.2 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; cada uno de 50 ml). Se colectaron 110 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 57.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-12 | 109.1 |
| 2 | 13-34 | 88.7 |
| 3 | 35-110 | 13.9 |

Tabla 57. Rendimientos de FC de la columna 44.

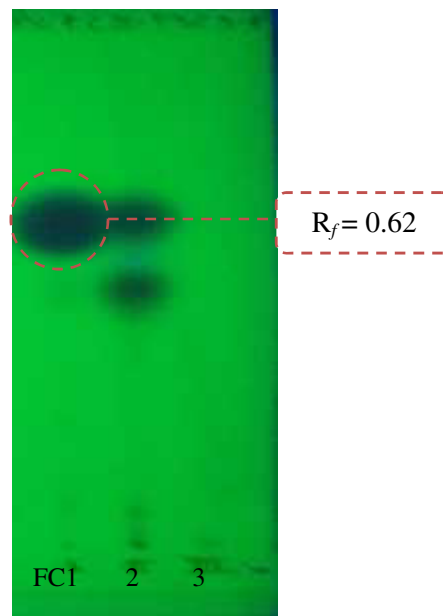


Figura 42. CCF de FC de la columna 44.
 Eluente: CHCl₃:EtOAc (9.5:0.5; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 42).

De la fracción FC1 de la presente columna se logró recuperar mayor cantidad del compuesto **C10**.

6.7.2.9 Columna 45. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción compuesta por las fracciones FC4 de la partición de acetato de etilo I y /FC4 de la partición de acetato de etilo II. Estas fracciones provienen de las columnas 6 y 7 así como de las columnas 26 a 35, respectivamente.

Para la realización de esta cromatografía en columna se decidió juntar la fracción FC4 de la partición de acetato de etilo I y la fracción FC4 de la partición de acetato de etilo II la cual mostro un porcentaje de inhibición de 94.16 %. Esta unión de fracciones se realizó debido a la similitud en el R_f de los compuestos que conforman dichas fracciones. Para el fraccionamiento se empleó una cromatografía en columna con 22 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 475.9 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 v/v; cada uno de 50 ml). Finalmente se agregaron 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la sílica. Se colectaron 80 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 6 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 58.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-15 | 4.4 |
| 2 | 16-17 | 33.1 |
| 3 | 18-19 | 55.0 |
| 4 | 20-26 | 192.8 |
| 5 | 27-30 | 53.3 |
| 6 | 31-80 | 41.8 |

Tabla 58. Rendimientos de FC de la columna 45

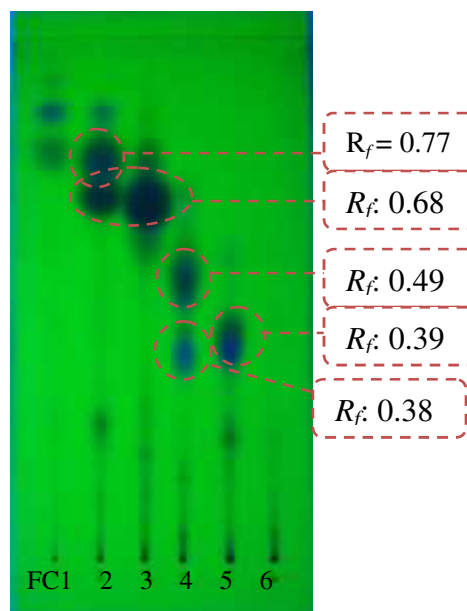


Figura 43. CCF de FC de la columna 45. Eluente: CHCl_3 :EtOAc; (9:1; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 43).

Como es posible observar en la figura 44 las FC2, FC3, FC4, FC5 contienen los compuestos principales y posibles responsables de la actividad amebicida exhibida por la fracción de la que proceden. Por lo tanto se continuara con el fraccionamiento de estas FC.

6.7.2.10 Columna 46. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 45 y aislamiento de **C12**

La fracción FC2 de la columna 45 contiene dos compuestos principales con R_f de 0.77 y 0.68 los cuales se buscará aislar por medio de un proceso cromatográfico. Para el

desarrollo de esta columna se empleó una cromatografía en columna de 160 cm de longitud empaquetado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicaron 33.1 mg de la fracción disuelta en metanol y se empleó como eluyente 450 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 90 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 59.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-40 | 2.1 |
| 2 | 41-48 | 2.6 |
| 3 | 49-90 | 22.8 |

Tabla 59. Rendimientos de FC de la columna 46.

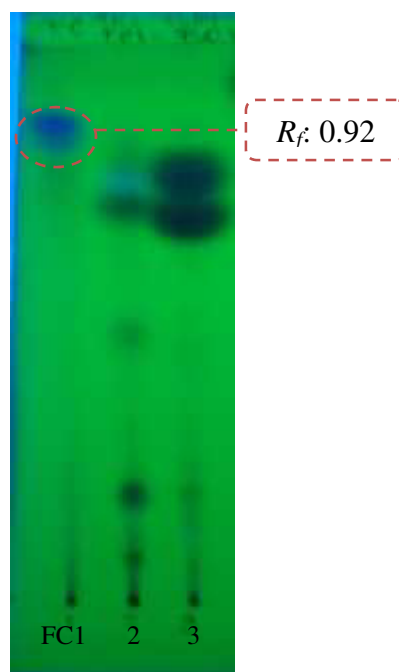


Figura 44. CCF de FC de la columna 46. Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (9:1; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución en base a su polaridad (figura 44).

De la fracción FC1 de la columna 46 se recuperó un compuesto con un R_f de 0.92 ($\text{CHCl}_3/\text{EtoAc}$ 9:1) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco) se le denomina **C12**.

C12 es el mismo compuesto identificado anteriormente como **C3** debido a que en la comparación de sus espectros de ^1H y ^{13}C -RMN presentan señales similares con el mismo desplazamiento químico.

6.7.2.11 Columna 47. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna 45 y aislamiento del compuesto **C13**

La FC3 de la columna 45 contiene un compuesto principal con un R_f de 0.68, por lo cual esta fracción se sometió a un fraccionamiento cromatográfico para aislar este compuesto. Para el desarrollo de esta columna se empleó una cromatografía en columna de 160 cm de longitud empacado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 55 mg disuelta en metanol y se empleó como eluyente 300 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 60 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una de las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 60.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución en base a su polaridad (figura 45).

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-39 | 6.9 |
| 2 | 40-46 | 26.8 |
| 3 | 47-60 | 5.6 |

Tabla 60. Rendimientos de FC de la columna 47.

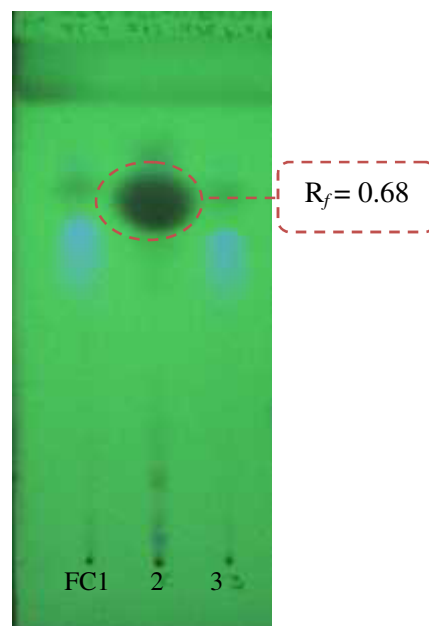


Figura 45. CCF de FC de la columna 47.
Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9:1).
Revelador: luz UV a 254 nm.

De la fracción FC2 de la columna 47 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.68 (CHCl_3 /EtOAc 9:1) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 118.85 °C y una IC_{50} 26.22 $\mu\text{g/ml}$) se le denomina **C13**.

6.7.2.12 Columna 48. Fraccionamiento cromatográfico de FC4 de la columna 45.

El objetivo de este fraccionamiento cromatográfico a la fracción FC4 de la columna 45 es aislar los compuestos principales con R_f de 0.49 y 0.38. Para el desarrollo de esta cromatografía en columna se empleó una columna de 160 cm de longitud empaquetado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 157.7 mg disuelta en metanol y se

empleó como eluente 450 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 90 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 61.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-41 | 7.5 |
| 2 | 42-49 | 80.9 |
| 3 | 50-64 | 58.1 |
| 4 | 65-90 | 6.4 |

Tabla 61. Rendimiento de FC de la columna 48

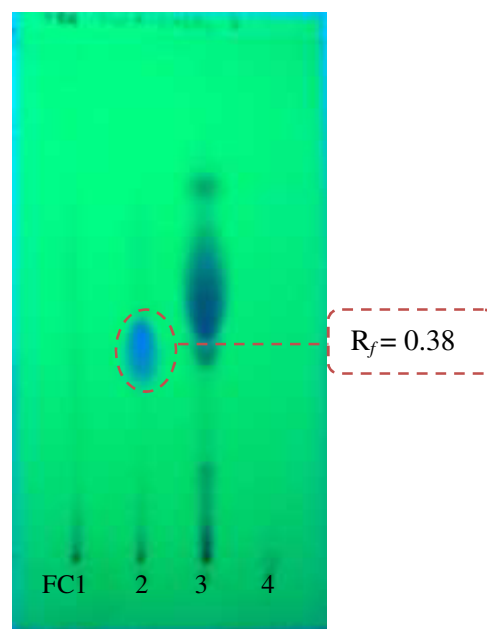


Figura 46. CCF de FC de la columna 48.
Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9:1).
Revelador: luz UV a 254 nm.

Una vez que se formaron las FC y que se registró su rendimiento se realizó una CCF para evaluar la distribución de los compuestos principales, observando una distribución en base a la polaridad de los compuestos, ver figura 46.

En la fracción FC2 se logró obtener un compuesto parcialmente puro con un R_f de 0.38, por lo tanto se decidió purificar esta fracción por medio de una cromatografía en columna adicional.

6.7.2.13 Columna 49. Fraccionamiento cromatográfico de FC2 de la columna 48 y aislamiento de **C14**

El aislamiento del compuesto con R_f de 0.38 contenido en la fracción FC2 de la columna 48 se realizó empleando una columna de 160 cm de longitud empaquetada con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 80.9 mg disuelta en metanol y se empleó como eluente 350 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 70 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 62

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-46 | 3.5 |
| 2 | 47-52 | 65.6 |
| 3 | 53-70 | 4.2 |

Tabla 62. Rendimientos de FC de la columna 49.

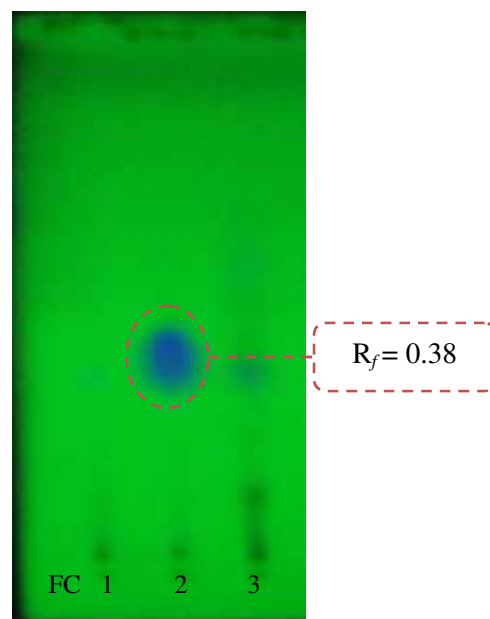


Figura 47. CCF de FC de la columna 49.
Eluente: CHCl₃:EtOAc (9:1; 8 ml).
Revelador: luz UV a 254 nm.

Una vez que se formaron las FC y que se registró su rendimiento se realizó una CCF de las FC para evaluar la distribución de los compuestos principales, observando una distribución en base a la polaridad de los compuestos, ver figura 47.

En la fracción FC2 de la columna 49 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.38 ($\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$ 9:1) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 125.26 °C y una IC_{50} 28.67 $\mu\text{g/ml}$) se le denomina **C14**.

En la fracción FC5 de la columna 45 se encuentra este mismo compuesto **C14** por tal razón se sometió esta fracción a un fraccionamiento cromatográfico con la finalidad de obtener un cantidad adicional de **C14**.

6.7.2.14 Columna 50. Fraccionamiento cromatográfico de FC5 de la columna 45

El fraccionamiento que se realizó a esta fracción tuvo la finalidad de purificar el compuesto con R_f de 0.38 identificado anteriormente como **C14** para así obtener cantidades adicionales del mismo. Para el desarrollo de esta cromatografía en columna se empleó una columna de 160 cm de longitud empaquetado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 53.3 mg disuelta en metanol y se empleó como eluyente 350 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 70 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 63.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-38 | 6.1 |
| 2 | 39-43 | 9.2 |
| 3 | 44-48 | 2.7 |
| 4 | 49-70 | 6.1 |

Tabla 63. Rendimientos de FC de la columna 50

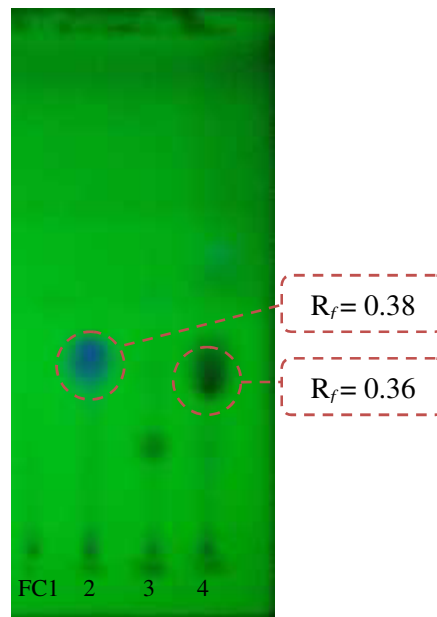


Figura 48. CCF de FC de la columna 50.
Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9:1; 8 ml).
Revelador: luz UV a 254 nm.

Una vez que se formaron las FC y que se registró su rendimiento se realizó una CCF de las FC para evaluar la distribución de los compuestos principales, observando una distribución en base a la polaridad de los compuestos, ver figura 48.

De la fracción FC2 se logró nuevamente aislar el compuesto **C14**.

6.7.2.15 Columna 51. Fraccionamiento cromatográfico de la mezcla conformada por las fracciones FC6, FC7 y FC8 de la partición de acetato de etilo II, provenientes de las columnas 26 a 35.

Debido a que las fracciones FC6, FC7 y FC8 de la partición de acetato de etilo II (de columnas 26 a 35) contienen el mismo compuesto con un R_f de 0.1 (CHCl_3 :EtOAc; 9:1)

se decidió juntarlas y someterlas a un fraccionamiento cromatográfico con el fin de aislar el compuesto antes mencionado.

Para el fraccionamiento se empleó una cromatografía en columna con 22 g de sílica gel, los cuales se suspendieron en cloroformo para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.4. La muestra de 1502.3 mg se disolvió en una pequeña cantidad de cloroformo para ser aplicada en la columna y la elución de la columna se realizó empleando el siguiente gradiente de elución: cloroformo-acetato de etilo (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 v/v; las primeras 6 eluciones se realizaron de 50 ml, las 5 restantes se realizaron de 80 ml). Finalmente se agregaron 50 ml de metanol para eluir los compuestos más polares retenidos por la sílica. Se colectaron 150 fracciones de aproximadamente 5 ml cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 6 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 64.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-27 | 107.3 |
| 2 | 28-35 | 387.9 |
| 3 | 36-41 | 182.1 |
| 4 | 42-48 | 123.5 |
| 5 | 49-76 | 377.5 |
| 6 | 77-150 | 101.6 |

Tabla 64. Rendimientos de FC de la columna 51

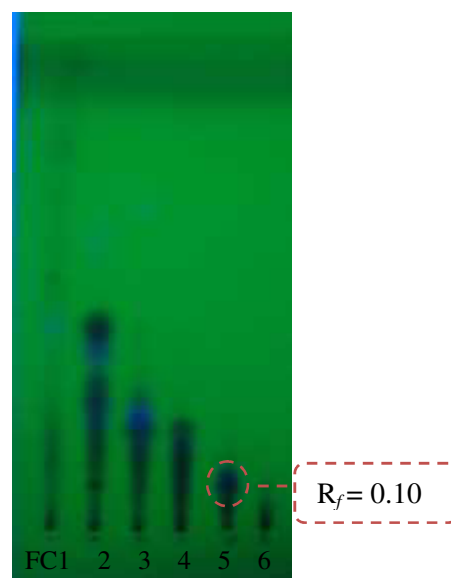


Figura 49. CCF de FC de la columna 51.
 Eluente: CHCl_3 :EtOAc (9:1).
 Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 49).

En la fracción FC5 se logra observar el compuesto con R_f de 0.10 (CHCl_3 :EtOAc 9:1) pero con una gran cantidad de impurezas polares por lo que se decidió continuar con la purificación de esta fracción.

6.7.2.16 Columna 52. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC5 de la columna 51

Debido a que la fracción FC5 de la columna 51 contiene principalmente el compuesto con R_f de 0.10 el cual se encuentra contaminado con una considerable cantidad de compuestos polares se decidió someter esta fracción a una purificación adicional. Para el fraccionamiento cromatográfico de esta fracción se empleó una cromatografía en columna con 20 g de sílica gel fase reversa, los cuales se suspendieron en metanol para ser empaquetados en la columna de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.5. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 335.9 mg los cuales se disolvieron en metanol para ser aplicada a la columna y se empleó como eluente 140 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 56 fracciones de 2.5 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 3 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 65.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución de menor a mayor polaridad (figura 50).

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimiento (mg) |
|----|----------------------|------------------|
| 1 | 1-24 | 10.9 |
| 2 | 25-29 | 232.0 |
| 3 | 30-56 | 41.6 |

Tabla 65. Rendimientos de FC de la columna 52.

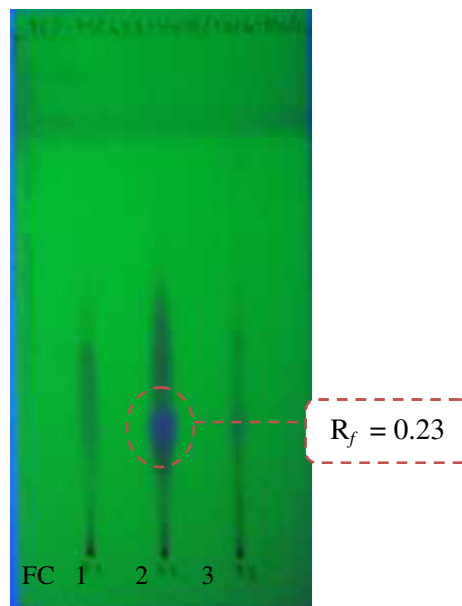


Figura 50. CCF de FC de la columna 52.
 Eluyente: CHCl_3 :EtOAc (1:1; 8 ml).
 Revelador: luz UV a 254 nm.

Al igual que en la columna 51, el compuesto de $R_f = 0.23$ (CHCl_3 :EtOAc 1:1) se observa en una buena concentración, pero con una gran cantidad de impurezas polares, por esta razón se decidió someter nuevamente la FC2 a un fraccionamiento cromatográfico por exclusión molecular.

6.7.2.17 Columna 53. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC2 de la columna 52

Para el desarrollo de esta cromatografía en columna se empleó una columna de 160 cm de longitud empaquetado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 232.0 mg disuelta en metanol y se empleó como eluyente 450 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 90 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada

una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 4 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 66.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-42 | 12.0 |
| 2 | 43-47- | 35.3 |
| 3 | 48-60 | 141.6 |
| 4 | 61-90 | 25.6 |

Tabla 66. Rendimientos de FC de la columna 53

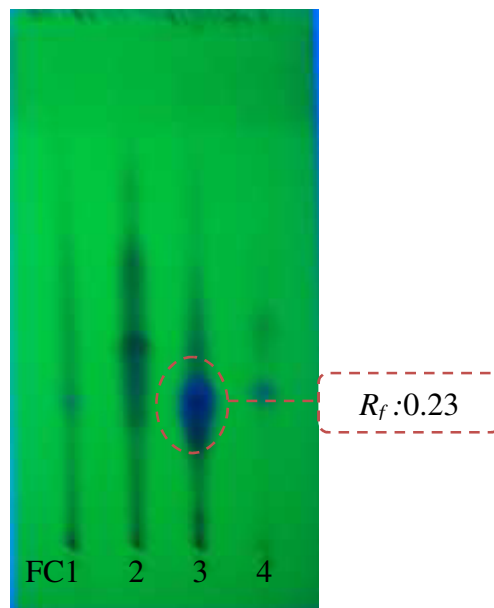


Figura 51. CCF de FC de la columna 53.
Eluente: CHCl_3 :EtOAc (1:1; 8 ml).
Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución en base a su polaridad (figura 51).

En la fracción FC3 se observa de nuevo el compuesto con $R_f = 0.23$ (CHCl_3 :EtOAc 1:1) sin embargo sigue estando contaminado con compuestos de mayor polaridad, por lo que se decidió realizar nuevamente una purificación ahora a la fracción FC3 de la columna 53.

6.7.2.18 Columna 54. Fraccionamiento cromatográfico de la fracción FC3 de la columna 53 y aislamiento de **C15**

Para el desarrollo de esta cromatografía en columna se empleó una columna de 160 cm de longitud empaquetado con Sephadex LH-20 de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.1.6. Se aplicó la totalidad de la fracción la cual está compuesta por 141.6 mg disuelta en metanol y se empleó como eluente 300 ml de metanol. Al terminar el proceso cromatográfico se recuperaron 60 fracciones de 5 ml aproximadamente. Cada una las cuales se analizaron por medio de CCF permitiendo agruparlas de acuerdo a la similitud en su R_f . Por lo tanto se formaron 2 FC y se evaluó su rendimiento, ver tabla 67.

| FC | Fracciones mezcladas | Rendimientos (mg) |
|----|----------------------|-------------------|
| 1 | 1-45 | 35.2 |
| 2 | 46-60 | 17.3 |

Tabla 67. Rendimientos de FC de la columna 54.

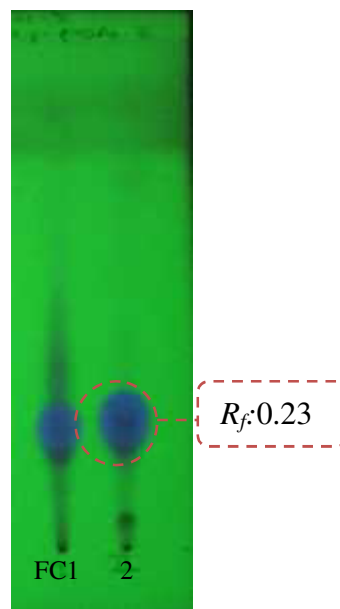


Figura 52. CCF de FC de la columna 54. Eluente: CHCl_3 :EtOAc (1:1; 8 ml). Revelador: luz UV a 254 nm.

Posteriormente se realizó una CCF de las FC para evaluar el desplazamiento de los compuestos observando una distribución en base a su polaridad (figura 52).

En la fracción FC2 de la columna 54 se obtuvo un compuesto con un R_f de 0.23 (CHCl_3 /acetato de etilo 1:1) con la pureza adecuada para realizar análisis espectroscópico. A este compuesto (polvo amorfo color blanco, con un punto de fusión de 167.82 °C) se le denomina **C15**.

C15 es el mismo compuesto identificado anteriormente como **C5**, debido a que en la comparación de sus espectros de ^1H , ^{13}C -RMN presentan señales similares con el mismo desplazamiento químico.

6.8 Resultados espectroscópicos

6.8.1 Análisis espectrométrico y espectroscópico del compuesto **C1**

6.8.1.1 Análisis de espectrometría de masas

En la figura 53 se muestra un espectro de espectrometría de masas por el método de ionización por electrospray en su modo positivo, en el cual se puede observar el aducto del ion molecular con un protón $[M+H]^+$ a $m/z = 255.1$. También se observa el aducto del ion molecular con el ion sodio $[M+Na]^+$ a $m/z = 277.1$. Estos aductos permiten identificar el peso del compuesto al restar el peso del protón y del ion sodio respectivamente, quedando la masa del compuesto en 254.1 uma. Del mismo modo y de una forma confirmatoria de la masa del compuesto **C1** se ubicó la señal producida por el ion $[2M+Na]^+$ a $m/z = 531.2$.

El espectro de alta resolución de (+)-HR-ESI-MS de la figura 54 muestra de nuevo varios aductos simples del compuesto **C1**, primero se ubica el aducto $[M+H]^+$ a $m/z = 255.1014$, y a continuación el aducto $[M+Na]^+$ con una masa de 277.0835. Los valores de peso molecular calculados para $C_{16}H_{15}O_3$ y para $C_{16}H_{14}NaO_3$ son 255.1016 y 277.0835, respectivamente, lo cual concuerda con el peso molecular de los dos primeros aductos indicados arriba. Se propone por lo tanto la fórmula molecular $C_{16}H_{14}O_3$ para el compuesto **C1**, después de abstraer un átomo de H o de Na, respectivamente.

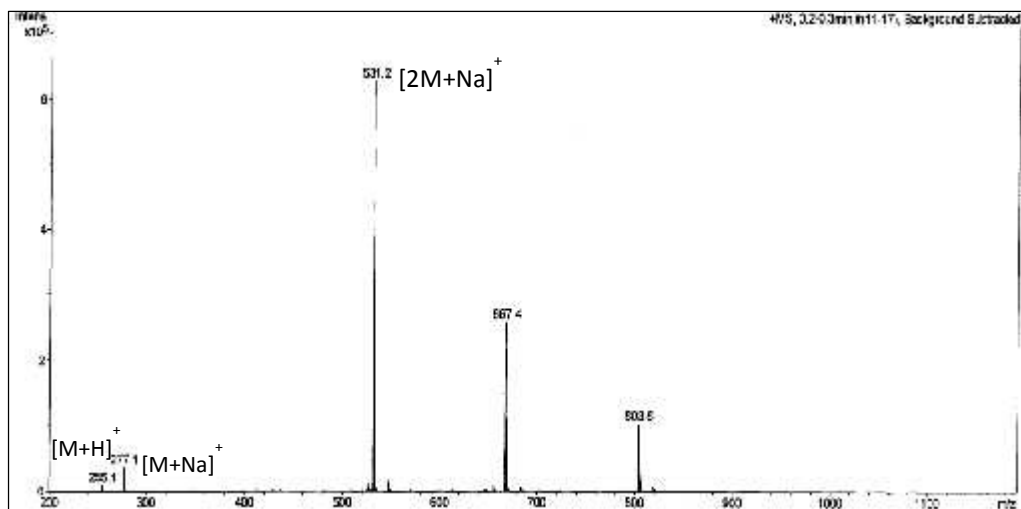


Figura 53. Espectro de masas (+)-ESI-MS del compuesto C1

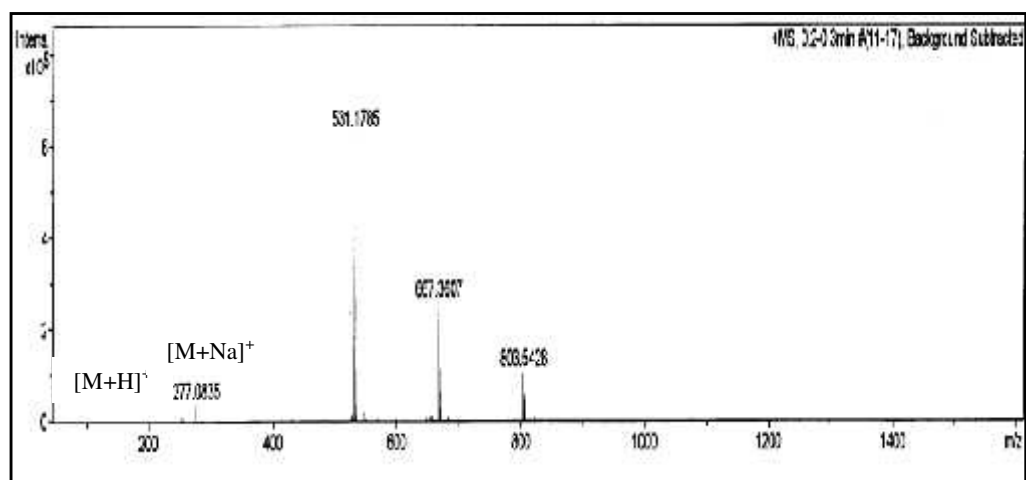


Figura 54. Espectro de masas de alta resolución (+)-HR-ESI-MS del compuesto C1.

6.8.1.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

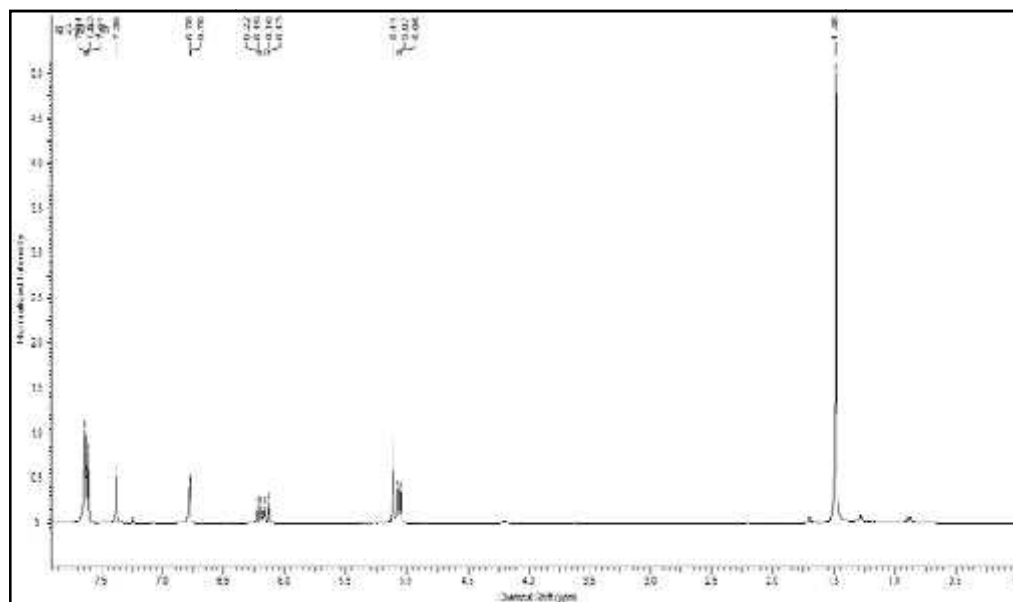


Figura 55. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C1** en CDCl_3 .

En el espectro de ^1H -RMN de la figura 55 se procedió primero a identificar la señal correspondiente al solvente sin deuterar (CHCl_3) a 7.25 ppm. Una vez identificada esta señal es posible observar claramente 8 señales correspondientes al compuesto **C1**, las señales A, B, C y D están representadas por cuatro singuletes (s) con desplazamientos de 7.64, 7.63, 7.61 y 7.37 ppm respectivamente, las cuales integran para cuatro metinos de protones aromáticos. La señal E con un desplazamiento de 6.78 ppm y una multiplicidad de doblete (d) así como la señal F con desplazamiento a 6.18 ppm y una multiplicidad de doblete doblete (dd) integra cada una para 1 protón. La señal E tiene acoplamiento con un metino en la región de aromáticos (señal B) y la señal F posee un acoplamiento con la señal de un protón de la región de aromáticos (señal G) (COSY, figura 56). Por otra parte la señal G con un desplazamiento a 5.08 ppm tiene multiplicidad de multiplete (m)

e integra para dos protones y finalmente a 1.48 ppm se ubica la señal H la cual está representada como un singlete que integra para 6 protones en el área de grupos metilo. Los datos obtenidos de este espectro se resumen en la tabla 68.

| Señal | | Multiplicidad | <i>J</i> (Hz) | Integración |
|-------|------|---------------|---------------|-------------|
| A | 7.64 | s | | 1H |
| B | 7.63 | s | | 1H |
| C | 7.61 | s | | 1H |
| D | 7.37 | s | | 1H |
| E | 6.78 | d | 1.20 | 1H |
| F | 6.18 | dd | 10.86, 17.30 | 1H |
| G | 5.08 | m | | 2H |
| H | 1.48 | s | | 6H |

Tabla 68. Resumen de señales del espectro de ¹H-RMN de C1.

También se realizó un análisis bidimensional de RMN para poder observar las correlaciones que hay entre las señales de los protones del compuesto a través de 3 o más enlaces. En la figura 56 se presenta un espectro de COSY (Correlation Spectroscopy).

El análisis de este espectro permite ubicar dos correlaciones a largo alcance entre las señales G (5.08 ppm) y la señal H (1.48 ppm) además de la correlación de la señal A (7.64 ppm) con la señal H. Esto permite identificar la cercanía que existe entre los grupos metilo de la señal H con el anillo aromático donde se encuentra la señal A.

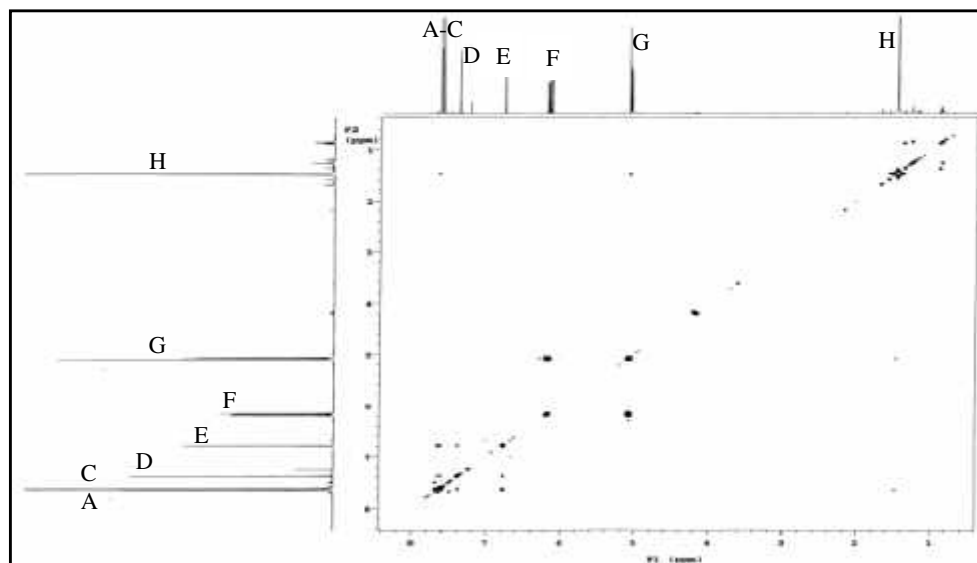


Figura 56. Espectro general de COSY del compuesto **C1** en CDCl_3 .

En una ampliación del espectro de COSY (figura 57) se pueden observar más claramente las correlaciones que existen entre los protones aromáticos así como el acoplamiento de un protón vinílico. Primeramente se observa la correlación entre la señal B (7.63 ppm) y la señal E (6.78 ppm) a 3 enlaces identificando a estos protones como vecinos. El acoplamiento del protón F (6.18 ppm) con los protones G (5.08 ppm) parecen indicar la presencia de un doble enlace terminal. Además de estos acoplamientos entre protones vecinos se puede ubicar la señal de un acoplamiento a largo alcance entre la señal D (7.37 ppm) y E (6.78 ppm).

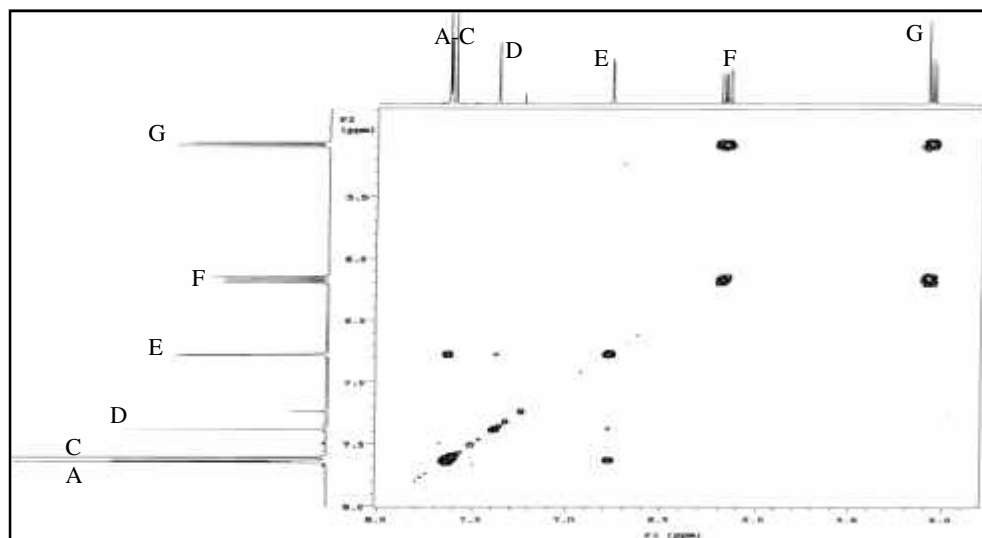


Figura 57. Ampliación del espectro COSY del compuesto **C1** en CDCl_3 .

En la tabla 69 se resumen los acoplamientos registrados en el espectro COSY del compuesto **C1**.

| Señal | Acoplamiento |
|-------|--------------|
| A | H |
| B | E |
| C | |
| D | E |
| E | B, D |
| F | G |
| G | F, H |
| H | A, G |

Tabla 69. Resumen de correlaciones en espectro COSY del compuesto **C1**.

Por otra parte en el espectro de ^{13}C -RMN, de la misma forma que en el espectro de protones se identificó la señal correspondiente al solvente sin deuterar (CHCl_3) con un desplazamiento que va de 77.25 a 76.74 ppm. Después de descartar la señal del solvente se pueden identificar 15 señales correspondientes al compuesto bajo estudio, ver figura 58.

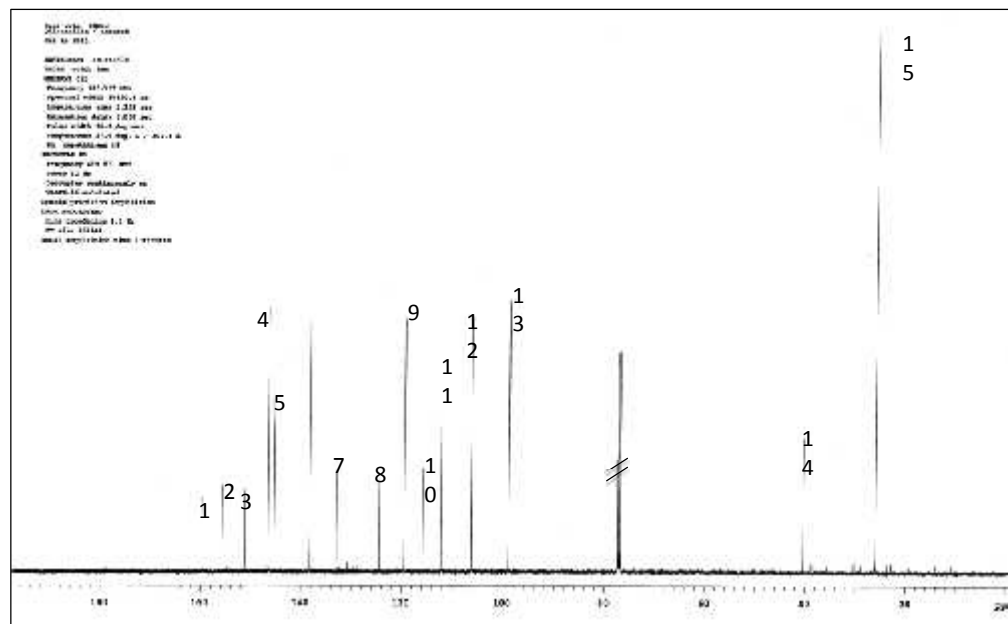


Figura 58. Espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **C1** en CDCl_3 .

Las señales de los carbonos 1, 2 y 3 presentan un desplazamiento superior a 150 ppm lo que permite ubicar a estos carbonos unidos a átomos más electronegativos que el carbono, en este caso unidos a átomos de oxígeno. El desplazamiento del carbono 1 (159.81 ppm) pertenece a un grupo carbonilo de lactona. La influencia del oxígeno con hibridación sp^3 del grupo lactona disminuye el desplazamiento común de un grupo carbonilo de cetona, el cual fluctúa entre 185 y 210 ppm. Con respecto al resto de las señales, se pueden clasificar como señales de carbonos aromáticos u olefínicos (hibridación sp^2) de la señal 2 a la señal 13, en tanto las señales 14 y 15 corresponden a carbonos alifáticos; aunque el espectro presenta solo 15 señales, la señal número 15 corresponde a dos carbonos los cuales son simétricos y presentan el mismo entorno químico. Para la completa clasificación de estas señales se hizo uso de otra técnica bidimensional de RMN, HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence). El empleo de esta técnica nos permite conocer el acoplamiento carbono-hidrógeno (^{13}C - ^1H) a un

enlace, de esta forma se logró adjudicar determinada señal de un protón a una determinada señal de carbono y al mismo tiempo confirmar la correcta clasificación de las señales del espectro de ^{13}C -RMN en metilos, metilenos, metinos y carbonos cuaternarios, tabla 70.

| Señal | | Clasificación |
|-------|--------|-----------------|
| 1 | 159.81 | Cq |
| 2 | 155.77 | Cq |
| 3 | 151.21 | Cq |
| 4 | 146.51 | CH |
| 5 | 145.38 | CH |
| 6 | 138.25 | CH |
| 7 | 133.03 | Cq |
| 8 | 124.51 | Cq |
| 9 | 119.46 | CH |
| 10 | 115.84 | Cq |
| 11 | 112.25 | CH ₂ |
| 12 | 106.27 | CH |
| 13 | 98.84 | CH |
| 14 | 40.44 | Cq |
| 15 | 26.08 | CH ₃ |
| 16 | 26.08 | CH ₃ |

Tabla 70. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN del compuesto **C1**.

En la figura 59 se muestra el espectro de HSQC en el cual se pueden observar los acoplamientos C-H a un enlace del compuesto **C1** y en la tabla 71 se resumen los acoplamientos C-H que muestra este espectro.

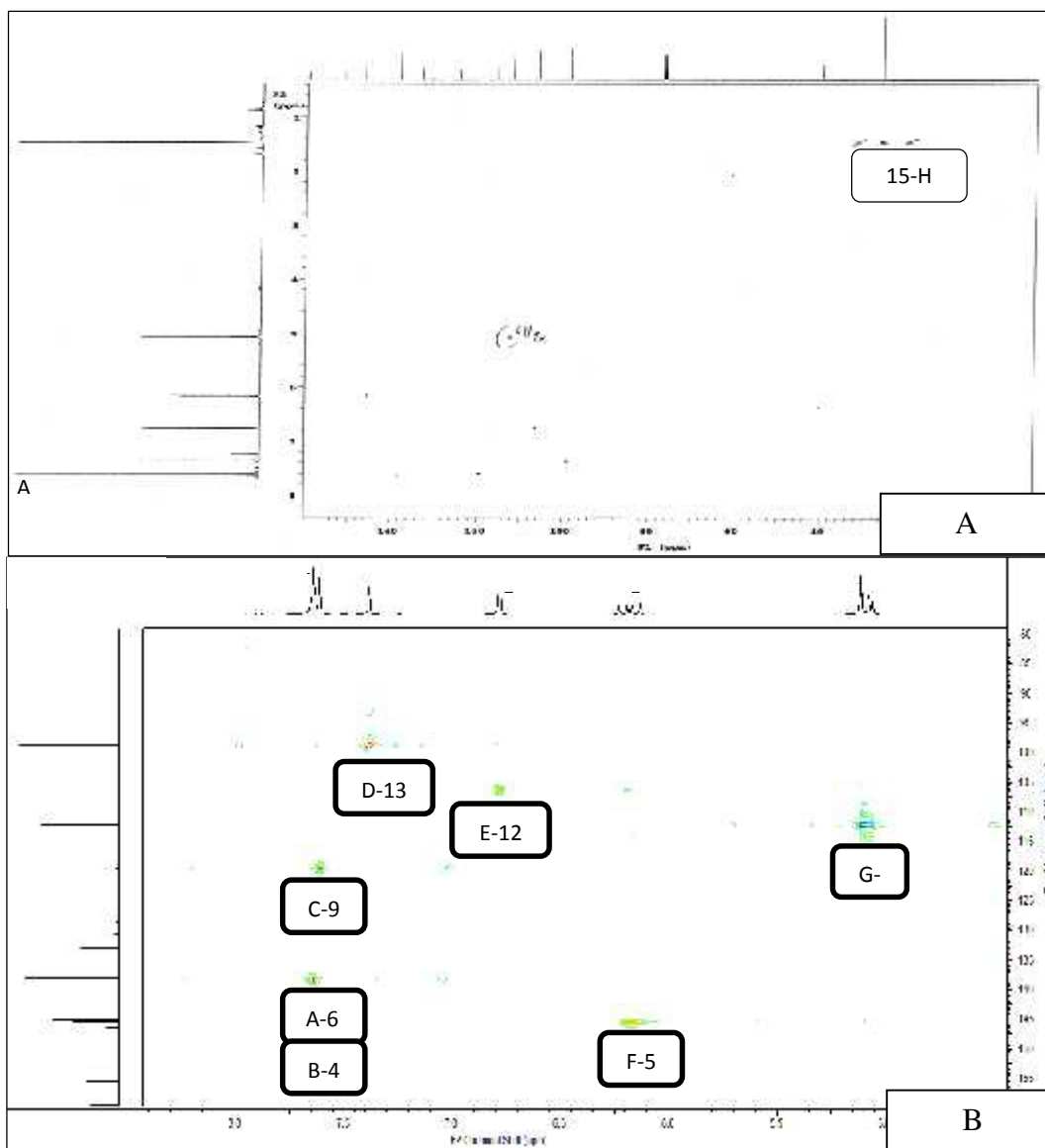


Figura 59. Espectro de HSQC del compuesto **C1**. A, espectro general de HSQC. B, ampliación del espectro de HSQC. ^1H : 4.5-8.5 ppm ^{13}C : 80-165 ppm.

Una vez establecidos los acoplamientos C-H a un enlace que se produjeron se puede confirmar que los carbonos 1, 2, 3, 7, 8, 10 y 14 son carbonos cuaternarios de los cuales solamente el carbono 14 pertenece a una cadena alifática del compuesto, los otros carbonos pertenecen a la región de aromáticos y olefínicos. Con los que respecta a las señales de los carbonos 4, 5, 6, 9, 12 y 13 son metinos, en tanto la señal 11 corresponde a un metileno olefínico. La señal del carbono 15 corresponde a dos grupos metilo de la

región alifática, a esta conclusión se llega basándonos en la integración de 6 protones para la señal H en el espectro de ^1H -RMN, esta situación se presenta debido a que ambos grupos metilos son simétricos y presentan el mismo entorno químico. Cada uno de los acoplamientos antes mencionados se representa mostrando solamente el desplazamiento químico de las señales de protones (^1H) en la fila del carbono correspondiente.

| Señal | ^{13}C | HMBC | ^1H |
|-------|-----------------|-----------------------|--------------|
| 1 | 159.81 | | |
| 2 | 155.77 | | |
| 3 | 151.21 | | |
| 4 | 146.51 | 9, 8, 3, 2, 1 | 7.63 |
| 5 | 145.38 | 16, 15, 14 | 6.18 |
| 6 | 138.25 | 14, 13, 10, 3, 1 | 7.64 |
| 7 | 133.03 | | |
| 8 | 124.51 | | |
| 9 | 119.46 | 13, 12, 6, 3, 2 | 7.61 |
| 10 | 115.84 | | |
| 11 | 112.25 | 14, 5 | 5.08 |
| 12 | 106.27 | 8, 4, 2 | 6.78 |
| 13 | 98.84 | 10, 8, 3, 2 | 7.37 |
| 14 | 40.44 | | |
| 15 | 26.08 | 16, (15), 14, 7, 5 | 1.48 |
| 16 | 26.08 | (16), 15, 14, 7, 5 | 1.48 |

Tabla 71. Resumen de correlaciones del espectro de HSQC y HMBC del compuesto **C1**

Además de los análisis que se realizaron al compuesto para identificar los acoplamientos de C-H a un enlace y conocer la naturaleza de cada una de las señales tanto del espectro de ^1H -RMN y de ^{13}C -RMN, se realizó un análisis de HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) con el cual podemos observar los acoplamientos C-H a 2 o 3 enlaces y en sistemas conjugados hasta 4 enlaces, este tipo de información nos permite deducir la conectividad que hay entre los carbonos e

hidrógenos de determinadas regiones de la molécula y de esta forma confirmar la correcta asignación de los carbonos e hidrógenos en la molécula. En la tabla 71 se muestra un resumen de las señales obtenidas del espectro de HMBC (columna HMBC) en el cual se muestran solamente el número de carbono con el cual se está produciendo un acoplamiento C-H.

El tipo de información recopilada de cada una de las técnicas antes descritas permite deducir que la estructura posee un esqueleto carbonado semejante a la estructura base de furanocumarinas compuestos muy abundantes en esta planta. Posee una cadena hidrocarbonada, *2-metilbut-3-en-2-ilo* como sustituyente en la posición 2 de la estructura. Finalmente reuniendo esta información se identifica al compuesto **C1** como *6-(2-metilbut-3-en-2-ilo)furo[3,2-g]cromen-7-ona*, el cual tiene como nombre común *chalepensina*, ya que el punto de fusión (Tian-Shung *et al.*, 2003) (ver sección 6.5.1.2) y los datos espectroscópicos aquí reportados coinciden con los datos disponibles en la literatura científica (El-Belh *et al.*, 1981; Tian-Shung *et al.*, 2003).

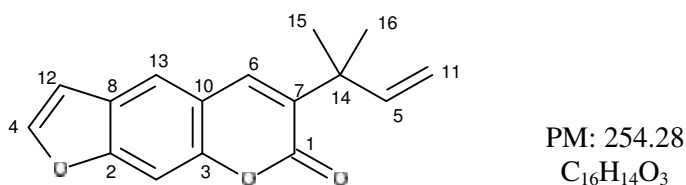


Figura 60. Estructura del compuesto **C1**, chalepensina.

6.8.2 Análisis espectrométrico y espectroscópico del compuesto **C2**

6.8.2.1 Análisis de espectrometría de masas

El análisis de espectrometría de masas del compuesto **C2** se llevó a cabo con el método de ionización de electrospray en el modo positivo, ver figura 97.

En primera instancia se pueden reconocer las señales de dos aductos con diferente relación m/z . El primer aducto será identificado como $[M_1+Na]^+$ a $m/z = 209.0$, en tanto el segundo se identificó como $[M_2+Na]^+$ con un peso de $m/z = 239.1$. Además es posible observar el aducto $[2M_1+Na]^+$ con un peso de $m/z = 395.1$ confirmando el peso del compuesto M1 en 186.0 uma (**C2-A**), una vez que se resta el peso del ion sodio. Por otra parte también es posible identificar el aducto $[2M_2+Na]^+$ a $m/z = 395.1$ y restando el peso del ion sodio fue posible confirmar el peso de M2 como 216.0 uma (**C2-B**).

El espectro de alta resolución de (+)-HR-ESI-MS de la figura 62 muestran los aductos simples de la mezcla identificada como **C2**, primero se ubica el aducto $[M_1+H]^+$ a $m/z = 187.0391$, y a continuación el aducto $[M_1+Na]^+$ con una masa de 209.0211. El valor del peso molecular calculado para $C_{11}H_6NaO_3$ es 209.020915 lo cual concuerda con el peso molecular del segundo aducto indicado anteriormente. Se propone por lo tanto la fórmula molecular $C_{11}H_6O_3$ para el compuesto **C2-A**, después de substraer un átomo de Na, respectivamente. Por otra parte, también se ubicó el aducto $[M_2+H]^+$ a $m/z = 217.0497$ además del aducto $[M_2+Na]^+$ a $m/z = 239.0318$. Los valores de peso molecular calculados para $C_{12}H_9O_4$ y para $C_{12}H_8NaO_4$ son 217.04953 y 239.0314, respectivamente, lo cual concuerda con el peso molecular de los dos primeros aductos

indicados arriba. Se propone por lo tanto la fórmula molecular $C_{12}H_8O_4$ para el compuesto **C2-B**, después de sustraer un átomo de H o de Na, respectivamente.

Aparte de la información antes descrita es importante mencionar que la mezcla que conforma **C2** no sólo está formada por dos compuestos sino que también están presentes otros compuestos en una menor cantidad a los cuales no fue posible determinar su peso.

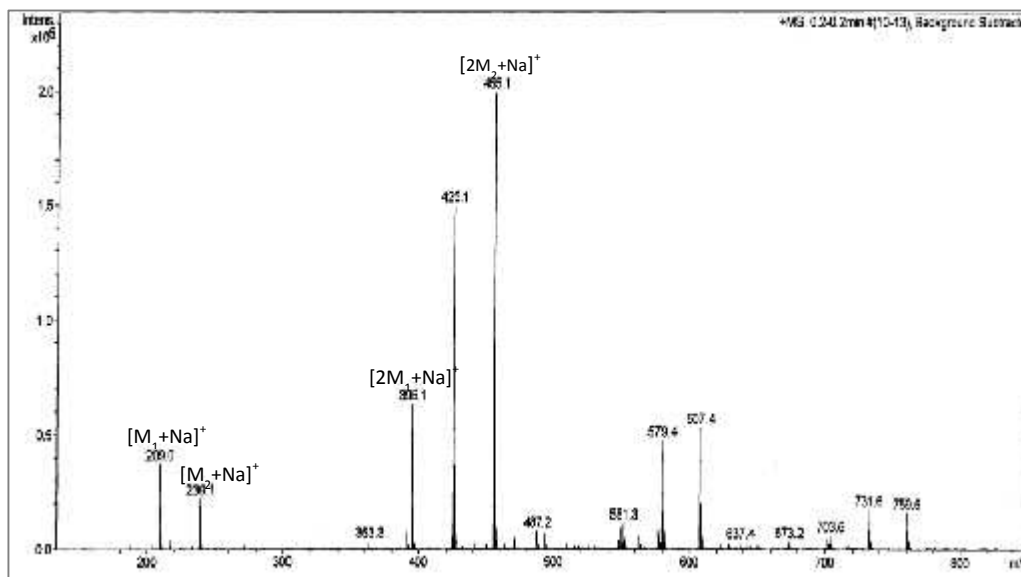


Figura 61. Espectro de masas ((+)-ESI-MS) de **C2**.

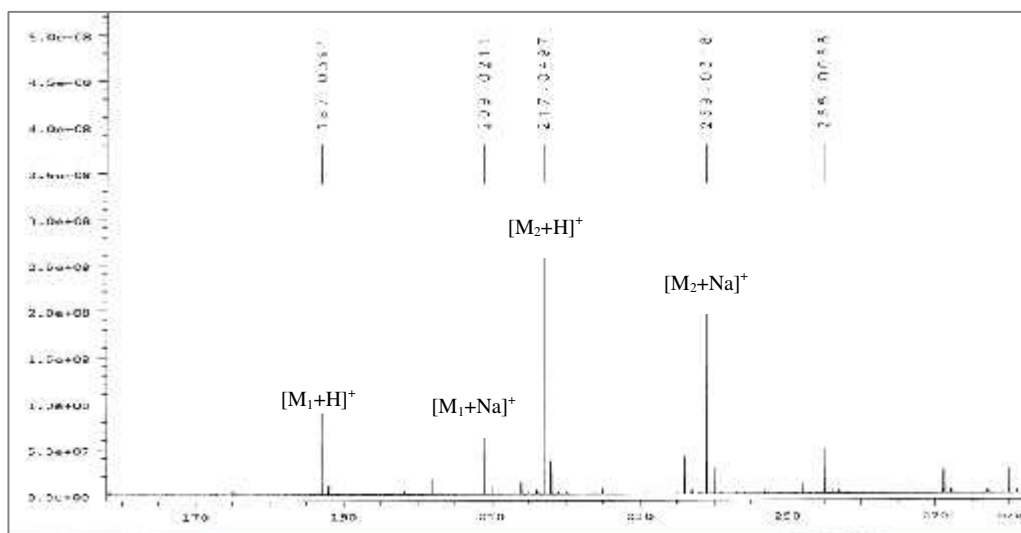


Figura 62. Espectro de masas ((+)-HR-ESI-MS) de **C2**.

6.8.2.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

Para el análisis estructural de los compuestos que conforman **C2** se hizo uso de análisis de RMN de una dimensión y de dos dimensiones.

En la figura 99 se observa el espectro de ^1H -RMN en el cual en primera instancia se identificó la señal del solvente sin deuterar (CHCl_3) 7.27 ppm. Después de descartar la señal del solvente, se observan 17 señales (de la señal A a la señal P), distribuidas tanto en el área de hidrógenos aromáticos como en el área de alifáticos. Al realizar el cálculo de integración de cada una de las señales se observan dos conjuntos de señales en donde para cada conjunto se observa un factor de integración similar, indicando la presencia de más de un compuesto, información ya proporcionada por el análisis de espectrometría de masas, sin embargo en el espectro de ^1H -RMN se observan señales para un tercer compuesto; para los dos primeros sus señales de protones se encuentran situadas principalmente en el área de aromáticos en tanto para el tercero sus señales mayoritariamente pertenecen al área de alifáticos. Una vez identificadas las señales pertenecientes a cada uno de los tres compuestos que conforman esta mezcla se procede a describirlos por separado.

Las señales A, E, G, H, K, L pertenecen al conjunto cuyo factor de integración indica que se encuentra en menor proporción en la mezcla y corresponden al compuesto de peso molecular de 216.0 uma (**C2-B**). La señal del protón A representada con un doblete $A = 8.15$ y $J = 9.82$ Hz se encuentra acoplada con la señal del protón K a $\delta = 6.28$, la cual tiene el mismo valor de la constante de acoplamiento y similar multiplicidad, por lo que se deduce que la señal A y la señal K son protones vecinos.

C e I a = 7.70 y 6.84 el cual es posible confirmar con el acoplamiento que se observa en el espectro de COSY, ver figura 64. También están presentes dos singuletes representados en las señales D y F a = 7.69 y 7.48, las cuales representan dos protones aislados dentro del sistema de resonancia además es importante notar la ausencia de señal para O-CH₃, ver tabla 72.

Las señales pertenecientes al tercer compuesto son M, N, Ñ, O y P, las cuales representan solamente protones alifáticos. Las señales M, N y Ñ a = 2.35, 2.02 y 1.63 representan grupos metilenos desapantallados por lo que se encuentran unidos o cerca a grupos electronegativos, la señal M a un grupo carbonilo y la señal N a un doble enlace. La señal P a = 0.86 representa a un grupo metilo y la señal O a = 1.28 representa grupos metilenos pertenecientes a una larga cadena de átomos de carbono.

| Señal | (ppm) | Multiplicidad | J(Hz) | Señal | (ppm) | Multiplicidad | J(Hz) |
|----------|-------|---------------|-------|----------|-------|---------------|--------------|
| A | 8.15 | d | 9.82 | J | 6.39 | d | 9.57 |
| B | 7.81 | d | 9.57 | K | 6.28 | d | 9.82 |
| C | 7.70 | d | 2.27 | L | 4.27 | s | |
| D | 7.69 | m | | M | 2.35 | t | 7.43 7.43 |
| E | 7.59 | d | 2.01 | N | 2.02 | m | |
| F | 4.48 | s | | Ñ | 1.63 | m | |
| G | 7.13 | s | | O | 1.28 | m | |
| H | 7.02 | d | 1.26 | P | 0.86 | m | |
| I | 6.84 | d | 1.01 | | | | |

Tabla 72. Resumen de señales de ¹H-RMN de **C2**.

A la mezcla de compuestos identificados como **C2** se les realizó un análisis con la técnica bidimensional de COSY. De este análisis se obtuvo la confirmación de los acoplamientos ya descritos entre las señales A-K y E-H para el compuesto de fórmula molecular C₁₂H₈O₄ (PM = 216.0 uma) así como entre las señales B-J, C-I para el

compuesto de fórmula molecular $C_{11}H_6O_3$ (PM = 186 uma). También es posible observar los acoplamientos que se dan en el tercer compuesto presente en **C2** (los cuales no era posible apreciar en el espectro de protones) entre las señales M-Ñ, N-O y O-P, ver figura 64. A continuación se muestra una tabla con el resumen de la información obtenida del espectro COSY.

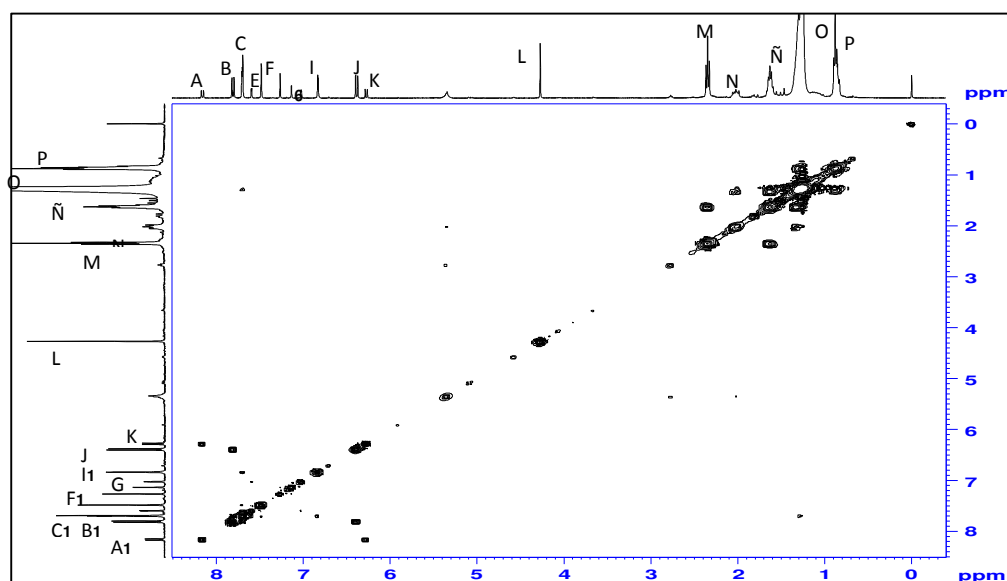


Figura 64. Espectro general de COSY de **C2** en $CDCl_3$.

| Señal | Acoplamiento | Señal | Acoplamiento |
|----------|--------------|----------|--------------|
| A | K | J | B |
| B | J | K | A |
| C | I | L | |
| D | | M | Ñ |
| E | H | N | O |
| F | | Ñ | M |
| G | | O | N, P |
| H | E | P | O |
| I | C | | |

Tabla 73. Resumen de señales de COSY de **C2**.

En el análisis de ^{13}C -RMN se pueden identificar 36 señales pertenecientes a los tres compuestos mayoritarios, ver figura 101. Para su análisis en primera instancia se descarta la señal del solvente que aparece entre 76.70 y 77.33 ppm, correspondiente al cloroformo.

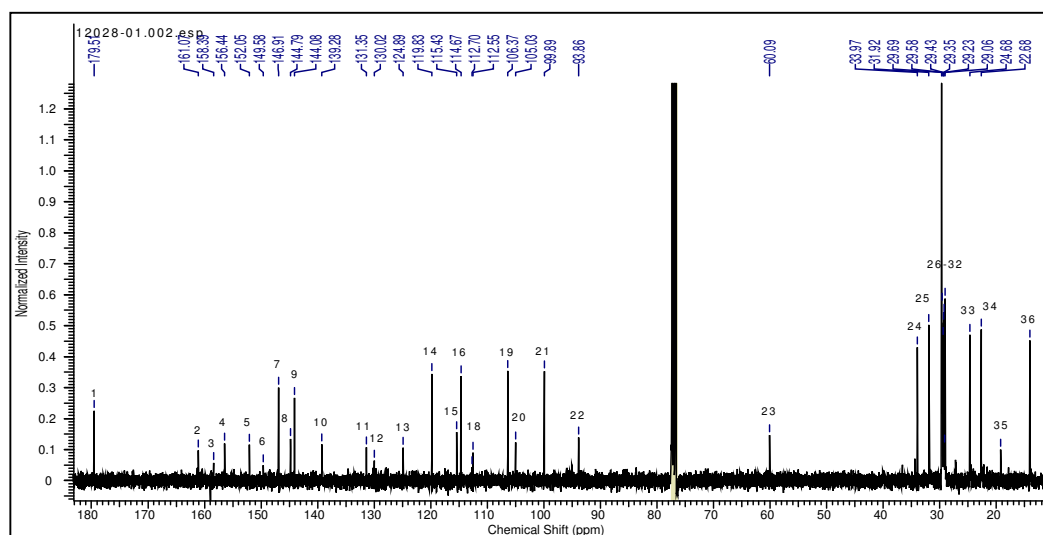


Figura 65. Espectro de ^{13}C -RMN de C2 en CHCl_3 .

Basándonos en la información que proporcionan análisis adicionales como el DEPT-135 y HSQC (ver figura 66 y 67) se pudo clasificar las señales de acuerdo al tipo de carbono o al grupo al cual pertenece.

Las primeras 6 señales a campo bajo corresponden a carbonos cuaternarios probablemente unidos a átomos de oxígeno. El carbono 1 pertenece a un grupo carbonilo de cetona, el cual recibe influencia de un doble enlace en posición α al carbonilo lo que provoca un desplazamiento químico a campos altos de lo normal.

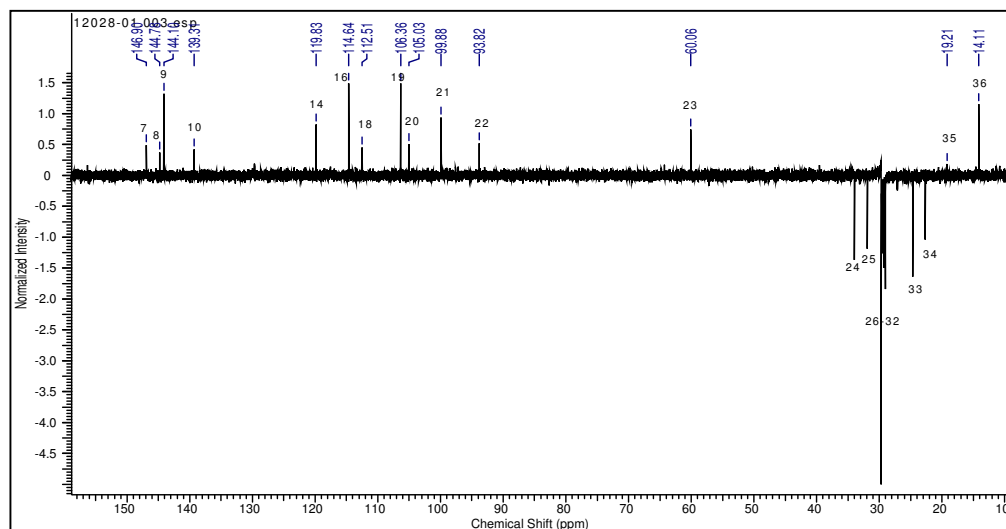


Figura 66. Espectro de DEPT-135 de C2 en CDCl_3 .

El carbono 2 representa un grupo carbonilo pero de una lactona por lo que su desplazamiento químico es menor al del carbono 1. Los carbonos 3, 4 y 5 son carbonos que se encuentran unidos a los átomos de oxígeno con hibridación sp^3 del grupo lactónico en tanto el carbono 6 se encuentra formando un enlace éter con el oxígeno unido al grupo carboxilo de la lactona. También las señales 11, 12, 13, 15 y 17 corresponden a carbonos cuaternarios. Los grupos metinos de anillos aromáticos están representados por las señales 7-10, 14, 16, 18, 19, 20, 21 y 22, mientras que las señales 24 a 34 corresponden a grupos metilentos de naturaleza alifática. La señal del carbono 23 corresponde a un grupo metoxilo y la señal de los carbonos 35 y 36 pertenecen al compuesto alifático de la mezcla, ver tabla 74.

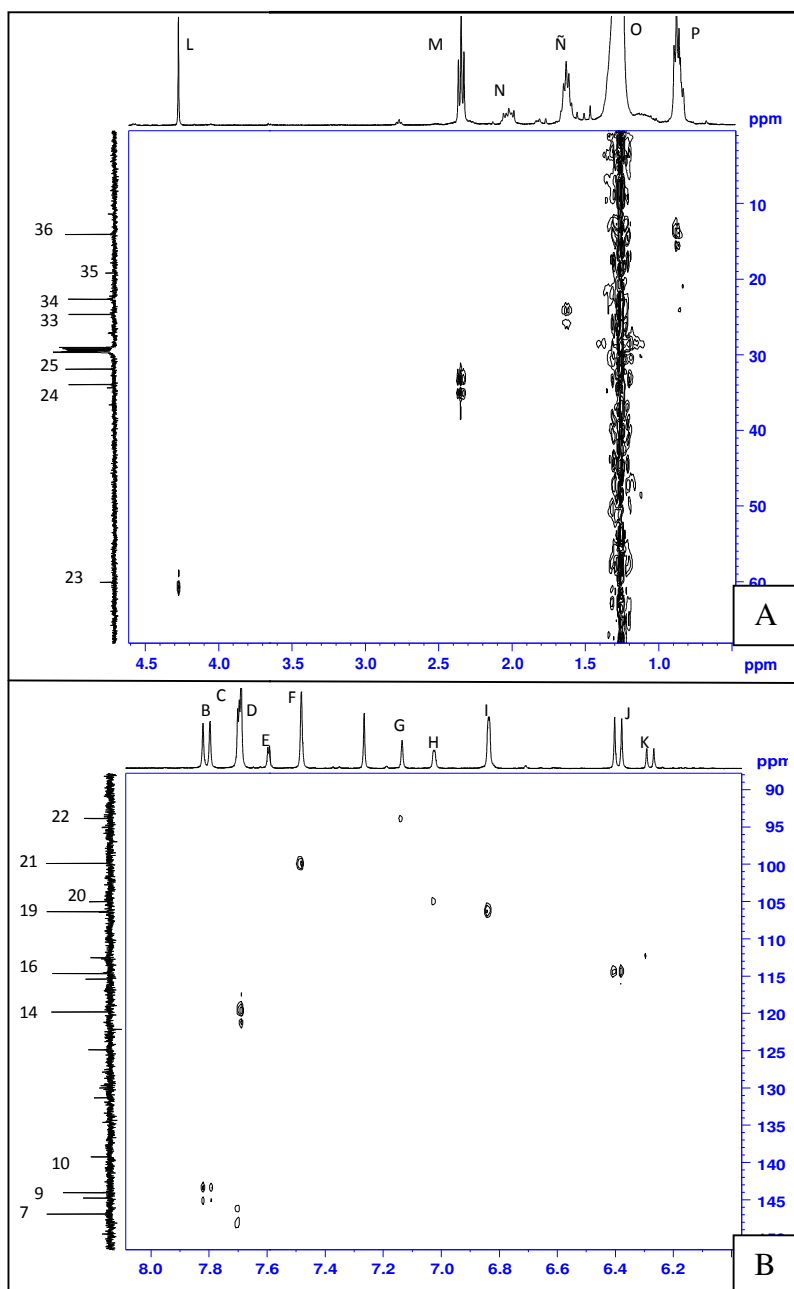


Figura 67. Espectro de HSQC de $\text{C}2$ en C D C l_3 . A, ampliación de la región de alifáticos. B, ampliación de la región de aromáticos

También se realizó un análisis de HMBC para el correcto análisis del espectro de ^{13}C -RMN con el cual se logró determinar cuáles señales corresponden a determinado compuesto, por lo que se pudo determinar que las señales 2, 4, 5, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 19 y 21 pertenecen al compuesto de menor peso molecular mencionado en el apartado

6.8.2.1. Por otra parte las señales 2, 3, 5, 6, 8, 10, 17, 18, 19, 20, 22 y 23 pertenecen al compuesto de mayor peso molecular mencionado en el apartado antes descrito. Finalmente también se identificaron las señales pertenecientes al compuesto alifático evidenciado en el espectro de protones, este está compuesto por las señales 1, 11, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 y 36, ver figura 68 y tabla 74.

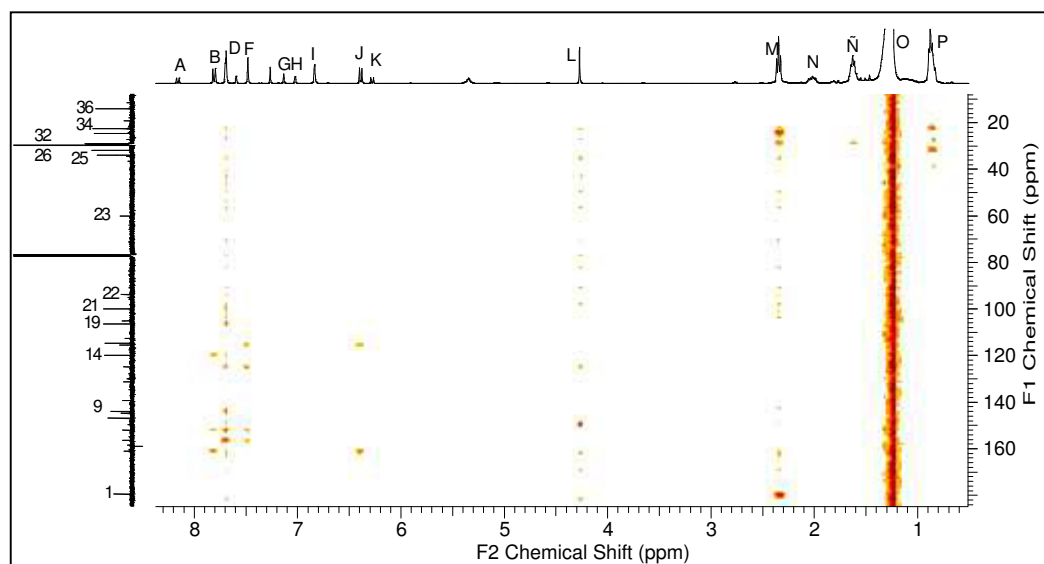


Figura 68. Espectro de HMBC de **C2** en CDCl_3 .

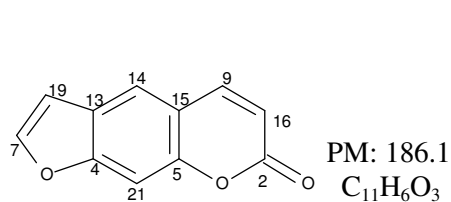
En base a la información recopilada del análisis de espectrometría de masas y de resonancia magnética nuclear se llegó a la conclusión que los tres compuestos de la mezcla identificada como **C2** son el compuesto *7H*-Furo[3,2-*g*]cromen-7-ona, nombre común psoraleno con una peso molecular de 186.0313 (**C2-A**) y el compuesto 5-metoxi-*2H*-furo[3,2-*g*]cromen-2-ona, nombre común bergapteno con un peso molecular de 216.0417 (**C2-B**) (Tian-shung *et al.*, 2003; Chunyen *et al.*, 2009; Intekhab and Aslam, 2009). Con respecto al compuesto de naturaleza alifática no fue posible determinar

completamente su estructura, sin embargo se pudo concluir que probablemente se trata de una cetona, α,β -insaturada de 15 átomos de carbono.

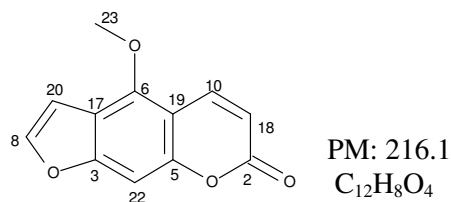
| Señal | (ppm) | C(tipo) | HMBC | ^1H |
|-------|--------|---------|-----------------|--------------|
| 1 | 179.51 | Cq | | |
| 2 | 161.07 | Cq | | |
| 3 | 158.39 | Cq | | |
| 4 | 156.44 | Cq | | |
| 5 | 152.05 | Cq | | |
| 6 | 149.58 | Cq | | |
| 7 | 146.91 | CH | 13, 9, 5, 4 | C |
| 8 | 144.79 | CH | 17, 3 | E |
| 9 | 144.08 | CH | 14, 5, 2 | B |
| 10 | 139.28 | CH | 6, 5, 2 | A |
| 11 | 131.35 | Cq | | |
| 12 | 130.02 | Cq | | |
| 13 | 124.89 | Cq | | |
| 14 | 119.83 | CH | 21, 19, 9, 5, 4 | D |
| 15 | 115.43 | Cq | | |
| 16 | 114.67 | CH | 15, 1 | J |
| 17 | 112.70 | Cq | | |
| 18 | 112.56 | CH | 19, 1 | K |

| Señal | (ppm) | C(tipo) | HMBC | ^1H |
|-------|--------|-----------------|--------------|--------------|
| 19 | 106.37 | CH | 13, 7, 4 | I |
| 20 | 105.03 | CH | 17, 8, 3 | H |
| 21 | 99.89 | CH | 15, 13, 5, 4 | F |
| 22 | 93.86 | CH | 19, 17, 3 | G |
| 23 | 60.09 | CH ₃ | 6 | L |
| 24 | 33.97 | CH ₂ | 33, 32-26, 1 | M |
| 25 | 31.92 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 26 | 29.69 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 27 | 29.58 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 28 | 29.43 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 29 | 29.35 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 30 | 29.23 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 31 | 29.13 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 32 | 29.06 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 33 | 24.68 | CH ₂ | 32-26 | Ñ |
| 34 | 22.68 | CH ₂ | 32-26 | O |
| 35 | 19.22 | CH ₃ | 32-26 | O |
| 36 | 14.10 | CH ₃ | 34, 25 | P |

Tabla 74. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC de **C2** en CHCl_3 .



C2-A, Psoraleno



C2-B-Bergapteno

Figura 69. Estructura de los componentes mayoritarios de **C2**.

6.8.3 Análisis espectroscópico del compuesto **C3**

6.8.3.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

Para el análisis de la estructura del compuesto **C3** se empleó la técnica espectroscópica de RMN tanto mono- como bi-dimensional.

En el espectro de ^1H -RMN fue posible ubicar 11 señales identificadas con las letras A hasta K, después de descartar la señal del solvente sin deuterar a 7.26 ppm, ver figura 70. La integración del área bajo las curvas indica un total de 24 hidrógenos para este compuesto.

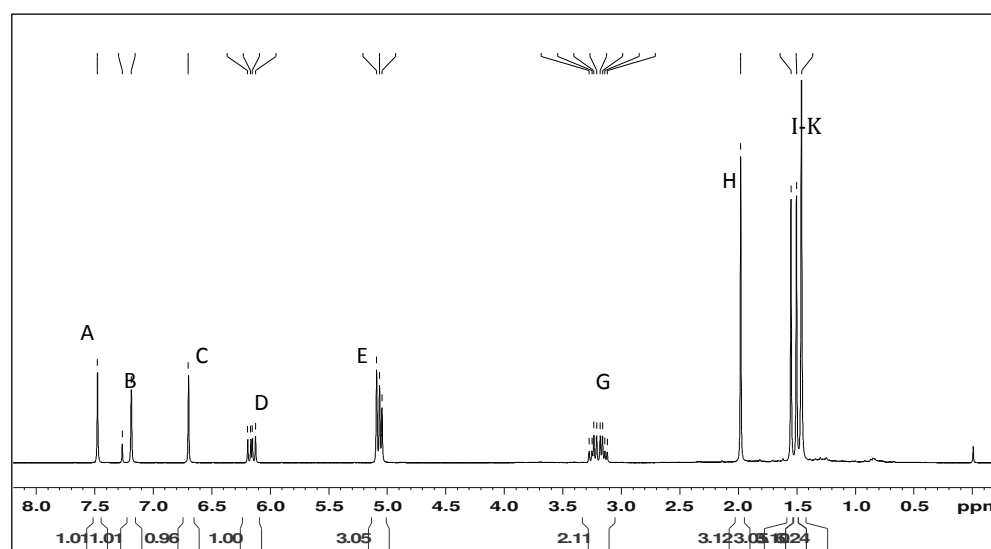


Figura 70. Espectro de ^1H -RMN del compuesto **C3** en CDCl_3

Las señales A, B y C (= 7.47, 7.18 y 6.70) corresponden a protones de grupos metinos de anillos aromáticos presentes en la estructura, protones que a su vez se encuentran aislados por lo que producen singuletes. La señal D (= 6.16), la cual presenta una multiplicidad de doble doblete (dd) forma parte de un sistema ABX donde este protón se acopla con un grupo metileno de forma diferente con cada uno de los hidrógenos que

conforman este grupo. El grupo AB corresponde a un grupo metileno identificado con la señal E ($\delta = 5.08$), la cual de manera recíproca se acopla con la señal D formando un multiplete debido a que no se alcanzó a separar bien la señal E de la señal F. El grupo ABX corresponde a un grupo vinilo terminal mostrando un acoplamiento *trans* y un acoplamiento *cis*.

La señal F ($\delta = 5.04$) con una multiplicidad que sólo fue identificada como multiplete debido a que no alcanzó a separarse de la señal E, representa un grupo metileno que está acoplado a un grupo metileno con hibridación sp^3 que corresponde a la señal G ($\delta = 3.19$), el cual del mismo modo tiene una multiplicidad de multiplete. Es importante mencionar que este segundo acoplamiento forma parte de un anillo de dihidrofurano el cual se encuentra unido a un anillo aromático. Finalmente las señales H, I, J y K ($\delta = 1.98, 1.55, 1.50$ y 1.46) pertenecen a grupos metilos los cuales se diferencian por el entorno químico diferente que los rodean. La señal H pertenece a un metilo de un grupo acetato (CH_3-COO-), siendo esta la razón por la cual se encuentra desplazado hacia campos bajos. Las señales I y J son grupos metilos que se encuentran unidos al carbono al grupo acetato conformando de esta manera el radical etanoato de *iso-prop-2-ilo*. La señal K representa a dos grupos metilos que están dispuestos simétricamente y bajo un mismo entorno químico, ver tabla 75.

| Señal | (ppm) | Mult | J (Hz) | Integración |
|-------|-------|------|----------------------|-------------|
| A | 7.47 | s | | 1 |
| B | 7.18 | s | | 1 |
| C | 6.70 | s | | 1 |
| D | 6.16 | dd | 10.85, 10.86, 17..20 | 1 |
| E | 5.08 | m | | 2 |
| F | 5.04 | m | | 1 |
| G | 3.19 | m | | 2 |
| H | 1.98 | s | | 3 |
| I | 1.55 | s | | 3 |
| J | 1.50 | s | | 3 |
| K | 1.46 | s | | 6 |

Tabla 75. Resumen de señales del espectro de ^1H -RMN de C3.

Se realizó un análisis de COSY con el cual se pudo confirmar el acoplamiento de las señales D-E y F-G, ver figura 71.

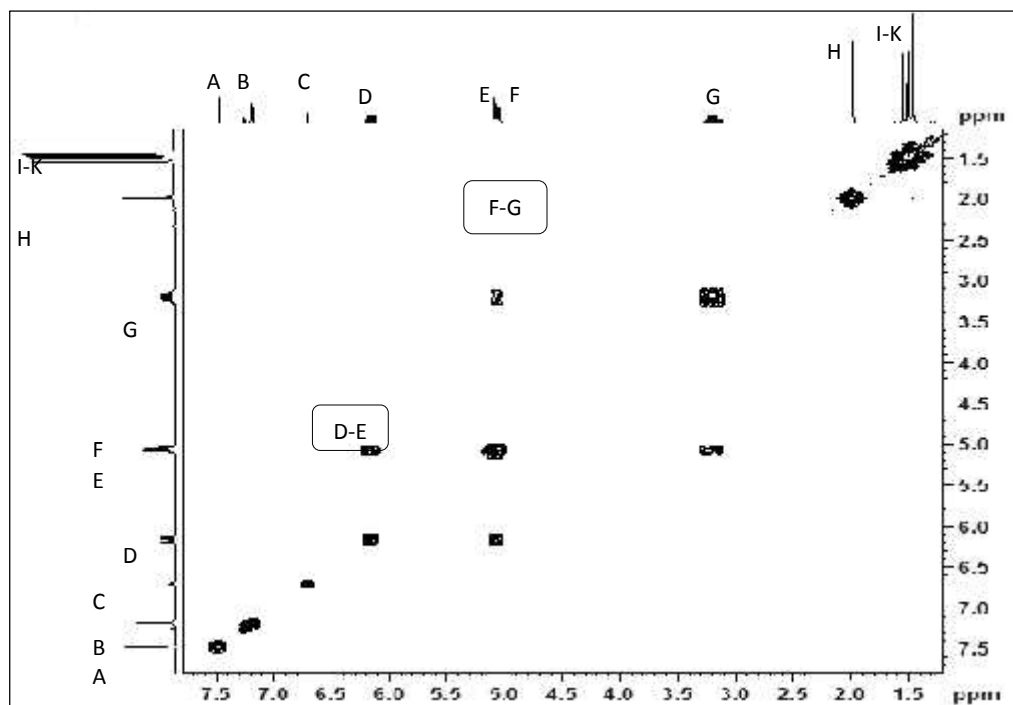


Figura 71. Espectro de COSY de C3 en CDCl_3 .

En la tabla 76 se muestra una lista de los acoplamientos observados en el espectro COSY.

| Señal | Acoplamiento | Señal | Acoplamiento |
|----------|--------------|----------|--------------|
| A | | G | F |
| B | | H | |
| C | | I | |
| D | E | J | |
| E | D | K | |
| F | G | | |

Tabla 76. Resumen de señales del espectro COSY de **C3**.

Continuando con la elucidación estructural del compuesto **C3** se procedió a realizar un análisis de ^{13}C -RMN, ver figura 72, en el cual hace evidente la presencia de impurezas, sin embargo con el empleo de otras técnicas bidimensionales se logró identificar 20 señales pertenecientes al compuesto, además de descartar las señales de impurezas y del solvente sin deuterar con un desplazamiento que va de 77.35 a 76.72 ppm (CDCl_3).

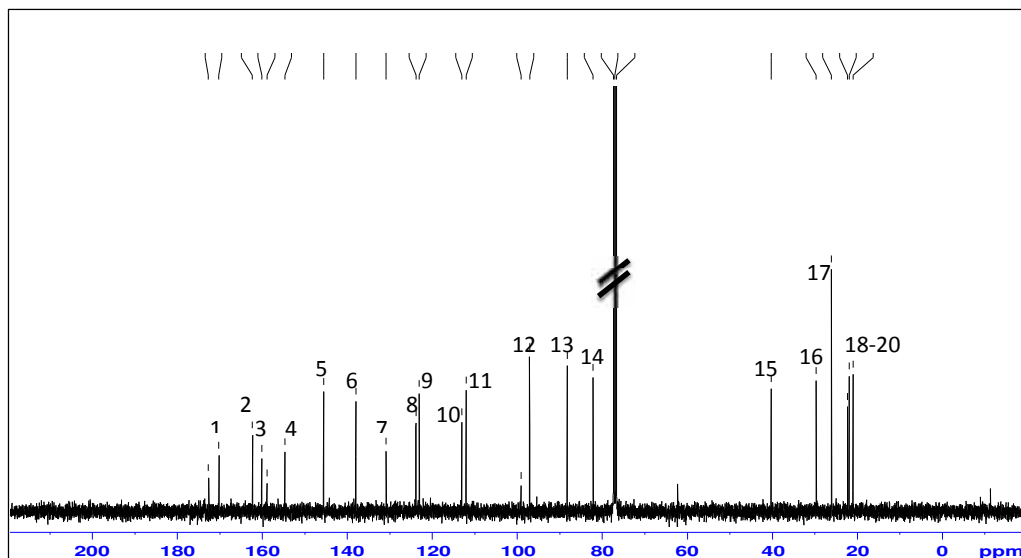


Figura 72. Espectro de ^{13}C -RMN de **C3** en CDCl_3 .

Las señales 1 y 2 son evidencia de la presencia de grupos carbonilo. La señal 1 corresponde a un carbonilo de un grupo acetato y la señal 2 pertenece al carbonilo que forma parte de un grupo lactona dentro de un sistema aromático. Las señales 3, 4, 13 y 14, aunque están en diferentes regiones del espectro y por ende diferente entorno químico, se encuentran enlazadas a átomos de oxígeno; la señal 3 al oxígeno del grupo lactona, las señales 4 y 13 unidas al átomo de oxígeno de un anillo de furano y la señal 14 unida al oxígeno del grupo acetato.

Basándonos en la información de análisis adicionales como el DEPT-135 y HSQC (figura 73 y 74) se clasificó el tipo de carbono al cual pertenece determinada señal, de esta manera se dedujo que las señales 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10, 14 y 15 corresponden a carbonos cuaternario (las señales 1 y 2 de carbonilos, las señales 3, 4, 7, 8, y 10 pertenecen a anillos aromáticos y las señales 14 y 15 son carbonos alifáticos).

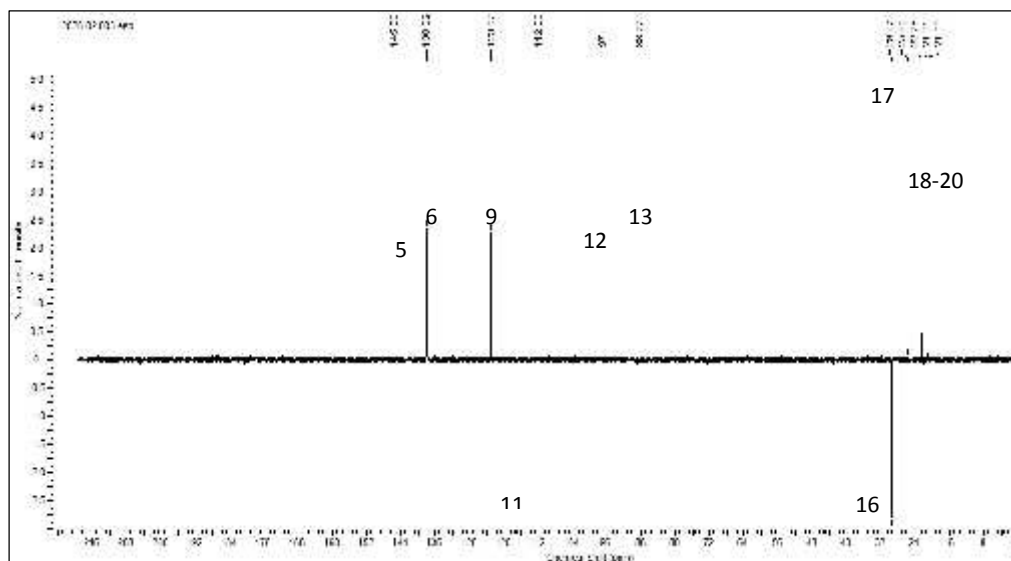


Figura 73. Espectro de DEPT-135 de C3 en CDCl₃.

Las señales 5, 6, 9 y 12 corresponden a grupos metino los cuales forman parte de los anillos aromáticos y del doble enlace terminal evidenciado en el análisis de ^1H -RMN. También se identificó que la señales 11 y 16 corresponde a grupos metileno perteneciendo el primero al doble enlace terminal y el segundo al anillo de dihidrofurano; finalmente las señales 17, 18, 19 y 20 corresponden a grupos metilo observándose diferencias entre éstos debido a que la señal 18 pertenece al grupo acetato y su desplazamiento a campos bajos se debe a la influencia del grupo carbonilo. Las señales 19 y 20 forman parte del radical etanoato de *iso*-prop-2-ilo sin embargo no se encuentran dentro del mismo entorno químico al estar en posición a un carbono quiral. La señal 17 representa a 2 grupos metilo, los cuales están situados dentro del mismo entorno químico en forma simétrica en un segundo radical, ver tabla 77.

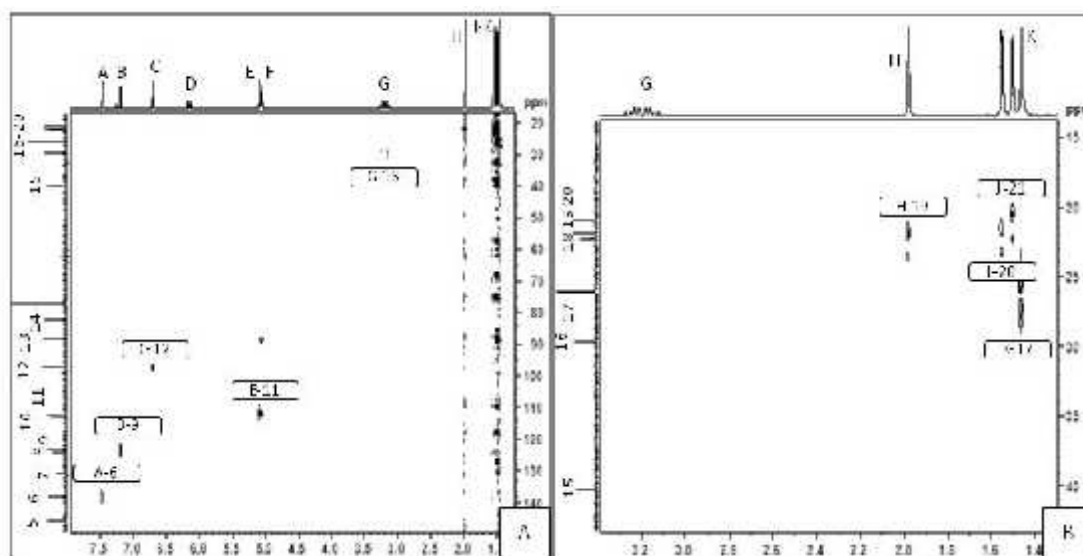
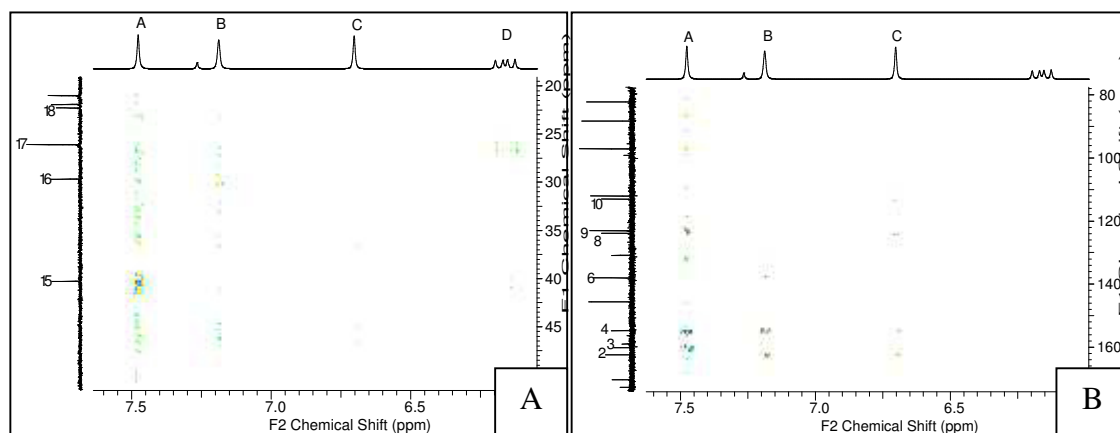


Figura 74. Espectro de HSQC de C3 en CDCl_3 , A, espectro general de HSQC. B, ampliación del área alifática del espectro de HSQC ^1H : 1.4-3.2 ppm ^{13}C : 15-45 ppm.

Con la información que proporciona la técnica de HMBC se pueden confirmar acoplamiento C-H a dos o tres enlaces (ver figura 75) y permite las siguientes

interpretaciones: las señales de carbono 2, 3, 6, 7 y 8 conforman un anillo heterocíclico, el cual contiene el grupo lactona. Las señales 3, 4, 8, 9, 10 y 12 conforman un anillo aromático el cual está unido por los carbonos 3 y 8 al heterociclo; además de estos anillos también está presente un anillo de dihidro-furano conformado por los carbonos 4, 10, 13 y 16 unido al anillo aromático por los carbonos 4 y 10. Al unir los ciclos antes mencionados es posible formar un núcleo de psoraleno. Los acoplamientos observados en la técnica de HMBC entre las señales de los protones F, H, I y J con las señales de los carbonos 1, 13, 14, 18,19, y 20 permite describir la presencia de un radical acetato de propan-2-ilo el cual está enlazado al anillo de furano por el carbono 13. De igual forma las señales D, E y K se acoplan con los carbonos 5, 11, 15 y los dos grupos metilo de la señal 17 conformando el radical que posee al doble enlace terminal, este radical se identificó como 2-metilbut-3-en-2-ilo, el cual se encuentra enlazado al heterociclo de 6 átomos en el carbono al carbonilo, ver tabla 77.



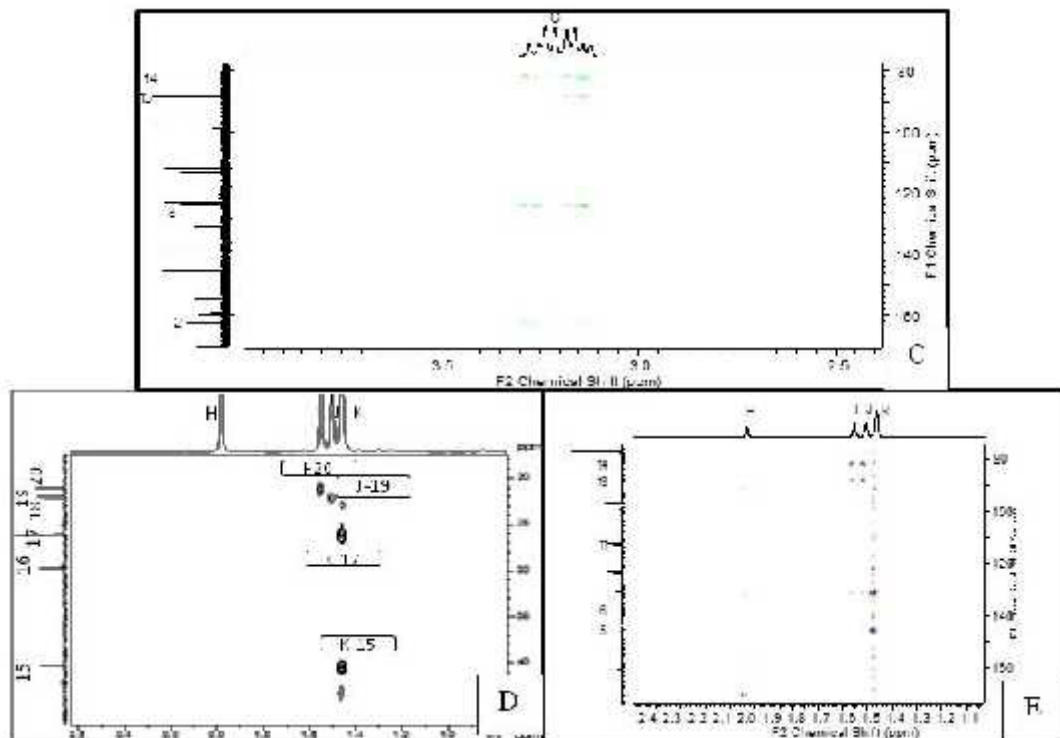


Figura 75. Espectro de HMBC de **C3** en CDCl_3 , A, ampliación del espectro de HMBC en la región de aromáticos, ^1H : 7.8-6.0 ppm ^{13}C : 20-50 ppm. B, ampliación del espectro de HMBC en la región de aromáticos, ^1H : 7.8-6.0 ppm ^{13}C : 80-175 ppm. C, ampliación de la región de alifáticos, ^1H : 2.6-4.0 ppm ^{13}C : 80-175 ppm. D, ampliación de la región de alifáticos, ^1H : 0.5-2.6 ppm ^{13}C : 20-50 ppm. E, ampliación de la región de alifáticos, ^1H : 1.0-2.5 ppm ^{13}C : 80-175 ppm.

| Señal | (ppm) | C (tipo) | HMBC | H | Señal | (ppm) | C (tipo) | HMBC | H |
|-------|--------|----------|-----------------|---|-------|--------|-----------------|--------------|---|
| 1 | 170.26 | Cq | | | 11 | 112.07 | CH_2 | 15 | E |
| 2 | 162.41 | Cq | | | 12 | 97.12 | CH | 10, 8, 4, 2 | C |
| 3 | 160.16 | Cq | | | 13 | 88.27 | CH | | F |
| 4 | 154.72 | Cq | | | 14 | 82.19 | Cq | | |
| 5 | 145.60 | CH | 17, 15 | D | 15 | 40.29 | Cq | | |
| 6 | 138.02 | CH | 15, 12, 9, 4, 3 | A | 16 | 29.68 | CH_2 | 14, 13, 8, 2 | G |
| 7 | 130.86 | Cq | | | 17 | 26.10 | 2 CH_3 | 17, 15, 7, 5 | K |
| 8 | 123.88 | Cq | | | 18 | 22.28 | CH_3 | 1 | H |
| 9 | 123.07 | CH | 16, 6, 4, 2 | B | 19 | 21.93 | CH_3 | 20, 14, 13 | I |
| 10 | 113.07 | Cq | | | 20 | 21.01 | CH_3 | 19, 14, 13 | J |

Tabla 77. Resumen de señales de los espectro ^{13}C -RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC de **C3**.

Tomando en cuenta toda la información proporcionada por las diversas técnicas de RMN se confirmó la estructura del compuesto como Acetato de propan-2-il(2-[6-(2-metilbut-3-en-2-il)-7-oxo-2,3-dihidrofurano[3,2-g]cromen-2-il]) llamado comúnmente rutamarina, con una fórmula molecular de $C_{21}H_{24}O_5$ (Tian-Shung et al., 2003) ver figura 76.

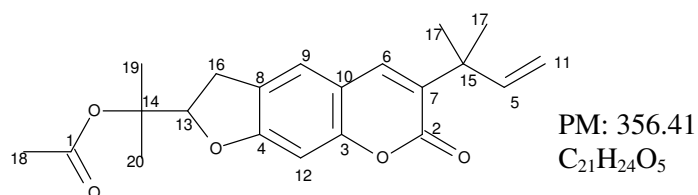


Figura 76. Rutamarina.

6.8.4 Análisis espectroscópico del compuesto **C4**.

6.8.4.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de 1H -RMN del compuesto **C4** (ver figura 77) concuerda completamente con el espectro de 1H -RMN del compuesto **C1** (ver figura 55), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C4** por lo tanto es identificado también como chalepensina, descrita en la sección 6.8.1.2, figura 60.

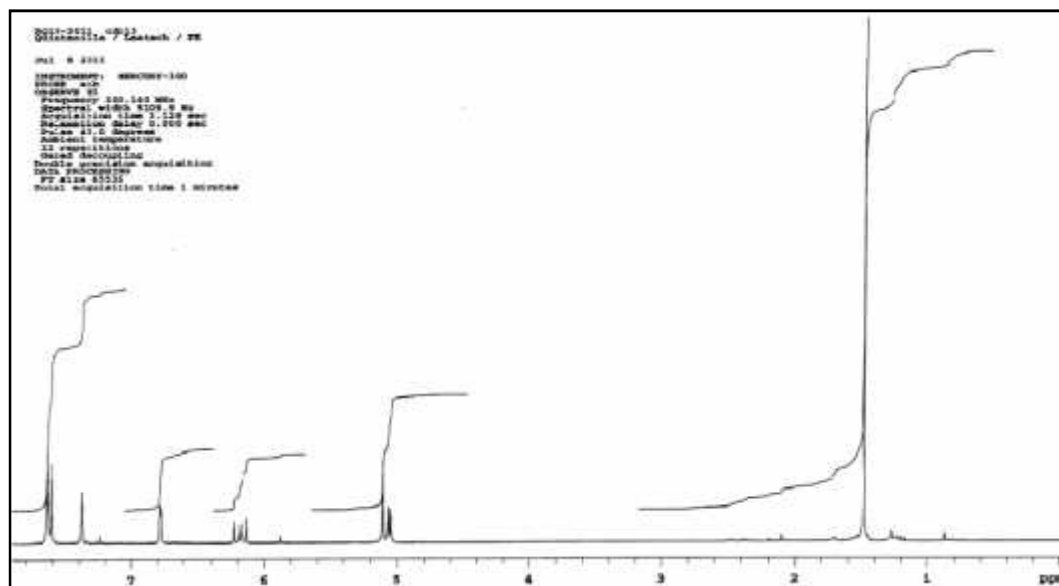


Figura 77. Espectro general de ¹H-RMN del compuesto **C4** en CDCl₃.

6.8.5 Análisis espectroscópico del compuesto **C5**

6.8.5.1 Espectrometría de Masas

El estudio de espectrometría de masas de **C5** por el método de ionización por electrospray permitió ubicar los aductos [M+H]⁺ a $m/z = 280.1$, [M+Na]⁺ a $m/z = 302.1$, [2M+H]⁺ a $m/z = 559.2$, [2M+Na]⁺ a $m/z = 581.2$ y [3M+Na]⁺ a $m/z = 860.3$. La presencia de estos iones en el espectro de masas permite deducir el peso molecular del compuesto **C5** en 279 uma, al substrar el peso atómico de un átomo de hidrógeno o de sodio, respectivamente, ver figura 78. La masa impar de este compuesto indica la presencia de nitrógeno en su estructura.

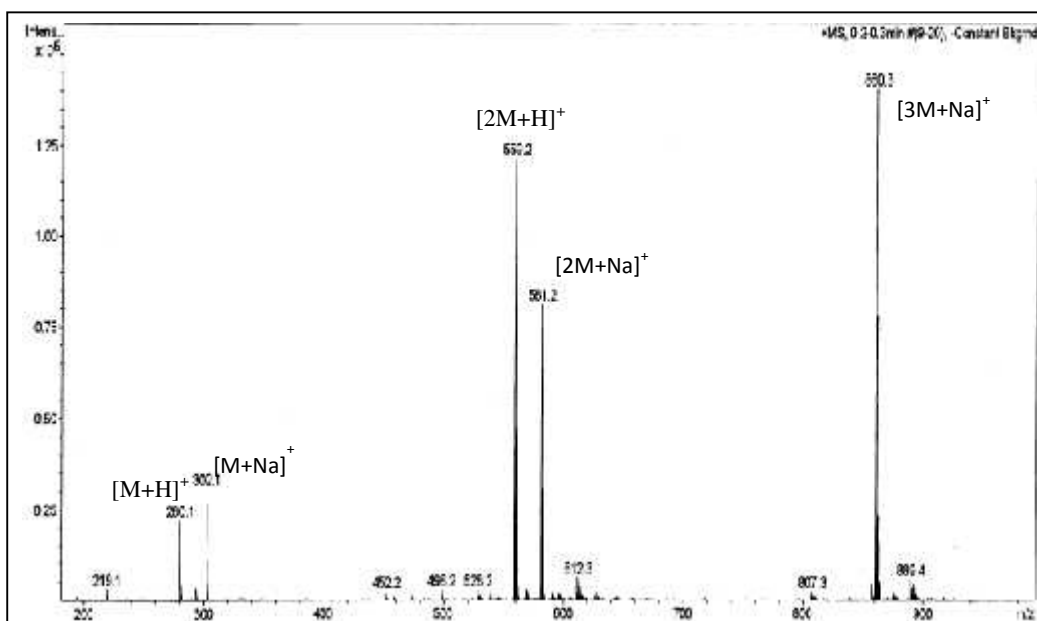


Figura 78. Espectro de masas (+)-ESI-MS de C5.

Aparte de este análisis se realizó un estudio de (+)-ESIHR-MS observando para los aductos $[M+Na]^+$ y $[3M+Na]^+$ un peso de 302.0786 y 860.2604 una respectivamente. También se observan los aductos $[M+H]^+$ y $[2M+H]^+$ con pesos de 280.0975 y 559.1879 uma. Los valores de peso molecular calculados para $C_{17}H_{14}NO_3$ y para $C_{17}H_{13}NaNO_3$ son 280.0968 y 302.0788, respectivamente, lo cual concuerda con el peso molecular de los aductos $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$ indicados arriba. Se propone por lo tanto la fórmula molecular $C_{17}H_{13}NO_3$ para el compuesto **C5**, después de substrair un átomo de H o de Na, respectivamente.

Con esta información del espectro de (+)-ESIHR-MS se concluye que el peso del compuesto es de 279.089 calculado para la fórmula molecular de $C_{17}H_{13}NO_3$, ver figura 79.

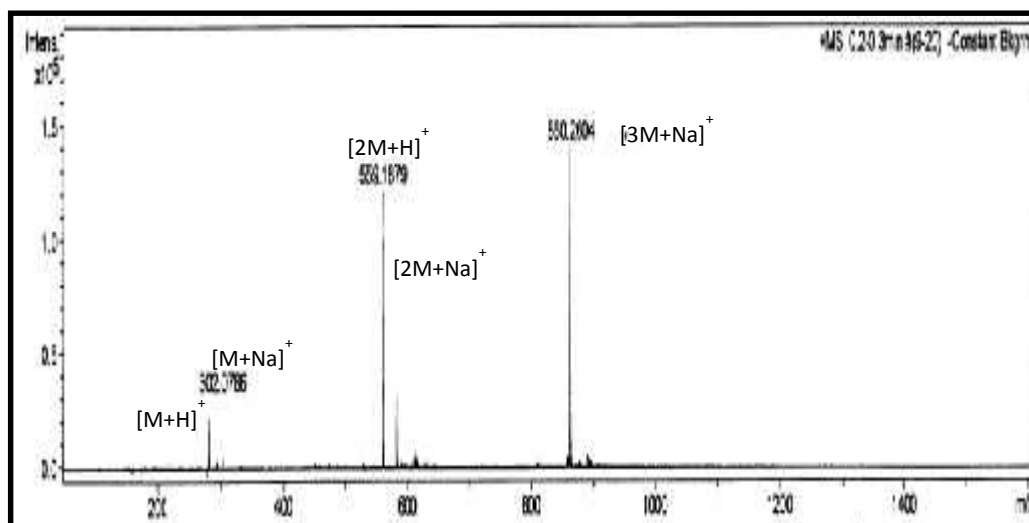


Figura 79 Espectro de masas (+)-HRESI-MS de **C5**.

6.8.5.2 Resonancia Magnética Nuclear

En el espectro de ^1H -RMN de **C5** se identificaron 10 señales, 9 en el área de protones aromáticos y una en el área de protones alifáticos, identificándolas con las letras A a la letra J, ver figura 80. A continuación se muestra la descripción de cada señal. En primera instancia se identificaron las señales que integran para 1 hidrogeno las cuales representan grupos metino, estas señales fueron A, B, C, D, E, F, G y H teniendo cada una de estas las siguientes características. La señal A la cual tiene una multiplicidad de doblete y representa un protón el cual se acopla con la señal D, la cual a su vez se acopla con la señal B razón la cual la señal D tiene una multiplicidad de triplete. Del mismo modo existe un acoplamiento entre el multiplete de la señal B y el doblete de la señal C.

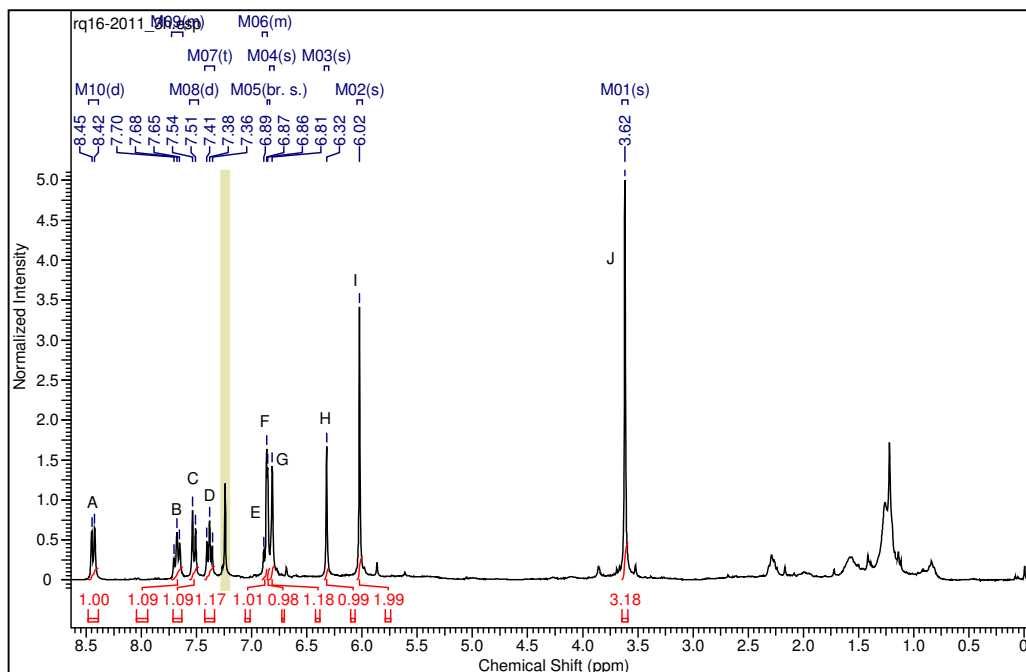


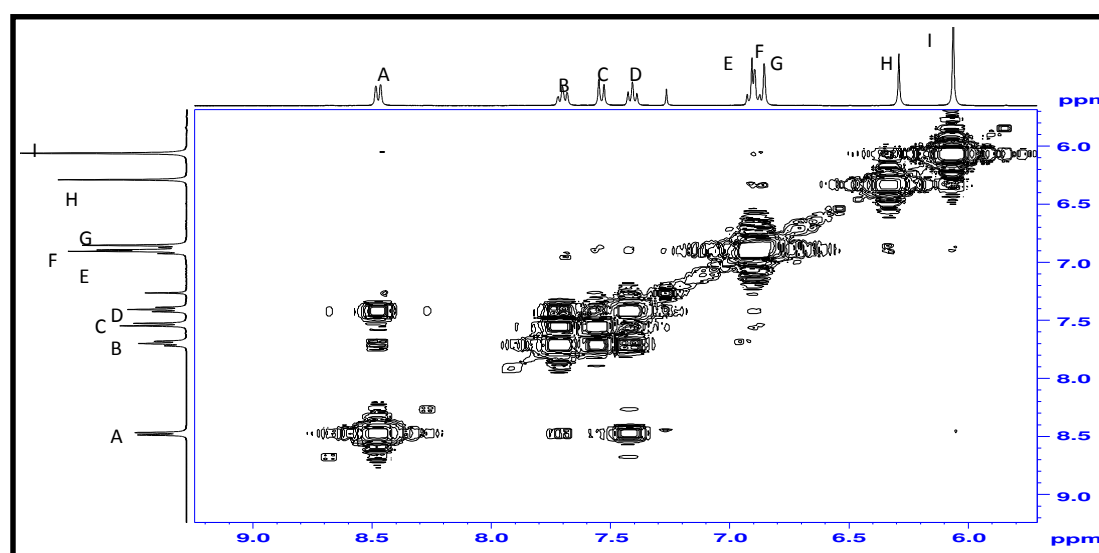
Figura 80. Espectro de ^1H -RMN de **C5** en CDCl_3

Los múltiples acoplamiento entre las señales A, B, C y D evidencia que los protones están posicionados sobre el mismo anillo aromático y que no se encuentran aislados. Por otra parte las señales E, F y G se encuentran representadas por una multiplicidad de multiplete debió a que sus señales no se alcanzaron a desdoblar, no así la señal H la cual claramente se identifica como singulete demostrando un protón aromático aislado. También se identificó un grupo metileno representado por la señal I, sin embargo aunque el desplazamiento químico de esta señal se encuentra en el área de aromáticos, se trata de un carbono con hibridación sp^3 , el cual se encuentra entre dos átomos de oxígeno formando un grupo dioximetileno, ver tabla 78.

| Señal | (ppm) | Multiplicidad | J (Hz) | Integración |
|-------|-------|---------------|--------------|-------------|
| A | 8.44 | d | 7.80 | 1H |
| B | 7.68 | m | | 1H |
| C | 7.52 | d | 8.42 | 1H |
| D | 7.38 | t | 7.49 7.49 | 1H |
| E | 6.88 | m | | 1H |
| F | 6.86 | m | | 1H |
| G | 6.81 | s | | 1H |
| H | 6.32 | s | | 1H |
| I | 6.02 | s | | 2H |
| J | 3.62 | s | | 3H |

T a b l a 7 8 . Resumen de señales de ^1H -RMN de c_5 .

Para realizar un mejor análisis de los protones con que cuenta la estructura en estudio se obtuvo un espectro por la técnica de COSY (figura 81), logrando identificar los protones que son vecinos a 2 o 3 enlaces al poder observar los acoplamientos entre éstos. Se confirmaron los acoplamientos antes mencionados en el espectro de ^1H -RMN entre las señales A, B, C y D y se logran ver acoplamientos a largo alcance entre los protones A con el protón B. Se observa un acoplamiento a 3 enlaces entre las señales G y F y un acoplamiento a largo alcance entre los protones E y F, ver tabla 79.



F i g u r a 8 1 . Espectro de COSY de c_5 en CDCl_3

| Señal | Acoplamiento |
|-------|--------------|
| A | B, D |
| B | A, D, C |
| C | B |
| D | A, B |
| E | F |
| F | E,G |
| G | F |
| H | |
| I | |
| J | |

Tabla 79. Resumen de señales de COSY de **C5**

En el espectro de ^{13}C -RMN de **C5** se observan 17 señales pertenecientes al compuesto mayoritario, ya que tanto en este espectro como en el de ^1H -RMN es evidente la presencia de otros compuestos en pequeñas cantidades, los cuales se tomaron como contaminación, ver figura 82.

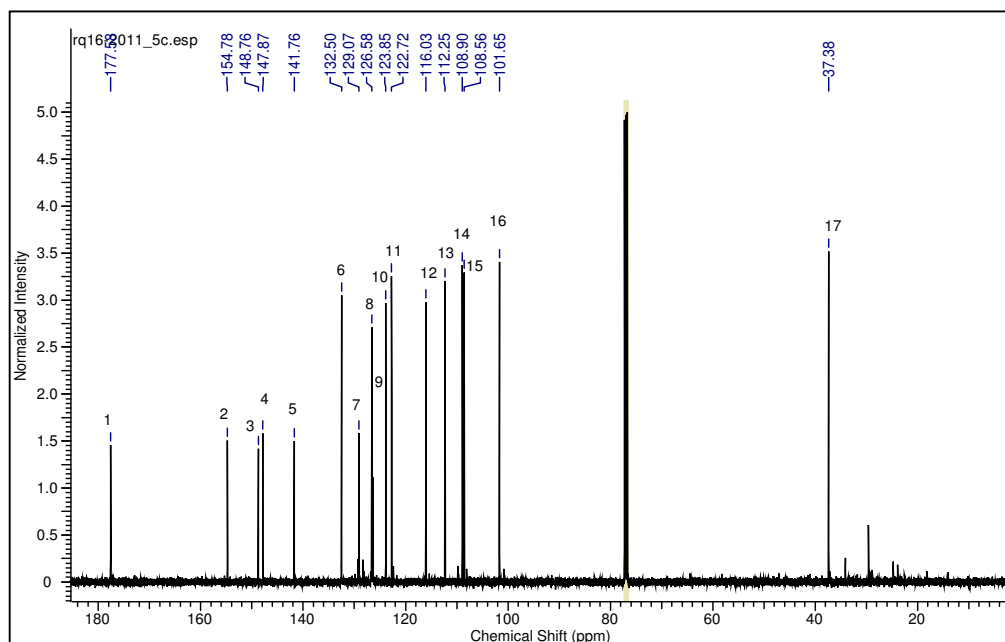


Figura 82. Espectro de ^{13}C -RMN de **C5** en CDCl_3 .

Es posible observar que la mayoría de las señales tienen un desplazamiento químico dentro del área de carbonos aromáticos, solamente la señal 17 tiene un desplazamiento químico dentro del área de alifáticos. Empleando las técnicas de APT y HSQC (figuras 83 y 84) se clasificaron las señales de la siguiente manera. Las señales 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9 corresponden a carbonos cuaternarios, los cuales a su vez difieren de acuerdo a su naturaleza química. El carbono de la señal 1 forma parte de un grupo carbonilo de cetona, sin embargo su desplazamiento químico es menor a lo esperado para un carbonilo de esa naturaleza, ya que al estar dentro de un sistema en resonancia disminuye 10 ppm aproximadamente. Los carbonos 2 y 5 se encuentran enlazados a un átomo de nitrógeno, en tanto los carbonos 3 y 4 están enlazados cada uno a un átomo de oxígeno. Los carbonos 7 y 2 se encuentran enlazados formando un enlace entre anillos que conforman la estructura.

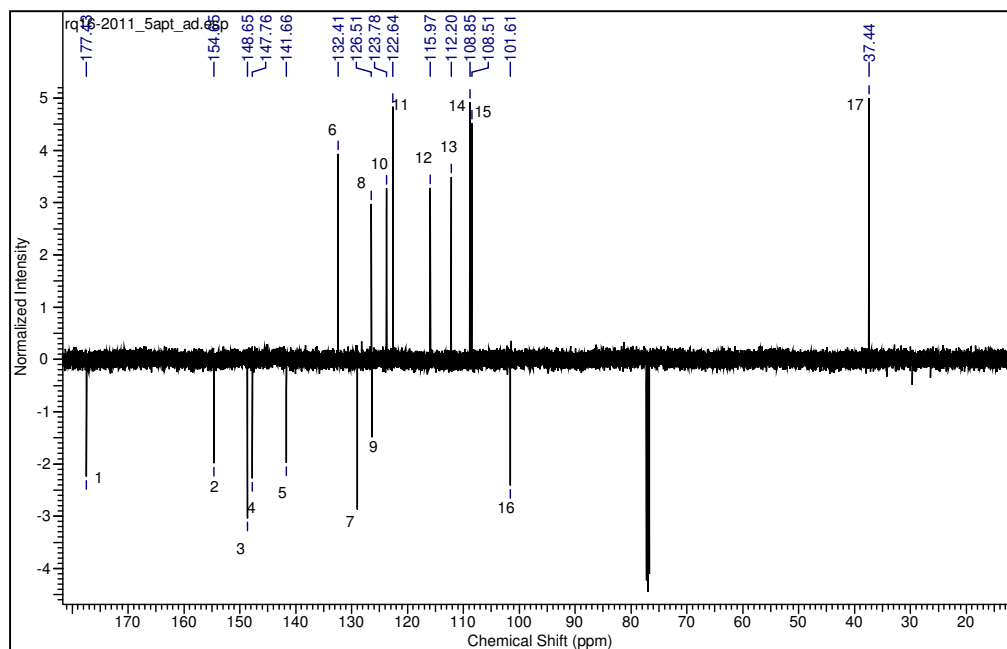


Figura 83. Espectro de APT de C5 en CDCl₃.

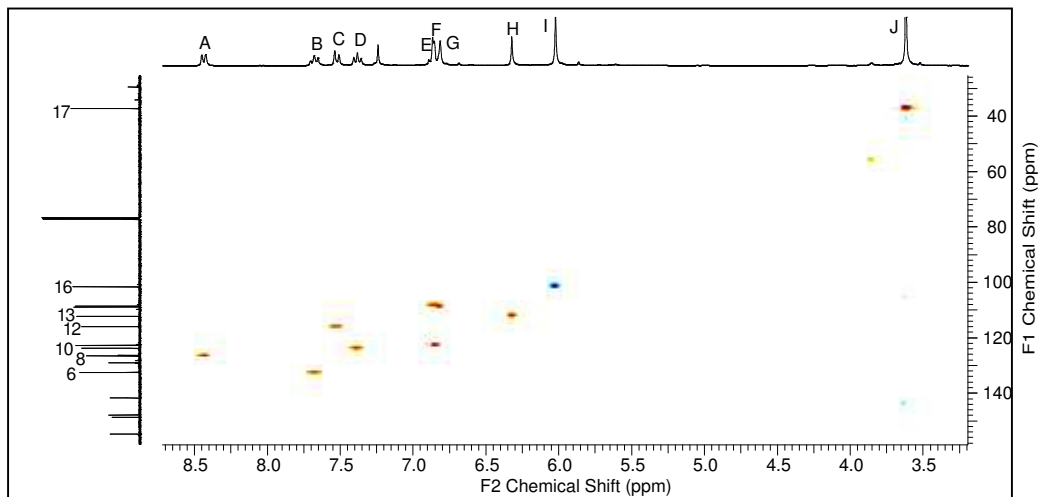
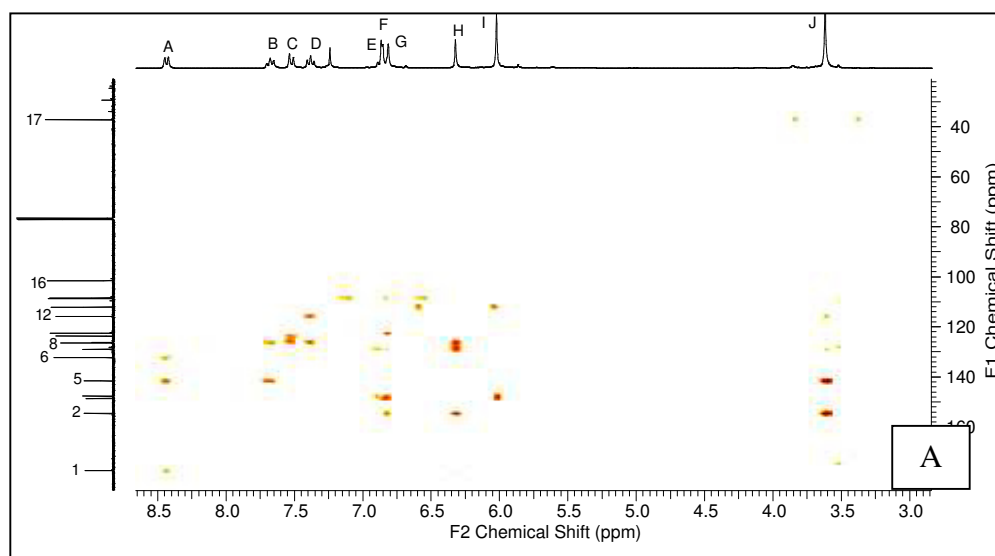


Figura 84. Espectro de HSQC de C5 en CDCl₃.

Las señales 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 corresponden a carbonos de grupos metino. También se identificó la señal de un grupo metileno con hibridación sp^3 a 101.65 el cual forma parte de un grupo dioximetileno, y finalmente se identificó un grupo metilo representado por la señal 17 el cual se encuentra unido a un átomo de nitrógeno, ver tabla 80.



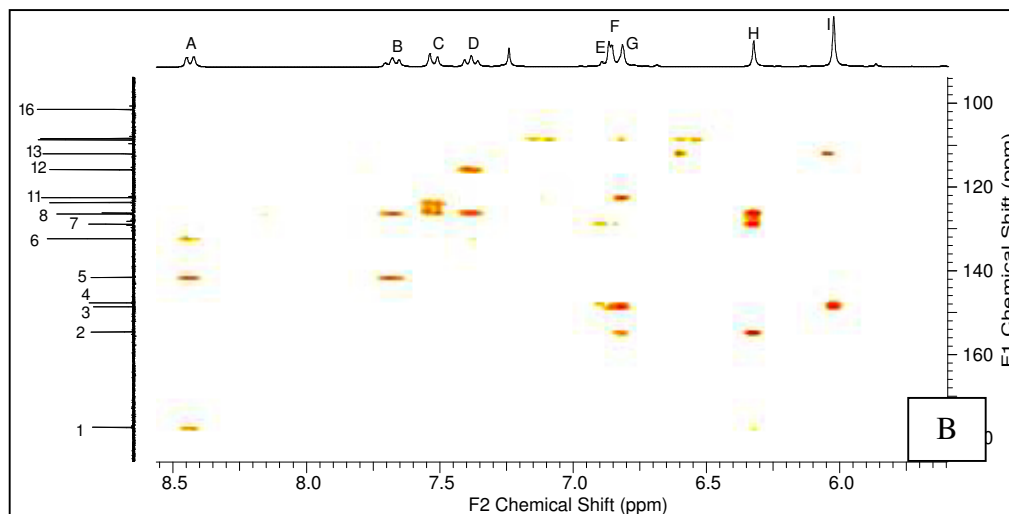


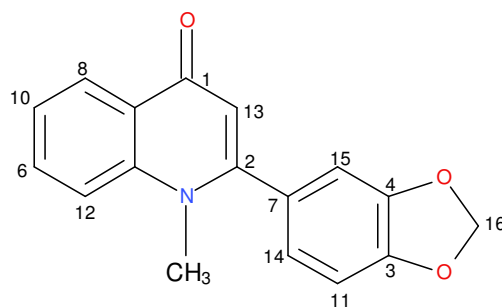
Figura 85. Espectro de HMBC de **C5** en CDCl_3 . A, espectro general de HMBC. B, ampliación del espectro de HMBC ^1H : 5.0-8.8 ppm ^{13}C : 90-185 ppm.

Al emplear la técnica de HMBC (ver figura 85) se pudo ubicar la posición de cada señal dentro de la estructura de la siguiente manera. Los carbonos de las señales 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 12 y 13 conforman el núcleo quinolin-4-ona, siendo los carbonos de las señales 1, 2, 5, 9 y 13 los que forman el anillo donde está insertado el carbonilo y al átomo de nitrógeno, por otro lado los carbonos de las señales 5, 6, 8, 9, 10 y 12 forman el anillo de benceno uniéndose al heterociclo antes mencionado a través de los carbonos 5 y 9. A este núcleo de quinolin-4-ona está enlazado un radical dioximetilbenceno, el cual está conformado por los carbonos 3, 4, 7, 11, 14, 15 y 16, estando formado el anillo de benceno por los carbonos 3, 4, 7, 11, 14, 15 y unido al grupo dioximetileno por los carbonos 3 y 4 por medio de enlaces éter. Se identificó a la señal 16 como de un grupo metileno. Este grupo dioxometilbenceno se encuentra unido al núcleo quinolin-4-ona a través de los carbonos 7 y 2. En la tabla 80 se muestra un resumen de las señales obtenidas del espectro de HMBC (columna HMBC) en el cual se muestran las señales de carbono que producen un acoplamiento C-H con la respectiva señal de protones (columna ^1H).

Tomando en cuenta toda la información proporcionada por las diversas técnicas de RMN se confirmó la estructura del compuesto como 2-(1,3-benzodioxol-5-il)-1-metilquinolin-4-ona llamado comúnmente graveolina, con una fórmula molecular de $C_{17}H_{13}NO_3$ (Tian-Shung et al., 2003) ver figura 86.

| Señal | (ppm) | C (tipo) | HMBC | 1H |
|-------|--------|-----------------|----------|-------|
| 1 | 177.58 | Cq | | |
| 2 | 154.78 | Cq | | |
| 3 | 148.76 | Cq | | |
| 4 | 147.87 | Cq | | D |
| 5 | 141.76 | Cq | | A |
| 6 | 132.50 | CH | 5, 8 | |
| 7 | 129.07 | Cq | | |
| 8 | 126.58 | CH | 6, 5, 1 | B |
| 9 | 126.38 | Cq | | |
| 10 | 123.85 | CH | 8, 12 | E |
| 11 | 122.72 | CH | 3, 15 | C |
| 12 | 116.03 | CH | 8, 10 | F |
| 13 | 112.25 | CH | 8, 7, 2 | |
| 14 | 108.90 | CH | 11, 3, 2 | |
| 15 | 108.56 | CH | 7, 4 | G |
| 16 | 101.65 | CH ₂ | 13, 3 | I |
| 17 | 37.38 | CH ₃ | 5, 2, 12 | J |

Tabla 80. Resumen de señales del espectro de ^{13}C -RMN, APT, HSQC y HMBC de C5.



$C_{17}H_{13}NO_3$
(PM: 279.29)

Figura 86. Graveolina

6.8.6 Análisis espectroscópico del compuesto **C6**

6.8.6.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **C6** (ver figura 87) concuerda completamente con el espectro de ^1H -RMN del compuesto **C1** (ver figura 55), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C6** por lo tanto es identificado también como chalepensina, descrita en la sección 6.8.1.2, figura 60.

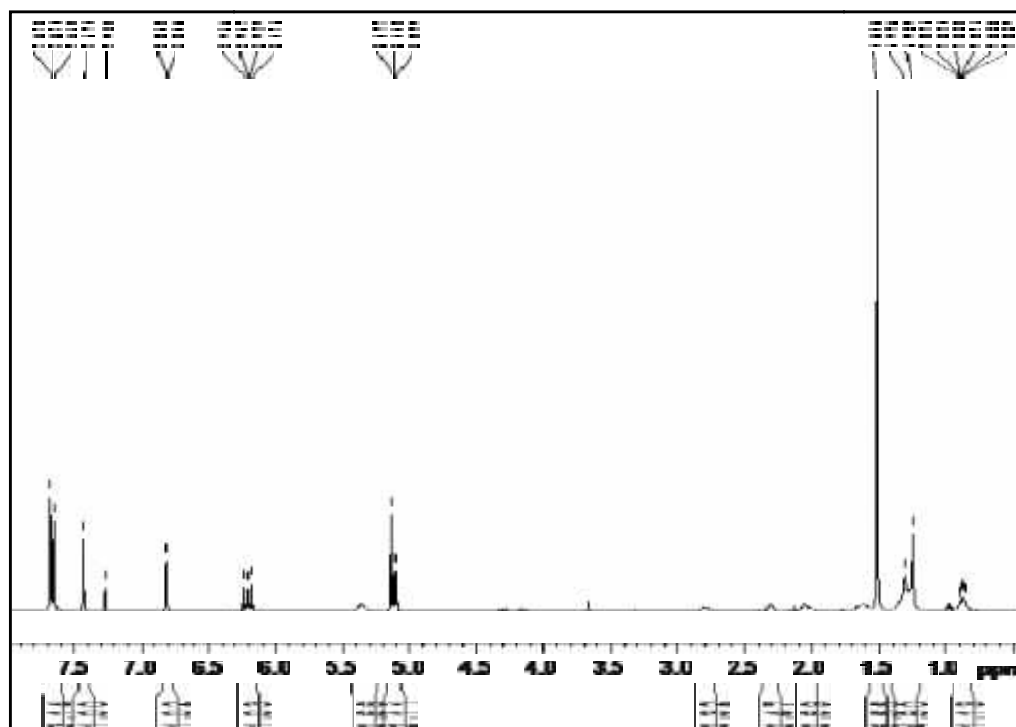


Figura 87. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C6** en CDCl_3 .

6.8.7 Análisis espectroscópico del compuesto **C7**

6.8.7.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **C7** (ver figura 88) concuerda completamente con el espectro de ^1H -RMN del compuesto **C2** (ver figura 63), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C7** por lo tanto es identificado también como una mezcla de bergapteno y psoraleno, descrita en la sección 6.8.2.2, figura 69.

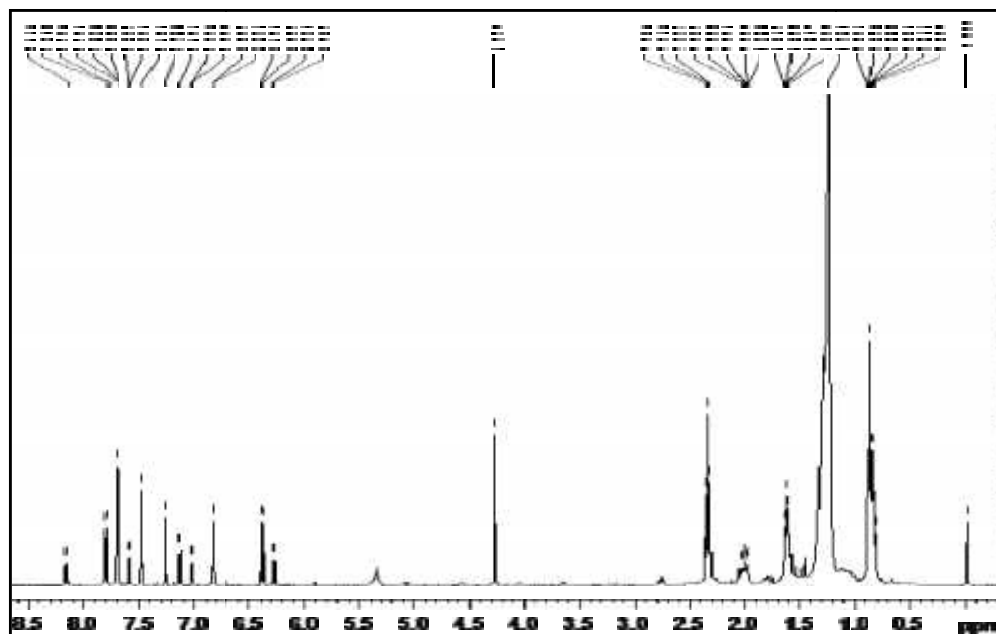


Figura 88. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C7** en CDCl_3 .

6.8.8 Análisis espectroscópico del compuesto **C8**

6.8.8.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **C8** (ver figura 89) concuerda completamente con el espectro de ^1H -RMN del compuesto **C1** (ver figura 55), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C8** por lo tanto es identificado también como chalepensina, descrita en la sección 6.8.1.2, figura 60.

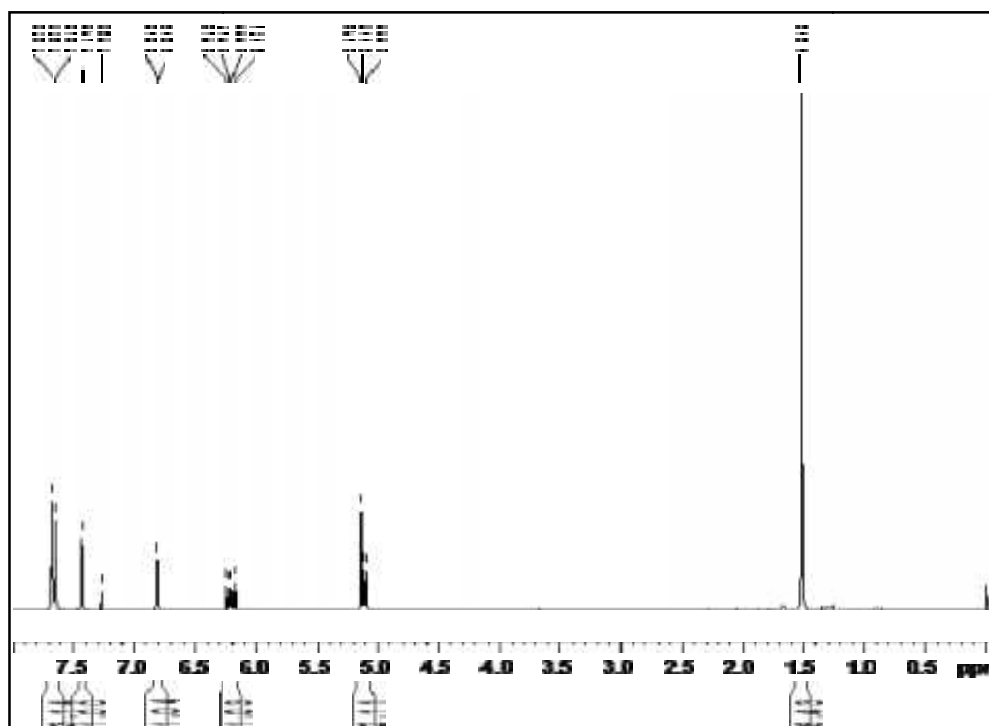


Figura 89. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C8** en CDCl_3 .

6.8.9 Análisis espectroscópico del compuesto **C9**

6.8.9.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **C9** (ver figura 90) concuerda completamente con el espectro de ^1H -RMN del compuesto **C1** (ver figura 55), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C9** por lo tanto es identificado también como chalepensina, descrita en la sección 6.8.1.2, figura 60.

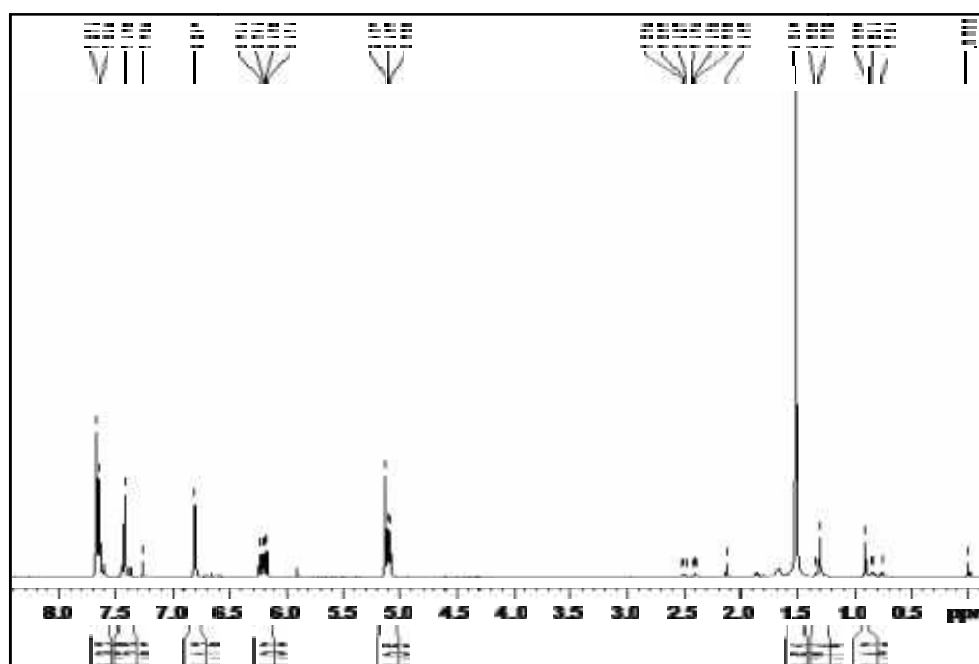


Figura 90. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C9** en CDCl_3 .

6.8.10 Análisis espectroscópicos del compuesto **C10**.

6.8.10.1 Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **C10** (ver figura 91) concuerda completamente con el espectro de ^1H -RMN del compuesto **C2** (ver figura 63), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C10** por lo tanto es identificado también como una mezcla de bergapteno y psoraleno, descrita en la sección 6.8.2.2, figura 69.

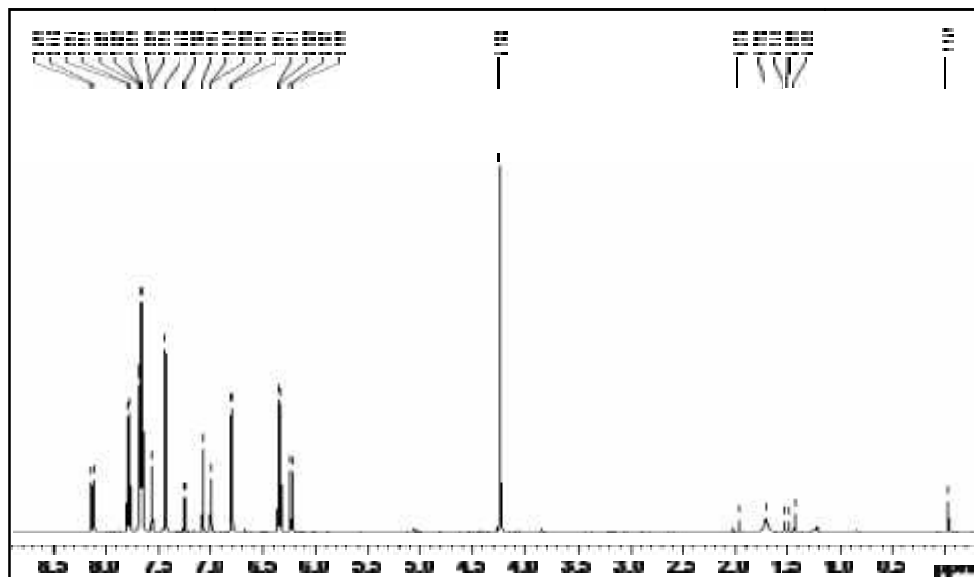


Figura 91. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C10** en CDCl_3 .

6.8.11 Análisis espectroscópico del compuesto **C11**

6.8.11.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **C11** (ver figura 92) concuerda completamente con el espectro de ^1H -RMN del compuesto **C3** (ver figura 70), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C11** por lo tanto es identificado también como una mezcla de bergapteno y psoraleno, descrita en la sección 6.8.3.1, figura 76.

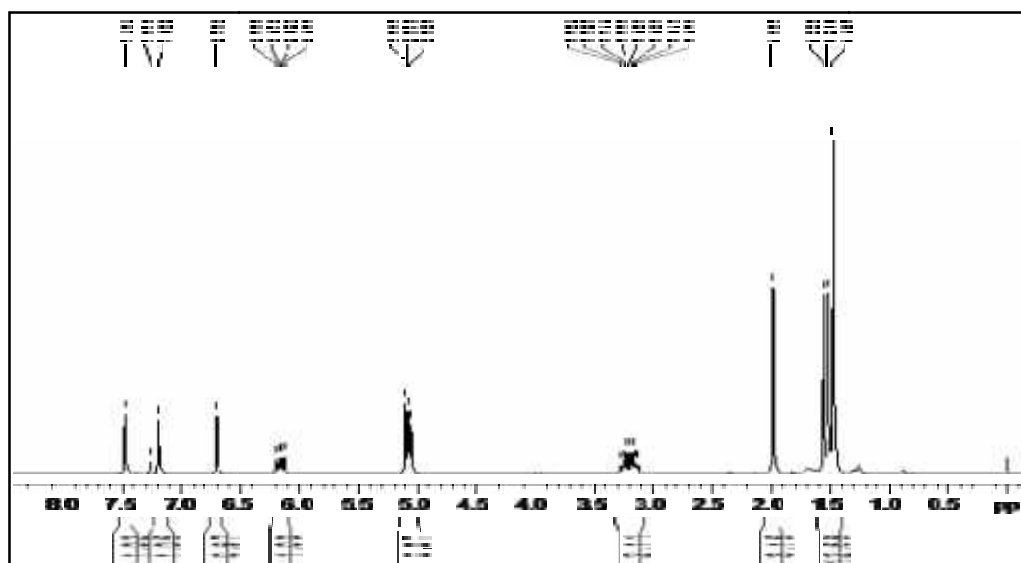


Figura 92. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C11** en CDCl_3 .

6.8.12 Análisis espectroscópicos del compuesto **C12**.

6.8.12.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de ^1H -RMN del compuesto **C12** (ver figura 93) concuerda completamente con el espectro de ^1H -RMN del compuesto **C3** (ver figura 70), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C12** por lo tanto es identificado también como una mezcla de bergapteno y psoraleno, descrita en la sección 6.8.3.1, figura 76.

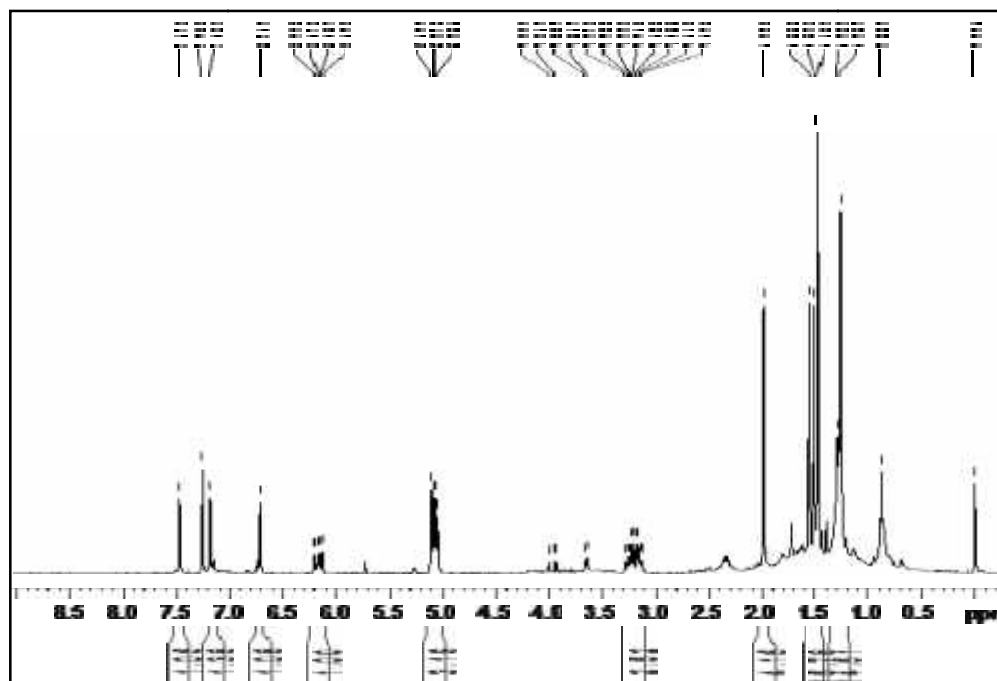


Figura 93. Espectro general de ^1H -RMN del compuesto **C12** en CDCl_3 .

6.8.13 Análisis espectroscópicos del compuesto **C13**

6.8.13.1 Resonancia Magnética Nuclear

En el espectro de ^1H -RMN de **C13** se identificaron las señales presentes en el espectro usando la letra A a la letra K, después de descartar la señal del solvente sin deuterar (CDCl_3) a 7.26 ppm, ver figura 94.

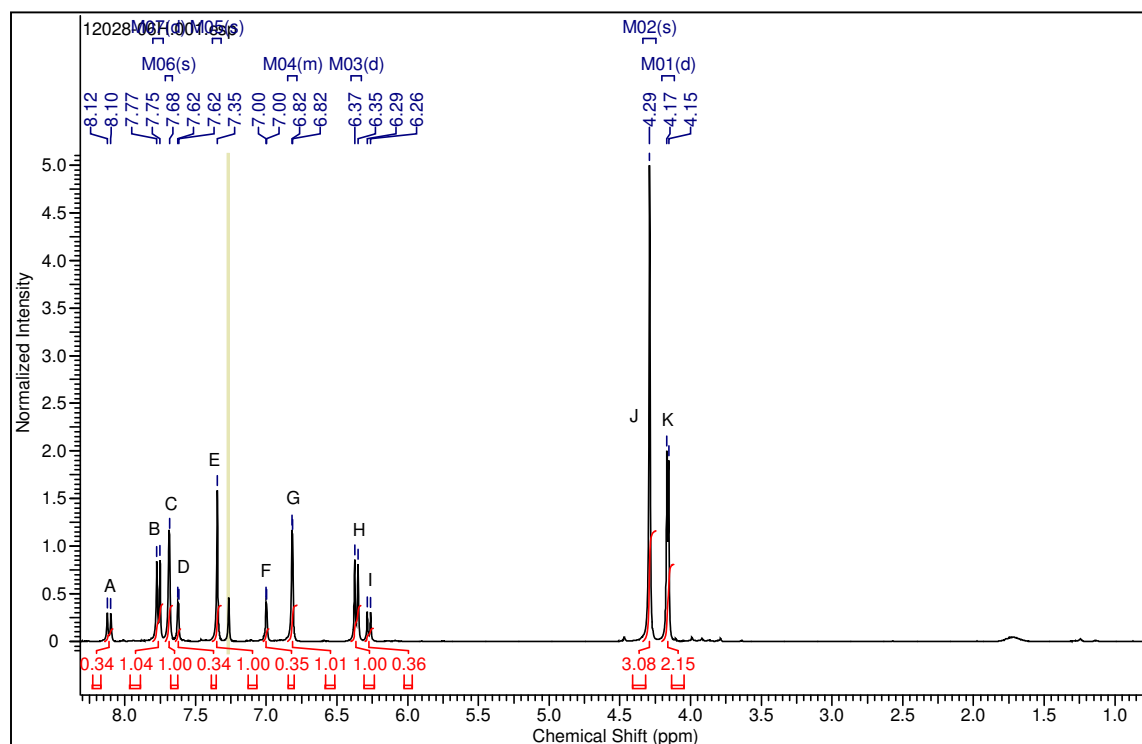


Figura 94. Espectro de ^1H -RMN de **C13** en CDCl_3 .

Como es posible ver en la figura 94, al momento de calcular la integración para cada una de las señales se observó que se formaban dos conjuntos de señales cada uno con un patrón similar de integración y basándonos de manera similar al análisis de **C2**, **C7** y **C10** se concluye que están presentes dos compuestos en una relación de 1:3

conformando una mezcla identificada como **C13**. Posterior a concluir que **C13** está conformado por 2 compuestos se procedió a clasificar las señales en base a su integración y acoplamientos de protones vecinos obteniendo los siguientes resultados. Las señales A, D, F, I, K corresponden compuesto en menor proporción (**C13-A**) y las señales B, C, E, G, H y J corresponden al compuesto presente en mayor proporción (**C13-B**). Cada compuesto se describirá por separado.

| Señal | ppm | Multi | <i>J</i> (Hz) | Integración | Señal | ppm | Multi | <i>J</i> (Hz) | Integración |
|-------|------|-------|---------------|-------------|-------|------|-------|---------------|-------------|
| A | 8.11 | d | 9.80 | 1 | B | 7.76 | d | 9.59 | 1 |
| D | 7.62 | d | 2.03 | 1 | C | 7.68 | d | 1.84 | 1 |
| F | 6.99 | d | 2.04 | 1 | E | 7.34 | s | 2.03 | 1 |
| I | 6.27 | d | 9.79 | 1 | G | 6.81 | d | 1.88 | 1 |
| K | 4.16 | d | | 6 | H | 6.36 | d | 9.58 | 1 |
| | | | | | J | 4.29 | s | | 3 |

Tabla 81. Resumen de señales de ¹H-RMN de **C13**. a, tabla de desplazamientos químicos de **C13-A**. b, tabla de desplazamientos químicos de **C13-B**.

Con respecto a las señales de **C13-A**, las primeras 4 forman grupos metinos las cuales tienen un desplazamiento químico dentro del área de protones aromáticos y solamente la señal K $\delta = 4.16$ es la que se encuentra en el área de alifáticos e integra para 6 hidrógenos. Las señales A, D, F e I $\delta = 8.11, 7.62, 6.99$ y 6.27 tienen como multiplicidad un doblete por lo que se puede inferir el hecho de se encuentran acopladas entre sí por pares, observando que la señal del protón A $\delta = 8.11$ y $J = 9.80$ Hz se encuentra acoplada con la señal del protón I $\delta = 6.27$ y $J = 9.79$ Hz. Del mismo modo las señales D y F $\delta = 7.62$ y 6.99 se acoplan entre sí con una J de 2.03 y 2.04 Hz, respectivamente. La señal K $\delta = 4.16$ identificada por una señal de doblete la cual integra para 6 hidrógenos conformando dos grupos metoxilo (OCH₃), ver tabla 81. Los acoplamientos se confirmaron con el análisis de COSY (figura 95) observándose los

acoplamiento de las señales A-I y D-F. En el espectro no se observan acoplamiento para la señal K, por lo que se podría concluir que la señal K realmente este conformada por dos singuletes, ver tabla 81.

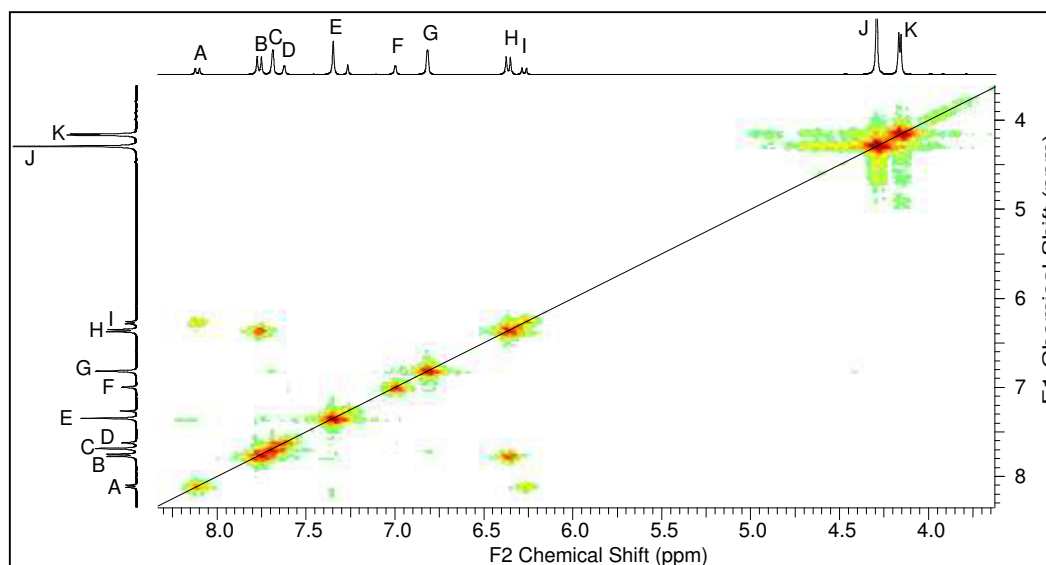


Figura 95. Espectro de COSY de **C13** en CDCl_3

Con respecto al compuesto **C13-B**, las señales B, C, E, G y H representan a 5 grupos metino con un desplazamiento químico dentro del área de aromáticos, también es importante resaltar los acoplamiento que se dan entre estas señales. El doblete de la señal B = 7.76 se acopla con la señal H = 6.36, la cual tiene también una multiplicidad de doblete, presentando ambas una constante de acoplamiento de $J = 9.59$ y 9.58 Hz, respectivamente; del mismo modo se observó un segundo acoplamiento entre las señales C y G = 7.68 y 6.81 con una J de 1.84, 1.88 Hz, respectivamente. Además de estas señales se observó la presencia de 2 singuletes uno en el área de aromáticos integrando para un hidrógeno identificado por la señal E = 7.34 y el segundo señalado con la señal J = 4.29 en el área de alifáticos con una integración de 3 hidrógenos lo que

permite concluir que la señal J representa un grupo metoxilo, ver tabla 81. Los acoplamientos mencionados para este segundo compuesto se confirmaron con el análisis COSY (figura 95) concluyendo que los protones B y H son protones vecinos del mismo modo los protones C y G, ver tabla 82.

| Señal | Acoplamientos |
|-------|---------------|
| A | I |
| B | H |
| C | G |
| D | F |
| E | |
| F | D |
| G | C |
| H | B |
| I | A |
| J | |
| K | |

Tabla 82. Resumen de señales de COSY de **C13**

En el espectro de ^{13}C -RMN del cual se pudo identificar 23 señales, 20 en el área de aromáticos y 3 en el área de alifáticos. Las señales del solvente no deuterado empleado para solubilizar la muestra (CDCl_3) entre 77.36 y 76.72 ppm serán descartadas, ver figura 96.

Con la ayuda de otras técnicas de RMN como DEPT-135, HSQC y HMBC se pudo diferenciar las señales que corresponden a cada compuesto. Para el compuesto **C13-A** se identificaron las señales 1, 2, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 17, 18, 20, 21 y 23. La señal 1 es de un carbono cuaternario, el cual corresponde a un carbonilo de α -lactona. Las señales 2, 6, 7 y 11 representan a carbonos cuaternarios enlazados a átomos de oxígeno, la señal 2 al oxígeno de un anillo de furano, la señal 6 al oxígeno de la α -lactona y las señales 7 y 11

corresponde a los carbonos que soportan a los grupos metoxilo descritos en el análisis de protones. Las señales de los carbonos 14 y 18 son también cuaternarios sin embargo estos no se encuentran enlazados a átomos con electronegatividad relevante.

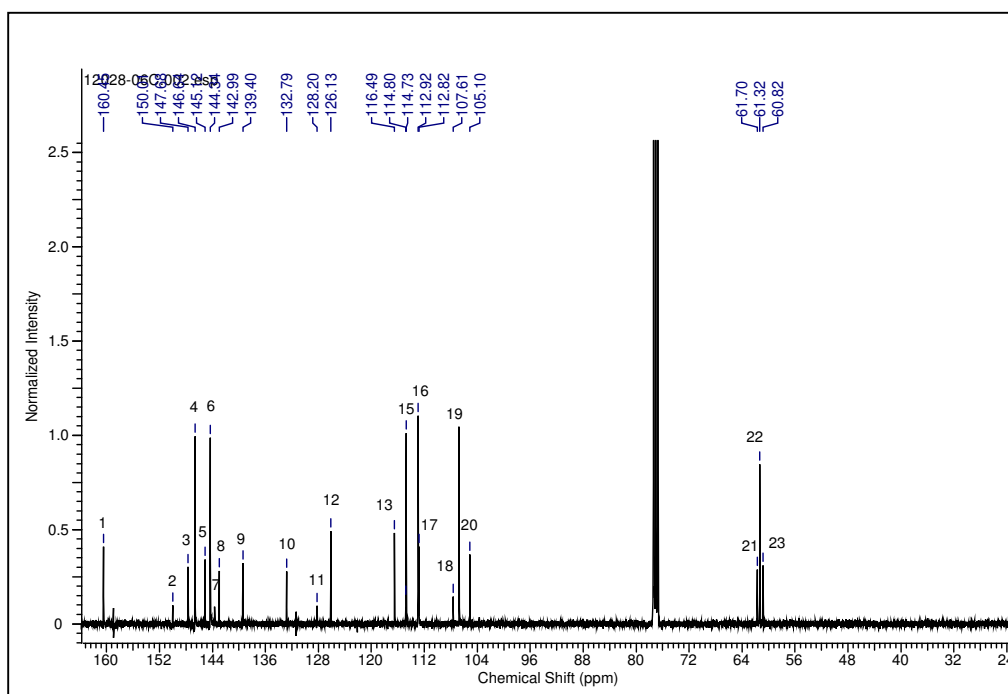


Figura 96. Espectro de ^{13}C -RMN de C13 en CDCl_3 .

Empleando las técnicas de DEPT-135 y HSQC (ver figuras 97 y 98) se pudo identificar las señales de carbono que están enlazados a átomos de hidrógeno formando grupos metino, metileno y metilo. Las señales 17 y 9 son metinos que forman parte de la -lactona y las señales de los carbonos 5 y 20 forman los grupo metinos de un anillo de furano Las señales 21 y 23 son identificadas como grupos metilo y por su desplazamiento químico se pudo identificarlas como grupos metoxilo.

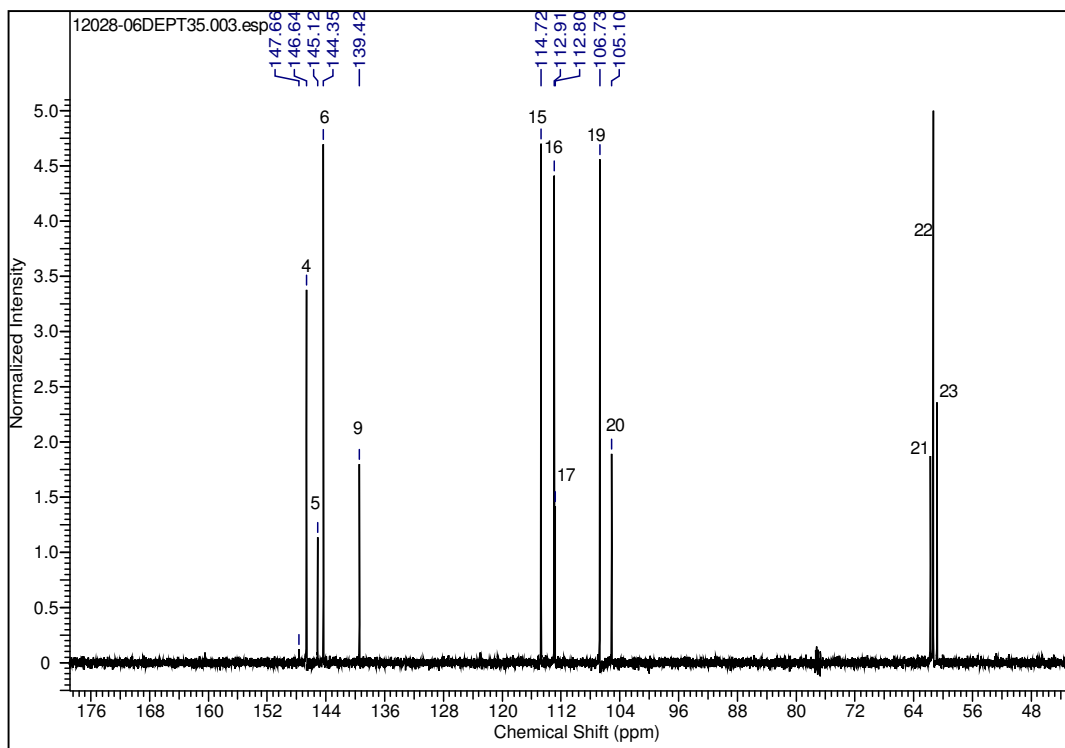


Figura 97. Espectro de DEPT-135 de **C13** en CDCl_3 .

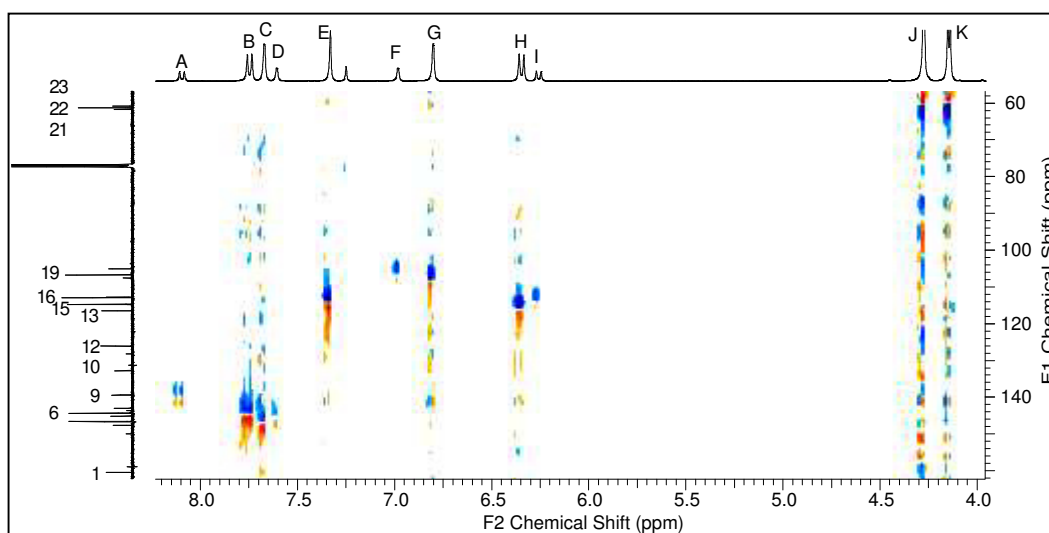


Figura 98. Espectro de HSQC de **C13** en CDCl_3 .

Una vez que se identificó la naturaleza de las señales de los espectros de protones y de carbono 13, se procedió a conocer su arreglo y posición dentro de la estructura por lo que se empleó la información obtenida del espectro de HMBC, ver figura 99. Tomando

en cuenta esta información se determinó que la γ -lactona está conformada por los carbonos 1, 6, 9, 17 y 18, la cual a su vez está unida a un anillo de benceno por medio de los carbonos 6 y 18; el anillo de benceno está conformado por los carbonos 2, 6, 7, 11, 14 y 18, de estos carbonos la señal 7 y 11 son carbonos que se encuentran enlazados a los grupos metoxilo que corresponden a las señales 21 y 23. Los grupos metóxilos se encuentran en posición *para*. La diferencia surgida entre las señales 7 y 11 es que la señal 7 se encuentra más desapantallada por la influencia de los oxígenos del anillo de furano y de la γ -lactona. A su vez el anillo de benceno está enlazado a un anillo de furano por medio de los carbonos 2 y 14 y este anillo de furano queda conformado por los carbonos 2, 5, 14 y 20, ver tabla 83. Reuniendo toda la información se obtiene la identidad del compuesto como *4,9-dimetoxi-furo[3,2-g]cromen-7-ona*, conocido comúnmente como isopimpinellina y con una fórmula molecular de $C_{13}H_{10}O_5$, ver figura 100.

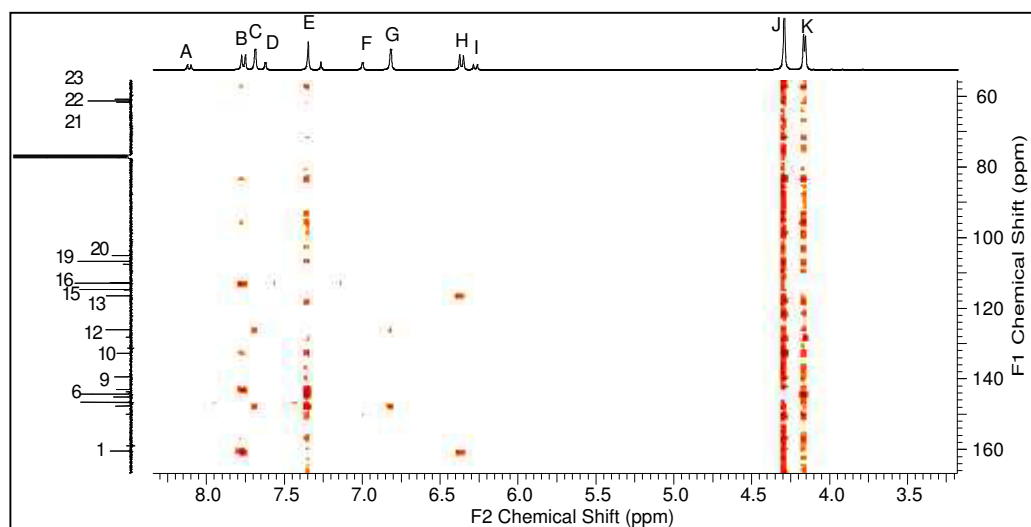


Figura 99. Espectro de HMBC de C_{13} en $CDCl_3$.

Para el compuesto **C13-B** se identificaron las señales 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19 y 22 como pertenecientes a este. Empleando análisis adicionales con las técnicas de DEPT-135 y HMBC se logró determinar la naturaleza de cada una de estas señales. La señal 1 corresponde a un carbono cuaternario de un grupo carbonilo de γ -lactona. Las señales de los carbonos 3, 8 y 10 corresponden a carbonos cuaternarios y están unidos a átomos de oxígeno, el carbono 8 está unido al oxígeno de la γ -lactona, el carbono 3 unido al oxígeno de un anillo de furano y el carbono 10 está unido a un grupo metoxilo, el cual fue evidenciado en el análisis anterior de protones. Los carbonos 12 y 13 también están clasificados como carbonos cuaternarios sin embargo estos no están unidos a átomos electronegativos. Por otra parte, las señales 4, 6, 15, 16 y 19 corresponden a grupos metino. Es importante mencionar que para **C13-A**, la señal 6 también se tomó en cuenta, solamente que para el primer compuesto la señal 6 es de un carbono cuaternario a diferencia que en este segundo compuesto es un grupo metino; y la señal 22 corresponde a un grupo metilo el cual conforma el grupo metoxilo antes mencionado, ver tabla 83.

Tomando la información que proporciona la técnica de HMBC, ver figura 99, se logró ubicar cada una de las señales en el correcto acomodo dentro de la estructura. Las señales 1, 6, 8, 13 y 15 conforman el anillo de γ -lactona, el cual se encuentra enlazado a un anillo de benceno penta-sustituido unido por los carbonos 8 y 13. El anillo de benceno está conformado por los carbonos 3, 8, 10, 12, 13 y 16 y a su vez está unido a un anillo de furano por medio de los carbonos 3 y 12. El anillo de furano está conformado por los carbonos 3, 4, 12 y 19. Integrando la información recopilada de las diversas técnicas de RMN se llegó a la elucidación estructural del compuesto, identificándolo como 9-

metoxi-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona, conocido comúnmente con el nombre de xantotoxina con una fórmula molecular de $C_{12}H_8O_4$, ver figura 100.

| Señal | (ppm) | C (tipo) | HMBC | 1H |
|-------|--------|-----------------|-------------|-------|
| 1 | 160.45 | Cq | | |
| 2 | 150.01 | Cq | | |
| 3 | 147.68 | Cq | | |
| 4 | 146.64 | CH | 12, 3 | C |
| 5 | 145.12 | CH | 2 | D |
| 6 | 144.34 | CH | 10, 8, 1 | B |
| 7 | 143.65 | Cq | | |
| 8 | 142.99 | Cq | | |
| 9 | 139.40 | CH | 1 | A |
| 10 | 132.79 | Cq | | |
| 11 | 128.19 | Cq | | |
| 12 | 126.13 | Cq | | |
| 13 | 116.49 | Cq | | |
| 14 | 114.79 | Cq | | |
| 15 | 114.73 | CH | 13, 1 | H |
| 16 | 112.91 | CH | 19, 8, 6, 3 | E |
| 17 | 112.82 | CH | 18, 1 | I |
| 18 | 107.91 | Cq | | |
| 19 | 106-73 | CH | 12, 3 | G |
| 20 | 105.10 | CH | 2 | F |
| 21 | 61.69 | CH ₃ | 11, 6 | K |
| 22 | 61.32 | CH ₃ | 8 | J |
| 23 | 60.82 | CH ₃ | 11, 6 | K |

Tabla 83. Resumen de señales de ^{13}C -RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC de **C13**

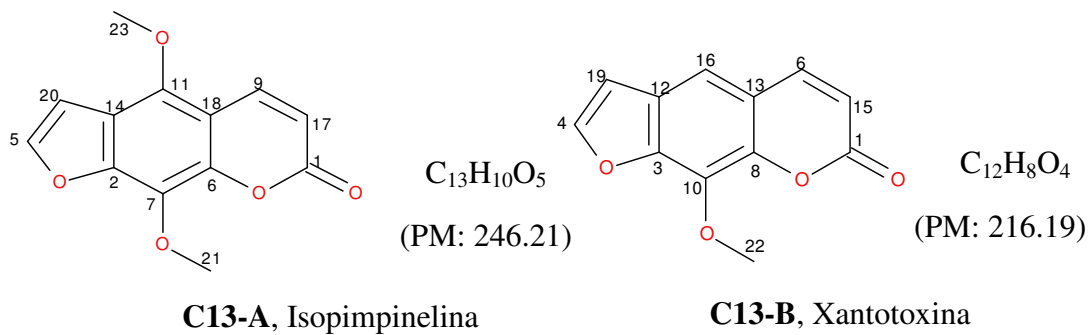


Figura 100. Compuestos mayoritarios de la mezcla **C13**

6.8.14 Análisis espectroscópico de **C14**

6.8.14.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

En el espectro de ^1H -RMN de **C14** se pueden observar claramente 11 señales marcadas de la letra A a la K, ver figura 101. Las señales A, B, C, D y F integran para 1 hidrógeno cada una por lo que se clasificó a éstas como grupos metinos donde los singuletes de las señales A, B y C = 7.47, 7.18 y 6.68 forman parte de un sistema en resonancia además de estar aislados entre sí. La señal D = 6.15 con una multiplicidad de doble doblete forma parte de un grupo vinílico terminal, además se acopla con el protón de la señal E = 5.07 el cual tiene una integración para 2 hidrógenos. De manera similar la señal del protón F con una multiplicidad de multiplete se encuentra acoplada con la señal G = 3.44 con una multiplicidad de multiplete, la cual integra para 2 hidrógenos, sin embargo a diferencia del acoplamiento de los protones D y E el acoplamiento F-G se da en entre átomos con hibridación sp^3 en un anillo de dihidrofurano. La señal H = 1.94 es un singulete ancho que integra para un hidrógeno y al observar que en el análisis de HSQC que no presenta acoplamiento con ningún carbono se dedujo que esta señal representa un grupo $-\text{OH}$. Las señales I, J y K representan grupos metilo, en el caso de la señal I = 1.45, la cual tiene una multiplicidad de singulete y una integración para 6 hidrógenos representa a dos grupos metilo los cuales están ubicados de manera simétrica y dentro del mismo entorno químico; por otro lado las señales J y K = 1.35 y 1.22, las cuales integran para 3 hidrógenos cada una, representan grupos metilo los cuales se encuentran bajo diferente

entorno químico y por lo tanto exhiben un desplazamiento químico diferente, ver tabla

84.

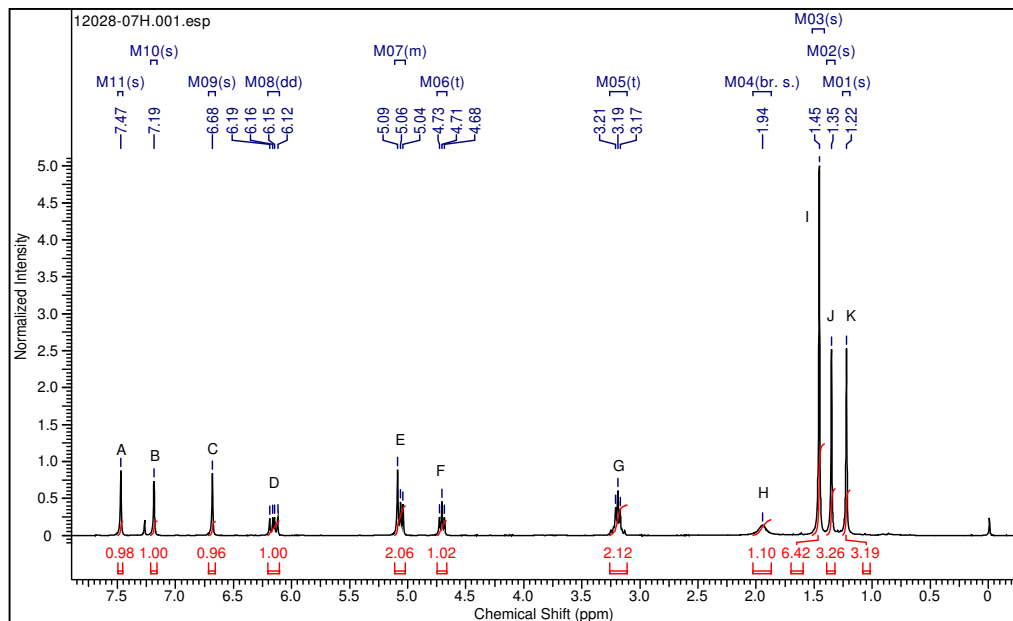


Figura 101. Espectro de ^1H -RMN de **C14** en CDCl_3 .

| Señal | (ppm) | Multiplicidad | J (HZ) | Integración |
|-------|-------|---------------|-------------------------|-------------|
| A | 7.47 | S | | 1H |
| B | 7.18 | S | | 1H |
| C | 6.68 | S | | 1H |
| D | 6.15 | Dd | 10.88 10.86 17.20 | 1H |
| E | 5.07 | M | | 2H |
| F | 4.70 | T | | 1H |
| G | 3.44 | M | | 2H |
| H | 1.94 | S | | 1H |
| I | 1.45 | S | | 6H |
| J | 1.35 | S | | 3H |
| K | 1.22 | S | | 3H |

Tabla 84. Resumen de señales de ^1H -RMN de **C14**.

El espectro COSY se confirma los acoplamientos que existen entre protones vecinos, como es el caso de D y E así como F y G. Además también fue posible observar

acoplamiento a largo alcance, fenómeno que sólo se produce dentro de sistemas aromáticos. Los acoplamientos a largo alcance se dieron entre los protones A, B y C confirmando que estos se encuentran aislados y que forman parte de un sistema en resonancia. Este tipo de acoplamiento se identifica por la baja intensidad de las señales producidas en el acoplamiento, ver figura 102.

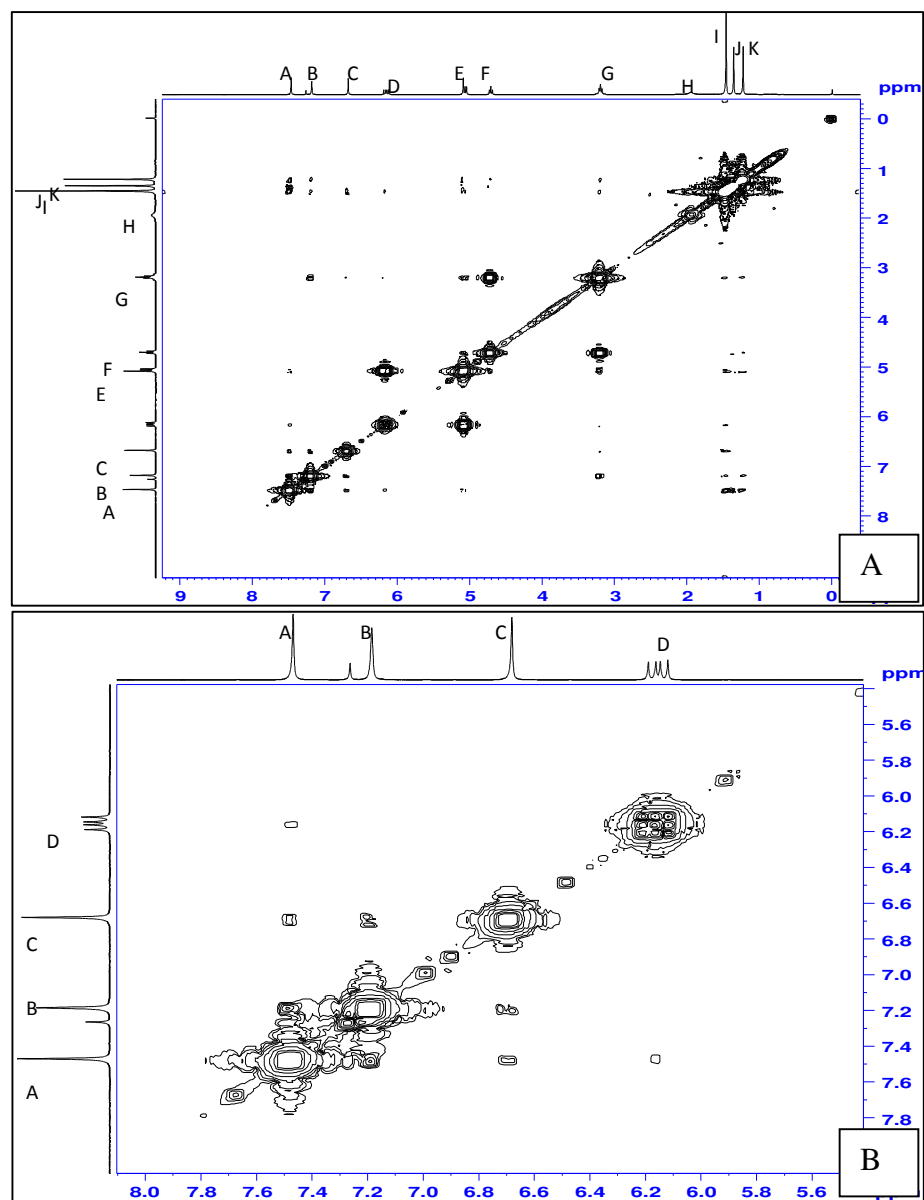


Figura 102. Espectro de COSY de C14 en CDCl₃. A, espectro general de COSY. B, ampliación del espectro (5.6-8.0 ppm)

| Señal | Acoplamiento |
|-------|--------------|
| A | B, C* |
| B | A, C* |
| C | A, B* |
| D | E |
| E | D |
| F | G |
| G | F |
| H | |
| I | |
| J | |
| k | |

Tabla 85. Resumen de señales de COSY de **C14**. *, acoplamiento a largo alcance

El espectro de ^{13}C -RMN de **C14** muestra 18 señales de las cuales 11 pertenecen a protones aromáticos, en tanto las otras 7 señales se encuentran localizadas en el área de alifáticos, ver figura 103.

Empleando las técnicas de DEPT-135 y HSQC (figuras 104 y 105) se evaluó y clasifico de acuerdo a su naturaleza química cada una de las señales del espectro de ^{13}C -RMN, por lo que se identificó a las señales 1, 2, 3, 6, 7, 9, 13, y 14 como carbonos cuaternarios. Las señales 1, 2, 3 y 13 representan carbonos que se encuentran enlazados a átomos de oxígeno de la siguiente manera: la señal 1 forma parte de un grupo carbonilo de -lactona, el carbono de la señal 2 está enlazado al oxígeno del grupo lactona antes mencionado, la señal 3 representa un carbono que está unido al oxígeno de un anillo de dihidrofurano y finalmente el carbono de la señal 13 está unido al grupo OH descrito en la técnica ^1H -RMN. Por otra parte se clasificó las señales 4, 5, 8, 11 y 12

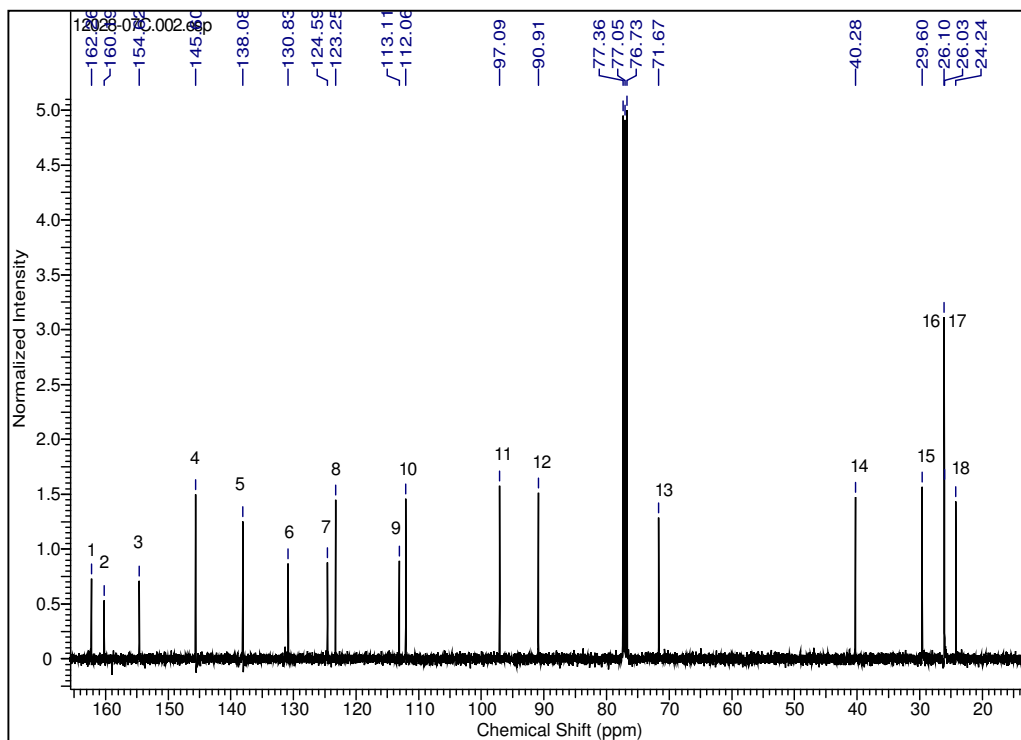


Figura 103. Espectro de ^{13}C -RMN de C14 en CHCl_3 .

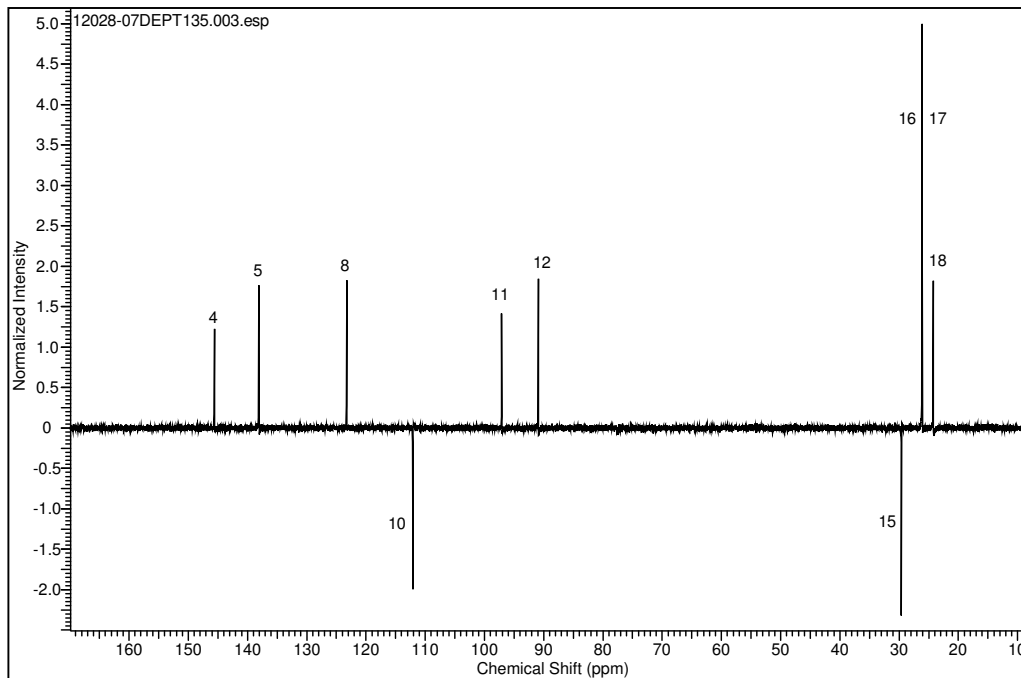
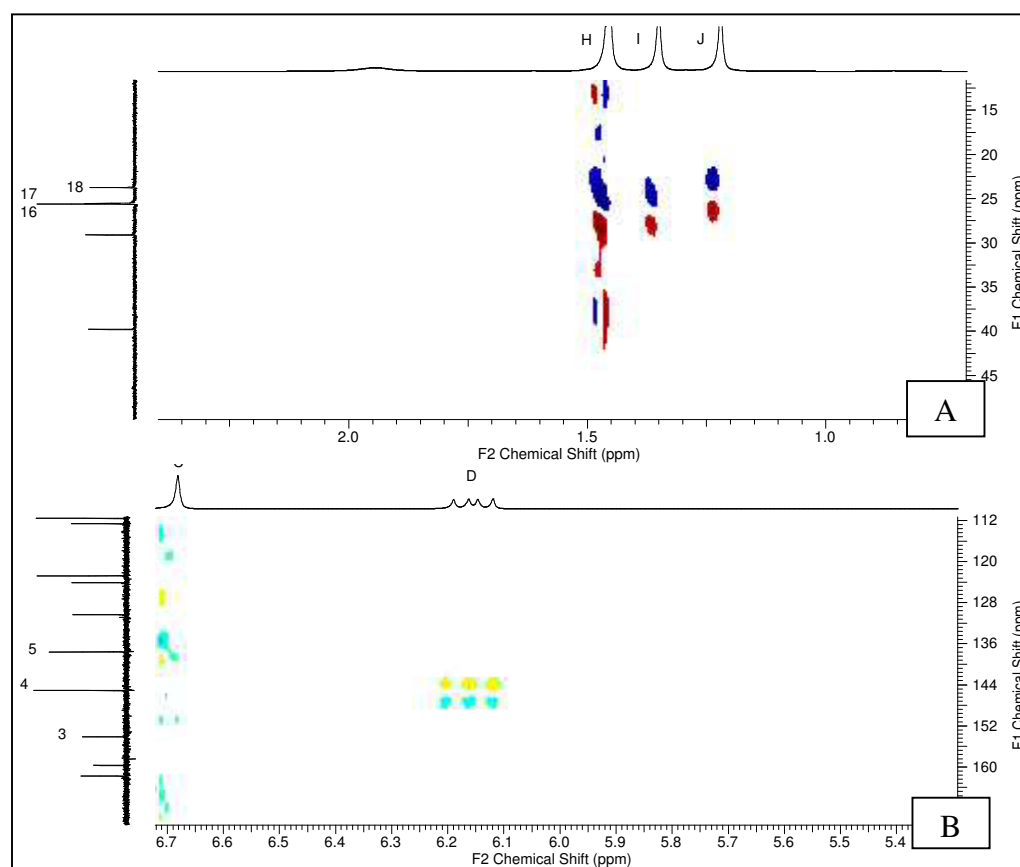


Figura 104. Espectro de DEPT-135 de C14 en CDCl_3 .

como grupos metino, perteneciendo las señales 4, 5 y 8 al sistema aromático, la señal 11 al grupo vinílico terminal y la señal 12 representa al grupo metino del anillo de dihidrofurano descrito anteriormente. Además de los grupos metino también se observa la presencia de dos carbonos de grupos metileno, la señal 10 y la señal 15, la diferencia entre estos se da porque el carbono 10 pertenece al grupo vinilo terminal y la señal 15 al grupo metileno presente en el anillo de dihidrofurano, con un desplazamiento químico menor debido a que es un carbono con hibridación sp^3 . Finalmente las señales 16, 17 y 18 representan grupos metilo, de éstos sólo hay que resaltar que la señal 16 corresponde a dos grupos metilo los cuales son magnéticamente equivalentes, ver tabla 86.



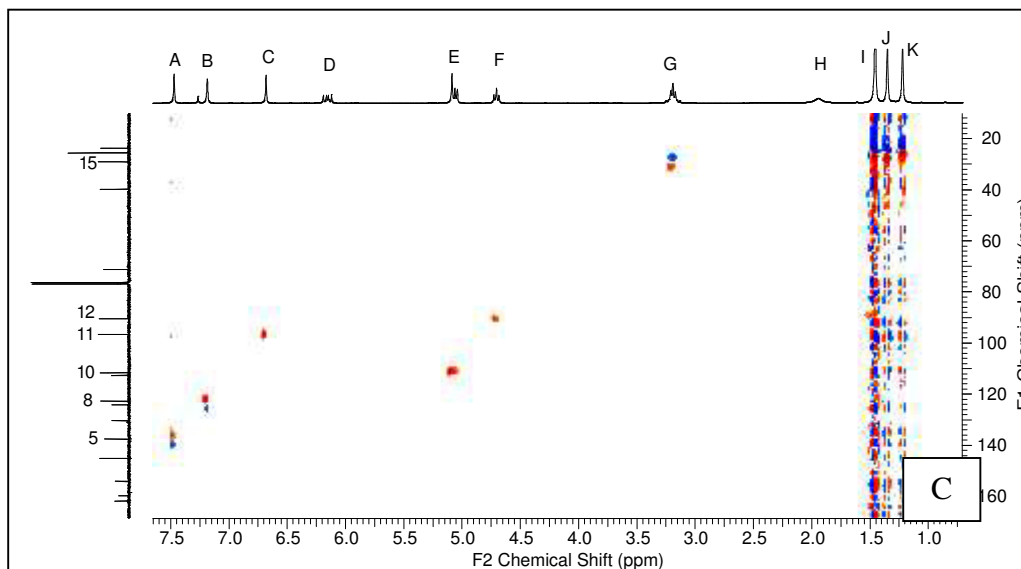


Figura 105. Espectro de HSQC de **C14** en CDCl_3 . A, ampliación del espectro de HSQC en el área de alifáticos ^1H : 1-2 ppm ^{13}C :10-45 ppm. B, Ampliación del espectro de HSQC ^1H : 5.3-6.7 ppm ^{13}C : 112-160 ppm. C, espectro general de HSQC.

Empleando la técnica de resonancia magnética nuclear HMBC (ver figura 137) se determinó el correcto acomodo de los carbonos en la estructura de la siguiente manera. El anillo de γ -lactona está conformado por los carbonos 1, 2, 5, 6, 7 y unida a un anillo de benceno a través los carbonos 7 y 2. El anillo de benceno está conformado por los carbonos 2, 3, 7, 8, 9 y 11. Los carbonos 3, 9, 12, y 15 forman un anillo de dihidrofurano unidos al anillo de benceno a través de los carbonos 3 y 9. Los ciclos antes mencionados conforman el núcleo de psoraleno, sin embargo esta estructura posee los siguientes sustituyentes: el radical 2-hidroxi-isopropan-2-ilo integrado por los carbonos 13, 16 y 17, con el grupo OH enlazado al carbono 13 y unido al núcleo de psoraleno a través del carbóno 12 del anillo de dihidrofurano. El segundo radical llamado 2-metilbut-3-en-2-ilo está conformado por los carbonos 4, 10, 14 y 17 y unido al núcleo de psoraleno por el carbono 6 del anillo de la γ -lactona, ver tabla 102. Reuniendo toda esta información se

llegó a la determinación estructural del compuesto **C14** identificándolo como 6(1,1-dimetilalil)-2-(1-hidroxi-1-dimetiletil)-2,3-dihidro-7*H*-furo[3,2-*G*]cromen-7-ona, conocido comúnmente como chalepina, con una fórmula molecular de $C_{19}H_{22}O_4$.

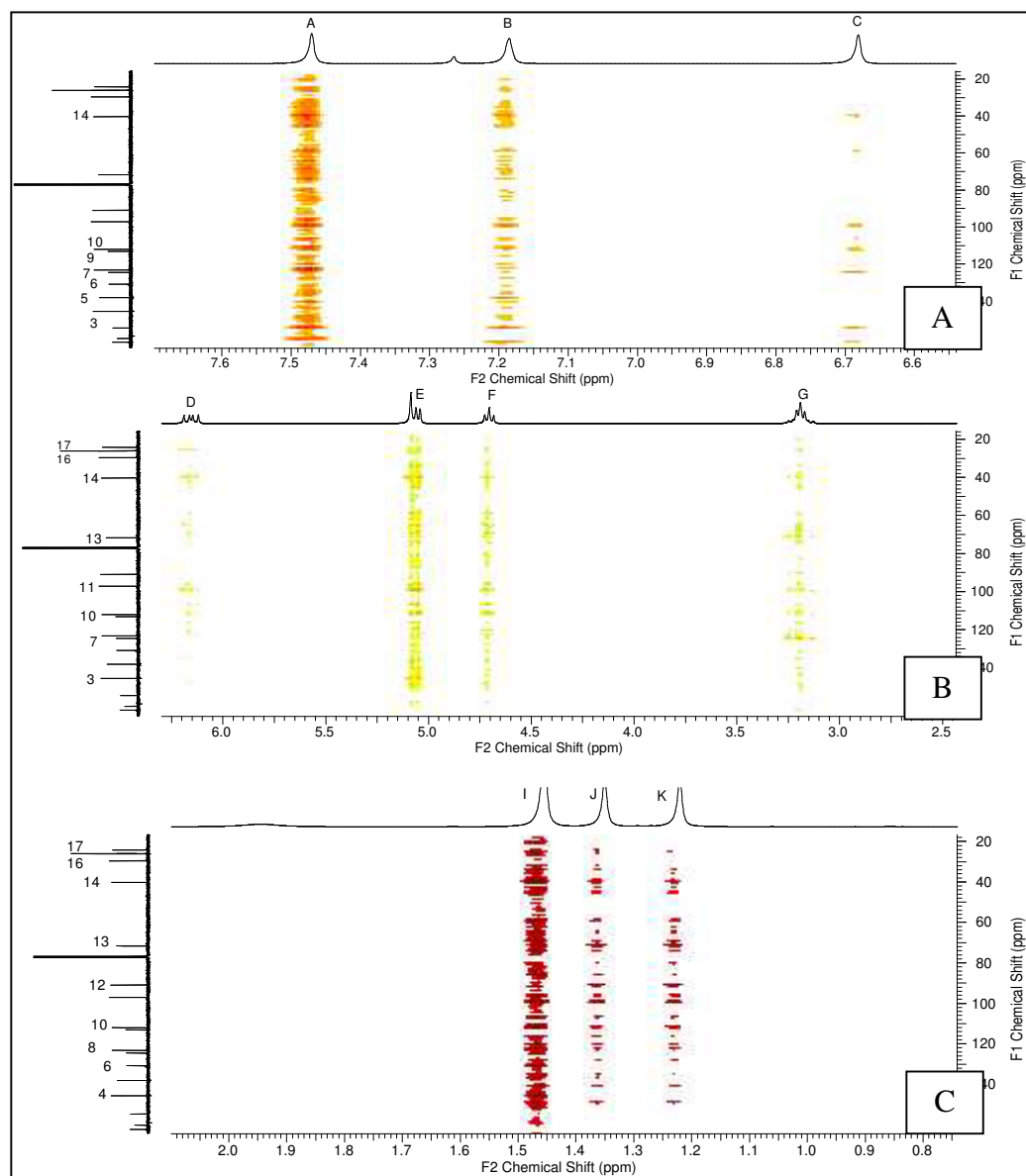


Figura 106. Espectro de HMBC de **C14** en $CDCl_3$. A, ampliación del espectro de HMBC 1H : 7.8-6.4 ppm ^{13}C : 20-160 ppm. B, ampliación del espectro de HMBC 1H : 6.0-2.5 ppm ^{13}C : 20-160 ppm. C, ampliación del espectro de HMBC 1H : 2.0-0.8 ppm ^{13}C : 20-160 ppm.

| Señal | (ppm) | C (tipo) | HMBC | ¹ H |
|-------|--------|-----------------|-------------------|----------------|
| 1 | 162.25 | Cq | | |
| 2 | 160.19 | Cq | | |
| 3 | 154.61 | Cq | | |
| 4 | 145.60 | CH | 11, 8 | D |
| 5 | 138.07 | CH | 6, 5, 1 | A |
| 6 | 130.82 | Cq | | |
| 7 | 124.58 | Cq | | |
| 8 | 123.24 | CH | 8, 5 | B |
| 9 | 113.11 | Cq | | |
| 10 | 112.06 | CH ₂ | 7, 4 | E |
| 11 | 97.09 | CH | 9, 8, 6 | C |
| 12 | 90.90 | CH | 7, 3, 2 | F |
| 13 | 71.67 | Cq | | |
| 14 | 40.28 | Cq | | |
| 15 | 29.59 | CH ₂ | (13), 10, 4, 3, 2 | G |
| 16 | 26.10 | CH ₃ | 14, 7, 4 | I |
| 17 | 26.03 | CH ₃ | 14, 7, 5, 2 | J |
| 18 | 24.24 | CH ₃ | | K |

Tabla 86. Resumen de señales del espectro de ¹³C-RMN, DEPT-135, HSQC y HMBC de **C14**.

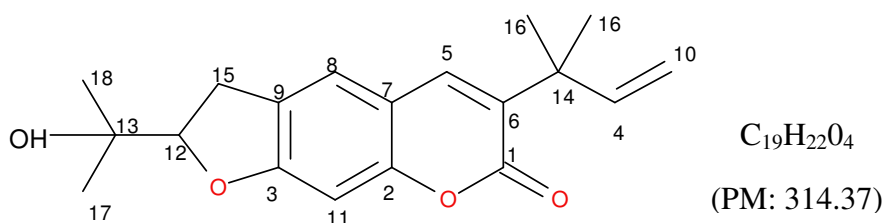


Figura 107. Chalepina

6.8.15 Análisis y espectroscópico de **C15**

6.8.15.1 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear

El espectro de ¹H-RMN del compuesto **C15** (ver figura 93) concuerda completamente con el espectro de ¹H-RMN del compuesto **C5** (ver figura 86), tanto en el número de señales como desplazamientos químicos y multiplicidad. El compuesto **C15** por lo tanto es identificado como graveolina, descrita en la sección 6.8.5.2, figura 86.

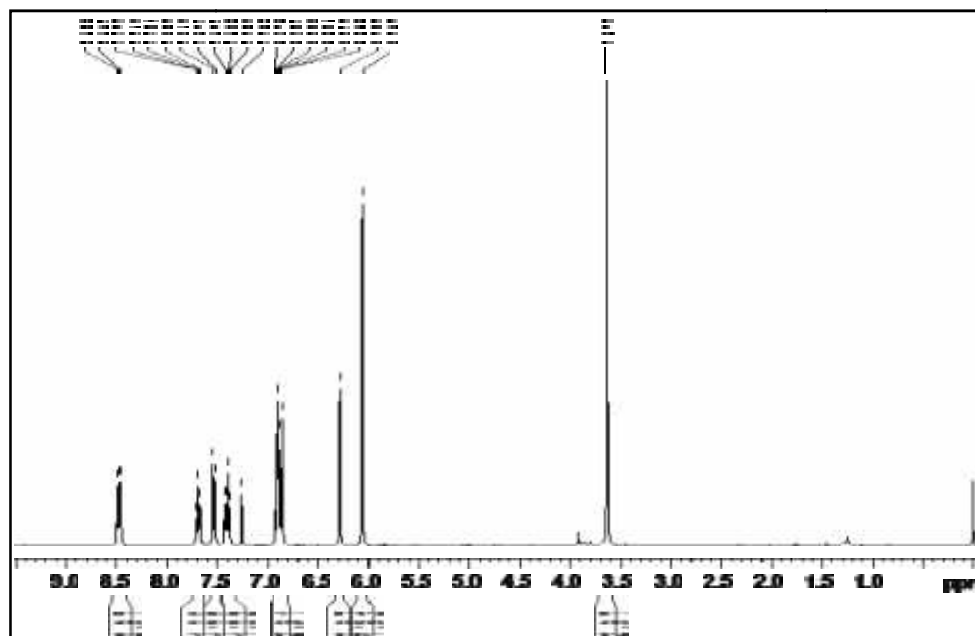


Figura 108. Espectro general de ¹H-RMN del compuesto C15 en CDCl₃.

7.0 DISCUSIÓN

Ciertas infecciones parasitarias son consideradas como unos de los padecimientos de mayor prevalencia en el mundo, manteniendo en riesgo y matando a millones de vidas humanas. Esta notable prevalencia es debida a las diferentes condiciones sociales, económicas, alimenticias y climáticas en las que habitan las diferentes poblaciones humanas. Aunque el control de las enfermedades parasitarias se lleva por medio de medidas ecológicas como lo son el control del vector que esté relacionado con el parásito para determinada enfermedad y la sanitización, también es de vital importancia el control de las parasitosis por medio de fármacos antiparasitarios (Frayha et al., 1997).

La amibiasis es una de las enfermedades parasitarias de mayor importancia en países y regiones en vías de desarrollo. Las zonas con mayor endemia de esta enfermedad son los países con regiones tropicales y subtropicales de América latina, Asia y África, afectando a 500 millones de personas y causando 100 000 muertes anualmente. La amibiasis es actualmente una de las causas de mayor morbilidad y mortalidad a nivel mundial y es considerada la tercera parasitosis de mayor importancia después de la malaria y la esquistosomiasis (Bansal et al., 2006; Pinilla et al., 2008; Ali et al., 2008). En México la amibiasis también es un problema sanitario de salud pública importante ya

que se reportó en un análisis seroepidemiológico que el 8.41 % de la población tiene anticuerpos antiamebianos, mostrando así la alta frecuencia de infecciones causadas por *E. histolítica* (Ximénez et al., 2007).

En la actualidad la falta de eficacia de los fármacos de elección para combatir la amibiasis y el aumento en la gravedad de los efectos secundarios del fármaco empleado ha vuelto de vital importancia la búsqueda de nuevas sustancias con actividad antiamebiana. La búsqueda de compuestos antiparasitarios en la Herbolaria Tradicional Mexicana ha tomado gran importancia ya que existe una bibliografía etnobotánica local muy abundante en el uso de plantas a la forma de extractos crudos, infusiones o ungüentos para tratar infecciones gastrointestinales (Navarro et al., 1996).

En esta investigación los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad amebicida de las plantas en estudio se clasificaron de acuerdo al porcentaje de inhibición obtenido a 150 µg/ml, clasificando como activo los porcentajes mayores a 80 %, moderadamente activos los porcentajes entre 70 y 80 % de inhibición y con actividad amebicida no relevante los extractos con porcentajes de inhibición inferiores a 70 % (Sülsen et al., 2006, 2008). De esta manera la planta con mayor porcentaje de inhibición fue *R. chalepensis*, seguida por *C. annuum*, *H. brasiletto* y *S. molle*. Las plantas *M. officinalis*, *C. genistoides* y *C. texana* se clasificaron como dentro del grupo de moderada actividad amebicida y finalmente las 8 plantas restantes presentaron una actividad que va de baja a nula.

Sin embargo es importante mencionar que para algunas de las plantas que mostraron actividad no relevante, se ha reportado actividad amebicida sobresaliente. Tal es el caso

de *Persea americana*, para la cual en una investigación realizada anteriormente se evaluó la actividad amebicida de un extracto etanólico y de un extracto clorofórmico obteniendo una IC₅₀ de 0.386 y 0.417 µg/ml, respectivamente (Jiménez-Arellanes *et al.*, 2013) y por otro lado se evaluó un extracto acuoso para determinar su actividad antiamebiana obteniendo una IC₅₀ de 15.96 µg/ml (Vera-ku *et al.*, 2010). En este caso la actividad amebicida altamente significativa contra *E. histolytica* difiere con el resultado obtenido en nuestra investigación (IC₅₀ mayor a 150 µg/ml) debido a que los datos mencionados anteriormente se refieren a extractos de la semilla y no de la hoja como en nuestro caso. Aunque en estos reportes no se intentó aislar los compuestos responsables de dicha actividad es posible que alguno de estos compuestos presentes en la semilla del *P. americana* se encuentren presentes en concentraciones muy bajas en las hojas, razón por la cual obtuvimos un porcentaje de inhibición muy bajo. También para *A. mexicana*, existen reportes previos de la evaluación de su actividad amebicida, sin embargo es posible observar una gran variación en los resultados que se han obtenido ya que en una evaluación realizada en el año 2005 de un extracto hexánico y un extracto acetónico de las partes aéreas se obtuvieron IC₅₀ de 122.0 y 117.2 µg/ml, respectivamente (Said *et al.*, 2005), mientras que en otro estudio empleando solamente las hojas de *A. ludoviciana* (sinónimo de *A. mexicana*) se reporta una IC₅₀ de 82.2 µg/ml para un extracto metanólico (Calzada *et al.*, 2006), con lo cual se confirma que la actividad amebicida de esta planta no es relevante y además se observa que influye de manera significativa en la actividad biológica la región de recolecta de la planta.

En torno al grupo de plantas que presentaron una actividad amebicida moderada existen reportes que respaldan el nivel de actividad mostrada en nuestras

investigaciones. Reportes previos sobre la evaluación de la actividad antiparasitaria ante trofozoitos de *E. histolytica* de compuestos aislados de *C. texana* muestran una actividad moderada por parte del terpeno chaparrina a una concentración de 10 μM (Calzado-Flores *et al.*, 1998). También se ha identificado al compuesto 11-*O*-trans-*p*-coumaroil-amarolido aislado de esta misma planta al cual se le atribuye actividad antiprotozoaria (Dou *et al.*, 1996). Estos dos compuestos antes mencionados podrían ser los responsables de la actividad moderada de 73 % de inhibición a 150 $\mu\text{g/ml}$ que obtuvimos en la evaluación que nosotros realizamos. También para *M. officinalis* existen reportes previos de actividad amebicida sobre el parásito oportunista *Acanthamoeba castellanii* mostrando una actividad moderada tanto en quistes como en trofozoitos (Malatyali *et al.*, 2011). Sin embargo es importante resaltar que *M. officinalis* no ha sido evaluada previamente para determinar su actividad amebicida sobre trofozoitos de *E. histolytica* por lo que los resultados mostrados en esta investigación representen nueva información acerca de la actividad biológica de esta planta.

Con lo que respecta al primer grupo de plantas, las cuales mostraron actividad amebicida relevante, solamente *H. brasiletto* y *C. annuum* carecen de reportes previos acerca de la actividad amebicida, sin embargo se ha reportado actividad antiprotozoaria de baja relevancia sobre trofozoitos de *Giardia duodenalis* por parte de *C. annuum* (Ponce-Macotella *et al.*, 1994). Aunque no se han realizado trabajos evaluando la actividad amebicida de compuestos aislados de *S. molle* o de *R. chalepensis*, si se ha reportado actividad amebicida en extractos metanólicos ante trofozoitos de *E. Histolytica*, reportando una IC_{50} de 82.4 $\mu\text{g/ml}$ para *S. molle* y una IC_{50} de 61.9 $\mu\text{g/ml}$ para *R. chalepensis* (Calzada *et al.*, 2006), en donde podemos observar que la actividad

amebicida reportada por estos autores es inferior a la obtenida por nosotros en el extracto de *S. molle* (IC₅₀ de 32.45 µg/ml) y similar a la actividad obtenida del extracto de *R. Chalepensis* (IC₅₀ de 68.17 µg/ml).

El siguiente paso para el desarrollo de nuevos agentes antiprotozoarios es el aislamiento del compuesto activo y el análisis de su mecanismo de acción ya que enfocarse sólo a la investigación de los extractos crudos limitaría su uso potencial para la industria farmacéutica (Spainhour, 2005; Harvey and Cree, 2010). Por eso se seleccionó el extracto de *R. Chalepensis*, al ser el extracto con mayor porcentaje de inhibición sobre trofozoitos de *E. Histolytica*, para realizar un fraccionamiento biodirigido con el cual fue posible aislar 15 compuestos puros.

En base a los análisis de ¹H- y ¹³C-RMN se determinó que los compuestos **C1**, **C4**, **C6**, **C8** y **C9** poseen la misma estructura, y por comparación con datos espectroscópicos ya reportados en la literatura científica (El-Belh *et al.*, 1981; Tian-Shung *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007) se pudo identificar como chalepensina (ver figura 109), compuesto ya aislado de esta planta (Ezmirly and Milson, 1980), sin embargo no existen a la fecha reportes acerca de su actividad amebicida, por lo que el resultados que obtenido en nuestro investigación (IC₅₀ 38.71 µg/ml) es el primero.

Los compuestos **C2** y **C7**, como se menciono anteriormente son similares y se determinó que realmente resultaron ser una mezcla de tres componentes, de los cuales en el espectro de ¹³C-RMN fue posible distinguir las señales pertenecientes a cada uno de ellos. Al clasificar las señales de ¹H y ¹³C-RMN para cada uno de los compuestos y posteriormente relacionarlos mediante análisis bidimensionales de RMN (HSQC y

HMBC) se logró determinar que esta mezcla está compuesta por 2 furanocumarinas, psoraleno y bergapteno, los cuales ya han sido aislados previamente de esta planta (Tian-Shung *et al.*, 2003; Chunyan *et al.*, 2009; Intekhab and Aslam, 2009) (ver figura 109) así como por un tercer compuesto con naturaleza de cetona alifática - insaturada, el cual no fue posible identificar completamente. Por otra parte, como se mencionó en la sección 6.8.10.1 lo que se aisló como compuesto **C10** realmente corresponde a una mezcla también compuesta por psoraleno y bergapteno, solamente que el compuesto de naturaleza alifática ahora no está presente debido a su insolubilidad en el solvente acetato de etilo. De esta manera se confirma lo difícil que resulta separar estos compuestos furanocumarínicos (Chunyan *et al.*, 2009). La actividad amebicida aquí reportada para **C10** se clasificó como moderada (IC_{50} de 57.09 $\mu\text{g/ml}$), siendo imposible determinar la actividad para **C2** y **C7**, ya que influye de manera importante la presencia de la cetona alifática al convertir estas mezclas en insolubles en el medio de cultivo y en DMSO por lo que resultó imposible evaluar su actividad. La actividad amebicida tanto del psoraleno como del bergapteno no ha sido reportada con anterioridad, solamente al bergapteno se le ha evaluado su actividad antiprotozoaria, teniendo una actividad moderada sobre *T. brucei rhodesiense* (Tasdemir *et al.*, 2006).

Mediante el análisis de Resonancia Magnética Nuclear se determinó que los compuestos **C3**, **C11** y **C12** tienen la misma estructura, variando únicamente en el tipo de impureza que posee cada uno. Esta diferencia permitió que el compuesto fuese aislado en diferentes etapas del aislamiento biodirigido influyendo de esta manera en su solubilidad y el grado de actividad biológica. Al comparar con datos espectroscópicos de la literatura se determinó que este compuesto ya ha sido aislado anteriormente de *R.*

graveolens e identificado como rutamarina (Tian-Shung *et al.*, 2003) (ver figura 109), pero hasta ahora no ha sido aislado de *R. chalepensis*. De igual manera la actividad amebicida no ha sido determinada con anterioridad por lo que el resultado reportado en nuestra investigación, obteniendo una actividad relevante con una IC₅₀ de 6.54 µg/ml es el primero reportado contra algún tipo de protozoario.

La determinación estructural de los compuestos **C5** y de **C15** mediante el análisis de ¹H- y ¹³C-RMN indicó que se tratan del mismo compuesto. Al comparar los desplazamientos químicos de las señales determinadas en el espectro de ¹H-RMN con los reportados en la literatura corroboró la identidad del compuesto de naturaleza alcaloidea como graveolina (Koyama *et al.*, 1999; Tiang-Shung *et al.*, 2003) (ver figura 109), el cual al igual que los demás compuestos antes descritos también ha sido en *R. chalepensis* (Ulubelen *et al.*, 1986). Aunque no fue posible determinar la actividad amebicida de este compuesto debido al alto grado de insolubilidad en el medio de cultivo y en el DMSO, es importante mencionar que no existen reportes del uso de este compuesto como antiptozoario.

Después de analizar el compuesto **C13** por medio de las técnicas de ¹H- y ¹³C-RMN (1D y 2D) se identificó a **C13** como una mezcla de dos componentes identificados como xantotoxina e isopimpinlina (ver figura 109), los cuales ya han sido aislados previamente de *R. chalepensis* (Ulubelen *et al.*, 1986) y por lo tanto los desplazamientos químicos, tanto de las señales del espectro de ¹H-RMN como del espectro de ¹³C-RMN coinciden con los reportados en la literatura (Bogucka-Kocka, 1999; Tian-Sung *et al.*, 2003; Lehr *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2008). Dentro de los tipos de actividad biológica

reportada para este compuesto no figura la actividad antiprotozoaria, por lo que los resultados de actividad amebicida con una IC_{50} sobresaliente a 26.22 $\mu\text{g/ml}$ obtenidos en nuestra investigación son los primeros en este rubro.

La identificación del compuesto **C14** se llevó a cabo empleando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear, empleando análisis de ^1H y de ^{13}C , confirmando que este compuesto ya ha sido aislado con anterioridad de *R. cholepensis* (Ulubelen *et al.*, 1986). Al comparar los desplazamientos químicos tanto del espectro de ^1H - y ^{13}C -RMN con los reportados en la literatura se confirmó la identidad del compuesto como chalepina (Ezmirly and Wilson, 1980, Oliveira *et al.*, 1996) (ver figura 109). Por otra parte la actividad amebicida no ha sido reportada aun para este compuesto, sin embargo ha sido evaluada su actividad ante otros protozoarios de importancia médica (Pavão *et al.*, 2002).

Como es posible observar, 7 de los compuestos con actividad amebicida aislados de *R. cholepensis* en nuestra investigaciones forman parte de un grupo de productos naturales identificados como furanocumarinas, en este caso la totalidad de los compuestos son furanocumarinas lineales. Este grupo de compuestos naturales representan una fuente de oportunidades para ser empleados como agentes antiprotozoarios, ya que su principal actividad sobre parásitos tiene como objetivo alteraciones en el ADN, uniéndose de manera covalente a las bases que conforman la hélice del ADN causando mutaciones puntuales, supresiones y mutaciones por desplazamiento lo que origina la muerte del parasito (Wink, 2012). Además de la capacidad que poseen estos compuestos para unirse covalentemente al ADN se ha

reportada una importante actividad antiparasitaria y por lo tanto actividad citotóxica por la reactividad química que posee el grupo funcional de las α -lactonas β -insaturadas para fungir como aceptor de Michael para nucleófilos como son los residuos aminoácidos (cisteína, lisina, serina, treonina) presentes en los receptores de ciertas biomoléculas del parásito, las cuales interactúan con el compuesto (Cardona and Saez, 2011).

De acuerdo a los diferentes métodos de acción de los compuestos que logramos identificar, se puede observar que la actividad antiprotozoaria que mostraron cada uno de ellos, se debe a las características estructurales de cada molécula. Por lo tanto es de esperarse que compuestos que posean anillos aromáticos unidos al anillo de la α -lactona β -insaturada aumente su actividad, razón por la cual los compuestos chalepina, psoraleno, bergapteno, rutamarina, xantotoxina, isopimpinellina y la chalepina resultaron los compuestos con mayor actividad amebicida. De los compuestos antes mencionados la mayor actividad antiparasitaria se obtuvo en la rutamarina, este resultado contradice a lo reportado en la literatura ya que se menciona que la actividad biológica del compuesto disminuirá al modificar los grupos $-\text{OH}$ produciendo acetilaciones. Este fenómeno se hace más evidente al comparar la actividad antiparasitaria de la chalepina con la rutamarina, obteniendo una menor actividad antiparasitaria en la chalepina aunque este compuesto sea el que posee un grupo OH libre el cual en la rutamarina se encuentra acetilado. Lo anterior demuestra que el mecanismo de acción de estos dos compuestos sobre *E. histolytica* es diferente a lo reportado sobre otros protozoarios (Cardona and Saez, 2011).

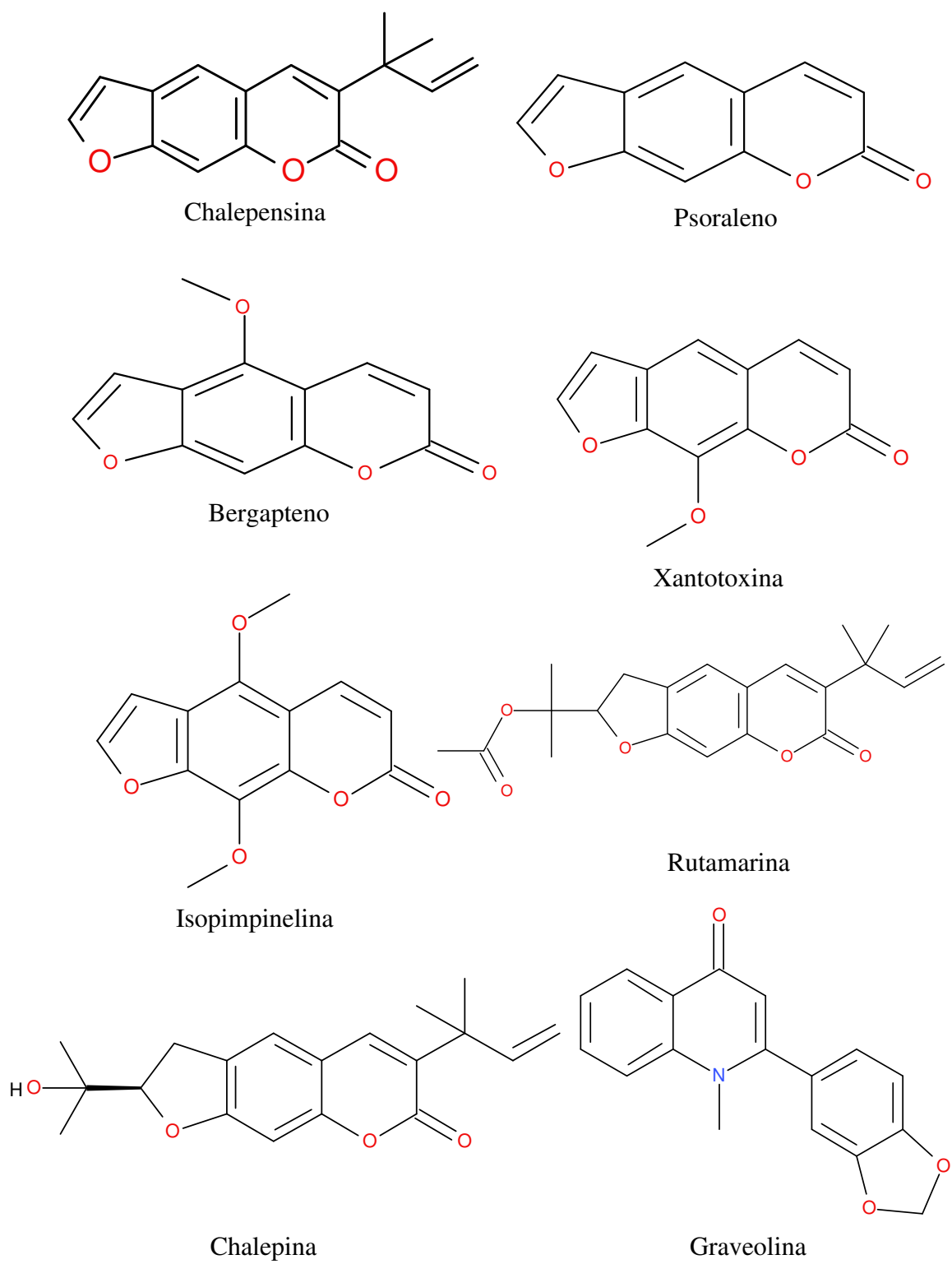


Figura 109. Compuestos aislado de *R. chalepensis*.

8. CONCLUSIONES

Al finalizar la presente investigación de llegaron a las siguientes conclusiones:

1. Se obtuvieron los extractos metanólicos de las 15 plantas medicinales bajo estudio, obteniendo los mayores rendimientos en las plantas *G. glutinosum*, *C. annuum* y *P. americana*.
2. Como parámetros de crecimiento de *E. histolytica* se obtuvo un tiempo de generación de 6.29 horas y un tiempo de duplicación de 4.32 horas. Además se determinó que el tiempo ideal para evaluar la actividad amebicida de los diferentes extractos, fracciones y compuestos es de 72 horas.
3. Se determinó que los extractos de *R. chalepensis*, *C. annuum*, *H. brasiletto* y *S. molle* presentan el mayor porcentaje de inhibición sobre trofozoitos de *E. histolytica*, siendo el extracto de *R. chalepensis* el que presentó el mayor porcentaje de inhibición (90.50 %).
4. Se realizó la partición del extracto metanólico de *R. chalepensis* con los solventes hexano y acetato de etilo y se evaluó su actividad amebicida observando que ambas particiones poseen una actividad amebicida relevante.

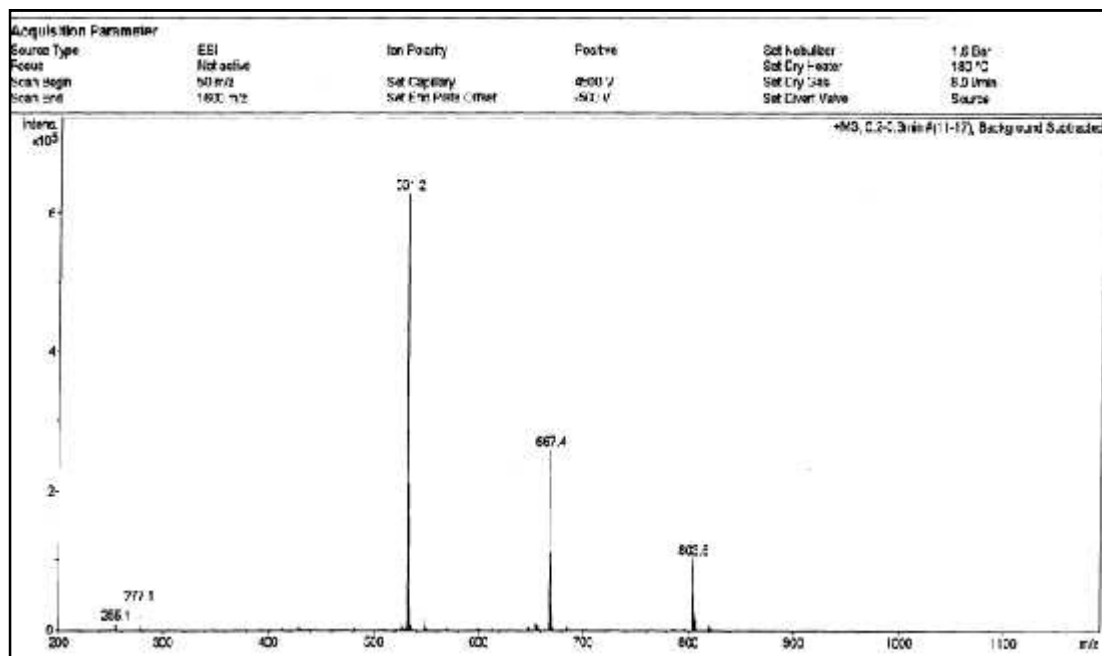
5. Del fraccionamiento biodirigido realizado a las dos particiones (partición de hexano y partición de acetato de etilo) se obtuvo lo siguiente:
- De la partición hexánica se aislaron los compuestos denominados como **C1, C2, C3, C6 y C7**.
 - De la partición de acetato de etilo se aislaron los compuestos **C4, C5, C8, C9, C10, C11, C12, C13, C14 y C15**.
6. Se elucidó la estructura de los compuestos aislados mediante técnicas de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN, ^{13}C -RMN, APT, DEPT 135, HSQC, HMBC y HMQC) y espectrometría de masas. Además se determinó su actividad amebicida calculando su IC_{50} .
- Se determinó que los compuestos **C1, C4, C6, C8 y C9** ($\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_3$) son idénticos y su estructura corresponde a la furanocumarina identificada como chalepensina con una IC_{50} de $38.71 \mu\text{g/ml}$.
 - Se determinó que los dos componentes principales de las mezclas denominadas como **C2, C7 y C10** corresponden al psoraleno ($\text{C}_{11}\text{H}_6\text{O}_3$) y al bergapteno ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_4$) en proporciones de 1:3. La mezcla presenta una IC_{50} de $57.09 \mu\text{g/ml}$.
 - Se determinó que los compuestos **C3, C11 y C12** ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$) poseen la misma estructura química y se identificaron como rutamarina, la cual posee una IC_{50} de $6.54 \mu\text{g/ml}$.
 - Se determinó que los compuestos **C5 y C15** ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{NO}_3$) poseen la misma estructura química, identificándolos como el alcaloide graveolina. A este compuesto no fue posible determinar su actividad

antiparasitaria debido a la insolubilidad que presentó tanto en el medio de cultivo como en el DMSO.

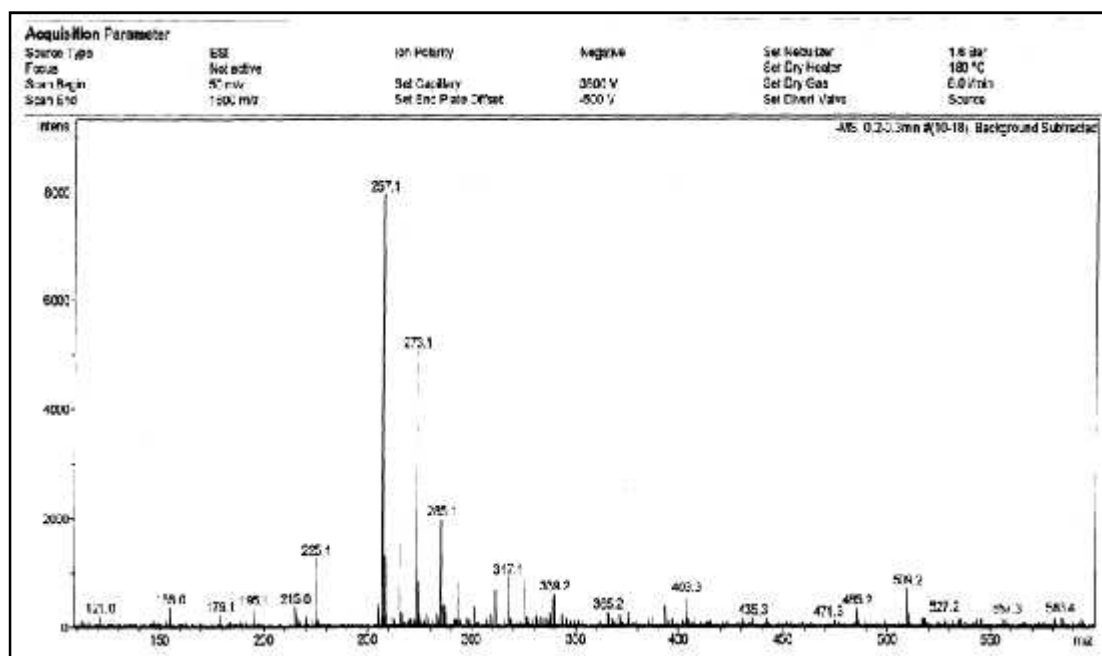
- e. Se determinó que **C13** es una mezcla formada por los compuestos xantotoxina ($C_{12}H_8O_4$) e isopimpinlina ($C_{13}H_{10}O_5$), la cual presenta una IC_{50} de 26.22 $\mu\text{g/ml}$.
- f. El compuesto **C14** ($C_{19}H_{22}O_4$) se identificó como la furanocumarina chalepina, la cual presentó una IC_{50} 28.67 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitieron formar una brecha para nuevas investigaciones enfocadas en evidenciar el mecanismo de acción de furanocumarinas al ser aplicadas sobre trofozoitos de *E. histolytica*. Además es importante resaltar la notoria actividad antiparasitaria del compuesto rutamarina con una IC_{50} de 6.54 $\mu\text{g/ml}$ siendo el principal candidato para posteriores análisis y ser tomado en cuenta como un posible agente antiamebiano.

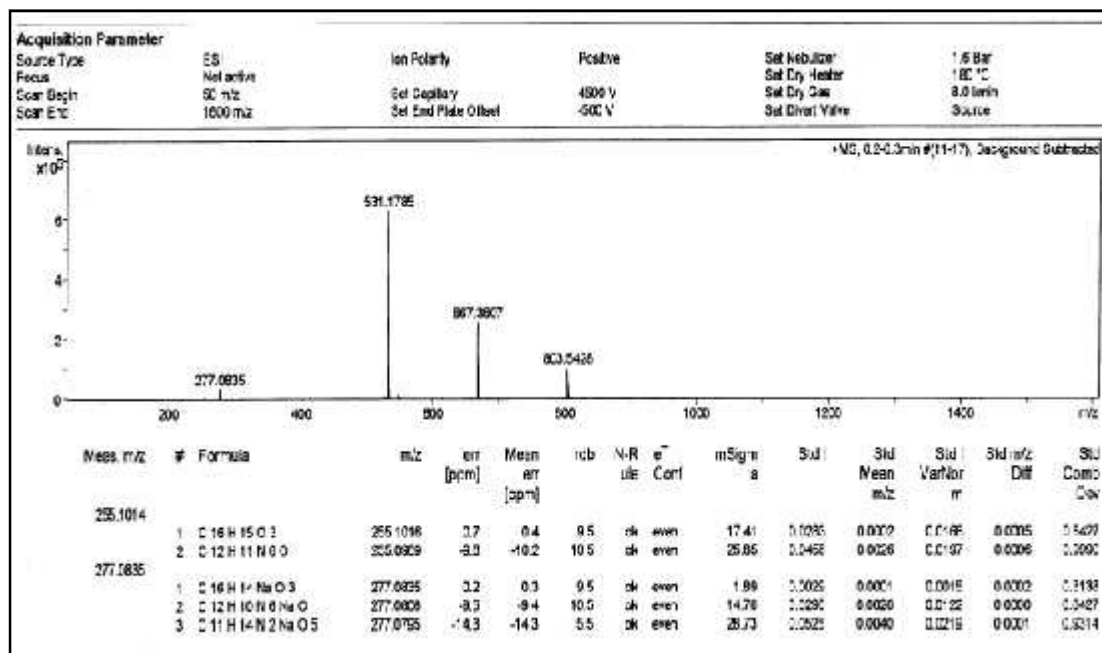
APENDICE A



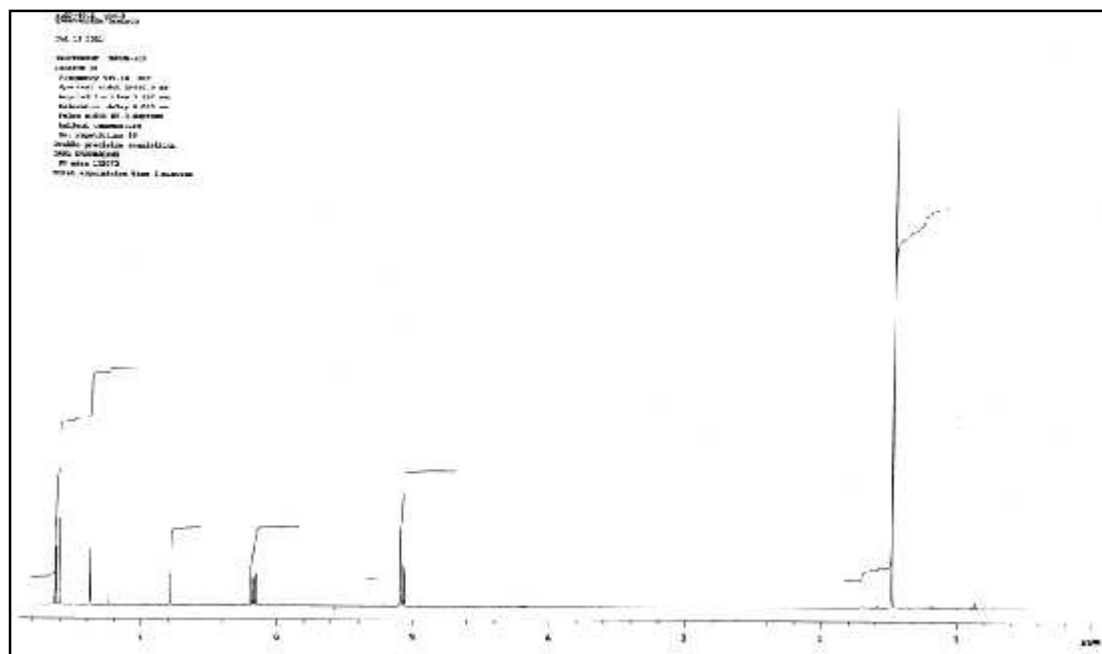
A-1. Espectro de masas [(+)-ESI-MS] del compuesto C1. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



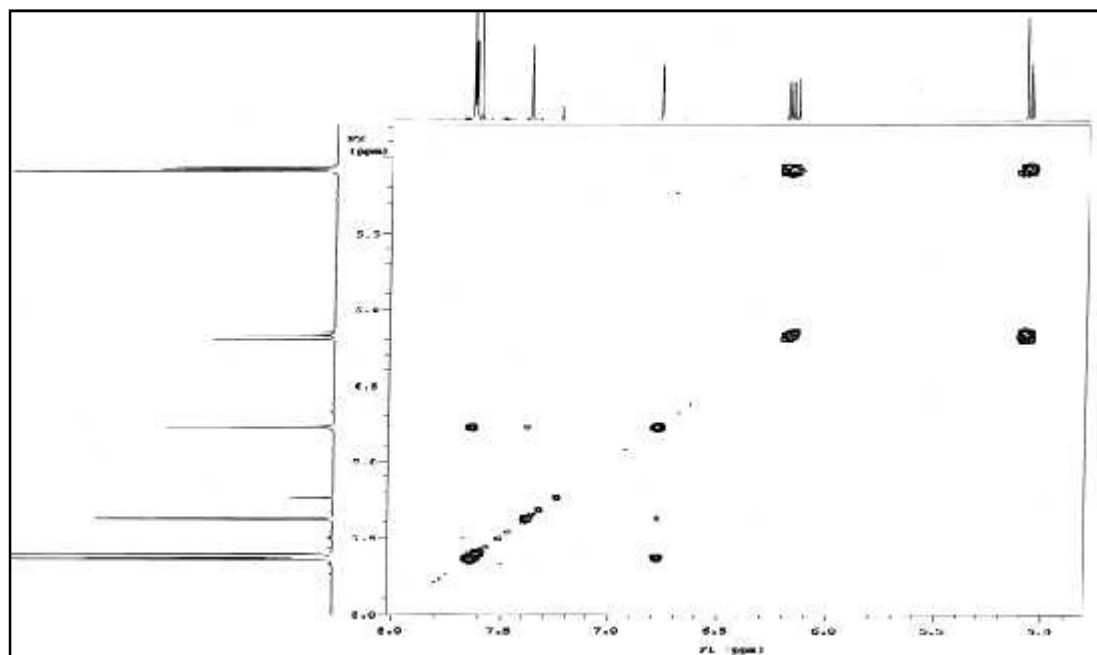
A-2. Espectro de masas [(-)-ESI-MS] del compuesto C1. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



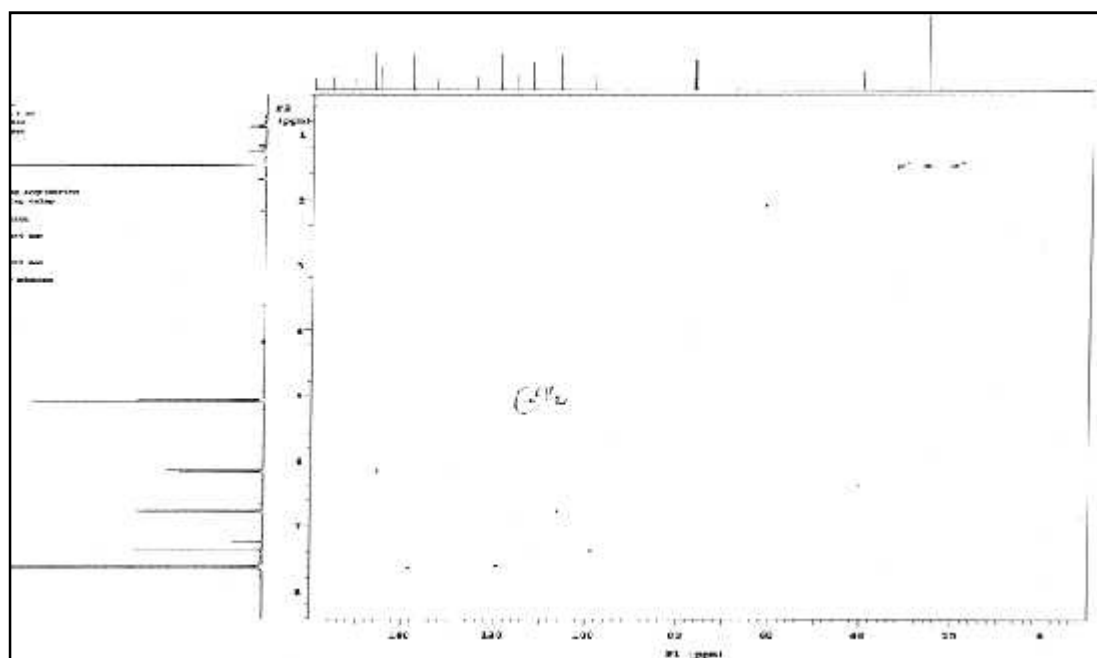
A-3. Espectro de masas de alta resolución [(+)-HRESI-MS] del compuesto C1. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



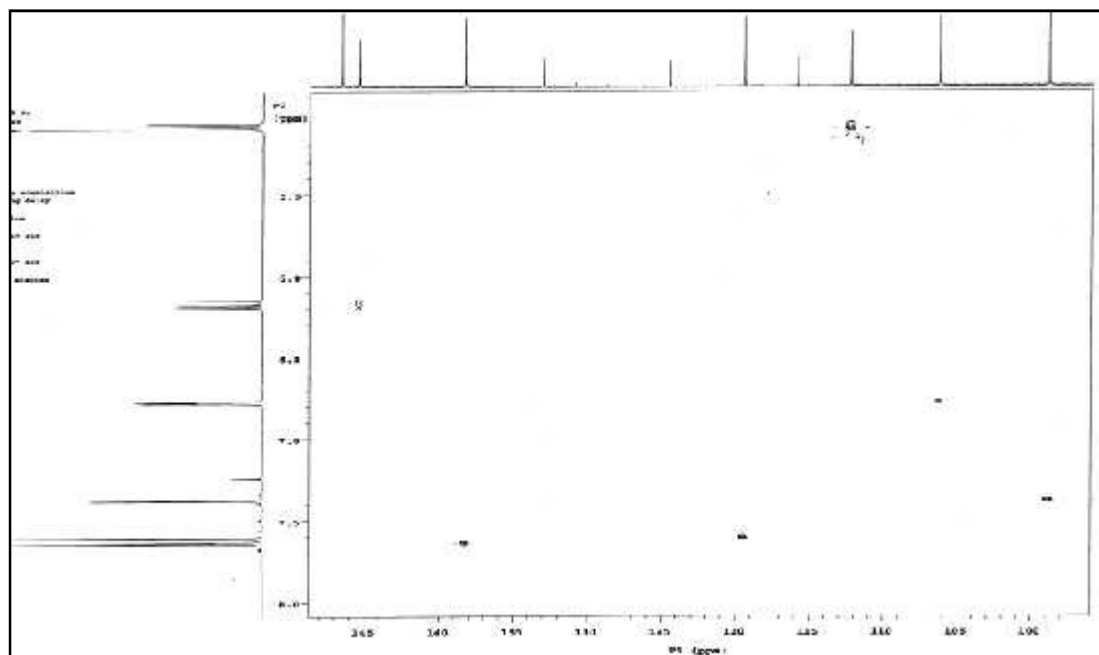
A-4. Espectro ¹H-RMN general del compuesto C1. Obtenido mediante un Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



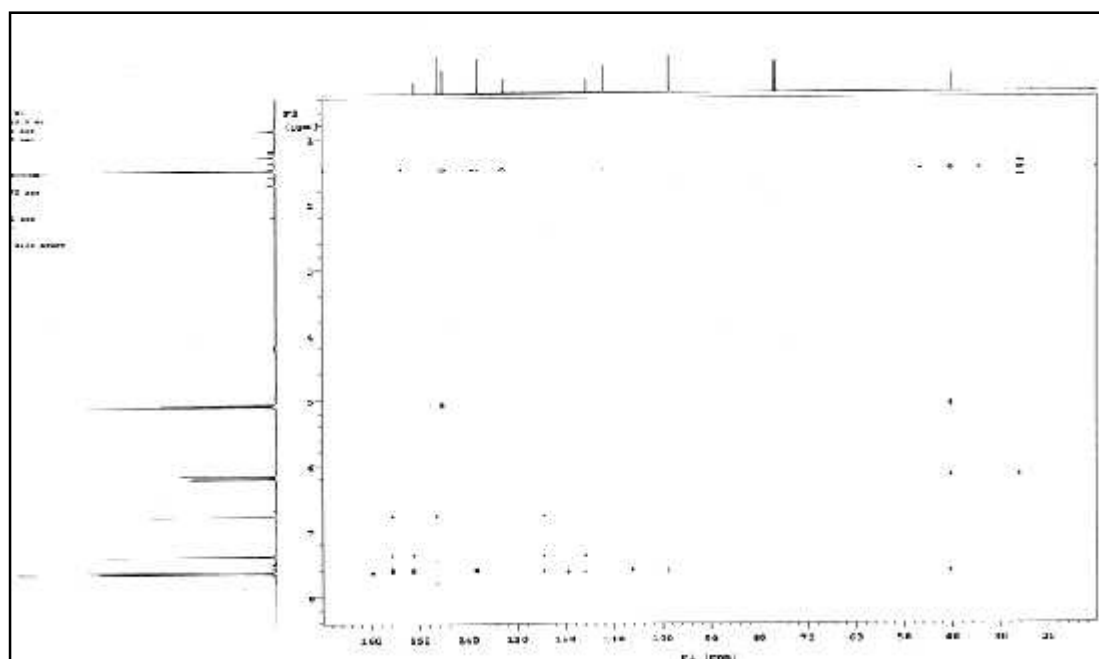
A-7. Ampliación del espectro COSY (^1H : 5.0-8.0 ppm; ^1H : 5.0-8.0 ppm) del compuesto C1. Obtenido mediante un Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



A-8. Espectro HSQC general del compuesto C1. Obtenido mediante un Espectrómetro Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

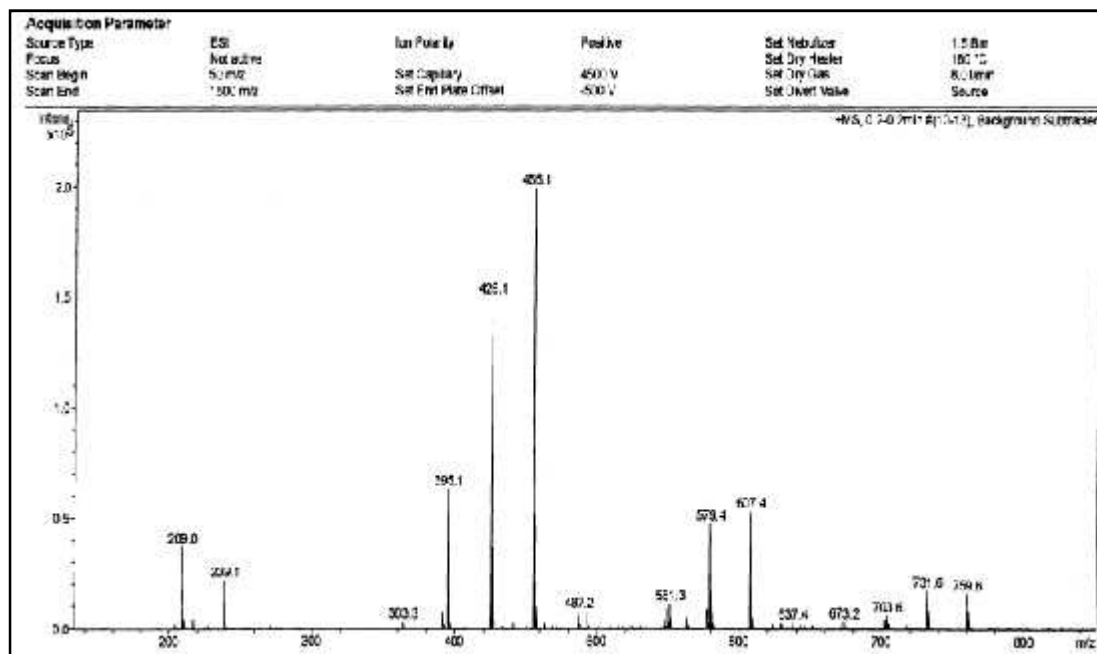


A-8. Ampliación del espectro HSQC (^1H : 5.0-8.0 ppm; ^{13}C : 100-150 ppm) del compuesto **C1**. Obtenido mediante un Espectrómetro Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

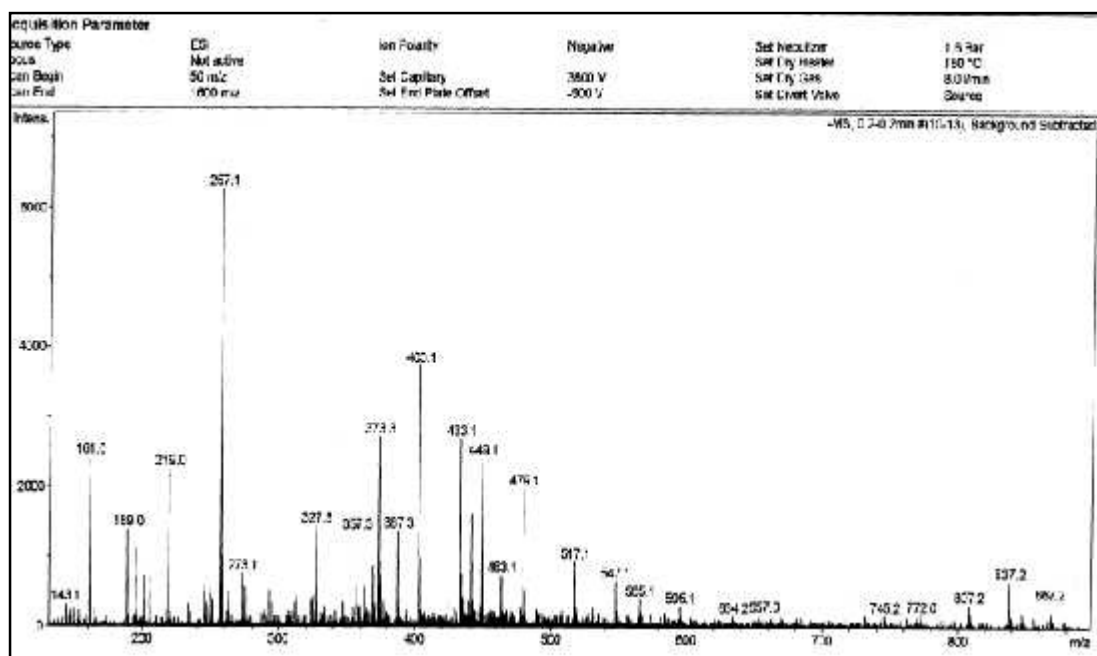


A-9. Espectro HMBC general del compuesto **C1**. Obtenido mediante un Espectrómetro Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

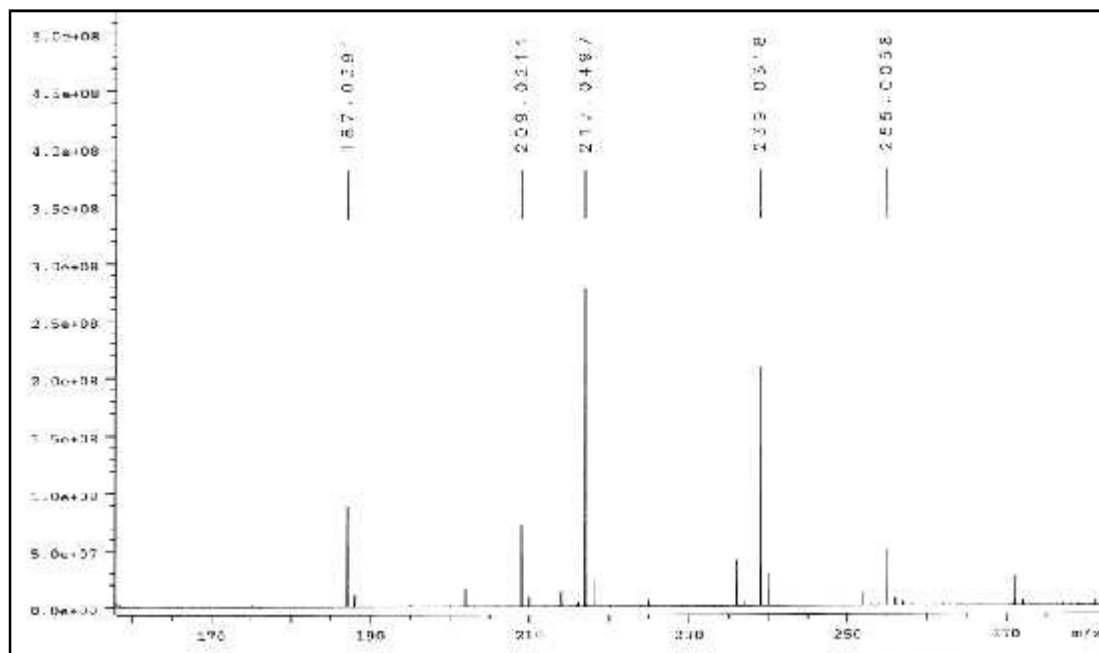
APENDICE B



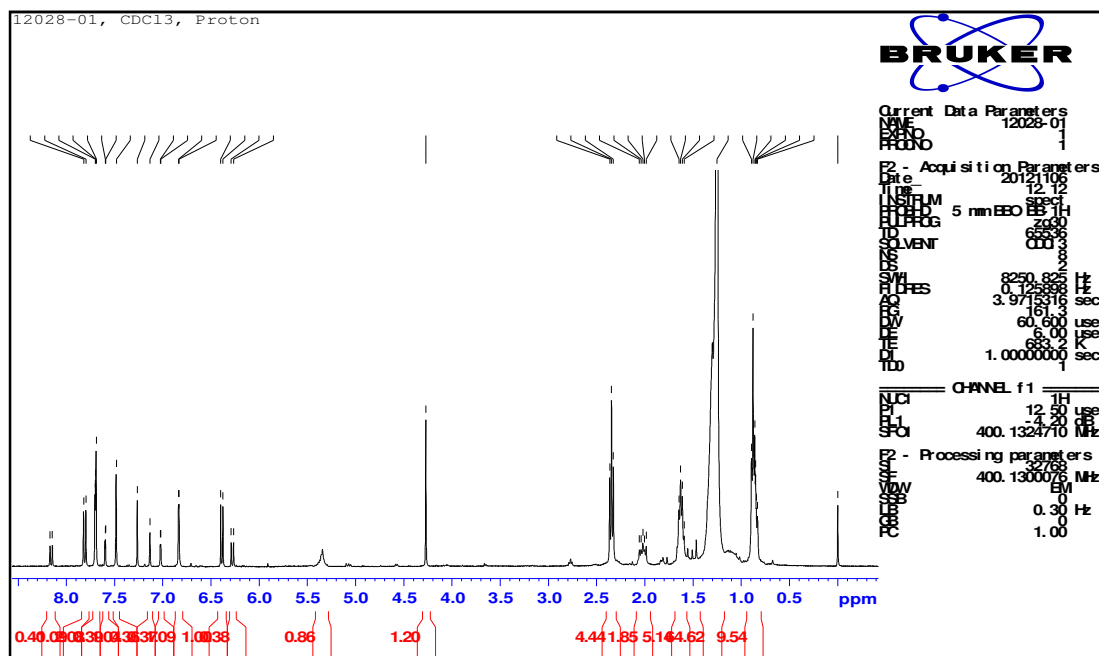
B-1. Espectro de masas [(+)-ESI-MS] del compuesto **C2**. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



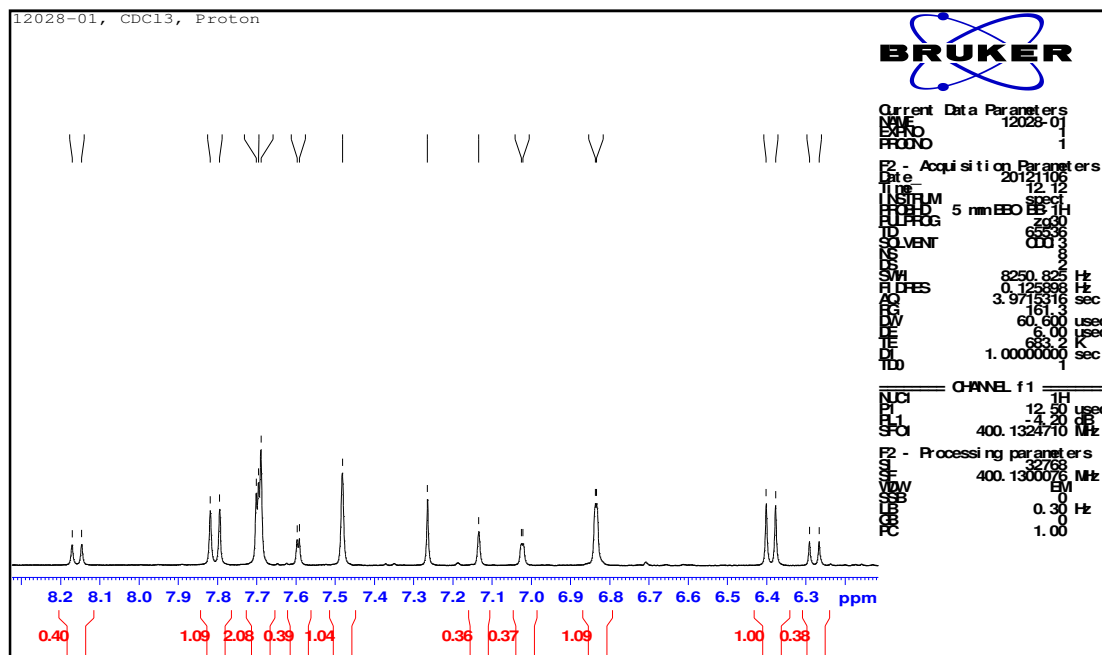
B-2. Espectro de masas [(-)-ESI-MS] del compuesto **C2**. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



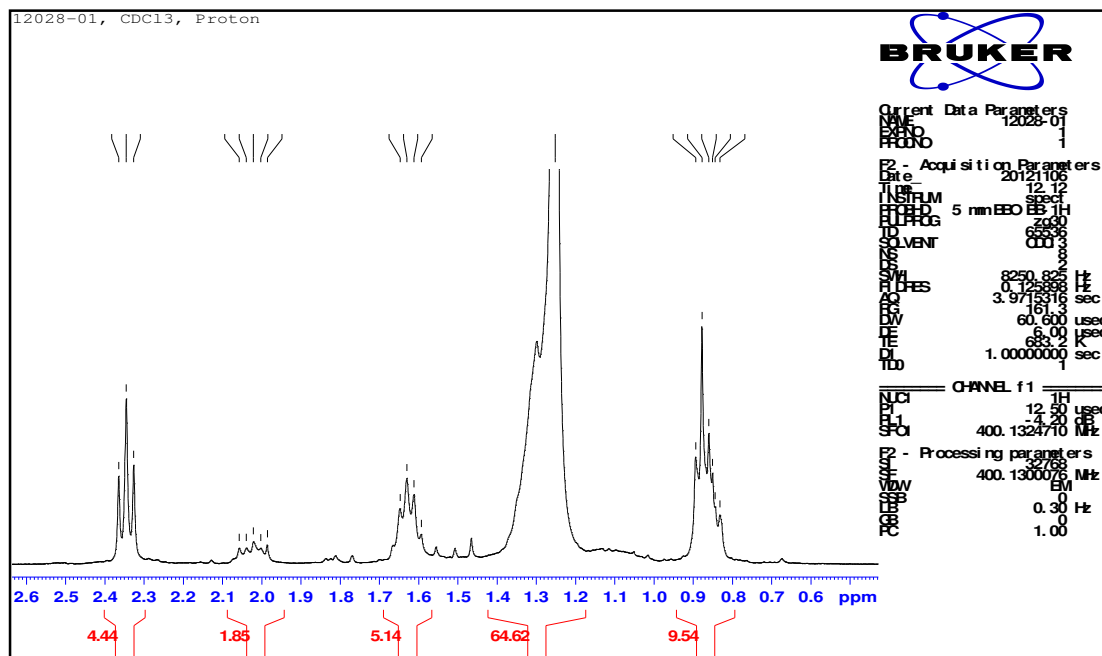
B-3. Espectro de masas de alta resolución [(+)-HRESI-MS] del compuesto **C2**. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



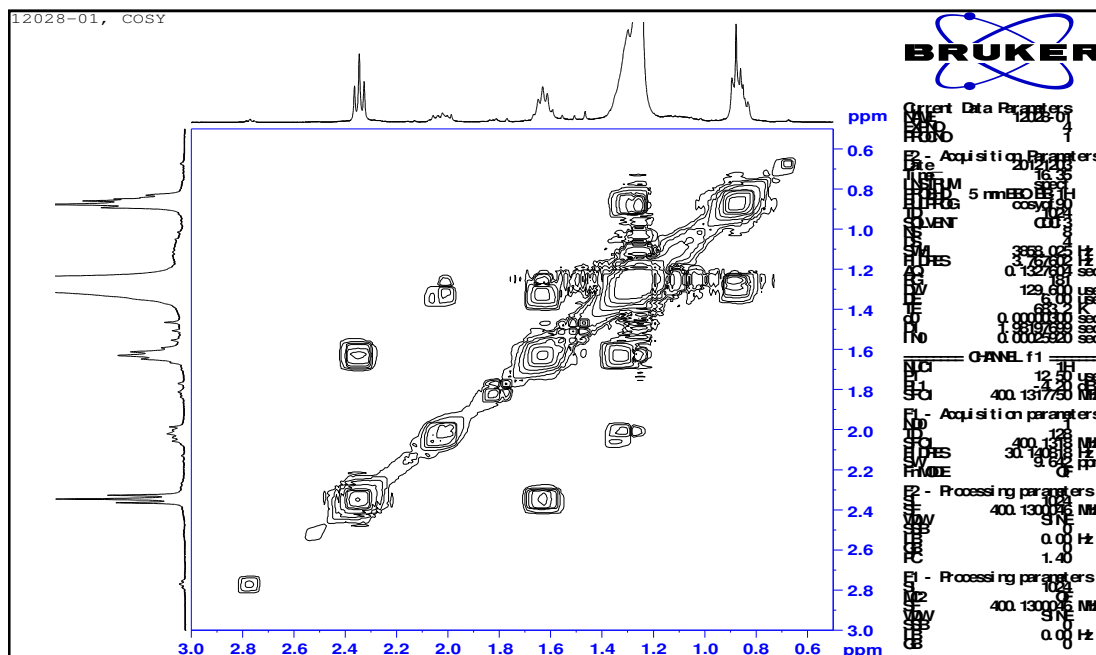
B-4. Espectro ^1H -RMN general del compuesto **C2**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



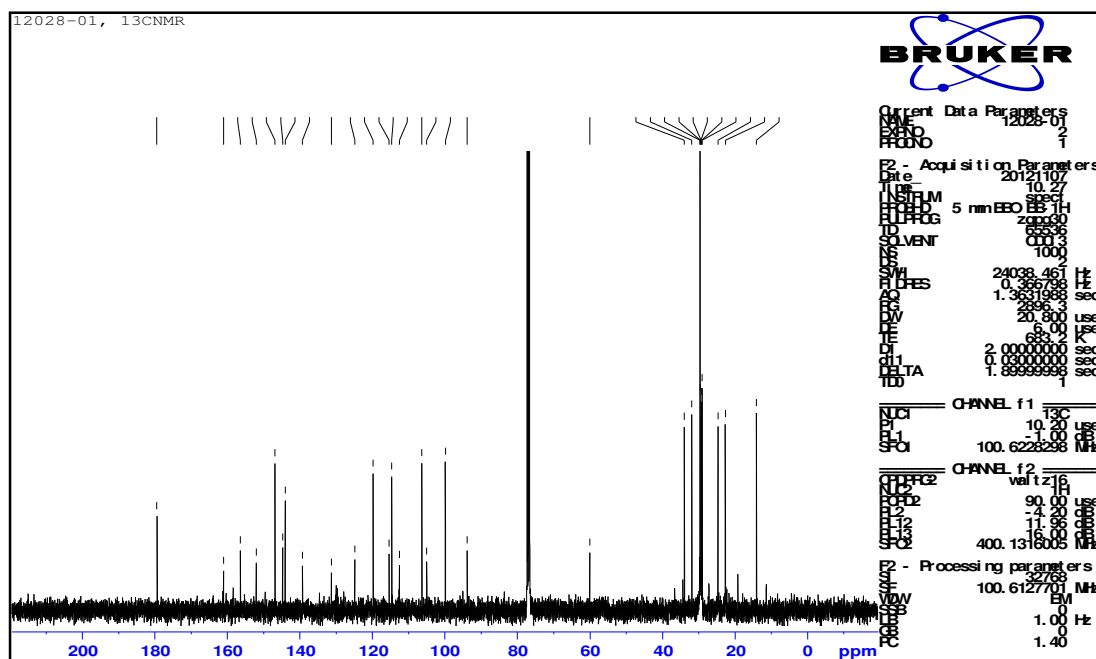
B-5. Ampliación de la zona 6.1-8.3 ppm del espectro ¹H-RMN del Compuesto C2. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



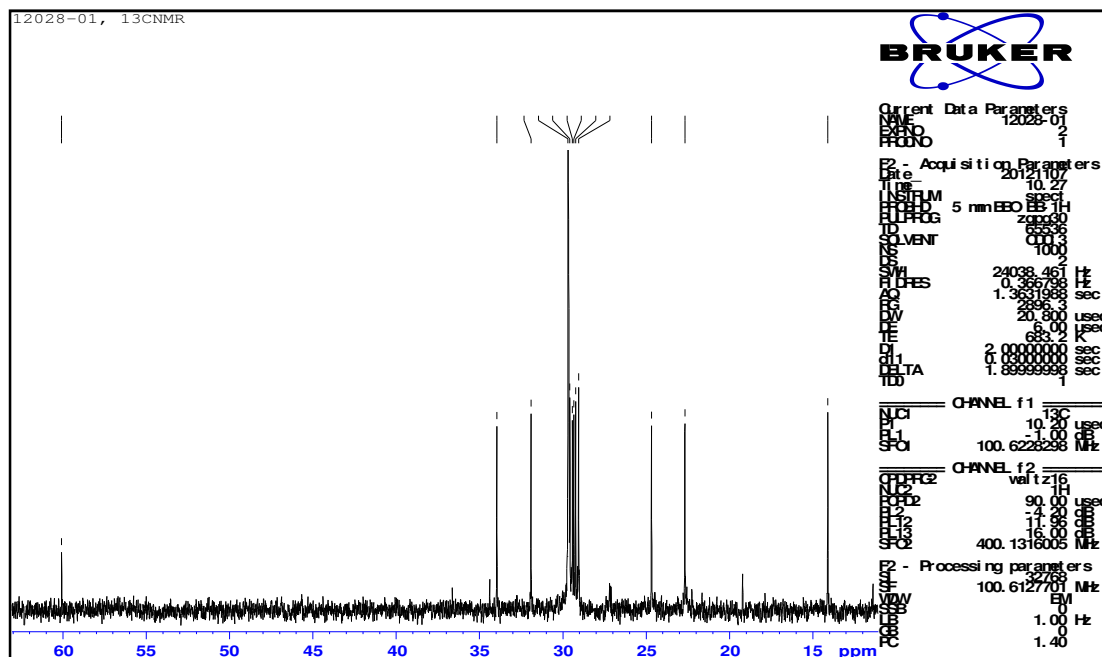
B-6. Ampliación de la zona 0.5-2.7 ppm del espectro ¹H-RMN del Compuesto C2. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



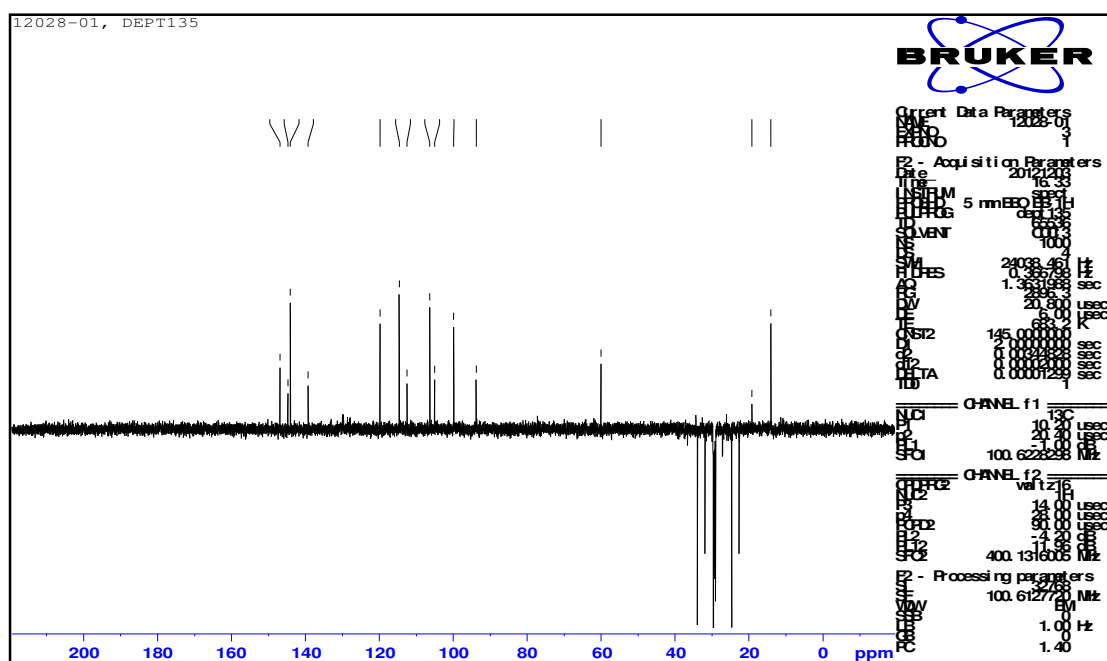
B-9.Ampliación del espectro COSY (^1H : 0.6-3.0 ppm; ^1H : 0.6-3.0 ppm) del compuesto **C2**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



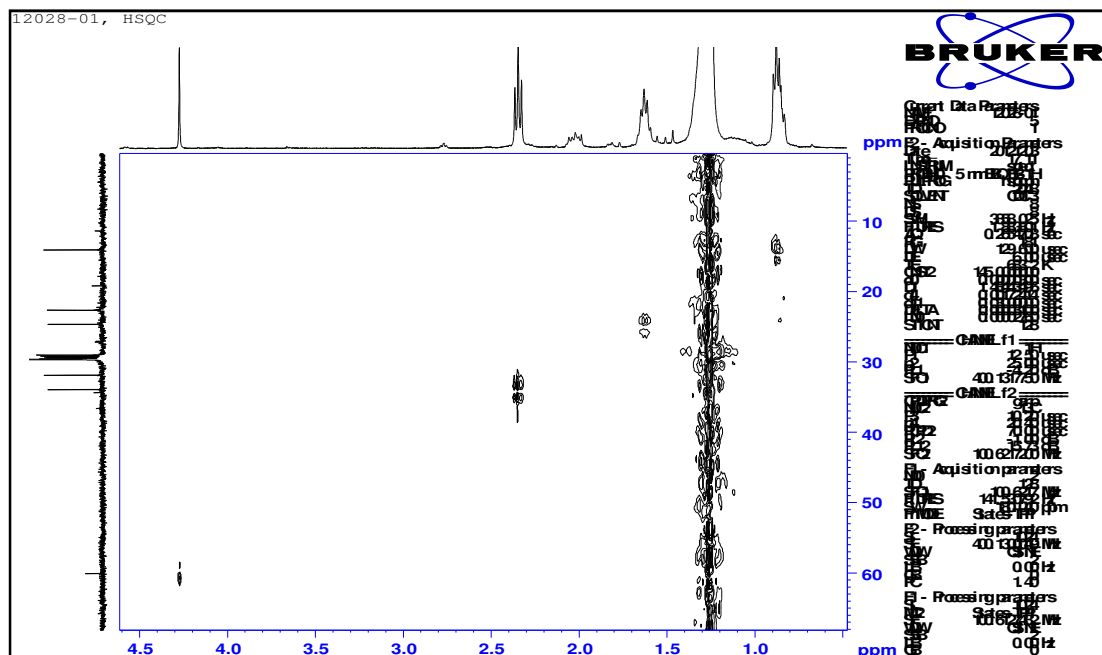
B-10. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto **C2**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



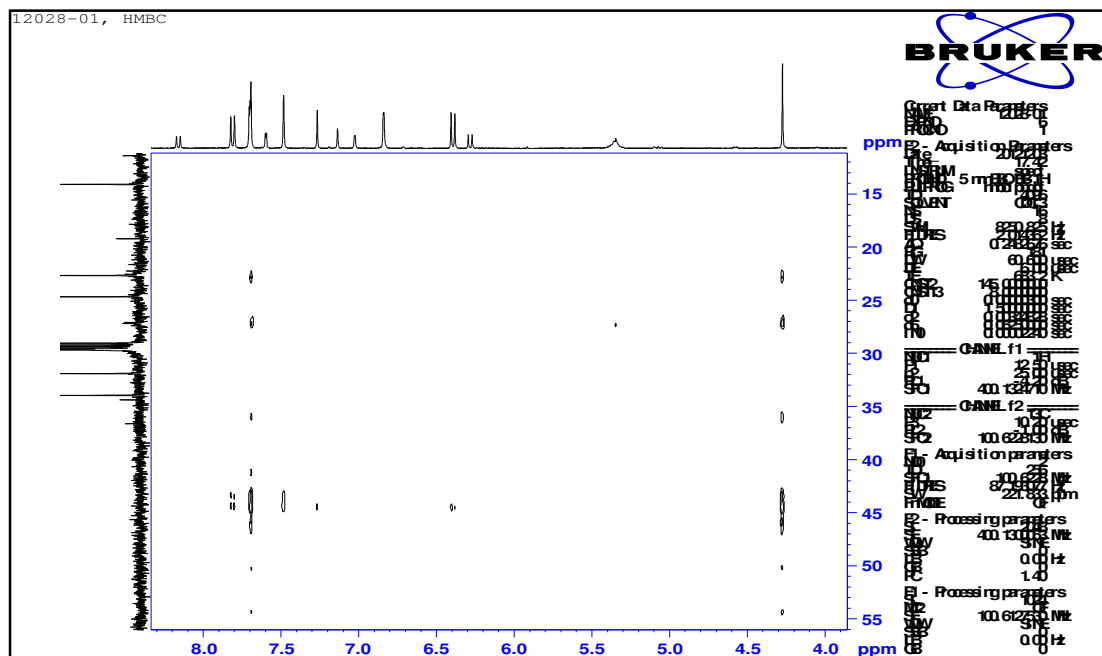
B-11. Ampliación de la zona 10-65 ppm del. espectro ¹³C-RMN del compuesto **C2**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



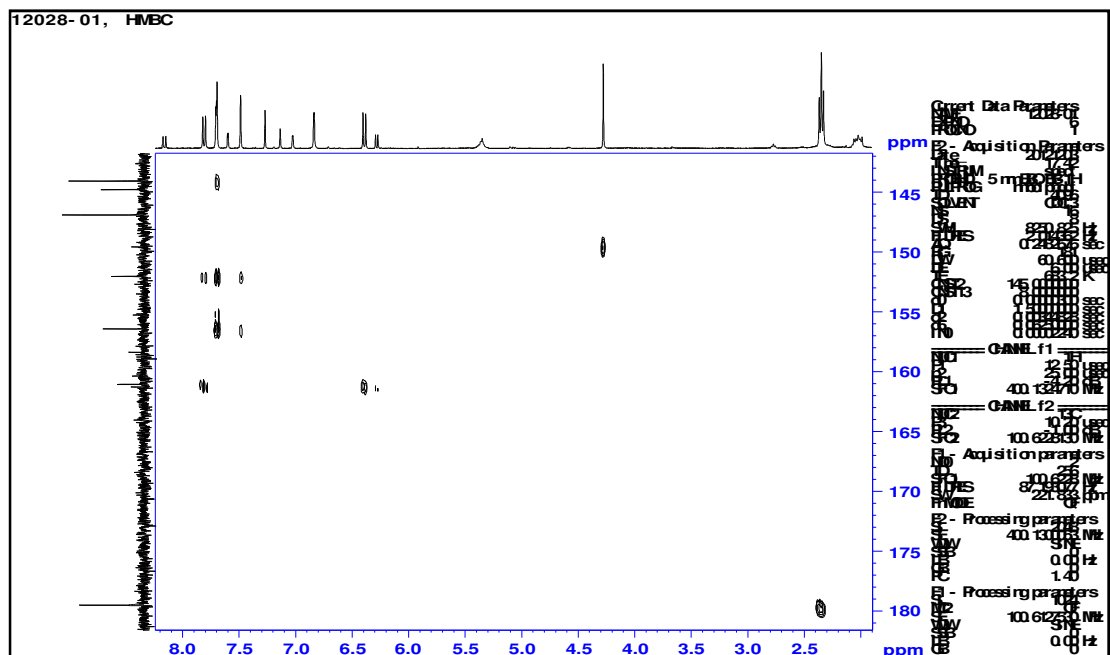
B-12. Espectro DEPT135 del espectro ¹³C-RMN del compuesto **C2**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



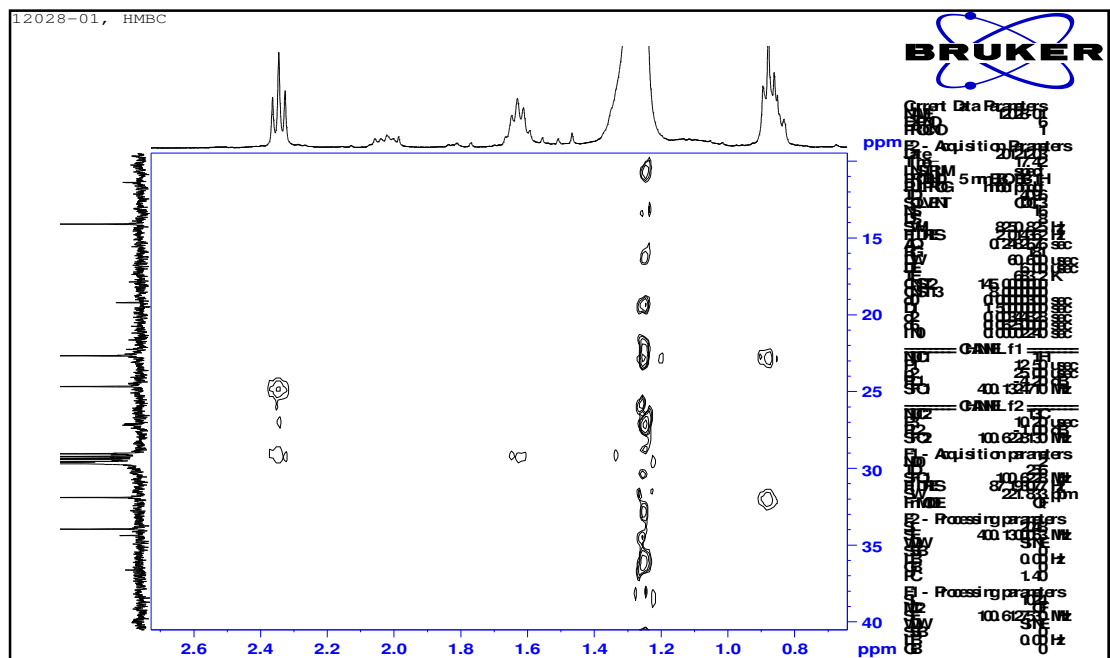
B-15 Ampliación del espectro HSQC (1H: 0.5-4.5 ppm; 13C: 9-70 ppm) del compuesto C2. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



B-16. Ampliación del espectro HMBC (1H: 3.8-8.5 ppm; 13C: 10-55 ppm) del compuesto C2. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

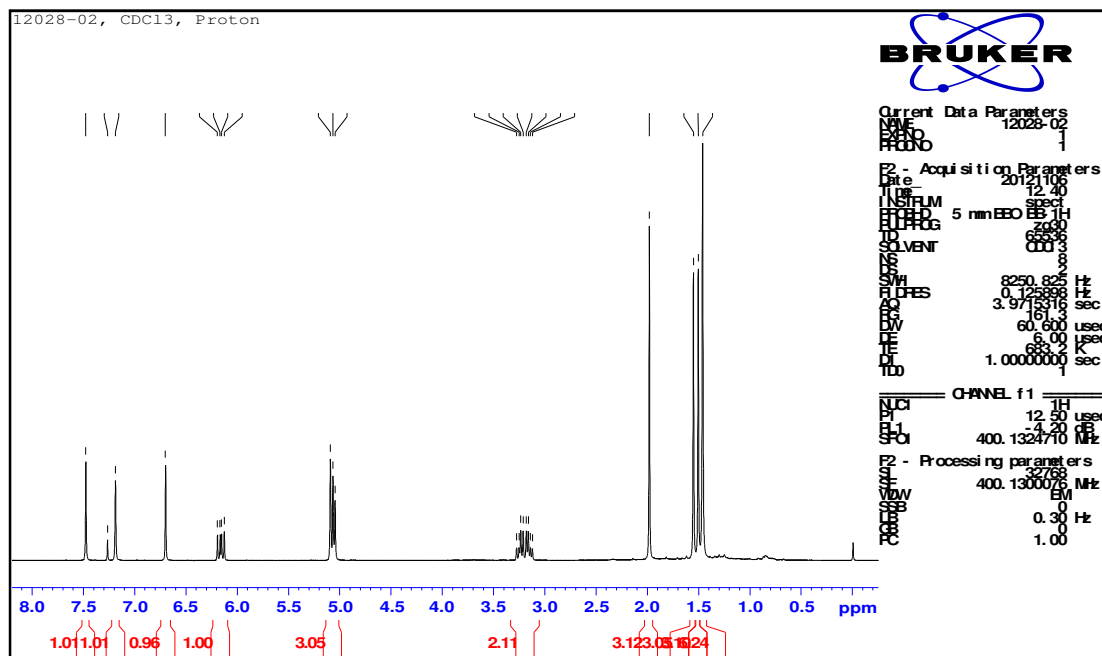


B-17 Ampliación del espectro HMBC (^1H : 2.0-8.3 ppm; ^{13}C : 140-182 ppm) del compuesto C2. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

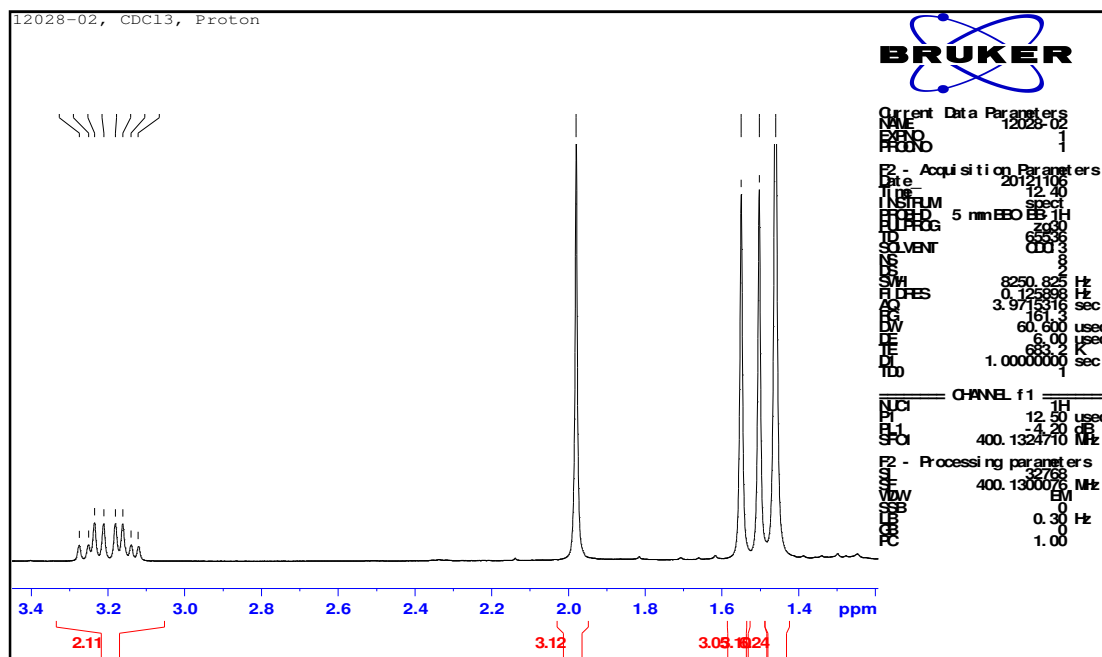


B-18 Ampliación del espectro HMBC (^1H : 0.6-2.7 ppm; ^{13}C : 10-40 ppm) del compuesto C2. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

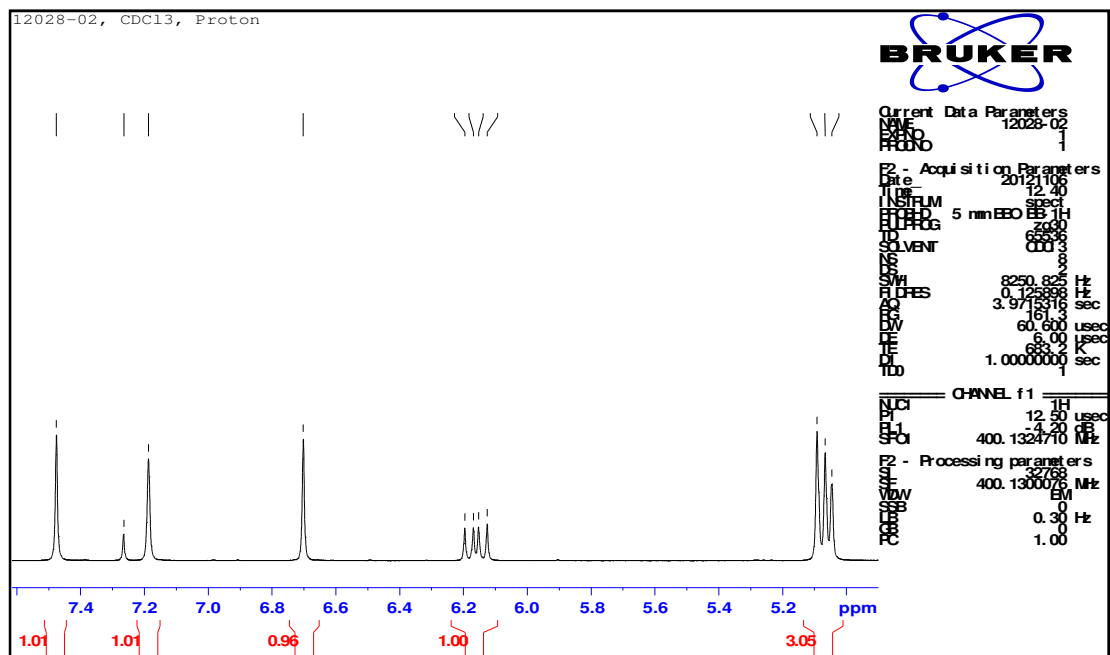
APENDICE C



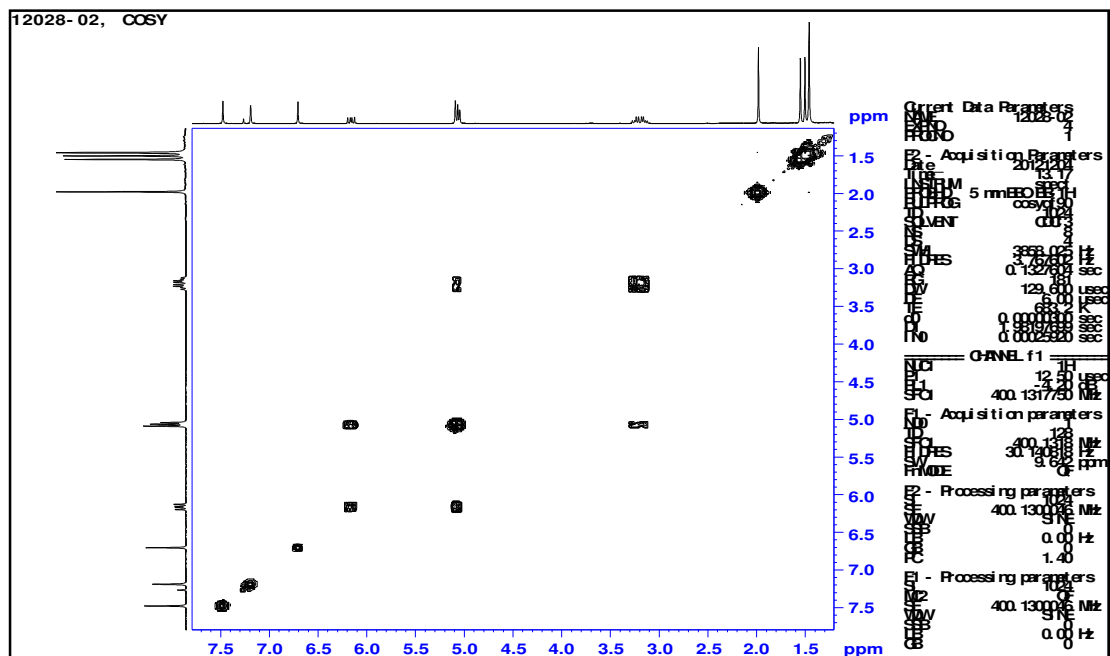
C-1. Espectro ¹H-RMN general del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



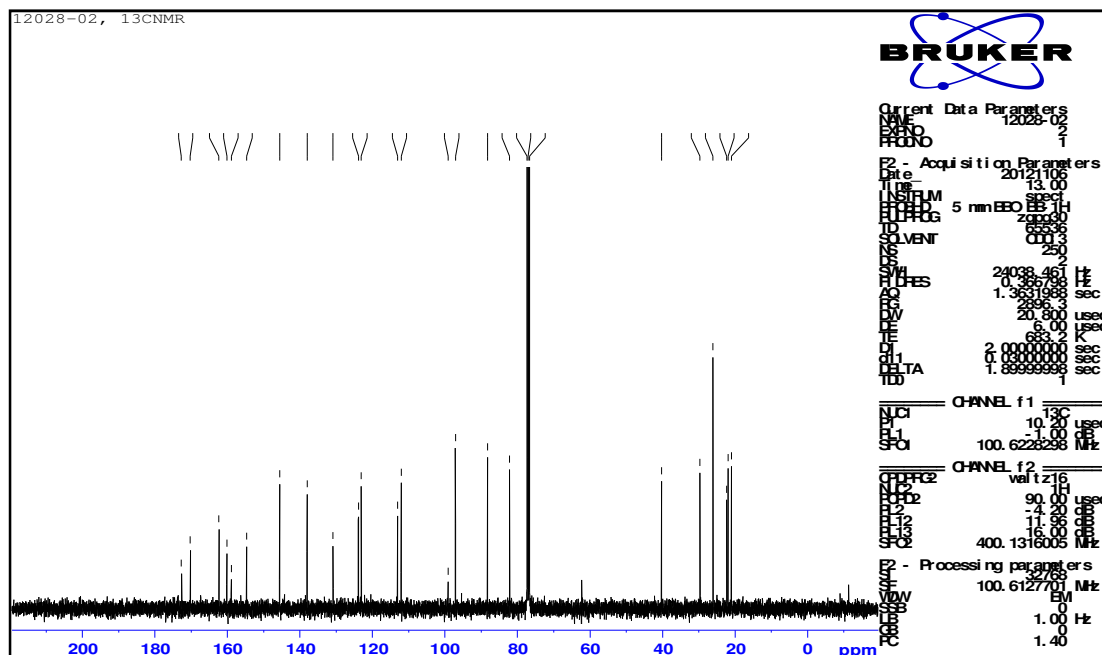
C-2. Ampliación de la zona 1.2-3.4 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



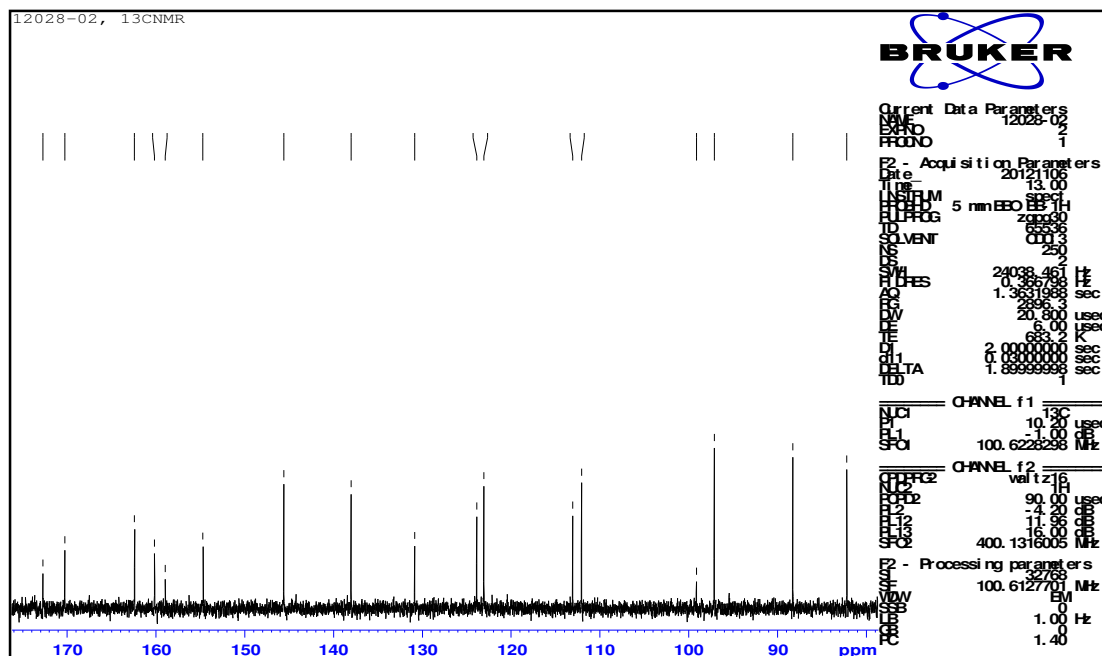
C-3. Ampliación de la zona 4.8-7.6 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



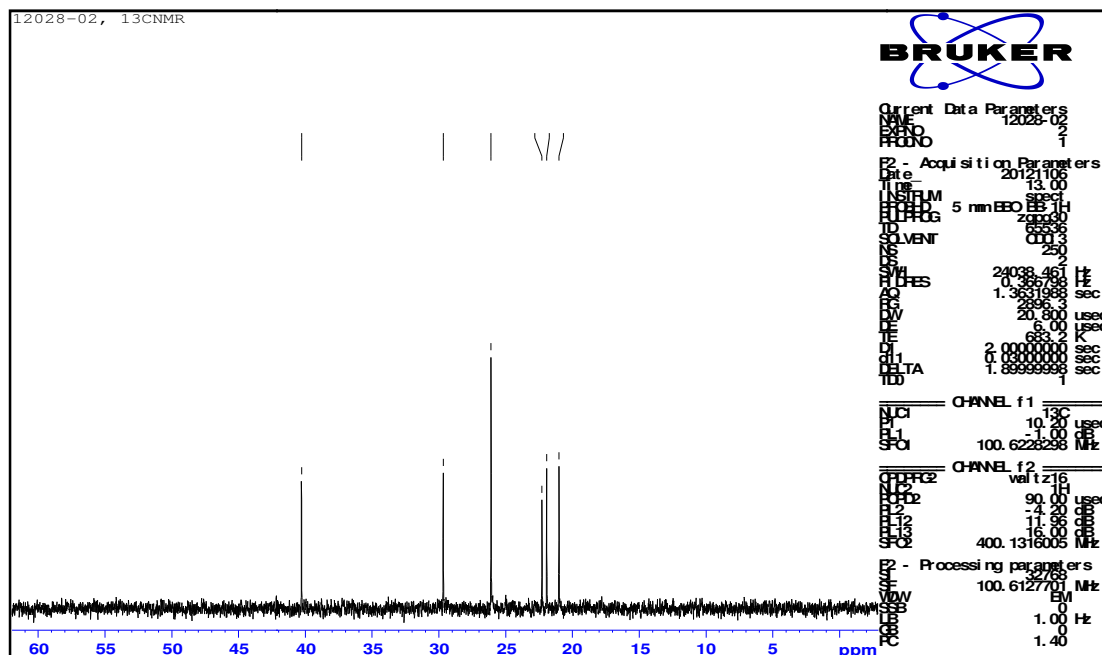
C-4. Espectro COSY general del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



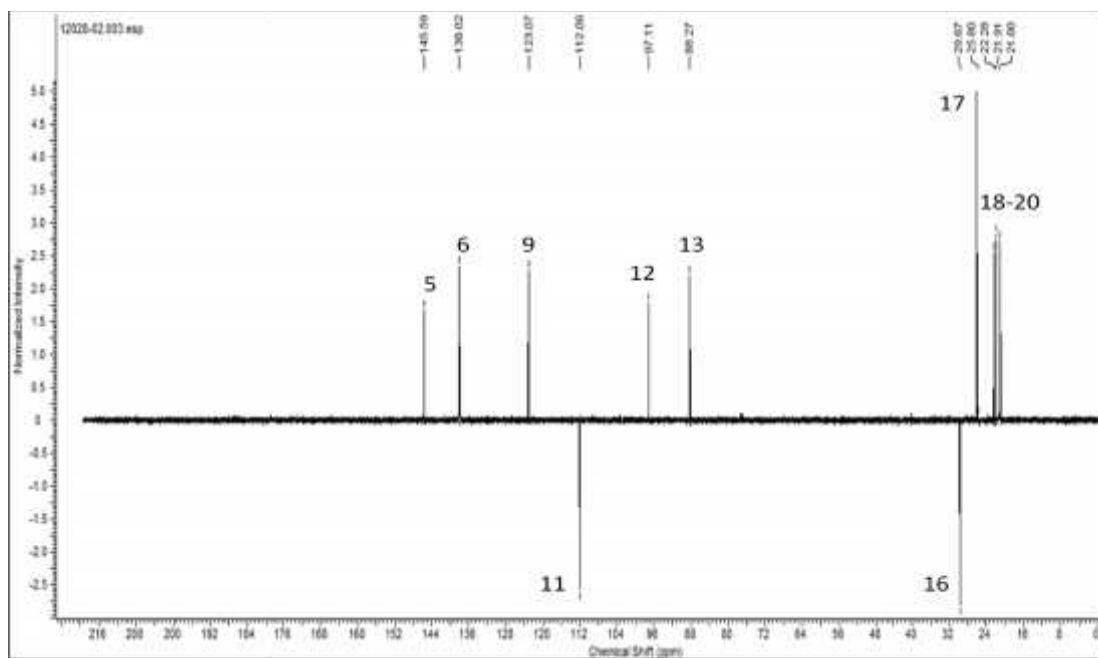
C-5. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



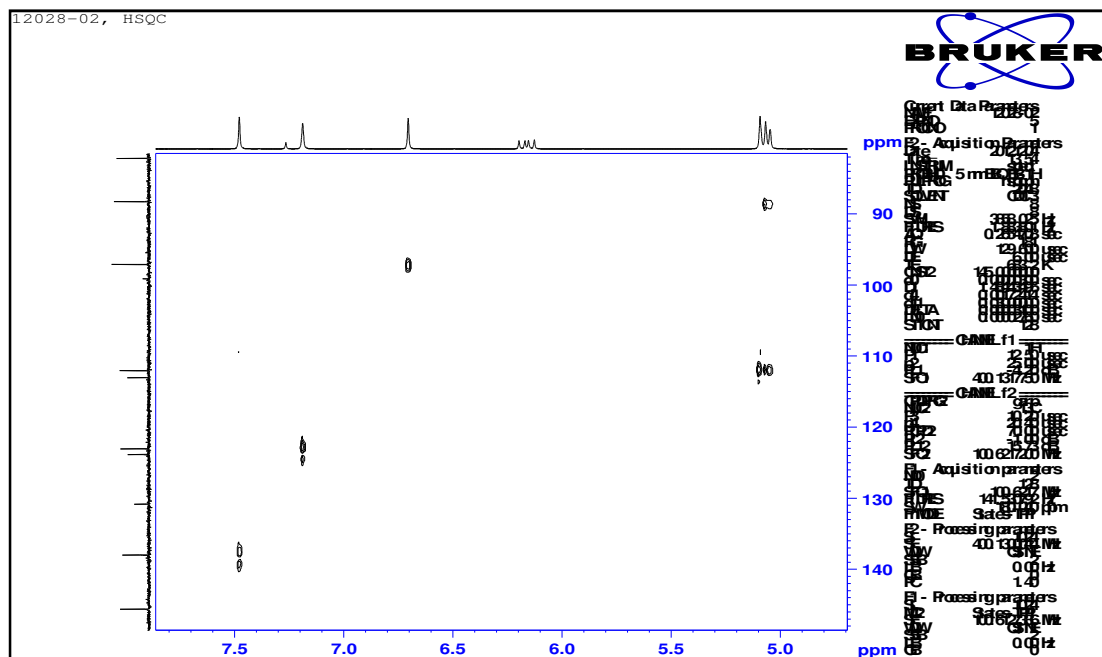
C-6. Ampliación de la zona 80-175 ppm del espectro ^{13}C -RMN del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



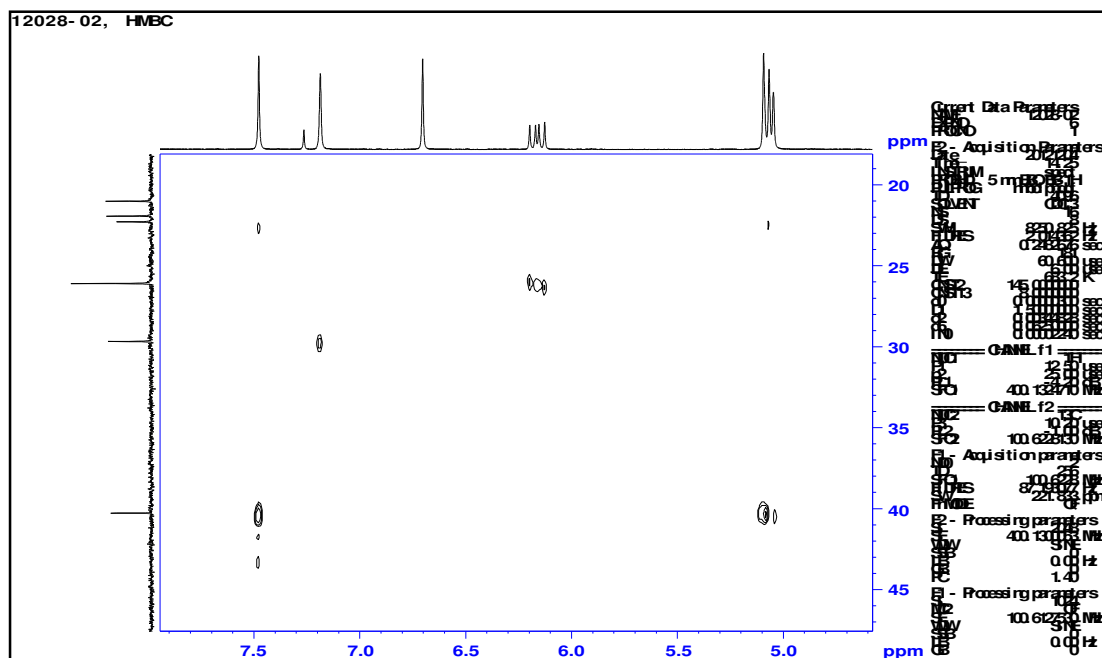
C-7. Ampliación de la zona 0.5-60 ppm del espectro ¹³C-RMN del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



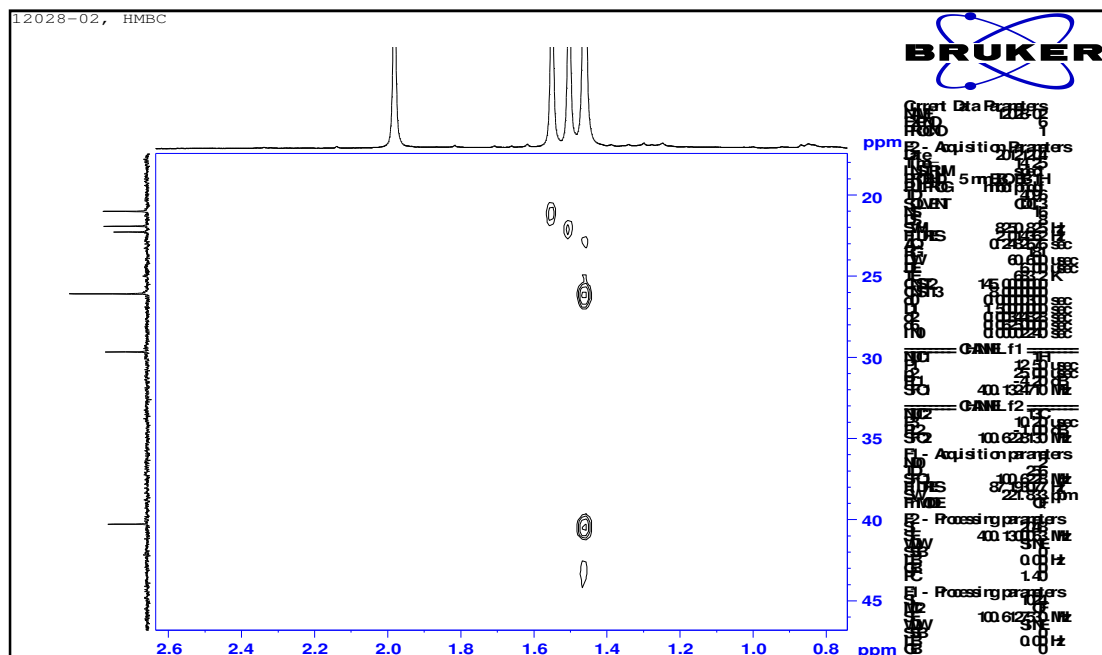
C-8. Espectro DEPT135 del espectro ¹³C-RMN del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



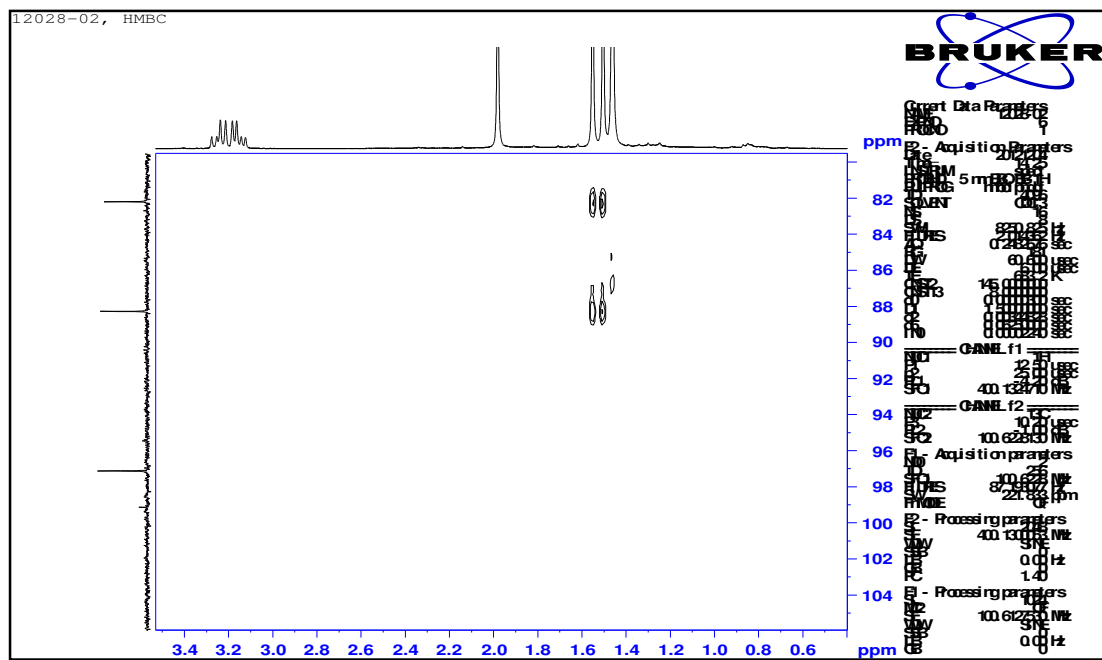
C-11. Ampliación del espectro HSQC (^1H : 4.6-8.0 ppm; ^{13}C : 80-150 ppm) del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



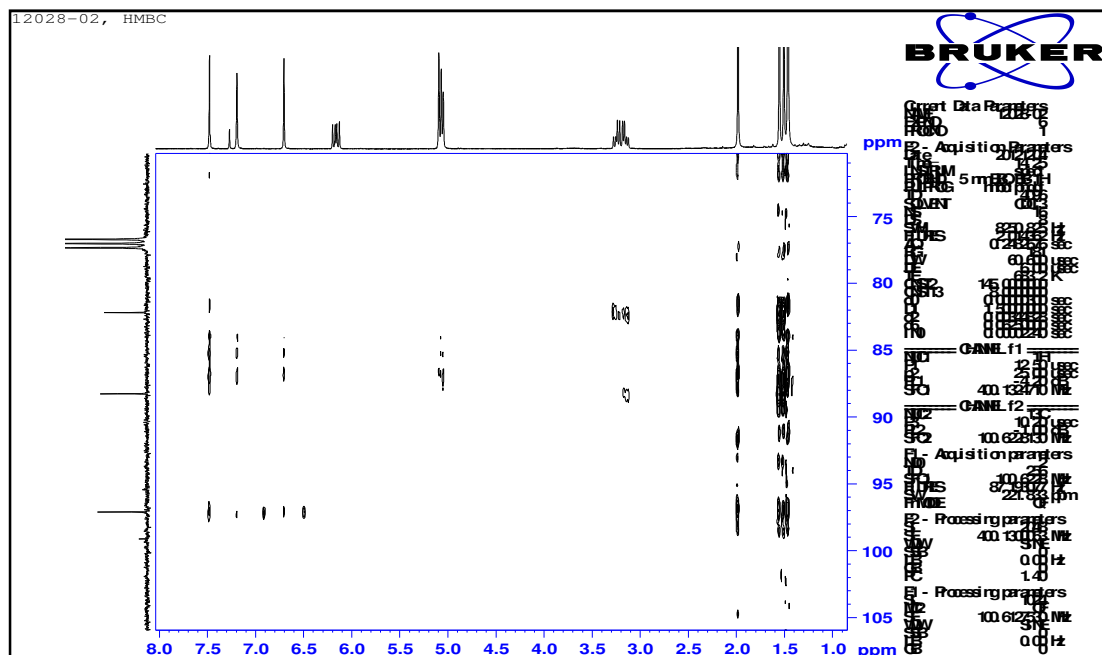
C-12. Ampliación del espectro HSQC (^1H : 4.6-8.0 ppm; ^{13}C : 80-150 ppm) del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



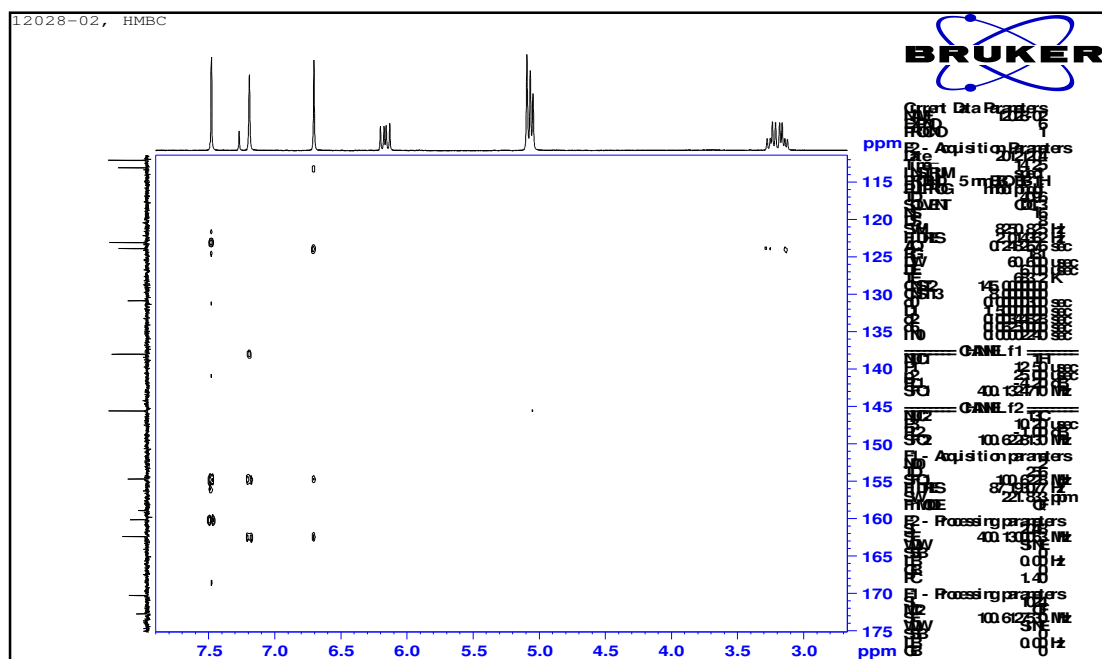
C-13. Ampliación del espectro HMBC (^1H : 0.8-2.6 ppm; ^{13}C : 15-50 ppm) del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



C-14. Ampliación del espectro HMBC (^1H : 0.4-3.5 ppm; ^{13}C : 80-106 ppm) del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

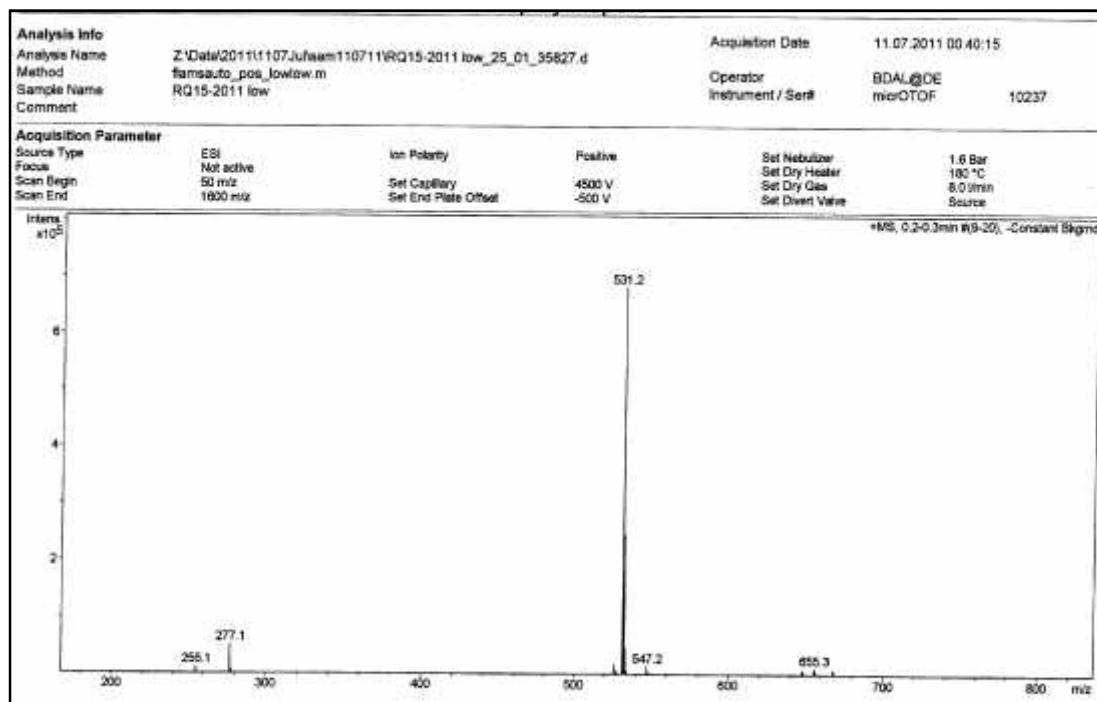


C-17. Ampliación del espectro HMBC (^1H : 1.0-8.0 ppm; ^{13}C : 70-105 ppm) del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

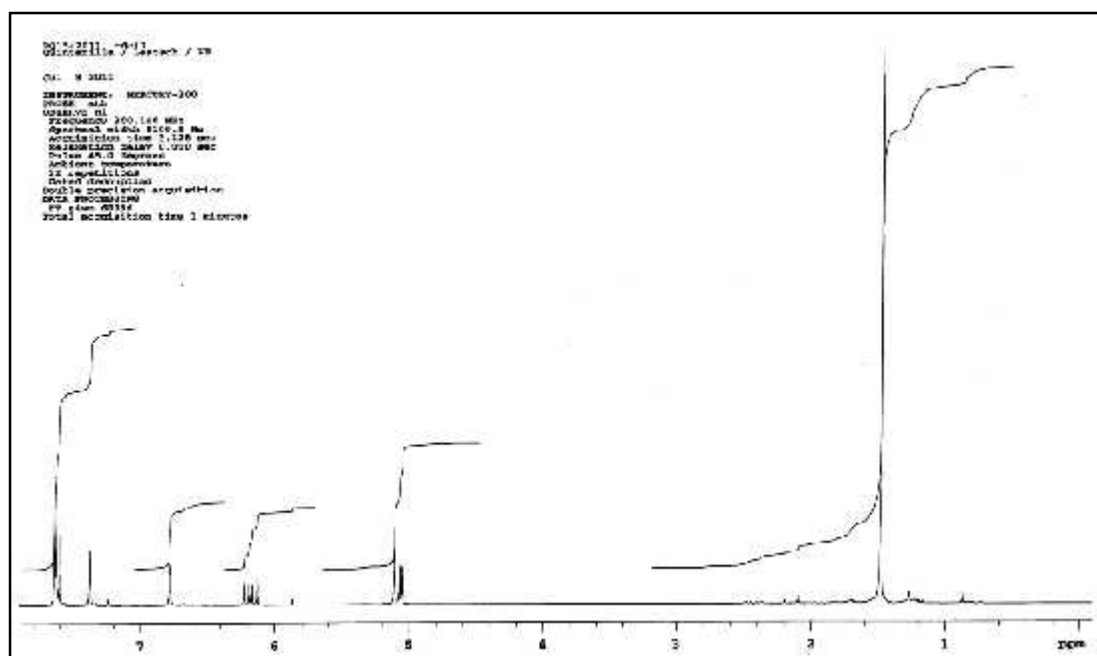


C-18. Ampliación del espectro HMBC (^1H : 2.5-8.0 ppm; ^{13}C : 110-175 ppm) del compuesto C3. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

APENDICE D

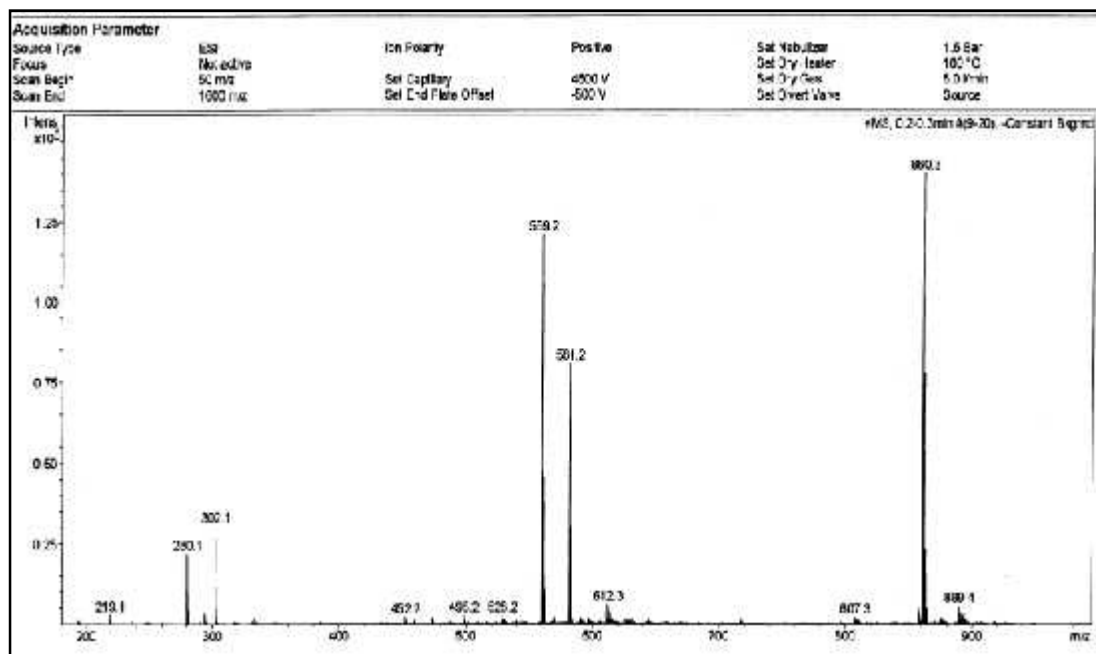


D-1. Espectro de masas [(+)-ESI-MS] del compuesto **C4**. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.

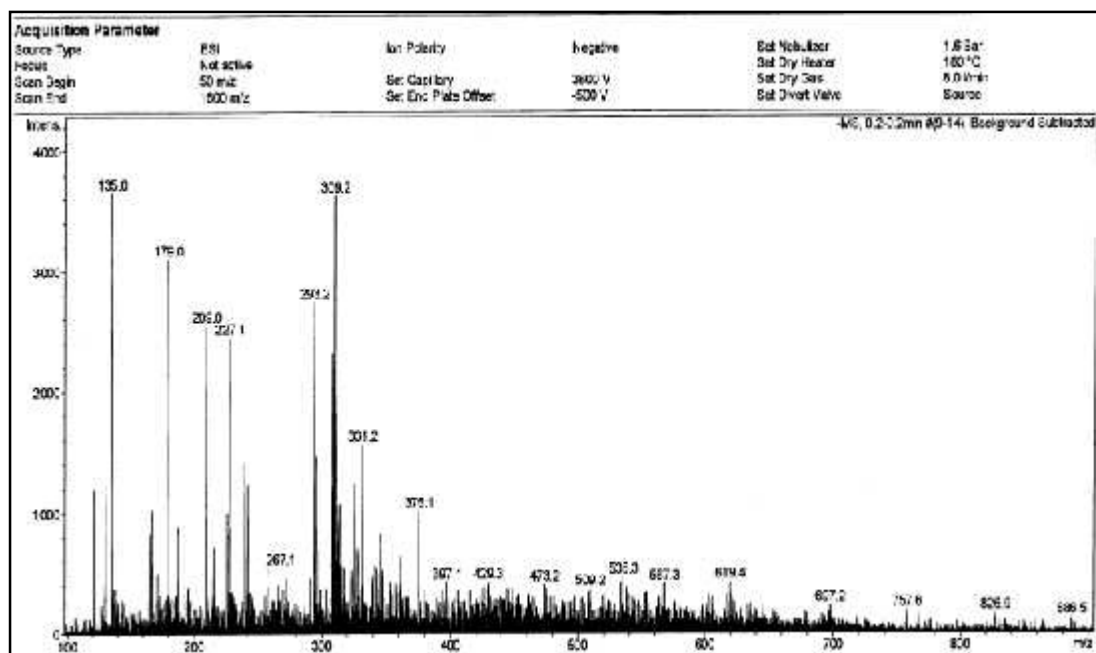


D-2. Espectro ^1H -RMN general del compuesto **C4**. Obtenido mediante un Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

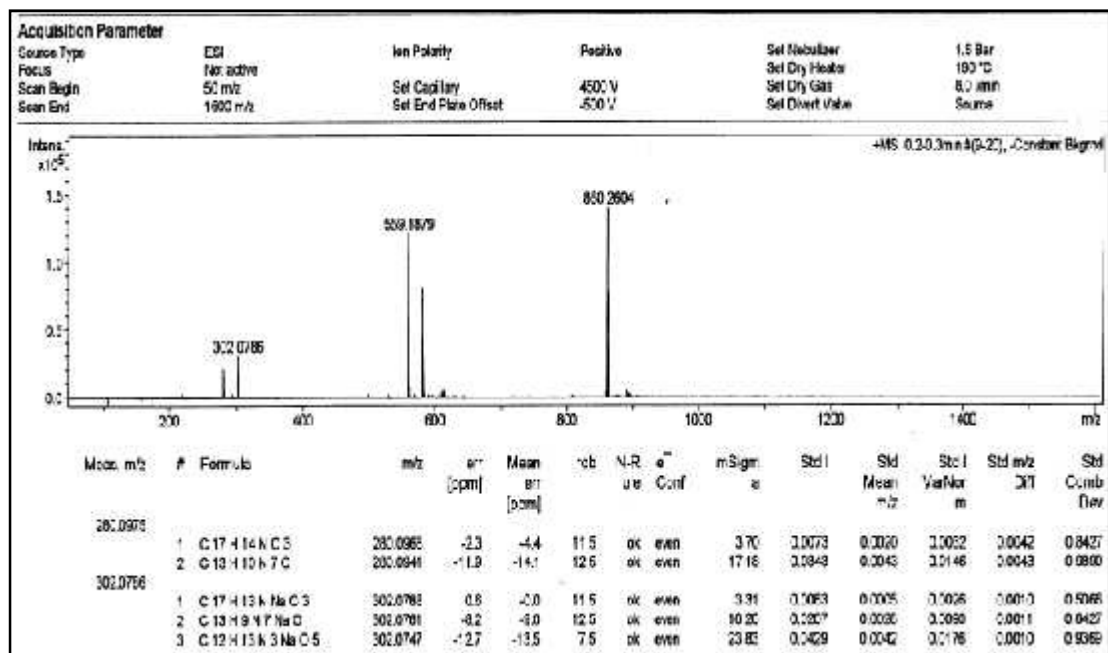
APENDICE E



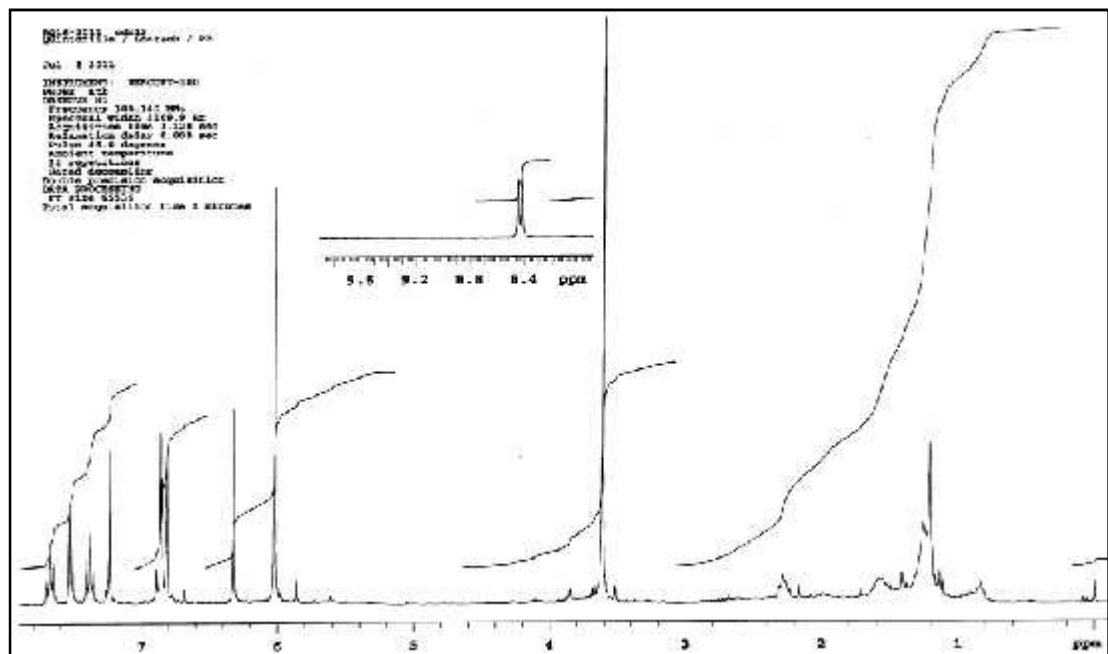
E-1. Espectro de masas [(+)-ESI-MS] del compuesto **C5**. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



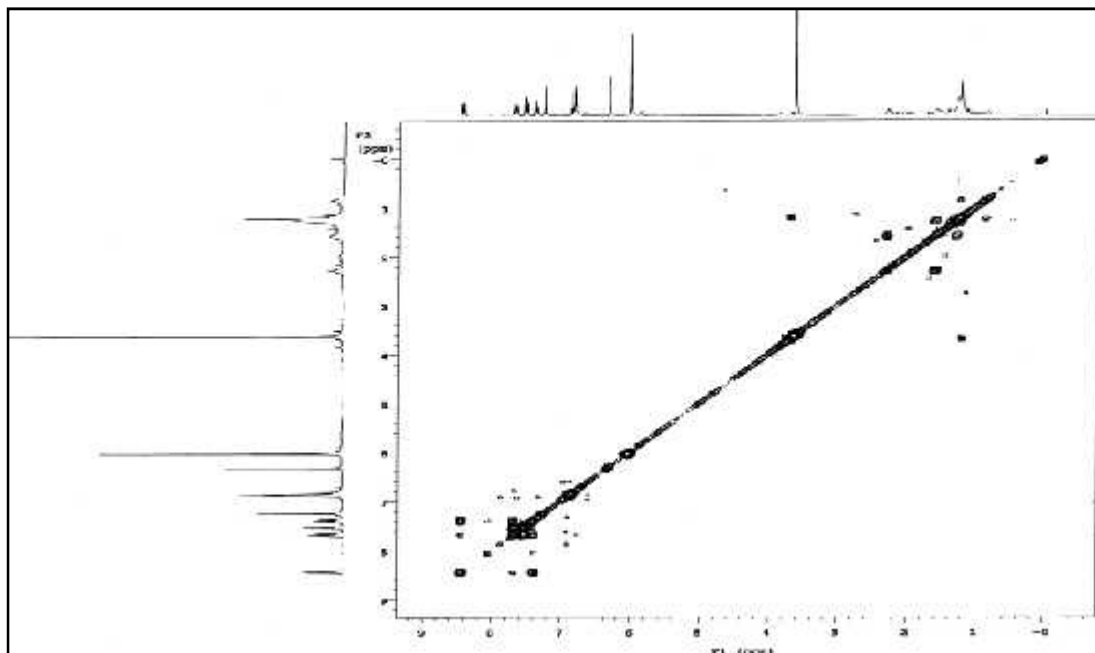
E-2. Espectro de masas [(-)-ESI-MS] del compuesto **C5**. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



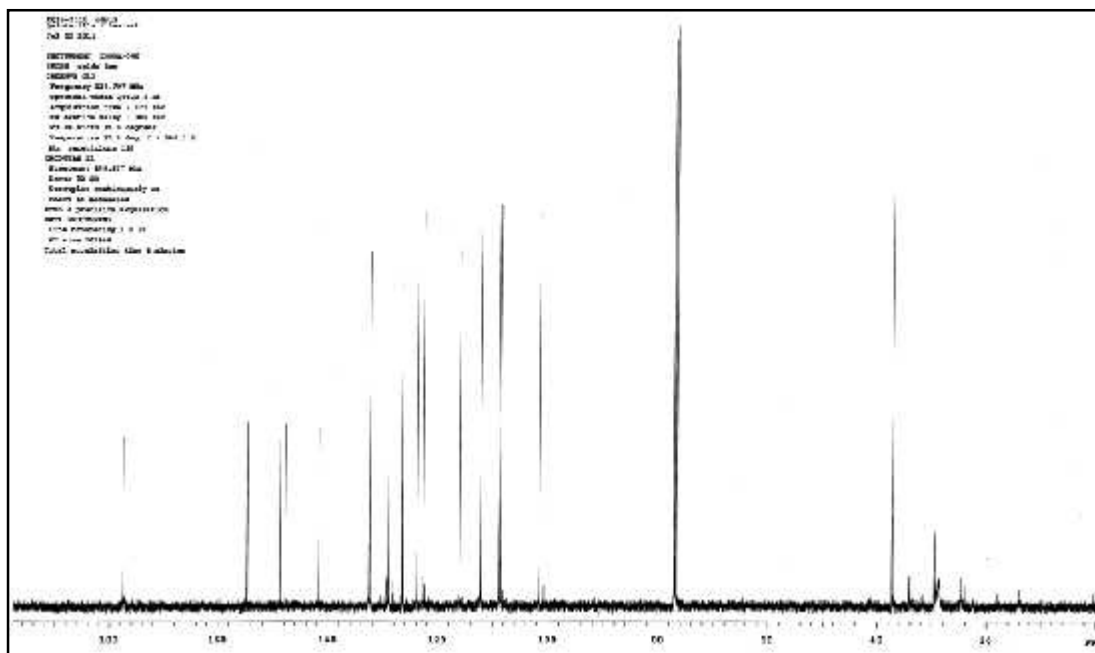
E-3. Espectro de masas de alta resolución [(+)-HRESI-MS] del compuesto C5. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



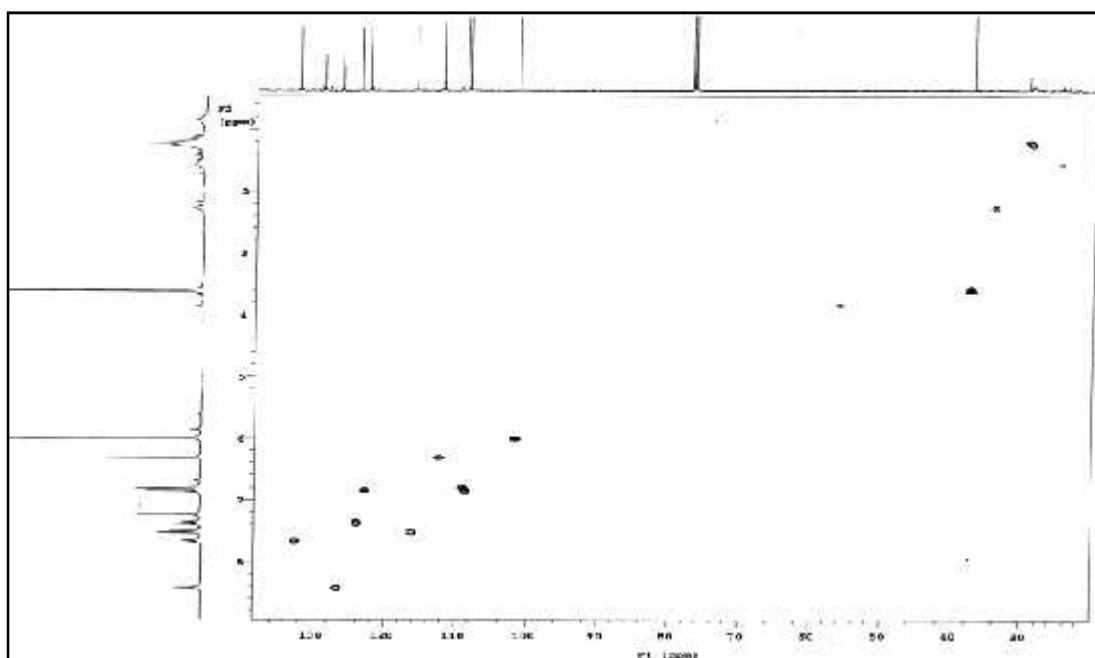
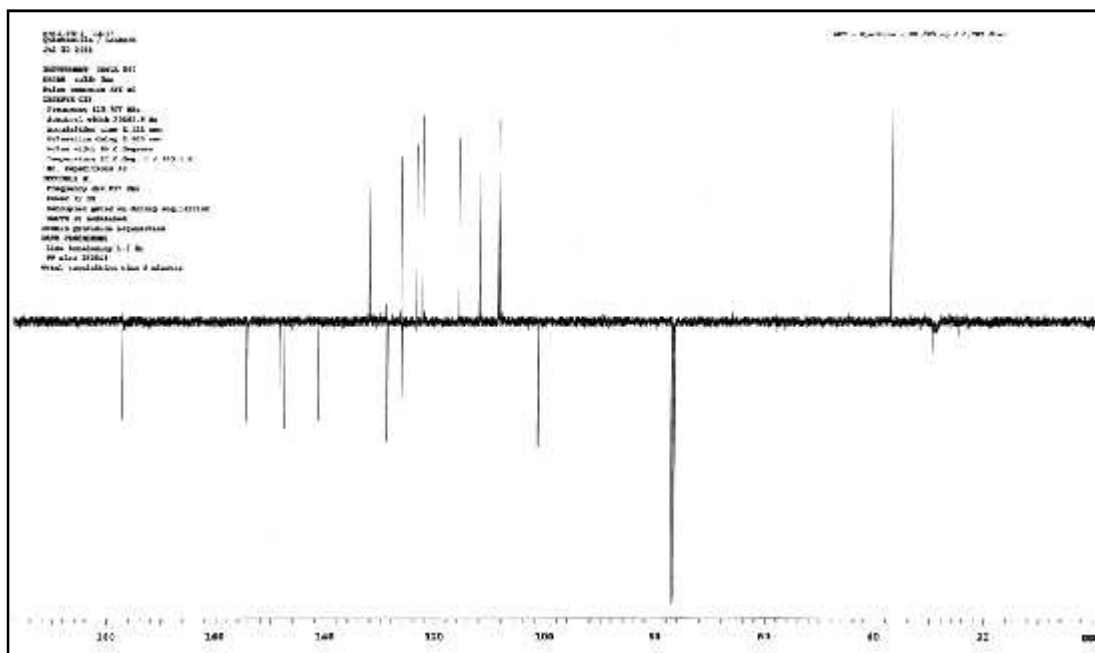
E-4. Espectro ¹H-RMN general del compuesto C5. Obtenido mediante un Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.

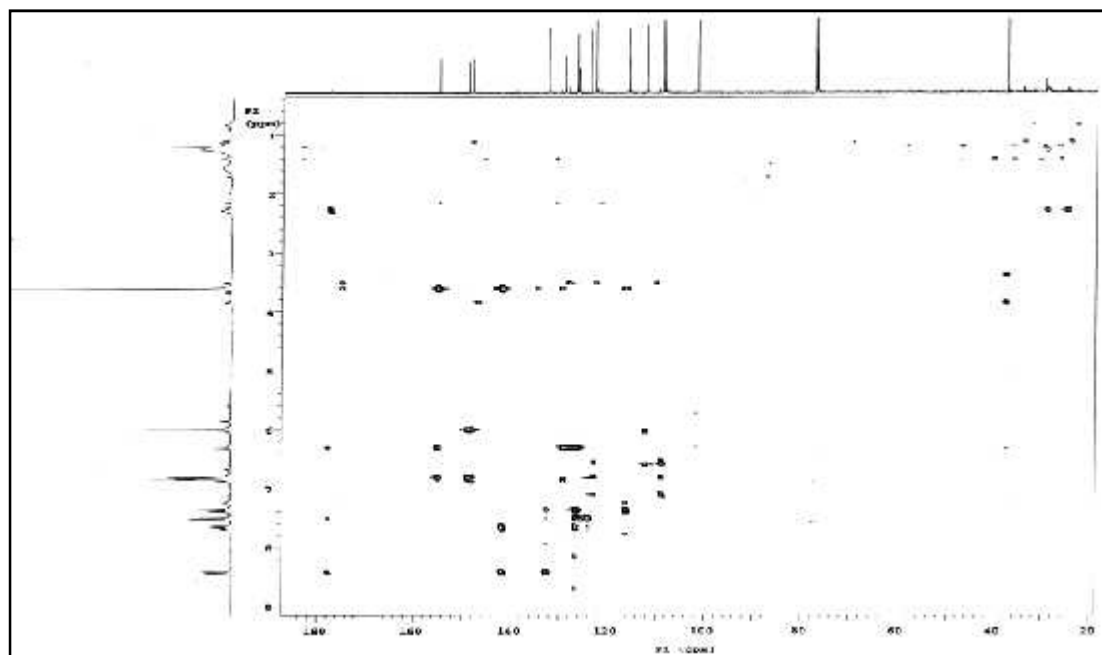


E-5. Espectro COSY general del compuesto C5. Obtenido mediante un Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



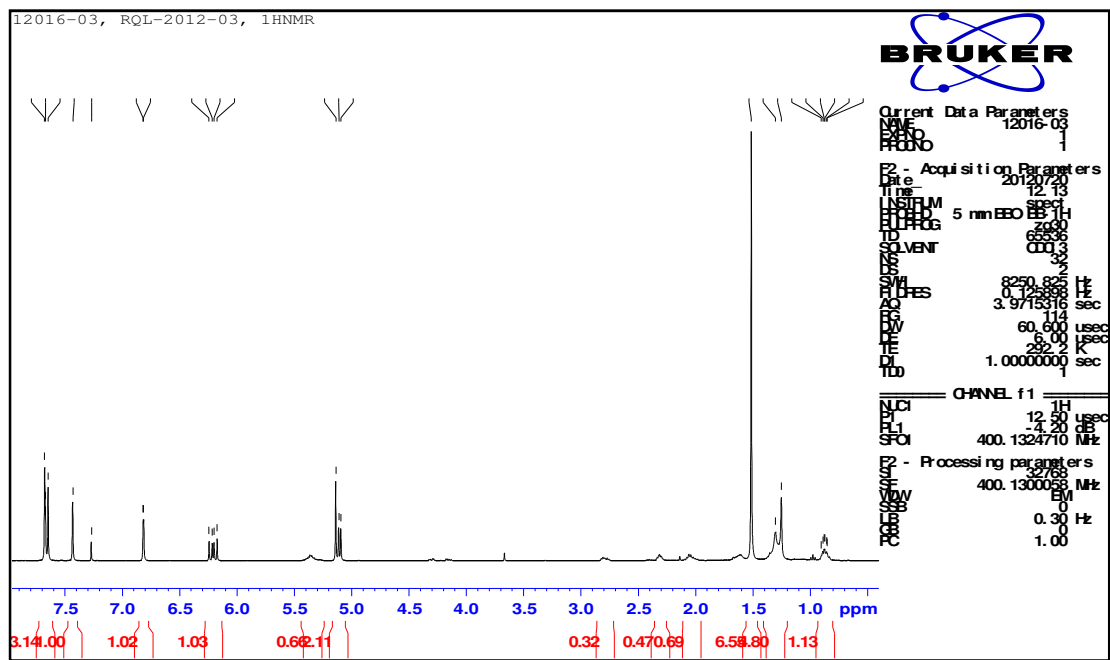
E-6. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto C5. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 125 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



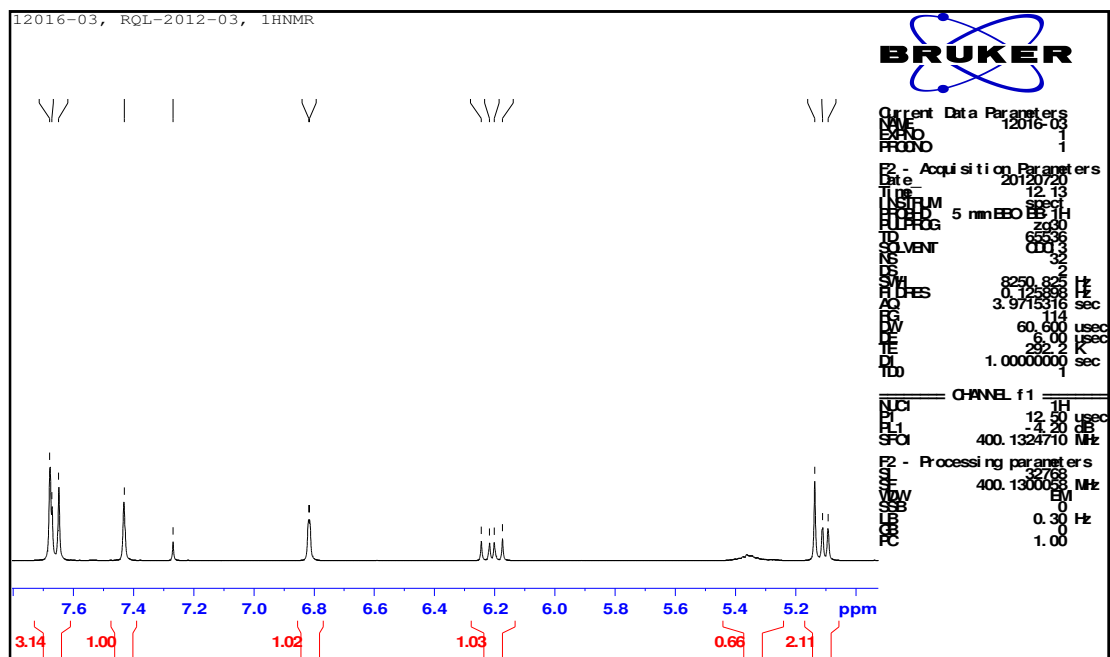


E-9. Espectro HMBC general del compuesto **C5**. Obtenido mediante un Espectrómetro Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.

APENDICE F

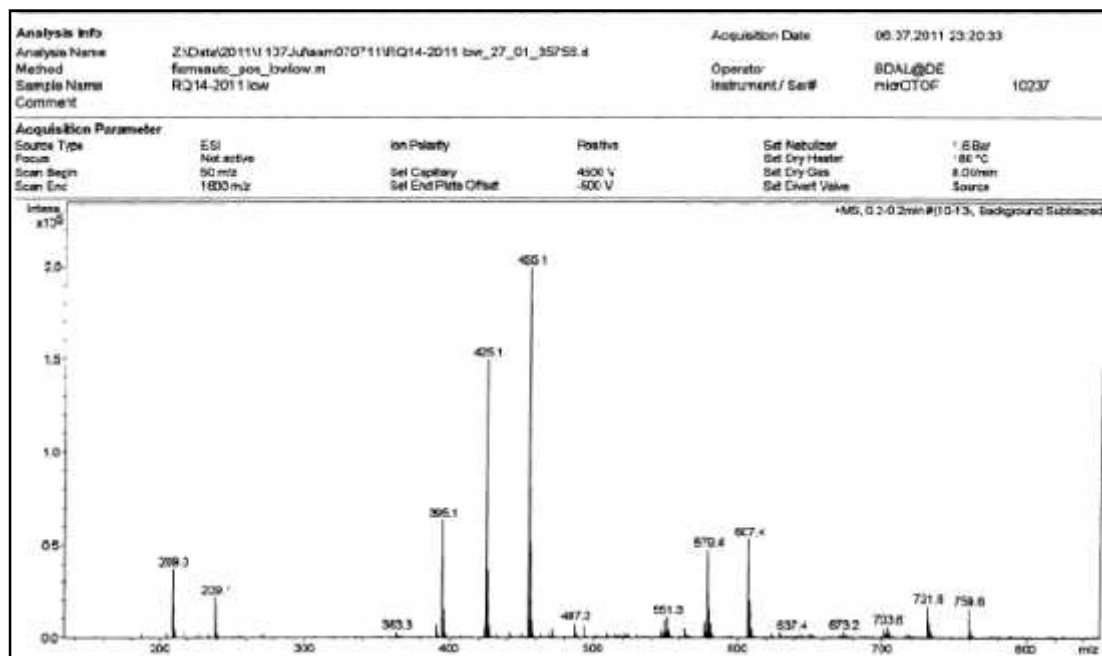


F-1. Espectro ^1H -RMN general del compuesto **C6**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

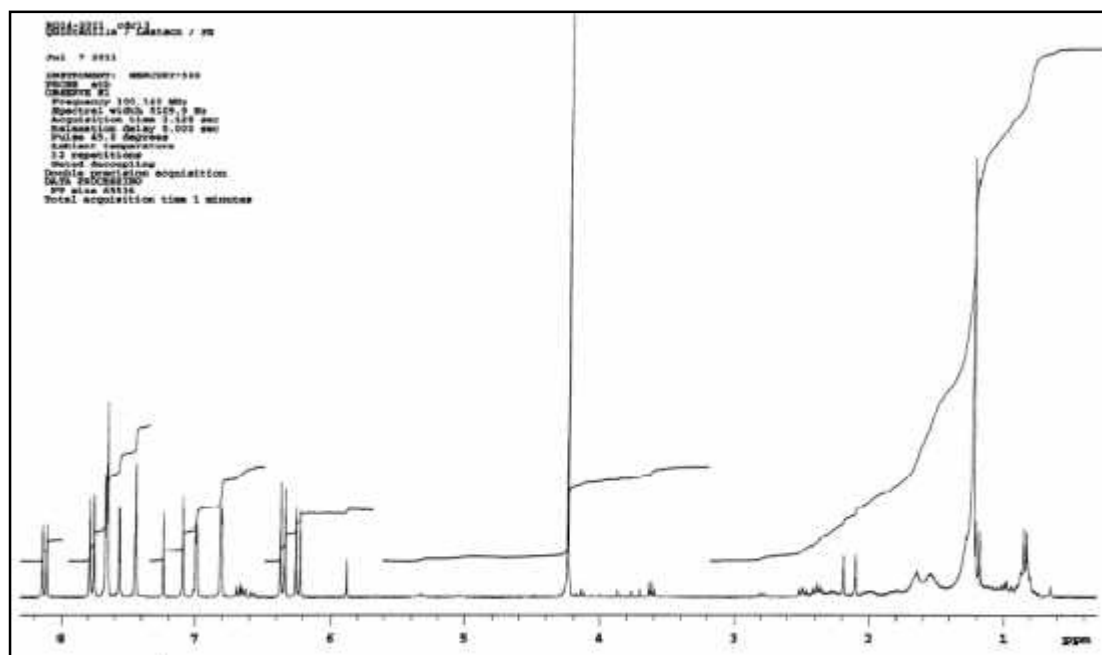


F-2. Ampliación de la zona 4.8-7.8 ppm del espectro ^1H -RMN del compuesto **C6**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

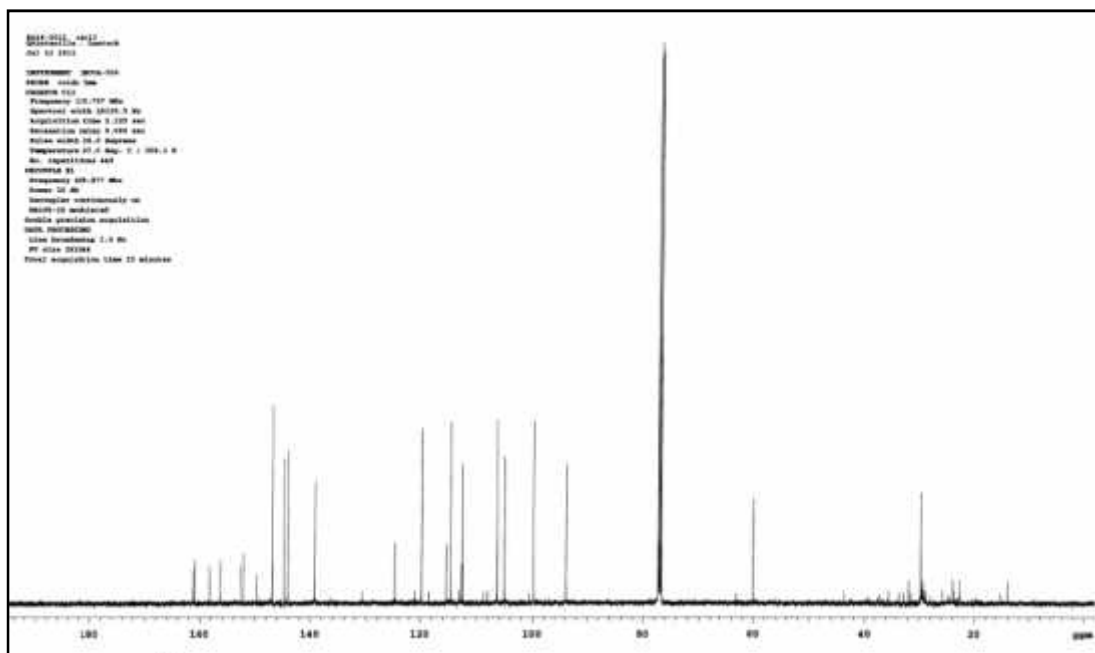
APENDICE G



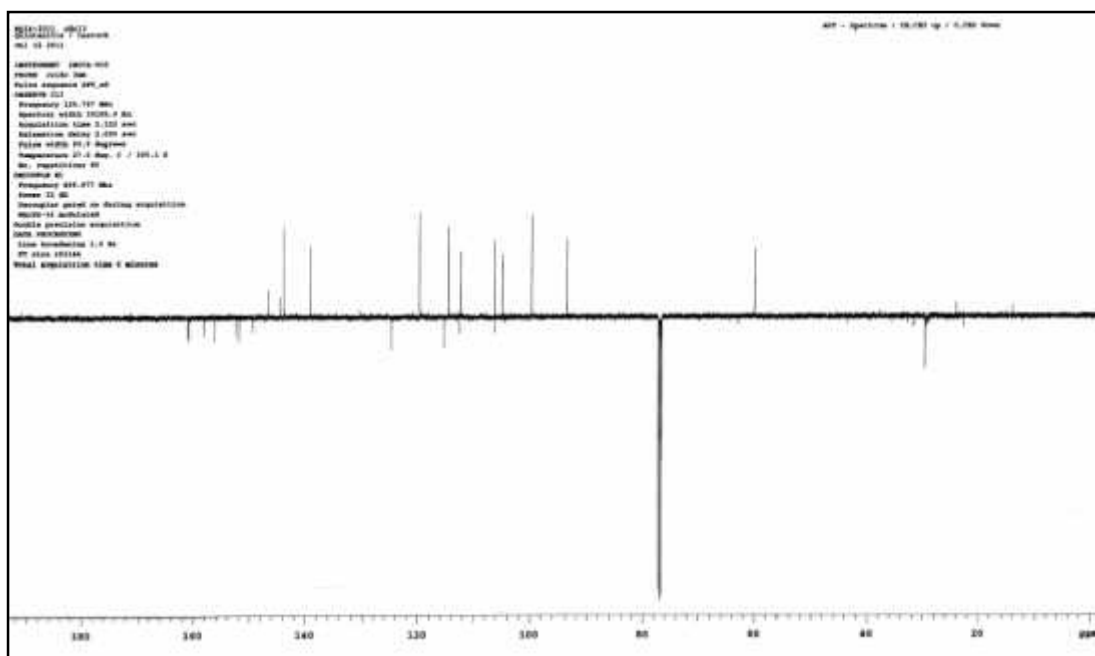
G-1. Espectro de masas [(+)-ESI-MS] del compuesto **C7**. Obtenido mediante un instrumento Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



G-2. Espectro ^1H -RMN general del compuesto **C7**. Obtenido mediante un Espectrómetro Mercury-VX300. Frecuencia de Operación 300 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

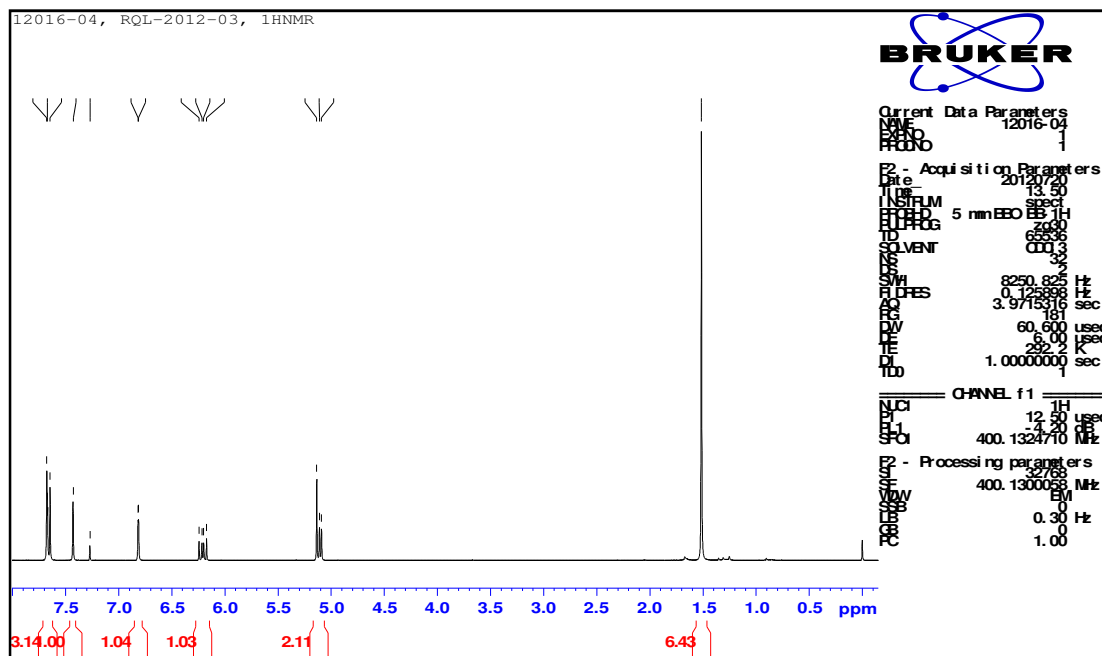


G-3. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto **C7**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 125 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

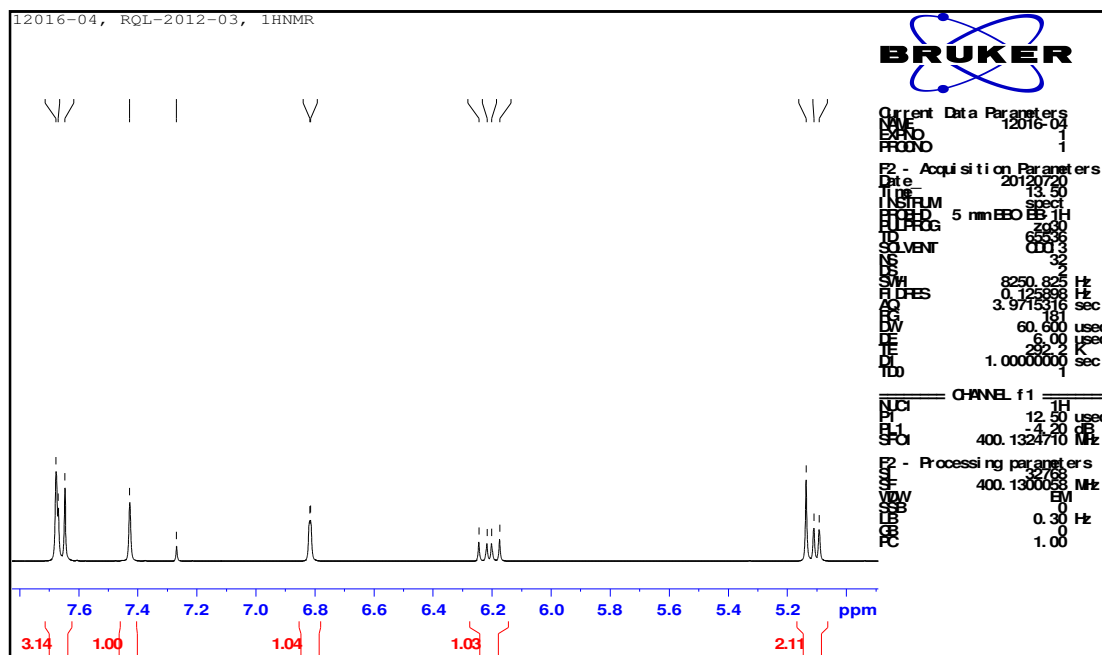


G-4. Espectro de APT general del compuesto **C7**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 125 MHz. Solvente de disolución CDCl_3

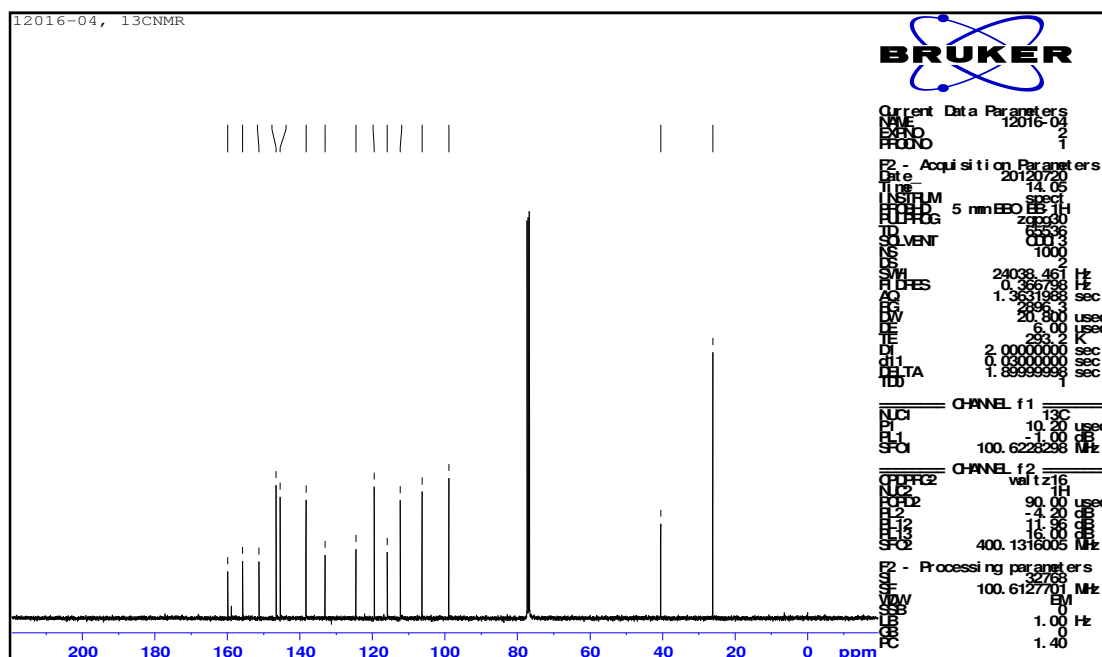
APENDICE H



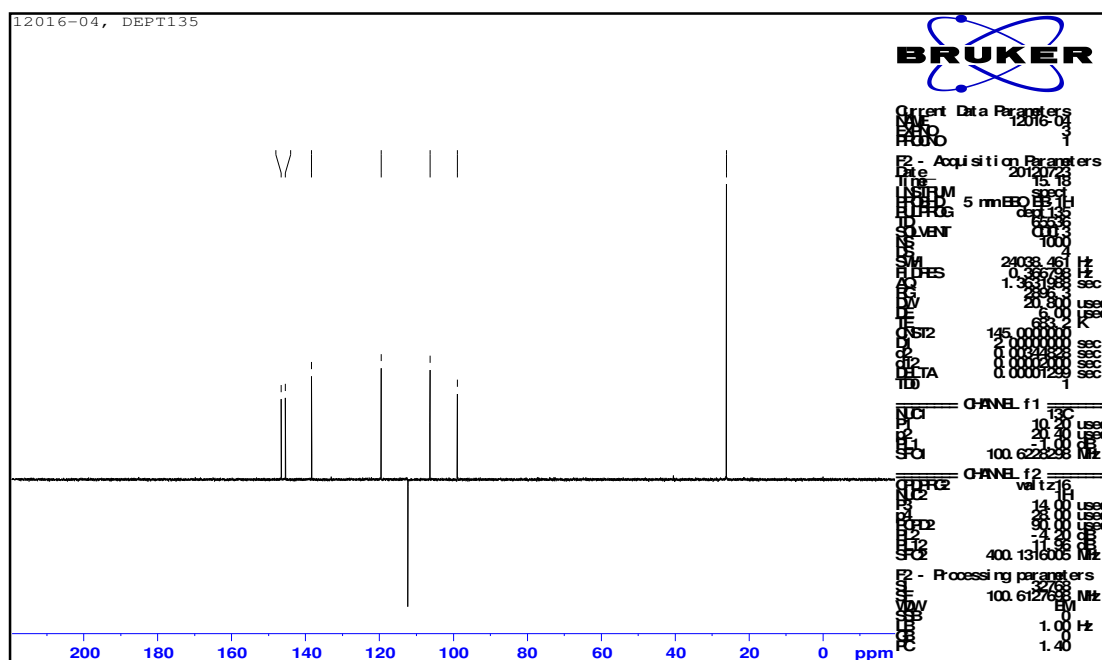
H-1. Espectro ^1H -RMN general del compuesto **C8**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



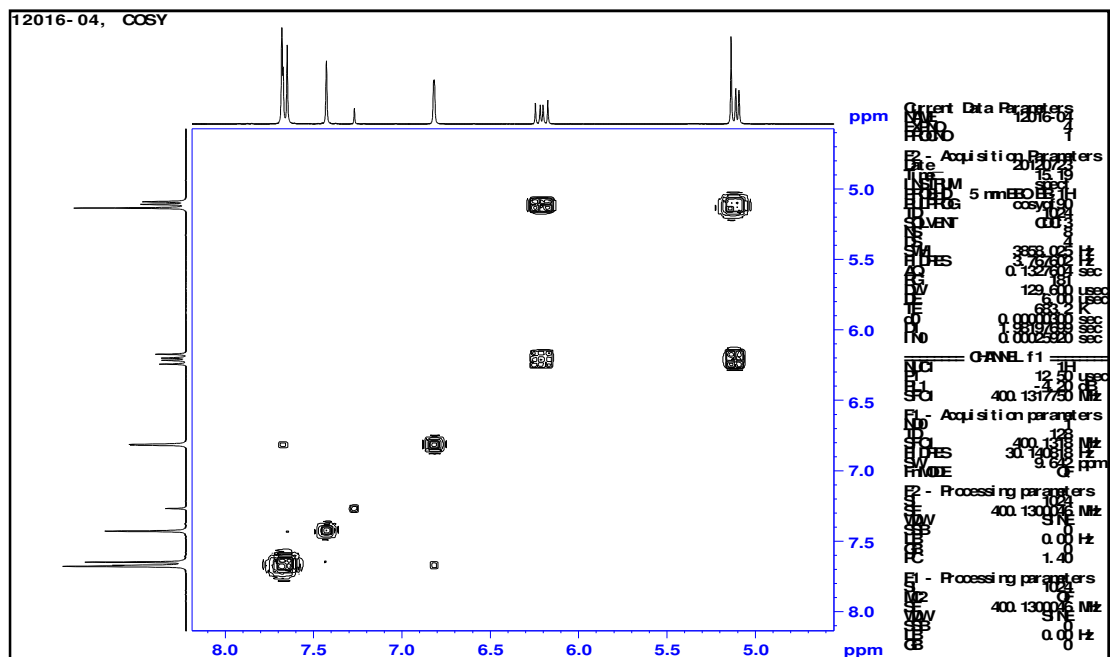
H-2. Ampliación de la zona 4.8-7.8 ppm del espectro ^1H -RMN del compuesto **C8**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



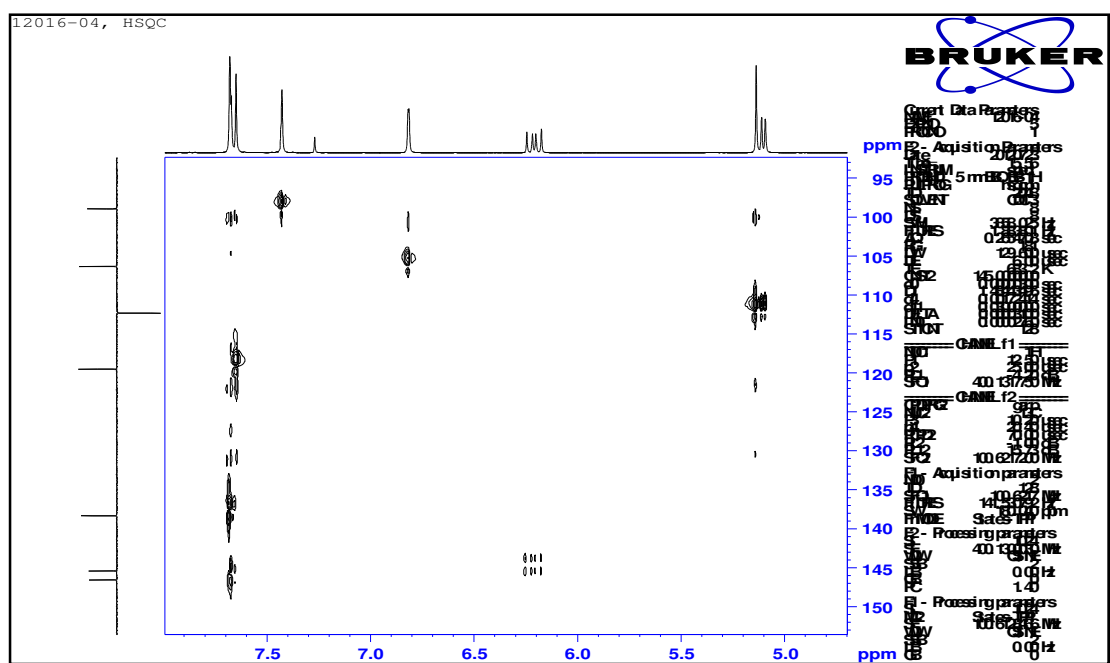
H-3. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto **C8**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



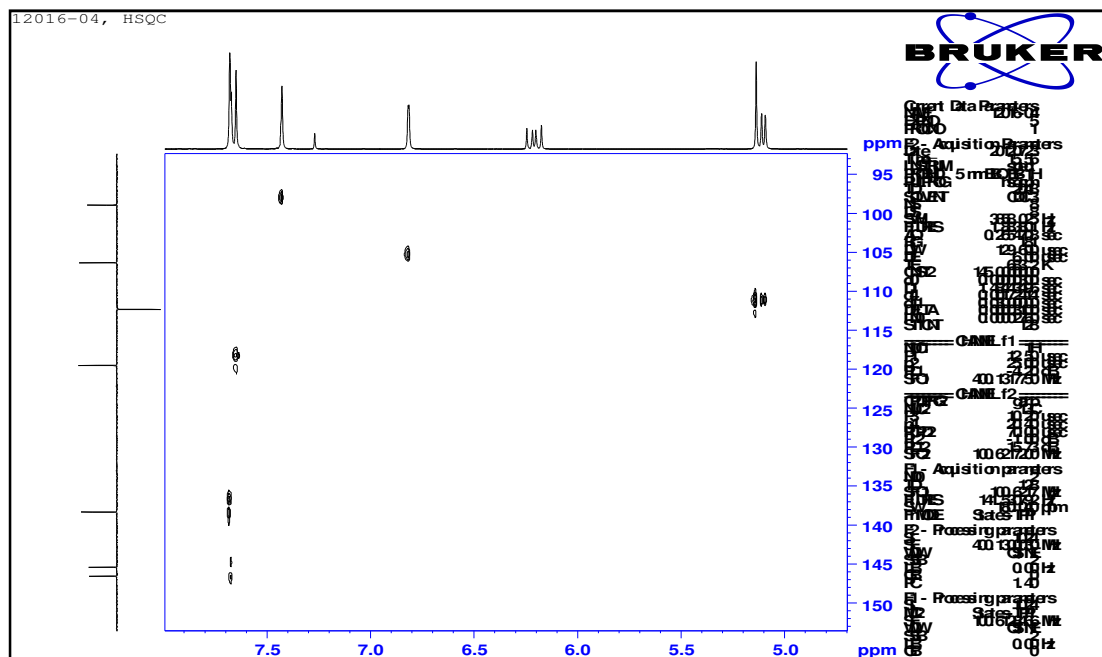
H-4. Espectro DEPT135 del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **C8**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



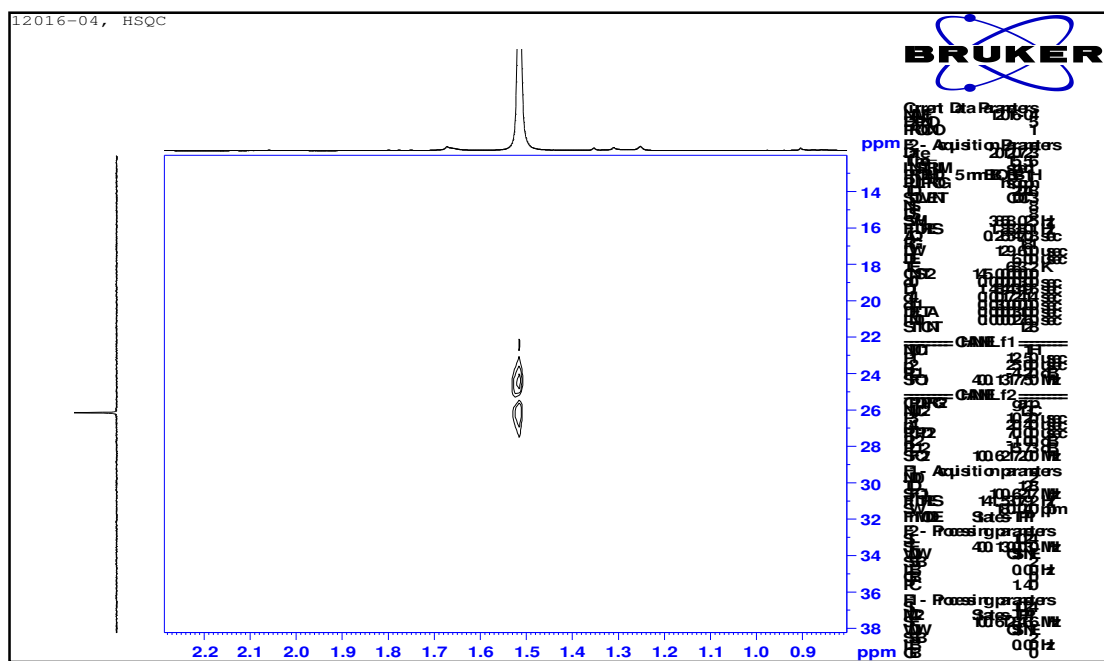
H-5. Ampliación del espectro COSY (^1H : 4.5-8.0 ppm; ^1H : 4.5-8.0 ppm) del compuesto **C8**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



H-6. Ampliación del espectro HSQC (^1H : 5.5-8.0 ppm; ^{13}C : 90-155 ppm) del compuesto **C8**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

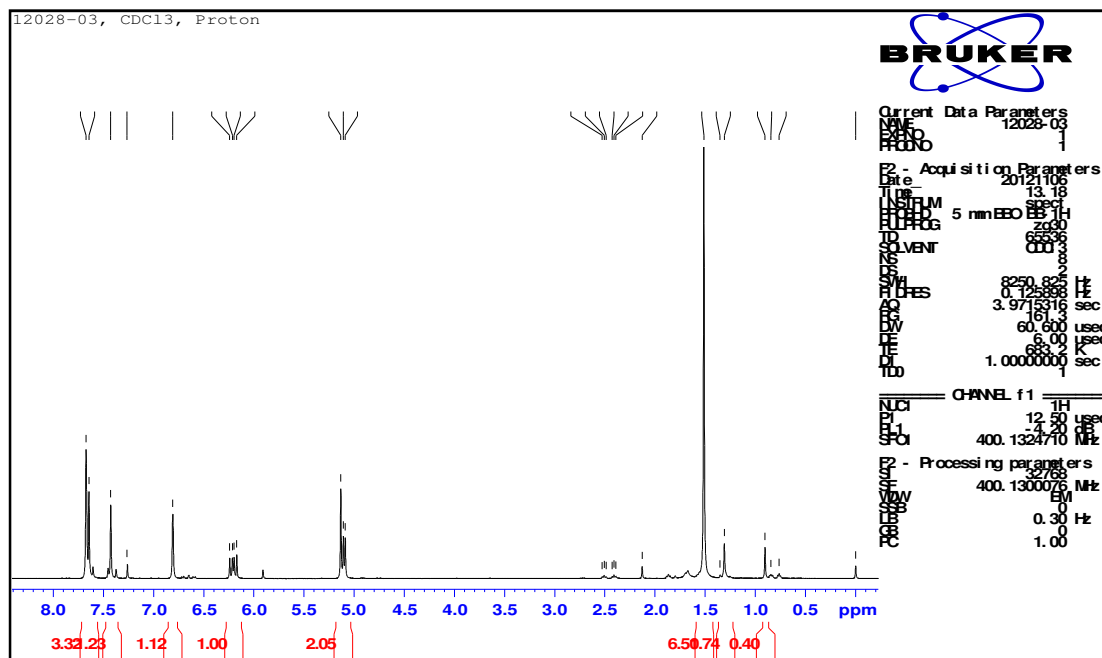


H-7. Ampliación del espectro HSQC (^1H : 5.5-8.0 ppm; ^{13}C : 90-155 ppm) del compuesto **C8**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

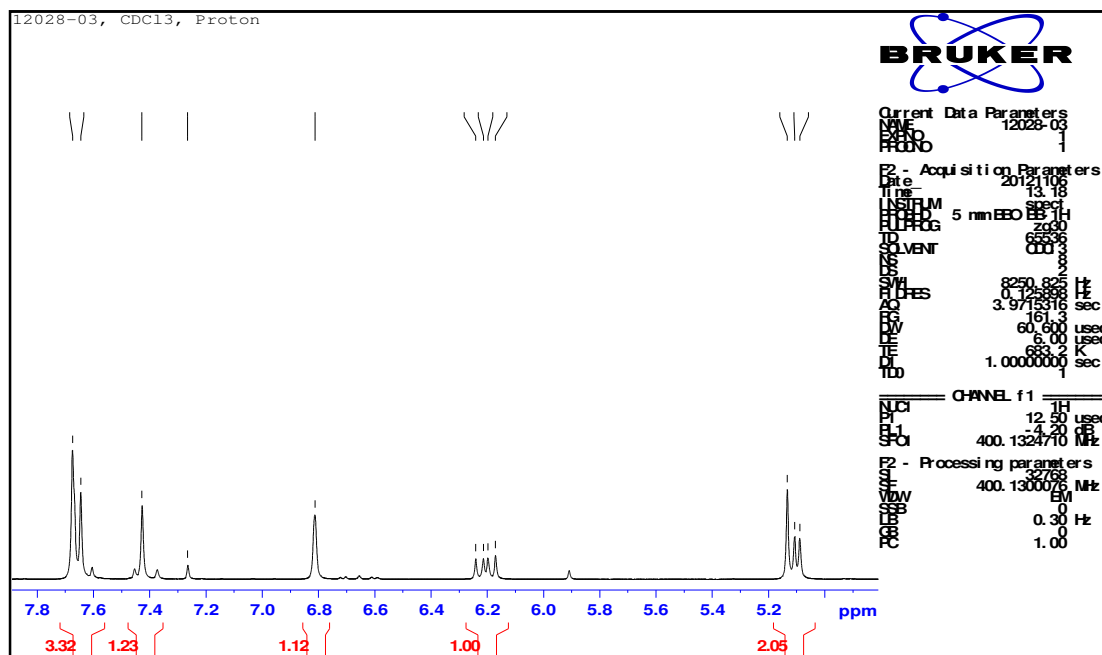


H-8. Ampliación del espectro HSQC (^1H : 0.1-2.2 ppm; ^{13}C : 12-38 ppm) del compuesto **C8**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

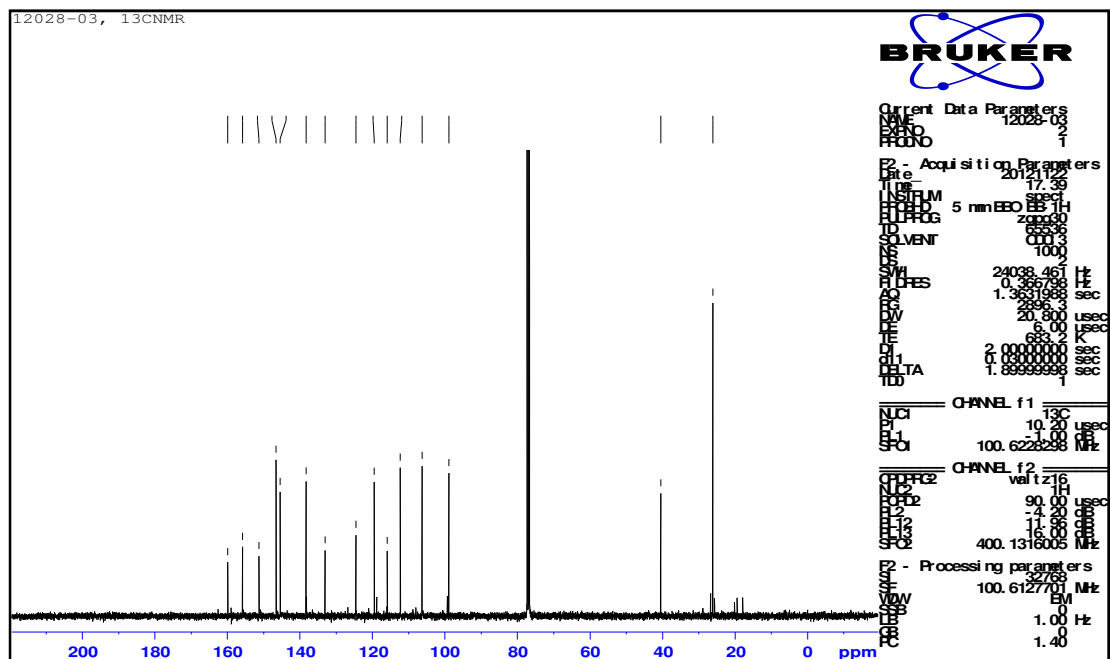
APENDICE I



I-1. Espectro ¹H-RMN general del compuesto **C9**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.

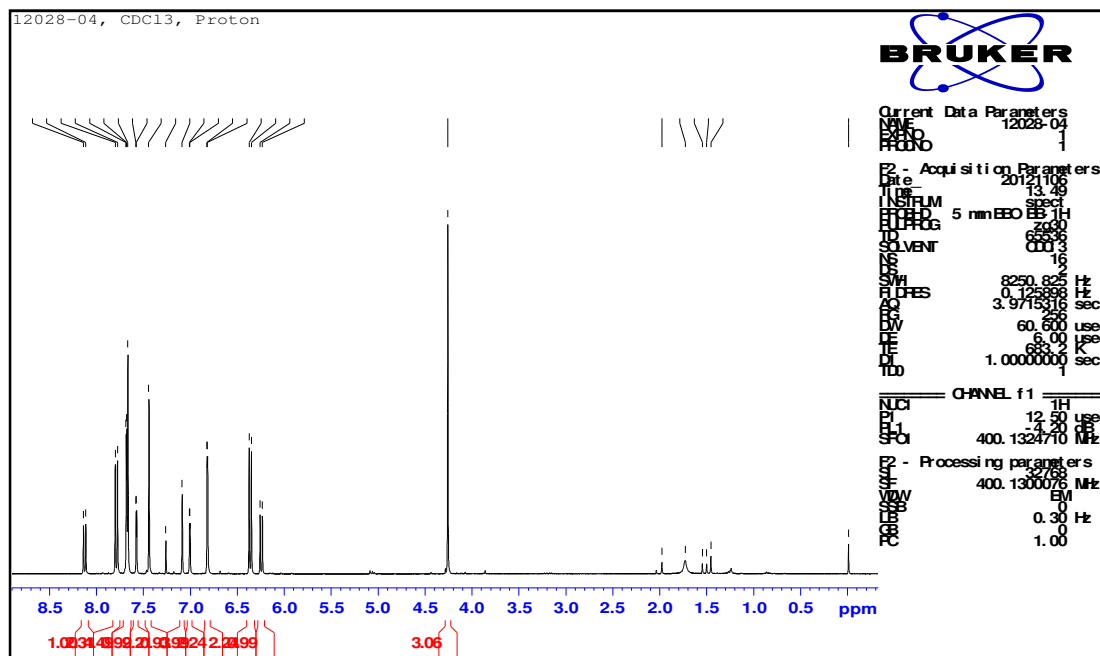


I-2. Ampliación de la zona 4.8-7.8 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto **C9**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.

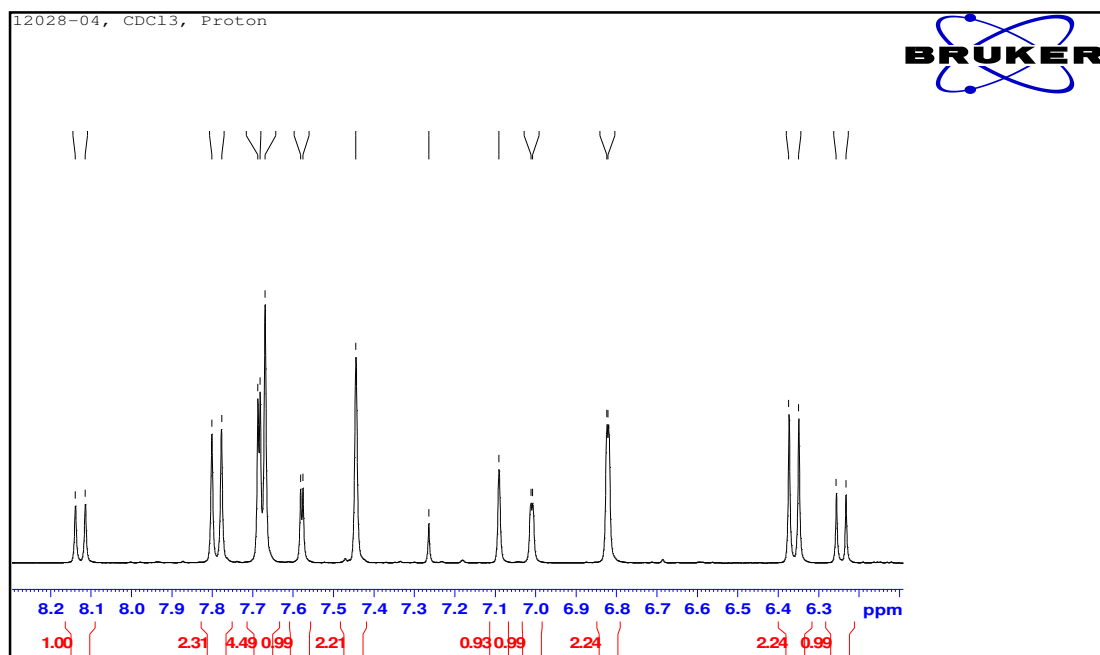


I-3. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto **C9**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

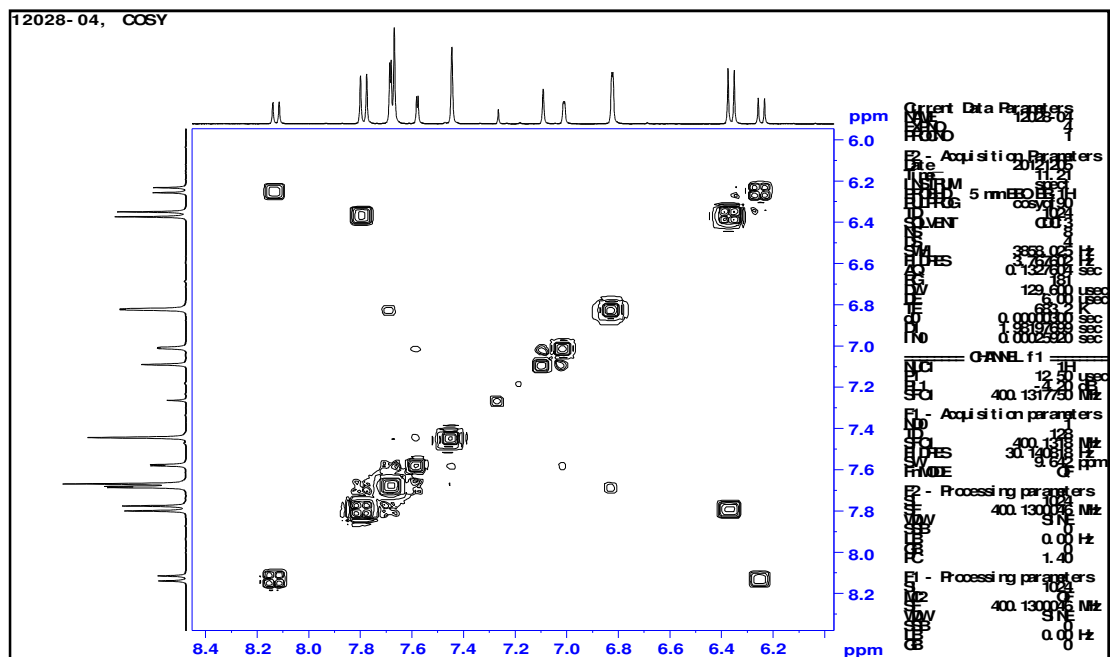
APENDICE J



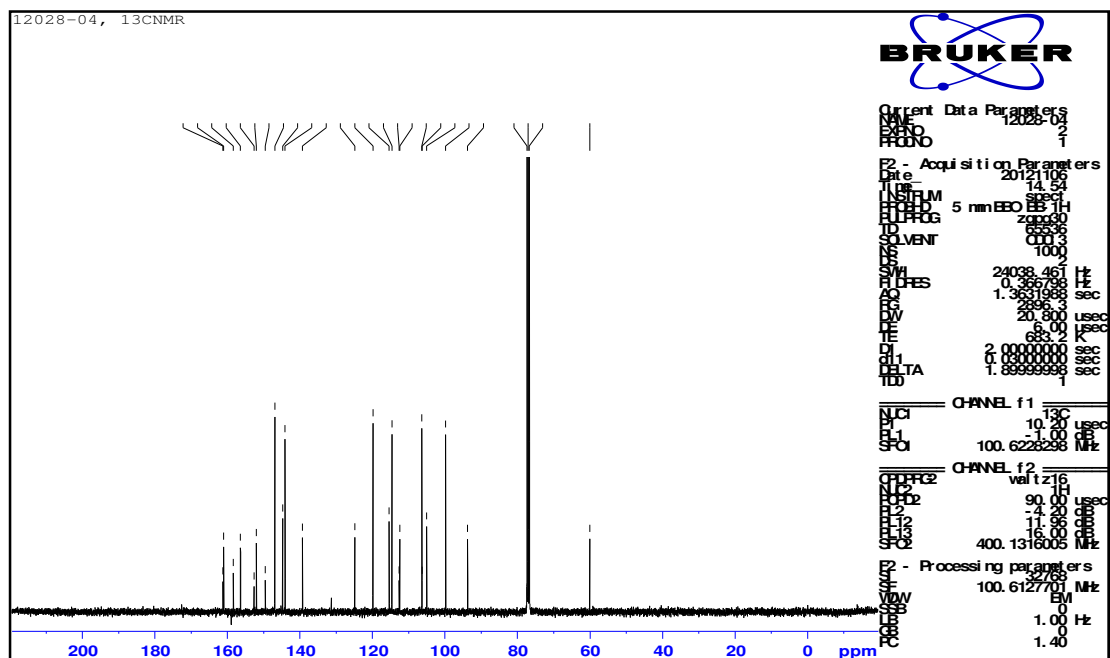
J-1. Espectro ¹H-RMN general del compuesto **C10**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



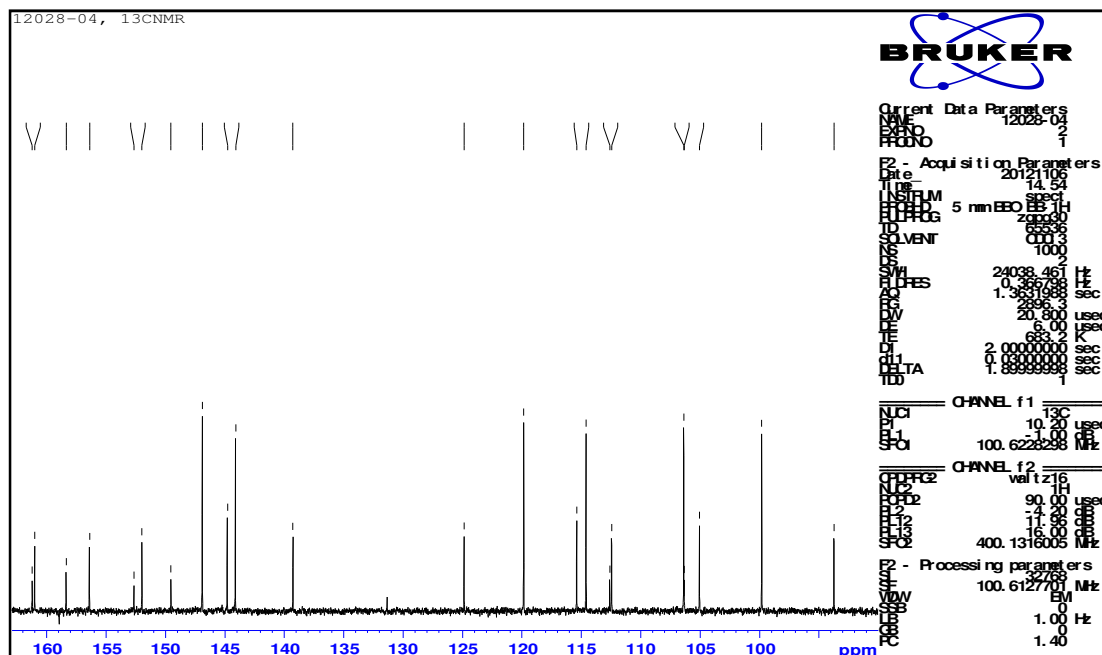
J-2. Ampliación de la zona 6.1-8.3 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto **C10**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



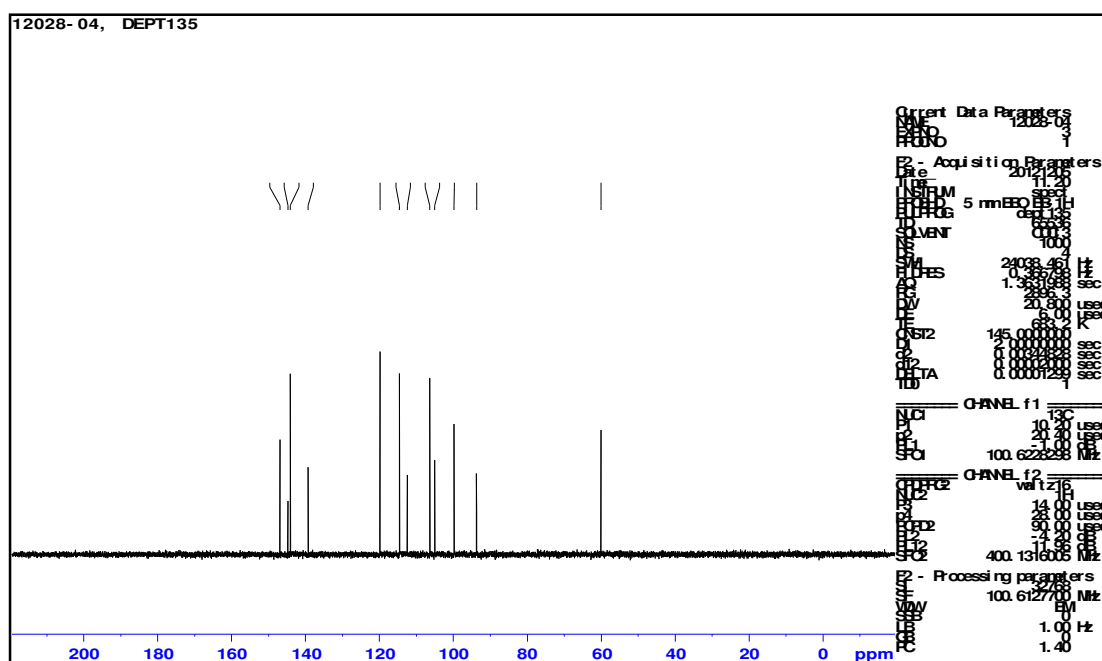
J-3. Espectro COSY general del compuesto **C10**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



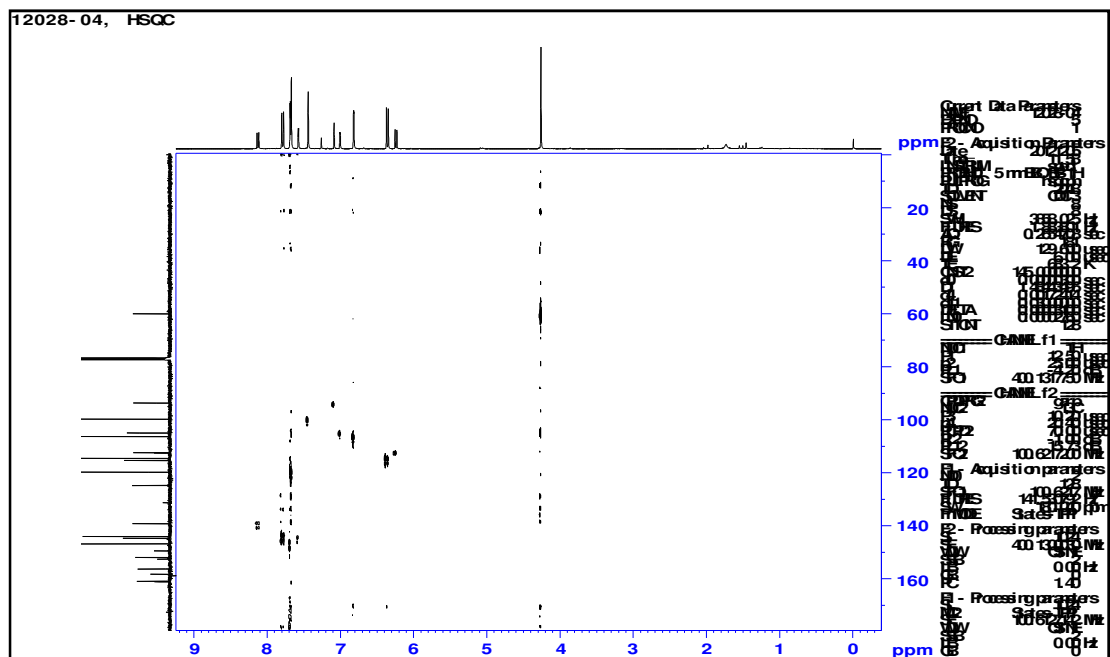
J-4. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto **C10**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



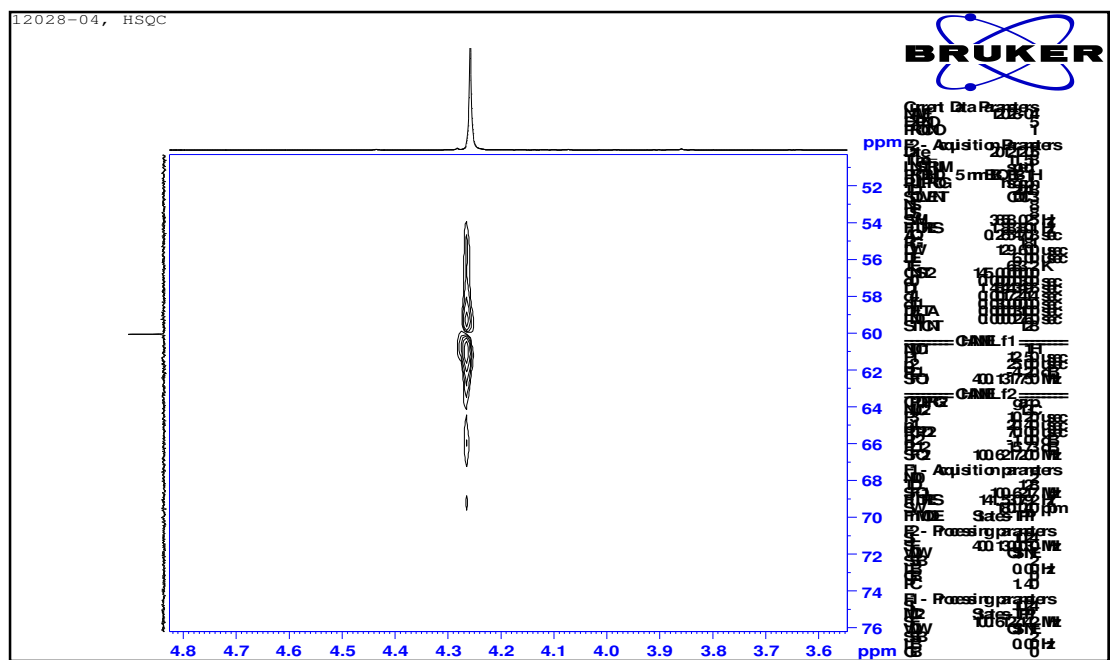
J-5. Ampliación de la zona 80-180 ppm del espectro ¹³C-RMN del compuesto C10. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



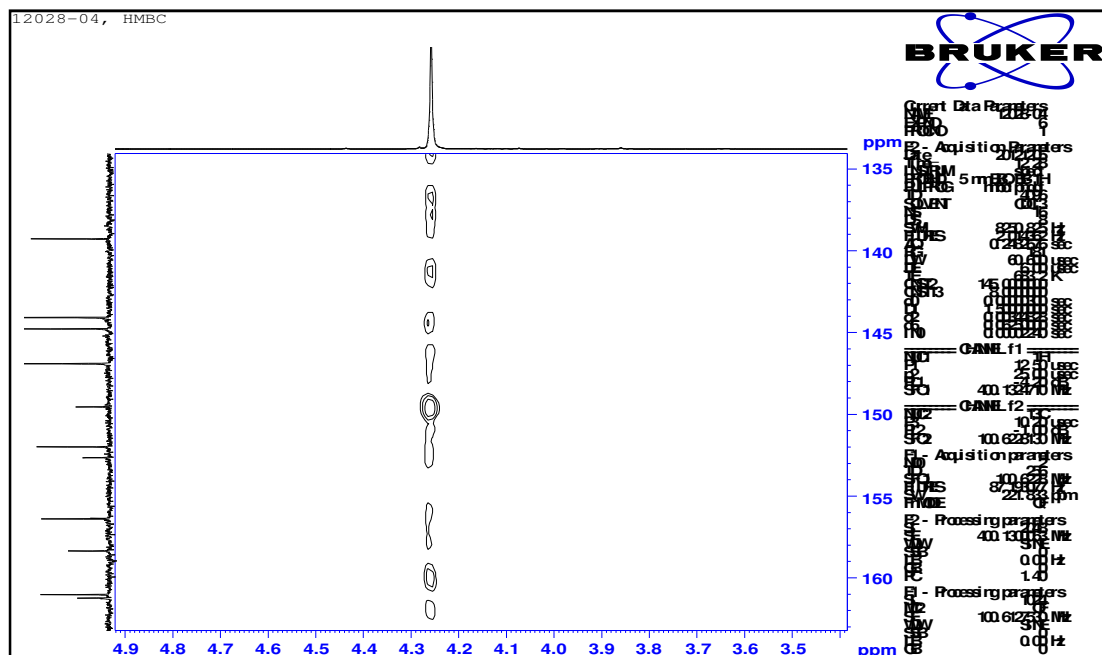
J-6. Espectro DEPT135 del espectro ¹³C-RMN del compuesto C10. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



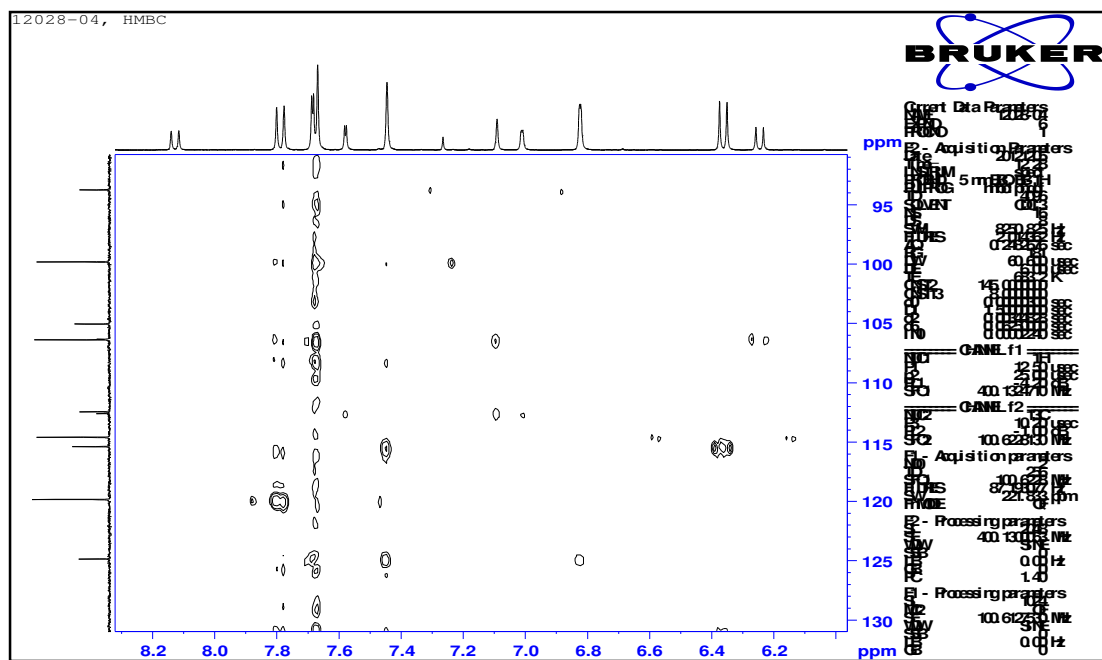
J-7 Espectro HSQC general del compuesto **C10**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



F-8. Ampliación del espectro HSQC (^1H : 3.6-4.8 ppm; ^{13}C : 63-78 ppm) del compuesto **C10**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

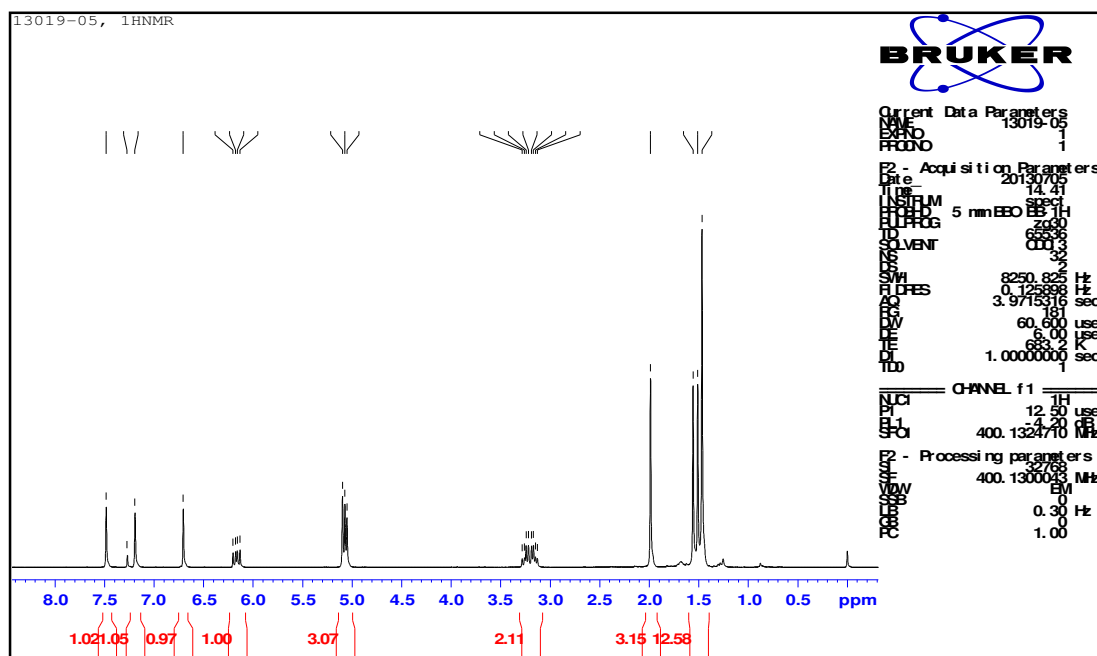


J-13. Ampliación del espectro HMBC (^1H : 3.4-4.9 ppm; ^{13}C : 135-185 ppm) del compuesto **C10**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

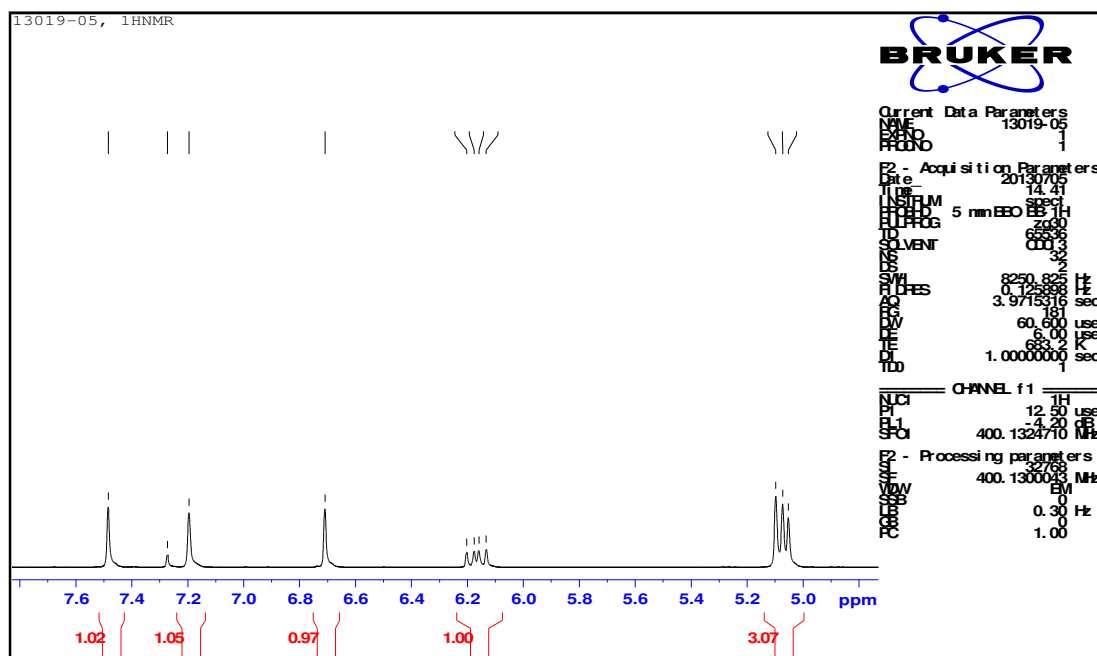


J-14. Ampliación del espectro HMBC (^1H : 6.0-8.2 ppm; ^{13}C : 80-130 ppm) del compuesto **C10**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

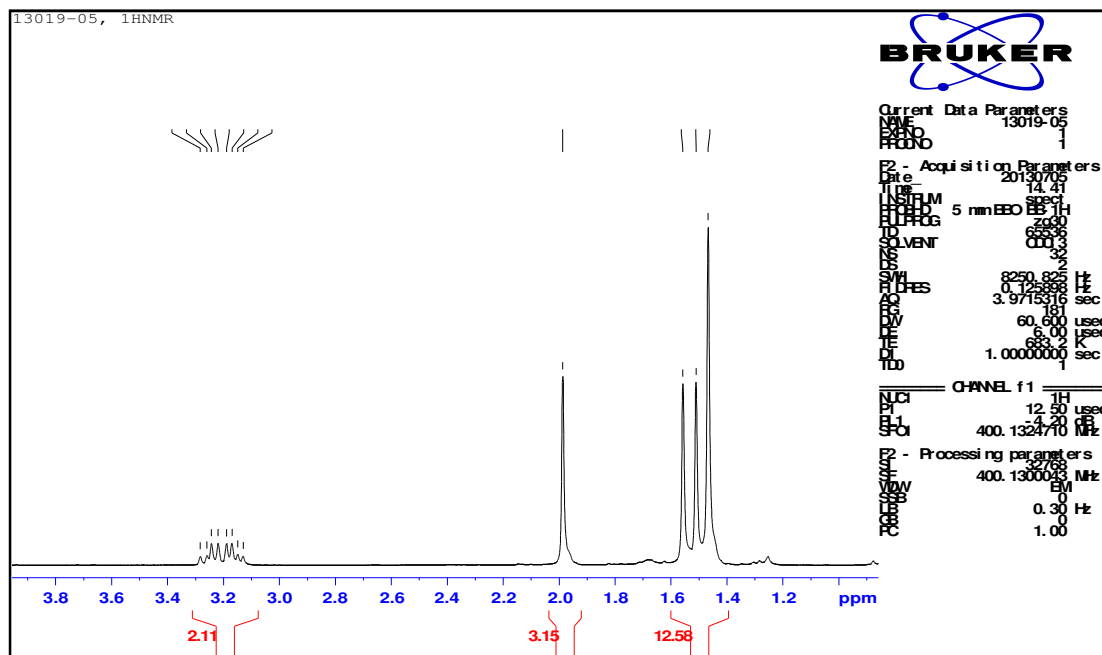
APENDICE K



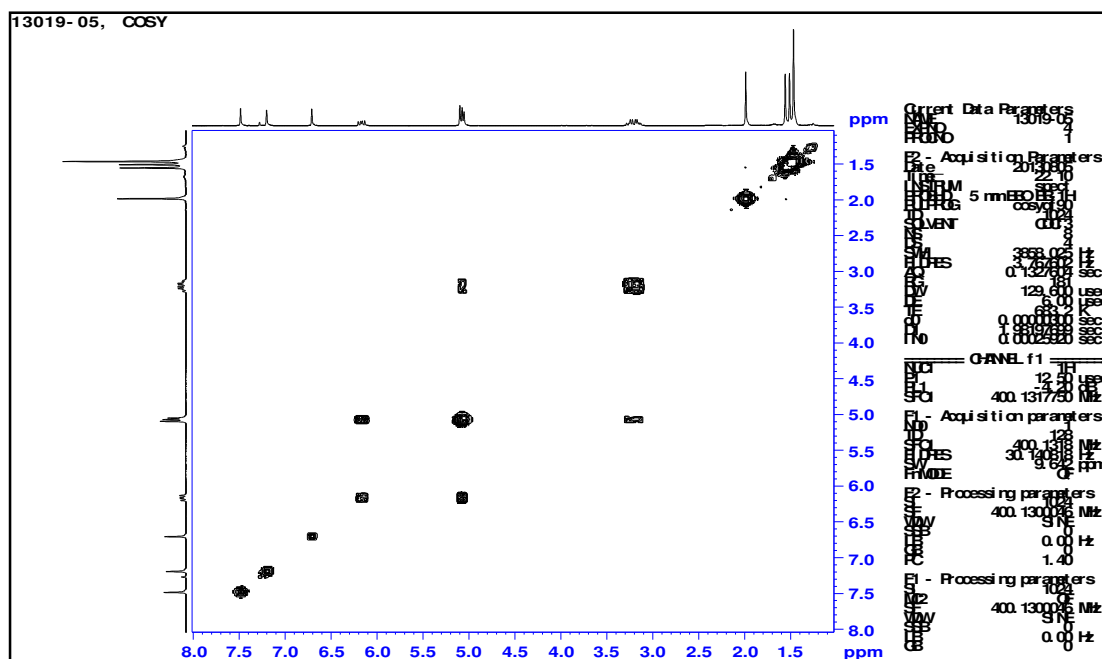
K-1. Espectro ¹H-RMN general del compuesto **C11**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



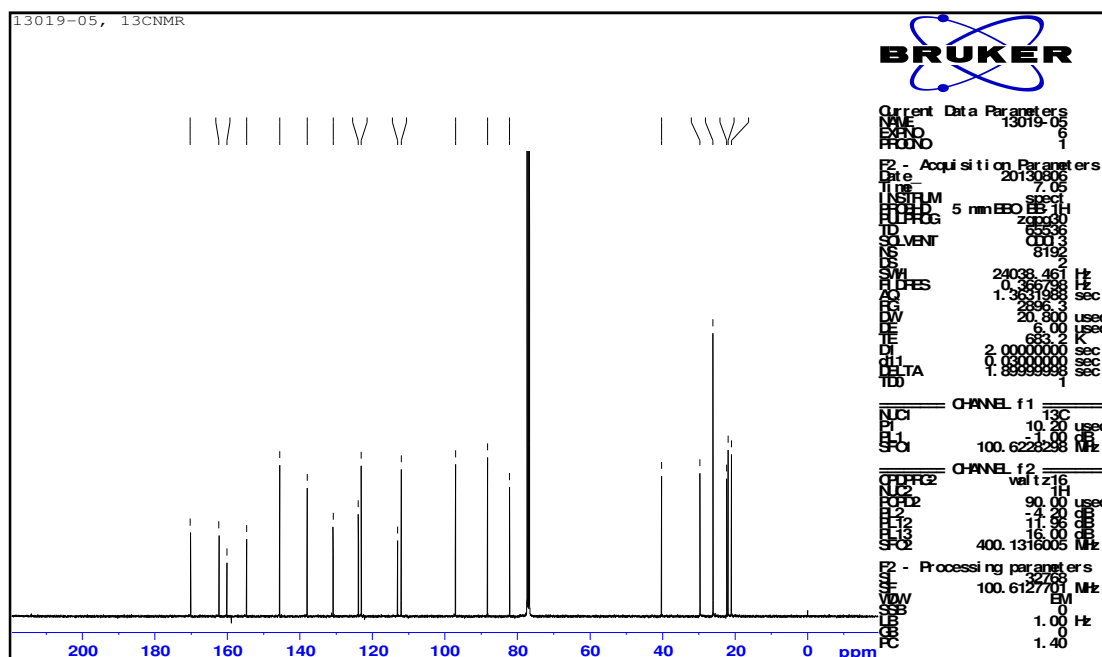
K-2. Ampliación de la zona 5.8-8.0 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto **C11**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



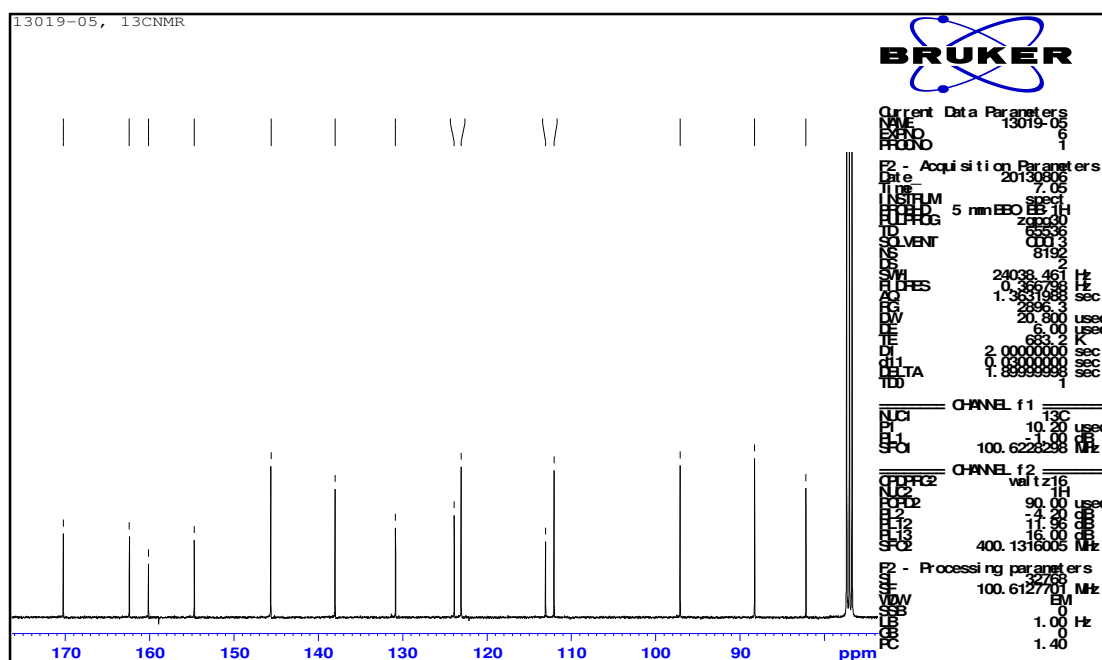
K-3. Ampliación de la zona 0.8-4.0 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto **C11**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



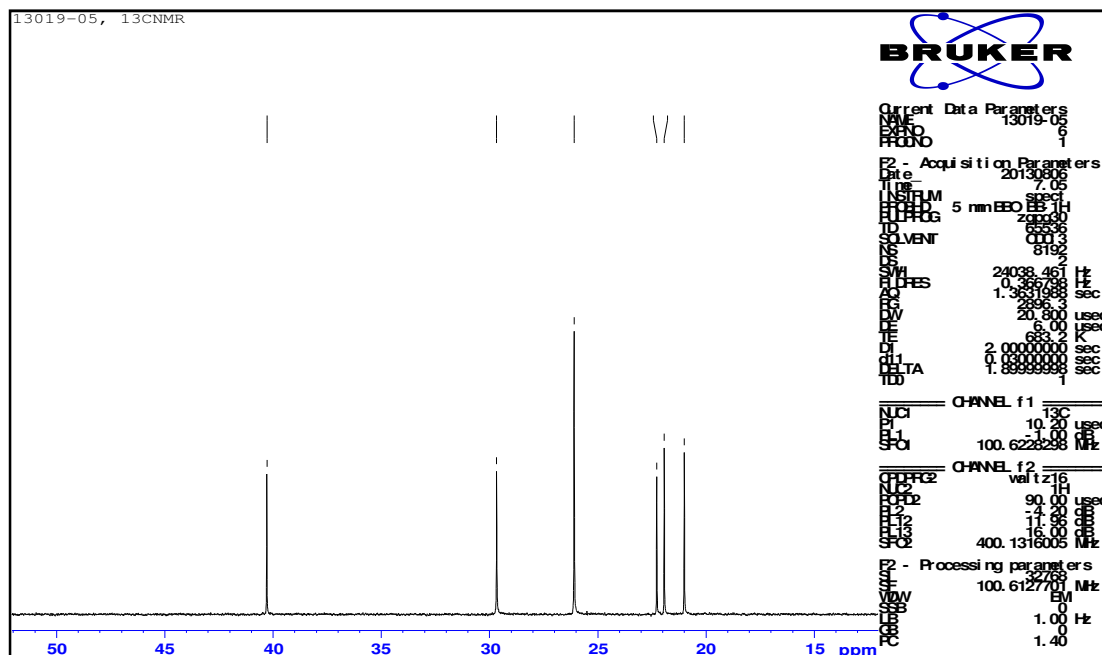
K-4. Espectro COSY general del compuesto **C11**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



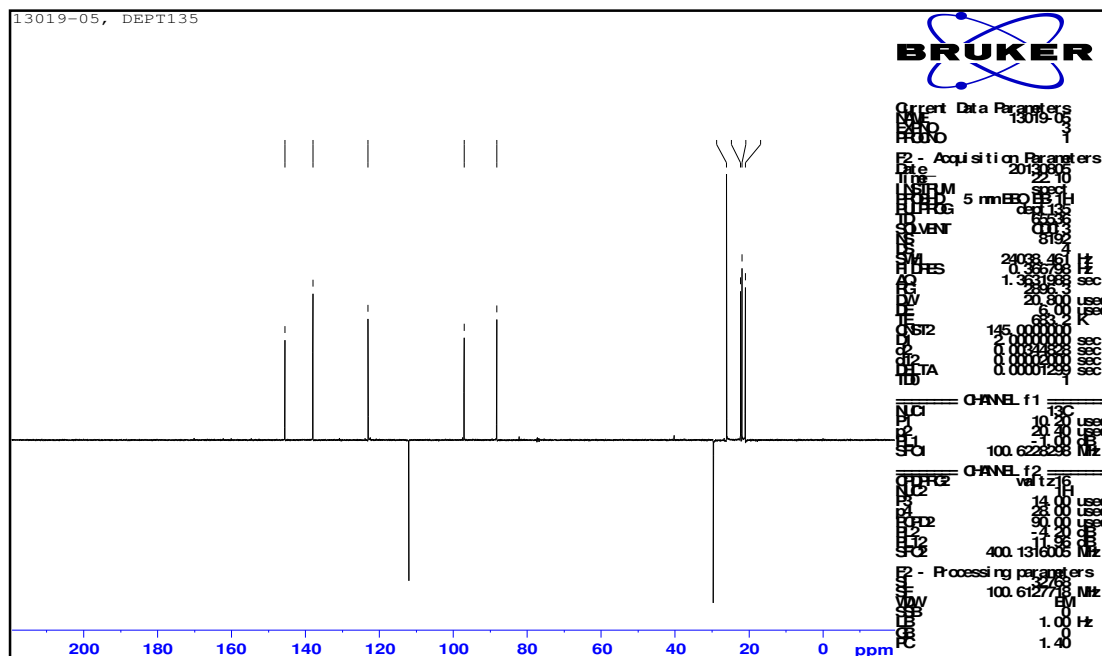
K-5. Espectro ¹³C-RMN general del compuesto **C11**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



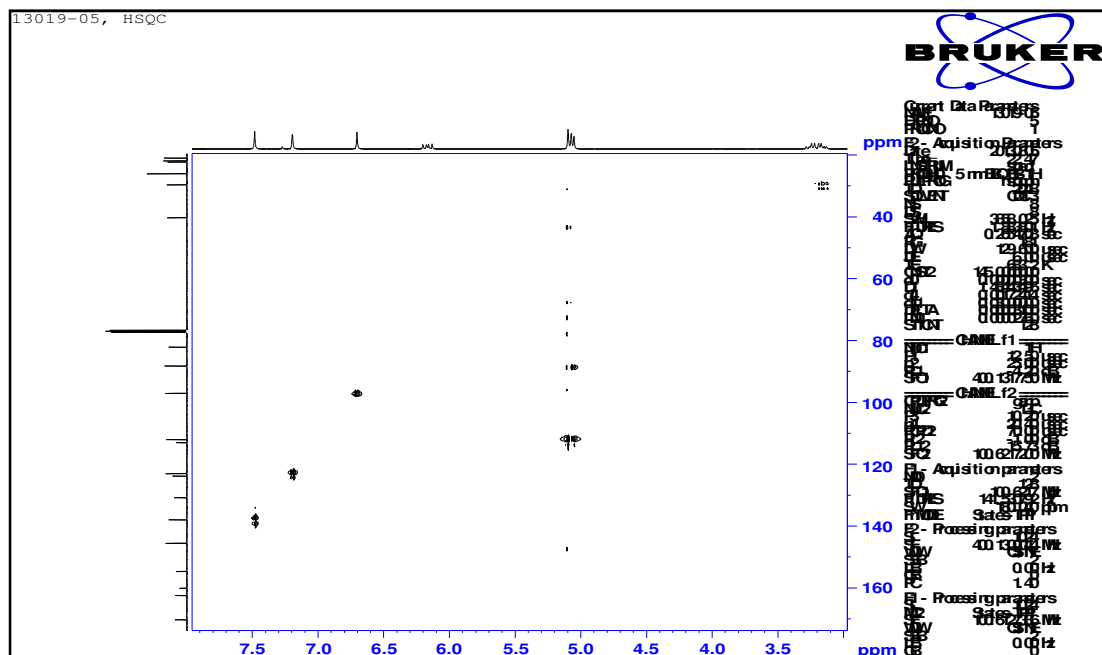
K-6. Ampliación de la zona 80-180 ppm del espectro ¹³C-RMN del compuesto **C11**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



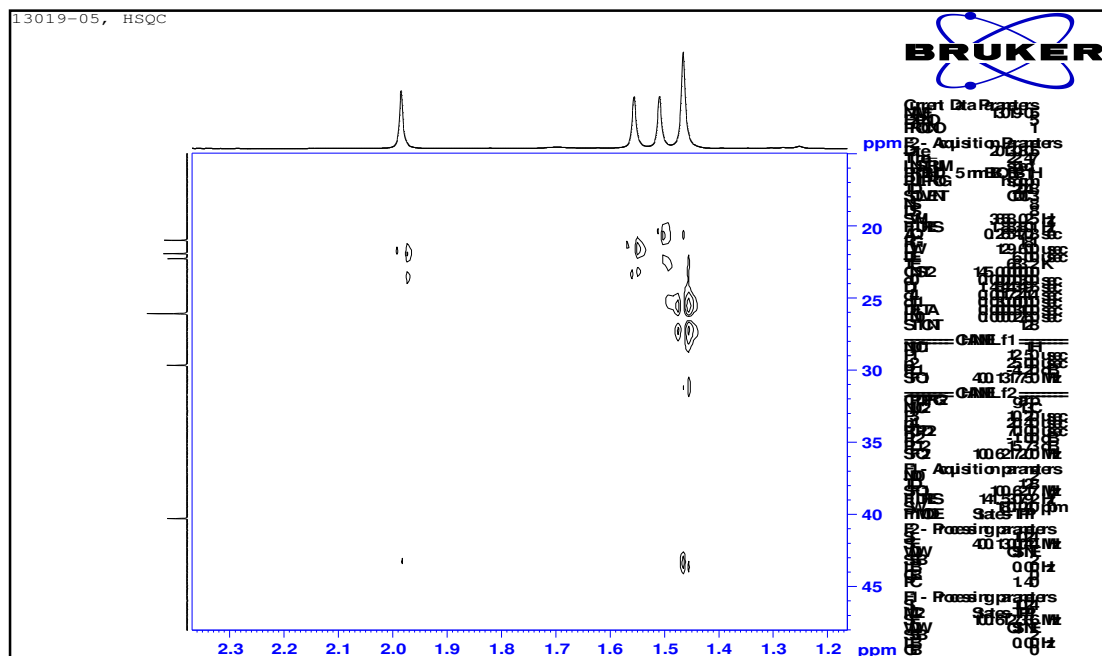
K-7. Ampliación de la zona 80-180 ppm del espectro ¹³C-RMN del compuesto C11. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



K-8. Espectro DEPT135 del espectro ¹³C-RMN del compuesto C11. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.

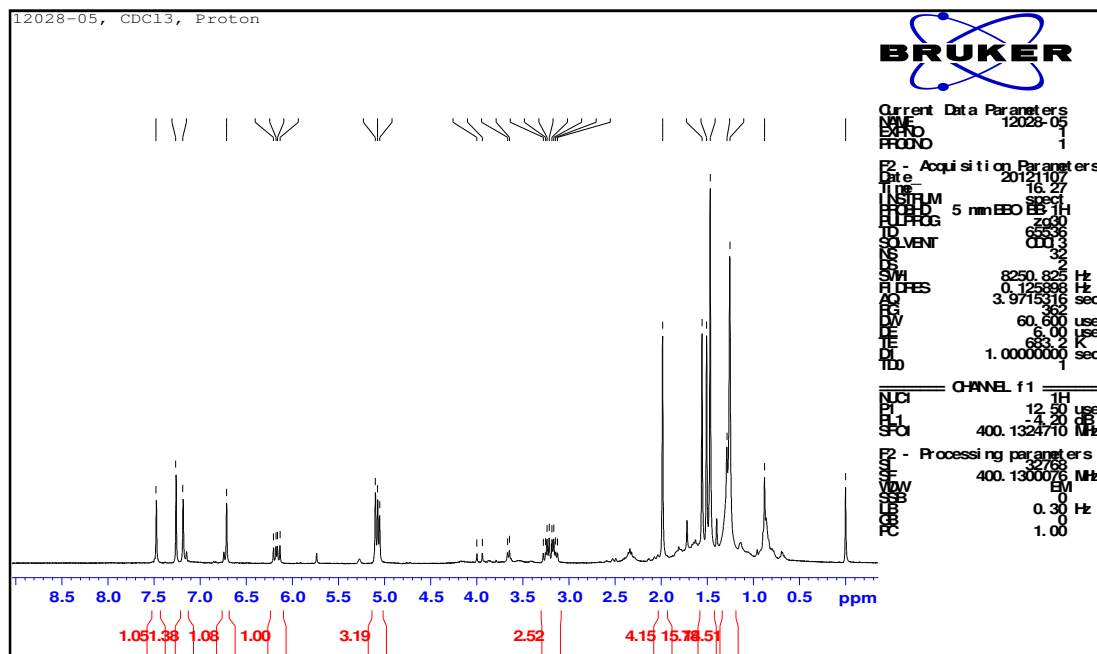


K-11 Ampliación del espectro HSQC (^1H : 3.0-8.0 ppm; ^{13}C : 20-170 ppm) del compuesto C11. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

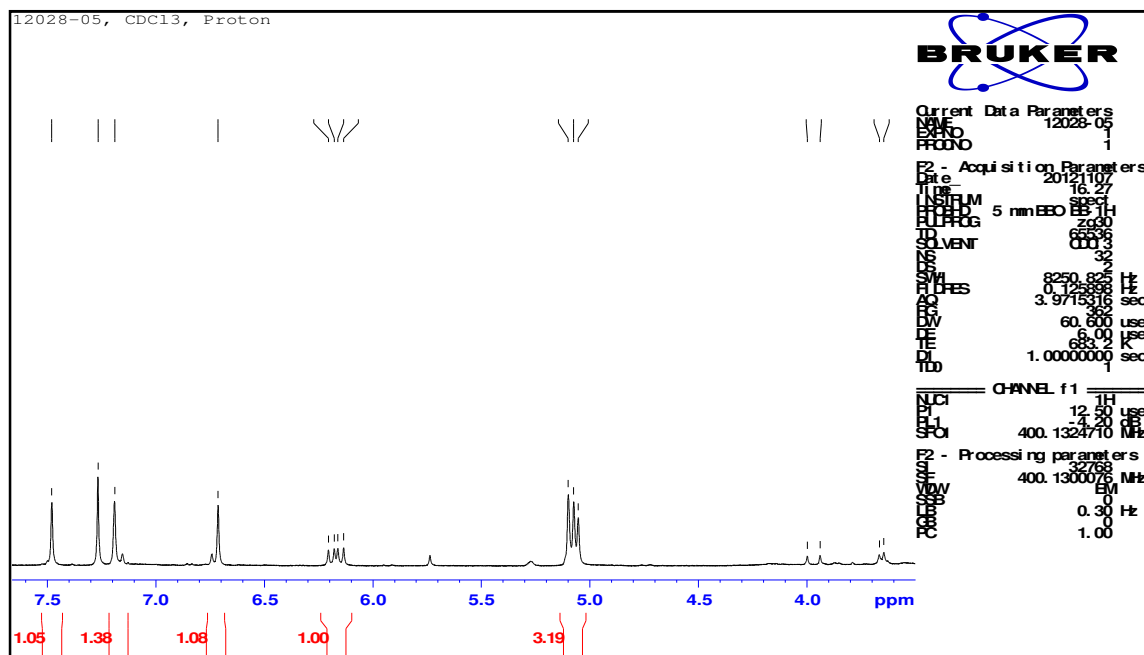


K-12 Ampliación del espectro HSQC (^1H : 1.2-2.3 ppm; ^{13}C : 10-50 ppm) del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

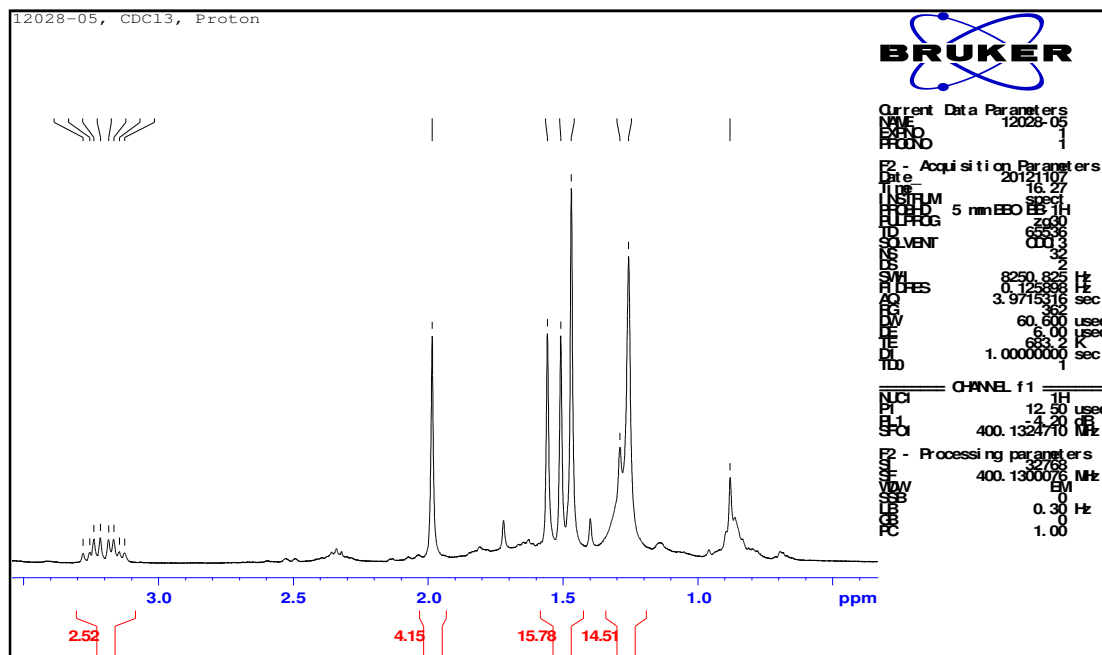
APENDICE L



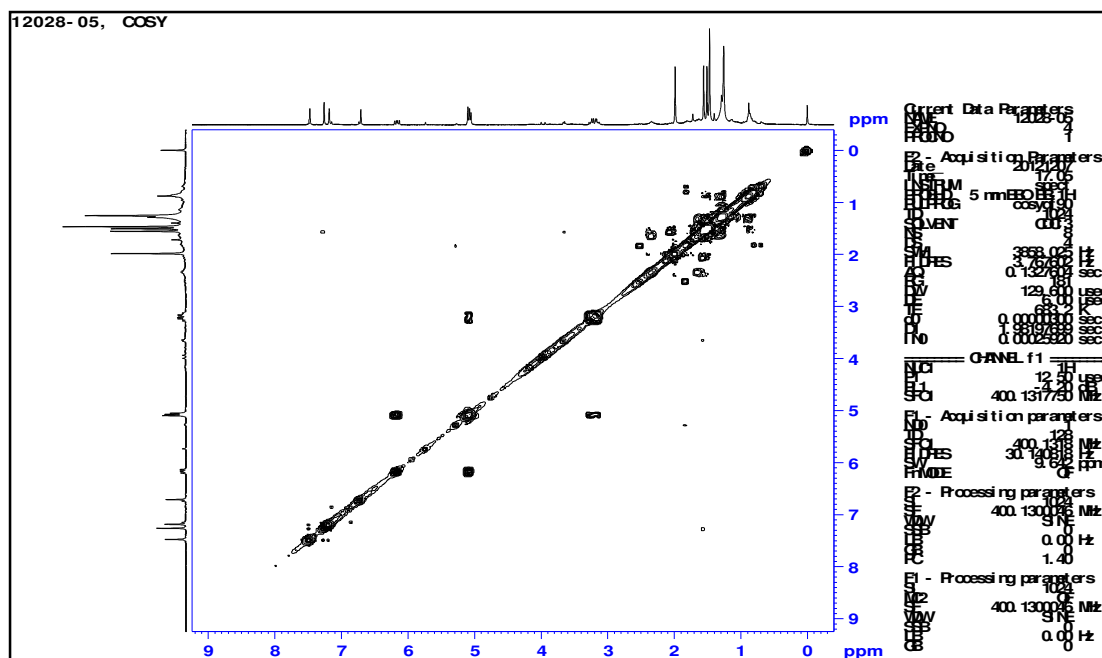
L-1. Espectro ¹H-RMN general del compuesto **C12**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



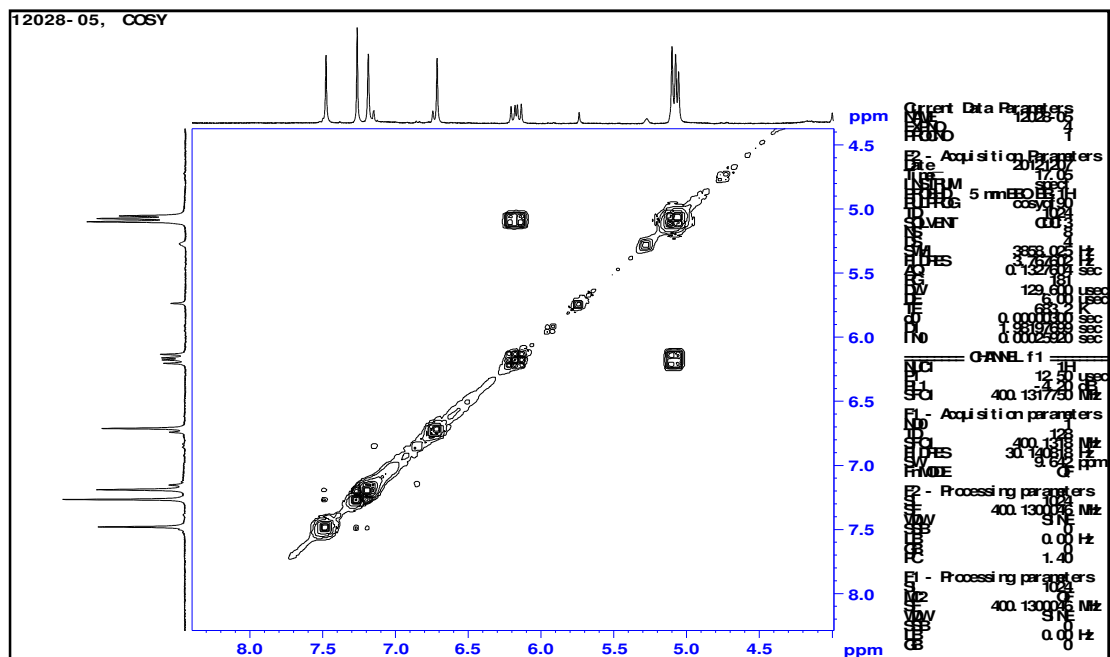
L-2. Ampliación de la zona 3.5-7.5 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto **C12**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



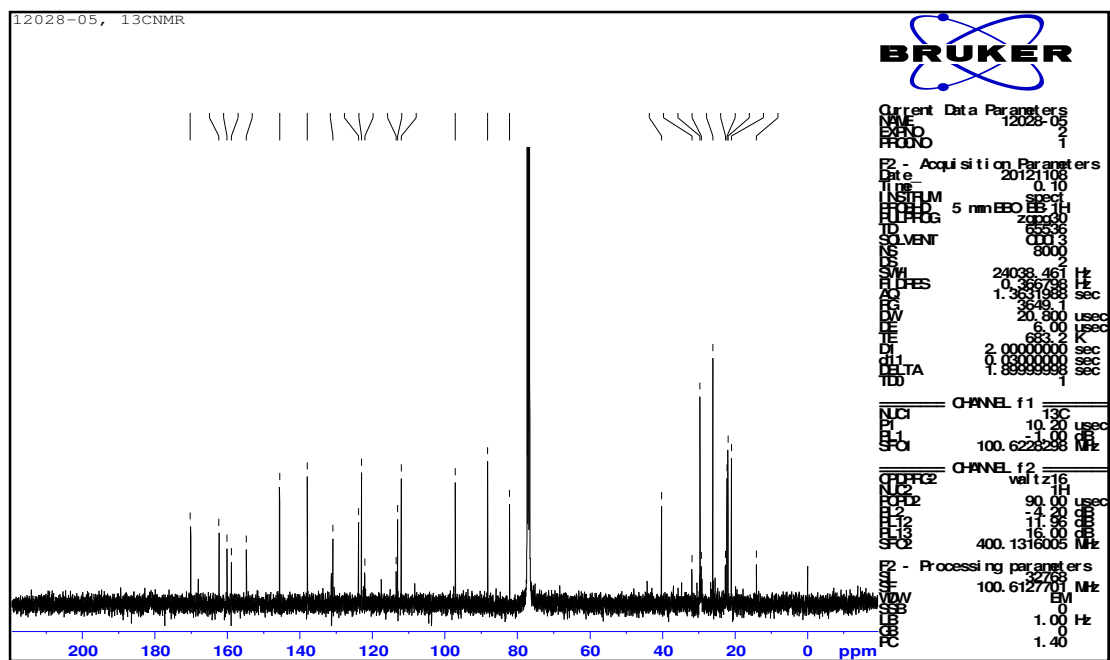
L-3. Ampliación de la zona 0.5-3.5 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



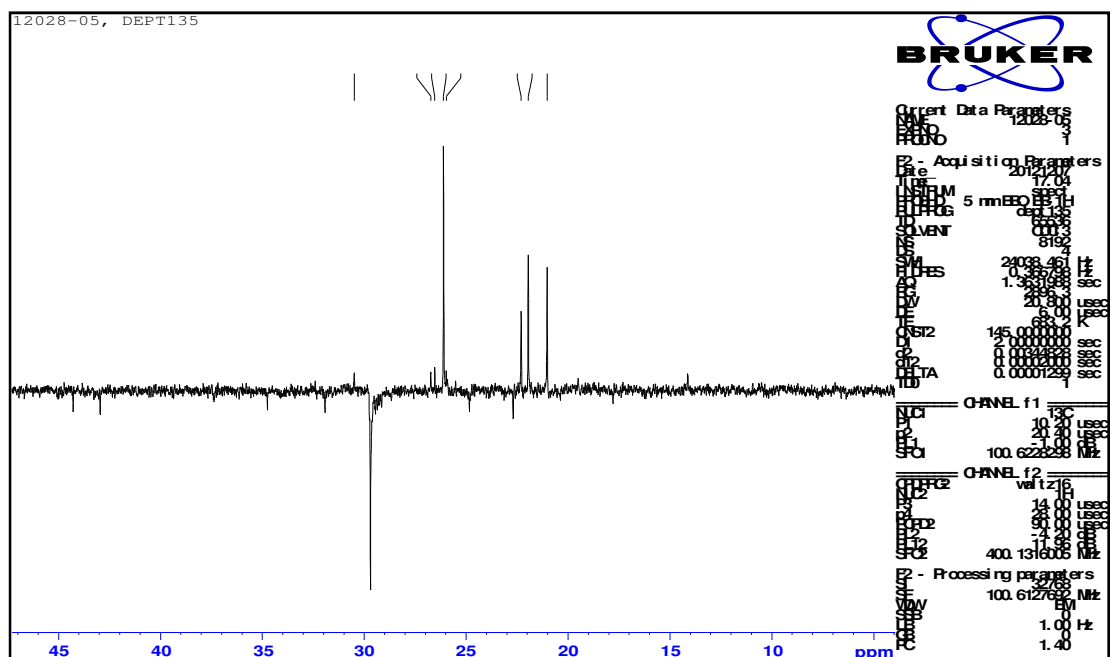
L-4. Espectro COSY general del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



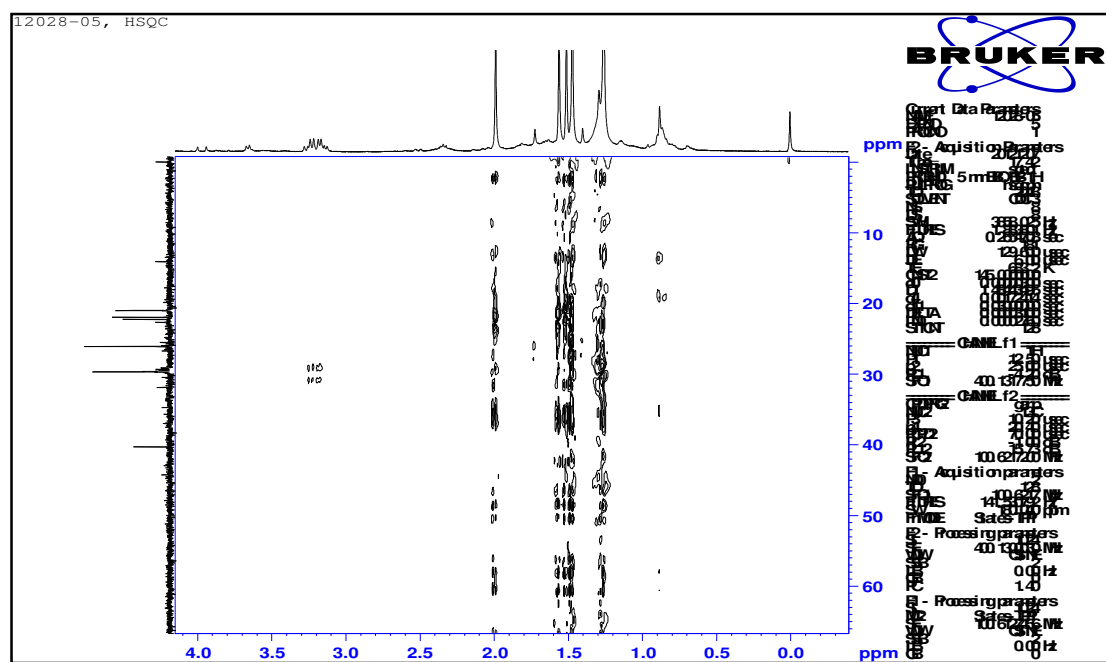
L-5. Ampliación de la zona (^1H : 4.5-8.0 ppm, ^1H : 4.5-8.0 ppm) del espectro COSY del compuesto **C12**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



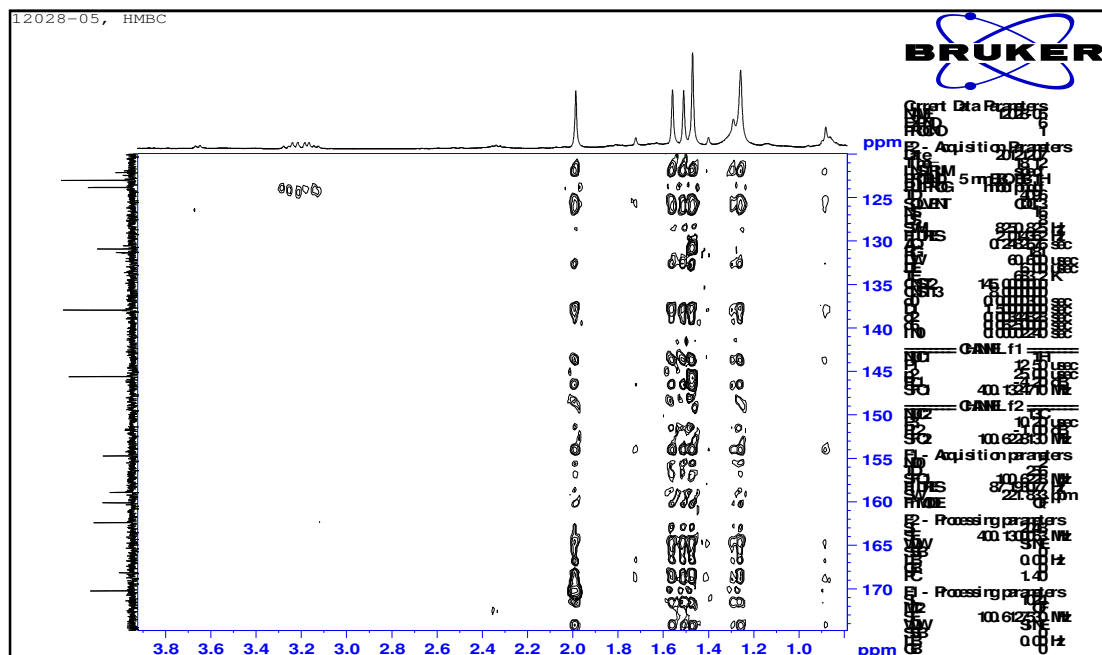
L-6. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto **C12**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



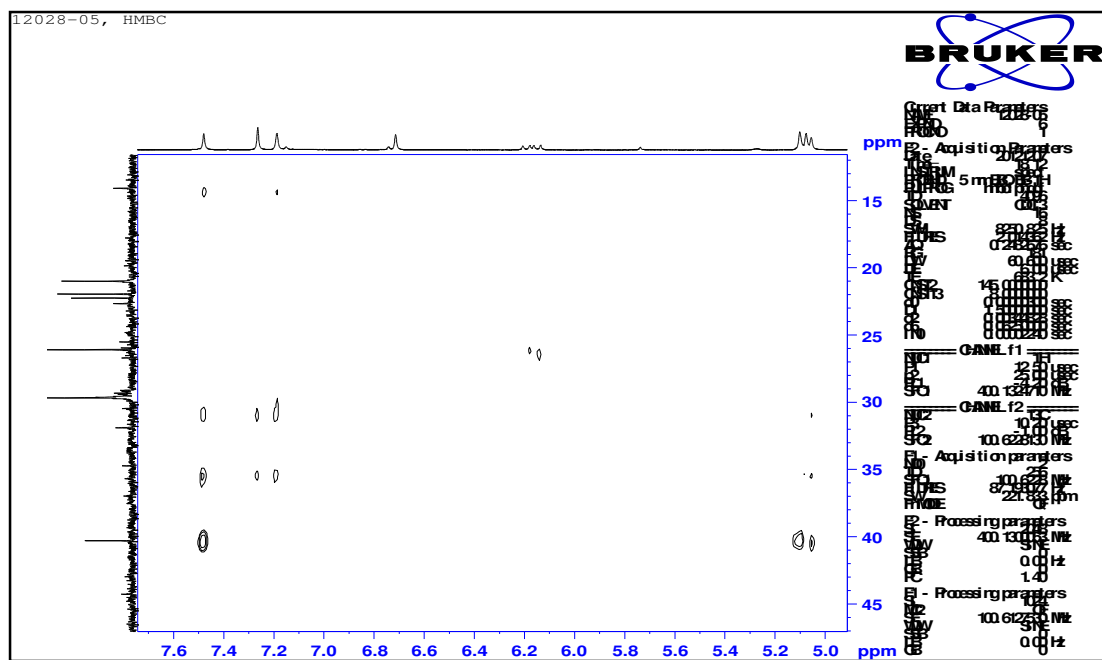
L-9. Ampliación de la zona 5-45 ppm del espectro DEPT135 del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



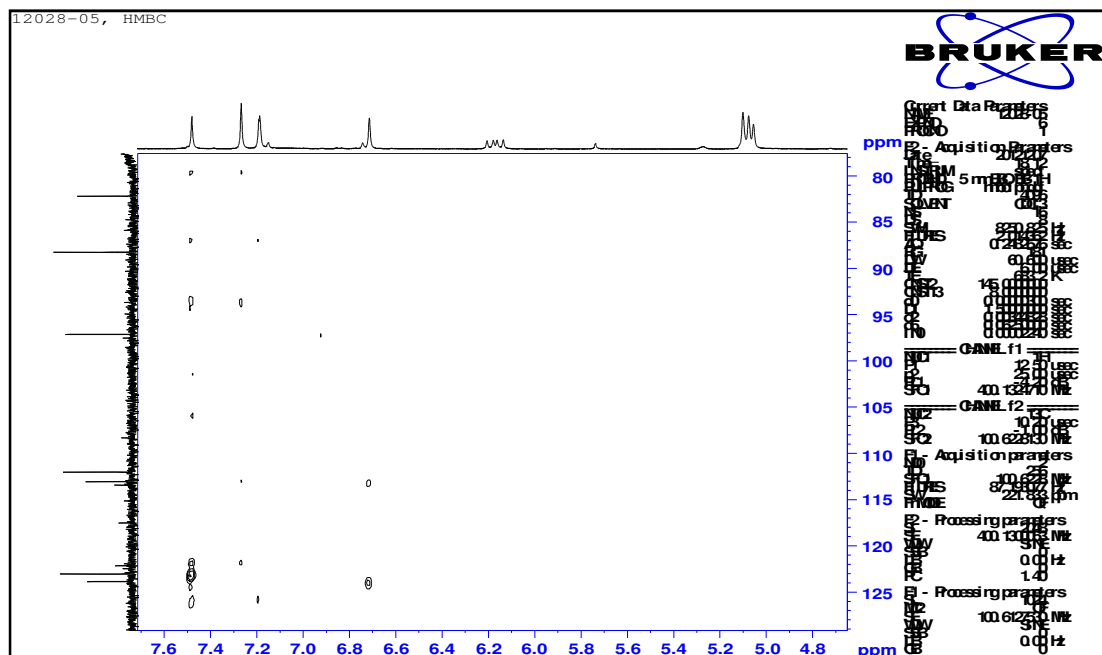
L-10 Ampliación del espectro HSQC (^1H : 0.0-4.0 ppm; ^{13}C : 0-85 ppm) del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



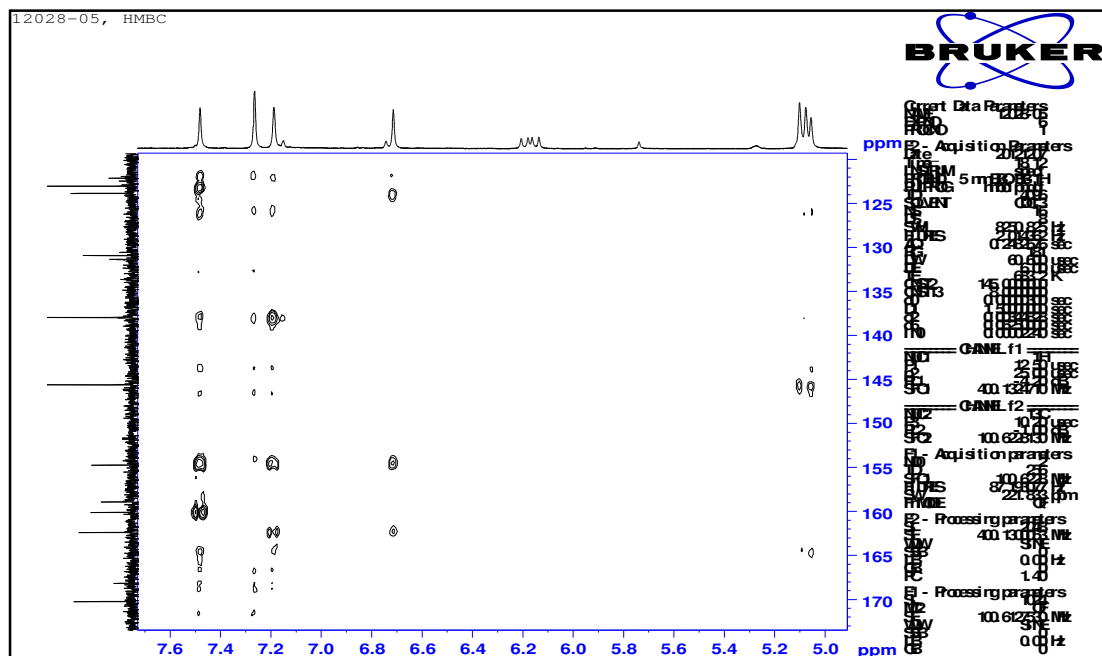
L-17 Ampliación del espectro HMBC (^1H : 0.7-3.8 ppm; ^{13}C : 120-170 ppm) del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



L-18 Ampliación del espectro HMBC (^1H : 6.0-7.8 ppm; ^{13}C : 10-45 ppm) del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

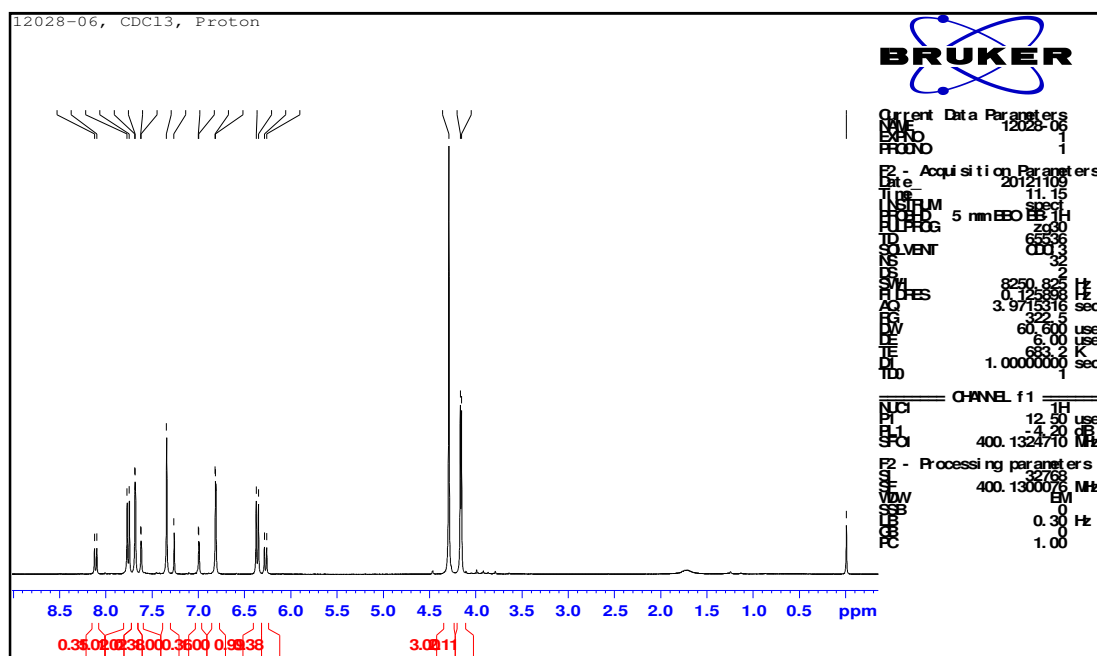


L-19 Ampliación del espectro HMBC (^1H : 4.6-7.8 ppm; ^{13}C : 80-126 ppm) del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

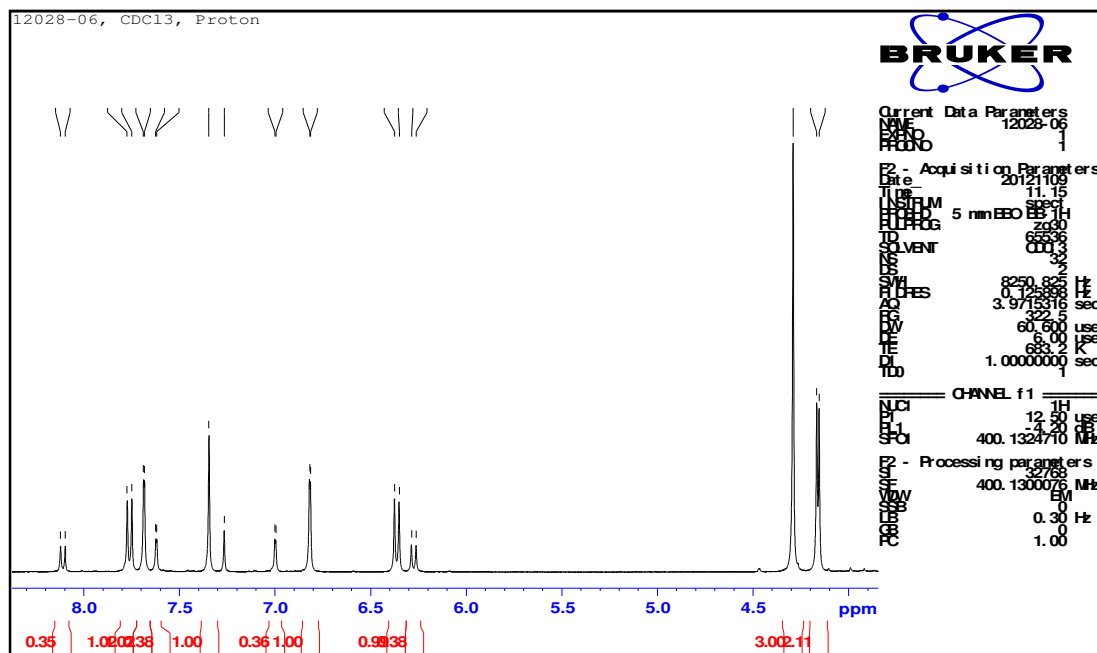


L-20 Ampliación del espectro HMBC (^1H : 6.0-7.8 ppm; ^{13}C : 120-170 ppm) del compuesto C12. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

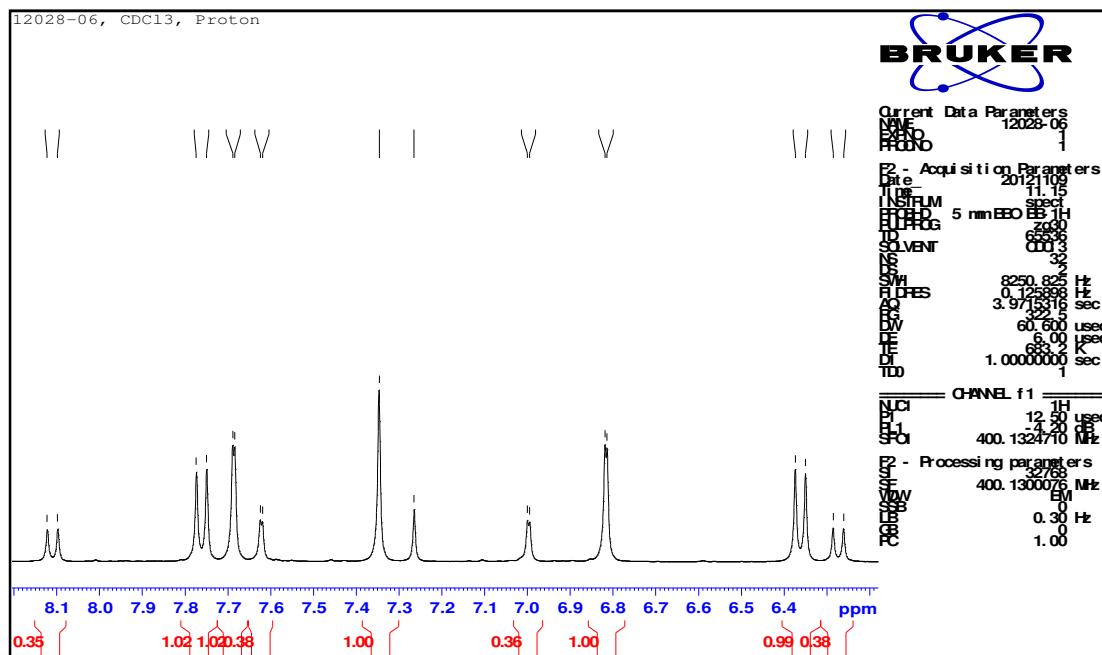
APENDICE M



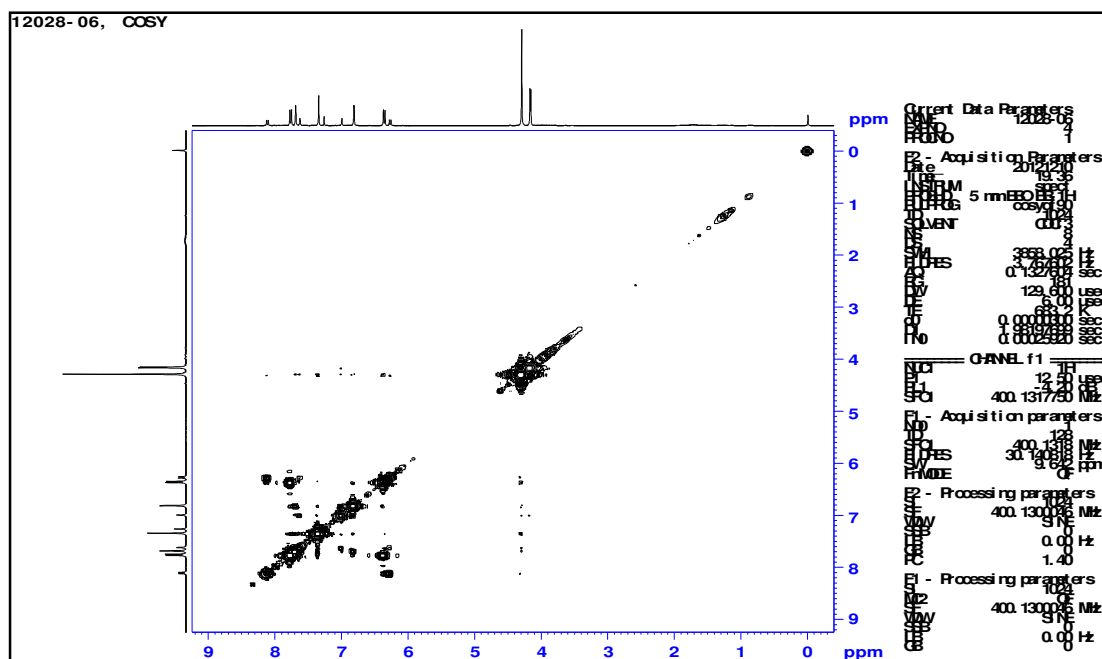
M-1. Espectro ¹H-RMN general del compuesto C13. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



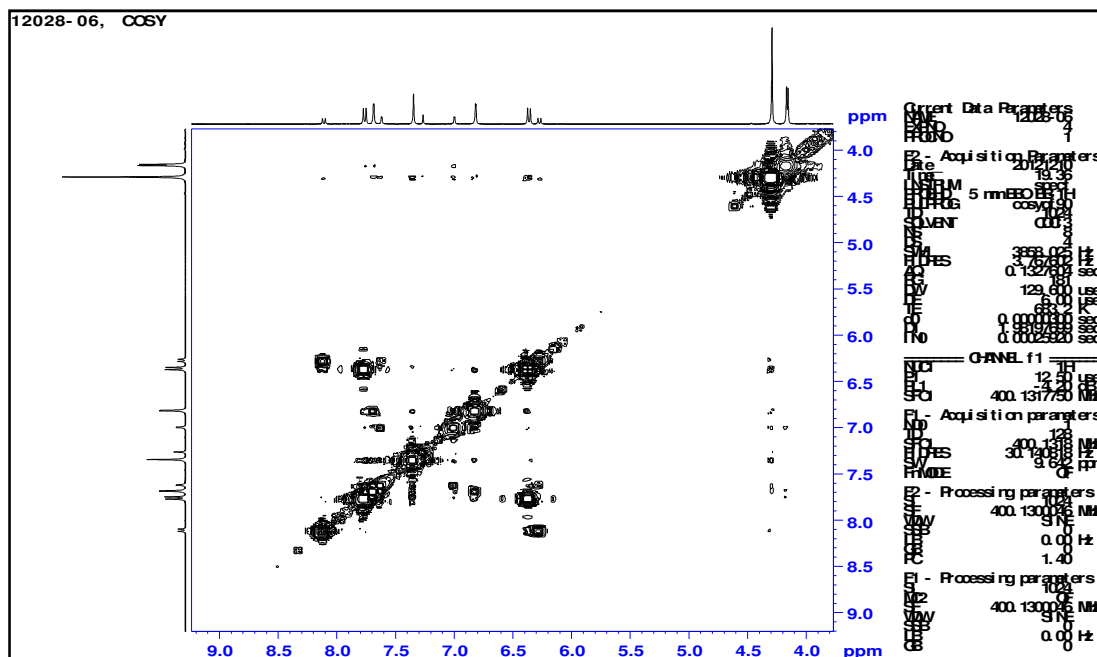
M-2. Ampliación de la zona 4.0-8.5 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto C13. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



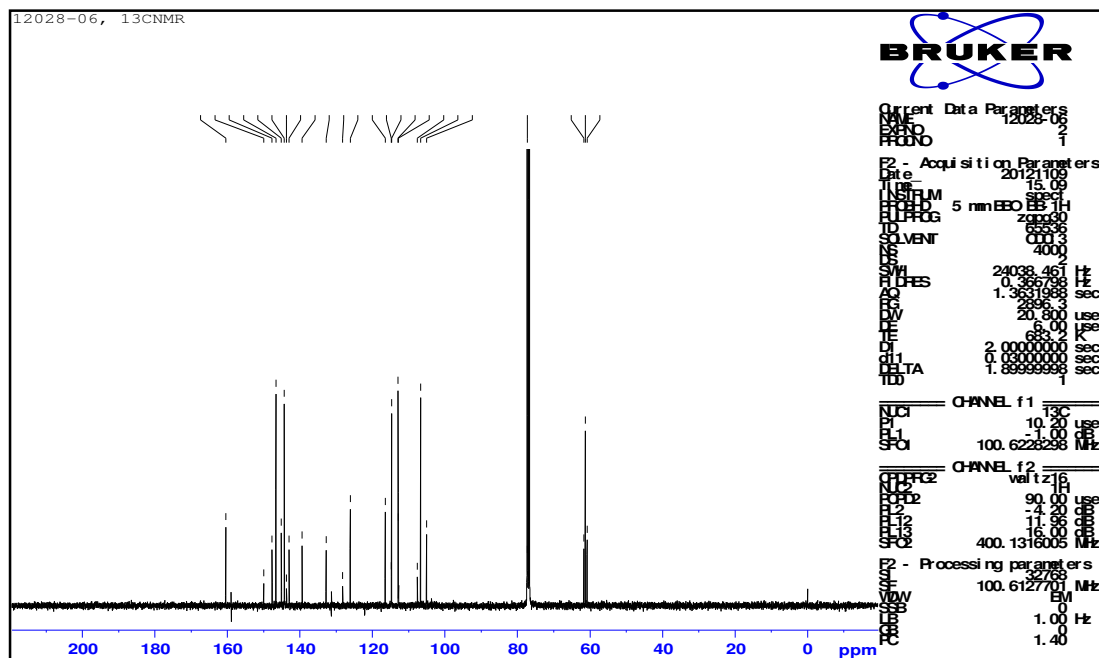
M-3. Ampliación de la zona 6.2-8.2 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto **C13**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



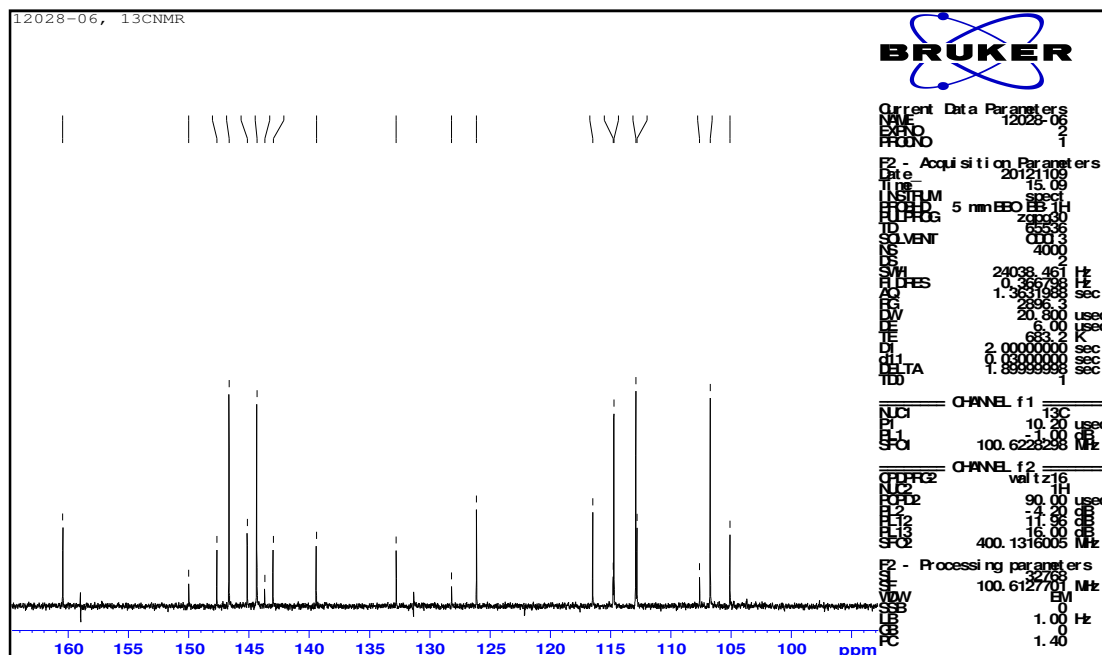
M-4. Espectro COSY general del compuesto **C13**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



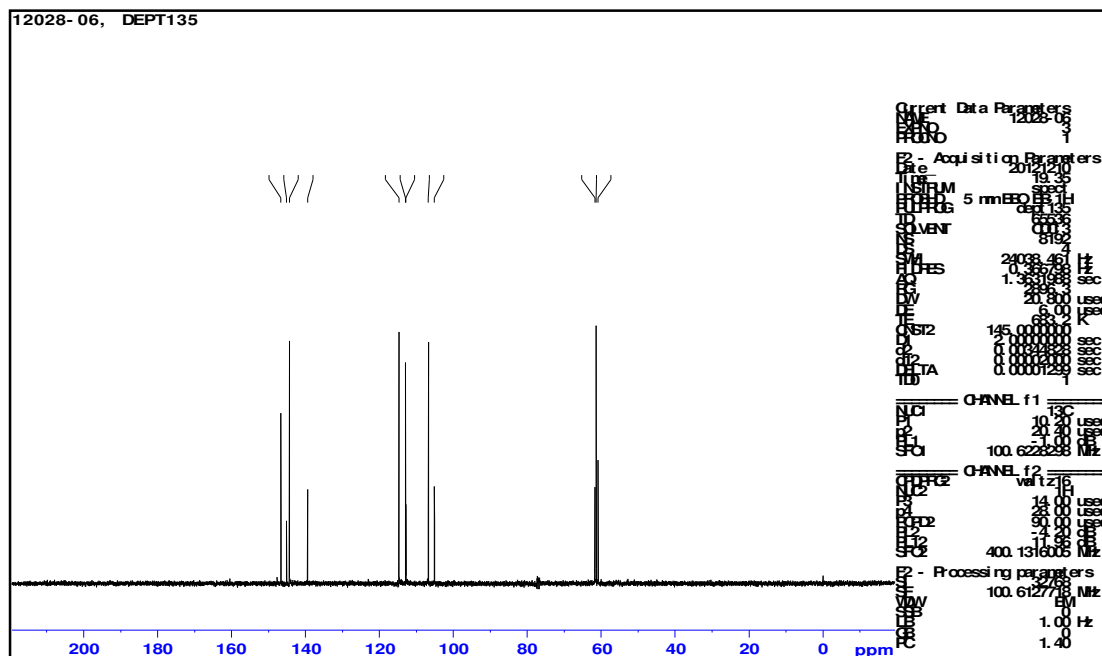
M-5. Ampliación de la zona (^1H : 4.0-8.0 ppm, ^1H : 4.0-8.0 ppm) del espectro COSY del compuesto **C13**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



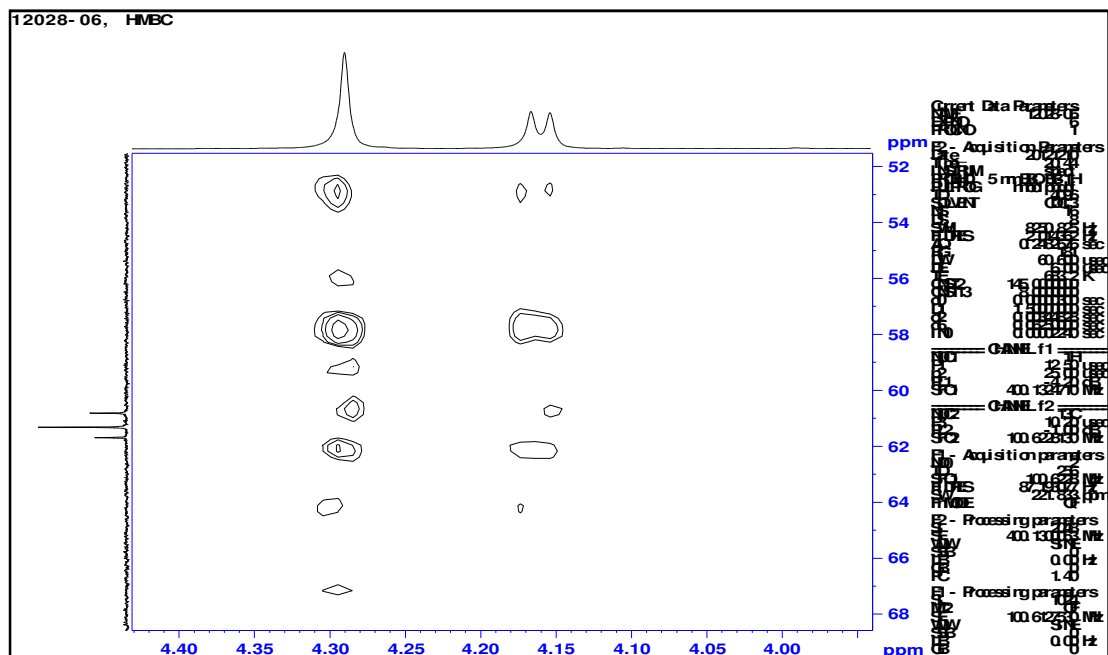
M-6. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto **C13**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

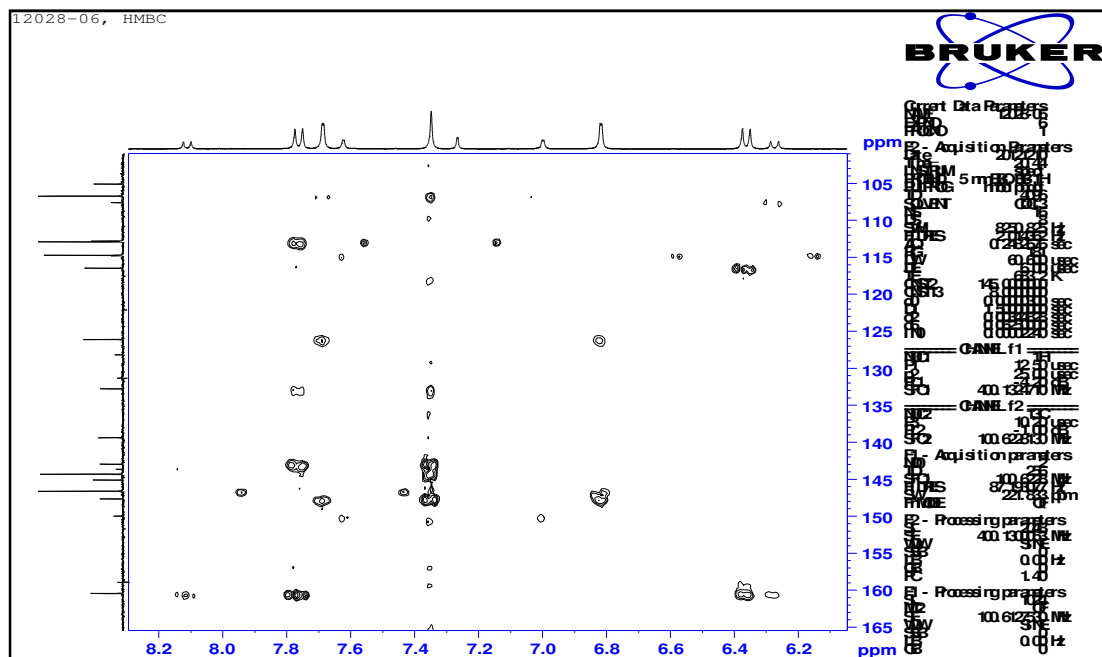


M-7. Ampliación de la zona 97-165 ppm del espectro ¹³C-RMN del compuesto C13. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



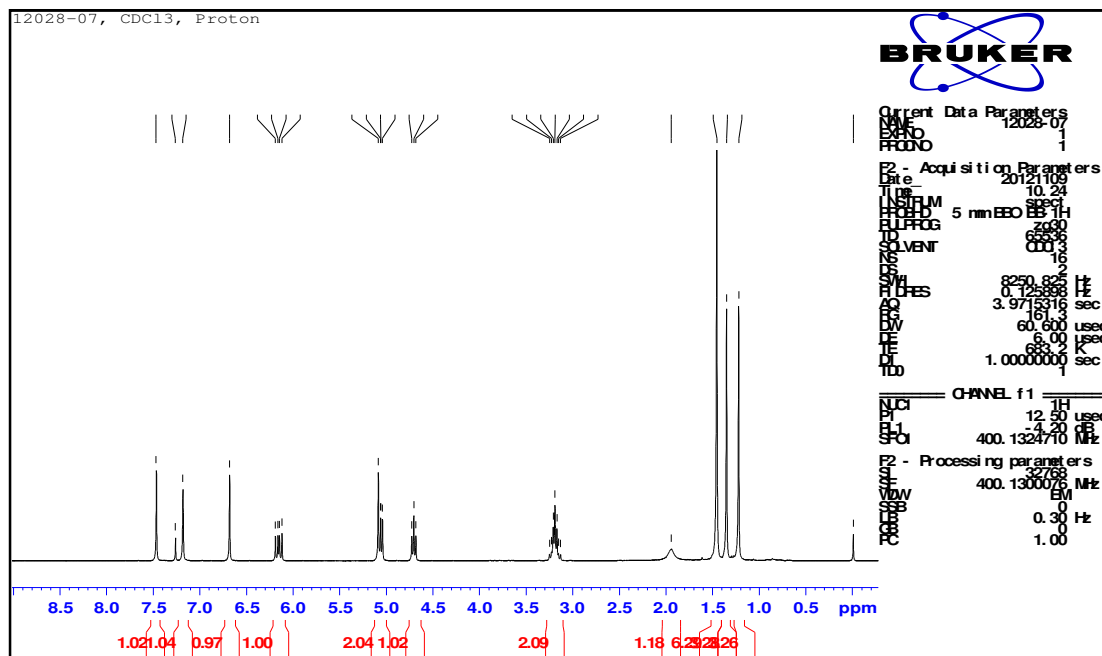
M-8. Espectro DEPT135 del espectro ¹³C-RMN del compuesto C13. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



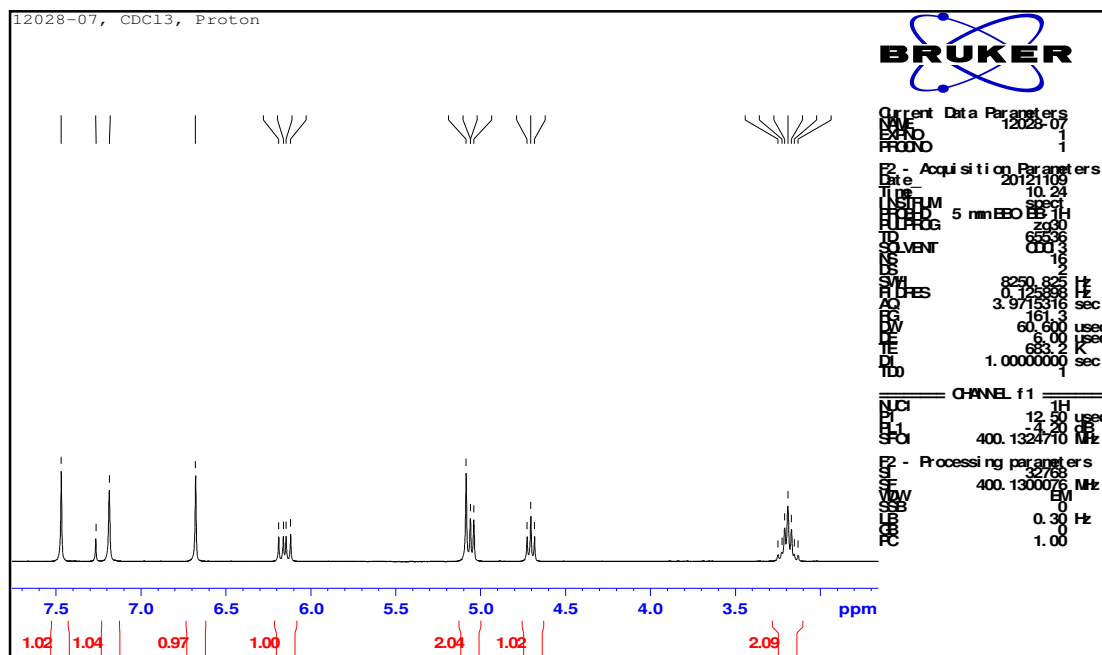


M-17. Ampliación del espectro HMBC (^1H : 6.0-8.82 ppm; ^{13}C : 100-165 ppm) del compuesto **C13**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

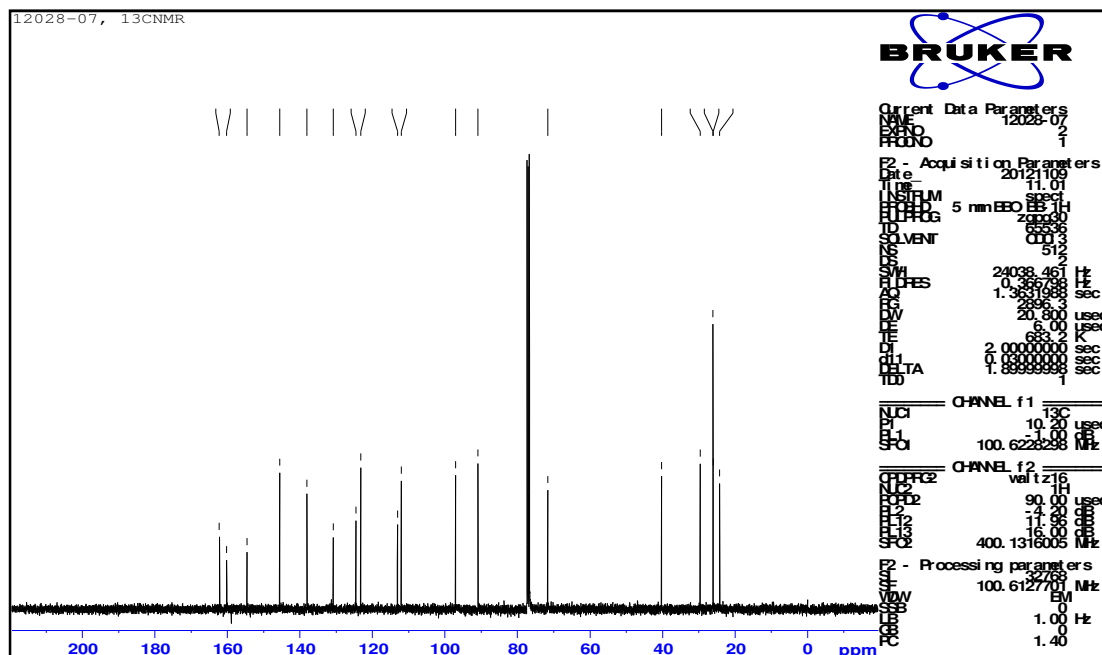
APENDICE N



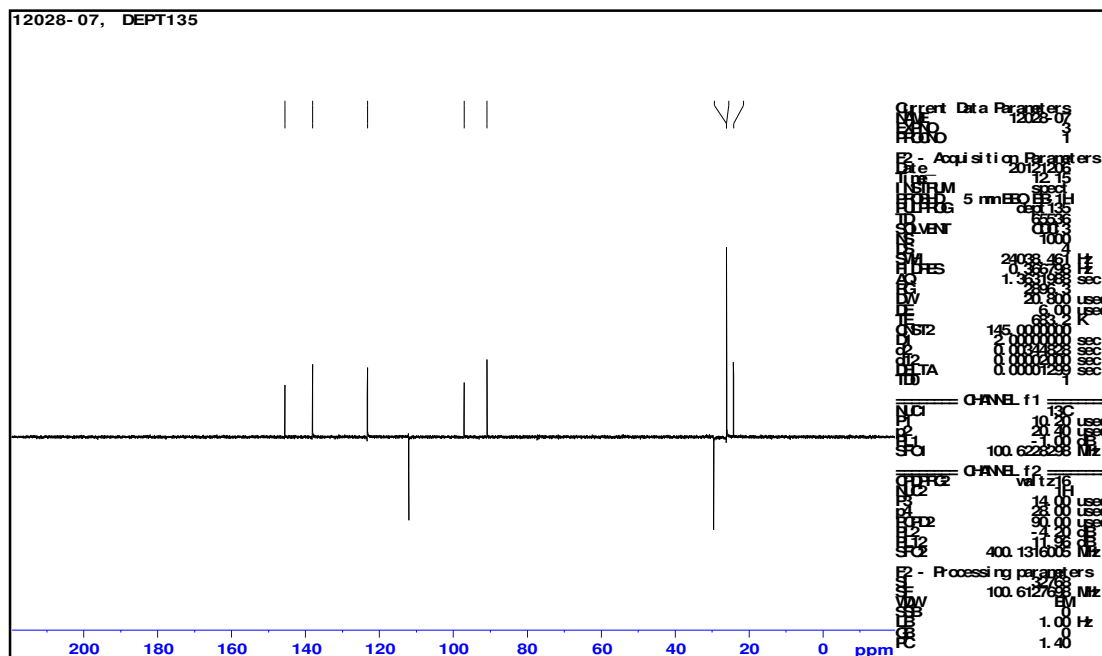
N-1. Espectro ¹H-RMN general del compuesto **C14**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



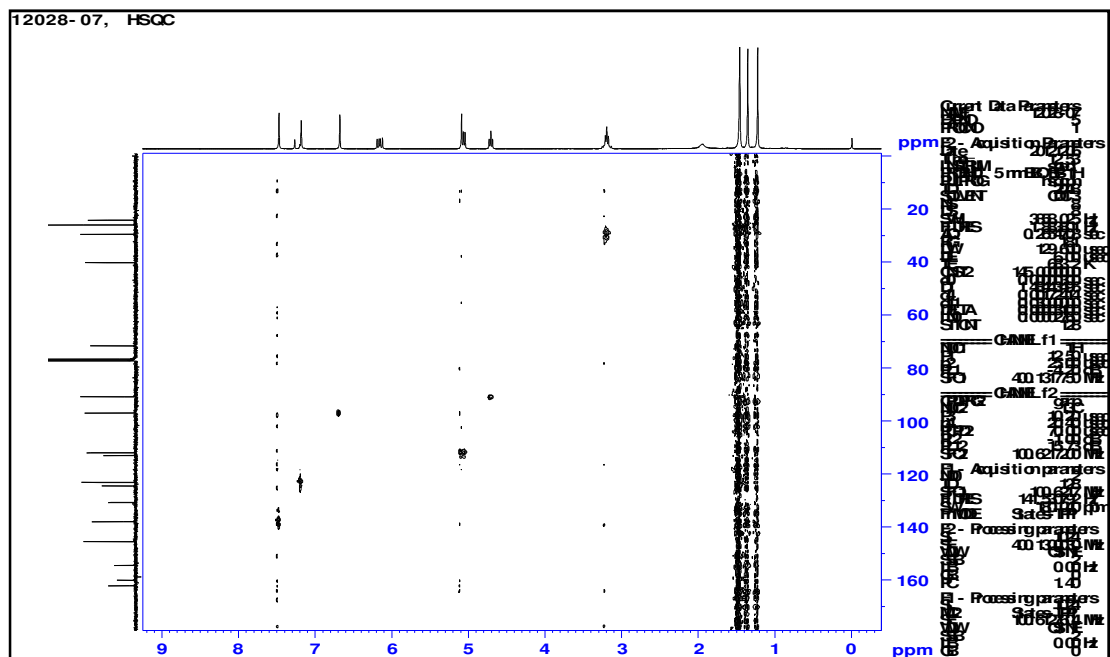
N-2. Ampliación de la zona 2.5-8.0 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto **C14**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



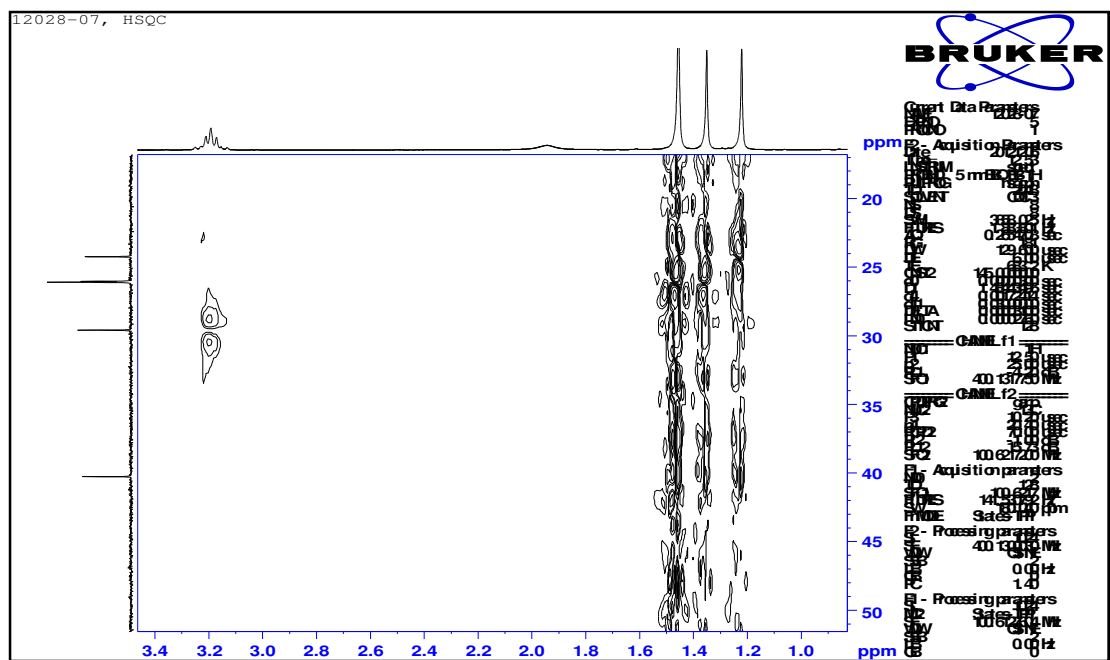
N-5. Espectro ¹³C-RMN general del compuesto **C14**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



N-6. Espectro DEPT135 del espectro ¹³C-RMN del compuesto **C14**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.

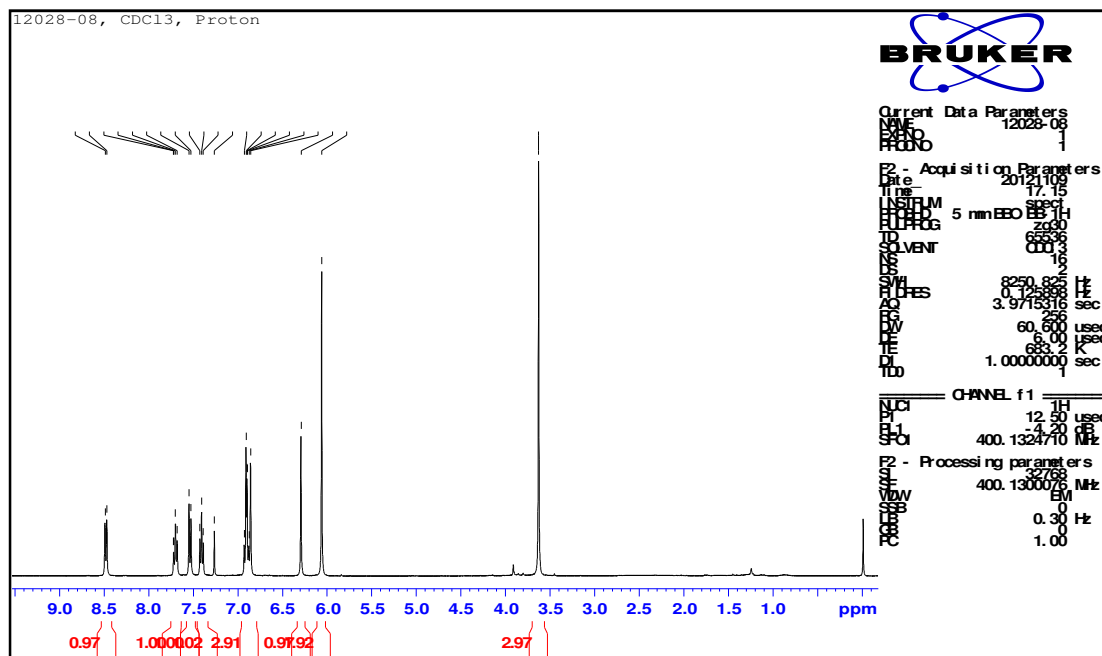


N-7. Espectro HSQC general del compuesto **C14**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

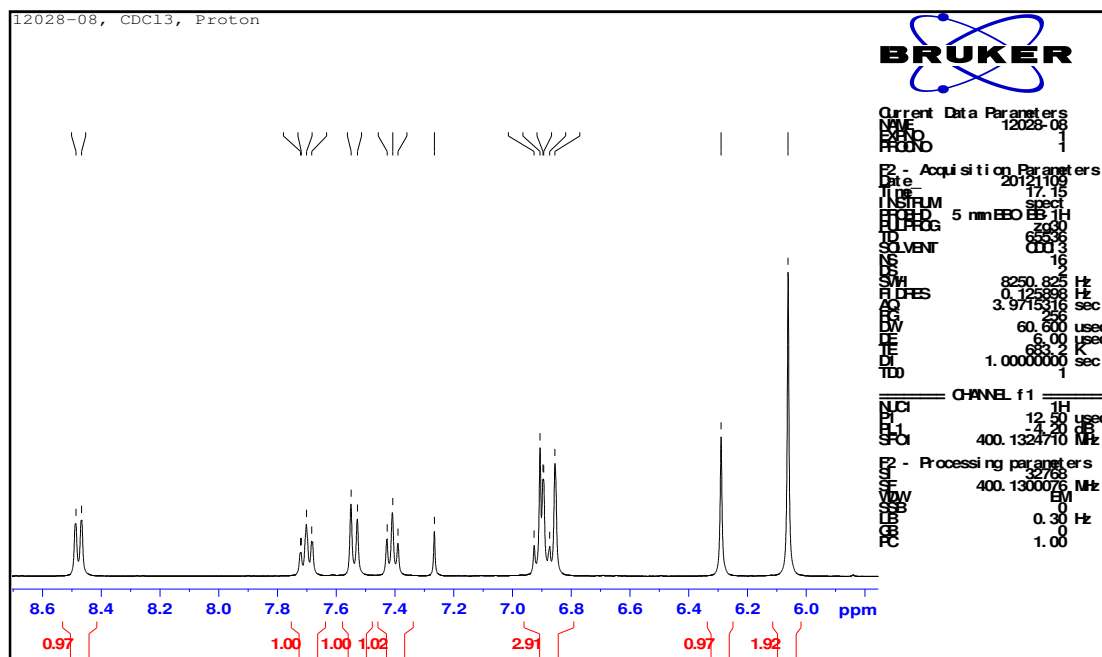


N-8. Ampliación del espectro HSQC (^1H : 1.0-3.4 ppm; ^{13}C : 15-50 ppm) del compuesto **C14**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

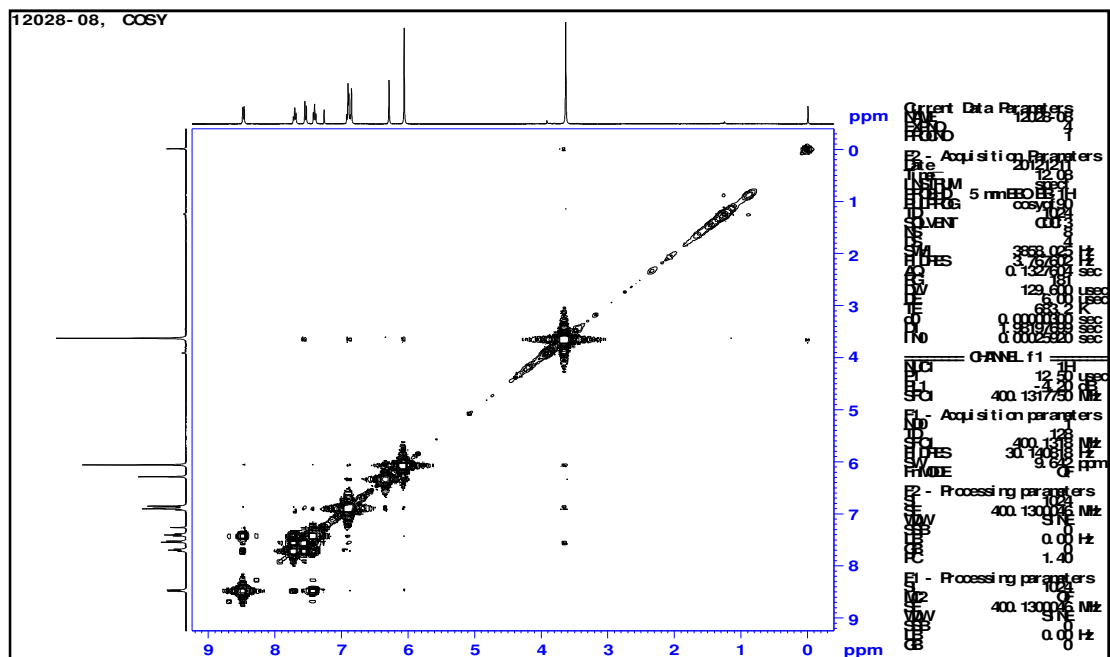
APENDICE M



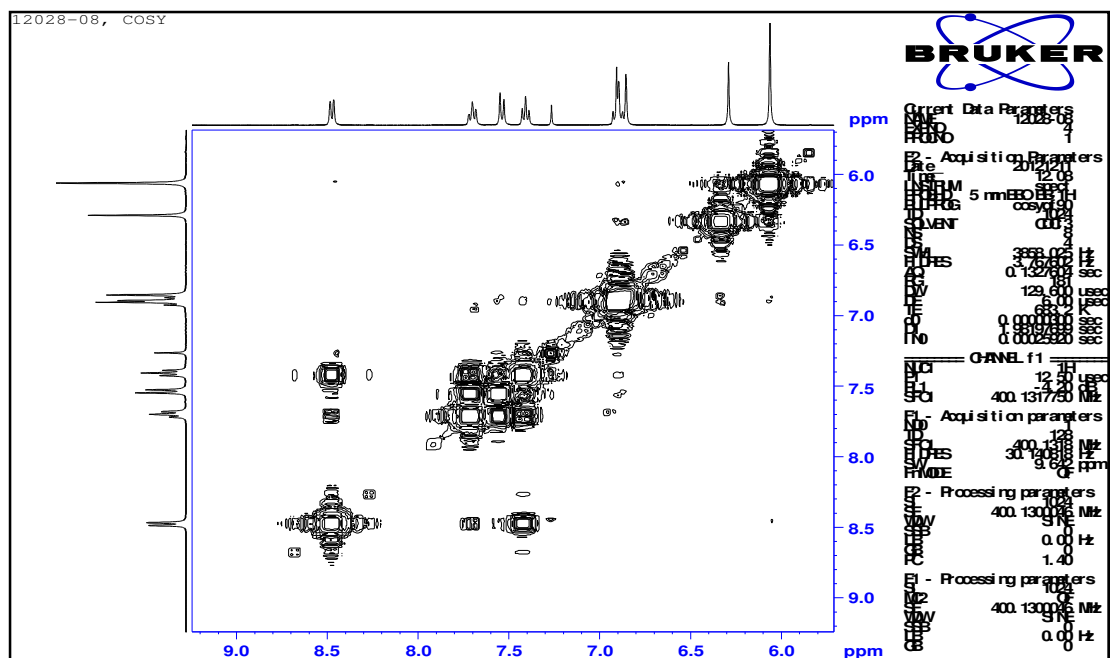
M-1. Espectro ¹H-RMN general del compuesto **C15**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



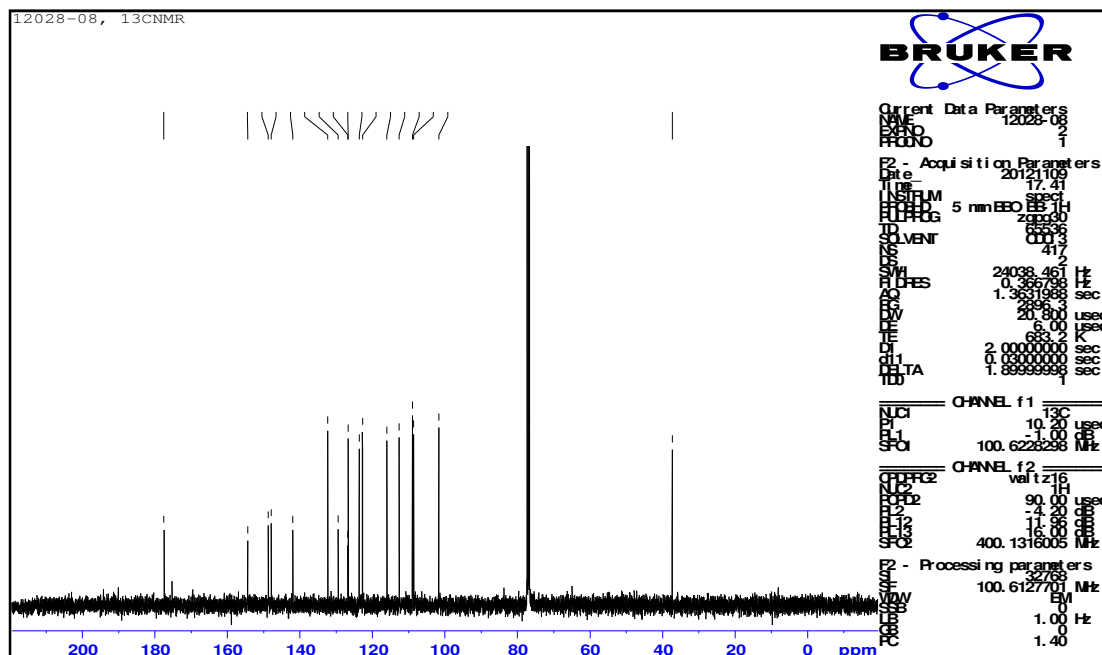
M-2. Ampliación de la zona 5.8-8.6 ppm del espectro ¹H-RMN del compuesto **C15**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl₃.



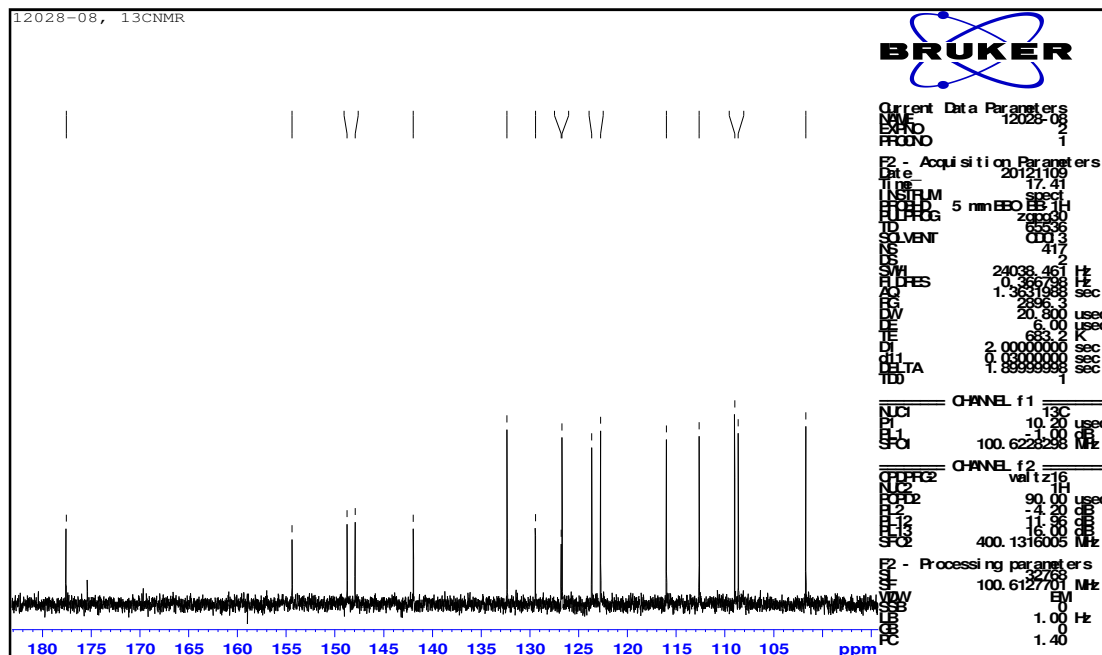
M-3. Espectro COSY general del compuesto **C15**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



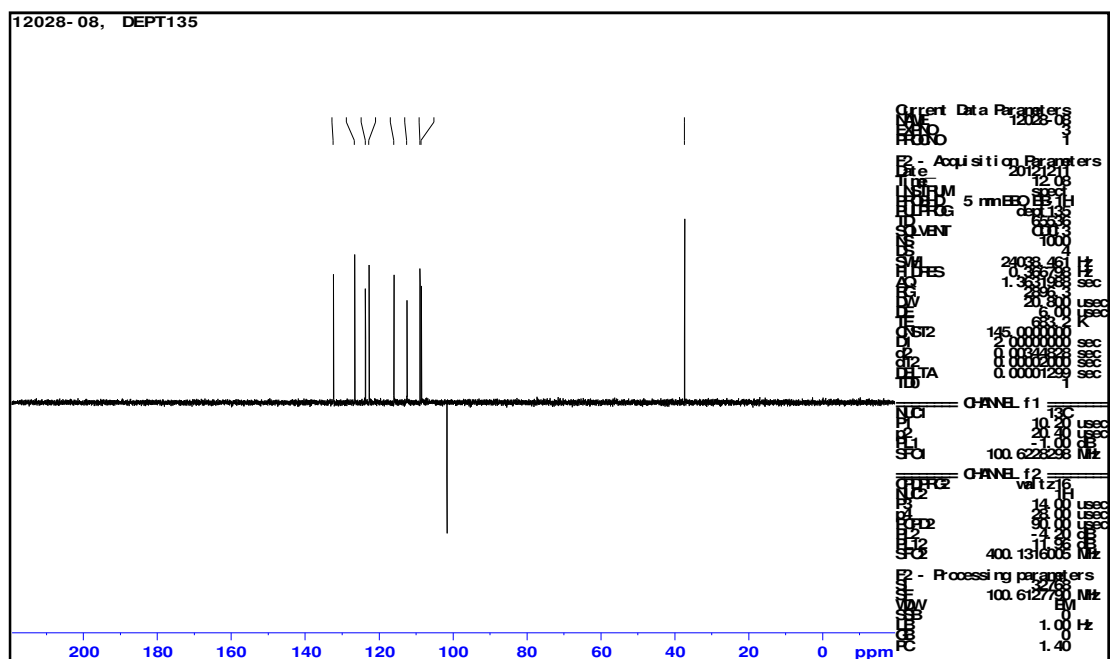
M-4. Ampliación de la zona (^1H : 6.0-8.0 ppm, ^1H : 5.6-8.0 ppm) del espectro COSY del compuesto **C15**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

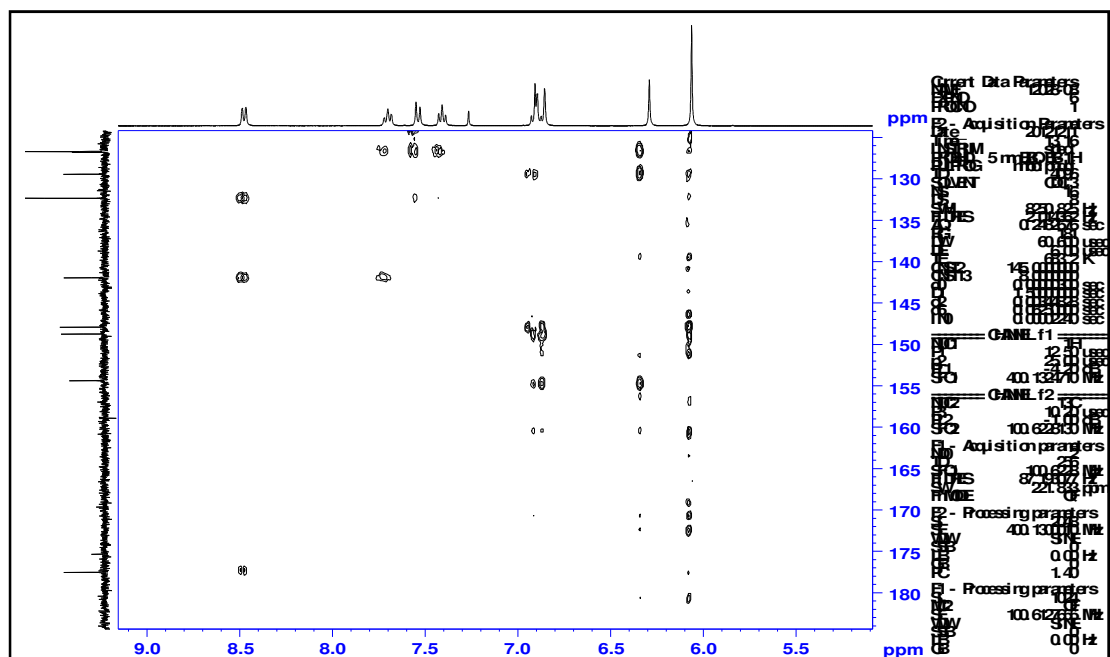


M-5. Espectro ^{13}C -RMN general del compuesto **C15**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .



M-6. Ampliación de la zona 95-180 ppm del espectro ^{13}C -RMN del compuesto **C15**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 100 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .





M-15 Ampliación del espectro HMBC (^1H : 5.0-9.1ppm; ^{13}C : 125-180 ppm) del compuesto **C15**. Obtenido mediante un Espectrómetro Bruker Modelo Avance DPX400, 9.4 Teslas. Frecuencia de Operación 400 MHz. Solvente de disolución CDCl_3 .

LITERATURA CITADA

Acero-Ortega C, Dorantes-Alvarez L, Hernández-Sánchez H, Gutierrez-López G, Aparicio G, Jaramillo-Flores ME. 2005. Evaluation of phenylpropanoids in ten *Capsicum annuum* L. varieties and their inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* Murray, Webb and Swann Scott A. *Food Science and Technology International* 11:5-10.

Adagu IS, Nolder D, Warhurst DC, Rossignol JF. 2002. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49:103-111.

Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, Tharakan ST, Sung B, Anand. 2008. Potential of spice-derived phytochemicals for cancer prevention. *Planta Medica* 74:1560-1569.

Alali FQ, Tawaha K, El-Elimat T, Syouf M, El-Fayad M, Abulaila K, Nielsen SJ, Wheaton WD, Falkinham JO, Oberlies NH. 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis* 21:1121-1131.

Ali MIK, Clark CG, Petri Jr WA. 2008. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infection, Genetics and Evolution* 8:698-707.

Amer MMA. 1993. Constituents of the aerial parts of *Marrubium vulgare* L. Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences 9:92-98.

Andrade-Cetto A, Cardenas RV. 2010. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. Journal of Ethnopharmacology 130:93-97.

Andrade-Cetto A, Wiedenfeld H. 2001. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 78:2-3.

Atanassova M, Georgieva S, Ivancheva K. 2011. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy 46:81-88.

Atta-ur-Rahman NS, Iqbal MC, Pir MS, Riaz KM. 1998. Isolation and structural studies on the chemical constituents of *Skimmia laureola*. Journal of Natural Products 61:71.

Bader A, Mosleh I. 2008. In vitro anti-amoebic and anti-giardial activity of some medicinal plants of the family Myrtaceae. Planta Medica 74.

Bandaranayake, WM. 2006. Quality control, screening, toxicity, and regulation of herbal drugs. In: Modern Phytomedicine, Ahmad I, Aquil F, Owais M. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, pp. 25-57.

Bansal D, Malla N, Mahajan RC. 2006. Drug resistance in amoebiasis. Indian journal Medicinal Reserch 123:115-118.

Bardai SE, Lyoussi B, Wibbo M, Morel N. 2001. Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrubium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rat. Clinical and Experimental Hypertension 23:329-343.

Bardai SE, Wibo M, Hamaide MC, Lyossi B, Quetin-Leclerq J, Morel N. 2003. Characterisation of marrubenol a diterpene extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker. *British Journal of Pharmacology* 140:1211-1216.

Beaver PC, Rodney CJ, Eddie WC. 2003. *Parasitología Clínica*. Masson Doyma: México, S. A. pp. 83-103.

Bendesky A, Menéndez D. 2001. Metronidazol: una visión integral. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 44:6.

Biavatti MW, Paulo CV, Fátima MGF da S, Joao BF, Sergio A. 2002. Triterpenoid constituents of *Raulinoa echinata*. *Journal of Natural Products* 65:562-565.

BDMTM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Disponible en el sitio <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php?mo=moe&nombre=botanico&action=bot> [Revisado el 15 de noviembre de 2012].

Biswas R, Dutta PK, Achari B, Bandyopadhyay D, Mishra M, Pramanik KC, Chatterjee TK. 2007. Isolation of pure compound R/J/3 from *Pluchea indica* (L.) Less. and its anti-amoebic activities against *Entamoeba histolytica*. *Phytomedicine* 14:534-537.

Bogucka-Kocka A. 1999. The analysis of furanocoumarins in fruits of *Heracleum sibiricum* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* 56:399-401.

Bork MBP, Schimitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. 1997. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kB. *FEBS Letters* 402:85-90.

Caballero-Salcedo A, Viveros-Rogel M, Salvatierra B, Tapia-Conver R, Sepúlveda Amor J, Gutiérrez G, Ortíz-Ortíz L. 1994. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 50:412-419.

^bCalzada F, Cedillo-Rivera R, Mata R. 2001. Antiprotozoal Activity of the constituents of *Conyza filaginoides*. Journal of Natural Products 64:671-673.

^aCalzada F, Cedillo-Rivera R, Bye R, Mata R. 2001. Geranins C and D, additional new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. Planta Medica 67:677-680.

^aCalzada F, Cerda-García-Rojas CM, Meckes M, Cedillo-Rivera R, Bye R, Mata R. 1999. Geranis A and B, New antiprotozoal A-type Proanthocyanidins from *Geranium niveum*. Journal of Natural Products 62:705-709.

^bCalzada F, Meckes M, Cedillo-Rivera R. 1999. Antiamoebic and anti giardial activity of plant flavonoids. Planta Medica 65:78-80.

Calzada F, Yépez-Mulia L, Aguilar A. 2006. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology 108:367-370.

Calzada F, Yépez-Mulia L, Tapia-Contreras A, Ortega A. 2009. Antiprotozoal and antibacterial properties of *Decachaeta incompta*. Revista Latinoamericana de Química 37:97-103.

^bCalzado-Flores C, Guajardo-Touche EM, Carranza-Rosales MP, Segura-Luna JJ. 1998. In vitro anti-trichomonid activity of *Castela texana*. Proceedings of the Western Pharmacology Society 41:173-174.

Calzado-Flores CC, Segura JJ, Rodriguez VM, Domínguez, XA. 1983. A new amebicide agent from *Castela texana*. Proceedings of the Western Pharmacology Society 26:431-434.

^aCalzado-Flores C, Verde-Star J, Lozano-Garza G, Segura-Luna JJ. 1998. Preliminary acute toxicological study of *Castela texana*. Proceedings of the Western Pharmacology Society 41:77-78.

Calzado-Flores C, Verde-Star J, Morales-Vallarta M, Segura-Luna JJ. 2000. Possible inhibition of *Entamoeba invadens* encystation by *Castela texana*. Archives of medical research 31:196-197.

Canadanovi-Brunet J, Cetkovi G, Djilas S, Tumbas V, Bogdanovi G, Mandi A, Markov S, Cvetkovi D, Canadanovi V. 2008. Radical Scavenging, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of *Melissa officinalis* L. Extracts. Journal of Medicinal Food 11:133-143.

Canales M, Hernández T, Serrano R, Hernández LB, Duran A, Ríos V, Sigrist S, Hernández HLH, García AM, Ángeles-López O, Fernández-Araiza MA, Ávila G. 2007. Antimicrobial and general toxicity activities of *Gymnosperma glutinosum*: A comparative study. Journal of Ethnopharmacology 110:343–347.

Cannell RJP. 1998. Natural Products Isolation. Humana Press: Totowa, New Jersey pp. 111-140, 209-216, 265-269.

Cantillo-Ciau Z, Moo-Puc R, Quijano L, Freile-Pelegrín Y. 2010. The tropical brown alga *Lobophora variegata*: a source of antiprotozoal compounds. Marine Drugs 8:1292-1304.

Cardona GW, Saez VJ. 2011. Antiprotozoal activity of α , β -unsaturated γ -lactones: promising compounds for the development of new therapeutic alternatives. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 10:671-680.

Carvalho IS, Cavaco T, Brodelius M. 2011. Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species. Industrial Crops and Products 33:382-388.

Castillo SL, Heredia N, Contreras JF, García S. 2011. Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence, and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Food Science 76:421-426.

Celeghini RM, Sousa IMO, Ana PS, Alexandre FR, Mary A. 2009. Development and validation of HPLC-IR for the determination of artemisin in *Artemia annua* L. *Quimica Nova* 32:875-878.

CENAVECE. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Secretaria de Salud México. Disponible en el sitio red: http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_informacion [Revisado el 17 de enero de 2010].

Chunyan C, Bo S, Ping I, Jingmei L, Ito Y. 2009. Isolation and purification of psoralen and bergapten from *Ficus carica* L. Leaves by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 32:136–143.

Claus MP, Sandoval-Ramirez J, Wright CW. 1999. Sesquiterpene lactones from *Neurolaena oaxacana*. *Journal of Natural Products* 62:1093-1095.

Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Camacho-Carranza R, Cardenas-Rodriguez N, Huerta-Gertrudis B, Medina-Campos ON, Mendoza-Cruz M, Delgado-Lamas G, Espinosa-Aguirre JJ. 2010. Antioxidant activity of *Heterotheca inuloides* extracts and of some of its metabolites. *Toxicology* 276:41-48.

Colegate SM, Molyneux RJ. 2008. Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination. CRC Press, Taylor & Francis Group: New York, pp. 41-54, 78-82.

Conde-Bonfil MC, Mora-Zerpa C. 1992. *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Publica de México* 34:3.

Constant HL, Cordell GA, West DP, Johnson JH. 1995. Separation and quantification of capsaicinoids. *Journal of Natural Products* 58:1925-1928.

Cox FEG. 2002. History of human parasitology. *Clinical Microbiology Reviews* 15:595-612.

Damian LMB, Martínez REM, Salgado RG, Martínez MMP. 2010. *In vitro* antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 9:136-142.

Damian-Badillo LM, Salgado-Garciglia R, Martínez-Muñoz R, Martínez-Pacheco MM. 2008. Antifungal properties of some mexican medicinal plants. *The Open Natural Products Journal* 1:27-33.

Dastmalchi K, Damien HJ, Oinonen PP, Darwis Y, Laakso I, Hiltunen R. 2008. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT-Food Science and Technology* 41:391-400.

Davila-Gutierrez CE, Velsquez C, Trujillo-Hernandez B, Huerta M. 2002. Nitazoxanide compared with quinifamide and mebendazole in the treatment of helminthic infections and intestinal protozoan in children. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 66:251-254.

De Marino S, Iorizzi M, Zollo F. 2008. Antioxidant activity and biological properties of phytochemicals in vegetables and spices (*Capsicum*, *Laurus*, *Foeniculum*). *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7:3174-3177.

Delgado G, Olivares MS, Chávez, MI, Ramirez-Apan T, Linares E, Bye R, Espinosa-Garcia FJ. 2001. Antiinflammatory Constituents from *Heterotheca inuloides*. *Journal of Natural Products* 64:861-864.

Diaz C, Quesada S, Brenes O, Aguilar G, Ciccio JF. 2008. Chemical composition of *Schinus molle* essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. *Natural Product Research* 22:1521-1534.

Dikshit A, Naqvi, AA, Husain A. 1986. *Schinus molle*: a new source of natural fungitoxicant. *Applied and Environmental Microbiology* 51:1085-1088.

Domergue F, Helms GL, Prusky D, Browse J. 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. *Phytochemistry* 54: 183-189.

Dominguez XA, Torre B. 1974. Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 13:1624-1625.

Dou J, Khan IA, McChesney JD, Sindelar RD, Goins DK, Walker LA. 1996. A new quassinoid from *Castela texana*. *Journal of Natural Products* 59:73-76.

Dzido TH, Tuzimski T. 2008. Chambers, Sample Application and Chromatogram Development. In: *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J and Kowalska T. (eds.). CRC Press: Boca Ratón, Florida, pp. 119-168

El-Beih FK, El-Tawil BAH, Baghlaf AO. 1981. Constituents of local plants, Part 12. Coumarin and chalepentin, a further constituents of *Ruta chalepensis* L. *Journal Chinese Chemical Society* 28 237-238.

Ellingboe J, Nyström E, Sjövall J. 1970. Liquid-gel chromatography on lipophilic-hydrophobic Sephadex derivatives. *Journal of Lipid Research* 11:266-273.

Emam AM, Swelam ES, Megally NY. 2009. Furocoumarin and quinolone alkaloid with larvicidal and antifeedant activities isolated from *Ruta chalepensis* leaves. *Journal of Natural Products* 2:10-22.

Ezmerly ST, Wilson SR. 1980. Saudi Arabian medicinal plants I: *Ruta chaepensis*. *Journal of Chemical Society Pakistan* 2:55-57.

Ferrero AA, Werdin GJO, Sanchez CC. 2006. Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia* 77:381-383.

Ferrero AA, Chopra CS, Gonzalez JOW, Alzogaray RA. 2007. Repellence and toxicity of *Schinus molle* extracts on *Blattella germanica*. *Fitoterapia* 78:311-314.

Frayha GJ, Smyth JD, Gobert G, Savel J. 1997. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen. Pharmac.* 28:273-299.

Fumiko A, Shinya N, Tatsuo Y, Hikaru O, Jun M, Hiroo H, Hiroshige A, Abigail A, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R. 2002. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Gauco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25:1188-1191.

Gbolade AA, Lockwood GB. 1989. The constituents of *Melissa officinalis* cell cultures. *Planta Medica* 55:228.

González CR, Isibasi A, Navarrete OV, Paniagua J, García JA, Ramírez A, Salvatierra B, Tapia R, Sepulveda J, Guitierrez G, Kumate J. 1995. Prevalence of antibodies against *Entamoeba histolytica* in Mexico measured by ELISA. *Epidemiology Infection* 115:535-543.

González MJ, Marioli JM. 2010. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology* 104:209-213.

González-Salazar F, Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villareal J. 2009. Sensibilidad de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* a ivermectina. *Medicina* 69:318-320.

Gross JH. 2004. Mass spectrometry. A Textbook. Springer: Heidelberg, Alemania, pp. 1-10.

Guil-Guerrero JL, Martinez-Guirado C, Reboloso-Fuentes MM, Carrique-Perez A. 2006. Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. *European Food Research and Technology* 224:1-9.

Harvey AL, Cree IA. 2010. High-Throughput Screening of Natural Products for Cancer Therapy. *Planta Medica* 76:1080-1086.

Hasegawa H. 2007. Augmentation by palo azul of plasma adiponectin levels in humans. *Food Style* 21:60-61.

Heluani CS, Margarita de BV, Catalan CAN, Diaz JG, Gedris TE, Herz W. 1997. Triterpenes and sesquiterpene lactones from *Cyclolepis genistoides*. *Phytochemistry* 45:801-805.

Heredia N, Escobar M, Rodríguez-Padilla C, García S. 2005. Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesión of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Journal of Food Protection* 68:1346-1351.

Hernández GME. 2006. Implementación de una nueva técnica para la determinación de la sensibilidad a drogas para *Entamoeba histolytica*. Tesis (MC). Universidad Autónoma de Nuevo León.

Ikramov MT, Khazanovich RL, Khalmatov KK. 1969. D-manitol from *eryngium coeruleum* and *Eryngium macrocalix*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 5:590.

^aIkramov MT, Bandyukova VA, Khalmatou KK. 1971. Flavonoids of some species of *Eryngium*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 1:117-118.

^bIkramov MT, Khazanovich RL, Khalmatov KK. 1971. The saponins of two species of *Eryngium*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 6:843.

Ikramov MT, Goryaev MI, Sharipova FS, Khaanovich RL, Khalmatov KK. 1973. Investigation of the essential oil from the fruit of *Eryngium octophyllum*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 5:675-676.

Intekhab J, Aslam M. 2009. Constituents from *Feronia limonia*. *Analele Universității din București* 18:95-101.

Iorizzi M, Lanzotti V, De Marino S, Zollo F, Blanco-Molina M, Macho A, Muñoz E. 2001. New glycosides from *Capsicum annuum* L. Var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2022-2029.

Izabela F, Sebastian T. 2007. Determination of water-soluble polyphenolic compounds in commercial herbal teas from Lamiaceae: Peppermint, Melissa, and Sage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55:10908–10917.

Jae SK, Park SJ. 2006. Composition for inhibiting activity of dipeptidyl peptidase-iv and lowering blood glucose level comprising at least one plant extract selected from *Piper longum*, *Marrubium vulgare* and *Oryzae radix*. Korean patent application 2006084087 A. 2005-01-17. July 2006 Natural Endotech Co., Ltd., S. Korea.

Jang-Hee C, Chi-Hoon L, Hoi-Seon L. 2005. Antimicrobial activity of quinoline derivatives isolated from *Ruta chalepensis* toward human intestinal bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15:646-651.

Jang HW, Ka MH, Lee KG. 2008. Antioxidant activity and characterization of volatile extracts of *Capsicum annuum* L. and *Allium spp.* *Flavour and Fragrance Journal* 23:178-184.

Jerga C, Merfort I, Willuhn G. 1990. Flavanoidglykoside und andere hydrophile Inhaltsstoffe aus den Blüten von *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* 56:413-415.

Jiménez-Arellanes A, Luna-Herrera J, Ruiz-Nicolás R, Cornejo-Garrido J, Tapia A, Yépez-Mulia L. 2013. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13:109.

Kandil FE, El-Sayed NH, Micheal HN, Ishak MS, Mabry TJ. 1996. Gallotannins and flavonoids from *Haematoxylon campechianum*. *Phytochemistry* 42:1243-1245.

Kashman Y, Neeman I, Lifshitz A. 1969. Six new C17-olefinic and acetylenic oxygenated compounds from avocado pear. *Israel Journal of Chemistry* 7:173-176.

Kawaguchi Y, Ochi T, Takaishi Y, Kawazoe K, Lee KH. 2004. New sesquiterpenes from *Capsicum annuum*. *Journal of Natural Products* 67:1893-1896.

Kim OK, Murakami A, Nakamura Y, Takeda N, Yoshizumi H, Ohigashi H. 2000. Novel nitric oxide and superoxide generation inhibitors, persenone A and B, from avocado fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:1557-1563.

Klayman DL, Acton NAL, Scovill JP, Hoch JM, Milhous WK, Theoharides AD. 1984. Isolation of artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *Journal of Natural Products* 47:715-717.

Knöss W, Zapp J. 1998. Accumulation of furanic labdane diterpenes in *Marrubium vulgare* and *Leonurus cardiaca*. *Planta Medica* 64:357-361.

Kobata K, Sutoh K, Todo T, Yazawa S, Iwai K, Watanabe T. 1999. Nordihydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annuum*. *Journal of Natural Products* 62:335-336.

Koyama J, Toyokuni I, Tagahara K. 1999. Synthesis of 2-arylquinoline and 2-aryl-4-quinolone alkaloids *via* diels-alder reaction of 1,2,3-benzotriazine with enamines. *Chemical Pharmacology Bulletin* 47:1038-1039.

Kubo I, Chaudhuri SK, Kubo Y, Sanchez Y, Ogura T, Saito T, Ishikawa H, Haraguchi H. 1996. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterothea inuloides*. *Planta Medica* 62:427-430.

Kubo I, Muroi H, Kubo A, Chaudhuri SK, Sanchez Y, Ogura T. 1994. Antimicrobial agents from *Heterotheca inuloides*. *Planta Medica* 60:218-221.

Kuku A, Odekanyin O, Adeniran K, Adewusi M, Olonade T. 2009. Purification of a mannose/glucose-specific lectin with antifungal activity from pepper seeds (*Capsicum annuum*). *African Journal of Biochemistry Research* 3:272-278.

Lara-Díaz VJ, Gaytán-Ramos AA, Dávalos-Balderas AJ, Santos-Guzmán J, Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, Barbosa-Quintana A, Sanson M, López-Reyes AG, Moreno-Cuevas JE. 2009. Microbiological and toxicological effects of perla black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Extracts: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Basic & Clinical Pharmacology & toxicology* 104:81-86.

Lee SH, Lee MY, Kang HM, Han DC, Son KH, Yang DC, Sung ND, Lee CW, Kim HM, Kwon BM. 2003. Antitumor activity of the farnesyl-protein transferase inhibitors arteminolides, isolated from Artemisa. *Bioorganic & medicinal chemistry* 11:4545-4549.

Lehr GJ, Barry T, Franolic JD, Petzinger G, Scheiner P. 2003. LC determination of impurities in methoxsalen drug substance: isolation and identification of isopimpinellin as a major impurity by atmospheric pressure chemical ionization LC/MS and NMR. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 33:627-637.

Liu YL, Mabry TJ. 1982. Flavonoids from *Artemisia ludoviciana* var. *ludoviciana*. *Phytochemistry* 21:209-214.

Lohia A, Dutta PK, Manna D. 2008. Novel compounds from *Oxalis corniculata* that kill *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* and process for isolating, purifying and characterizing the same. Indian patent application 20081226 A. 2008-12-26. September 2008 Bose Institute, Indian Institute of Chemical Biology.

Lopes-Lutz D, Alviano DS, Alviano CS, Kolodziejczyk PP. 2008. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry* 69:1732-1738.

López JA, Wagner B. 1997. Granulisin, a new chromone from *Galipea granulose*. Journal of Natural Products 60:24-26.

Malatyali E, Tepe B, Degerli S, Berk S. 2011. *In vitro* amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Parasitology Research 110:2175-2180.

Maldonado E, Segura-Correa, Ortiga A, Calderón J, Fronczeck F. 1994. *Ent*-Labdane and *Neo*-clerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. Phytochemistry 35:721-724.

Maldonado-López Y, Linares-Mazari E, Bye R, Delgado G, Espinosa-Garcia FJ. 2008. Mexican arnica anti-inflammatory action: plant age is correlated with the concentration of anti-inflammatory sesquiterpenes in the medicinal plant *Heterotheca inuloides* Cass. (Asteraceae). Economic Botany 62:161-170.

Manna D, Dutta PK, Achari B, Lohia A. 2010. A novel galacto-glycerolipid from *Oxalis corniculata* kills *Entamoeba histolytica* and *G. lamblia*. Antimicrobial agents and chemotherapy 54:4825-4832.

Manotti LAM, Tiripicchio A, Tiripicchio CM, Scapini G. 1975. Methyl ester of (13,14,17,20S,24Z)-3-oxolanosta-8,24-dien-26-oic acid C₃₁H₄₈O₃. Crystal Structure Communications 4:551-556.

^bMaoka T, Fujiwara Y, Hashimoto K, Akimoto N. 2001. Isolation of a series of apocarotenoids from the fruits of the red paprika *Capsicum annuum* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49:1601-1606.

^aMaoka T, Goto Y, Isobe K, Fujiwara Y, Hashimoto K, Mochida K. 2001. Antioxidative activity of capsorubin and related compounds from paprika (*Capsicum annuum*). Journal of Oleo Science 50:663-665.

Martínez, M. 1959. Las Plantas Medicinales de México. 4^a Ed., México.

Martínez, M. 1994. Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica: México, pp. 32,117, 679.

Martin-Nizard F, Sahpaz S, Kandoussi A, Carpentier M, Jean-Charles F, Duriez P, Bailleul F. 2004. Natural phenylpropanoids inhibit lipoprotein-induced endothelin-1 secretion by endothelial cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56:1607-1611.

Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, Gonzáles-Salazar F, Palacios-Corona R, Said-Fernández S. 2008. A new vial microassay to screen antiprotozoal drugs. *Pharmacologyonline* 1:529-537.

Materska M, Perucka I. 2005. Antioxidant Activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1750-1756.

McChesney JD, Dou J, Sindelar RD, Goins DK, Walker LA, Rogers RD. 1997. Tirucallane-type triterpenoids: NMR and x-ray diffraction analyses of 24-epi-piscidinol A and piscidinol A. *Journal of Chemical Crystallography* 27:283-290.

Mikus J, Harkenthal M, Steverding D, Reichling J. 2000. *In vitro* effects of essential oil and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Medica* 66:366-368.

Miyakado M, Ohno N, Yoshioka H. 1974. Gymnospermin: a new labdan triol from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry* 13:189-190.

Moo-Puc RE, Mena-Rejon GJ, Quijano L, Cedillo-Rivera R. 2007. Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. *Journal of Ethnopharmacology* 112:415-416.

Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 53:143-147.

Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as a source of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* 75:311-335.

Nigenda G, Mora-Flores G, Aldama-López S, Orozco-Núñez BA. 2001. La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. *Salud Pública de México* 4:41-51.

Ochi T, Takaishi Y, Kogure K, Yamauti I. 2003. Antioxidant activity of a new capsaicin derivative from *Capsicum annuum*. *Journal of Natural Products* 66:1094-1096.

Ogura T, Sanchez MY, Kubo I. 2002. Antiinflammatory and analgesic agent. Japanese patent application WO 2001-JP5485. 2002-01-17. Kansai Technology Licensing Organization Co., Ltd., Japan.

Oliveira FM, Santana AEG, Conserva LM, Maia JGS, Guilhon GMP. 1996. Alkaloids and coumarins from *Esenbeckia* species. *Phytochemistry* 41:647-649.

Ōmura S. 2008. Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31:91-98.

Ono M, Yamashita M, Mori K, Masuoka C, Eto M, Kinjo J, Ikeda T, Yoshimitsu H, Nohara T. 2008. Sesquiterpenoids, triterpenoids, and flavonoids from the fruits of *Schinus molle*. *Food Science and Technology Research* 14:499-508.

Padin EV, Pose GN, Pollio ML. 2007. Antibacterial activity of oleoresin from Aguaribay (*Schinus molle* L.). *Journal of Food Technology* 5:5-8.

Palá-Paúl J, Brophy JJ, Pérez-Alonso MJ, Usano J, Soria SC. 2007. Essential oil composition of the different parts of *Eryngium corniculatum* Lam. (Apiaceae) from Spain. *Journal of Chromatography A* 1175:289-293.

Pavão F, Castilho MS, Pupo MT, Dias RLA, Correa AG, Fernandes JB, da Silva MFGF, Mafezoli J, Vieira PC, Oliva G. 2002. Structure of *Trypanosoma cruzi*

glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. FEBS Letters 520:13-17.

Pérez-Castorena AL, Ruth FO, Alma RV, Mahinda M, Emma M. 2006. Labdanes and Withanolides from *Physalis coztomatl*. Journal of Natural Products 69:1029-1033.

Pérez-Guerrero C, Herrera MD, Ortiz R, Álvarez de SM, Fernández MA. 2001. A pharmacological study of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extract. Journal of Ethnopharmacology 76:279-284.

Pinilla AE, López MC, Viasus DF. 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. Revista Médica Chilena 136:118-124.

Ponce-Macotela M, Navarro-Alegria I, Martínez-Gordillo MN, Alvarez-Chacón R. 1994. *In vitro* effect against Giardia of 14 plant extracts. Revista de Investigación Clínica 46:343-347.

Ramos F, Moran P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, García LMC, Melendro EI, Valadez A, Ximénez C. 2005. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. American Journal Tropical Medicine and Hygiene 73:87-91.

Reid RG, Sarker SD. 2006. Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography. In: Methods in Biotechnology, Vol. 20, Natural Products Isolation, Second edition; Sarker SD, Latif Z and Gray AI. (eds.). Humana Press: Totowa, New Jersey, pp. 117-157.

Revilla-Monsalve MaC, Andrade-Cetto A, Palomino-Goribay MA, Wiedenfeld H, Islas-Andrade S. 2007. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients. Journal of Ethnopharmacology 111:636-640.

Reyes-Lopez M, Villa-Trevino S, Arriaga-Alba M, Aleman-Lazarini L, Rodriguez-Mendiola M, Arias-Castro C, Fattel-Fazenda S, Garza M. 2005. The amoebicidal

aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. *Toxicology in Vitro* 19:91-97.

Rigano D, Formisano C, Basile A, Lavitola A, Senatore F, Rosselli S, Bruno M. 2007. Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *Libanoticum*. *Phytotherapy Research* 21:395-397.

Rivero-Cruz JF. 2008. Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology* 119:99-103.

Rodríguez CA, Savi AOS, Schlemper V, Reynaud F, Cechinel-Filho V. 1998. An improved extraction of marrubiin from *Marrubium vulgare*. *Chromatographia* 47:449-450.

Romero-Caballero R, Robert-Guerrero L, Martínez-Barbosa I, Vazquez-Tsuji O, Ruiz-Sánchez D, Tay-Zavala J, Sánchez-Vega JT, Calderon-Romero L. 2005. Evaluation of the efficacy and security of quinifamide administered in a single dose of 300 mg in adult patients with intestinal amebiasis. *Parasitología Latinoamericana* 60:57-60.

Ruiz-Cancino A, Cano AE, Delgado G. 1993. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *Mexicana*. *Phytochemistry* 33:1113-1115.

Said FS, Ramos GMC, Mata CBD, Vargas VJ, Villarreal TL. 2005. *In vitro* antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. *Fitoterapia* 76 466-468.

Saleh MM, Glombitza KW. 1989. Volatile oil of *Marrubium vulgare* and its anti-schistosomal activity. *Planta Medica* 55:105.

Sánchez E, García S, Heredia N. 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholera*. *Applied and Environmental Microbiology* 76:6888-6894.

Sanchez-Marroquin, A, Garcia L, Mendez M. 1958. Brazilin, antibacterial substance from *Haematoxylon brasiletto*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 1:225-232.

Samarawickrema NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P. 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 40: 833-840.

Samie A, Housein A, Lall N, Meyer JJM. 2009. Crude extracts of, and purified compounds from, *Pterocarpus angolensis*, and the essential oil of *Lippia javanica*, their in-vitro cytotoxicities and activities against selected bacterial and *Entamoeba histolytica*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 103:427-439.

Sarer E, Kökdil G. 1991. Constituents of the essential oil from *Melissa officinalis*. *Planta Medica* 57:89-90.

Secretaria de Salud. 2007. Programa de Acción Específico 2007-2012 Medicina Tradicional y Sistemas Complementarios de Atención a la Salud. México: Secretaria de Salud, México.

Segura L, Freixa B, Ringbom T, Vila R, Perera P, Adzel T, Bohlin L, Cañigüeral S. 2000. Anti-inflammatory activity of dichloromethane extract of *Heterotheca inuloides* in vivo and in vitro. *Planta Medica* 66:553-555.

Seidel V. 2006. Initial and Bulk extraction. In: *Methods in Biotechnology*, Vol. 20, Natural Products Isolation, Second edition; Sarker SD, Latif Z and Gray AI. (eds.). Humana Press: Totowa, New Jersey, pp. 27-46

Shah V, Sunder R, Souza NJ. 1987. Chonemorphine and rapanone-antiparasitic agents from plant sources. *Journal of Natural Products* 50:730-731.

Silvesrstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. 2005. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons, Inc: New York, pp. 1-13, 117-176

Sosa A, Fusco MR, Rossomando P, Juárez, A, Robles S, Petenatti, E Pelzer, L. 2011. Anti-inflammatory properties from isolated compounds of *Cyclolepis genistoides*. *Pharmaceutical Biology* 49:675-678.

Spainhour CB. 2005. Natural Products. In: *Drug Discovery Handbook*; Gad SC (ed.). John Wiley & Sons Inc.: USA, pp 11-72.

Stermitz FR, Scriven LN, Tegos G, Lewis K. 2002. Two flavonols from *Artemisa annua* which potentiate the activity of berberine and norfloxacin against a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Planta Medica* 68:1140-1141.

Stipanovic RD, Puckhaber LS. 2004. Identification of (+)-3-hydroxy- β -calacorene. In: *Cotton and kenaf. Proceedings - Beltwide Cotton Conferences*. Southern Plains Agricultural Research Center: Learned Information, 2176-2180.

Sülsen VP, Frank FM, Cazorla SI, Anesini CA, Malchiodi EL, Freixa B, Vila R, Muschietti LV, Martino VS. 2008. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52:2415–2419.

Sülsen V, Güida C, Coussio J, Paveto C, Muschietti L, Martino V. 2006. In vitro evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitology Research* 98:370-374.

Tagashira M, Ohtake Y. 1998. A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta Medica* 64:555-558.

Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P. 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:1352-1364.

Tian-Shung W, Li-Shian S, Jhi-Joung W, Song-Chou I, Hsien-Chang C, Yuh-Pan C, Yao-Haur K, Ya-Ling C, Che-Ming T. 2003. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. *Journal of the Chinese Chemical Society* 50:171-178.

Ulubelen A, Terem B, Tuzlaci E, Cheng KF, Kong YC. 1986. Alkaloids and coumarins from *Ruta chalepensis*. *Phytochemistry* 25:2692-2693.

Ventura PA, Solange LC. 2009. The Trypanocidal Activity of Naphtoquinones: A Review. *Molecules* 14:4570-4590.

Vera-Ku M, Méndez-González M, Moo-Puc R, Rosado-Vallado M, Simá-Polanco P, Cedillo-Rivera R, Peraza-Sánchez SR. 2010. Medicinal potions used against infectious bowel diseases in Mayan traditional medicine. *Jornal of Ethnopharmacology* 132:303-308.

Villagómez-Ibarra JR, Sánchez M, Espejo O, Zúñiga-Estrada A, Torres-Valencia JM, Joseph-Nathan P. 2001. Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. *Fitoterapia* 72:692-694.

Wang G, Zhou Z, Cheng C, Yao J, Yang Z. 2008. Osthol and isopimpinellin from *Fructus cnidii* for the control of *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. *Veterinary Parasitology* 158:144–151.

Weel KGC, Venskutonis PR, Pukalskas A, Gruzdiene D, Linssen JPH. 1999. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare*) grown in Lithuania. *Wiley-VCH Verlag GmbH* 101:395-400.

Wink M. 2012. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules* 17:12771-12791.

Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. 2007. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México* 23:398-407.

Yang QY, Tian XY, Fang WS. 2007. Bioactive coumarins from *Boenninghausenia sessilicarpa*. Journal of Asian Natural Products Research 9:59-65

Yu S, Fang N, Mabry TJ. 1988. Flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. Phytochemistry 27:171-177.

Yueqin Z, Recio MC, Manez SG, Rosa M, Cerda-Nicolas M, Rios J. 2003. Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-inflammatory activity from *Schinus molle* fruits. Planta Medica 69:893-898.

Yukizaki C, Sakai M, Kosaka T, Dozono M, Sakono M, Fukuda N. 2008. Effects of drying temperature on antioxidant activity of lemon balm (*Melissa officinalis*) leaves. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 55:293-298.

Zarai Z, Kadri A, Chobba IB, Mansour RB, Bekir A, mejdoub H, Gharsallah N. 2011. The *in-vitro* evaluation of antibacterial, antifungal, and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. Lipids in Health and Disease 10:161.

Zavala-Sánchez MA, Pérez-Gutiérrez S, Pérez-González C, Sánchez-Saldivar D, Arias-García L. 2002. Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. Pharmaceutical Biology 40:263-268.

Zerpa R, Náquira C, Espinoza Y. 2007. Una nueva visión de *Entamoeba histolytica*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica 24:190-192.