

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE LOS EXTRACTOS DE
Artemisia ludoviciana, Chenopodium ambosioides,
Flourensia cernua, Marrubium vulgare, Mentha spicata Y SU
DETERMINACIÓN COMO ACTIVIDAD AMEBICIDA,
GIARDICIDA Y BACTERICIDA

Por

M.C. Mónica Celina Ramos Guerra

Tesis Doctoral
(Microbiología)

2005

CARACTERIZACION PARCIAL DE LOS EXTRACTOS DE
Artemisia ludoviciana, *Chenopodium ambosioides*,
Flourensia cernua, *Marrubium vulgare*, *Mentha spicata* Y SU
DETERMINACIÓN COMO ACTIVIDAD AMEBICIDA,
GIARDICIDA Y BACTERICIDA

Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño (Director)

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta (Secretario)

Dr. Benito David Mata Cárdenas (Vocal Director Externo)

Dra. Azucena Oranday Cárdenas (Vocal)

Dr. Javier Vargas Villarreal (Vocal)

CARACTERIZACION PARCIAL DE LOS EXTRACTOS DE
Artemisia ludoviciana, *Chenopodium ambosioides*,
Flourensia cernua, *Marrubium vulgare*, *Mentha spicata* Y SU
DETERMINACIÓN COMO ACTIVIDAD AMEBICIDA,
GIARDICIDA Y BACTERICIDA

Comité Académico de Doctorado

Dra. Julia Verde Star.
Subdirector de Estudios de Postgrado.

TABLA DE CONTENIDO

| Sección | Página |
|--|--------|
| 1. RESUMEN Y ABSTRACT..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 3. HIPOTESIS..... | 25 |
| 4. OBJETIVOS..... | 26 |
| 4.1 Objetivo general | |
| 4.2 Objetivos específicos | |
| 5. ANTECEDENTES..... | 28 |
| 5.1 Efecto de los extractos de plantas sobre <i>E. histolytica</i> | 28 |
| 5.2 Efecto de los extractos de plantas sobre <i>G. lamblia</i> | 30 |
| 5.3 Efecto de los extractos de plantas sobre bacterias | 31 |
| 5.4 Importancia del presente trabajo | 35 |
| 5.5 Originalidad y justificación | 36 |
| 5.6 Contribución y perspectivas | 36 |
| 6 MATERIAL Y MÉTODOS..... | 38 |
| 6.1 Origen de los reactivos | 38 |
| 6.2 Material biológico | 38 |
| 6.2.1 Cepa de HM1: IMSS de <i>E. histolytica</i> | 38 |
| 6.2.2 Cepa de <i>G. lamblia</i> IMSS 0889 | 39 |
| 6.3 Cepas bacterianas | 39 |
| 6.4 Preparación de suero | 39 |
| 6.4.1 Suero bovino estéril | 39 |
| 6.5 Preparación de los medios de cultivo | 40 |
| 6.5.1 Medio basal (PEHP)..... | 40 |
| 6.5.2 Medio basal TYI..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 6.5.3 Medio completo PEHPS y TYI..... | 41 |
| 6.5.4 Caldo Soya-Trypticasa..... | 41 |
| 6.5.5 Agar Soya-Trypticasa..... | 41 |
| 6.6 Cultivo axénicos de protozoarios..... | 42 |
| 6.6.1 Resiembra..... | 42 |
| 6.7 Cinética de crecimiento..... | 43 |
| 6.7.1 <i>Entamoeba histolytica</i> | 43 |
| 6.7.2 <i>Giardia lamblia</i> | 43 |
| 6.8 Cultivos bacterianos..... | 44 |
| 6.8.1 Ajuste de los inóculos bacterianos..... | 44 |
| 6.9 Colecta de las plantas..... | 44 |
| 6.9.1 Localización..... | 44 |
| 6.10 Obtención de los extractos..... | 46 |
| 6.10.1 Extractos acuosos..... | 46 |
| 6.10.2 Extractos hexánios..... | 48 |
| 6.10.3 Extractos acetónicos..... | 48 |
| 6.10.4 Extractos metanólicos..... | 49 |
| 6.11 Obtención de la CI ₅₀ en <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> de los extractos de cada planta y el metronidazol..... | 50 |
| 6.11.1 Incorporación de los extractos de las plantas a los medios de cultivo y la obtención de la IC ₅₀ | 50 |
| 6.12 Análisis estadístico de la CI ₅₀ usando el método Pobit.... | 52 |
| 6.13 Obtención de la CMB de los extractos de las plantas sobre las bacterias..... | 52 |
| 6.13.1 Técnicas de dilución en tubo usando los extractos de las plantas sobre el crecimiento de las bacterias... | 53 |
| 6.14 Identificación de los metabolitos secundarios de los Extractos de las plantas por métodos químicos..... | 53 |
| 6.14.1 Prueba de Liebermann-Burchard..... | 53 |
| 6.14.2 Prueba de Salkowski..... | 54 |
| 6.14.3 Prueba del ácido sulfúrico..... | 54 |
| 6.14.4 Prueba de Baljet..... | 54 |
| 6.14.5 Prueba de Dragendorff..... | 55 |
| 6.14.6 Prueba de permanganato de potasio..... | 55 |
| 6.14.7 Prueba de cloruro férrico..... | 55 |
| 6.14.8 Prueba de Molisch..... | 56 |
| 6.14.9 Prueba de bicarbonato de sodio..... | 56 |
| 6.15 Cromatografía en placa fina de los extractos..... | 57 |
| 6.16 Aislamiento de las fracciones..... | 58 |
| 6.17 Efecto de las fracciones sobre <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> | 59 |
| 6.18 Determinación de los grupos funcionales de las fracciones aisladas..... | 59 |
| 7. RESULTADOS..... | 60 |
| 7.1 Relación temporal del crecimiento de las cepas..... | 60 |
| 7.1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> | 60 |

| | |
|--|----|
| 7.1.2 <i>Giardia lamblia</i> | 61 |
| 7.2 Determinación del efecto del metronidazol sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> | 63 |
| 7.3 Determinación de la CI ₅₀ de los extractos de las Plantas sobre <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> | 65 |
| 7.3.1 <i>E. histolytica</i> | 65 |
| 7.3.2 <i>G. lamblia</i> | 67 |
| 7.4 Determinación de la CMB de los extractos sobre <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. cholerasuis</i> y <i>S. flexneri</i> | 68 |
| 7.5 Determinación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de cada planta..... | 69 |
| 7.6 Separación en fracciones del extracto de <i>M. vulgare</i> usando cromatografía en placa fina..... | 72 |
| 7.7 Efecto de las fracciones sobre <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> ... | 73 |
| 7.8 Determinación de los grupos funcionales en las bandas..... | 73 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 74 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 86 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 89 |

CARACTERIZACION PARCIAL DE LOS EXTRACTOS DE
Artemisia ludoviciana, *Chenopodium ambosioides*,
Flourensia cernua, *Marrubium vulgare*, *Mentha spicata* Y SU
DETERMINACIÓN COMO ACTIVIDAD AMEBICIDA,
GIARDICIDA Y BACTERICIDA

Comité de Tesis

Dra. Licet Villarreal Treviño (Director)

Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta (Secretario)

Dr. Benito David Mata Cárdenas (Vocal Director Externo)

Dra. Azucena Oranday Cárdenas (Vocal)

Dr. Javier Vargas Villarreal (Vocal)

CARACTERIZACION PARCIAL DE LOS EXTRACTOS DE
Artemisia ludoviciana, *Chenopodium ambosioides*,
Flourensia cernua, *Marrubium vulgare*, *Mentha spicata* Y SU
DETERMINACIÓN COMO ACTIVIDAD AMEBICIDA,
GIARDICIDA Y BACTERICIDA

Comité Académico de Doctorado

Dra. Julia Verde Star.
Subdirector de Estudios de Postgrado.

A DIOS:

Que ha sido mi Fortaleza
y por permitirme seguir con vida

A mi Niña:

Victoria Ramos Guerra
Con todo mi AMOR...
Por tener la paciencia y cederme tu
tiempo para la realización de este trabajo

A mis Padres:

Ing. Juan José de Jesús Ramos Cantú
Gloria Dalia Guerra Cavazos
Con Cariño y Respeto

A mi Hermana:

Q.B.P. Viviam Soraya O. Hernández Díaz
Va por las dos!!!

A mi Amigo:

Biól. Luis Antonio Segura Tovar
Por estos veinte años de Amistad
GRACIAS!!!

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Licet Villarreal Treviño por sus consejos, asesoría y ayuda en la realización de la presente tesis en el área microbiológica y por la revisión y redacción de ésta....GRACIAS.

Al Dr. Benito David Mata Cárdenas por brindarme la oportunidad de llevar a cabo la presente tesis, por sus consejos, ayuda, asesoría y amistad. Por la dirección de la parte experimental de protozoología.

Mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la Beca No. 170465 otorgada para la realización de la presente tesis.

Agradezco también al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT-UANL) por el apoyo CN 703-02 para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal por su invaluable ayuda en la redacción de esta tesis, por su orientación, sus atinados consejos y observaciones, y por brindarme su amistad.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, por sus consejos y ayuda para la realización de la parte experimental de Química Orgánica.

Al Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta por sus consejos y aceptar ser parte de mi Comité de Tesis.

Al Dr. Fernando Jiménez Guzmán por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Salvador Said Fernández de mi Comité Tutorial. Por sus atinadas observaciones, orientación y por estar al pendiente que no faltara material para trabajar; mi mas sincero agradecimiento.

Al Dr. Carlos Hernández Luna de mi Comité Tutorial por sus consejos y amistad.

Al Dr. José Antonio Heredia Rojas de mi Comité Tutorial por sus consejos, ayuda, orientación, entusiasmo y amistad de tiempo atrás. Por estar siempre al pendiente de la realización de la presente.

A la M en C. María del Consuelo Gonzáles De la Rosa y al Biól. Marco Antonio Guzmán Lucio por su ayuda en la identificación de las plantas estudiadas en la presente investigación.

Al Q.B.P. Juan José Gutiérrez García por su ayuda y mostrarme esos trucos “mitos y realidades” que solo se adquieren con la experiencia para la realización de las cromatografías.

A la M. en C. María Guadalupe DeWitt Sepúlveda por su amistad, apoyo y por facilitarme literatura correspondiente a plantas medicinales.

A mis compañeros del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS: Manuel Gutiérrez Rueda, M en C Rebeca Palacios, Q.F.B. Leticia Navarro Marmolejo, M.V.Z. Héctor Gerardo Lozano Garza y Dr. Francisco González Salazar por su amistad.

Al Sr. Abel Navarro por todas las facilidades otorgadas en la recuperación de referencias bibliográficas.

A la Dra. Gloria María Molina Salinas por su apoyo y amistad.

Al Dr. Baldemar Escobar González, “El Vaquero”, por su desinteresada amistad, por su apoyo moral y por su ayuda incondicional.

A mis compañeras del Laboratorio de Parasitología: Q.B.P. Ma. Margrita González Rivera, a mi amigocha T.L.C. Maria Elena “Nené” García De la Rosa, a Doña Leo y Doña Marina por su apoyo, consejos y amistad.

Al Biól. Luis Antonio Segura Tovar por su apoyo y tolerancia en mis momentos críticos durante la realización de la presente tesis.

A todas aquellas personas que no menciono pero que de alguna manera ayudaron a la realización de esta tesis....GRACIAS!!!

El desarrollo experimental de la presente tesis se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología General y en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Laboratorio de Biología Celular y Bioquímica del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social.

TABLA DE CONTENIDO

| Sección | Página |
|--|--------|
| 1. RESUMEN Y ABSTRACT..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 3. HIPOTESIS..... | 21 |
| 4. OBJETIVOS..... | 22 |
| 4.1 Objetivo general | |
| 4.2 Objetivos específicos | |
| 5. ANTECEDENTES..... | 24 |
| 5.1 Efecto de los extractos de plantas sobre <i>E. histolytica</i> | 24 |
| 5.2 Efecto de los extractos de plantas sobre <i>G. lamblia</i> | 26 |
| 5.3 Efecto de los extractos de plantas sobre bacterias | 27 |
| 5.4 Importancia del presente trabajo | 29 |
| 5.5 Originalidad y justificación | 30 |
| 5.6 Contribución y perspectivas | 30 |
| 6 MATERIAL Y MÉTODOS..... | 32 |
| 6.1 Origen de los reactivos | 32 |
| 6.2 Material biológico | 32 |
| 6.2.1 Cepa de HM1: IMSS de <i>E. histolytica</i> | 32 |
| 6.2.2 Cepa de <i>G. lamblia</i> IMSS 0889 | 33 |
| 6.3 Cepas bacterianas | 33 |
| 6.4 Preparación de suero | 33 |
| 6.4.1 Suero bovino estéril | 33 |
| 6.5 Preparación de los medios de cultivo | 34 |
| 6.5.1 Medio basal (PEHP)..... | 34 |
| 6.5.2 Medio basal TYI..... | 34 |
| 6.5.3 Medio completo PEHPS y TYI..... | 34 |
| 6.5.4 Caldo Soya-Trypticasa..... | 35 |
| 6.5.5 Agar Soya-Trypticasa..... | 35 |
| 6.6 Cultivo axénicos de protozoarios..... | 36 |
| 6.6.1 Resiembra..... | 36 |
| 6.7 Cinética de crecimiento..... | 36 |
| 6.7.1 <i>Entamoeba histolytica</i> | 36 |
| 6.7.2 <i>Giardia lamblia</i> | 37 |
| 6.8 Cultivos bacterianos..... | 37 |
| 6.8.1 Ajuste de los inóculos bacterianos..... | 37 |

| | | |
|--------|---|----|
| 6.9 | Colecta de las plantas..... | 38 |
| 6.9.1 | Localización..... | 38 |
| 6.10 | Obtención de los extractos..... | 40 |
| 6.10.1 | Extractos acuosos..... | 40 |
| 6.10.2 | Extractos hexánios..... | 41 |
| 6.10.3 | Extractos acetónicos..... | 42 |
| 6.10.4 | Extractos metanólicos..... | 42 |
| 6.11 | Obtención de la CI ₅₀ en <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> de los extractos de cada planta y el metronidazol..... | 44 |
| 6.11.1 | Incorporación de los extractos de las plantas a los medios de cultivo y la obtención de la IC ₅₀ | 44 |
| 6.12 | Análisis estadístico de la CI ₅₀ usando el método Pobit.... | 45 |
| 6.13 | Obtención de la CMB de los extractos de las plantas sobre las bacterias..... | 45 |
| 6.13.1 | Técnicas de dilución en tubo usando los extractos de las plantas sobre el crecimiento de las bacterias... | 46 |
| 6.14 | Identificación de los metabolitos secundarios de los Extractos de las plantas por métodos químicos..... | 46 |
| 6.14.1 | Prueba de Liebermann-Burchard..... | 46 |
| 6.14.2 | Prueba de Salkowski..... | 47 |
| 6.14.3 | Prueba del ácido sulfúrico..... | 47 |
| 6.14.4 | Prueba de Baljet..... | 47 |
| 6.14.5 | Prueba de Dragendorff..... | 47 |
| 6.14.6 | Prueba de permanganato de potasio..... | 48 |
| 6.14.7 | Prueba de cloruro férrico..... | 48 |
| 6.14.8 | Prueba de Molisch..... | 48 |
| 6.14.9 | Prueba de bicarbonato de sodio..... | 49 |
| 6.15 | Cromatografía en placa fina de los extractos..... | 49 |
| 6.16 | Aislamiento de las fracciones..... | 50 |
| 6.17 | Efecto de las fracciones sobre <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> | 51 |
| 6.18 | Determinación de los grupos funcionales de las fracciones aisladas..... | 51 |
| 7. | RESULTADOS..... | 52 |
| 7.1 | Relación temporal del crecimiento de las cepas..... | 52 |
| 7.1.1 | <i>Entamoeba histolytica</i> | 52 |
| 7.1.2 | <i>Giardia lamblia</i> | 54 |
| 7.2 | Determinación del efecto del metronidazol sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> | 55 |
| 7.3 | Determinación de la CI ₅₀ de los extractos de las Plantas sobre <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> | 56 |
| 7.3.1 | <i>E. histolytica</i> | 56 |
| 7.3.2 | <i>G. lamblia</i> | 58 |
| 7.4 | Determinación de la CMB de los extractos sobre <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. cholerasuis</i> y <i>S. flexneri</i> | 59 |
| 7.5 | Determinación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de cada planta..... | 60 |
| 7.6 | Separación en fracciones del extracto de <i>M. vulgare</i> usando | |

| | |
|--|----|
| cromatografía en placa fina..... | 63 |
| 7.7 Efecto de las fracciones sobre <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> ... | 64 |
| 7.8 Determinación de los grupos funcionales en las bandas..... | 64 |
| 8. DISCUSIÓN..... | 65 |
| 9. CONCLUSIONES..... | 74 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA..... | 76 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1. CI ₅₀ de los extractos de las plantas contra <i>E. histolytica</i> | 57 |
| 2. CI ₅₀ de los extractos de las plantas contra <i>G. lamblia</i> | 58 |
| 3. CI ₅₀ de los extractos de las plantas contra ambos protozoarios..... | 59 |
| 4. CMB de los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de todas las plantas contra <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. aureus</i> , <i>S. cholerasuis</i> y <i>S. flexneri</i> | 60 |
| 5. CMB de los extractos acuosos de todas las plantas contra <i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. aureus</i> , <i>S. cholerasuis</i> y <i>S. flexneri</i> | 60 |
| 6. Metabolitos secundarios presentes en los extractos..... | 62 |
| 7. Efecto de los compuestos aislados sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> | 64 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Trofozoíto y quiste de <i>Entamoeba histolytica</i> | 5 |
| 2. Trofozoíto y quiste de <i>G. lamblia</i> | 7 |
| 3. <i>Artemisia ludoviciana</i> | 11 |
| 4. <i>Chenopodium ambrosioides</i> | 13 |
| 5. <i>Flourensia cernua</i> | 15 |
| 6. <i>Marrubium vulgare</i> | 16 |
| 7. <i>Mentha spicata</i> | 18 |
| 8. Mapa del estado de Galeana, N.L.:..... | 39 |
| 9. Filtración del extracto acuoso..... | 40 |
| 10. Liofilización del extracto acuoso..... | 41 |
| 11. Obtención de los extractos con solventes..... | 43 |
| 12. Extractos en el sheker en agitación constante..... | 43 |
| 13. Placa de porcelana con pruebas coloridas..... | 49 |
| 14. Corrimiento de las muestras en cromatoplasmas de sílica gel..... | 50 |
| 15. Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> | 53 |
| 16. Cinética de crecimiento de <i>G. lamblia</i> | 54 |
| 17. Relación entre la cantidad de metronidazol sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i> | 55 |
| 18. Relación entre la cantidad de metronidazol sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i> | 56 |
| 19. Cromatografía en placa fina del extracto de <i>Marrubium vulgare</i> | 63 |

NOMENCLATURA

| | |
|------------------|---|
| ATCC | American type Culture Collection |
| °C | Grados Celsius |
| CIVIN | Centro de Investigación Biomédica del Noreste |
| CI ₅₀ | Concentración Inhibitoria Media |
| cm | Centímetros |
| CMB | Concentración Mínima Bactericida |
| cols. | Colaboradores |
| Depto. | Departamento |
| EU | Estados Unidos de América |
| FDA | Food Drug Administration |
| g | Gramo |
| h | Horas |
| IMSS | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| L | Litro |
| m | Metro |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |
| µg | Microgramos |
| µL | Microlitros |
| N | Concentración normal |
| N. L. | Nuevo León |
| Rf | Factor de retardo (cociente de frentes) |
| SS | Secretaría de Salud |
| TLC | Thin Layer Chromatography |
| UANL | Universidad Autónoma de Nuevo León |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | World Health Organization |
| λ | Longitud de onda |
| β | Beta |

| | |
|---|------------|
| + | Positivo |
| - | Negativo |
| % | Porcentaje |

1. RESUMEN

En la actualidad el uso indiscriminado de medicamentos y la aparición de cepas con drogo-resistencia, han traído como consecuencia el resurgimiento de enfermedades ancestrales como tuberculosis, ántrax, amibiasis, giardiasis y enfermedades bacterianas que producen diarrea. Por ello, es imperante el buscar y desarrollar otras vías para descubrir nuevos medicamentos. Una alternativa viable son las plantas medicinales, consideradas como una importante fuente para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. En México, se cuenta con una gran diversidad botánica, y solo un bajo porcentaje ha sido estudiado científicamente. En este trabajo nos propusimos explorar la actividad citotóxica *in vitro* contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* de los extractos acuosos, hexánicos, acetónicos, y metanólicos de la parte aérea de las plantas *Artemisia ludoviciana*, *Chenopodium ambrosioides*, *Marrubium vulgare*, *Flourensia cernua* y *Mentha spicata*. Para determinar la actividad citotóxica de los extractos adaptamos el modelo para obtener la CI_{50} *in vitro* para los protozoarios y la CMB para las bacterias y recurrimos al método estadístico de Probit para este propósito. Se realizaron curvas de crecimiento para *E. histolytica* donde el tiempo de duplicación fue de 33.76 h y para *G. lamblia* de 10.36 h, con un inóculo de 5,000 amibas/mL y 10,000 giardias/mL y por regresión lineal definimos 3 días de incubación como máximo para ambos protozoarios. Para el modelo de la CI_{50} se probó el efecto del metronidazol en ambos parásitos. Usando Probit determinamos una CI_{50} para *E. histolytica* de 0.124 $\mu\text{g/mL}$ y para *G. lamblia* de 0.205 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, utilizamos el modelo de la CMB para las bacterias ya mencionadas utilizando las técnicas de dilución en tubo y la difusión en agar. La técnica más eficaz para esta investigación fue la dilución en tubo usando el cloranfenicol como testigo positivo. Una vez probados los modelos de CI_{50} y CMB, analizamos la actividad antiprotozoaria y bactericida de todos los extractos de las plantas. Obtuvimos los extractos y usamos el poder de disolución máxima para ajustar las concentraciones. Se observó que las CI_{50} en los extractos acuosos no bajaron de 100 $\mu\text{g/mL}$ para ambos protozoarios. Encontramos que la CI_{50} bajaron considerablemente cuando usamos los extractos polares y medianamente polares, siendo los más bajos, el acetónico del marrubio con 7 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y el metanólico de yerbabuena con 8 $\mu\text{g/mL}$ para *G. lamblia*. Además encontramos que los extractos metanólico del marrubio y el acetónico de hierbabuena fueron muy similares con una CI_{50} de 12 y 13 $\mu\text{g/mL}$ y el hexánico y acetónico del epazote con 57 y 58 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Se probó la efectividad citotóxica de los extractos de cada planta sobre las bacterias encontrando que solo el extracto acuoso de las plantas *Marrubium vulgare* y *Mentha spicata* tuvieron un efecto sobre *S. aureus* a concentraciones de 5 y 5.5 mg/mL . También se definió conocer los metabolitos secundarios de los extractos de cada una de las plantas, detectando sesquiterpenlactonas, dobles enlaces, oxidrilos fenólicos, azúcares, lactonas, alcaloides, saponinas, triterpenos y compuestos esteroidales. Así mismo separamos por cromatografía en placa fina el extracto metanólico de *M. vulgare* siendo el de menor CI_{50} para ambos protozoarios. Determinamos el R_f de 5 manchas: 0.94, 0.90, 0.84, 0.25 y 0.17 La fracción con mayor % de inhibición (41%) fue para *E. histolytica* con la fracción de 0.25 y para *G. lamblia* la fracción con R_f de 0.90 con un 40%, las cuales pertenecen a las sesquiterpenlactonas.

ABSTRACT

At the present time the indiscriminate medicine use and the appearance of stocks with drug-resistance, have brought like consequence the resurgence of ancestral diseases as: tuberculosis, anthrax, amebiasis, giardiasis and diseases bacterial that produce diarrhea. For that reason, this is prevailing looking for and to develop other routes to discover new medicines, a viable alternative are the medicinal plants, considered like an important source for the development of new quimiotherapeutic agents. Mexico, it is counted on a great botanical diversity, and a low percentage has been studied scientifically. In this work we steed out to explore the cytotoxic activity *in vitro* against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexnieri* and *Staphylococcus aureus* of the aqueous, hexanic, acetic extracts, and methanolic of the aerial part of the plants *Artemisia ludoviciana*, *Chenopodium ambrosioides*, *Marrubium vulgare*, *Flourensia cernua* and *Mentha spicata*. In order to determine the cytotoxic activity of the extracts we adapted the model to obtain the CI_{50} *in vitro* for the protozoa and the CMB for the bacteria and resorted to the statistical method of Probit for this intention. Growth curves were made, for *Entamoeba histolytica* where the time of duplication were of the 33.76 h and for 10.36 h in *G. lamblia*, with 5,000 amoebas/mL and 10,000 giardias/mL respectively. For the linear regression we defined 3 days of incubation for both protozoa. For the model of the CI_{50} the effect of metronidazole in both parasites was proven. Using Probit we determined a CI_{50} for *Entamoeba histolytica* of 0.124 $\mu\text{g/mL}$ and *G. lamblia* of 0.205 $\mu\text{g/mL}$. On the other hand, we used the model of the CMB for the bacteria: already mentioned using the techniques of dilution in tube and the diffusion with sensidisc. The most effective technique for this thesis was the dilution in tube using cloramphenicol like positive control. We obtained the extracts and the power of maximum dissolution to fit the concentrations. It was observed that the CI_{50} in the aqueous extracts did not lower less than 100 $\mu\text{g/mL}$ for both protozoa. We found that the CI_{50} lowered considerably when we used the moderately polar extracts, polestars and, being lowest: the acetic of marrubio with 7 $\mu\text{g/mL}$ for *Entamoeba histolytica* and the methanolic of hierbabuena with 8 $\mu\text{g/mL}$ for *G. lamblia*. In addition we found that the extracts methanolic (marrubio) and acetic (hierbabuena) were very similar with a CI_{50} of 13 and 12 $\mu\text{g/mL}$ and the hexanic and acetic of epazote with 57 and 58 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The cytotoxic effectiveness of the extracts of each plant was proven on the aqueous bacteria finding that single the extract of the plants *Marrubium vulgare* and *Mentha spicata* had an effect on *S. aureus* a concentrations of 5 and 5.5 mg/mL . Also we detecting in the extract of each plant: Sesquiterpenlacton, phenolic, oxidril, sugars, lactonas, alkaloids, saponin, triterpens and steroidal compounds. As objective following we separated by thin layer chromatography the methanolic extract of *M. vulgare* (it gave lower CI_{50} for both protozoa). We determined the R_f of 5 spots (0,94, 0,90, 0,84, 0,25 and 0,17) the greater fraction with % of inhibition (41%) was for *Entamoeba histolytica* with the fraction of 0,25 and for *G. lamblia* the fraction with R_f of 0,90 with a 40% which belongs to sesquiterpenlacton.

2. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos inmemorables (50,000 años a.c.) hasta la fecha, se han encontrado documentos en todas las culturas: Los Vedas, Mesopotamia, Asirios, hasta la actualidad, con publicaciones científicas, donde han usado a las plantas medicinales para obtener remedios o medicamentos que han curado sus enfermedades (Yesilada, 2005). Durante las últimas décadas, el uso de las plantas medicinales ha ganado popularidad mundial y la mayoría de los países desarrollados usan la medicina tradicional. En Europa los países como Bulgaria, Alemania y Polonia son grandes exportadores de fitofármacos (Hoareau y DaSilva, 1999), ya que usan como productos medicinales más de 1,500 especies de plantas pertenecientes a 200 familias y 800 géneros. Además varias naciones incluyendo a China, Nigeria, Tailandia y México, han decidido integrar las investigaciones etnobotánicas en sus sistemas básicos de salud y cada vez más países desarrollados están adoptando este sistema (Hoareau y DaSilva, 1999).

El desarrollo y la comercialización de fitofármacos se basan en la disponibilidad, facilidades e información concerniente a los procesos de extracción, purificación, producción industrial y comercialización de productos extraídos de plantas o desarrollados a partir de éstos (Hoareau y DaSilva, 1999). Las plantas medicinales son un componente integral de desarrollo de investigación y constituyen una alternativa importante para la obtención de nuevas e importantes drogas o compuestos semisintéticos, que han servido para curar enfermedades a menor costo (Balick y Cox, 1995).

En años recientes, la población mundial ha aumentado su interés en usar drogas naturales y terapias alternativas obtenidas de las plantas como infusiones herbales, extractos etanólicos, metanólicos, clorofórmicos, tinturas, suplementos alimenticios, fitofarmacéuticos y productos farmacéuticos (American Medical Association, 1997).

Esta inclinación es debido a 1) que la mayoría de los microorganismos se han hecho drogo-resistentes y la medicina convencional cada vez es más ineficiente, 2) el uso indiscriminado e incorrecto de drogas han dado como resultado efectos colaterales a los usuarios (intolerancia, mutagénesis, enfermedades antiinmunes) y 3) no siempre se tiene acceso a tratamientos convencionales farmacológicos por su elevado costo o disponibilidad (Rates, 2000).

Además se ha observado en forma muy evidente el resurgimiento de enfermedades ancestrales como la tuberculosis, el ántrax, la amibiasis, la giardiasis y las enfermedades diarreicas (Epidemiología, SS, 2005); ya que las drogas son menos eficaces por la aparición de cepas drogo-resistentes. Por ello, es imperante el desarrollar y/o buscar nuevos medicamentos que puedan ayudar a controlar a estos microorganismos y las fuentes pueden ser a) la modificación química de los compuestos que componen a los fármacos ya existentes, para hacerlos más efectivos y/o menos tóxicos para el hospedero (Gubarev *et al.*, 1998; Fabricant y Farnsworth, 2001), b) desarrollar nuevos medicamentos que estimulen los mecanismos de defensa innatos de los hospederos (Gubarev *et al.*, 1998; Fabricant y Farnsworth, 2001) y c) buscar e identificar en la medicina tradicional fuentes naturales que contengan compuestos para formar nuevos fármacos para que sean más selectivos, sin resistencia o con mayor potencia (Gubarev *et al.* 1998; Fabricant y Farnsworth, 2001). Nuestro grupo de trabajo está interesado en analizar esta última fuente, sobre microorganismos que producen diarrea como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* y *Shigella flexneri*.

2.1 Características de *Entamoeba histolytica*.

2.1.1 Clasificación taxonómica (Carliss *et al.*, 1969) (Levine *et al.*, 1980).

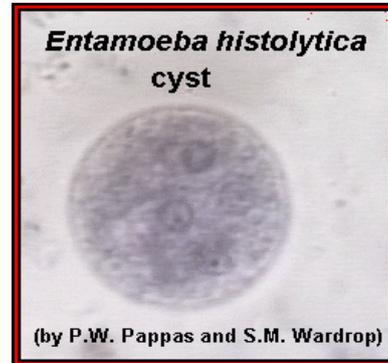
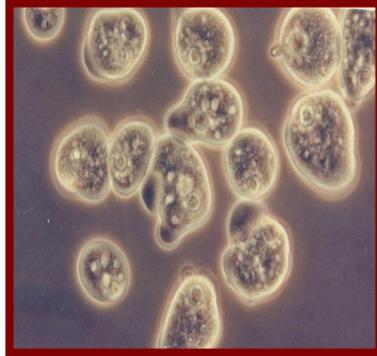


Figura 1. Trofozoítos de *E. histolytica*.

Quiste de *E. histolytica*.

Reino: Protista

Subreino: Protozoo

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Sarcodina

Superclase: Rhizopoda

Clase: Lobosea

Subclase: Gymnamoebida

Orden: Amoebida

Suborden: Acantophodina

Familia: Endamoebidae

Género: *Entamoeba*

Especie: *histolytica*

La amibiasis es una infección parasitaria ocasionada por *E. histolytica*; se distribuye universalmente y es considerada como una infección endémica con una incidencia mundial del 12 % (Petri *et al.*, 2000). En México constituye un problema muy importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad (Gutiérrez y Muñoz, 1994). El sistema nacional de vigilancia epidemiológica reportó 207,039 casos de amibiasis durante el 2004 (Epidemiología SS, 2005).

Entamoeba histolytica presenta dos fases principales en su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto. El quiste es la forma infectiva de esta enfermedad, son cuadrinucleados y rodeados por una pared celular (que los protege de medios desfavorables). Cuando los quistes son ingeridos por el hospedero, en su intestino grueso se liberan los trofozoítos (forma móvil, no infectiva) y son los responsables de producir la enfermedad (Dobell, 1982). Las personas se infectan por consumir alimentos, agua o fomites contaminados con quistes. La sintomatología se presenta a partir de la primera a la cuarta semana con pérdida de peso, dolor abdominal, disentería, heces sanguinolentas y fiebre. Si no hay una atención médica los trofozoítos pueden invadir además del intestino grueso, otros órganos como el hígado, cerebro, pulmones y si no hay una atención adecuada puede causar la muerte del hospedero (Guerrant, 1986.; FDA, 1999).

Para el tratamiento de la amibiasis se tienen diferentes drogas, 1) las que actúan extra-intestinalmente como cloruro de emetina, la dehidroemetina y el fosfato de cloroquina; 2) las que actúan exclusivamente en la luz del intestino (intra-intestinales), como las quinolinas y 3) las que actúan en ambas extra e intra-intestinales como el metronidazol y sus derivados (Goth 1975).

2.2. Características de *Giardia lamblia*.

2.2.1 Clasificación taxonómica (Levine *et al.*,1980):



Figura 2. Trofozoítos de *G. lamblia*

Quiste de *G. lamblia*

Reino: Protista

Subreino: Protozoo

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastogophorea

Clase: zoomastogophorea

Orden: Diplomonadida

Suborden: Diplomonadina

Familia: Hexamitidae

Género: *Giardia*

Especie: *lamblia*

La giardiasis es una infección parasitaria ocasionada por el género *Giardia*, siendo la especie más importante *G. lamblia*. Este género se distribuye universalmente e infecta intestinalmente a una variedad de mamíferos (aves, reptiles, anfibios, peces óseos y al hombre). Este parásito es considerado entre los protozoarios con mayor incidencia intestinal (Kulda, 1978). La giardiasis es una infección que es adquirida por la ingestión de quistes (en alimentos o agua contaminados). Los trofozoítos (flagelados bi-nucleados) son eclosionados de los quistes en el intestino delgado (Dancinger, 1975). La frecuencia en México de esta enfermedad en el 2004 fue de 9,242 casos de giardiasis (Epidemiología SS, 2005).

Esta enfermedad puede ser sintomática o asintomática y esto depende de la resistencia del hospedero, el cual puede excretar quistes por meses o años (Dancinger, 1975). La sintomatología de la enfermedad aparece de 1 a 2 semanas de la infección y los síntomas son: pérdida de peso, deshidratación, diarrea (deposiciones sueltas o acuosas), calambres y trastorno estomacal (www.cdc.gov).

2.3. Características generales de las bacterias.

Las bacterias que utilizamos para la realización de esta tesis son: *Escherichia coli* O157:H7 Obtenida del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) México D.F., *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella choleraesuis* ATCC 6962, y *Shigella flexneri* ATCC 25931.

En la familia de las enterobacteriaceae principalmente están involucrados los géneros que ocasionan trastornos al intestino, como *Salmonella sp.* *Shigella sp.* y *Escherichia coli*. Estos son bacilos Gram-negativos, se encuentran habitualmente en el intestino humano y algunos animales de granja, son aerobios facultativas, fermentan diferentes carbohidratos y poseen una estructura antigénica compleja, además pueden producir una variedad de diversas toxinas y principalmente otros factores de virulencia como hemolisinas, citolisinas y factores moduladores de la respuesta inmunológica (Jawetz, 1996).

2.3.1 *Escherichia coli* O157:H7

Es un bacilo gram-negativo y las cepas patógenas producen una poderosa endotoxina llamada shigatoxina, su infección produce diarrea sanguinolenta y ocasionalmente falla renal y es transmitida generalmente por alimentos (carne, pollo, cerdo, leche) o mala higiene de personas contaminadas. Generalmente la enfermedad desaparece entre los 5 a 10 días, donde se puede o no producir fiebre. En niños menores de 5 años y en ancianos puede producir el síndrome urémico hemolítico,

donde hay una insuficiencia renal (<http://www.cdc.gov>). Existen cuatro grupos enterovirulentos que son: *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteroinvasiva. Estas bacterias son lisina (+), citrato (-), indol (+), acetato (+) y lactosa (+) (Attisha y Clark 1995).

2.3.2 *Staphylococcus* spp.

Son bacterias esféricas gram-positivas con estructura de racimo de uvas y son otra especie de bacterias importantes que producen diarrea por la ingestión de sus toxinas en los alimentos contaminados (Jawetz *et al.*, 1996). Produce una enterotoxina termoestable llamada estafilocócica, que al ser ingerida causa calambres y vómitos severos, deshidratación y si no se atiende con rapidez y eficacia puede producir la muerte (Attisha y Clark 1995). Clínicamente, la especie más importante de este género es *S. aureus* y éste se puede distinguir por ser positivo a la coagulasa; fermenta la glucosa con producción de gas, catalasa (+) y nitrato (+).

2.3.3 *Salmonella* spp.:

Produce diarrea, fiebre y calambres abdominales entre las 12 y 72 h, la mayoría de los pacientes se recuperan sin tratamiento, aunque a muchos pacientes hay que hospitalizarlos y proporcionarles antibióticos ya que esta bacteria puede difundir de los intestinos hacia el sistema circulatorio y alcanzar un estado de septicemia y tener al hospedero en riesgo de muerte. *Salmonella* se transmite por contaminación de alimentos (carne, pollo, leche, huevos y vegetales), con heces fecales de personas o animales infectados (www.cdc.gov). Esta enfermedad presenta una incidencia de morbilidad de 55,811 casos infectados por año en México (Epidemiología, SS, 2001). En la actualidad se conocen 2,200 especies de *Salmonella* sp. y se han clasificado de acuerdo a sus antígenos de superficie. Estas bacterias son lisina (+), sulfuro de hidrógeno (+), reacción TSI (+/-) con gas, indol (+), citrato (+) y malonato (-) (Attisha y Clark 1995). *Salmonella choleraesuis* es un patógeno hospedero-adaptado

del cerdo, produciéndole paratifoidea. También puede ser patógeno para los humanos, pudiendo producir septicemia en su tracto intestinal (Chen-Hsun *et al.*, 2004).

2.3.4 *Shigella* spp.

La sintomatología se produce entre las 24 a 48 h, después de la ingestión de las bacterias y generalmente produce diarrea. Algunas personas pueden ser asintomáticas pero portadoras de la enfermedad. *Shigella* presenta varias clases: *Shigella flexneri*, (*Shigella* del “Grupo D”), *Shigella flexneri* (*Shigella* del “Grupo B”), *Shigella dysenteriae* (del tipo 1 ocasiona epidemias), *S. flexneri* (produce dolores en articulaciones, irritación de ojos, dolores al orinar –se le llama síndrome de Reiter-) (<http://www.cdc.gov>). *Shigella* está relacionada con el género de *Escherichia* y es considerada por algunos autores como otra cepa de *E. coli*. Sin embargo, *Shigella* es anaerogénica (no produce gas a partir de carbohidratos) y es lactosa (-). Este tipo de bacterias se trasmite por heces fecales en alimentos, legumbres y fomites. (Attisha y Clark 1995).

2.5 Descripción de las plantas

2.5.1 *Artemisia ludoviciana* Nutt. Istafiate / Estafiate.



Figura 3. *Artemisia ludoviciana*

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Género: *Artemisia* L - sagebrush
Especie: *ludoviciana* Nutt – White sagebrush

Sinónimos: *Artemisia ludoviciana mexicana* ((Willd. Ex Spreng) Keck

Nombres comunes: Estafiate, istafiate o ajenjo (<http://www.usda.gov>)

No. de baucher: 024024.

De la familia Asteraceae (Britton y Brown, 1970). Esta planta es de crecimiento perenne llegan a medir hasta 1 metro de altura, tallos pilosos con hojas muy aromáticas, tomentosas, bipinnadas y tripinnadas, las flores son hermafroditas de 3-4 mm de diámetro con brácteas de color verde grisáceo y numerosos flósculos amarillos diminutos, aparecen desde finales de verano hasta finales de otoño. Los usos medicinales que se le atribuyen son vermífugo, emenagogo y estimulante (Stuart, 1981, Simon *et al.*, 1984, Martínez y Martínez, 1990; Bown, 1996; Martínez, 1996); sus hojas masticadas reducen el dolor de garganta (Moerman, 1998). En México el uso popular, es para el dolor de estómago, diarrea, parasitismo, infecciones intestinales, afecciones bronqueales, anginas, bronquitis, resfriado, tos, (Navarro, *et al.*, 1996). Se han identificado como principios activos: guaianolido crisartemina A, eudoemanólidos, ludalbina, alfa-epoxyludalbina, arglanina, douglanina, armexina, borneol terpenos, anfor, limoneno, alfa y beta-pelandreno y armefolina sesquiterpenos, 8-alfa-acetoxymefolin y armexifolin, sesquiterpen lactona estafiatina, artemisia-ketona, tulipinólido, y el germacranólido artemorin (<http://www.tlahui.com>). En general las hojas, tallos y raíces contienen aceite y santonina, materia nitrogenada, sustancias resinosas, clorofila, albúmina, almidón, celulosa, taninos y sales. (<http://www.tlahui.com>).

2.5.2 *Chenopodium ambrosioides* L. Epazote / Pazote.



Figura 4. *Chenopodium ambrosioides*.

| | |
|----------------|----------------------|
| Reino: | Plantae |
| Subreino: | Tracheobionta |
| Superdivisión: | Spermatophyta |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Subclase: | Caryophyllidae |
| Orden: | Caryophylliales |
| Familia: | Chenopodiaceae |
| Género: | <i>Chenopodium</i> L |

Especie: *ambrosioides* L – Mexican tea, wormseed

Nombres comunes: Epazote, pazote, paico, hierba de los jesuitas apazote, pazote.

Sinónimos: *Teloxys ambrosioides* (L.) W. A. Weber) (<http://www.usda.gov>)

No. de baucher: 024023.

Planta herbácea perenne, muy aromática, de tallo erguido de hasta 1 metro de altura, glabro, con surcos longitudinales poco profundo, anguloso, ramoso, verde con

líneas blanquecinas o rosáceas. Hojas ascendentes, atenuadas en pecíolo corto, oblongo-lanceoladas, mas o menos agudas, irregularmente sinuoso-dentadas o casi enteras, delgadas, glabras, a veces tenuamente pubescentes, glandulosas en la cara inferior, las hojas superiores son lanceolo-lineares, mas agudas y enteras y de color muy intenso. Flores aglomeradas, pequeñas de 1 mm de diámetro o un poco mayor, reunidas en racimos foliosos, espiciformes, glabros, hermafroditas por lo regular. Fruto ovoide, de menos de 1 mm, comprimido, perfectamente envuelto por el cáliz, semillas lisas, color negro brillante, lustrosa, lenticular, horizontal o más o menos vertical. Las hojas tienen sabor aromático. La floración se presenta en otoño. Las hojas tiernas son usadas como condimento en sopas y reduce la flatulencia (Facciola, 1990). Los usos medicinales son: vermífugo, estomáquico, carminativo, antimicótico y antiasmático, (Martínez y Martínez, 1990; Linares, 1993; Chevallir, 1996; Pahlow, 1995; Bown, 1996). Otros de los usos son como insecticida (Bown, 1996). Los componentes principales son ascaridol, componente activo del aceite esencial (Torres, *et al.*, 2002), p-cimeno, limoneno, alcanfor, atasona, safrol, N-docosano, N-heptacosano, beta-pineno, metadieno, salicilato de metilo, d-terpineol (<http://www.herbotecnia.com.ar>), además de alfa pineno, alfa-felandreno, alfa-terpineno, 1,8-cineol, gama-3-careno, linalol, timol, carvacrol, gama-2-careno, limoneno, transpinocarveol, cis-para menta 2,8 dienol, pinocarvona, trans-isocarvrol, verbenota, neoisodihidrocarveol, carvona, acetato de bornilo (Torres *et al.*, 2002).

2.5.3 *Flourensia cernua* DC. Hoja sé / Hoja sen

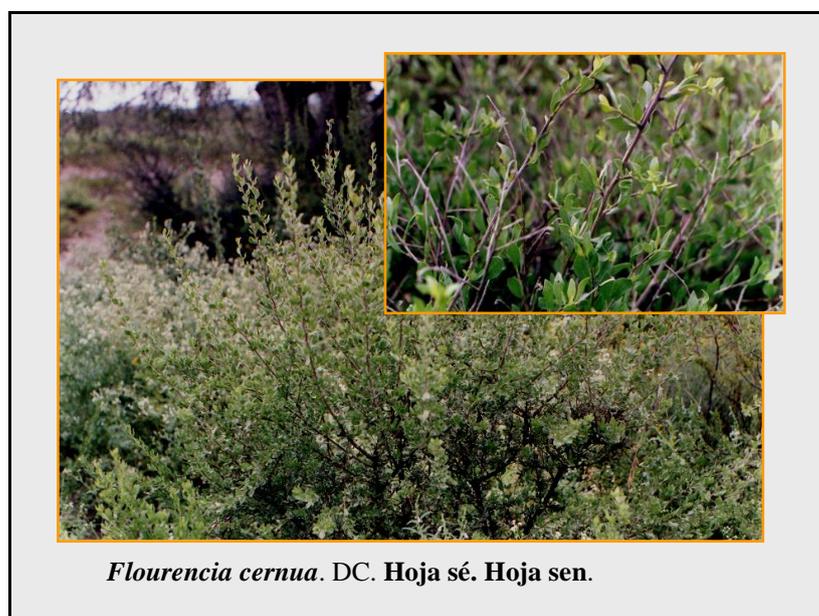


Figura 5. *Flourensia cernua*.

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Género: *Flourensia* DC. - tarwort
Especie: *cernua* DC. American tarwort, Tarbush. (www.usda.gov).
Nombres comunes: Hoja sen, Hoja sé. (Martínez, 1996).
No. de baucher: 024027.

De la familia de las Asteraceae. Arbusto de 1-2 metros de altura, hojas olorosas y de sabor amargo. Se utiliza contra la indigestión y como purgante suave (Martínez, 1996). Se le considera un arbusto perenne, sus hojas son alternas, simples y elípticas, llegan a medir hasta 2.5 cm de largo. Las flores son compuestas, pequeñas, solitarias

e inconspicuas, en cabezuelas axilares; el fruto es un aquenio (www.fs.fed.us). Contiene terpenos y compuestos fenólicos (Estell *et al.*, 2002). En comunicaciones personales se dice que tiene propiedades vermífugas.

2.5.4 *Marrubium vulgare* L. Marrubio / Manrubio.

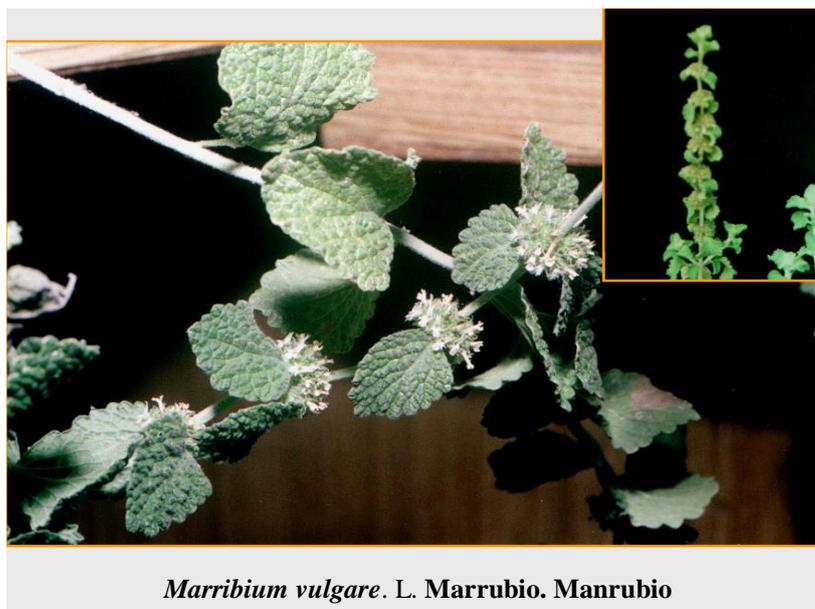


Figura 6. *Marrubium vulgare*.

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae
Género: *Marrubium* L. - horehound
Especie: *vulgare* L. – horehound. (<http://www.usda.gov>).
Nombres comunes: Manrubio, marrubio. (Martínez, 1996).
No. de baucher: 024025.

Marrubium vulgare L. Marrubio / Manrubio De la familia Labiatae. De crecimiento perenne llegando a medir 0.5 metros de altura. Planta leñosa, débilmente aromática y casi toda lanosa. Ramificada cerca de la base; tallos erectos, casi cuadrados, de 30-60 mm de alto; hojas dentadas, ovadas, opuestas, tomentosas, de 1.5-5 cm de largo, largamente pecioladas. Flores blanquecinas, de 5-8 mm de largo, numerosas en verticilos axilares (Stuart, 1981). Los usos medicinales que se le han dado a esta planta son: antiséptico, antiespasmódico, digestivo, diurético, emenagogo, expectorante y como tónico (Launert, 1981; Stuart, 1981, Lust, 1983; Bown, 1996) y además como vermífugo, (García, 1968, Simon *et al.*, 1984; Martínez y Martínez, 1990; Linares, 1993; Arias y Costas, 1995; Pahlow, 1995; Martínez, 1996). Como principios activos contiene: marrubina, lactona diterpénica amarga (de núcleo labdanofuránico), diterpenos (marrubiol, peregrinol, vulgarol), flavonoides (apigenina, luteolina y sus derivados 7-glucósido, 7-lactato, 7-(2 glucil) lactato y 7-(2glucurosil)-lactato), quercetina (3-glucósido y 3-ramnoglucósido, vitexina, vicenina II y crisoeriol), ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, 1-cafeilquínico, criptoclorogénico), trazas de aceite esencial (triciclono, beta-pineno, bisabolon, beta-elemona e isomenton-8-tiol), taninos, saponósidos, esteroides (beta-sitosterol), ácido ursólico, mucílagos, pectinas, sales minerales (Fe, K) y vitamina C. (<http://www.fitoterapia.net>).

2.5.5 *Mentha spicata* Hierbabuena, yerbabuena.



Figura 7. *Mentha spicata*

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae
Género: *Mentha* L. – mint.

Especie: *Mentha spicata* L. – spearmint (<http://www.usda.gov>).

Sinónimos: *Mentha viridis* L. (<http://www.hort.purdue.edu>).

Nombres comunes: Hierbabuena, yerbabuena.

No. de baucher: 024028.

De la familia Lamiaceae. Planta perenne aromática casi glabra, con estolones subterráneos foliados. Tallos erectos, angulosos, ligeramente ramificados, de 30 a 60

cm de altura. Hojas suaves y verdes, opuestas, casi sésiles, lanceoladas u ovado-lanceoladas, con bordes profundamente aserrados, de hasta 6 cm de largo. Flores de color lila pálido, en espigas terminales cilíndricas, irregulares, de 6-10 cm de largo (Stuart, 1981). Se utiliza como condimento, té, aromatizante y para dar sabor a dulces y pastas dentales. Dentro de sus propiedades medicinales se le atribuyen propiedades antihemáticas, antisépticas, antiespasmódicas, diurética, estimulante (Briggs, 1978; Lust, 1983; Duke y Ayensu, 1985; Martínez y Martínez, 1990; Bown, 1996; Martínez, 1996) y contra el cáncer (Duke y Yensu, 1985). Las hojas de menta contienen aceite esencial (rico en mentol) y sus estereoisómeros (neomentol, isomentol, mentona y ésteres de mentol), que van acompañados de mentofurano y otros monopertenos y sequiterpenos, flavonoides (aglicones, heterósidos), taninos; ácidos, fenoles y triterpenos (<http://www.fitoterapia.net>)

2.6. Separación de los compuestos en extractos de plantas.

En general los procedimientos más usados para la separación de los compuestos que son los responsables de las actividades en los extractos de las plantas incluyen el uso de i) cromatografía de alta resolución (HPLC), ii) cromatografía de gases, iii) cromatografía en columna y iv) cromatografía en placa fina (Touchstone, 1992; Canell, 1998; Rubinson y Rubinson, 2001 Fessenden y Fessenden, 2001;), Este último, es el más utilizado ya que permite identificar y/o caracterizar semi-cuantitativamente componentes individuales de los extractos de las plantas y es muy adecuado, rápido, sencillo y extremadamente barato comparados con los otros procedimientos mencionados (Touchstone, 1992; Canell, 1998; Fessenden y Fessenden, 2001; Rubinson y Rubinson, 2001). La separación por esta técnica se basa en que los compuestos del extracto de las plantas se reparten de modo diferencial, entre una fase estacionaria y una fase móvil; el eluyente (fase móvil) se desplaza por una fina capa del sorbente (fase estacionaria), transportando así los componentes individuales de la mezcla de sustancias dependiendo de su solubilidad y/o de su comportamiento frente a la adsorción a ambas fases. La placa separativa es plana y el recorrido particular de cada compuesto se emplea así para su identificación. Las separaciones se realizan generalmente por el procedimiento

ascendente, introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el eluente, que es succionado por acción de las fuerzas capilares del recubrimiento de la superficie de cada placa.

La identificación de cada uno de los componentes se realiza de acuerdo con su color y del denominado valor R_f (factor de retención), es decir, el cociente entre el recorrido del compuesto (l_s) y el del eluente (l_T) (Rubinson, y Rubinson, 1992). Una vez separados los componentes de los extractos, los compuestos se visualizan con luz visible, ultravioleta o vapores de yodo, se raspa la sílica de cada banda y se extrae con un disolvente el compuesto y para probar su actividad biológica.

3. HIPÓTESIS

Considerando la utilización de las diferentes partes de las plantas de *Artemisia ludoviciana*, *Chenopodium ambrosioides*, *Marrubium vulgare*, *Flourensia cernua* y *Mentha spicata* dentro de la medicina tradicional para el tratamiento de pacientes con disentería, es posible que los extractos de la corteza, tallo y hojas de estas plantas presenten actividad citotóxica *in vitro* contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar *in vitro* la actividad citotóxica contra *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* de los extractos acuosos, acetónicos, metanólicos y hexánicos de la corteza, tallos y hojas de *Artemisia ludoviciana*, *Chenopodium ambrosioides*, *Marrubium vulgare*, *Flourensia cernua* y *Mentha spicata*.

4.2 Objetivos Específicos:

1. Evaluar los parámetros de crecimiento (tiempo de duplicación; tiempo de generación, intercepto en la curva, pendiente, r^2 , densidad máxima en tiempo determinado) de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* en sus medios de cultivo originales.

2.- Colectar la corteza, tallo y hojas y obtener los extractos acuosos, hexánicos, acetónicos y metanólicos de las plantas *Artemisia ludoviciana*, *Chenopodium ambrosioides*, *Marrubium vulgare*, *Flourensia cernua* y *Mentha spicata*.

3.-Determinar la CI_{50} (concentración inhibitoria media) de los diferentes extractos acuoso, acetónico, metanólico y hexánico de las plantas ya mencionadas sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*, y en *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* determinar la CMB (concentración mínima bactericida) de los diferentes extractos de cada planta.

4.- Caracterizar parcialmente por cromatografía en placa fina los compuestos de la(s) planta(s) que mayor CI_{50} presenten para ambos protozoarios.

5.- Evaluar los compuestos químicamente y determinar la dosis mínima inhibitoria sobre el crecimiento de *E. histolytica*, *G. lamblia*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*.

5. ANTECEDENTES

5.1 Efecto de los extractos de plantas sobre *E. histolytica*.

Poco se ha estudiado sobre los efectos de los extractos de las plantas contra *E. histolytica*. Las investigaciones serias comienzan desde 1990, con el extracto acuoso de la planta *Punica granatum L* y el efecto de sus alcaloides y taninos. Estos extractos y compuestos se usaron a concentraciones de 1 a 1,000 µg/mL e inhibieron el crecimiento de *E. histolytica* y *E. invadens* (Segura *et al.*, 1990). Después no fue hasta 1995, cuando se estudió el efecto del extracto etanólico de *Boerhavia diffusa*, *Berberis aristata*, *Tinospora cordifolia*, *Terminalia chebula* y *Zingiber officinale* (usadas en la India) contra *E. histolytica* demostrando que solamente los extractos de *T. cordifolia* y *B. aristata* inhibieron el crecimiento de este protozooario *in vitro*. (Sohni *et al.*, 1990).

Mas tarde en 1996, usaron los extracto etanólico, hexánico, n-butanólico y clorofórmico del fruto de *Piper longum* contra *E. histolytica* a una concentración de 1,000 µg/mL y la fracción del cloroformo a 500 µg/mL, presentando estos extractos una actividad amebicida moderada (Ghoshal *et al.*, 1996). Posteriormente en 1998, se estudiaron 45 extractos de diferentes plantas usadas como antidiarréicos en la medicina tradicional contra *E. histolytica*. Solo 35 de ellas presentaron una actividad amebicida parcial, entre las plantas usadas fueron: *Paropsia brazzeana*, *Cryptolepis sanguinolenta*, *Alchornea cordifolia*, *Hensia pulchella*, *Maprounea africana*, *Rauwolfia obscura*, *Voacanga africana*; *Psisium guajava*, *Dialum englerianum*, *Harungana madagascariensis* *Manguifera indica*; *Carica papaya*, *Morinda morindoides* y *Tithonia diversifolia* (Tona *et al.*, 1998). En este mismo año, también se estudió el extracto metanólico de 19 plantas mexicanas, contra *E. histolytica*, encontrando que los extractos de: *Acalypha phleoides*, *Cnidocolus tehuacanensis*,

Geranium niveum, *Helianthella quinquenervis* y *Teloxys graveolens* presentaron actividad parcial y los más efectivos fueron: *Rubus coriifolius*, *Cuphea pinetorum*, y *Helianthemum glomeratum* (Calzada *et al.*, 1998).

En 1999, otro grupo de investigadores estudiaron la planta *Helianthemum glomeratum* particularmente los polifenoles: flavan 3-ols, (-)-epigallocatequina galato y la (-)-epigallocatequina, sobre el crecimiento de *E. histolytica*. Encontraron una actividad importante *in vitro* de los extractos metanólicos (Meckes *et al.*, 1999). Más recientemente en el 2000 se estudió 42 extractos: acuosos, etanólicos y hexánicos de 21 géneros (18 familias) de plantas medicinales de Sudáfrica. Encontrando que las plantas: *A. calamos*, *A. adianthifolia*, *D. oblongifolia* y *S. birrea* mostraron actividad significativa contra *E. histolytica* (McGaw *et al.*, 2000).

Posteriormente en el año 2001 Arrieta *et al.*, trabajaron con extractos etanólicos de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* los cuales demostraron efectos inhibitorios sobre el crecimiento *in vitro* de *E. histolytica* y *G. lamblia*. De este extracto se aislaron asarinina, viperina, β -sistoterol y el β -sistoterol glucósido. La asarinina fue la más activa contra ambos protozoarios (Arrieta *et al.*, 2001).

Alanís y colaboradores en el 2003 realizaron un estudio de las partes aéreas de *Rubus coriifolius*, planta medicinal usada por las comunidades Mayas en el sur de México para tratar diarrea sanguinolenta, donde aislaron 7 compuestos conocidos: (-) epicatequina, (+)-catequina, viperina, nigaichigosido F1, β -sitosterol, 3-O- β -D-glucopiranosido, ácido gálico y ácido egálico, los cuales se probaron contra *E. histolytica* obteniendo como resultado que la epicatequina fue el compuesto que presentó la mayor actividad antiprotozoaria con una CI_{50} de 1.9 μ g/mL (Alanís *et al.*, 2003).

5.2 Efecto de los extractos de plantas sobre *G. lamblia*.

En 1997 se estudiaron 25 pacientes con giardiasis (*Giardia lamblia*), a los cuales se les administró una dosis diaria de 1 g tres veces al día de “Pippali Rasayana” (PR), droga ayurvédica preparada de *Butea monosperma* (leguminaceae) y de *Piper longum* L., (piperaceae), donde encontraron que después de 15 días de tratamiento en 23 pacientes, desaparecieron tanto los quistes y los trofozoítos de las heces así como sus síntomas y el dolor abdominal, la presencia de moco y células con pus, mostrando una marcada mejoría en el perfil clínico de estos pacientes (Saxena *et al.*, 1997). En este mismo año Calzada *et al.*, estudiaron el extracto metanólico de 19 plantas mexicanas contra *G. lamblia*, encontrando que los extractos de las plantas derivadas de *Acalypha phleoides*, *Cnidocolus tehuacanensis*, *Geranium niveum*, *Helianthella quinquenervis* y *Teloxys graveolens* presentaron actividad significativa contra este protozoario (Calzada *et al.*, 1998a).

Posteriormente en 1999 Tripathi y colaboradores, estudiaron el fruto de *Piper longum* usado como remedio tradicional contra desórdenes intestinales. A este fruto lo probaron *in vivo* contra *Giardia lamblia* en ratones y estudiaron su efecto inmunostimulatorio y su actividad como giardicida. Encontraron que los extractos acuosos y etanólicos presentaron ambas actividades ya mencionadas (Tripathi, 1999). En este mismo año Meckes *et al.*, estudiaron la planta *Helianthemum glomeratum* particularmente los polifenoles: flavan 3-ols, (-)-epigallocatequina galato y la (-)-epigallocatequina sobre el crecimiento de *G. lamblia* donde encontraron que estos últimos fueron activos a una CI₅₀ de 8.73 µg/mL (Meckes *et al.*, 1999).

Alanís *et al.*, en el 2003 realizaron un estudio de las partes aéreas de *Rubis corrifolius*, donde aislaron 7 compuestos conocidos: (-) epicatequina, (+)-catequina, viperina, nigaichigosido F1, β-sitosterol, 3-o-β-n-glucopiranosido, ácido gálico y ácido egálico, los cuales se probaron contra *G. lamblia* obteniendo como resultado que la epicatequina fue el compuesto que presentó la mayor actividad antiprotozoaria con una CI₅₀ de 1.6 µg/mL (Alanís *et al.*, 2003).

5.3 Efecto de extractos de plantas sobre bacterias

Han sido muy diversos los estudios de los extractos de plantas sobre los efectos inhibitorios del crecimiento de muchas bacterias. En 1995 se estudiaron los extractos metanólicos de *Camellia sinensis* L y de *Euphorbi hirta* L, donde se observó que estos extractos presentaron efecto contra la disentería causada por *Shigella* spp, además de no ser citotóxicos sobre el hospedero (Vijaya y Nalini, 1995). Se ha reportado que los Mayas utilizaban extractos acuosos de diferentes variedades del chile *Capsicum* ssp. (*C. frutescens*, *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense* y *C. pubescens*) para controlar las infecciones causadas por bacterias. En la actualidad se ha probado este efecto en sensidiscos contra 15 especies de ellas y una especie de levadura, pudiéndose identificar dos compuestos: capsaicina y dihidrocapsaicina; éstos presentaron diferentes grados de inhibición contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. tetani* y *S. pyogenes* (Cichewicz y Torpe, 1996). En ese mismo año se estudiaron 20 extractos metanólicos de plantas contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, los resultados mostraron que los extractos de *Eucalyptus globulus*, *Punica granatum*, *Artemisia mexicana* y *Bocon arborea* poseen actividad contra estas bacterias (Navarro *et al.*, 1996). Otros estudios en el mismo año, probaron los extractos etanólicos de *Bisa orellana* contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *S. faecalis*, obteniendo una acción bactericida a dosis altas (Irobi *et al.*, 1996). Además en el mismo año, se probaron 101 extractos de las plantas de *Scrophulariaceae* y *Acanthaceae*, contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*. La actividad antimicrobiana se detectó en más del 40% de los extractos analizados (Meurer-Grimes *et al.*, 1996).

En 1997, trabajaron con 15 extractos de plantas de la familia Chenopodiaceas donde analizaron los alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, saponinas, esteroides y/o terpenos y taninos. Encontraron que la mayoría de los extractos tienen actividad antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis* (Al-Saleh y *et al.*, 1997). En este mismo año, también se trabajó con los extractos acuosos, metanólicos y clorofórmicos de *Argemone mexicana*, *Baccharis sordenscens*, *Cecropia obtusifolia*, *Commelina coelestis*, *Crescentia alata*, *Eryngium*

carlinae, *Eysenhardtia polistachia* y *Ziziphus amole* contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. lutea*, *P. vulgaris* y *C. albicans* siendo el extracto metanólico de *E. polistachia* el más potente a una dosis de 400 µg/mL contra estos microorganismos (Zavala *et al.*, 1997)

En 1998, se estudió los efectos del glicoalcaloide de la planta de *Solanum* (contiene solanina y chaconina), demostrando que ratones tratados con bajas dosis de los extractos, sobrevivieron a dosis letales de *S. typhimurium* (Gubarev *et al.*, 1998). Por otro lado, también se investigó 109 plantas procedentes de Baja California Sur, México, usando extractos etanólicos, éstos se probaron contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *E. coli* y *C. albicans* y se encontró que 64 plantas fueron activas contra una o mas de estas bacterias. Entre las plantas estudiadas se encuentran *Artemisia absinthium* L. y *Ch. ambrosiodes* L y tuvieron muy poca actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis* y a *Mentha spicata* a quien no se le observó actividad alguna contra estas bacterias (Dimayuga *et al.*, 1998).

Mas recientemente en el año 2000, se investigó en los extractos con éter de petróleo, benceno, cloroformo, acetona y metanol de la planta *Ficus racemosa*, los cuales fueron probados contra *E. coli*, *B. pumilis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, y se encontró que éstos extractos inhibieron medianamente el crecimiento de las bacterias (Mandal *et al.*, 2000). En este mismo año, evaluaron los extractos metanólicos de *Picralima nitida* sobre bacterias gram-positivas y gram-negativas, encontrando una concentración mínima inhibitoria para *S. aureus* muy similar al control (ampicilina) (Fakeye *et al.*, 2000). También en ese mismo año, se evaluaron los aceites esenciales y extractos etanólicos de *Phlomis fruticosa* L. con su poder antimicrobiano y se encontró que los aceites esenciales presentaron actividad inhibitoria en el crecimiento sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *K. pneumoniae* y *M. luteus* y los extractos etanólico presentaron actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis* (Ristic *et al.*, 2000).

En el 2001 se probó la actividad inhibitoria de la fracción etil acetato insoluble del extracto metanólico de *Cleistropholis patens* (una hierba medicinal Nigeriana utilizada para la fiebre tifoidea) contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *A. níger* y *C. albicans* y se observó que la fracción esteroideal fue 20 y

15 veces más potente que la penicilina y el cloramfenicol contra *B. subtilis* y dos veces más activa contra *K. pneumoniae* (Ebi y Kamalu 2001). En este mismo año se investigó al extracto etanólico de *Streblus asper* sobre el crecimiento de *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. marscesens*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* y *C. albicans*, encontrando que este extracto solo, es muy activo contra *S. mutans* (Wongkham *et al.*, 2001). También se determinó la actividad antibacteriana de diferentes fracciones del extracto metanólico de *Ailanthus excelsa* contra *B. subtilis*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *P. cichorii*, encontrando que la fracción de etil acetato inhibió el crecimiento de todas las bacterias probadas (Shrimali *et al.*, 2001).

En el 2003 se estudiaron las actividades antimicrobianas de los extractos metanólicos y la fracción alcaloidea de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., por el método de difusión de Kirby-Bauer (Pinheiro *et al.*, 2003), donde encontraron actividad moderada contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. faecalis*, *S. enteritidis*, *S. flexneri*, *S. epidermidis*, *Acinetobacter iwoffii* (Guida *et al.*, 2003). También se estudió en este mismo año, las xantonas de *Kielmeyera variabilis* (un árbol de Brasil usado contra enfermedades tropicales severas como schistosomiasis, leishmaniasis, malaria, hongos y bacterias). Encontraron que los extractos metanólicos fueron muy activos contra *S. aureus* y *B. subtilis* (Pinheiro *et al.*, 2003).

5.4 Importancia del presente trabajo.

México cuenta con una gran diversidad etnobotánica debido a su clima, suelo y actividad orogénica por lo que existen más de 30,000 especies de plantas (Lugo, 1992) y solo un bajo porcentaje de éstas ha sido estudiado tanto en su bioactividad como en sus compuestos químicos. Los microorganismos, tanto enterobacterias como protozoarios han comenzado a mostrar drogo-resistencia a los antibióticos y medicamentos de elección. Es indispensable buscar nuevas alternativas para encontrar compuestos que puedan matar a estos microorganismos. El trabajar con la productos naturales nos puede proporcionar nuevas drogas o compuestos que se requieren urgentemente para combatir estas enfermedades. Por ello, el interés de este trabajo es

investigar si en los extractos acuosos, acetónicos, metanólicos y hexánicos de la corteza, tallos y hojas de las plantas *Artemisia ludoviciana*, *Chenopodium ambrosioides*, *Marrubium vulgare*, *Flourensia cernua* y *Mentha spicata* existe la presencia de principios activos citotóxicos contra: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* causantes de disentería en el humano.

5.5 Originalidad y Justificación

Las plantas medicinales son consideradas como una importante fuente de estructuras potencialmente útiles para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos. El primer paso hacia esta meta, es la determinación de los efectos biológicos de extractos de plantas preparados en forma tradicional. La estrategia exitosa para la investigación de estas preparaciones involucra la selección de extractos crudos basados en una combinación de prácticas etnofarmacológicas y en este caso poder usarlas contra microorganismos que producen diarrea como: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*. Debido a los escasos trabajos científicos realizados con estas plantas nos dimos a la tarea de investigar sus propiedades bactericida y antiprotozoarias.

5.6 Contribución y perspectivas del presente trabajo

Consideramos que las principales contribuciones de este trabajo a los campos de la etnobotánica experimental y a la de etnofarmacobiología son las siguientes: i) hallazgos de 7 extractos que presentaron actividad citotóxica para *Entamoeba histolytica* y 4 para *Giardia lamblia* (tablas 1 y 2); ii) las plantas de *Marrubium vulgare* y *Mentha spicata* tuvieron un efecto sobre *S. aureus* (tabla 4); iii) evidencia de que la mayoría de las plantas presentaron indicios de sesquiterpenlactonas, dobles enlaces, oxidrilos fenólicos, azúcares y lactonas (tabla 5); iv) el extracto metanólico

de la planta de *M. vulgare* fue el que menor CI_{50} presentó para *E. histolytica* y *G. lamblia* (tabla 3). Por cromatografía en placa fina se determinaron 5 fracciones, las cuales presentaron menos del 50% de inhibición para ambos protozoarios (tabla 6).

Las perspectivas de este trabajo consisten en que a partir de los extractos de cada planta que dieron mejor efecto sobre ambos protozoarios, extraer los compuestos activos y analizar su contribución relativa de cada una de ellos sobre las bacterias y los protozoarios y evaluar su citotoxicidad sobre células humanas y animales de experimentación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Origen de los reactivos

Todos los compuestos usados en esta tesis, fueron grado reactivo y sus orígenes fueron los siguientes: de Bioxon de México: extracto de levadura y peptona de caseína; de Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo, USA), glucosa y L-cisteína; de Reactivos Monterrey: cloruro de sodio, ácido ascórbico, citrato férrico amónico e hidróxido de sodio; de JRH Biosciences. (Lenexa, KS), vitaminas de Diamond; de Control Técnico y Representaciones: el hexano, acetona, metanol y etanol; de Bioxon, Becton Dikenson de México. S. A. de C. V: caldo soya tripticaseína y agar granulado marca BBL. Cockeysville, Maryland. USA. Div. Becton Dickinson and Company el cloramfenicol y de Sigma el metronidazol.

6.2 MATERIAL BIOLÓGICO

6.2.1 Cepa de HM1: IMSS de *Entamoeba histolytica*.

Proviene del cepario del laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular, de la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste. En este laboratorio se ha cultivado por 16 años en el medio PEHPS (Saíd-Fernández *et al.*, 1988).

6.2.2 Cepa de *Giardia lamblia* IMSS:0889.

Proviene del cepario del laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular, de la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste. En este laboratorio se ha cultivado por 9 años en el medio TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978).

6.3 Cepas bacterianas.

Las cepas bacteriana fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N. L. y son: a) *Escherichia coli* O157:H7 obtenida del Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) Méx, D. F. b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, c) *Salmonella choleraesuis* ATCC 6962 y d) *Shigella flexneri* ATCC 25931.

6.4 Preparación de suero.

6.4.1 Suero bovino estéril.

El suero se descongeló en baño de agua a 37 °C y se descomplementó a 56 °C por 30 min, agitándolo suavemente cada 5 min. Se transfirió asépticamente 10 mL del suero a tubos estériles de borosilicato con tapón de rosca y se incubaron a 37 °C por 5 días para comprobar su esterilidad y se almacenaron a –20 °C hasta su uso.

6.5 Preparación de los medios de cultivo.

6.5.1 Medio basal (PEHP) (Said-Fernández *et al.*, 1988).

Peptona de caseína 10.0 g, D-Glucosa 6.0 g, L-cisteína 1.0 g, ácido ascórbico 0.1 g, KH_2PO_4 1.0 g, K_2HPO_4 0.6 g, extracto de hígado y páncreas 250 mL. Se mezcló y se disolvieron los componentes en 950 mL de agua desionizada. Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1,000 mL con agua desionizada. El medio se distribuyó en alícuotas de 5 mL en tubos para cultivo de 13 X 100 mm con tapón de rosca y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Posteriormente se almacenó el medio a temperatura ambiente hasta su uso.

6.5.2 Medio basal TYI (Diamond *et al.*, 1978).

Tripticasa 20.0 g, extracto de levadura 10.0 g, glucosa 10.0 g, NaCl 3.30 g, L-cisteína 1.0 g, ácido ascórbico 0.2 g, KH_2PO_4 0.6 g, K_2HPO_4 1.0 g y citrato férrico amónico 0.028 g. Los componentes se disolvieron en 950 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1,000 mL con agua desionizada. El medio se distribuyó en alícuotas de 5 mL en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min y los tubos se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

6.5.3 Medio completo PEHPS y TYI.

Se adicionó a los tubos conteniendo 5 mL de los medios PEHPS y TYI 10% de suero bovino 48 h antes de inocularse con amibas y giardias respectivamente (adicionado con vitaminas 107 de Diamond's -25 mL de vitaminas; JRH Biosciences, Lanexa, KS por cada 1,000 mL de suero-). Al TYI-S además se le agregó 1% de bilis bovina (0.5 g/10 mL de agua desionizada y esterilizada por

filtración de 0.22 micras Millex-GS, Millipore, Molsheim, France) (Keister, 1983). Se incubó por 72 h a 37 °C para comprobar su esterilización. Este material se usó posteriormente para las resiembras de los protozoarios.

6.5.4 Caldo Soya-Trypticasa

Para la preparación del caldo soya-trypticasa, se siguieron las especificaciones del fabricante (BBL), se agregó 30.0 g de caldo soya trypticasa a 1,000 mL de agua desionizada. El caldo disuelto se distribuyó en alícuotas de 5.5 mL en tubos de 13 X 100 mm con tapón de rosca. Se esterilizó en autoclave a 120 °C por 15 min. Posteriormente se almacenó en refrigeración hasta su uso.

6.5.5 Agar Soya-Trypticasa

Se procedió de la misma forma que en el 6.5.4 pero con la siguiente modificación: se agregó al caldo soya-trypticasa, 20.0 g de agar bacteriológico en 1000 mL de agua desionizada. Se calentó el medio a 70 °C para disolver el agar. Una parte del medio se distribuyó en tubos de 13 X 100 mm colocando alícuotas de 5 mL y la otra parte en un matraz de vidrio. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Después de este tiempo los tubos se colocaron en forma inclinada, y el medio del matraz se vertió en cajas de petri de 100 X 15 mm estériles, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se almacenó el material en ambiente húmedo a 4 °C hasta su uso.

6.6 Cultivo axénicos de protozoarios.

6.6.1 Resiembra

Las cepas de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS y de *Giardia lamblia* IMSS:0889 se mantuvieron a 37 °C en una incubadora (Napco, modelo 5100, Pórtland Oregón, USA). Antes de cada resiembra se observaron los cultivos en un microscopio invertido (Reich, No. de serie WI-54220) para comprobar el buen aspecto morfológico y la movilidad de estos protozoarios. Se colocaron los cultivos de cada cepa en agua-hielo por 10 min, posteriormente se determinó la concentración celular con un hemacitómetro y se inocularon 5×10^3 amibas y 1×10^4 giardias por mL en cada uno de otros tres tubos (5.5 mL de medio suplementados con 10% de suero bovino) en medio de cultivo PEHPS (Saïd-Fernández *et al.*, 1988) o TYI-S-33 (suplementado 10% de suero bovino y 0.1 % de bilis bovina, Keister, 1983) fresco. Se conservaron los cultivos de la penúltima resiembra hasta comprobar el crecimiento celular de las amibas y las giardias. Las resiembras se realizaron cada 72 h.

6.7 Cinética de crecimiento

6.7.1 *Entamoeba histolytica*

Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para cada cepa. Se colocaron los tubos de la última resiembra en agua-hielo por 10 min, se agitaron suavemente y se determinó la densidad celular de cada tubo con un hemacitómetro. Se inocularon 5,000 trofozoítos/mL a 63 tubos de 13 X 100 mm conteniendo 5.5 mL de medio PEHPS. Cada 24 h se determinó en 3 tubos el número de trofozoítos por mL por tubo.

6.7.2 *Giardia lamblia*:

Se utilizó el procedimiento antes descrito para *E. histolytica* con la siguiente modificación: de los mejores tubos de la última resiembra, se enfriaron en agua-hielo por 10 min, se agitaron suavemente y se determinó la densidad celular haciendo una dilución de 1:10 para contar a las giardias (usando 100 μ L de medio de cultivo enfriado y homogenizado en 900 μ L de formalina al 10%), se obtuvo usando un hemacitómetro el número de trofozoítos por mL por tubo. Se inoculó 45 tubos (por triplicado) con 5.5 mL de cultivo TYI-S-33 y un inóculo de 1×10^4 trofozoítos/mL, los cuales se contaron cada 24 h.

6.8 Cultivos bacterianos

Los cultivos bacterianos se activaron, inoculándolos en caldo soya-tripticosa a 37 °C/24 h. Posteriormente se reincubaron en agar soya tripticosa y se incubaron nuevamente a 37 °C/24 h, para enseguida almacenarse a 4 °C/30 días hasta su utilización.

6.8.1 Ajuste de los inóculos bacterianos

De un cultivo activado en agar soya tripticosa se tomó un inóculo y se resuspendió en un tubo con solución salina al 0.85%, hasta obtener una absorbancia de 0.098-0.1 equivalente al tubo 0.5 de la escala de MacFarland. La lectura se llevó a cabo en un espectrofotómetro (TURNER Sp830) a una longitud de onda de 600 nm.

6.9 Colecta de las plantas

6.9.1 Localización

Las plantas se colectaron en el municipio de Galeana. Este municipio se encuentra en la parte central del Estado de Nuevo León, en las coordenadas 24° 50' latitud norte y 100° 04' longitud oeste, a una altura de 1,655 metros sobre el nivel del mar. Limita al Norte con Rayones y con el estado de Coahuila; al Sur con Aramberri y Doctor Arroyo; al Este con Rayones, Montemorelos, Linares e Iturbide, y al Oeste con los estados de Coahuila y San Luis Potosí. Su extensión territorial es de 7,154.6 kilómetros cuadrados y presenta los siguientes cerros: El Cerro del Potosí con 3,715 (de los más altos de Nuevo León), El Pañuelo, El Orégano y las Sierras de Cateado y Mazmorras. Galeana tiene los ríos: Pablillo, Potosí y Pilon, la Laguna de Labradores y las presas: el Vikingo y el Carmen. Su clima es seco, estepario y frío; es templado con lluvias de verano y una precipitación media de 393 mm. Galeana presenta una temperatura media anual de 19 °C. Su flora se compone de pinos, encinos, oyameles, cedros, mezquites, palmas, lechuguillas, magueyes, nopales, carrizos y nogales (<http://www.e-local.gob.mx>).



Figura 8. Mapa del Estado de Galeana, N.L.

Las plantas se colectaron del ejido San Antonio del Salero, municipio de Galeana. Obtuvimos corteza, tallo y hojas de *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Chenopodium ambrosioides* L., *Marrubium vulgare* L., *Mentha spicata* L y solamente las hojas de *Fluorensia cernua* DC. Parte de cada planta, se colocó en una prensa botánica y se identificaron en el Departamento de Fanerógamas del Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Esto con el objeto de obtener su identificación correcta y tener la certeza de que las plantas fueron las auténticas para hacer las pruebas de actividad antiprotozoaria y antimicrobiana. Otra parte del material colectado se deshidrató en una estufa a 37 °C. Después se trituró cada parte seca de las plantas, con un molino manual y se almacenó el material en frascos oscuros de vidrio. De

cada muestra se obtuvieron los extractos, hexánicos, acetónicos, metanólicos y acuosos. La preparación de los extractos se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular del CIBIN, IMSS.

6.10 Obtención de los extractos

6.10 1 Extractos acuosos

A partir de la muestra seca y molida se agregaron 60.0 g a 600 mL de agua bidestilada y se llevó a ebullición/20 min. Después de este tiempo, se retiró del fuego y se dejó reposar hasta que la infusión alcanzó la temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró a través de filtros de 8.0, 4.0, 0.8 y 0.45 micras e inmediatamente se llevó a sequedad usando una liofilizadora (LABCONCO, Freeze Dry System, Frezone 12 USA). Una vez liofilizadas las muestras, se colocaron en frascos de vidrio oscuro y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.



Figura 9. Filtración del extracto acuoso



Figura 10. Liofilización de los extractos acuosos

6.10.2 Extractos hexánicos.

Se colocaron en matraces erlenmeyer con tapón de rosca, 300 mL de hexano y 150.0 g de la muestra seca de las plantas de *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Chenopodium ambrosioides* L., *Marrubium vulgare* L., *Mentha spicata* L y solo las hojas en el caso de *Fluorensia cernua*. Se mantuvieron los matraces en un agitador shaker (Controlled Environment Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, N.J., USA) por 7 días a temperatura ambiente. Después de este tiempo se filtró cada extracto en filtros Wathman No. 1. El filtrado se dejó evaporar hasta sequedad a temperatura ambiente usando una campana de extracción. Se obtuvo el extracto mediante un raspado de los residuos y se almacenaron en frascos de vidrio oscuro hasta su uso. Para el análisis de cada extracto, se pesó 0.3 g de cada extracto y se resuspendió en 3 mL de etanol absoluto (solución madre). Posteriormente se esterilizó cada solución madre usando filtros de 0.22 micras (Millipore, Molsheim, France), y se almacenó cada solución del extracto estéril a - 20 °C hasta su uso.

6.10.3 Extractos acetónicos.

Al residuo vegetal hexánico de cada planta se agregaron 300 mL de acetona. Se colocaron en agitación constantemente por 7 días a temperatura ambiente en un agitador sheker. Después de este tiempo, se filtró con papel Wathman No. 1. A los filtrados los evaporamos a sequedad y se conservaron en frascos de vidrio oscuro a temperatura ambiente hasta su uso. Se resuspendieron 0.3 g de cada extracto en 3 mL de etanol absoluto, se esterilizó por filtración y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

6.10.4 Extractos metanólicos.

A los residuos vegetales acetónicos de cada planta se les agregó 300 mL de metanol. Se agitaron los extractos de cada planta en forma constante por 7 días a temperatura ambiente usando un agitador sheker. Después de este tiempo, se filtró cada extracto en papel Wathman No. 1. El filtrado se evaporó a temperatura ambiente en una campana de extracción. Se rasparon los residuos de cada extracto y se conservaron en frascos oscuros hasta su uso. Resuspendimos 0.3 g de cada extracto en 3 mL de etanol absoluto, se esterilizó por filtración y se almacenó cada extracto a -20 °C hasta su uso.



Figura 11. Obtención de los extractos con solventes



Figura 12. Extractos en el sheker en agitación constante.

6.11 Obtención de la CI₅₀ en *E. histolytica* y *G. lamblia* de los extractos de cada planta y el metronidazol.

La CI₅₀ es la concentración inhibitoria necesaria para obtener el 50 % de los microorganismos vivos cuando se trabaja en condiciones de citotoxicidad de algún fármaco.

6.11.1 Incorporación de los extractos de las plantas a los medios de cultivo PEHP (Amibas) y TYI (Giardias) y la obtención de sus CI₅₀

6.11.1.1 Acuoso.

Tubos con tapón de rosca conteniendo 5 mL de medio PEHP, TYI y Soya-Trypticase-Caldo se esterilizaron a 121 °C por 15 min y se dejaron enfriar. A los tubos con medio PEHP y TYI les añadimos 10 % de suero (con vitaminas y al TYI-S-33 1 % de bilis bovina)., se añadió 50 µL de cada uno de los extracto acuosos de cada planta previamente esterilizados por filtración con filtros de 0.22 µ, ajustando las concentraciones desde 10 a 0.5 mg/mL. Se inocularon los tubos de PEHPS con 5 X 10³ amibas/mL y en el caso de TYI-S 1 X 10⁴ giardias/mL y las bacterias con 1.5 X 10⁶ bacterias/mL. Se determinó el número de trofozoítos en los medios PEHPS y TYI-S-33 cada 72 h con un hemacitómetro y en el caso de las bacterias a las 24 h, se seleccionaron los tubos con ausencia de turbidez y se corroboró la ausencia de crecimiento inoculando 10 µL en cajas petri con agar soya tripticasa. Como control positivo usamos al cloranfenicol (a concentraciones de 0.001 a 20 mg/mL) y como control negativo 50 µL de etanol absoluto. Con estos datos determinamos la Concentración Mínima Bactericida.

6.11.1.2 Hexánico, acetónico y metanólico.

A partir de los diferentes extractos obtenidos con diferentes polaridades de cada planta, se procedió de igual manera que en el extracto anterior, solo que las concentraciones de cada extracto se ajustaron desde 5.0 a 0.009 mg/mL. Los tubos

con medio PEHPS y TYI-S-33 se inocularon con la misma concentración de cél/mL que en el caso anterior; de la misma forma se procedió con las bacterias. El número de trofozoítos y de bacterias se determinó de igual forma que en el caso anterior.

En todos los experimentos con los extractos de las plantas, se usó como control positivo al metronidazol (0.4 a 0.05 µg/mL) disuelto en los medios PEHPS (amibas) o TYI-S-33 (giardias) y al cloramfenicol (20 mg/mL a 10 µg/mL) para las bacterias. Como control negativo usamos 50 µL de etanol absoluto (Sigma). Se incubó durante 72 h, después de este tiempo se determinó el número de trofozoítos con un hemacitómetro y el número de bacterias a las 24 h. Posteriormente se inoculó en cajas Petri con agar soya tripticasa para descartar crecimiento bacteriano.

6.12 Análisis estadístico de la CI₅₀ usando el método PROBIT (Finney, 1971).

Se obtuvo la CI₅₀ de cada experimento del logaritmo base 10 del número de trofozoítos vivos de cada dosis probada en los extractos de cada planta; el metronidazol (control positivo) y el etanol (control negativo); estos datos los comparamos con el número de trofozoítos contra el control negativo. Los datos se procesaron y analizaron en el paquete estadístico SPSS versión 10. Se graficó el número encontrado en Probit contra el logaritmo base 10 de las concentraciones probadas de cada extracto (Finney, 1971).

6.13 Obtención de la CMB de los extractos de las plantas sobre las bacterias

La actividad antimicrobiana se mide determinando la cantidad más pequeña del agente que se necesita para inhibir el crecimiento de un organismo control, valor que se conoce como concentración mínima bactericida (CMB). Se determinó las CMB de los extractos de cada planta en tubos con 5 mL de Caldo-Soya-Trypticasa, a los cuales se les añadió diferentes concentraciones de cada extracto. Se inocularon tubos con 10 µL de la suspensión bacteriana y se incubó por 24 h. Después de la

incubación se observó la ausencia de crecimiento, indicado por la ausencia de turbidez visible y se corroboró depositando en placas con agar soya tripticasa.

6.13.1 Técnica de dilución en tubo usando los extractos de las plantas sobre el crecimiento de las bacterias.

6.13.1.1 Acuosos

Se procedió igual que el inciso 6.11.1.1

6.13.1.2 Hexánico, acetónico y metanólico

Se procedió igual que el inciso 6.11.1.2

6.14. Identificación de metabolitos secundarios de los extractos de las plantas por métodos químicos. (Domínguez, 1973).

Se identificaron los metabolitos secundarios en cada extracto de cada planta y determinamos los posibles grupos funcionales por los métodos de pruebas coloridas.

6.14.1 Prueba de Liebermann-Burchard

Para triterpenos y compuestos esteroidales. En una placa de porcelana se añadió una gota del extracto, 1 gota de cloroformo y tres gotas del reactivo de Liebermann-Burchard (20 µL de ácido sulfúrico más 1 mL de ácido acético anhidro y 1 mL de cloroformo), un viraje de color hacia azul, verde, rojo o anaranjado es una prueba positiva para estos compuestos.

6.14.2 Prueba de Salkowski

Para esteroides y metilesteroides. A 1 gota de cada muestra de extracto de cada planta se le añadió 1 mL de cloroformo y 1 mL de ácido sulfúrico, al contacto se observa un viraje de color hacia el amarillo o rojo en la presencia de estos compuestos.

6.14.3. Prueba de ácido sulfúrico

Para flavonoides. A una gota del extracto, se le agregó 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Si la coloración varía corresponde a: amarillo para flavonas y flavonoles; naranja-guinda para flavonas; rojo-azuloso para chalconas y roja-púrpura para quinonas.

6.14.4. Prueba de Baljet

Para sesquiterpenlactonas. Se utilizaron dos soluciones mezcladas en volúmenes iguales antes de usarse, reactivo 1: solución A: se disolvió 1.0 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol; y la solución B: 10.0 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua bidestilada. A 3 gotas de los extractos, se agregaron 4 gotas del reactivo 1, la coloración naranja a roja oscura representa una prueba positiva.

6.14.5. Prueba de Dragendorff

Para alcaloides. Modificación de Meunier y Machelobuf. Se obtuvo el reactivo 2: solución A: A 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua bidestilada, en la cual se le disolvieron 0.85 g de nitrato de bismuto; y solución B: se disolvieron 8.0 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua bidestilada. El reactivo 2 lo preparamos cuando mezclamos 5 mL de la solución A con 4 mL de la solución B y aforamos a

100 mL con agua bidestilada. A 1 gota del extracto se le agregaron 80 μ L del reactivo 2, al contacto las muestras que se tornaron a una coloración rojas o naranjas persistentes por 24 horas nos indica una prueba positiva.

6.14.6. Prueba de permanganato de potasio

Para dobles enlaces. Se disolvieron 2.0 g de permanganato en 100 mL de agua bidestilada. Pesamos 0.2 mg de cada extracto y agregamos 3 gotas del permanganato. Si se observa precipitado café la prueba es positiva.

6.14.7. Prueba de cloruro férrico

Para oxhidrilos fenólicos. A 1 gota del extracto le agregamos 3 gotas de etanol y 20 μ L de una solución de cloruro férrico (2.5% en agua bidestilada). Al contacto, si aparece una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se considera positiva.

6.14.8. Prueba de Molisch

Para azúcares. Se añadieron a tubos de ensaye de 13 X 100 mm 2 gotas del extracto con 60 μ L de reactivo de Molisch (1 g de alfa naftol en 100 mL de etanol al 95%), se agitaron los tubos y se añadió a cada tubo 2 ml de ácido sulfúrico concentrado por las paredes. La prueba se consideró positiva si se observa un anillo coloreado en la interfase.

6.14.9. Prueba de bicarbonato de sodio

Para saponinas. Se mezclaron 2 gotas de cada extracto de cada planta con 3 gotas de una solución de bicarbonato al 10% y la aparición de burbujas en los tubos indica la presencia de estos compuestos.

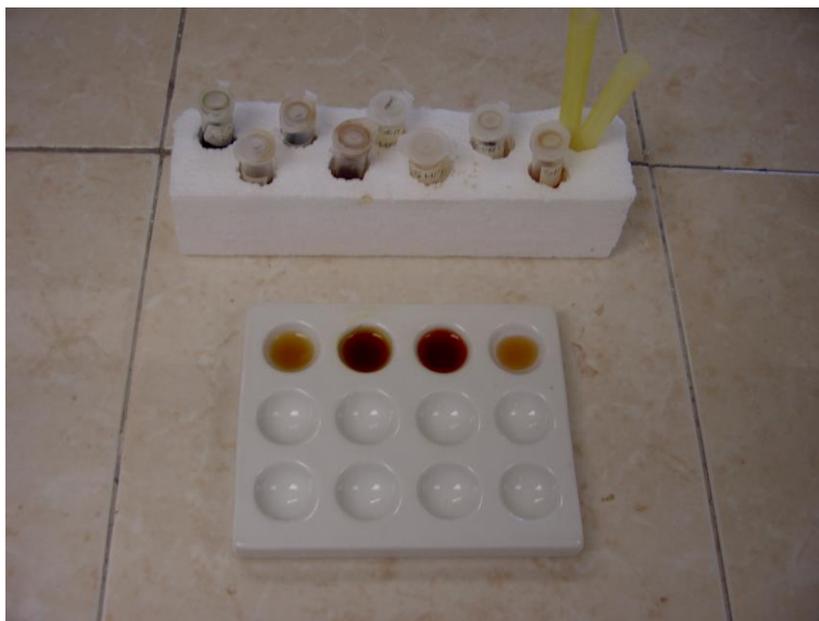


Figura 13. Placa de porcelana con pruebas coloridas

6.15. Cromatografía en placa fina de los extractos de las plantas.

Los extractos se separaron en fracciones usando cromatografía en placa fina (silica gel GHL, F-254 de 250 μm , Universal Cientific Incorporated Merck Inc.).

Se aplicaron 3 mL del extracto (1 g en 10 mL de etanol), gota a gota con una jeringa de 10 mL a 1.5 cm del borde inferior de una cromatoplaque. Se secaron las muestras con calentamiento ligero con aire de un secador de pelo industrial. Se colocó verticalmente las cromatoplaques dentro de cámaras porta cromatoplaques. Se usó como disolvente una mezcla de cloroformo-acetona (9.5:0.5). Se cerraron las cámaras y se dejó ascender el disolvente hasta 0.5 cm antes de terminar las

cromatoplasmas. Se evaporó el disolvente a temperatura ambiente y se observaron las fracciones usando luz visible y luz ultravioleta. En base a las separaciones de las fracciones se obtuvieron los Rf de cada fracción: el cociente entre el recorrido de la fracción (l_s) y el del eluyente (l_T).

$$R_f = \frac{l_s \text{ (cm)}}{l_T \text{ (cm)}}$$

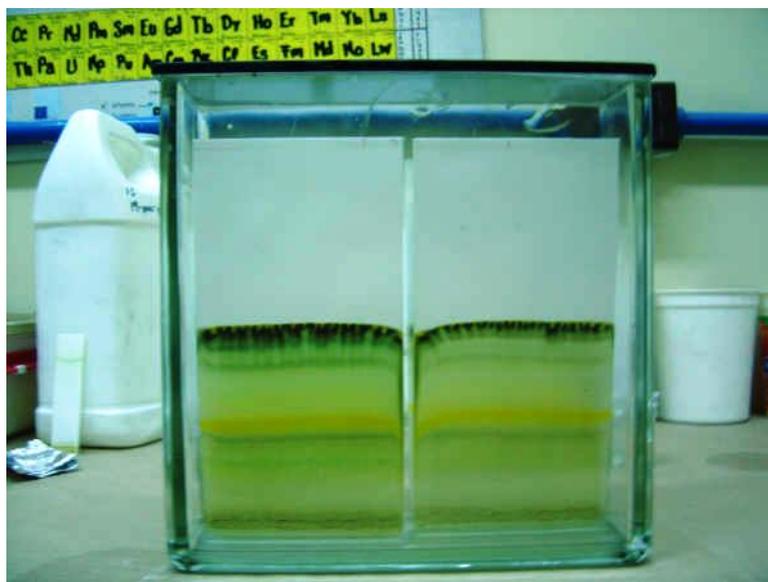


Figura 14. Corrimiento de las muestras en cromatoplasmas de sílica gel.

6.16 Aislamiento de las fracciones.

Se aislaron las fracciones de las cromatoplasmas que mayor separación tuvieron, se raspó cada fracción y se colocaron en tubos de poliestireno de 50 ml. A cada tubo se le agregó 10 mL de etanol absoluto y se agitaron en un vórtex 15 min, después se centrifugaron 2,500 r.p.m. por 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se colocó en tubos de vidrio 15 X 150 mm (previamente pesados) y se llevaron a sequedad en una estufa a 45 °C. Se determinó por diferencia de peso la cantidad de

cada muestra y se ajustaron las concentraciones entre 111 y 123 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en etanol absoluto.

6.17 Efecto de las fracciones sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Se obtuvieron las fracciones de las cromatoplasmas a partir de los extractos. Cada fracción se probó contra el porcentaje de viabilidad en *E. histolytica* y *G. lamblia*. A tubos con tapón de rosca y 5 mL de medio PEHPS (amibas) y TYI-S-33 (giardia), se les añadieron 50 μL de cada fracción y se ajustaron las fracciones a la máxima concentración. Se inocularon los tubos de PEHPS con 5×10^3 amibas/mL y en el caso de TYI-S 1×10^4 giardias/mL. Se determinó el número de trofozoítos en los medios PEHPS y TYI-S-33, después de incubarlos por 72 h con un hemacitómetro y los resultados se comprobaron contra el control negativo (etanol absoluto).

6.18 Determinación de los grupos funcionales de las fracciones aisladas

A fracciones aisladas de la cromatografía se les realizó las pruebas coloridas de acuerdo a lo descrito por Domínguez, 1973 tal y como se describe en el punto 6.14

7. RESULTADOS

En esta investigación se decidió explorar el efecto de los extractos, hexánicos, acetónicos, metanólicos y acuosos de las siguientes plantas: corteza, tallo y hojas de *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Chenopodium ambrosioides* L., *Marrubium vulgare* L., *Mentha spicata* L y solamente las hojas de *Fluorensia cernua* DC, sobre el crecimiento *in vitro* de *E. histolytica*, *G. lamblia* y sobre las bacterias: *E. coli*, *S. aureus*, *S. choleraesuis* y *S. flexneri*.

7.1 Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* y la cepa IMSS:0989 de *Giardia lamblia*.

Se determinó matemáticamente por medio de regresión lineal en curvas de crecimiento de *E. histolytica* y *G. lamblia* los parámetros de crecimiento como el tiempo de duplicación, inóculo y días de incubación necesarios para obtener cultivos creciendo en la fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas para cada protozooario (fig. 15 y 16).

7.1.1 *E. histolytica* cepa HM1:IMSS.

La fig. 15 corresponde a una curva típica de crecimiento de la cepa HM1:IMSS, en donde se observa una ausencia de la fase lag de crecimiento. La función que encontramos en la fase exponencial de crecimiento de la cepa HM1:IMSS correspondió a la siguiente ecuación:

$$\text{Número de amibas/mL} = e^{mX+b}$$

$$\text{Correlación con la recta } r^2 = 0.95$$

A partir de esta ecuación se determinó un tiempo de duplicación de 33.76 h, un inóculo de 5×10^3 amibas/mL y el tiempo de cultivo de 3 días necesario para obtener cultivos creciendo en la fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas.

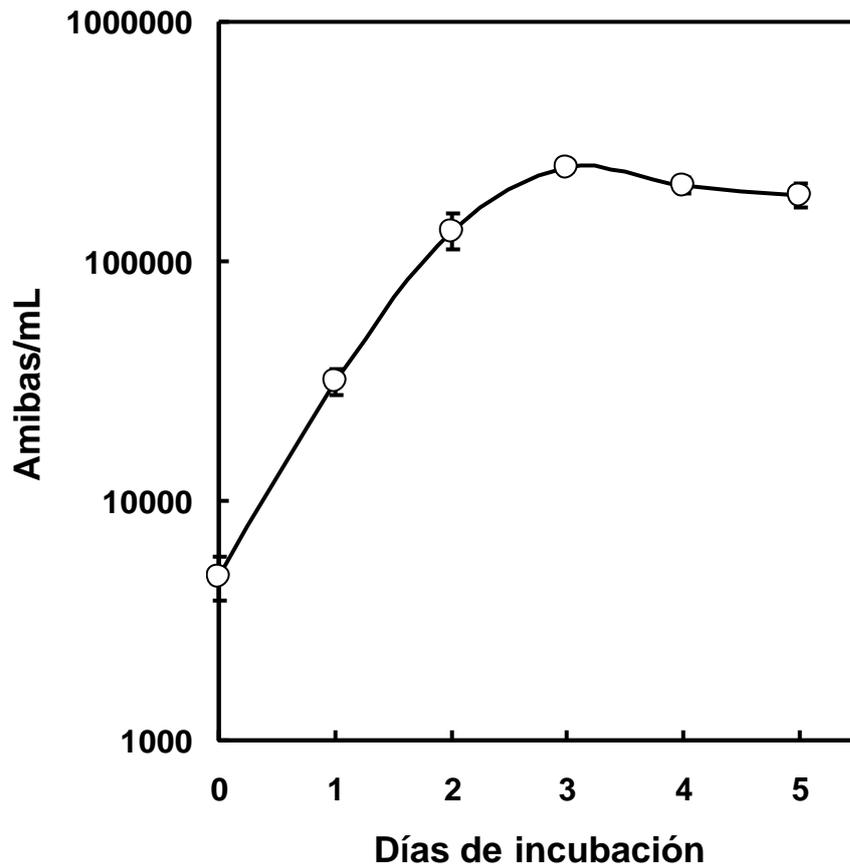


Figura 15. Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes en tres ensayos diferentes. El coeficiente de correlación con la recta (r^2) = 0.95; $P < 0.001$.

7.1.2 *G. lamblia* cepa IMSS:0989.

La fig. 16 corresponde a una curva típica de crecimiento de la cepa de *G. lamblia* cepa IMSS:0989. La función que se encontró en la fase exponencial de crecimiento de *G. lamblia* correspondió a la siguiente:

$$\text{Número de trofozoítos/mL} = e^{m(x)+b}.$$

$$\text{Correlación con la recta } r^2 = 0.996$$

A partir de esta ecuación se determinó un tiempo de duplicación de 10.36 h, un inóculo de 1×10^4 giardias/mL, y un tiempo de cultivo de 3 días necesario para obtener cultivos creciendo en la fase exponencial y en buenas condiciones fisiológicas.

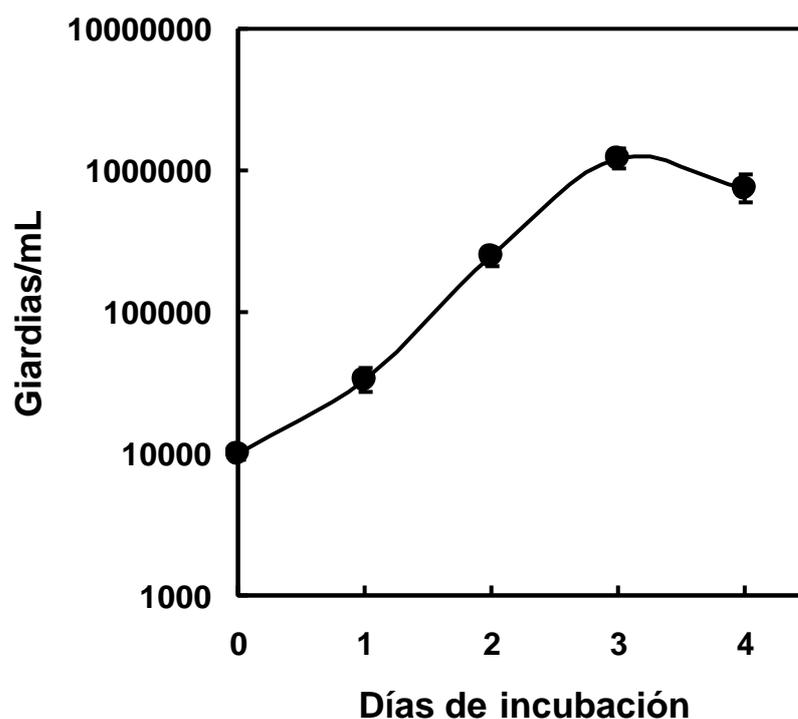


Figura 16. Relación temporal del crecimiento de la cepa IMSS:0989 de *G. lamblia*. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes de tres experimentos diferentes. El coeficiente de correlación con la recta (r^2) = 0.996; $P < 0.001$.

7.2 Determinación del efecto del metronidazol sobre el crecimiento de *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Una vez obtenido los parámetros de crecimiento y las condiciones óptimas de cultivo de ambos protozoarios, determinamos la CI_{50} del metronidazol (control positivo), ya que este medicamento se usa por excelencia para matar a ambos parásitos. Para ello adaptamos un método de ensayo que nos permitiera evaluar con precisión y reproducibilidad la CI_{50} en ambos protozoarios usando extractos de plantas, para después identificar el ó los compuestos responsables de este efecto.

Se encontró que las concentraciones crecientes de 0.05-0.4 $\mu\text{g/mL}$ del metronidazol en los medios de cultivo, disminuyeron el crecimiento tanto de *E. histolytica* (fig. 17) como *G. lamblia* (fig. 18). Con el uso de la prueba estadística de Probit determinamos una CI_{50} para *E. histolytica* que fue de 0.124 $\mu\text{g/mL}$ y para *G. lamblia* fue de 0.205 $\mu\text{g/mL}$; es decir el metronidazol fue 1.65 veces más activo contra las amibas que contra las giardias.

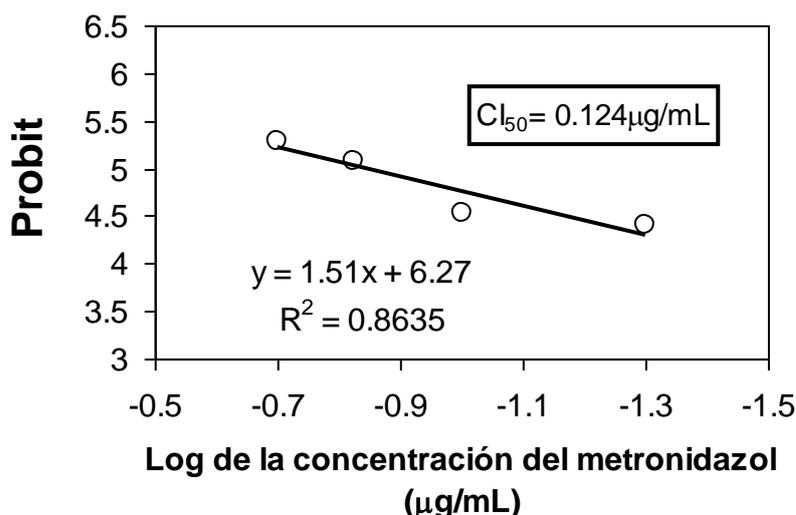


Figura 17. Relación entre la cantidad de metronidazol y el crecimiento de *E. histolytica*. Estos resultados se procesaron y analizaron por el método de Probit, usando el paquete estadístico de SPSS-10. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes en tres experimentos diferentes.

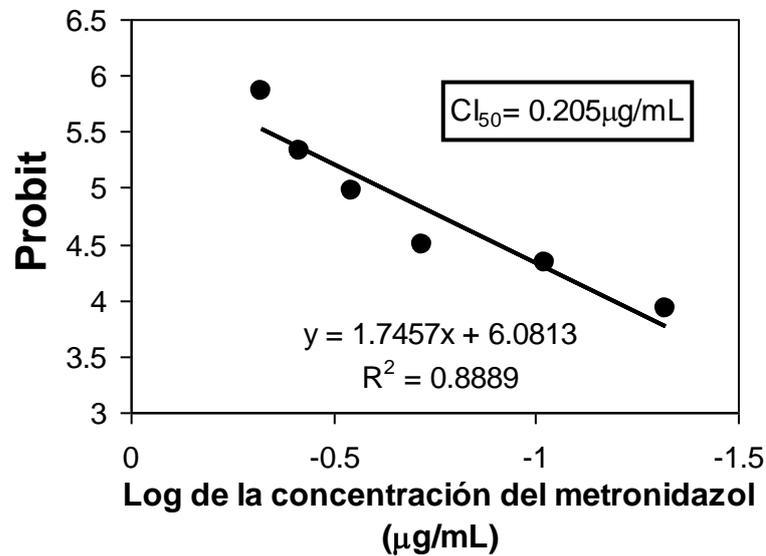


Figura 18 Relación entre la cantidad de metronidazol y el crecimiento de *G. lamblia*. Estos resultados se procesaron y analizaron por el método de Probit, usando el paquete estadístico de SPSS-10. Cada punto corresponde a tres experimentos independientes y tres determinaciones en cada experimento.

7.3 Determinación de la CI_{50} de los extractos de las plantas sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Una vez que se determinó la CI_{50} con el metronidazol sobre *E. histolytica* y *G. lamblia* se detectó y cuantificó el efecto de los extractos; hexánicos, acetónicos, metanólicos y acuosos de las plantas; corteza, tallo y hojas de *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Chenopodium ambrosioides* L., *Marrubium vulgare* L., *Mentha spicata* L y solamente las hojas de *Fluorensia cernua* DC.

7.3.1 *E. histolytica*.

Se encontró que las CI₅₀ de todas las plantas en sus extractos acuosos resultaron con valores mayores de 100 µg/mL como se puede ver en la tabla 1. En los extractos obtenidos con los diversos disolventes encontramos que las CI₅₀ más bajas fueron: acetónico de marrubio con 7 µg/mL y el metanólico de yerbabuena con 8 µg/mL. El metanólico del marrubio y el acetónico de la yerbabuena fueron muy similares con una CI₅₀ de 12 y 13 µg/mL y el hexánico y acetónico del epazote con 57 y 58 µg/mL respectivamente (tabla 1).

TABLA 1

CI₅₀ DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS CONTRA *E. histolytica*. µg/mL

| PLANTA | ACUOSO | HEXÁNICO | ACETÓNICO | METANÓLICO |
|--------------------------------------|--------|-----------|-----------|------------|
| <i>A. ludoviciana</i> (ISTAFIATE) | 2,243 | 122 | 117 | 322 |
| <i>Ch. ambrosioides</i> (EPAZOTE) | 3,274 | 57 | 58 | 186 |
| <i>F. cernua</i> (HOJASEN) | 1,067 | 264 | 232 | 236 |
| <i>M. vulgare</i> (MARRUBIO) | 534 | 230 | 7 | 12 |
| <i>M. spicata</i> (YERBABUENA) | 357 | 17 | 13 | 8 |
| METRONIDAZOL ^a | 0.124 | | | |

^a control positivo.

7.3.2 *G. lamblia*.

Se encontró que las CI₅₀ de los extractos acetónicos y metanólicos del marrubio y del hojaseñ dieron valores menores de 100 µg/mL y (tabla 2). Las cantidades encontradas de sus CI₅₀ fueron muy similares 34 a 42 µg/mL a excepción del acetónico del marrubio que fue de 90 µg/mL.

TABLA 2

CI₅₀ DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS CONTRA *G. lamblia*. µg/mL

| PLANTA | ACUOSO | HEXÁNICO | ACETÓNICO | METANÓLICO |
|--------------------------------------|--------|----------|-----------|------------|
| <i>A. ludoviciana</i> (ISTAFIATE) | 1,905 | 137 | 496 | 298 |
| <i>Ch. ambrosioides</i> (EPAZOTE) | 3,039 | 597 | 135 | 580 |
| <i>F. cernua</i> (HOJASEÑ) | 943 | 119 | 42 | 35 |
| <i>M. vulgare</i> (MARRUBIO) | 960 | 502 | 90 | 34 |
| <i>M. spicata</i> (YERBABUENA) | 982 | 185 | 110 | 380 |
| METRONIDAZOL ^a | 0.205 | | | |

^aControl positivo

La tabla 3 nos muestra el resumen de los extractos de las plantas y la CI₅₀ para *E. histolytica* y *G. lamblia*

TABLA 3
CI₅₀ DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS
CONTRA *E. histolytica*/G. lamblia µg/mL

| PLANTA | ACUOSO | HEXÁNICO | ACETÓNICO | METANÓLICO |
|--------------------------------------|----------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>A. ludoviciana</i> (ISTAFIATE) | 2,243 1,905 | 122 137 | 117 496 | 322 298 |
| <i>Ch. ambrosioides</i> (EPAZOTE) | 3,274 3,039 | 57 597 | 58 135 | 186 580 |
| <i>F. cernua</i> (HOJASEN) | 1,067 943 | 264 119 | 232 42 | 236 35 |
| <i>M. vulgare</i> (MARRUBIO) | 534 960 | 230 502 | 7 90 | 12 34 |
| <i>M. spicata</i> (YERBABUENA) | 357 982 | 17 185 | 13 110 | 8 380 |
| METRONIDAZOL ^a | 0.124 0.205 | | | |

^aControl positivo

7.4 Determinación de la CMB de los extractos sobre *E. coli*, *S. aureus*, *S. choleraesuis* y *S. flexneri*.

Los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de las plantas no mostraron actividad citotóxica a 900 µg/mL contra el crecimiento de las bacterias (tabla 4). Se encontró que solo el extracto acuoso de las plantas *Marrubium vulgare* y *Mentha spicata* tuvieron un efecto sobre *S. aureus* observándose una CMB de 5 y 5.5 µg/mL respectivamente (tabla 5). Se usó el cloranfenicol como control positivo.

TABLA 4

CMB DE LOS EXTRACTOS DE *A. ludoviciana*, *Ch. ambrosioides*, *F. cernua*, *M. vulgare* y *M. spicata* contra *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis* y *Shigella flexneri*.

| Extractos | <i>E. coli</i> CMB µg/mL | <i>S. aureus</i> CMB µg/mL | <i>S. choleraesuis</i> CMB µg/mL | <i>S. flexneri</i> CMB µg/mL |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| HEXÁNICOS | > 900 | > 900 | > 900 | > 900 |
| ACETÓNICOS | > 900 | > 900 | > 900 | > 900 |
| METANÓLICOS | > 900 | > 900 | > 900 | > 900 |
| CLORAMFENICOL | 40 µg/ mL | | | |

TABLA 5

CMB DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE LAS PLANTAS CONTRA *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis* y *Shigella flexneri*.

| Extractos | <i>E. coli</i> CMB mg/mL | <i>S. aureus</i> CMB mg/mL | <i>S. choleraesuis</i> CMB mg/mL | <i>S. flexneri</i> CMB mg/mL |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| <i>A. ludoviciana</i> | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 |
| <i>Ch. ambrosioides</i> | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 |
| <i>F. cernua</i> | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 |
| <i>M. vulgare</i> | > 10 | 5 | > 10 | > 10 |
| <i>M. spicata</i> | > 10 | 5.5 | > 10 | > 10 |
| CLORAMFENICOL | 40 µg/ mL | | | |

7.5 Determinación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de cada planta.

Se determinaron los metabolitos secundarios de cada extracto; hexánico, acetónico, metanólico y acuoso de las plantas *Artemisia ludoviciana* Nutt., *Chenopodium ambrosioides* L., *Marrubium vulgare* L., *Mentha spicata* L y *Fluorensia cernua* usando las pruebas coloridas. Se encontraron sesquiterpenlactonas, dobles enlaces, oxidrilos fenólicos, azúcares y lactonas (tabla

6). Algunos extractos presentaron alcaloides, saponinas y solo un extracto, el acuoso de *Artemisa ludoviciana* presentó triterpenos y compuestos esteroidales, como se puede observar en la tabla 6.

TABLA 6
METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LOS EXTRACTOS

| Extractos de las plantas | | | | | |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Pruebas realizadas | <i>Artemisia ludoviciana</i> | <i>Chenopodium ambosioides</i> | <i>Flourensia cernua</i> | <i>Marrubium vulgare</i> | <i>Mentha Spicata</i> |
| Sesquiterpenlactonas | + ¹ | - ¹ | + ¹ | ± ¹ | + ¹ |
| | + ² | + ² | + ² | + ² | + ² |
| | + ³ | + ³ | + ³ | + ³ | + ³ |
| | + ⁴ | - ⁴ | + ⁴ | - ⁴ | + ⁴ |
| Alcaloides | - ¹ | + ¹ | - ¹ | - ¹ | - ¹ |
| | + ² | - ² | - ² | - ² | - ² |
| | - ³ | - ³ | - ³ | - ³ | - ³ |
| | - ⁴ | + ⁴ | + ⁴ | - ⁴ | - ⁴ |
| Dobles enlaces | + ¹ | + ¹ | + ¹ | + ¹ | + ¹ |
| | + ² | + ² | + ² | + ² | + ² |
| | + ³ | + ³ | + ³ | + ³ | + ³ |
| | + ⁴ | + ⁴ | + ⁴ | + ⁴ | + ⁴ |
| Oxidrilos fenólicos | - ¹ | + ¹ | + ¹ | + ¹ | + ¹ |
| | + ² | + ² | + ² | + ² | + ² |
| | - ³ | + ³ | + ³ | + ³ | + ³ |
| | + ⁴ | - ⁴ | + ⁴ | - ⁴ | + ⁴ |
| Azúcares | - ¹ | + ¹ | + ¹ | + ¹ | - ¹ |
| | + ² | - ² | + ² | + ² | + ² |
| | - ³ | + ³ | + ³ | + ³ | + ³ |
| | + ⁴ | + ⁴ | + ⁴ | - ⁴ | - ⁴ |
| Saponinas | - ¹ | - ¹ | - ¹ | - ¹ | - ¹ |
| | - ² | - ² | - ² | - ² | - ² |
| | - ³ | - ³ | - ³ | - ³ | - ³ |
| | - ⁴ | + ⁴ | + ⁴ | - ⁴ | + ⁴ |
| Triterpenos y Comp. esteroidales | - ¹ | - ¹ | - ¹ | - ¹ | - ¹ |
| | - ² | - ² | - ² | - ² | - ² |
| | - ³ | - ³ | - ³ | - ³ | - ³ |
| | + ⁴ | - ⁴ | - ⁴ | - ⁴ | - ⁴ |
| Lactonas | + ¹ | + ¹ | + ¹ | + ¹ | - ¹ |
| | + ² | + ² | + ² | + ² | + ² |
| | - ³ | - ³ | + ³ | + ³ | + ³ |
| | + ⁴ | + ⁴ | + ⁴ | + ⁴ | + ⁴ |

1) Extracto hexánico, 2) acetónico, 3) metanólico, 4) acuoso

7.6 Separación en fracciones del extracto de *M. vulgare* usando cromatografía en placa fina.

Se seleccionó el extracto metanólico de la planta de *M. vulgare* ya que este extracto fue el que menor CI_{50} presentó para *E. histolytica* y *G. lamblia* (tabla 3). El extracto metanólico se separó por cromatografía en placa fina y se observaron las manchas con luz visible y luz ultravioleta (fig. 19). Se determinó el R_f de cada una y se aislaron 5 fracciones cuyos R_f fueron los siguientes: 0.94, 0.90, 0.84, 0.25 y 0.17 (fig. 19).

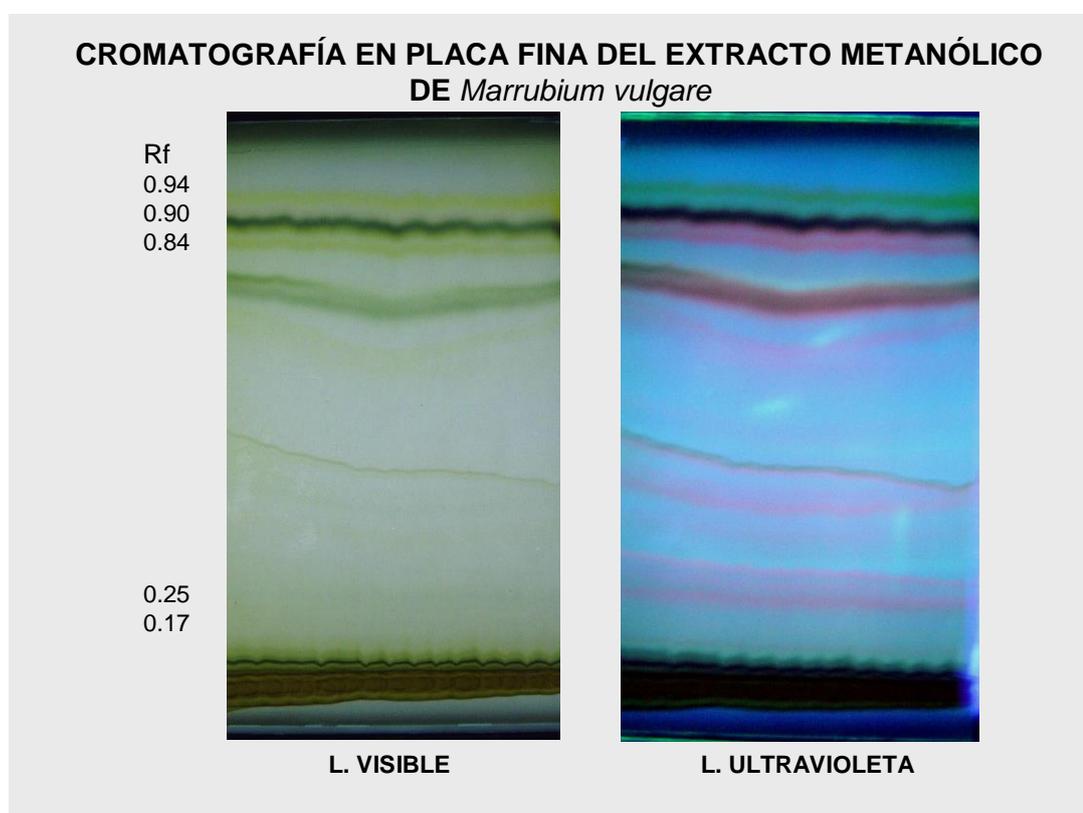


Figura 19. Separación y aislamiento del extracto metanólico de *M. vulgare* usando cromatografía en placa fina.

7.7 Efecto de las fracciones sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Se analizó el efecto de las fracciones sobre el porcentaje de inhibición en ambos protozoarios, se encontró que todas las fracciones presentaron menos del 50% de inhibición. La fracción con mayor % de inhibición (41%) fue para *E. histolytica* con un Rf de 0.25 y para *G. lamblia* la fracción con Rf de 0.90 con un 40% de inhibición (tabla 6). Las de menor % de inhibición fueron la de 0.90 para *E. histolytica* (12%) y para *G. lamblia* fue la de 0.17 (7%) tabla 6.

Tabla 7.

EFFECTO DE LOS COMPUESTOS AISLADOS SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *E. histolytica* y *G. lamblia*

| Rf | Concentración máxima (µg/ml) | <i>E. histolytica</i> % inhibición | <i>G. lamblia</i> % inhibición |
|-------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| 0.94 | 123 | 34 | 20 |
| 0.90 | 117 | 12 | 40 |
| 0.84 | 121 | 14 | 20 |
| 0.25 | 111 | 41 | 23 |
| 0.17 | 119 | 31 | 7 |

Tabla 6. Efecto de los compuestos aislados sobre el crecimiento de *E. histolytica* y *G. lamblia*

7.8 Determinación de los grupos funcionales en las bandas .

Se realizaron las pruebas coloridas descritas en el número 6.14 y se encontró que ambas bandas con Rf de 0.90 y 0.95 mostraron la presencia de sesquiterpenlactonas.

8. DISCUSIÓN

En todos los pueblos del mundo el proceso de salud-enfermedad es una realidad concreta presente en el ciclo de vida de todos los individuos. Desde siempre ha sido una preocupación básica del hombre la observación de sus padecimientos hasta llegar a elaborar complejas concepciones sobre la vida y la muerte, las enfermedades y sus tratamientos. Parte importante del patrimonio cultural de cada pueblo es este desarrollo conocedor, y a partir de él, se han conformado sistemas médicos empíricos teniendo como base la retención y uso de los recursos naturales del entorno biótico.

Estos conocimientos se han transmitido de generación en generación para preservar la vida y permitir la reproducción y florecimiento de la propia cultura. Miles de años de observación y experimentación empírica han sido necesarios para la evolución de los diversos sistemas médicos empíricos alrededor del mundo, de las concepciones que los fundamentan, así como del conocimiento de plantas, animales y minerales que constituyen los nichos ecológicos. Se han seleccionado los elementos útiles con potencialidades curativas y elaboradas taxonomías y diferentes tratamientos para las necesidades de salud que afrontan las sociedades.

Frecuentemente se piensa que la medicina tradicional abarca sólo el manejo de medicamentos naturales o más específicamente, la curación herbolaria. El concepto de medicina tradicional es una nominación convencional adoptada recientemente por investigadores de los procesos de salud-enfermedad para referirse a los sistemas médicos empíricos, organizados y fundamentados en las diversas culturas del mundo. Aunque existen generalidades compartidas, cada sociedad ha elaborado un sistema terapéutico complejo que engloba concepciones ideológicas y prácticas terapéuticas, al igual que el desarrollo de especialistas que saben cómo aplicarlas.

Muchos de los pacientes que hoy en día usan terapias herbales han manifestado el uso de la medicina tradicional desde los años 90, donde el uso de medicina no convencional no difiere de sexos o estatus social, pero sí por grupos étnicos, ingresos y edades (Eisenberg *et al.*, 1993; Goldman, 2001).

La Organización Mundial de la Salud ha publicado que de las 252 drogas consideradas como básicas y esenciales que existen, 28 son exclusivamente originarias de las plantas y un número significativo son drogas sintéticas obtenidas de precursores naturales (WHO, 2005). En éstos últimos años ha ido creciendo el interés en las terapias alternativas y del uso terapéutico derivados de plantas (Rates, 2000).

En este entorno, México cuenta con una gran diversidad de plantas por lo que es común que sean empleadas para tratar ciertas enfermedades, por lo que se han realizado estudios etnobotánicos para conocer el uso de ellas. Por ello, nuestro interés en detectar y caracterizar compuestos de origen herbolario que presenten grupos químicos activos que puedan ser efectivos contra microorganismos importantes que ocasionan diarrea. Con este enfoque nosotros usamos en este trabajo las siguientes cepas bacterianas: a) *Escherichia coli* O157:H7, b) *Staphylococcus aureus*, c) *Salmonella choleraesuis* y d) *Shigella flexneri*. Elegimos estas cepas por ser altamente patógenas (Alanís *et al.*, 2005). Además seleccionamos a los protozoarios parásitos *E. histolytica* HM1:IMSS y *G. lamblia* IMSS:0989, por ser las cepas que producen mayor rendimiento en los cultivos, porque en ellas se han detectado y caracterizado varias actividades biológicas y porque son usadas en los laboratorios de referencia en todo el mundo para realizar estudios contra estos dos parásitos (Calzada *et al.*, 1998; Meckes, 1999, Alanís *et al.*, 2003). También debido a que son los más representativos en las estirpes que producen diarrea en el humano (<http://cdc.gov>). Además debido a que ya existen cepas que han comenzado a mostrar resistencia a las drogas que comúnmente se emplean para combatir las, es de vital importancia el buscar alternativas y una de ellas es el estudio de las plantas, las cuales son utilizadas como remedios para enfermedades gastrointestinales (Borst y Ouellette, 1995).

Para tal propósito montamos el modelo para obtener la CI_{50} *in vitro* para los protozoarios y la CMB para las bacterias. Adaptando a estos resultados el método de Probit.

Para ello, el desarrollo de nuestro modelo experimental consistió primero en determinar el inóculo y los días de incubación necesarios para tener a *E. histolytica* y *G. lamblia* en buenas condiciones fisiológicas. Desarrollamos curvas de crecimiento donde encontramos lo esperado, un tiempo de duplicación para *E. histolytica* y *G. lamblia* de 33.76 h y 10.36 h y con un inóculo de 5,000 amibas/mL y 10,000 giardias/mL respectivamente. También definimos 2 días de incubación para ambos protozoarios como el tiempo necesario para tener a estos parásitos en fase logarítmica (fig. 15 y 16).

En segundo lugar, una vez obtenido los parámetros de crecimiento y las condiciones óptimas de los cultivos para ambos protozoarios (los cuales eran necesarios para obtener la CI_{50}), analizamos en nuestro modelo los efectos de una droga cuyos resultados fueran predecibles y que nos sirviera como un testigo positivo en todas nuestras pruebas donde usamos a estos dos protozoarios. Caracterizamos el efecto del metronidazol para ambos parásitos. Esta droga es la de excelencia para eliminar a ambos microorganismos (Sohni *et al.*, 1995., Samarawickrema *et al.*, 1997., Tona *et al.*, 1998., Uperoft *et al.*, 1999., Meckes *et al.*, 1999). Cuando usamos concentraciones crecientes de metronidazol en los cultivos de ambos protozoarios, encontramos lo esperado, que usando concentraciones crecientes (0.05-0.4 $\mu\text{g/mL}$) del metronidazol, disminuyó el crecimiento tanto de *E. histolytica* (fig. 17) como *G. lamblia* (fig. 18). Con el uso de la prueba estadística de Probit determinamos una CI_{50} para *E. histolytica* de 0.124 $\mu\text{g/mL}$ y para *G. lamblia* de 0.205 $\mu\text{g/mL}$; es decir el metronidazol es 1.65 veces más activo contra las amibas que contra las giardias. Con esto confirmamos que nuestro método tiene solidez y confiabilidad y se puede usar para probar cualquier agente que se sospeche que pueda matar a estos parásitos.

Usamos el método de análisis Probit ya que nos permite evaluar la CI_{50} ajustando los datos de mortalidad mediante una técnica de probabilidad para estimar los valores que siguen una distribución logarítmica de tolerancias. El porcentaje de organismos afectados o muertos por la acción tóxica de una sustancia, se transforma a unidades Probit. Esta transformación permite el ajuste a una línea de regresión, en

la cual la concentración perteneciente al Probit 5 corresponderá a la cantidad de sustancia capaz de generar el efecto estudiado en la mitad de la población.

Además, solamente una de las restricciones es que para el cálculo de la CI₅₀ deben obtenerse valores intermedios entre 0 y 100% de mortalidad, la mortalidad en el control negativo no debe exceder el 10% y la CI₅₀ para el tóxico de referencia deberá estar dentro de los límites de confianza preestablecidos por el control sin embargo, nosotros no tuvimos ningún problema debido a que nuestros resultados estaban dentro de los rangos o límites de confianza como se puede apreciar en las figuras 17 y 18.

Después adaptamos y analizamos en un modelo parecido al anterior (CI₅₀), la actividad antimicrobiana *in vitro* que llevamos a cabo mediante la determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) usando las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* y *Shigella flexneri*. Para ello, usamos dos técnicas para observar inhibición de crecimiento: i) dilución en tubo (Vanden y col., 1991) y 2) difusión en agar (Murray *et al.*, 2003). La técnica más eficaz fue la dilución en tubo para nuestros extractos. No tuvimos mucho éxito cuando usamos la difusión con sensibilizadores ya que en la zona de inhibición la apreciación fue casi imperceptible (1 mm de diámetro) con esta técnica. Esto se debió probablemente a que el diámetro de la zona de inhibición es influenciado por el rango de la difusión del agente antimicrobiano a través del agar y estos pueden variar de acuerdo al tamaño de la molécula de la droga y su hidrosolubilidad en el medio.

Cuando usamos esta técnica, encontramos que la técnica en dilución en tubo fue con la que pudimos detectar inhibición sobre el crecimiento de las bacterias.

Una vez adaptado y probado los modelos experimentales (CI₅₀ y CMB), analizamos la actividad antiprotozoaria y bactericida de los extractos acuosos, hexánicos, acetónicos y metanólicos de *Artemisia ludoviciana*, *Chenopodium ambrosioides*, *Flourensia cernua*, *Marrubium vulgare*, *Mentha spicata*. A estas plantas las seleccionamos debido a su importancia en la etnobotánica por ser utilizadas en casos de diarrea humana (comunicaciones personales y Cortés, 2000; Ankli *et al.*, 2002, <http://cdc.gov>).

Para esta parte del trabajo experimental, se usaron dos criterios para la elección de los disolventes y la estrategia para la obtención de los extractos de cada planta: 1) por la polaridad en donde usamos: i) el hexano por ser un disolvente no polar, por lo que extrae compuestos hidrofóbicos, anillos aromáticos y cadenas alquílicas; ii) la acetona que es medianamente polar, por lo que extrae metabolitos de este tipo y iii) el metanol por ser polar y extraer metabolitos hidrofílicos como de grupo hidroxilos y aminas, mayoritariamente polares y 2) porque esta estrategia ya se ha usado con gran éxito en la extracción de metabolitos secundarios y obtener los principios activos en extracto de planta (Touchstone, 1992., Cannell, 1998). Además decidimos usar el extracto acuoso en forma de infusión debido a que el uso cotidiano de estas plantas es mediante tes o infusiones para tratar enfermedades gastrointestinales y con ello nos apegamos lo más posible a como lo usan la gente (Heinrich, 2000 y Ankli *et al.*, 2002).

En cuanto a las concentraciones usadas de los extractos de cada planta, en el caso de los extractos acuosos usamos el criterio descrito por Tona *et al.*, en 1998, el cual consiste en tomar la dosis máxima a probar como lo usa la gente. Para los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos, nos basamos en el poder de disolución máxima de cada extracto en 1 mL de etanol con 1.0 g de muestra, ya que este último disolvente lo usamos como vehículo en todos nuestros ensayos. Estos criterios los usamos ya que no existe en la literatura un método estandarizado que nos indique las concentraciones máximas a las que se deben de probar los extractos a estudiar, generalmente se tienen rangos desde miligramos a nanogramos (Tona *et al.*, 1998) y la máxima disolución fue el criterio lógico probado en este trabajo.

Una vez probado el modelo para obtener la CI_{50} con el metronidazol sobre *E. histolytica* y *G. lamblia* pudimos confirmar que las CI_{50} de todas las plantas en la presentación de sus extractos acuosos no bajaron a menos de 100 $\mu\text{g/mL}$ como se puede ver en la tabla 1 para *E. histolytica* y en la tabla 2 para *G. lamblia* lo cual nos indica que el extracto acuoso de estas plantas no presenta actividad significativa sobre el crecimiento de ambos protozoarios. Este resultado fue adverso a lo esperado por nuestro grupo, pero son activos cuando son extraídos por disolventes con polaridad. Por ello, obtuvimos por extracción de cada planta, los extractos con las diferentes polaridades y los probamos contra ambos protozoarios. Encontramos que

la CI_{50} bajó considerablemente cuando usamos los extractos polares y medianamente polares, siendo los más bajos: el extracto acetónico del marrubio con 7 $\mu\text{g/mL}$ para *E. histolytica* y el metanólico de yerbabuena con 8 $\mu\text{g/mL}$ para *G. lamblia* (tabla 3). Estos resultados fueron muy alentadores ya que se demostró que los extractos de estas plantas obtenidos por extracción de polaridad fueron activos y comprobamos lo que está descrito en la literatura más reciente (Ríos y Recio, 2005), acerca de que algunas actividades que se pierden por el calor y otras se preservan en disolventes polares. Además se pudo observar que los extractos metanólicos de marrubio y acetónico de hierbabuena fueron muy similares con una CI_{50} de 12 y 13 $\mu\text{g/mL}$ y el hexánico y acetónico del epazote con 57 y 58 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente para ambos protozoarios (tabla 3).

Para continuar la caracterización parcial de los extractos de cada planta, investigamos si estos podrían ser efectivos contra las bacterias *E. coli* O151:H7, *S. aureus*, *S. choleraesuis* y *S. flexneri*. Usamos la determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) empleando el método de dilución en tubo y difusión en agar (Vanden *et al.*, 1991 y Murray *et al.*, 2003). Para ello, definimos el inóculo y las condiciones de tiempo de incubación y número de bacterias por tubo según las propuestas por Murray y Baron, 1999.

Los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de *A. ludoviciana*, *Ch. ambrosioides*, *F. cernua*, *M. vulgare* y *M. spicata* no mostraron ser activos contra el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus* a la máxima concentración recomendada que es de 900 $\mu\text{g/mL}$. Ya que algunos investigadores consideran inactivos a los extractos con valores de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Ríos y Recio, 2005). Solamente el extracto acuoso de las plantas *Marrubium vulgare* y *Mentha spicata* tuvo efecto sobre *S. aureus* (tabla 5) a una concentraciones relativamente alta de 5 y 5.5 mg/mL como CMB respectivamente, tabla 5.

Posteriormente durante la identificación de los metabolitos secundarios (Domínguez, 1974), pudimos encontrar indicios de: sesquiterpenlactonas en los cuatro extractos de *A. ludoviciana*, *F. cernua* y *M. spicata*; en los extractos acetónico y metanólico de *Ch. ambrosioides* y en los extractos hexánicos, acetónicos y

metanólicos de *M. vulgare*. Los dobles enlaces se presentaron en todos los extractos de todas las plantas. Los oxidrilos fenólicos, en los cuatro extractos de *F. cernua* y *M. spicata*; en los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de *Ch. ambrosioides* y *M. vulgare* y solamente en el extracto acetónico y acuoso de *A. ludovisiana*. Los azúcares se manifestaron en los cuatro extractos de *F. cernua*, en las extractos hexánico, acetónico y metanólico del *M. vulgare*, en el acetónico y metanólico de *F. cernua*, en los extractos hexánico, metanólico y acuoso de *Ch. ambrosioides* y en el metanólico y acuoso de *A. ludovisiana* y las lactonas en los cuatro extractos de *F. cernua* y *M. vulgare*, en el acetónico metanólico y acuoso de *M. spicata* y en los hexánicos, acetónicos y acuosos de *A. ludovisiana*. (tabla 5). Algunos extractos presentaron indicios de alcaloides como el acetónico de *A. ludovisiana*, el hexánico y acuoso de *Ch. ambrosioides* y el acuoso de *F. cernua*. Las saponinas solamente en los extractos acuosos de *Ch. amrosioides*, *F. cernua* y *M. spicata*. y solo un extracto, el acuoso de *Artemisa ludoviciana* presentó triterpenos y compuestos esteroidales, como lo demostramos en la tabla 5.

Por otro lado, la cromatografía en placa fina es considerada como un procedimiento simple, rápido y de bajo costo que da una rápida respuesta de cuántos componentes están en una mezcla; también es usado para soportar la identidad de un compuesto en una mezcla cuando el Rf de un compuesto es comparado con el Rf de un compuesto conocido (Fessenden *et al.*, 2000). De acuerdo a nuestros resultados seleccionamos el extracto metanólico de la planta de *M. vulgare* ya que este extracto fue el que menor CI₅₀ presentó para *E. histolytica* y *G. lamblia* (tabla 3). Al separar en fracciones el extracto metanólico de esta planta por cromatografía en placa fina, observamos las manchas con luz visible y luz ultravioleta (fig. 19) obtuvimos su Rf y de las 5 mas gruesas cuyos Rf fueron de 0.94, 0.90, 0.84, 0.25 y 0.17 (fig. 19), se ajustó las concentraciones de cada fracción entre 111 y 123 µg/mL y al probarlo contra el % de inhibición sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*, pudimos observar que todas las fracciones presentaron menos del 50% de inhibición. La fracción con Rf de 0.25 fué la que mayor % de inhibición (41%) presentó para *E. hitolytica*, y para *G. lamblia* la fracción con Rf de 0.90 con un 40% de inhibición (tabla 7). Las de menor % de inhibición fueron la de 0.90 para *E. histolytica* (12%) y para *G. lamblia* fue la de 0.17 (7%) tabla 7. Cabe mencionar que en la zona media de la cromatografía observamos una zona de bandas muy tenues y con poca separación, por lo que no nos

fue posible aislar más bandas y por ello, no se probaron sobre el crecimiento de estos protozoarios. Cabe la posibilidad de que estas bandas podrían contribuir en la actividad total contra estos protozoarios, o más aun que pudiera darse el caso, en el que existiera un sinergismo entre todos los compuestos debido a la actividad citotóxica que mostró el extracto crudo. Pero esta pregunta la podemos discernir cuando se intente purificar los compuestos activos de esta planta. Por otro lado, los valores de Rf encontrados en las bandas de las cromatoplasmas nos pueden estar indicando que se trata de dos compuestos diferentes debido a la diferencia del Rf y al color de las bandas ya que en luz visible, una presenta color verde oscuro y en luz ultravioleta presenta un color casi negro, mientras que la otra banda presenta un color verde tenue en luz visible y rosa fosforescente en luz ultravioleta.

En esta investigación decidimos considerar como extractos activos a los extractos de cada planta que tuvieran ≤ 10 mg/mL para los extractos acuosos y realizar la cromatografía en placa fina al extracto que fuera ≤ 50 μ g/mL pero que mostrara actividad para *E. histolytica* y *G. lamblia*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los extractos acuosos de *Ch. ambrosioides*, *A. ludoviciana* y *F. cernua* fueron los que presentaron una mayor CI_{50} con 3,274 μ g/mL, 2,243 μ g/mL y 1,068 μ g/mL respectivamente sobre el crecimiento de *E. histolytica* mientras que el de *Ch. ambrosioides* con 3,274 μ g/mL y *A. ludoviciana* con 1,905 μ g/mL fueron los extractos que tuvieron el menor efecto sobre el crecimiento de *G. lamblia*. Sin embargo, los extractos acuosos de *M. spicata* y *M. vulgare* fueron los que presentaron una CI_{50} mas baja, con 357 μ g/mL y 534 μ g/mL contra el crecimiento de *E. histolytica*, por lo que podría decirse que son considerados interesantes ya que al compararlos con el valor del *Ch. ambrosioides* son 9 y 6 veces mas citotóxicos.

De los extractos hexánicos que presentaron una CI_{50} mayor fueron los del *Ch. ambrosioides* con 597 μ g/mL y *M. vulgare* con 502 μ g/mL sobre el crecimiento de *G. lamblia* mientras que los valores mas bajos los mostraron los extractos de *Ch. ambrosioides* y *M. spicata* con 57 μ g/mL y 17 μ g/mL pero en este caso fue sobre el crecimiento de *E. histolytica*. Estos extractos presentan actividad significativa sobre

dicho protozoario debido a que están dentro del rango que proponen Ríos y Recio en el 2005, abajo de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el extracto crudo, por lo tanto podrían ser candidatos para realizar fraccionamiento biodirigido buscando compuestos no polares como es el caso de los compuestos hidrofóbicos, anillos aromáticos y cadenas alquílicas y observar el efecto sobre *E. histolytica* (Touchstone, 1992., Cannell, 1998).

El extracto acetónico de *A. ludoviciana* fue el que presentó una CI_{50} mayor, 496 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparada con el de las demás plantas sobre el crecimiento de *G. lamblia* mientras que los extractos de *Ch. ambrosioides*, *M. vulgare* y *M. spicata* fueron mas activos contra el crecimiento de *E. histolytica* a concentraciones de 58 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, así mismo el extracto acetónico de *F. cernua*, presentó una CI_{50} de 42 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre *G. lamblia*. Estos extractos también mostraron concentraciones por debajo de los 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de acuerdo con Ríos y Recio en el 2005 por lo que sería interesante seguir realizando fraccionamientos biodirigidos y probarlos sobre el crecimiento de los protozoarios. Estos fraccionamientos deberán ser mediante el uso de solventes medianamente polares debido a la naturaleza del extracto.

De los extractos metanólicos, los que presentaron una CI_{50} mas alta fueron los que actuaron sobre el crecimiento de *G. lamblia*, siendo el de *Ch. ambrosioides* con 580 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el de *M. spicata* con 380 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, los extractos que presentaron una CI_{50} menor sobre el crecimiento de *E. histolytica* fueron el *M. vulgare* con 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la *M. spicata* con 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos extractos también mostraron concentraciones por debajo de los 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por lo que sería interesante seguir realizando fraccionamientos biodirigidos y probarlos sobre el crecimiento de los protozoarios. Dichos fraccionamientos deberán ser mediante el uso de solventes polares buscando compuestos hidrofílicos como del grupo hidroxilos y aminas mayoritariamente polares (Touchstone, 1992., Cannell, 1998).

9. CONCLUSIONES

- 1) Se determinaron los parámetros de crecimiento y condiciones óptimas de cultivo para *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, siendo éstos: tiempo de duplicación 33.76 h y 10.36 h respectivamente; inóculo, 5,000 y 10,000 cél/mL y un período de 48 h para iniciar la fase logarítmica.
- 2) Se determinó que de acuerdo a su IC₅₀ el extracto hexánico y acetónico de *Chenopodium ambrosioides* de 57 y 58 µg/mL, el acetónico y metanólico de *Marrubium vulgare* de 7 y 12 µg/mL y el hexánico acetónico y metanólico de *Mentha spicata* de 17, 13 y 8 µg/mL respectivamente, fueron los extractos que presentaron mayor actividad citotóxica contra el crecimiento de *Entamoeba histolytica* comparados con el metronidazol.
- 3) Los extractos acetónicos y metanólicos de *Flourensia cernua* y *Marrubium vulgare* fueron los que presentaron mejor actividad citotóxica contra el crecimiento de *Giardia lamblia* comparados con el metronidazol al presentar una IC₅₀ de 42, 35, 90 y 34 µg/mL respectivamente.
- 4) Los extractos hexánicos acetónicos y metanólicos de todas las plantas no presentaron efecto citotóxico sobre las bacterias enteropatógenas: *E.coli*, *S. aureus*, *S. choleraesuis* y *S. flexneri*.
- 5) Los extractos acuosos de *Flourensia cernua* y de *Mentha spicata* presentaron efecto citotóxico en una concentración de 5.5mg/mL y 5 mg/mL respectivamente sobre el crecimiento de *S. aureus*.
- 6) Se determinó los grupos funcionales presentes de todos los extractos de cada planta donde encontramos que *A. luviciana* mostró tener sesquiterpenlactonas,

dobles enlaces, oxidrilos fenólicos, azúcares y lactonas, solamente el extracto hexánico presentó alcaloides y el acuoso, triterpenos y compuestos esteroidales. En *Ch. ambrosioides* se presentaron dobles enlaces, oxidrilos fenólicos, azúcares, sesquiterpenlactonas, lactonas en todos los extractos, y solo los extractos hexánico y acuoso mostraron la presencia de alcaloides y solo el acuoso mostró la presencia de saponinas. En los 4 extractos de *Flourensia cernua* estuvieron presentes las sesquiterpenlactonas, los dobles enlaces, los oxidrilos fenólicos, los azúcares y las lactonas, solo los extractos acuosos presentaron saponinas y alcaloides. El *Marrubio vulgare* presentó dobles enlaces y lactonas en los cuatro extractos; sesquiterpenlactonas, oxidrilos fenólicos y azúcares en los extractos hexánico, acetónico y metanólico; y. La *Menha spicata* mostró sesquiterpenlactonas, dobles enlaces y oxidrilos fenólicos en los cuatro extractos; lactonas en los extractos acetónico, metanólico y acuoso: azúcares en los extractos acetónico y metanólico; y solamente el extracto acuoso mostró la presencia de saponinas.

- 7) Se obtuvieron 5 fracciones a partir del extracto metanólico de *Marrubium vulgare* en donde la fracción con un Rf de 0.25 presentó un 41% de actividad contra *E. histolytica* y la de Rf de 0.90 mostró una actividad del 40% contra *G. lamblia*. Las otras bandas no presentaron mayor actividad sobre estos protozoarios.
- 8) En las fracciones aisladas con Rf de 0.25 y 0.90 se determinó la presencia de sesquiterpenlactonas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alanís, A. D., Calazada F., Cervantes J. A., Torres J. y Ceballos G. M. 2005 Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 100: 153-157.
- Al-Saleh, F.S., Gamal El-Din A.Y., Abbas J.A. y Saeed N.A. 1997. Phytochemical and Biological Studies of Medicinal Plants in Bahrain: The Family Chenopodiaceae-Part 2. *International J. of Pharmacognosy*. 35:38-42.
- American Medical Association. 1997. Alternative Medicine. Report 12 of the Council on Scientific Affairs (A-97).
<http://www.ama-assn.org/ama/pub/article/2036-2523.html>
- Ankli A, Heinrich M, Bork M, Wolfram L, Bauerfeind M, Brun R, Schmid C, Weiss C, Bruggisser R, Gertsch J, Wasescha M, y Sticher O. 2002 Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *J. of Ethnopharmacology*. 64: 43-52.
- Arias H, Costas F. 1995. Plantas Medicinales. Biblioteca Práctica Mexicana
- Arrieta, J., Reyes B., Calzada F., Cedillo-Rivera R. y Navarrete A. 2001. Amoebicidal and giardicidal compounds from the leaves of *Zanthoxylum liebmannianun*. *Fitoterapia*. 72: (Supl. 3) : p. 295-597.
- Attisha W, Clark RR. 1995. Introduction to Clinical Microbiology. University of Texas – Houston Medical School. DPALM MEDIC.
<http://medic.med.uth.tmc.edu/path/00001455.htm>
- Balick MJ, Cox P.A. 1995. Etnobotanical research and traditional health care in developing countries. Medicinal plants for conservation and health care. FAO.
<http://www.fao.org/icatalog/inter-e.htm>
- Borst P, Ouellette M. 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annu Rev Microbiol* 49 : 427-60
- Bown Deni.1996. The Royal Horticultural Society. *Enciclopedia de las hierbas y sus usos*. Ed. Grijalbo Mondadori, S. A.

- Briggs W R, Green P B, Russell L J. 1978 Annual review of plant physiology. Annual Reviews Inc. Palo Alto California 94306.
- Britton N.L, Brown A. 1970. An illustrated flora of the northern United States and Canada Dover Publications. New York.
- Calzada F, Alanis A D, Meckes M, Tapia-Contreras A, Cedillo-Rivera R. 1998 *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medical plants used by the people of Southern México. *Phytotherapy Research*. 12 (No. 1) : 70-72.
- Calzada, F., Meckes M., Cedillo-Rivera R., Tapia-Contreras A. y Mata R. 1998a. Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology*. 36 (No. 55) : 305-309.
- Cannell, RJP. 1998 *Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation*. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- Carliss JO, Gojides M, Hall RD, Kudo RR, Levine ND, Loeblich AR, Jr Weiser J and Wenrich DH. 1969. A revised classification the phyllus protozoa. *J. Protozool*. 11-17
- Center of Food Safety & Applied Nutrition. 1999. *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook*. Food and Drug Administration. <http://www.cfsan.fda.gov>
- Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov>
- Chevallier A. 1996. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*. Dorling Kindersley. New York, N. Y.
- Cichewiez, R.H. y Thorpe P.A. 1996. The antimicrobial properties of the chile peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *J. of Ethnopharmacology*. 52 (Supl. 2) : p. 61-71.
- Chen-Hsun C , Lin-Hui S, Chishis C. 2004. *Salmonella enterica* serotype *choleraesuis*: Epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*. 17 (No. 2) : p. 311-322.
- Cortés F, 2000 Medicine, myths and magic the folk healers of a Mexican market. *Economic Botany*. 54 (4) : 427-438.
- Dancinger, M.y Lopez M. 1975. Number of *Giardia* in the feces of infected childrens. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 72 : 431-432.
- Diamond LS, Harlow D and Cunnick CC. 1978 A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 72 : 431-432.

- Dimayuga RE, Virgen M, Ochoa N. 1998 Antimicrobial activity of medicinal plants from Baja California Sur (México). *Farmaceutical Biology*. 36 (No. 1) : p. 33-43.
- Dobell C. 1982. Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General Introduction. II. Description of the whole life – history of *Entamoeba histolytica* in cultures. *Parasitology*. 20 : 357-412.
- Domínguez X.A, 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. 2ª. Ed.
- Duke JL, Ayensu ES. 1985 Medicinal Plants of China. Reference Publications, Inc.
- Ebi GC, Kamalu TN. 2001. Phytochemical and antimicrobial properties of constituents of “Ogwu Odenigbo”, a popular Nigerian herbal medicine for typhoid fever. *Phytotherapy Research*. 15 (1) : 73-5
- Eisenberg D., Kessler RC, Foster C. 1993. Unconventional medicine in the United States: prevalence, cost and patterns of use. *N. Engl. J. Med*. 328:246-252.
- Epidemiología. SS. 2001. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 25 : (18). Junio
- Epidemiología. SS. 2005. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica 14: (22) Abril.
- Estell R E, Fredrickson E L, Anderson D M., Havstad K M, Remmenga D. 2002. Effects of four mono- and sesquiterpenes on the consumption of alfalfa pellets by sheep. *J. of Anim. Sci.* . 80. : 3301-3306.
- Fabricant D S, Norman F R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery . *Environmental Health Perspectives*. 109 : 69-75
- Fakae, B.B., Campbell A.M., Barrett J., I.M., Teesdale-Spittle P.H, Liebau E, y Brophy P M. 2000. Inhibition of scott glutathione S-transferases (GSTs) from parasitic nematode by extracts from traditional Nigerian medicinal plants. *Phytotherapy Research*. 14 (Suppl. 8) : 630-634.
- Facciola S. 1990. Cornucopia. A Source Book of Edible Plants. Kampong Publications. 2ª Ed New York, N. Y..
- Fessenden R J, Fessenden J S, Feist J. 2002 *Organic Laboratory Techniques*, 3rd Ed. Brooks/Cole.
- Finney D. 1971. *Probit Analysis*. Cambridge: University Press.
- Forest Service. USDA. <http://www.fs.fed.us>
- García G M. 1968. *Manual de Fitoterapia*. Guadalajara, Jalisco.

- Germanò, M.P., Sanogo R., Guglielmo M., De Pasquale R., Crisafi G. y Bisignano G. 1998 Effects of *Pteleopsi suberosa* extracts on experimental gastric ulcers and *Helicobacter pylori* growth. 59 (Supl. 3) : p. 167-172.
- Ghoshal S, B.N.K. Prasad, V. Lakshmi. 1996. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. J. of Ethnopharmacology. 50 (Supl. 3) : p. 167-170.
- Goldman P. 2001 Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. Ann Intern Med. 135 : 594-600.
- Goth A. 1975. Farmacología Médica. Principios y Conceptos. Ed. Interamericana.
- Gubarev M, Enioutina E Y, Taylor J L, Visic D M, Daynes R A. 1998. Plant-derived glycoalkaloids protect mice against lethal infection with *Salmonella typhimurium*. Phytotherapy Research. 12 (suppl 2) : 79-88.
- Gutiérrez G, Muñoz O. 1994. Epidemiología de la amibiasis. Ed. Kretschmer R. Amibiasis, Infección y Enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Ed. Trillas
- Heinrich M. 2000. Ethnobotany and its role in drug development. Phytotherapy Research. 14 : 479-488.
- Hoareau L, DaSilva E J. 1999 Medicinal plants: a re-emerging health aid. Plant Biotechnology. Vol. 2 No. 2.
<http://www.ejb.org/content/vol2/issue2/full/2/>
- Irobi O N, Moo-Young M, Anderson W A. 1996 Antimicrobial activity of annatto (*Bixa orellana*) Extract. International J. of Pharmacognosy. 34 (No. 2) : 415-419
- Jawetz E, Melenick J L., Adelberg E A., Brooks G F, Butel J S, Ornston L. N. 1996. Microbiología Médica de Jewetz, Melnick y Adelberg. 15ª edición. Editorial Manual Moderno.
- Keister D.B. 1983 Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg. 77 (4) : 487-488.
- Kiuchi F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G, Tsubouchi A, Nakajima-Shimada J, Aoki T. 2002 Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. J. Nat. Prod. 65 : 509-512.
- Kulda J, Nohynkova E. 1978 Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In Lreier J.P. (ed): Protozoa of Veterinary and Medical Interest. Vol. II, New York and London, Academic Press.
- Launert E. 1981. The Hamlyn Guide to Edible and Medicinal Plants. of Europe and Nothern Europe. 1st Edition.

- Levine N.D., Carlis J.O, Cox F. E.G, Deroux G, Grain J, Honinger B M, Leedale G F, Loeblich A R, Lin D, Lom J, Merinfeld E G, Page F. C, Poljanski G, Sprague V, Vavra J and Walalace F G. 1980 A new revised Classification of the Protozoa. J. of Protozool. Vol. 7 : 37.
- Linares E, Flores-Peñañiel B y Bye R. 1993. Selección de plantas medicinales de México. Editorial Limusa.
- Lugo E.E. 1992. Introducción al estudio de las plantas medicinales, la interacción del medio con la cultura. Universidad Autónoma de Chapingo. TESIS.
- Lust J. 1983. The Herb Book. Royal Publications Inc. U.S.A. pp. 675
- Madigan M T, Martinko J M, Parker J. 2002. Brock. Biología de los Microorganismos. 8ª ed. Prentice Hall.
- Mandal S C, Saha B.P, Pal M. 2000 Studies on antibacterial activity of *Ficus racemosa* Linn. Leaf extract. Phytotherapy Research. 14 (Suppl 4) : 278-280.
- Martínez M. 1996. Las Plantas Medicinales de México. Ediciones Botas. 7ª Reimpresión.
- Martínez B E, Martínez O D. 1990 Microdosis. Una Alternativa Medicinal. Universidad Autónoma de Zacatecas.
- Mata R, Bye R, Linares E, Macías M, Rivero-Cruz I, Pérez O, Timmermann B N. 2003. Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. 64 : 285-291.
- McGaw L.J, Jäger A.K, van Staden J. 2000. Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. 72 (Suppl. 1-2) : 247-263.
- Meckes M, Calzada F, Tapia-Contreras A, Cedillo-Rivera R. 1999. Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. Phytotherapy Research. 13 (Suppl. 2) : 102-105.
- Meurer-Grimes B, McBeth Di L, Hallihan B, Delph S. 1996. Antimicrobial activity in medicinal plants of the Scrophulariaceae and Acanthaceae. International J. of Pharmacognosy. 34 (No. 4) : 354-355
- Moerman D. 1998. Native American Ethnobotany. Timber Press. Oregon 1st Ed.
- Murphy, C M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12 : 564-582.
- Murray PR, Baren E J, Jorgensen J H., Pfaller M A. 2003 Yolken R.H. Manual of Clinical Microbiology, 7ª edition. Washington, D.C. American Society for Microbiology. Section V.

- Navarro V, Villarreal M L, Rojas G. y Lozoya X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J. of Ethnopharmacology*. 53 (Suppl. 3) : 143-147.
- Pahlow P. 1995. *El Gran Libro de las plantas medicinales. La Salud mediante las fuerzas curativas de la naturaleza*. 8^{va} Ed. Editorial Everset.
- Petri WA., Haque R, Lyerly D, Vines RR. 2000. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitology Today*. 16 : 320-321.
- Pinheiro L, Nakamura C V, Dias F B P, Ferreira A G, Marx Y M C, Garcia C D A. 2003. Antibacterial Xantonas from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro*. 98 (No. 4) : 549-552.
- Rates, S. M. K. 2001. Plants as source of drug. *Toxicon*. 39 : 603-613.
- Ríos, JL. y Recio MC. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 100 : 80-84.
- Ristic, M. D., Duletic-Lausevic S., Knezevic-Vulkcevic J., Marin P. D., Simic D., Vukojevic J., Janackovic P, Vajs V. 2000. Antimicrobial activity of essential oils and ethanol extract of *Phlomis fruticosa* L. (Lamiaceae). *Phytotherapy Research*. 14 : 267-271.
- Rubinson, K. A. y Rubinson J. F. 2001 *Análisis Instrumental*. Prentice Hall. USA.
- Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas B.D, Navarro-Mormalejo L, Lozano-Garza G and Martínez-Rodríguez H. 1988. PEPHS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba invadens*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82 : 249-253.
- Samarawickrema, N A., Brown D M., Uperoft J A, Thammapalerd N, Uperoft 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.
- Saxena K.C., Dubey C.B., Agrawal A.K., Tripathi D.M., Sahai R., Gupta N., Saxena R.P., Puri A., Singh M. y Misra R.N, 1997. Management of Giardiasis by a herbal drug "Pippali Rasayana": a clinical study. *Journal of Ethnopharmacology*. 56 (No. 3) : 233-236.
- Segura J. J, Morales-Ramos L H., Verde-Star J, Guerra D. 1990 Inhibición del crecimiento de *Entamoeba histolytica* y *E. invadens* producida por la raíz del granado (*Punica granatum* L). *Arch. Inves. Méd.* 21 : 235-239.
- Shrimali Meenakshi., Jain D. C., Darokar M. P. y Sharma R. P. 2001. Antibacterial activity of *Ailanthus excelsa* (Roxb). *Phytotherapy Research*. 15 : 165-166.

- Simon JE., Chadwick AF, Craker LE. 1984. Herbs: An Indexed Bibliography. 1970-1980. The scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Archon Books.
- Sohni Youvraj R., Kaimal P, Bhatt R M. 1995. The antiamebic effect of a crude drug formulation of herbal extracts against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. J. of Ethnopharmacology. 45 : 43-52.
- Stuart M. 1981. Encyclopedia of Herbs and Herbalism. Crescent Books, N.Y.
- Tona, L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K. y Vlietinck A.J. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. J. of Ethnopharmacology. 61 (Supl. 1) : 57-65. ()
- Torres A M Gabriela Ricciardi A.L., Agrelo de Nassiff Ada E. y Ricciardi Armando I.A. 2002 <http://www.unne.edu.ar/cyt/2002/08-Exactas/E-019.pdf>
- Touchstone, Joseph C. 1992. Practice of Thin Layer Chromatography. 3rd Edition. John Wiley & Sons, INC. .
- Tripathi, DM., Gupta N., Lakshmi V., Saxena K.C. y Agrawal A.K. 1999. Antigiardial and immunostimulatory effect of *Piper longum* on Giardiasis due to *Giardia lamblia*. Phytotherapy Research. 13 : 561-565.
- United States Department of Agriculture. <http://www.usda.gov>
- Uperoft JA, Campbell R W, Benakli K, Uperoft P y Vanelle P, 1999. Efficacy of new 5-Nitroimidazoles against Metronidazole-Suceptible and -Resistant *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43 : 73-76.
- Vanden B.D, Viteinck A. 1991. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. Methods Plant Biochem. 6 : 47-69.
- Vijaya K., Nanthan S. y Nalini R. 1995. Antibacterial effect of Theaflavin, polyphenon 60 (*Camelia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp. – a cell culture study. J. of Ethnopharmacology. 49 (Supl. 2-1) : 115-118.
- World Health Organization. 2005. Drug-resistant Salmonella. Fact sheet No. 139.
- Wongkham S, Laupattarakasaem P, Pienthaweechai K, Areejitranusorn P, Wongkham C y Techanitiswad T. 2001. Antimicrobial activity of *Streblus asper* leaf extract. Phytotherapy Research. 15 : 119-121.
- Wright C W, Phillipson D. 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drug. Phytotherapy Res. 4 (No. 4) : 127-139.
- Yesilada E, 2005. Past and future contributions to tradicional medicine in the health care system of the Middle-East. Journal of Ethnopharmacology. 100 : 135-137.

Zavala M A, Pérez G S, Pérez G R M. 1997 Antimicrobial screening of some medicinal plants. *Phytotherapy Res.* 11 : 368-371.

<http://www.e-local.gob.mx>

<http://www.fda.gov>

<http://www.fitoterapia.net>

<http://www.herbotecnia.com.ar/aut-paico.html>

<http://www.hort.prudue.edu>

<http://www.tlahui.com>

<http://www.usda.gov>

PRESPECTIVAS

El efecto que se detectó *in vitro* en los extractos de la planta *M. vulgare*, nos lleva a tomar acciones para purificar el o los compuestos activos contra ambos protozoarios; ya que una vez aislados se puede determinar con precisión su posible papel como droga alternativa para combatir a estos protozoarios que puedan tener resistencia al metronidazol.

Los resultados de esta investigación constituyen un avance en el proceso de identificación de drogas alternativas provenientes de medicina alternativa. Los modelos experimentales y la información que obtuvimos de él abren la posibilidad inmediata de intentar purificar el o los compuestos activos para ver su potencia y eficacia contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

RESUMEN CURRICULAR

Mónica Celina Ramos Guerra

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: CARACTERIZACION PARCIAL DE LOS EXTRACTOS DE

Artemisia ludoviciana, *Chenopodium ambosioides*, *Flourensia cernua*,
Marrubium vulgare, *Mentha spicata* Y SU DETERMINACIÓN COMO
ACTIVIDAD AMEBICIDA, GIARDICIDA Y BACTERICIDA

Campo de Estudio: Microbiología

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 20 de Abril de 1963, hija de
Juan José de J. Ramos Cantú y Gloria Dalia Guerra Cavazos.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León con la
Licenciatura de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1987, obteniendo
posteriormente el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en
Parasitología en 1998.

Experiencia Profesional: Profesional No Docente tiempo Completo.