

302827
14
20j



Universidad Motolinia A.C.

ESCUELA DE QUIMICA

CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

**ESTUDIO QUIMICOY PRUEBAS
FARMACOLOGICAS PRELIMINARES
DE LA CORTEZA DE
ZANTHOXYLUM LIEBMANIARUN
(COLOPATHLE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

MARGOT ROCIO LOPEZ ULACIO

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis papás, hermanos y sobrinos, por estar junto a mi en todo momento .

A Carla, a Pame y a ti Carlos por darme la fuerza para culminar este trabajo .

A mis amigos, por su colaboración desinteresada y palabras de aliento .

A mis maestros y sinodales por sus enseñanzas .

INDICE

| | Página |
|--|-----------|
| CAPITULO I | |
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1. Planteamiento del problema | 6 |
| 1.2. Objetivos | 6 |
| 1.3. Hipótesis | 7 |
| CAPITULO II | |
| 2. ANTECEDENTES | 8 |
| 2.1. La Amibiasis | 8 |
| 2.2. Generalidades de la Familia | 13 |
| 2.3. Generalidades del Género | 14 |
| 2.4. Generalidades de la Especie <u>Zanthoxylum liebmanniarum</u> | 19 |
| 2.5. Cromatografía: Generalidades e Identificación | 26 |
| CAPITULO III | |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL | 33 |
| 3.1. Diagrama General | 33 |
| 3.1.1. Extracción | 34 |
| 3.1.2. Análisis Fitoquímico Preliminar | 35 |
| 3.1.3. Fraccionamiento Preliminar del Extracto Hexánico | 36 |
| 3.1.4. Determinación del Efecto Amebicida de un Extracto Hexánico sobre <u>Entamoeba histolytica</u> en un medio axénico | 37 |
| 3.2. Material, Reactivos y Equipo | 38 |

| | Página |
|---|--------|
| 3.2.1. Material Vegetal | 38 |
| 3.2.2. Material Biológico | 38 |
| 3.2.3. Material de Laboratorio | 38 |
| 3.2.4. Reactivos | 40 |
| 3.2.5. Equipos | 42 |
| 3.3. Metodología | 43 |
| 3.3.1. Extracción | 43 |
| 3.3.2. Análisis Fitoquímico Preliminar | 43 |
| 3.3.3. Fraccionamiento Preliminar del Extracto Hexánico | 44 |
| 3.3.4. Pruebas Farmacológicas Preliminar | 45 |
| CAPITULO IV | |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSION | 47 |
| 4.1. Resultados | 47 |
| 4.1.1. Resultados de la Extracción con Hexano | 47 |
| 4.1.2. Resultados del Análisis Fitoquímico Preliminar | 48 |
| 4.1.3. Resultados del Fraccionamiento Preliminar del Extracto Hexánico | 50 |
| 4.1.4. Resultados del Efecto del Residuo del Fraccionamiento Hexánico sobre <u>Entamoeba Histolytica</u> en medio Axénico | 51 |
| 4.2. Discusión | 52 |
| CAPITULO V | |
| 5. CONCLUSIONES | 54 |
| BIBLIOGRAFIA | 55 |
| APENDICE | 60 |
| GLOSARIO | 65 |

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N

Los problemas de salud en México son los propios de los países en desarrollo, generados principalmente por enfermedades infecciosas y/o parasitarias, la desnutrición, la deficiencia de higiene y la limitación de los servicios de salud a un porcentaje mínimo de la población. Si sumamos a esto, el elevado costo de los medicamentos, entre otras causas, por la falta de una industria farmacológica propia y el uso inadecuado de los recursos existentes, en conjunto se forma un panorama crítico de la salud en México. (10, 21, 34)

Tomando en cuenta lo anterior, se hace evidente la necesidad de encontrar alternativas, en varias direcciones, para mejorar los problemas de salud en México. En este sentido la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) en su tratado de Alma-Ata, 1978, propone :

1.- Que los países en desarrollo como el nuestro, hagan uso de los recursos naturales y de su medicina tradicional, para resolver algunos problemas de salud.

2.- Impulsar la investigación multidisciplinaria de la medicina tradicional y de los recursos terapéuticos que utilizan, haciendo partícipes a los practicantes de tal medicina (curanderos, yerberos, parteros, etc.), y establecer lineamientos para su investigación y estudio. (4, 5, 29)

Se estima que aproximadamente un 75 - 80 % de la población de los países en desarrollo hacen uso de la medicina tradicional para resolver sus problemas de salud. Los practicantes de esta medicina hacen uso de los recursos a su

alcance: plantas, animales y minerales de la región y con mucha frecuencia su empleo va acompañado de prácticas mágicas y rituales. (6, 15, 16, 50)

Quizás la importancia de la medicina tradicional se pueda resumir a los tres puntos siguientes :

1.- Representa un modelo para procurar la salud en forma eficaz, para el hombre en su propio ambiente físico.

2.- Las plantas medicinales y animales usados en medicina tradicional, representan fuentes preciadas para el desarrollo y descubrimiento de nuevos medicamentos.

3.- Debido a la reserva natural de numerosas plantas y animales ofrece, en términos económicos, una alternativa para curar numerosas enfermedades a un costo menor. (11, 16)

La medicina tradicional podría ser, una de las alternativas más importante para resolver algunos de los problemas de salud en México. Pero debe señalarse que su adaptación, requiere de grandes esfuerzos de investigación sistemática y multidisciplinaria.

El estudio multidisciplinario de la medicina tradicional comprende varios aspectos : antropológicos, botánico y/o etnobotánico, agronómico, químico, farmacológico, clínico, económico, histórico, etc.

La gran riqueza y variedad de la flora mexicana, la tradición sobre el uso de vegetales con fines curativos, la carencia de una industria farmacológica propia, la crisis económica actual, las condiciones de los

servicios de salud y en general las características socioeconómicas de los países en vías de desarrollo (desnutrición, analfabetismo, pobreza, dependencia externa, etc.) entre otros hacen necesarios los estudios sistemáticos y multidisciplinarios, sobre las plantas medicinales mexicanas para proporcionar una alternativa viable que resuelva algunos de los problemas de salud en México.

Las investigaciones que se realizan actualmente sobre plantas medicinales son aisladas, sin continuidad y las bondades medicinales que se llegan a demostrar en estos trabajos son desconocidos por los practicantes y usuarios de este tipo de medicina, así como también por las autoridades sanitarias competentes.

Se estima que aproximadamente 3,000 especies de plantas medicinales registradas como medicinales, solo se han estudiado menos del 10 % en el laboratorio, y desde el punto de vista agronómico está lejos de llegar al 5 % .(21)

Como se mencionó antes, el estudio de las plantas medicinales, recursos terapéutico más comunmente empleado en medicina tradicional, requiere de estudios amplios, en varios aspectos; es por ello que en la Universidad Autónoma de Chapingo, Estado de México, desde el año de 1979, se realizan estudios etnobotánicos y agronómicos de plantas medicinales y recientemente estudios fitoquímicos de las mismas. En lo que respecta a estudios de actividad biológica se ha venido trabajando en la evaluación sobre la prevención y curación de cálculos biliares con una planta medicinal conocida

como (Yerba de Sapo) Erygium heterophyllum engel, a nivel de extracto de planta total y de extracto alcohólico.(3, 21, 23, 38)

En los trabajos de exploración etnobotánica, que realiza el M. en C. Erick Estrada, del Departamento de Fitotécnica de la Universidad Autónoma de Chapingo, utiliza la metodología de "Flujo de Información Bilateral", que consiste en el intercambio de conocimientos y materiales con la gente de los lugares estudiados y en el mercado la "Entrevista - Compra". Además de hacer partícipes a los practicantes de la medicina tradicional, esta metodología tiene las características particulares de que los beneficios demostrados en las plantas estudiadas en el laboratorio pueden revertirse a los usuarios y hacerles recomendaciones para optimizar sus propiedades curativas.(21)

En los productos naturales es posible distinguir 4 fases características de estas investigaciones :

1.- La actividad biológica es detectada en el material crudo y se monta el sistema de biovaloración para permitir la identificación de las fracciones activas y descartar rápidamente las inactivas.

2.- Se fracciona el material crudo por el procedimiento químico más apropiado; todas las fracciones se prueban, las fracciones activas se fraccionan aún más, hasta que se obtiene el compuesto puro.

3.- Se determina las estructuras química de los compuestos puros.

4.- Se realizan los ensayos paracénicos y de cernimiento.

En ocasiones los compuestos se someten a una "selección ciega"; en este tipo de búsqueda, el criterio específico para acciones deseadas en particular,

no se han establecido de antemano; el objetivo es determinar si un nuevo compuesto tiene alguna actividad farmacológica. (25)

Finalmente el programa de plantas medicinales de la Universidad Autónoma de Chapingo, destacan algunos especímenes vegetales, entre ellos se encuentran Zanthoxylum liebmanniarum, empleado para el tratamiento de la amibiasis; la cual constituye un modelo adecuado como punto de partida para tratar de resolver algunos de los principales problemas de salud en México.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Ya que hasta ahora no se cuenta con antiamebiano ideal resulta importante impulsar la investigación de nuevos fármacos que solo afecten al parásito sin dañar al huésped. En este trabajo se planteó la determinación de la existencia del efecto amebicida en un extracto de la corteza del Colopatle (Zanthoxylum liebmanniarum), planta medicinal, utilizada en la localidad de San Andrés Cacallupán, Estado de Puebla.

1.2. OBJETIVOS.

1.- Recopilar la información botánica, etnobotánica, químico - farmacológica de la especie objeto del estudio.

2.- Efectuar las operaciones preliminares propias a la preparación de extractos vegetales, para verificar la acción farmacológica sugerida por el conocimiento empírico popular.

3.- Realizar en estudio químico preliminar de la corteza de la planta.

4.- Determinar la acción amebicida "in vitro" del extracto hexánico a diferentes concentraciones.

1.3. HIPOTESIS.

En base a la información adquirida con respecto al efecto farmacológico asignado al Colopathe (Zanthoxylum liebmanniarum); se espera encontrar actividad amebicida en la corteza de la planta.

CAPITULO II

A N T E C E D E N T E S

2.1. LA AMIBIASIS .

Debido a la alta incidencia de la amibiasis en la población mundial, ésta ocupa un lugar importante entre las principales enfermedades que afectan al hombre. En México, se encuentra clasificada dentro de las primeras causas de mortalidad. En 1984 se le consideró responsable de la muerte de 2,072 personas, una tercera parte de las cuales no alcanzaban aún los 5 años de edad.(17, 42, 44)

Las diversas amibas que afectan al hombre son Entamoeba histolytica, Naegleria gruberi y Acantamoeba. De las tres anteriores la Entamoeba histolytica es la más frecuente en nuestro medio socioeconómico y afecta en promedio al 20 % de la población mundial.(33)

Actualmente la tasa de infección amibiana está definida como el porcentaje de la población que tiene Entamoeba histolytica en el intestino, pero este no es índice fiel para juzgar la frecuencia de la amibiasis clínica en una zona geográfica dada. Tal vez el único índice seguro para determinar la prevalencia y gravedad de la amibiasis es la cantidad de abscesos hepáticos amibianos.(33)

De acuerdo con este criterio, demuestra que ciertos países son más duramente azotados por el padecimiento. La fuente de contagio y el mecanismo de transmisión se adquiere por la ingestión de quistes a través de los alimentos, en el agua contaminada o por el contagio directo (ano - mano - boca).(33)

Actualmente la transformación de la forma no invasora (quistes) a la invasora (trofozoitos) es aún desconocida, aunque se aceptan dos ciclos vitales : un ciclo no patógeno durante el cual el parásito vive en la superficie de la mucosa o en la luz intestinal en forma quística, nutriéndose de otros microorganismo y restos alimenticios; y un ciclo patógeno, en donde habita en el espesor de los tejidos y se alimenta de los productos de histólisis fagocitando eritrocitos e invadiendo tejidos, adoptando la forma de trofozoitos y multiplicándose por división. (9, 12, 26)

Algunos factores que causan dicha transformación son los siguientes :

- Relativos al huésped: la amibiasis hepática es más frecuente en el adulto, en mujeres de edad reproductiva y en casos de desnutrición.

- Relativos al parásito: virulencia de la cepa, magnitud del inóculo y repetición de las infecciones.

- Factores asociados: coexistencia de infecciones enteropatógenas (Shigella, Salmonella, E. coli), alcoholismo, dietas ricas en colesterol y almidones, fatiga, etc.

La invasión tisular amibiana desencadena una respuesta inmunológica caracterizada por: aparición de anticuerpos séricos, aumento de inmunoglobulinas séricas (Ig G) e inmunidad celular.

No está comprobado el desarrollo de resistencia para la reinfección, que puede relacionarse con lo inaccesible del parásito para los mecanismos inmunitarios del huésped. El éxito principal de los estudios inmunitarios hasta aquí ha sido el desarrollo de pruebas serodiagnósticas (hemaglutinación indirecta, precipitina, aglutinación de partículas, anticuerpos

fluorescentes). Como la respuesta de anticuerpos sigue a la invasión de la mucosa intestinal o bien a la colonización dentro del hígado, las pruebas serológicas son muy útiles para establecer la exposición tisular al parásito. Se han señalado reacciones inmediatas y tardías de hipersensibilidad cutánea para antígenos de Entamoeba en algunos pacientes, pero todavía se necesita una valoración cuidadosa de la especificidad y la sensibilidad de estos antígenos.

Está comprobado el efecto protector de anticuerpo local en diversos sistemas, incluyendo aquellos en los que intervienen agentes bacterianos micóticos y virales. Sin embargo, no se ha descubierto un papel protector para Ig A secretoria o de inmunidad celular local para protozoarios intestinales. Las funciones de Ig A en la inmunidad localizada para agentes microbianos; incluyen su efecto neutralizante o de revestimiento de superficie epiteliales que impide la fijación o penetración del organismo.(8, 39, 48)

A partir de las paredes del intestino los trofozoitos pueden llegar por vía porta al hígado, por contingüidad invadir piel y genitales; a partir del hígado el parásito puede invadir pleura, pulmón, pericardio, peritoneo, estómago, riñón, abrirse a la piel y por vía hemática diseminarse a distancia (cerebro).(33)

De acuerdo al grado y desarrollo del parásito en el huésped, existen 3 grupos de fármacos que se utilizan en el tratamiento de la amibiasis.

1.- Los que tienen acción principalmente en tejidos y en la luz intestinal, administrados por vía oral, por ejemplo: los derivados imidazólicos, la dehidroemetina y el fosfato de cloroquina.

2.- Los que únicamente tienen acción en los tejidos y en la luz intestinal, administrados por vía parenteral, por ejemplo: clorhidrato de emetina y la dehidroemetina.

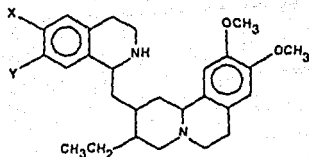
3.- Los que tienen acción únicamente en la luz intestinal, administrados por vía oral, con muy poca o nula absorción del intestino y que actúan por contacto contra los trofozoitos de la ameba. Se encuentran desde los antiguos arsenicales y fármacos yodados hasta las nuevas amidas, que poseen un radical clorado en su composición química. Por ejemplo: las hidroxiquinolinias halogenadas, dicloacetamidas y fenantrolinas. (32, 33, 51) (Figura 1).

Durante más de 50 años el tratamiento utilizado con mayor éxito para la amebiasis intestinal disintérica fue la emetina, sustancia de origen natural, obtenida de la Ipecacuana, pero ésta ha sido reemplazada por otros fármacos con menos efectos secundarios y de menor toxicidad; debido a que las reacciones adversas se presentan en un 50 a 70 % de los pacientes que reciben este fármaco; siendo las reacciones cardiovasculares las más serias e incluyen: dolor precordial, disnea, taquicardia, hipotensión, ritmo de galope, dilatación cardíaca, insuficiencia congestiva y muerte. (41, 43)

Actualmente los medicamentos de elección para el tratamiento de la amebiasis disintérica son los derivados imidazólicos: metronidazol, tinidazol, mebendazol, etc. En los últimos años se han reportado efectos carcinogénicos por el uso del metronidazol. Pruebas en ratas demostraron que este fármaco inducía la formación de tumores, lo que ha provocado una corriente de opiniones para la "Food and Drug Administration" (F.D.A.) de los Estados Unidos de Norteamérica, para que suprima este medicamento del mercado. Sin

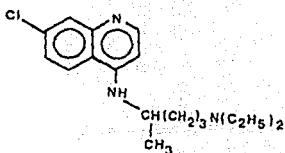


IMIDAZOL

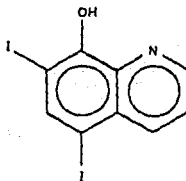


EMETINA : X = Y = CH₃O

DEHIDROEMETINA : X = Y = CH₂O

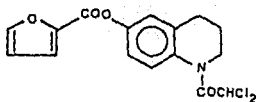


CLOROQUINA



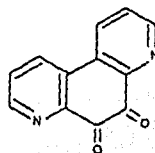
IDOQUINOL

(HIDROXIQUINOLINAS HALOGENADAS)



QUINFAMIDA

(DICLOROACETAMIDAS)



FANQUINONA

(FENANTROLINAS)

FIGURA 1. Estructuras químicas de los grupos de medicamentos que se utilizan en el tratamiento de la amebiasis .

embargo para la amibiasis hepática, la alternativa terapéutica es prácticamente inexistente por el momento.(22, 26, 35)

2.2. GENERALIDADES DE LA FAMILIA .

El género Zanthoxylum, pertenece a la familia de las Rutáceas, la cual está relacionada con cuatro familias: Rutoideas, Todaloideas, Rhanbdoideae y Auranioloideae.(37)

La familia Rutáceas se compone de unos 150 géneros y 900 especies, principalmente arbustos y árboles, distribuidos en regiones, tanto templadas, como tropicales, pero particularmente abundantes en Sudamérica y Australia. Las glándulas con esencia están presentes en las hojas y en otros órganos. Las flores, usualmente dispuestas en cimas, con 4-5 sépalos, 4-5 pétalos, 8 ó 10 estambres y un ovario súpero. Los frutos son de diversos tipos, pero en la subfamilia de los cítricos, Aurantioideae, es un hesperidio. Entre los frutos están la naranja y el limón, la lima, la toronja, cidra y el pomelo. Hay 12 especies diferentes de Citrus. Otros géneros son Zanthoxylum (20-30 especies), Fagara (250 especies), Choisya (6 especie), Ruta, (7 esp), y otros.

Entre los componentes de las Rutáceas se halla una amplia variedad de alcaloides, esencias, ramnoheterósidos, cumarinas y terpenoides. Entre los alcaloides están los tipos amina alcaloídicas, imidazol, indol, isoquinoleína, piridinas, pirrolidina, quinazolina y quinoleína.(19, 37, 54)

Las plantas de esta familia producen gran número de esencia, en la corteza del tallo, en las hojas, flores y frutos; por consiguiente, es muy importante en cuanto afecta a la ciencia médica.(54)

Entre las actividades biológicas, destacan : analgésico local y sistémico, anticolinérgicos en cólicos abdominales y dismenorrea atónica, así como en el glaucoma. Actividad antitumoral, antiepiléptico, antimicrobiano y antigripal, al proporcionar vitamina C, entre otras.(Tabla 2).

2.3. GENERALIDADES DEL GENERO .

El género Zanthoxylum comprende de 20 a 30 especies. Las especies más comunes son las siguientes : Z. arborecens, Z. fagara, Z. limoncello y Z. caribeum.(37)

Una descripción general de Zanthoxylum la hace Maximino Martínez, como sigue : hay variedad en la forma en que se presenta este género, se puede encontrar como arbusto y árbol, que van desde 3 a 4.5 metros de altura. Los arbustos presentan espinas, hojas, ricos en glándulas más o menos hundidas. Flores pentámeras, pequeñas, con colores variados y frutos foliculados.(47,54) (Figura 2).

Se encuentran ampliamente distribuido, al sur de América, en Estados Unidos de Norteamérica, Africa del Sur y Australia. En México se localiza al norte y centro de la República hasta llegar al sur de Oaxaca; en Michoacán, Hidalgo, Puebla y Chiapas.(13, 37) (Mapa 1).

Se tienen muchos antecedentes fitoquímicos, en los que se describen una gran variedad de metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, esteroides, lignanos, amidas ácidas insaturadas, fenilpropanoides, monoterpenos, triterpenos y sesquiterpenos. En la tabla 1 se encuentran algunos de los compuestos aislados de este género.(Figura 3 y 4).

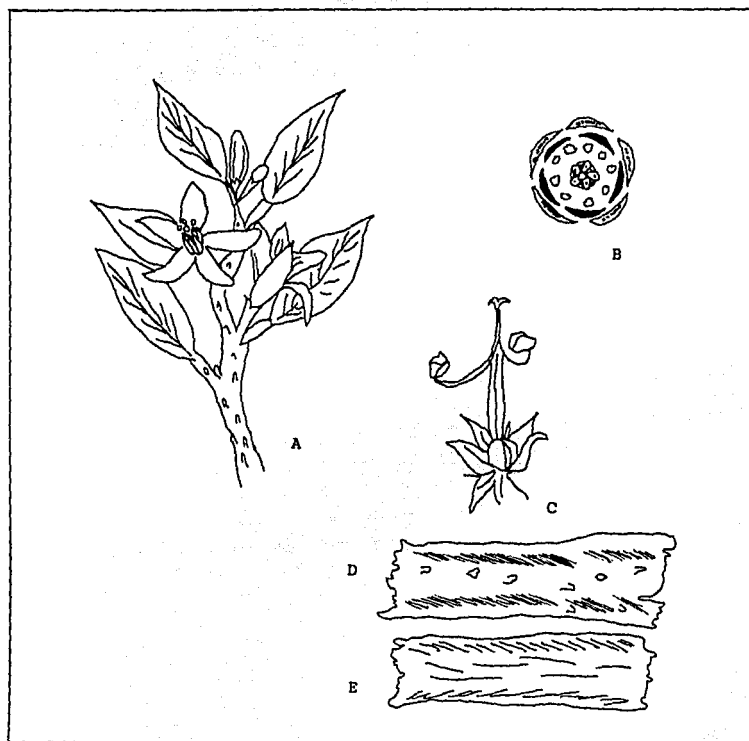


Figura 2 . Zanthoxylum liebmaniarum . A. Aspecto general del arbusto x 0.4
 B. Diagrama transversal de la flor. C. Fruto foliculado x 1.6
 D - E . Aspecto de la corteza, superficie exterior e interior respectivamente x 0.3 .-

TAHLA 1. ALGUNOS COMPUESTOS ENCONTRADOS DEL GENERO Zanthoxylum .

| FUENTE NATURAL | COMPUESTOS | REFERENCIA |
|-------------------------|--|------------|
| Zanthoxylum arborescens | (2S,5s)-2,5-dibenzil-1,4-dimetilpiperazina 1-metil-3-(2'-feniletetil) 1 H,3H-quinazolína-2,4-diona 1-metil-3-3(2'-(4''-metoxifenil)-1H,3H-quinazolína- 2,4- diona. 8-hidroxi-4,7- dimetoxifuranoquinolina 8-isopenteniloxi-4,7-dimetoxifuranoquinolina | (13,31) |
| Zanthoxylum fagara | Skimmianina Scolpepetina Lauriflorina Magnoflorina | (18) |
| Zanthoxylum limoncillo | Skimmianina | (13) |
| Zanthoxylum culantrillo | Skimmianina Magnoflorina | (49) |
| Zanthoxylum coriaceum | Chelerytrina N - metilcanadina Alfileramina | (28) |
| Zanthoxylum senegalense | Fagarina | (40) |

TABLA 1. ALGUNOS COMPUESTOS ENCONTRADOS DEL GENERO Zanthoxylum . (continuación)

| FUENTE NATURAL | C O M P U E S T O S | REFERENCIA |
|-------------------------------|--|------------|
| Zanthoxylum thomense | Decarina Zanthoxamida Angolina Norecheliretrina | (45) |
| Zanthoxylum intergrifolium | Intergramina Intergriguinolona | (28) |
| Zanthoxylum siniulans | Skirmianina | (55) |

TABLA 2 . ACTIVIDAD BIOLÓGICA QUE PRESENTAN ALGUNOS GENEROS *Zanthoxylum*.

| ESPECIE | U S O S | REFERENCIA |
|----------------------------------|---|------------|
| <i>Zanthoxylum zanthoxyloide</i> | Se ha reportado que en las raíces existen compuestos con actividad pungente, acción irritante particular, sensación de picor. | (30) |
| <i>Zanthoxylum setulosus</i> | Repelente de insectos. | (2) |
| <i>Zanthoxylum fagara</i> | Del extracto de raíces, se encontró propiedades antimicrobianas. Efecto diurético. Antiepiléptico, antiflatulento, antigripal y tónico muscular. | (14,46) |
| <i>Zanthoxylum avicena</i> | En Hong Kong, lo usan como desinflamatorio de la garganta y para la ictericia. | (24) |
| <i>Zanthoxylum caribaeum</i> | Astringente, dolor de cabeza, caústico, diarreas, entumecimiento de labios y lengua. Provoca inflamación, para tratar la lepra, reumatismo y sarna. | (14) |
| <i>Zanthoxylum pletora</i> | Anticonvulsivo, antipirético. Contra la erisipela. | (14) |

Presenta actividad biológica en las hojas y en la corteza, tales como: repelentes de insectos, astringente, antireumático, diurético, antiinflamatorio, anticonvulsivo, antipirético, etc.

2.4. GENERALIDADES DE LA ESPECIE ZANTHOXYLUM LIEBMANIARUM.

El Valle de Tehuacán, en el estado de Puebla, es una provincia xerofítica, ubicada dentro de los 18°00' a los 18°43' latitud norte y a los 96°55' longitud oeste; con una altitud promedio de 1,580 metros sobre el nivel del mar, de clima semiárido, lluvias de verano, suelos de predominio calcáneos y población: Nahuas y Popolaca (Mapa 2 y 3).

En esta zona se realizó una exploración etnobotánica de información bilateral (intercambio de datos y material con la gente, curanderos, etc.) De estas investigaciones se obtuvieron un total de 358 plantas medicinales, de las cuales se identificaron 269 especies; se encontraron registradas en la literatura 217 y 52 fueron de nuevo registro (14.5% del total). Dentro de estas especies de uso medicinal se encuentra el Colopatlhe (Zanthoxylum liebmaniarum) del cual se emplea la infusión acuosa de la corteza del tallo para el tratamiento de la amibiasis e infecciones parasitarias intestinales y en ocasiones como anestésico local.(22, 27)

El Colopatlhe (Zanthoxylum liebmaniarum) es un arbusto o árbol pequeño de 3 a 4.5 metros de altura, se presenta sin espinas y con espinas esparcidas, folíolos de 1.3 cm de largo, verde amarillento y granulados, con dientes muy pequeños, semillas negras lustrosas brillantes.(13)(Figura 2).

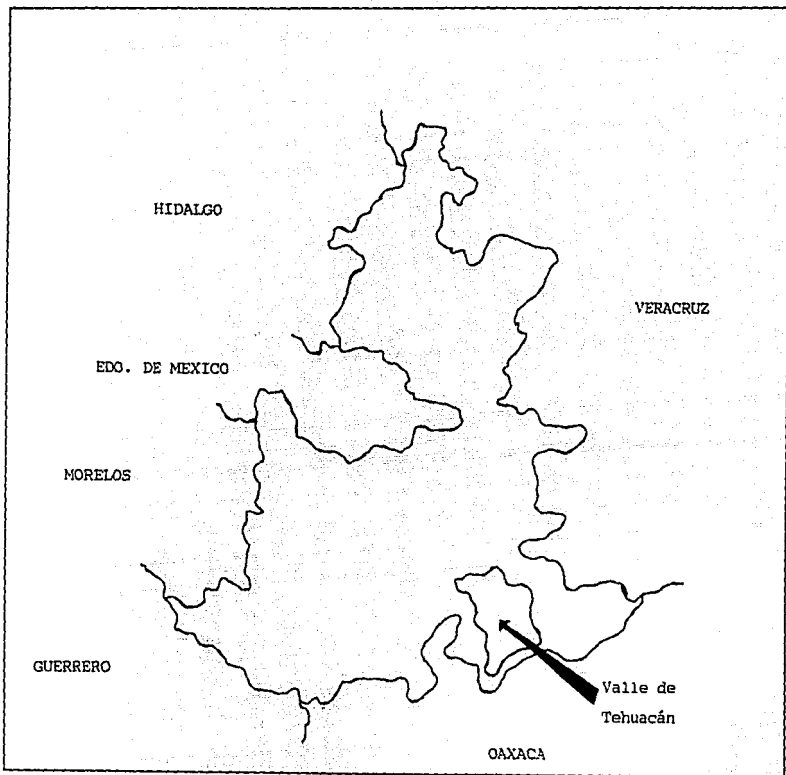
Este arbusto vegetal se encuentra ubicado en la República de México, en

la zona que corresponde al Valle de Tehuacán, entre los límites de los estados de Puebla y Oaxaca.

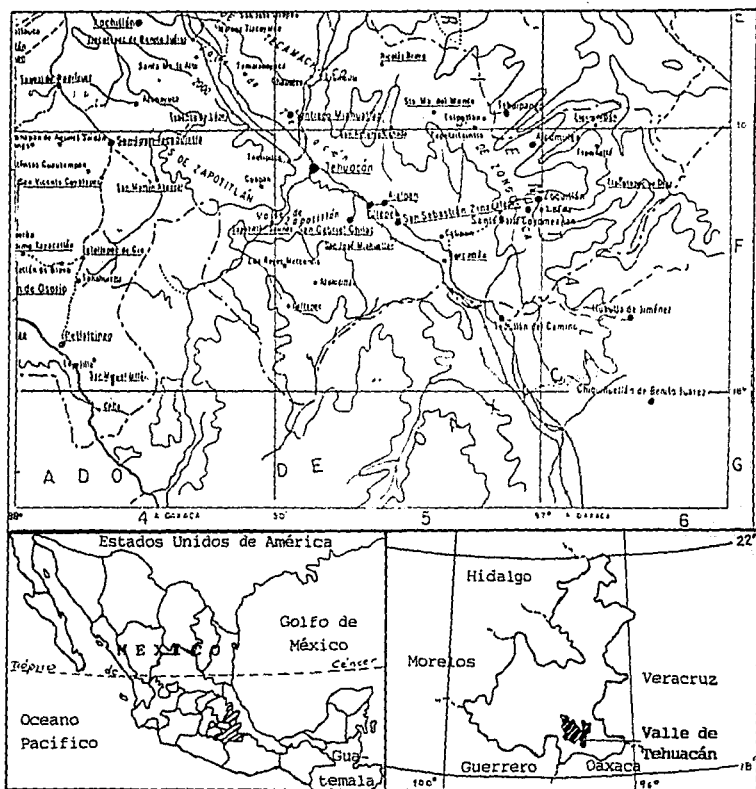
Todas las propiedades terapéuticas que se le atribuyen a esta planta han sido proporcionadas por los habitantes de los pueblos en que crece, todas ellas carecen de una base científica. Siendo la corteza de la planta la única que se utilizado para tales fines.



Mapa 1. Localización geográfica del Estado de Puebla, México .



Mapa 2. Estado de Puebla y localización de la región del Valle de Tehuacán, Puebla .



Mapa 3. Descripción geográfica del Valle de Tehuacán.

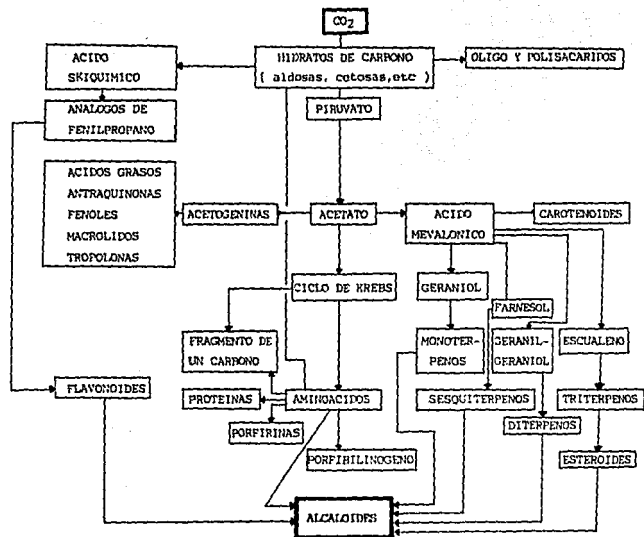
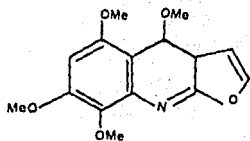
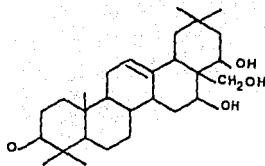


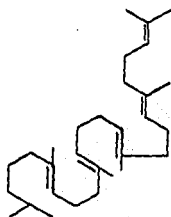
Figura 2. Esquema general de rutas metabólicas para la producción de alcaloides .



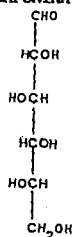
SKIMMIÁNINA
(ALCALOIDE)



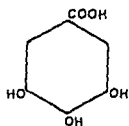
CHICHIPEGÉNINA
(SAPONINA)



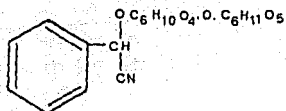
ESCUALENO
(TRITERPENO)



GLUCOSA



ÁCIDO GALICO
(TANINO)



AMIGDALINA
(GLUCOSIDO CIANOGENICO)

FIGURA 4. Estructuras químicas de los principales compuestos aislados del género Zanthoxylum.

2.5. CROMATOGRAFIA : GENERALIDADES E IDENTIFICACION .

La cromatografía puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basándose esta separación en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento.

Se pueden distinguir tres tipos de cromatografía : cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de reparto.

Cromatografía de Adsorción : las diferencias de comportamiento en la adsorción - desorción de sustancias contenidas en un disolvente móvil (un líquido o un gas), sobre un sólido estacionario, se utiliza para conseguir la separación de los componentes de una mezcla coloreada. La adsorción es un fenómeno de superficie, que se manifiesta por un aumento de concentración en la interfase que rodea el medio estacionario.

Cromatografía de Intercambio Iónico : se llevan a cabo con materiales especiales de estructura porosa e insolubles que contienen grupos reactivos que estan asociados a iones lábiles capaces de intercambiarlos con los del medio que les rodea.

Se emplea en la separación de sustancias iónicas tanto orgánicas como inorgánicas, de polielectrolitos, como enzimas, proteínas, hormonas, virus, ácidos nucleicos y otras sustancias biológicas importante.

Cromatografía de reparto : está basada en la separación de una mezcla de

sustancias mediante el reparto existente entre la fase móvil (disolvente) y la fase estacionaria, soportada sobre un sólido aacecuado.

La cromatografía de reparto se lleva a cabo sobre tiras de papel filtro, columnas y capas finas de polvo de celulosa, gel de sílice húmeda y polvo de diatomeas (kieselgurh y celita). En cada uno de estos casos el medio poroso sirve únicamente como soporte para el agua, la cual actúa como un agente de reparto.

CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA : La cromatografía sobre papel es muy versátil y sus métodos se emplean con mucha frecuencia, pero su uso se limita a separaciones sobre celulosa, ya que otros medios adsorbentes, como alumina y gel de sílice, no pueden prepararse en forma de tiras. Esta dificultad puede superarse fabricando capas finas de estas sustancias sobre placas de vidrio. Las capas finas preparadas sobre vidrio se denominan cromatoplas. Se usan dos tipos de capas: capa sólida y capa suelta.

PREPARACION DE LAS PLACAS.

a) Capa sólida: las placas se preparan aplicando una capa uniforme de material apropiado (el absorbente) en forma de una pasta acuosa muy fina sobre las placas de vidrio. Es esencial para obtener óptimos resultados conseguir que las capas sean uniformes. El tamaño de partícula, estructura superficial y poder adherente del agente adsorbente debe ser controlado cuidadosamente para obtener resultados reproducibles.

El espesor de las capas puede variar según las necesidades, pero generalmente éste es de 0.25 mm. Con capas más finas la separación es más rápida, pero menos efectiva.

La capa sobre la placa se seca en una estufa a una temperatura de 100-105°C

durante dos horas; esta operación se denomina "activado" de la capa. Normalmente los tamaños de las placas oscilan entre 2,5 x 20 cm y 20 x 20 cm.

b) Capa suelta: para la preparación de capa suelta puede usarse cualquier absorbente de los que se utilizan en la cromatografía de columna. Pueden hacerse con un aparato muy sencillo, que consiste en una varilla maciza de vidrio con un tubito de goma en cada extremo. El material para la capa se extiende con cuidado sobre la placa, y sobre él se rueda suavemente la varilla de vidrio, con lo que se consigue una capa uniforme. El desarrollo se lleva a cabo en posición casi horizontal.

ELECCION DEL ADSORBENTE : puede emplearse cualquier material para el trabajo en capa fina. Los más usuales son la gel de sílice, alúmina, kieselguhr, celulosa y resinas de intercambio iónico.

ELECCION DEL DISOLVENTE : dependerá, de la naturaleza del compuesto que se va a separar y del material en que la separación va a llevarse a cabo. Una regla general para la elección del disolvente es la comparación de la polaridad del disolvente y de la sustancia que se desea separar.

APLICACION DE LA MUESTRA SOBRE LA PLACA : Las muestras se aplican en la línea base con un capilar muy fino y se deja evaporar el disolvente. La evaporación en la capa fina es más rápida, siendo no necesario el empleo de un secador .

DESARROLLO DE LAS PLACAS :

a) Capa sólida. El desarrollo se lleva a cabo en cámaras por el método

ascendente. En la cámara se pone una tira de papel impregnada de disolvente y que cubre la parte delantera, inferior y trasera de ésta, para conseguir que la atmósfera interior esté saturada con el vapor del disolvente. La cámara se cierra herméticamente con la tapadera de vidrio mientras se desarrolla el cromatograma.

Generalmente se permite que el disolvente ascienda unos 10 cm antes de sacar la placa de la cámara. El frente del disolvente se señala con mucho cuidado trazando una línea con la punta de un lapicero.

b) Capa suelta. El método para desarrollar placas con capas sueltas consiste en el empleo de un frasco de boca ancha con el tapón fuertemente ajustado.

REVELADO DE PLACAS. Este se lleva a cabo en una cámara que contiene en el fondo unos pocos de cristallitos de Iodo, se introduce el cromatograma y se deja durante unos minutos. El Iodo tiende a concentrarse en los sitios donde estan los compuestos, por lo que aparece una mancha marrón. Siempre que no reaccione el Iodo con las sustancias el método es bueno como revelador no destructivo. Otros métodos que no afectan a los productos en el revelado son la fluorescencia, la radioactividad y los rayos ultravioletas.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA .

Son numerosos los absorbentes empleados en la cromatografía de columna; siendo los más generales la celulosa, gel de sílice, celita y kieselgurh, alúmina, óxido de magnesio, óxido cálcico y carbón activo.

Llenado dela columna. Las columnas de cromatografía pueden adquirirse

en una gran variedad de tipos y tamaños, e incluso muchas veces pueden construirse con materiales sencillos de laboratorio.

El primer paso en el montaje de la columna cromatográfica es colocarla fija en posición vertical. A continuación se pone en el fondo de la columna un pequeño disco de porcelana con varios orificios, y encima de éste un poco de lana de vidrio. Este dispositivo retiene el material sólido de la columna, mientras el líquido eluyente puede circular libremente.

El adsorbente puede introducirse en seco, pero lo más frecuente es echarlo en forma de papilla con el eluyente. Antes de introducir el adsorbente se echa en el interior de la columna un poco de disolvente puro y se elimina el aire que puede permanecer retenido en las paredes, agitando por medio de una varilla de vidrio. La papilla formada por el adsorbente y el disolvente se agrega lentamente en porciones, lo que permite que se pose el adsorbente por la fuerza de la gravedad, hasta alcanzar la altura deseada. Se debe golpear la columna durante el llenado con un tubo de goma para favorecer la formación del lecho adsorbente. Finalmente se abre la llave inferior de la columna para que salga el exceso de disolvente contenido. La altura del disolvente no debe exceder más de 2 a 5 mm sobre el sólido.

DISOLVENTES PARA LA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA. La elución de la columna puede llevarse a cabo empleando una serie de disolventes en los que vaya aumentando la polaridad. Una serie típica es la que sigue: agua -- metanol -- etanol -- acetona -- acetato de etilo -- éter dietílico -- cloroformo -- benceno -- ciclohexano -- hexano.

TECNICA DE SEPARACION.

Columna de reparto. La mezcla a separar se disuelve en el disolvente apropiado, formando una solución diluida que se introduce en la columna por medio de una pipeta. El disolvente elegido debe ser miscible con el empleado para llenar la columna. La adición se favorece con una varilla de vidrio que llega hasta el adsorbente.

Se abre la llave inferior y se deja salir el disolvente hasta que el nivel de la muestra esté a 1 ó 2 mm del adsorbente. Se agrega el eluyente y se permite que fluya suavemente a través del adsorbente, ajustando la llave inferior a la velocidad necesaria. El flujo se continúa hasta que se han separado todos los componentes.

IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS .

Cuando la muestra aplicada a la columna es coloreada, se observa fácilmente el progreso de la separación; pero cuando las sustancias son incoloras, es más difícil. Pueden emplearse dos procedimientos para identificar y aislar los compuestos separados en la columna. El método más sencillo consiste en eluir durante un tiempo apropiado y después sacar de la cuerpo del adsorbente, con mucho cuidado, para evitar que se desmorone. Una vez que el disolvente se ha evaporado de la columna, se "corta" ésta en rodajas, se extrae con disolvente cada rodaja y se analiza el extracto. Antes de cortar la columna, si los compuestos no son coloreados, se aprieta contra ella una tira de papel para que absorba un poco de disolvente. Cuando el papel está seco se pulveriza con un revelador que nos indique la posición de cada uno de los compuestos. El papel se coloca de nuevo al lado de la columna, y de

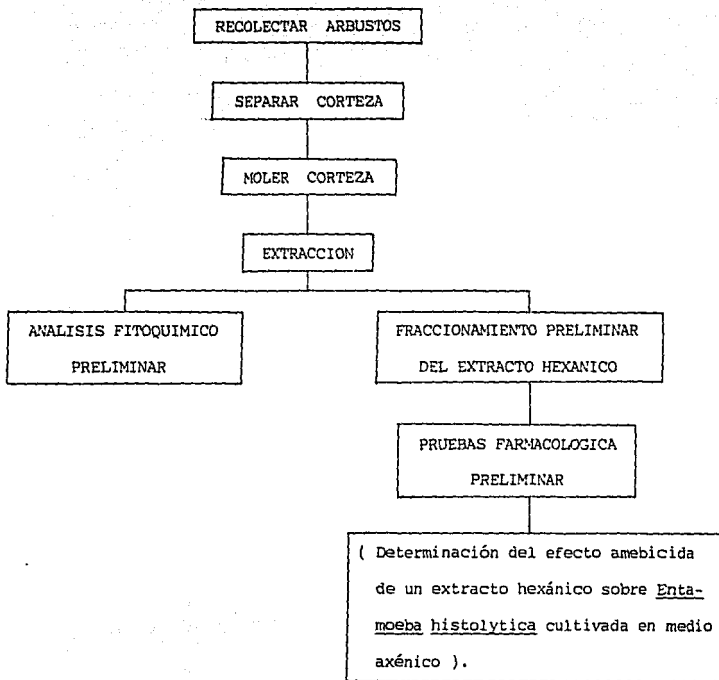
esta manera sabemos qué componentes contiene cada sección de la columna.

La segunda técnica, consiste en llevar a cabo una separación continua, lo que permite a los compuestos separados salir en el eluato. Un gran número de pequeñas fracciones de eluato se recogen y analizan por un método apropiado. Cuando se conoce la composición de cada eluato, pueden unirse algunas fracciones que se concentran, mientras que otras se eliminan por no contener ningún compuesto utilizable. Algunas fracciones pueden contener varios compuestos, y es necesario recromatografiarlas en otra columna. La pureza de los compuestos obtenidos de esta manera pueden comprobarse por cromatografía sobre papel o capa fina, empleando diversos disolventes. (1)

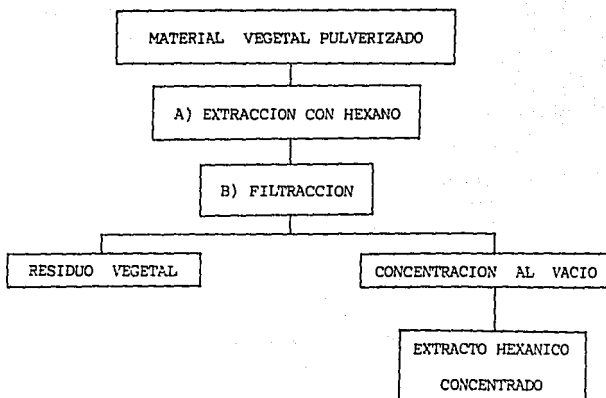
CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. DIAGRAMA GENERAL.

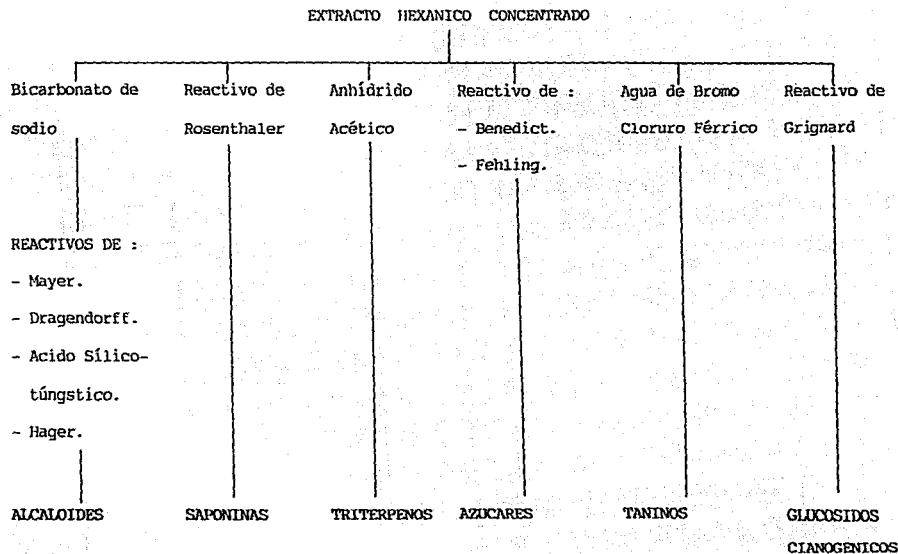


3.1.1. EXTRACCION .



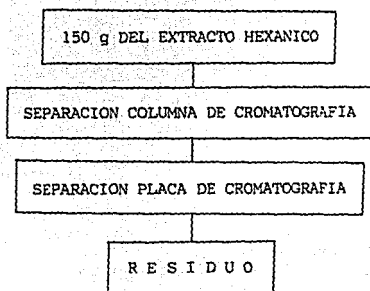
ESQUEMA 1. Extracción de la corteza del tallo de Zanthoxylum liebmaniarum.

3.1.2. ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR .



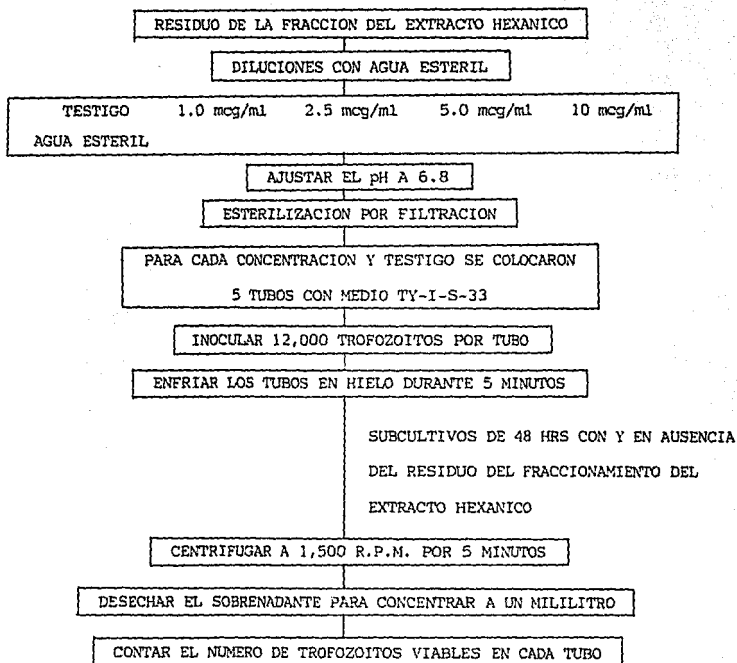
ESQUEMA 2. Marcha seguida en el análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de la corteza del tallo de Zanthoxylum liebenianarum .

3.1.3. FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO HEXANICO .



ESQUEMA 3. Fraccionamiento preliminar del extracto hexánico por cromatografía de columna de la corteza del tallo de Zanthoxylum liebmaniarum .

3.1.4. DETERMINACION DEL EFECTO AMEBICIDA DE UN EXTRACTO HEXANICO SOBRE ENTAMOBEA HISTOLYTICA CULTIVADA EN UN MEDIO AXENICO TY-I-S-33.



ESQUEMA 4. Determinación del efecto amebicida de un extracto hexánico de la corteza del tallo de Zanthoxylum liebmianiarum .

3.2. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO .

3.2.1. MATERIAL VEGETAL .

2.7 Kg de corteza seca y molida de Colopatlhe (Zanthoxylum liebmaniarum) recolectada en el Valle de Tehuacán, Puebla.

3.2.2. MATERIAL BIOLÓGICO .

Entamoeba histolytica , cepa H M I : I.M.S.S. , cultivada en medio axénico .

3.2.3. MATERIAL DE LABORATORIO.

Cinta testigo de esterilización N° 117

cubreobjeto N° 224 x 50 1 oz. Proper

espátula de acero inoxidable, de diferentes tamaños

frascos ámbar capacidad 50 ml

frascos de vidrio con tapón de rosca, capacidad 150 ml

gradilla para tubos de ensaye

lápiz marcador resistente al calor

manguera de hule

matraces aforados con tapón de 10, 50, 100, 500 y 1000 ml

matraces de Erlenmeyer de 10, 25, 50, 125, 250, 500, 1000 y 2000 ml

matraz de Kitasato Pyrex de 250 ml

papel glassine para pesar

papel parafilm "M" American Company
perillas para pipetas
pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10 y 15 ml
pipetas serológicas desechables de 1, 2, 5 y 10 ml
portaobjetos para microscopio
probeta graduada escala de 50, 100, 500 y 1000 ml
trípí con tela de asbesto
tubos de ensayo de 13 x 100 y 16 x 100 mm
cámara de Neubauer
tubos de ensayo con tapón de rosca de 15 x 125 mm
columna de vidrio para cromatografía de 5 diferentes tamaños, en longitud y diámetro (50 x 5 cm , 70 x 100 cm , 80 x 12 cm , 100 x 5 , 100 x 3 cm)
placa de vidrio para cromatografía de 20 x 20 cm
matraces de bola de boca esmerilada de 2000, 1000, 500, 250, 100 y 50 ml
embudos Buchner de 50, 250 y 500 ml
barras magnéticas para agitación de 5 diferentes tamaños (de 1 a 5 cm)
vasos de precipitados de 100, 250, 500 y 1000 ml
soporte universal
pinzas para bureta de 3 dedos
frascos ámbar de vidrio con tapón de rosca plástico de 30 ml
frasco de vidrio con tapón de rosca plástico de 3 ml
embudos de extracción de 50, 250, 500, 1000 y 2000 ml
embudos de filtración de tallo corto y largo
trampas para vacío
refrigerantes de varios tamaños.

3.2.4. REACTIVOS .

Peptona tripticasa. Broxon.
Extracto de levadura. Broxon.
Dextrosa. J.T. Baker.
Cloruro de sodio. J.T. Baker.
Fosfato de potasio monobásico. J.T. Baker.
Fosfato de potasio dibásico. J.T. Baker.
Acido ascórbico. J.T. Baker.
Clorhidrato de L-cisteína. Sigma.
Citrato de amonio férrico. Merck.
Solución de vitamina NCTC - 107. Microlab.
Vitamina B-12. Mega Pharma.
Acido teótico. Sigma.
Suero bovino. Microlab.
Fosfato dibásico de sodio. J.T. Baker.
Carbonato de sodio. J.T. Baker.
Hidróxido de sodio. J.T. Baker.
Sulfato de cobre pentahidratado, J.T. Baker.
Tartrato de sodio y potasio. J.T. Baker.
Reactivo de Folin Ciocalteu. Sigma.
Azul triptano. Sigma.
Cloruro de mercurio. J.T. Baker.
Acido pícrico. J.T. Baker.
Yodo. J.T. Baker.
Subnitrito de bismuto. Merck.

Acido nítrico. J.T. Baker.
Acido silicotúngstico. Merck.
Vainillina. J.T. Baker.
Etanol. J.T. Baker.
Bromo. J.T. Baker.
Cloruro férrico. J.T. Baker.
Citrato de sodio. J.T. Baker.
Gel de sílice de 30 - 70 mallas. Merck.
Gel de sílice de 70 - 230 mallas. Merck.
Hexano. J.T. Baker.
Benceno. J.T. Baker.
Acetato de etilo. J.T. Baker.
Acido sulfúrico. J.T. Baker.
Acido clorhídrico. J.T. Baker.
Acido fosfórico. Merck.
Acido acético. J.T. Baker.
Anhídrido acético. J.T. Baker.
Sulfato cérico. J.T. Baker.

3.2.5. EQUIPOS .

Auto clave marca Presto

balanza analítica, Mettler AE - 163

bomba de enfriamiento, Medi - Lab

bomba de vacío manual , de cristal

centrífuga Sorval con refrigeración modelo RC-5

filtro laminar, Veco

fuelle de poder, LXB 2103 Power supply

incubadora Medi - Lab N° 415

microscopio de luz invertida, Zeiss

microscopio óptico, Zeiss

potenciómetro Corning modelo pH meter

refrigerador, marca Whirpool de 20 pies cúbicos

reloj, General Electric

termómetro 0 - 100 ° C

evaporador rotatorio de cristal

calentador de vapor, Medi - Lab

agitadores magnéticos

lámpara de luz ultravioleta, Corning

molino manual, marca Corona

estufa de secado con aire caliente, Medi - Lab

3.3. METODOLOGIA .

3.3.1. EXTRACCION .

Se pesaron 2,7 Kg de la corteza seca de la planta Colopatthe (Zanthoxylum liebmanniarum) y se molieron en molino manual.

Se hicieron cuatro extracciones con 16 litros de hexano, con una duración por cada extracción de 3 días, se filtró y se concentró. De esta manera se obtuvieron 250 g del extracto de hexano.

3.3.2. ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR .

100 g del extracto hexánico resultante, se utilizaron para los siguientes ensayos :

ALCALOIDES. Un gramo del extracto se disolvió en 10 ml de ácido clorhídrico diluido (10 %), se agitó y filtró hasta que éste fue completamente transparente. El filtrado se ensayó con los reactivos de : Mayer, Dragendorff, Hager, ácido silicotúngstico y bicarbonato de sodio.

SAPONINAS. Se disolvió un gramo del extracto en un tubo de ensaye y se probó con el reactivo de Rosenthaler.

TRITERPENOS. Se disolvió un gramo del extracto en un mililitro de cloroformo al que se le agregó un mililitro de anhídrido acético dejándolo resbalar por las paredes del tubo y se dejó en reposo hasta la aparición de colores rojos, rosa, púrpura o azul en la interfase.

TANINOS. Se disolvió con agua un gramo del extracto, se filtró, se tomaron alícuotas para las pruebas con: agua de bromo y cloruro férrico.

AZUCARES. Un gramo del extracto se diluyó en aproximadamente 50 ml de agua, se filtró y se probaron los siguientes reactivos: Reactivo de Benedict. Se tomó un mililitro de la solución problema y se agregó un mililitro de reactivo de Benedict, 2 ml de agua y se calentó la mezcla en baño María, paralelamente se corrió un blanco.

Reactivo de Fehling, se tomó una alícuota de 10 ml del extracto diluido y se le agregaron 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B, se calentó en baño María, paralelamente se corrió un blanco.

GLUCOSIDOS CIANOGENICOS. Una tira de papel filtro se impregnó con reactivo de Grignard, el cual se colocó en la boca del tubo que contenía una pequeña cantidad del extracto con unas gotas de cloroformo, se calentó a 30 - 35 ° C y se observó la coloración del papel.

3.3.3. FRACCIONAMIENTO PRELIMINAR DEL EXTRACTO HEXÁNICO .

Los 150 g del extracto hexánico restantes se pasaron por una columna cromatográfica con 300 g de gel de sílice (de 0.5 a 0.5 mm) empezando a eluir con hexano, aumentando poco a poco la polaridad del eluyente con cantidades cada vez mayores de hexano y después mezclas de hexano - acetato de etilo hasta llegar a acetato de etilo puro. Las fracciones fueron de 200 ml cada una.

Las fracciones 60 a 66 correspondientes a la polaridad del eluyente hexano - acetato de etilo 90:10, se purificaron en una placa de gel de sílice,

presentaron dos manchas grandes en la cromatoplaque que se revelaron con sulfato cérico y estas fueron observadas con una lámpara de luz ultravioleta.

Las manchas correspondientes a todas estas fracciones se rasparon, se disolvieron en hexano, se filtró y después de eliminar el disolvente y secarlo al vacío se obtuvo 28 g de residuo. (7)

3.3.4. PRUEBAS FARMACOLOGICAS PRELIMINARES .

Con 28 g de residuo de extracto hexánico del Colopatihe (Zanthoxylum liebmanniarum), se realizaron diluciones desde 1.0 a 10 mcg/ml en agua estéril, a estas soluciones se le ajustó el pH a 6.8 y se esterilizaron por filtración con membrana Millipore de 0.22 µm.

Los experimentos consistieron en probar 5 tubos por concentración que contenían 12 ml del medio TY-I-S-33, 0.5 ml de la concentración del residuo hexánico y 0.3 ml de la suspensión de amibas (1.2×10^4 trofozoitos). Los tubos fueron mezclados por inversión suave en 10 ocasiones e incubados a 37 °C en forma inclinada. (17)

En todos los ensayos se utilizó un testigo que correspondió al crecimiento típico de la célula en ausencia del residuo hexánico de la planta.

El número de trofozoitos así como su viabilidad fue determinado bajo las siguientes condiciones :

1° Los tubos se incubaron a 37°C por 72 horas, después de este tiempo se

observaba su motilidad y la población de amibas fue contada de la siguiente manera : los tubos de enfriaron en baño de hielo por 5 minutos, se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 minutos, desechándose el sobrenadante para concentrar a un mililitro, del cual se tomó una alícuota para determinar el número de amibas en una cámara de Neubauer, utilizando como amibas viables aquellas que no eran permeable al colorante.

2° Después de las 72 horas se realizaron subcultivos de 48 horas en presencia y ausencia del residuo, durante 3 resiembras. Al término de cada subcultivo se observó el estado morfológico de las amibas, su viabilidad y su número.

Los tratamiento empleados fueron identificados como :

Subcultivo A : Presencia de residuo.

Subcultivo B : Ausencia de residuo.

Los resultados fueron tabulados con el siguiente criterio :

- (-) Amibas lisadas .
- (+/-) Escasa presencia de amibas y/o pronunciada redondez.
- (+) Número de amibas menor de 50 000 / ml.
- (++) Número de amibas igual o menor a 100 000 / ml.
- (+++) Número de amibas igual o menor a 200 000 / ml.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RESULTADOS .

4.1.1. Resultados de la extracción con hexano .

250 g del extracto hexánico .

4.1.2. Resultados del análisis fitoquímico preliminar .

Los cuales se describen a continuación .

4.1.2. RESULTADOS DEL ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR .

| ENSAYO | REACTIVO | COLOR TEORICO DEL REACTIVO | COLOR DE LA REACCION POSITIVA | RESULTADO |
|-------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------|
| ALCALOIDES | MEYER | BLANCO PAJA | PRECIPITADO COLOR CREMA . | (+) |
| | DRAGENDORFF | MARRON NARANJA | PRECIPITADO COLOR CASTAÑO ROJIZO | (+) |
| | ACIDO SILICOTUGSTICO | BLANCO - AMARILLO LIGERO | PRECIPITADO CRISTALINO | (+) |
| | HAGER | BLANCO | PRECIPITADO AMARILLO | (+) |
| | BICARBONATO DE SODIO | POLVO CRISTALINO GRANULADO BLANCO | PRECIPITADO CRISTALINO | (+) |
| SAPONINAS | ROSENTHALER | BLANCO - AMARILLO LIGERO | VIOLETA | (+) |
| TRITERPENOS | ANHIDRIDO ACETICO | TRANSPARENTE | SIN CAMBIOS | (-) |
| AZUCARES | BENEDICT | AZUL | ROJO LADRILLO | (+) |
| | FEHLING | AZUL | SIN CAMBIOS | (-) |
| TANINOS | AGUA DE BROMO | CAFE TRASLUCIDO | CASTAÑO ROJIZO | (+) |
| | CLORURO FERRICO | AZUL | VERDE OLIVA | (+) |

TAHLA 3. Resultados del análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de la corteza del tallo de Zanthoxylum liebmaniarun .

4.1.2. RESULTADOS DEL ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR. (continuación).

| ENSAYO | REACTIVO | COLOR TEORICO DEL REACTIVO | COLOR DE LA REACCION POSITIVA | RESULTADO |
|------------|----------|----------------------------|-------------------------------|-----------|
| GLUCOSIDOS | GRIGNARD | GRIS | SIN CAMBIOS | (-) |

Color del extracto hexánico : café claro.

(+) : resultado positivo.

(-) : resultado negativo.

TABLA 3. Resultados del análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de la corteza del tallo de Zanthoxylum liebmaniarum . (continuación)

4.1.3. Resultados del fraccionamiento preliminar del extracto hexánico .

FRACCIONAMIENTO VIA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

| ELUYENTE | PROPORCION | Nº DE FRACCIONES | FRACCIONES REUNIDAS | OBSERVACIONES |
|---------------------------|------------|------------------|---------------------|---------------|
| HEXANO | 100 % | 1 - 6 | 1 - 6 | DESCARTADA |
| HEXANO : ACETATO DE ETILO | 95:5 | 7 - 40 | 7 | DESCARTADA |
| HEXANO : ACETATO DE ETILO | 95:5 | 7 - 40 | 8 - 14 | DESCARTADA |
| HEXANO : ACETATO DE ETILO | 95:5 | 7 - 40 | 15 - 50 | DESCARTADA |
| HEXANO : ACETATO DE ETILO | 90:10 | 50 - 80 | 60 - 66 | ESTUDIADA |
| HEXANO : ACETATO DE ETILO | 90:10 | 50 - 80 | 67 - 80 | DESCARTADA |
| ACETATO DE ETILO | 100 % | 81 - 118 | 81 - 118 | DESCARTADA |

Las fracciones 60 - 66 se reunieron y después se trataron como se indica en punto N° 3.3.3.-

TABLA 4 . Cromatografía en columna del extracto hexánico de la corteza del tallo de Zanthoxylum liebmaniarum .

4.1.4. Resultados del efecto del residuo de la fracción del extracto hexánico sobre Entamoeba histolytica en medio axénico .

| TIEMPO/CONCENTRACION | 1 mcg/ml | 2.5 mcg/ml | 5 mcg/ml | 10 mcg/ml | CONTROL |
|------------------------------------|-------------|---------------|-------------|--------------|---------|
| RESIEMBRA 72 hrs. | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ |
| 1er. SUBCULTIVO "A" 48 hrs. "B" | +++ ++ | ++ +++ | +++ +++ | ++ +++ | +++ |
| 2do. SUBCULTIVO "A" 48 hrs. "B" | ++ ++ | +++ +++ | ++ ++ | ++ ++ | +++ |
| 3er. SUBCULTIVO "A" 48 hrs. "B" | - +/- | + + | +/- +/- | +/- + | +++ |

Los tratamientos empleados fueron identificados como :

- SUBCULTIVO "A" : presencia de residuo de la fracción del extracto hexánico.
- SUBCULTIVO "B" : ausencia de residuo.

- (-) Amibas lisadas.
- (+/-) Escasa presencia de amibas y/o pronunciada redondez.
- (+) Número de amibas menor a 50 000 / ml.
- (++) Número de amibas igual o menor a 100 000 / ml.
- (+++) Número de amibas igual o menor a 200 000 / ml.

TABLA 5 . Resultados del extracto hexánico de la corteza del tallo de Zanthoxylum liebmaniarum sobre Entamoeba histolytica .

D I S C U S I O N

El análisis fitoquímico preliminar demostró que la corteza del tallo del Colopatlhe (Zanthoxylum liebmaniarun), contenía saponinas, azúcares, taninos y alcaloides, siendo estos últimos una base importante para proseguir su estudio farmacológico, ya que frecuentemente estas sustancias poseen actividades terapéuticas útiles, tales como : efectos anticolinérgicos, por ejemplo la pilocarpina, que se usa en el tratamiento del glaucoma y combate la midriasis producida por la atropina. La fisostigmina, se ha recomendado en la atonía del músculo liso, intestinal y genitourinario. La atropina coadyuvante en la anestesia, para disminuir la salivación, causar broncodilatación y aumento de la frecuencia cardíaca, también para disminuir el dolor secundario al cólico renal. La nitidina, ha presentado excepcional actividad antileucémica, pero posee cierta toxicidad, por lo cual se prefiere su relacionado el alcaloide fagaronina, que carece de las propiedades citotóxicas de la nitidina.

La tecnología específica comprendió la obtención de un extracto en hexano, del cual mediante múltiples reactivos se le realizó un estudio fitoquímico para determinar la presencia de diferentes compuestos orgánicos; luego por cromatografía de columna y de placa fina, se aisló un residuo; que correlacionado el efecto farmacológico asignado a la planta en forma empírica, se determinó " in vitro " su acción sobre los trofozoitos de Entamoeba histolytica .

En el estudio "in vitro" , como se expone en la tabla de resultados 4.1.4. , los trofozoitos de Entamoeba histolytica cultivados en medio axénico, después de un tratamiento de dosis única y transcurridas 72 horas no mostraron alteraciones en su viabilidad y número, por el contrario su multiplicación siguió un patrón normal. Sin embargo, después de tres generaciones (subcultivos) de 48 horas, se observó una disminución en su número así como cambios morfológicos tales como vacuolización, redondez y lisis; estos se dió tanto en los subcultivos de dosis única como en los de mayor concentración de residuo hexánico.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

De las plantas medicinales utilizadas en algunas comunidades rurales del estado de Puebla, se eligió el Colopatle (Zanthoxylum liebmanniarum) por que se le usa contra la amebiasis, enfermedad muy común en esa zona y en toda la República .

A la corteza del tallo es la que se le atribuyen efectos terapéuticos, siendo la única parte de la planta estudiada .

Su análisis fitoquímico demostró la presencia de saponinas, azúcares, taninos y alcaloides. Así como la ausencia de glucósidos cianogénicos y triterpenos .

Se encontró un efecto amebicida en el extracto hexánico, que contiene los alcaloides, sobre el trofozoito de la Entamoeba histolytica, cepa H M I : I M S S en medio axénico, después de tres subcultivos, sin que existiera una diferencia significativa en cuanto a dosis única o dosis a mayor concentración .

B I B L I O G R A F I A

1. Abbott, D. ; R. S. Andrews. INTRODUCCION A LA CROMATOGRAFIA. Editorial Aihmbra S.A. México , D.F. 1981.
2. Adewole, L. ; D. Okunade. (-) licoide and antrepelent coumpound from Zanthoxylum setulosom J Hat Prod 48 (3) : 244 ; 1985.
3. Astudillo, V. Análisis químico de Erygium heterophyllum engel, y busueda del del principio activo en el control de cálculos biliares inducidos en el hamster. Tesis de Maestría Botánica. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Estado de México, 1983.
4. Bannerman, H. La medicina tradicional en el programa de la Organización Mundial de la Salud. Cronica. Ginebra, Suiza; 1987.
5. Bannerman, H. Organization and cooperation for development of studies of plants used en tradicional medicine. J of Etnopharmacology (2) 189-201; 1990.
6. Barajas, C. LOS ANIMALES USADOS EN LA MEDICINA POPULAR MEXICANA. Ed. Imprenta Universitaria; México, D.F. ; 1981.
7. Bates, R. B. ; J. P. Schaefer. TECNICAS DE INVESTIGACION EN QUIMICA ORGANICA. Editorial Pentice/Hall Internacional. España, 1987.
8. Biagi , F. ENFERMEADES PARASITARIAS. Editorial La Prensa Mexicana, S.A. 2 da. edición. México, D.F. ; 1984.
9. Botero, D. El tratamiento de la Amibiasis. Memoria. Conferencia Internacional sobre amibiasis. México, D.F. ; 1986.
10. Burbage, L. ; J. Wella. Incrementos de las perpectivas en la industria farma-
céutica internacional. Plantas Medicinales (19) 2: 26 - 30 ; 1983.
11. Cooperación económica y técnica en el sector farmacéutico. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo (PNUD); Guayana, 1979.

12. Cheng, T. L. GENERAL PARASITOLOGY. Ed. Academic Press. p. 455- 489. Nueva York USA, 1988.
13. David, L. ; B. Dreyes. Alkaloids of some mexican Zanthoxylum species. Phytochemistry 19 (5): 935, 1989 .
14. Del Amo, Silvia. PLANTAS MEDICINALES DEL ESTADO DE VERACRUZ. Ed. Instituto Nacional de Recursos Bióticos. Xalapa, Veracruz; México 1979.
15. De María y Campos, T. LOS ANIMALES EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA. Anales de Antropología , XVI . Universidad Autónoma de México; 1989.
16. Desarrollo de fármacos basados en plantas medicinales. Segunda consulta de la Industria farmacéutica. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI). Budapest, Hungría, 21-25 noviembre ; 1983.
17. Diamond, S.I. ; L. Bartgis. Axenic cultures for in vitro testing of drugs againts Entamoeba histolytica. Arch Inv Med 1 (supl 2) : 239 ; 1991.
18. Domínguez, X.A. ; C. Benavides . Zanthoxylum fagara y Zanthoxylum pletora Phytochemistry. 19: 630, 1984.
19. Domínguez, X.A. METODOS DE INVESTIGACION FITOQUIMICA. Editorial LIMUSA S.A. p. 345. México, D.F. 1981.
20. Espejo, O.N.; C. Cartuña. Estructura y actividad biológica del metronidazol posibles efectos de riesgo en el consumo de amebidas y antihelmínticos. Revista Instituto de Investigación Biomédica U.N.A.M. p. 21-32. México, D.F. 1990.
21. Estrada, L.E. Avances en la investigación sobre plantas medicinales en la Universidad de Chapingo. Departamento de Fitoquímica. Sección Plantas Medicinales, Mimeógrafo. Estado de México; 1985.
22. Estrada, L.E. ; N. A. Senties. Las plantas medicinales del Valle de Tehuacán. Puebla. Conferencia Congreso Latinoamericano de Botánica. Lima, Perú; 1982.

23. Estrada, L. E. Estudio biológico y cotejo experimental de la yerba de sapo Eryngium heterophyllum engelm en la prevención y curación de los cálculos biliares inducidos en el hamster dorado Mesonictetus aratus. Tesis de Maestría. Centro de Botánica. Colegio de Postgraduados. México, 1979.
24. Fish, F.A. ; I. Gray; P. Waterman. Coumarin and lignans from the bark of Zanthoxylum avicennae. Phytochemistry 14 841; 1985.
25. Goldstein, A.; L. Arrow . FARMACOLOGIA. Editorial Limusa S.A. México, D.F. 1989.
26. Graig, T. L. ; E. Faust. CLINICAL PARASITOLOGY Editorial Lea-Fabiger. 5 ta. edición. p. 25-30. Londres, 1988.
27. Heywood, V. H. FLOWERING PLANTS OF THE WORLD. Ed. University Press. Londres, 1989.
28. Hisashi, I. ; P. Chamount. Zanthoxamidas and aromatic amides from Zanthoxylum thomense. Phytochemistry 11 (24) : 2720; 1982.
29. Informe de la Conferencia Internacional sobre Atención Primaria de Salud. Organización Mundial de la Salud. Crónica. Alma-Ata; U.R.S.S., 6-12 septiembre, 1988.
30. Ichioro, Y. ; K. Takeda. Two new pungent principles isolated from the pericarps of Zanthoxylum alataoides. Chem Pharm Bull 29 (6): 1791; 1986.
31. Jonas, A. ñ F. Stermitz . 2,5 dibenzil-1,4-dimetihyl-piperazina a novel alkaloid from Zanthoxylum arborescens. Tet lett 22 (52): 5257 ; 1981.
32. Krelier, J.P. PARASITOLOGY PROTOZOA. Ed Academic Press. p. 216-217. Nueva York, USA, 1983.
33. Kumate, J. ; G. Gutierrez. MANUAL DE INFECTOLOGIA. Ediciones Médicas. Hospital Infantil de México. p 55-56. México, D.F. 1992.
34. Lamy, Ph. ; C. Zolla. La etnobotánica en relación con los problemas de la salud en México. Medicina Tradicional II. (5) 19-35; 1988.
35. Litter, M. COMPENDIO DE FARMACOLOGIA. Ed El ateneo. p. 664-668. México, D.F.; 1993.

36. Mannito, P. ; P.G. Sammers. BIOSYNTESIS OF NATURAL PRODUCT. Johns Wiley and Jons Ed. N.Y.; 1981.
37. Martinez, M. LAS PLANTAS MEDICINALES EN MEXICO. Ediciones Botas. p.99-103. México, D.F. ; 1979.
38. Navarrete, C. ; B. Reyes T. Estudio Químico de Zanthoxylum caribeaum.XVI Simposium Internacional de Química de Productos Naturales.. Monterrey,N.L. 28-30 abril;.1987.
39. Stites, D.P. ; Terr, A. I. INMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. Séptima edición. México, D.F. 1989.
40. Pezzuto, J. M. ; S. K. Antosiak. Interation of the antileurenic alkaloids 2-hidroxy-3,8,9-trimetoxy-5-metil-benzo-phenantridina. Arch Pharm 234: 338, 1986.
41. Rodríguez, C.R. ; P. C. Rubio. VADEMECUM ACADEMICO DE MEDICAMENTOS. Tomo I Ediciones programa del libro Universitario. México, D.F.; 1983.
42. Rivero, S. Conferencia IX Seminario sobre La Amibiasis.Arch Inv Med 13(supl 3) 5-7 ; 1988.
43. Segura, J. ; R. López. Inhibición de la síntesis de proteínas por la emetina en cepas axénicas de Entamoeba histolytica y Entamoeba invasora. Memorias Conferencia Internacional sobre Amibiasis. México, D.F.; 1986.
44. Sepulveda, B. La amibiasis invasora por Entamoeba histolytica. Gaceta Médica de México. (100) 210-254; 1985.
45. Simeray, J. ; P. Tsutomu. Studies on the chemical constituents a trutaceus. J Chem Soc Perkins Trans 1 : 2051; 1982.
46. Sofowora, A.E. Reversalof akling and cremation in Erythrocytes by the root of facara zanthoxyloides. Lloydia 34 (4) :383 ; 1981.
47. Stanley, P.C. TREES AND SHRUBS OF MEXICO. Government printing office. Washington, D.C. p. 503-533 ;1920.

48. Stein, J. H. MEDICINA INTERNA. Editorial Salvat S.A. p. 2053. México, D.F. 1984 .-
49. Swinehart, J. A. ; F. R. Stermitz. Bishordenyl terpene alkaloids and other constituents of Zanthoxylum culliantrillo and Zanthoxylum coriaceum. Phytochemistry 19 (7): 219; 1980.-
50. Tempesta, E. Evaluation of local resources in traditional medicine. J of Ethnopharmacology. (2) 163-165; 1980.-
51. Thompson, P.E. Pharmacology of antiamebic drug. Arch Inv Med (supl 1),165: 245; 1991 .-
52. Trease, G. E. ; Evans, W. Ch. TRATADO DE FARMACOGNOSIA. Editorial Interamericana S.A. de C.V. 12va. Edición. México, D.F. ' 1987.-
53. Vasquez, J. EXAMEN CUANTITATIVO DE LA PRESENCIA DE ALCALOIDES EN PLANTAS COLECTADAS EN EL ESTADO DE MORELOS. Ciencias 29 (2): 139-150; 1985.-
54. Youngken, H. W. ; Giral, F. TRATADO DE FARMACOGNOSIA. Editorial Atlante, S.A. México, D.F.; 1988.-
55. Zhing, CH. ; T. Teng. Studies on the chemical constituents of the Zanthoxylum simulans. Skimianine, eduline, ribaline araliopsione. YaoXue Xuebao 16 (5): 392; 1981 .-

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

A P E N D I C E

a) Reactivo de Mayer.

Disolver 1.36 gr de cloruro de mercurio en 60 ml de agua y 5 gr de yoduro de potasio. Se mezclan las dos soluciones y se afora a 100 ml de agua.

b) Reactivo de Hager.

Se hace una solución saturada de ácido pícrico en agua.

c) Reactivo de Wagner.

Se disuelven 12.7 gr de yodo y 20 gr de yoduro de potasio aforándose a 1 litro.

d) Reactivo de Dragendorff.

8 gr de subnitrito de bismuto se disuelven en 20 ml de ácido nítrico concentrado. En muy poca agua se disuelven 22.7 gr de yoduro de potasio, se mezclan ambas soluciones, se decanta para separar los cristales de nitrato de potasio y se diluye con agua a 100 ml.

e) Reactivo de ácido sílico-túngstico.

12 gr se disuelven en 100 ml de agua.

f) Reactivo de Rosenthaler.

Un gramo de vainillina se diluye con etanol a 100 ml.

g) Agua de bromo.

Solución saturada con vapores de bromo.

h) Cloruro férrico.

Se prepara una solución al 1 % en agua.

i) Reactivo de Grignard.

1 gr de carbonato de sodio más 100 mg de ácido pícrico se afora a 100 ml de agua.

j) Reactivo de Fehling.

Solución A : 3.5 gr de sulfato de cobre pentahidratado se diluyen a 50 ml de agua.

Solución B : 17.5 gr de tartrato de sodio y potasio más 5 gr de hidróxido de sodio son llevados a 50 ml de agua.

k) Reactivo de Benedict.

17.3 gr de citrato de sodio, 10 gr de carbonato de sodio anhidro se disolvieron en 60 ml de agua, la cual se añade lentamente y agitando 1.73 gr de sulfato de cobre pentahidratado en 15 ml de agua es aforada a 100 ml .

l) Cultivo axénico de Entamoeba histolytica.

Para el cultivo axénico de Entamoeba histolytica se utiliza el medio de cultivo TY-I-S-33 constituido por los siguientes componentes :

CALDO NUTRITIVO T Y

| | <u>Cantidades en gramos</u> |
|---|-----------------------------|
| Peptona tripticasa | 2.0 |
| Extracto de levadura | 1.0 |
| Dextrosa | 1.0 |
| Cloruro de sodio | 0.2 |
| Fosfato de potasio monobásico | 0.06 |
| Fosfato de potasio dibásico | 0.1 |
| Acido L-ascórbico | 0.02 |
| Clorhidrato de L-cisteína monohidratada | 0.1 |
| Citrato de amonio férrico | 0.00228 |
| Agua destilada | 87 ml |

PROCEDIMIENTO .

Se disuelven los reactivos en el orden presentados con aproximadamente 50 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 6,8 - 6,9 con NaOH 0.1 ml ; después se llevan a un volumen de 87 ml con agua destilada. El medio T - Y se clarifica mediante filtración a través de filtro Whatman # 1 y se esteriliza en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO TY - S - 33 .

Para cada 75 ml de caldo TY, se adiciona en condiciones estériles 3 ml de de mezcla vitamínica Microlab y 15 ml de suero bovino inactivado durante 30 minutos a 56 ° C .

PRUEBA DE ESTERILIDAD .

Esta prueba de esterilidad se lleva a cabo para determinar la existencia de una posible contaminación por bacterias, y es como sigue: se incuba el medio TY-I-S-33 durante 24 horas a 37° C.

Transcurrido este tiempo se observa al microscopio con el fin de descartar una posible contaminación.

INOCULACION DE LOS TROFOZOITOS AL MEDIO DE CULTIVO TY-I-S-33 .

Para la inoculación de trofozoitos al medio TY-I-S-33 se llenaron en forma estéril tubos de ensaye con tapón de rosca de 12 ml de medio. Los tubos con crecimiento óptimo de amibas fueron enfiados en un baño de hielo por 5 minutos, para desprender las células de la pared del tubo, se invirtió en 10 ocasiones para su homogenización y se realizó el conteo del número de trofozoitos resebrados con un inóculo de 1.2×10^4 amibas en 0.3 ml.

NUMERO Y VIABILIDAD DE TROFOZOITOS .

La determinación del número de células se realizó mediante el uso de una cámara de Neubauer y una pipeta para glóbulos blancos, con los siguientes cálculos :

$$\frac{A \times B \times C}{D} = \text{células / ml}$$

Donde :

A = Suma de los cuatros cuadrantes grandes de la cámara de Neubauer.

B = Dilución de la pipeta 1 : 20 .

C = Factor para determinar el valor por mm^3 (10) .

D = Número de cuadrantes (4) .

E = Factor para determinar el valor por ml (1000) .

La viabilidad se determina utilizando azul de triptano al 0.04 % considerando como ambas viabiles aquellas que no eran permeables al colorante.

G L O S A R I O

| | |
|--------------------------|---|
| Anticolinérgico. | Agente que bloquea el paso de los impulsos a través de los nervios parasimpáticos. Parasympaticolítico. |
| Anticonvulsivo. | Agente propio para combatir las convulsiones. |
| Antiepiléptico. | Remedio contra la epilepsia. |
| Antiinflamatorio. | Que causa disminución de la inflamación. |
| Antigripal. | Agente sintomático contra el catarro común. |
| Antimicrobiano. | Que impide el desarrollo de los microbios. |
| Astringente. | Sustancia que produce constricción y sequedad. |
| Antipirético. | Agente que se usa contra la hipertermia o fiebre. |
| Atonía. | Falta de la fuerza o tono normal de un órgano contráctil. |
| Broncodilatación. | Acción de dilatar el árbol bronquial. |
| Caústico. | Quemante o corrosivo, destructor de tejido vivo. |
| Citotóxicas. | Que posee la acción de una citotoxina. |
| Diurético. | Agente que aumenta la secreción de orina. |
| Erisipela. | Enfermedad aguda febril y eruptiva, causada por el <u>Streptococcus erysipelatis</u> , caracterizada por placas rojas y reborde bien definido y ataque al estado general. |
| Glaucoma. | Enfermedad del ojo, caracterizada por aumento de la presión intraocular, dureza del globo del ojo, atrofia de la papila y ceguera. |
| Ictericia. | Coloración amarilla de la piel, mucosas y secreciones, debido a la presencia de pigmentos biliares en la sangre. |
| Pungente. | Punzante, acción irritante particular, acompañado de una sensación de picor. |
| Repelente. | Que repele, por su olor o naturaleza a insectos, parásitos, etc. |