

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE PLANTAS
CON ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS EN MÉXICO”**

Por

M.C. JESUS NORBERTO GARZA GONZÁLEZ.

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con Acentuación en
QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

Cd. Universitaria

Noviembre 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE PLANTAS
CON ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS EN MÉXICO”

COMITÉ DE TESIS


Dra. MARIA JULIA VERDE STAR

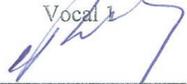
Presidente


Dr. JAVIER VARGAS VILLARREAL

Secretario


Dra. AZUCENA ORANDAY CÁRDENAS

Vocal 1


Dra. CATALINA RIVAS MORALES

Vocal 2


Dr. BENITO DAVID MATA CÁRDENAS

Vocal 3

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE PLANTAS
CON ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS EN MÉXICO”

Este trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Química Analítica,
Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Centro de Investigación
Biomédica del Noreste del IMSS de bajo la dirección de:



Dra. MARÍA JULIA VERDE STAR

Director Interno



Dr. JAVIER VARGAS VILLARREAL

Director Externo

DEDICATORIA

A Dios, que es la energía fundamental de la vida, que me permitió culminar esta meta, sin tropiezos.

Porque Yo Jehová soy tu Dios, quien te sostiene de tu mano derecha, y te dice: No temas Yo te ayudo.

Isaias 41:13

A mis Padres Sr. Norberto Garza Garza (†) y Sra. Francisca González de Garza (†) que por sus cuidados su dedicación, amor y esos principios, que sin los cuales no sería lo que soy, se que estarán muy contentos con este logro obtenido.

A mis Hijos, Dafne, Emmanuel, Sara e Israel que son el motor de mi vida, mi motivación.

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente, por permitirme haber terminado este proyecto.

A la Doctora María Julia Verde Star, por aceptarme como alumno en el área de Química de Producto Naturales, por ser un ejemplo a seguir, con quien la enseñanza es grata y amena, gracias por los consejos, el apoyo incondicional, por dirigirme en este proyecto.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal, por su disciplina, por creer en mí, su apoyo, su enseñanza, por dirigirme en este proyecto, su paciencia y motivación, vitales en mi formación y que es un modelo a seguir en este camino de la investigación.

Al Dr. Benito David Mata Cárdenas, por orientarme en cada momento de duda, por el empuje con que trabaja, su apoyo incondicional y que enseña con el ejemplo.

A la Doctora Catalina Rivas Morales, por su valioso tiempo, consejos, observaciones y regaños, todo mi respeto, por esa dedicación y entrega en la Ciencia, quien me motivo y me enseñó que en este camino no hace falta solo la persistencia, sino también la paciencia y la disciplina.

A la Doctora Azucena Oranday Cárdenas, gracias por brindarme su tiempo y su apoyo así como esas críticas constructivas que me enseñaron y me sirvieron en la realización de este trabajo.

Al M. en C. Gerardo Lozano Garza que siempre estuvo al pendiente de mi carrera, gracias por los consejos y apoyo.

Al Dr. Francisco González Salazar y a la Dra. Magda Elizabeth Hernández García, Compañeros y Amigos del Departamento de Biología Celular, por compartirme su tiempo en consejos y su paciencia.

Al Dr Sergio García González, por su dedicación, paciencia, experiencia y apoyo en la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de trabajo, ese grupo que tanto apoya, que por su motivación constante, me llenaron de energía positiva para seguir adelante.

A mi Familia que es mi motor, sin ellos nada de esto valdría la pena

A todos: ¡Mil Gracias!

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Dr. Antonio Guzmán Velasco, Director de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL por su apoyo y facilidades brindadas en la formación de Investigadores.

A la Doctora Diana Reséndez Pérez, Subdirectora de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas, gracias por su apoyo.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo en cuanto a instalaciones y equipo.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal, Director del Centro de Investigación Biomédica del Noreste de IMSS, por su apoyo, su interés en la realización de este proyecto sus consejos, porque brinda esa confianza tan necesaria al estudiante, mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
NOMENCLATURA	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUCCIÓN	1

2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos particulares	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1 Metronidazol	8
4.1.2 Resistencia al fármaco	10
4.1.2.1 Resistencia de <i>Entamoeba histolytica</i> al metronidazol	10
4.1.2.2 Resistencia de <i>Giardia lamblia</i> al metronidazol	11
4.1.2.3 Resistencia de <i>Trichomonas vaginalis</i> al metronidazol	11
4.1.3 Efectos secundarios del metronidazol	12
4.2 Características de <i>Entamoeba histolytica</i>. (Schaudinn)	13
4.2.1 Efecto amebecida de extractos de plantas sobre <i>E. histolytica</i> .	15
4.3 Características de <i>Giardia lamblia</i> (Kunstler)	19
4.3.1 Efecto de extractos de plantas sobre <i>G. lamblia</i> .	21
4.4 Características de <i>Trichomonas vaginalis</i>. (Donné)	25
4.4.1 Efecto de extractos de plantas sobre <i>T. vaginalis</i> .	27
4.5 Descripción de las plantas seleccionadas para este proyecto	29
4.5.1. Epazote	30

4.5.1.1 Clasificación taxonómica	30
4.5.1.2 Descripción	31
4.5.1.3 Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos	31
4.5.2 Cola de Caballo	34
4.5.2.1 Clasificación taxonómica	34
4.5.2.2 Descripción	34
4.5.2.3 Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos	35
4.5.3 Gobernadora	37
4.5.3.1 Clasificación taxonomica	37
4.5.3.2 Descripción	38
4.5.3.3 Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos	38
4.5.4. Tamarindo	41
4.5.4.1 Descripción	42
4.5.4.3. Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos:	43
4.5.5 Tomillo	45
4.5.5.1. Clasificación taxonómica:	45
4.5.5.2. Descripción:	45
4.7.5.3. Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos:	46
4.6. Estrategias generales en la investigación de Química de Productos Naturales	48
5 MATERIAL Y MÉTODOS	52
5.1 Material biológico	52
5.1.1 Material vegetal	52

5.1.2 Protozoarios	53
5,2 Medios de cultivo	53
5.2.1 Suero bovino estéril	53
5.2.2 Preparación de los medios de cultivo	53
5.2.2.1 Medio basal (PEHPS)	53
5.2.2.2 Medio basal TYI-S-33	54
5.2.2.3 Medio completo PEHPS y TYI-S33	54
5.3 Cultivo axénico de protozoarios	55
5.3.1 Resiembra	55
5.4 Reactivos y estándares químicos	55
5.5 Obtención de los extractos metanólicos	56
5.6 Rendimiento	57
5.7 Pruebas colorimétricas	57
5.7.1 Prueba de Liebermann-Burchard	58
5.7.2. Prueba de Baljet	58
5.7.3. Prueba de Dragendorff	58
5.7.4. Prueba de permanganato de potasio	59
5.7.5. Prueba de cloruro férrico	59
5.7.6. Prueba de bicarbonato de sodio	59
5.7.7 Prueba de Shinoda	59
5.7.8 Saponinas	59
5.7.9 Coumarinas	60
5.7.10 Dinitrofenilhidrazina	60
5.7.11 Prueba de la Antrona	60

5.8 Parámetros de crecimiento de los parásitos seleccionados:	61
5.8.1 Cinética de crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i> :	61
5.8.2 Cinética de crecimiento de <i>Giardia lamblia</i> :	61
5.8.3 Cinética de crecimiento de <i>T. vaginalis</i> :	62
5.9 Pruebas de actividad biológica	62
5.9.1 Actividad inhibitoria.	62
5.9.2 Determinación de CI50	63
5.9.2.2 Diluciones:	63
5.9.2.3 - Bioensayo:	64
5.10 Fraccionamiento de los extractos:	66
5.11 Citotoxicidad en células VERO	66
5.12 Análisis estadístico	67
6. RESULTADOS	68
6.1 Rendimientos de los extractos metanólicos:	68
6.2 Pruebas químicas colorimétricas de los extractos metanolicos de las plantas seleccionadas:	69
6.3 Parámetros de crecimiento de los protozoarios en estudio	70
6.3.1 Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> :	70
6.3.2 Cinética de crecimiento de <i>Giardia lamblia</i> :	72
6.3.3 Cinética de crecimiento de <i>Trichomonas vaginalis</i> :	73

6.4 Determinación del CI₅₀ del metronidazol sobre el crecimiento de <i>E. histolytica</i>, <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i>	74
6.5 Prueba de actividad biológica de los extractos metanólico de las plantas seleccionadas contra los tres parásitos en estudio.	75
6.6. Determinación de CI₅₀ de los extractos metanólicos más activos	76
6.6.1 CI ₅₀ del extracto metanólico de gobernadora contra los tres parásitos	76
6.6.2 CI ₅₀ del extracto metanólico de tomillo contra <i>G. lamblia</i> y <i>T. vaginalis</i>	77
6.7 Fraccionamiento de los extractos más activos:	77
6.7.1 Particiones del extracto metanólico de gobernadora	78
6.7.2 Particiones del extracto metanólico de tomillo	79
6.8 Determinación de la actividad biológica de las particiones de los extractos metanólicos de gobernadora y tomillo contra los tres parásitos.	79
6.8.1 Actividad biológica de las particiones de gobernadora	79
6.8.2 Actividad biológica de las particiones de tomillo	80
6.9 Fraccionamiento de la parte más activa	81
6.10 Prueba de actividad biológica de las diferentes partes obtenidas.	85
6.11 Identificación del o los compuestos contenidos en la muestra de psh/psa mediante cromatografía de gases acoplada	86

a espectrometría de masas:

6.12 Comparación cromatografica de la muestra del extracto metanólico de tomillo, mezcla de psh/psa y estándar de acido ursólico. 93

6.13 Comparación de los CI_{50} de las muestras de extracto metanólico de tomillo, psh/psa y estándar de ácido ursólico. 94

6.14 Pruebas de citotoxicidad en células VERO ATCC No. CCL-81.*Cercopithecus aethiops* (monkey, African green): 95

7. DISCUSIÓN 97

8. CONCLUSIONES 105

LITERATURA CITADA 106

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Plantas en estudio y número de registro asignado	52
II. Rendimientos de los extractos metanólicos de las plantas seleccionadas:	68
III. Pruebas químicas de los extractos metanólicos de las plantas en estudio	69
IV. Tiempos de incubación y tamaño del inóculo	74
V. Actividad de los extractos a una concentración inicial de 300 µg/mL contra los tres protozoarios expresado en porcentos de inhibición:	75
VI. CI ₅₀ del extracto metanólico de gobernadora	76
VII. CI ₅₀ del extracto metanólico de tomillo	77
VIII. Rendimientos de las particiones del extracto metanólico de gobernadora	78
XIX. Rendimiento de las particiones del extracto metanólico de tomillo	79
X. Actividad biológica de las particiones de gobernadora a una concentración inicial de 300µg/mL expresado en % de inhibición:	80
XI. Actividad biológica de las particiones de tomillo a una concentración de 300 µg/mL expresado en % de inhibición:	80
XII. Rendimientos y actividad biológica de las fracciones obtenidas con cloroformo caliente de la parte soluble en acetato de etilo del extracto metanólico de tomillo:	82
XIII. Rendimientos de las particiones obtenidas de las partes solubles e insolubles en metanol:	83

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismo de acción de los nitroimidazoles	10
2. Ciclo vital de <i>Entamoeba histolytica</i> .	14
3. Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	21
4. Ciclo biológico de <i>T. vaginalis</i>	27
5. Epazote	30
6. Cola de caballo	34
7. Gobernadora	37
8. Tamarindo	41
9. Tomillo	45
10. Obtención de los extractos de las plantas en estudio	56
11. Extractos en agitación constante	57
12. Pruebas coloridas de los extractos en estudio.	61
13. Relación temporal de crecimiento cepa HM1-IMSS <i>E. histolytica</i>	71
14. Relación temporal de crecimiento de la cepa IMSS-0989 de <i>Giardia lamblia</i>	72
15. Relación temporal del crecimiento de la cepa GT-15 de <i>Trichomonas vaginalis</i>	73
16. Partición de los extractos	78
17. Cromatografía en capa fina de extractos obtenidos con metanol caliente	84
18 Cromatografía de gases de estándar de ácido betulínico y <i>T. vulgaris</i>	86
19. Cromatografía de gases de muestras psh/psa de <i>T. vulgaris</i>	87
20. Cromatografía de gases y espectro de masas de muestras psh/psa de <i>T. vulgaris</i>	88
21. Cromatografía de gases de psh/psa con amplificación de ácido oleanoico	89

22. Cromatografía de gases y espectro de masas de psh/psa con amplificación de ácido ursólico	90
23. Diagrama de flujo del ensayo	92
24. Comparación cromatografica del extracto metanólico crudo de tomillo con muestra de psh/psa y estándar de ácido ursólico	93

NOMENCLATURA

ATCC	American Type Culture Collection
CG-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
cm	centimetro
°C	grados Celsius
CC ₅₀	Concentración citotóxica media
Cél.	célula
d	días
DMSO	Dimetilsulfoxido
ADN	Acido desoxirribonucleico
DfNH	Dinitrofenilhidrazina
EtOH	Etanol
Fig.	Figura
g	gramo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
h	hora
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
HCl	Acido clorhidrico
HPLC	High-performance liquid chromatography
kg	kilogramo
K ₂ HPO ₄	fosfato de potasio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
MeOH	metanol
MIC	Concentración mínima inhibitoria
min.	minuto
mm	milímetro
m	metro
mL	mililitro

m/z	masa/carga
μg	microgramo
μL	microlitro
μM	micromolar
≥	mayor o igual que
≤	menor o igual que
N	normal
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
%	por ciento
OMS	Organización Mundial de la Salud
PEHPS	Peptona extracto de hígado páncreas suero
PAHO	Pan American Health Organization
PFO	piruvato: ferredoxin oxidoreductasa
psh/psa	parte soluble en hexano mas parte soluble en acetona
ARN	Acido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
Rf	Relación de frentes o factor de retención.
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
τg	tiempo de generación
τd	tiempo de duplicación
TYI-S-33	Tripticasa levadura hierro suero
v/v	volumen sobre volumen
+	positivo
□	negativo
±	más/menos que
WHO	World Health Organization

RESUMEN

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. Una alternativa viable para enfrentar esto, 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 antiprotozoaria de los extractos metanólicos de las partes aéreas de las plantas *Chenopodium ambrosioides*, *Equisetum hyemale*, *Larrea tridentata*, *Tamarindus indica* y *Thymus vulgaris* contra el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, y *Trichomonas vaginalis* s. Se adquirieron las plantas de los mercados locales y mediante maceración en friose obtuvieron los extractos metanólicos y sus rendimientos fueron los siguientes: *Ch. ambrosioides*: 8.66%, *E. hyemale*: 4.69%, *L. tridentata*: 15%, *T. indica*: 13.31% y *T. vulgaris*: 12.15%. En pruebas biológicas, a una concentración inicial de 300 µg/mL el extracto metanólico de *L. tridentata* mostró los siguientes % de inhibición: 95.21 contra *E. histolytica* 95.52 contra *G. lamblia* y 91.26 contra *T. vaginalis* se determinó su CI_{50} : 90.38 ± 2.19 µg/mL, 98.47 ± 2.27 µg/mL y 130.57 ± 2.1 µg/mL contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente. El extracto de *T. vulgaris* mostró los siguientes % de inhibición: 14.12 contra *E. histolytica*, 95.86 contra *G. lamblia* y 96.42 contra *T. vaginalis*, sus CI_{50} fueron los siguientes: 86.41 ± 2.15 µg/mL y 115.47 ± 1.41 µg/mL contra *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente, el CI_{50} contra *E. histolytica* no se determinó ya que su % de inhibición fue bajo. Los extractos de las otras plantas mostraron baja actividad por lo que se continuo el trabajo solo con las 2 plantas ya mencionadas. Los extractos se fraccionaron mediante métodos directos (particiones), *L. tridentata* perdió su actividad al intentar fraccionar el material de un lote nuevo, por lo que se continuo el trabajo con *T. vulgaris*, en el cual de una parte soluble en hexano + una parte soluble en acetona, se logro identificar mediante métodos químicos y espectrometría de masas, una mezcla de ácido ursólico, ácido oleoico y ácido betulínico, a los cuales se les determinó su CI_{50} resultando 41.68 ± 4.24 µg/mL para *G. lamblia* y 75.93 ± 2.29 µg/mL contra *T. vaginalis*. Se evaluó la actividad del ácido ursólico comercial y se obtuvo una CI_{50} de 8.12 ± 0.43 µg/mL contra *G. lamblia* y 5.51 ± 0.16 µg/mL contra *T. vaginalis*. La citotoxicidad sobre células VERO para el extracto metanólico crudo de *T. vulgaris* mostró una CI_{50} de 260.46 ± 5.34 , la mezcla de compuestos identificados como ácido oleoico, ácido ursólico y ácido betulínico mostraron una CI_{50} de 260.74 ± 3.16 µg/mL y el ácido ursólico comercial ≥ 300 µg/mL.

ABSTRACT

The indiscriminate use of drugs and the emergence of drug-resistant strains have resulted in a resurgence of ancient diseases such as tuberculosis, anthrax, amoebiasis, giardiasis and bacterial diseases that cause diarrhea. A viable alternative to face this, are medicinal plants, considered as an important source for the development of new chemotherapeutic agents. In Mexico, it has a great botanical diversity and only a small percentage has been scientifically studied. In this paper we set out to explore the antiprotozoal activity of methanol extracts obtained with the the aerial parts of *Chenopodium ambrosioides*, *Equisetum hyemale*, *Larrea tridentata*, *Tamarindus indica* and *Thymus vulgaris* plants against *in vitro* growth of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. These plants, of local markets were purchased and by cold maceration, the methanol extracts were obtained and their yields were as follows: *Ch. ambrosioides*. 8.66%, *E. hyemale*: 4.69%, *L. tridentata*: 15%, *T. indica*: 13.31%: and *T. vulgaris* 12.15%. In biological tests at an 300 μg / mL of initial concentration, the methanolic extract of *L. tridentata* showed the following % of inhibition growth: 95.21 against *E. histolytica*; 95.52 against *G. lamblia* and 91.26 against *T. vaginalis*, their IC_{50} was determined: $90.38 \pm 2.19 \mu\text{g} / \text{mL}$, $98.47 \pm 2.27 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $130.57 \pm 2.1 \mu\text{g} / \text{mL}$ against *E. histolytica*, *G. lamblia* and *T. vaginalis*, respectively. *T. vulgaris* extract showed the following % of inhibition growth: 14.12 against *E. histolytica*; 95.86 against *G. lamblia* ; and 96.42 against *T. vaginalis*, their IC_{50} were: $86.41 \pm 2.15 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $115.47 \pm 1.41 \mu\text{g} / \text{mL}$ against *G. lamblia* and *T. vaginalis*, respectively, the IC_{50} against *E. histolytica* was not determined because their % of inhibition growth was low. The other plants extracts showed low activity so we continued the work alone with 2 plants above mentioned. The extracts were fractionated by direct methods (partitions), the *L. tridentata* extracts, lost the activity when trying to split the material of a new batch, so we continued working with *T. vulgaris*, which was achieved identify a mixture of ursolic acid, oleanolic acid, and betulinic acid obtained from hexane soluble portion + one acetone soluble part, using chemical methods and mass spectrometry their IC_{50} was determined which resulting in: $41.68 \pm 4.24 \mu\text{g} / \text{mL}$ against *G. lamblia* and $75.93 \pm 2.29 \mu\text{g} / \text{mL}$ against *T. vaginalis*. The inhibitory activity was tested of commercial ursolic acid and was determined an IC_{50} of $8.12 \pm 0.43 \mu\text{g} / \text{mL}$ against *G. lamblia* and $5.51 \pm 0.16 \mu\text{g} / \text{mL}$ against *T. vaginalis*. The cytotoxicity on VERO cells for crude methanolic extract of *T. vulgaris* resulted with an IC_{50} of $260.46 + 5.34 \mu\text{g} / \text{mL}$, the mixture of compounds identified with an IC_{50} of $260.74 + 3.16 \mu\text{g} / \text{mL}$ and commercial ursolic acid $\geq 300 \mu\text{g} / \text{mL}$.

1. INTRODUCCION

El hombre ha utilizado a las plantas medicinales para obtener remedios o medicamentos que han curado sus enfermedades, como data en documentos que se han encontrado desde los años 5,000 A. C.; hasta la fecha, desde las culturas de los Vedas, los de Mesopotamia, Asirios y hasta la actualidad (con publicaciones científicas) se han apoyado en estos descubrimientos etnobotánicos (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 como alternativa. Ya es evidente, que en Europa los países como Bulgaria, Alemania y Polonia son grandes exportadores de fitofármacos 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 nuevos e importantes medicamentos 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 medicamentos de origen y terapias alternativas obtenidas de las plantas como infusiones herbales, extractos etanólicos, metanólicos, clorofórmicos, tinturas, suplementos alimenticios y fitomedicamentos (Cowan, 1999; Hammer, *et al.* 1999). Esta inclinación es debido a: 1) que la mayoría de los microorganismos han desarrollado fármaco-resistencia y la medicina convencional cada vez es más ineficiente, 2) el uso indiscriminado e incorrecto de medicamentos han dado como resultado efectos

colaterales a los usuarios (intolerancia, mutagénesis, enfermedades autoinmunes) 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 parasitarias como son; la amibiasis, la giardiasis y la tricomoniasis (Epidemiología, SS, 2008); ya que los fármacos son menos eficaces por la aparición de cepas fármaco-resistentes (Ali y Nozaki, 2007). Por ello, es imperante el desarrollar y/o buscar nuevos medicamentos que puedan ayudar a controlar a estos microorganismos y las posibles soluciones pueden ser: a) modificar químicamente los fármacos ya existentes para hacerlos más efectivos y/o menos tóxicos para el hospedero, b) desarrollar nuevos medicamentos que estimulen los mecanismos de defensa innatos de los hospederos y c) buscar e identificar en la medicina tradicional fuentes naturales que contengan compuestos para desarrollar nuevos fármacos más selectivos y efectivos para las cepas resistentes o con mayor potencia (Fabricant y Farnsworth, 2001). En este trabajo apegándonos en la solución c), se evaluaron la actividad antiprotozoaria de 5 extractos metanólicos de plantas con antecedentes etnobotánicos contra los protozoarios patógenos *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

2. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de *Chenopodium ambrosioides* “Epazote”, *Equisetum hyemale* “Cola de caballo”, *Larrea tridentata* “Gobernadora”, *Tamarindus indica* “Tamarindo” y *Thymus vulgaris* “Tomillo” contienen compuestos que poseen actividad antiprotozoaria sobre el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad biológica inhibitoria de los extractos metanólicos y sus fracciones, obtenidos de de las plantas *Chenopodium ambrosioides* “Epazote”, *Equisetum hyemale* “Cola de caballo”, *Larrea tridentata* “Gobernadora”, *Tamarindus indica* “Tamarindo” y *Thymus vulgaris* “Tomillo” sobre el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis* y determinar el CI_{50} de los extractos más activos.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

3.2.1. Identificar las plantas en estudio y obtener extractos metanólicos por maceración.

3.2.2. Determinar los parámetros de crecimiento de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

3.2.3. Efectuar pruebas de actividad biológicas de los extractos metanólicos, sobre crecimiento *in vitro* de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* y determinar CI50 de los más activos.

3.2.4. Particionar y fraccionar los extractos de mayor actividad por métodos cromatográficos.

3.2.5. Seleccionar la fracción de mayor actividad por pruebas biológicas biodegradadas contra crecimiento *in vitro* de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*.

3.2.6 Identificar químicamente y por métodos espectroscópicos los compuestos de la ó las fracciones que hayan resultado más activas y determinar su CI50

4. ANTECEDENTES

El uso terapéutico de las plantas es tan antiguo como lo son las civilizaciones humanas y han evolucionado a la par con ellas. La vasta mayoría de la gente del planeta continúa confiando en sus sistemas étnicos, del uso de medicamentos o drogas a base de plantas. Los sistemas herbolarios chinos e hindús están bien establecidos con registros escritos de alrededor de 3000 años de antigüedad. La búsqueda de drogas a partir de las plantas medicinales continúa proveyendo de nuevos e importantes compuestos o principios activos contra varios blancos farmacológicos que incluyen el cáncer, parasitosis, enfermedades cardiovasculares y desordenes neurológicos. Muchas drogas de origen en los productos naturales de plantas han sido aprobados por la US Food and Drug Administration (FDA), para su uso, proporcionando buenas ganancias en el mercado farmacológico (Ramawat *et al.*, 2009).

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que el empleo de las plantas medicinales cumple un papel preponderante en la atención primaria de la salud, atendiendo a casi un 80% de la población que habita el planeta (Ocegeda, Moreno y Koleff. 2005).

La naturaleza es una abundante fuente de fármacos, sin embargo, se estima que solo del 5 al 15% de las aproximadamente 250,000 especies han sido estudiadas sistemáticamente por la presencia de compuestos bioactivos (Anthony *et al.*, 2005).

La comunidad científica internacional ha centrado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas fuentes de principios activos a partir de plantas conocidas por sus usos etnobotánicos (Laza *et al.*, 2003).

Un análisis de las prescripciones o recetas presentadas en farmacias de EUA, arrojó en 1998 que alrededor del 25% de ellas, contenían la recomendación del uso de extractos de plantas o principios activos derivados de ellas. Por otra parte, no menos de

119 sustancias químicas derivadas de 90 especies pueden ser consideradas de importancia farmacológica, actualmente en muchos países, de ellas, el 74% fue descubierto como resultado de estudios químicos o aislamientos de los principios activos de plantas usadas en la medicina tradicional (Cragg y Nexman 1999).

Para combatir la parasitosis, es común que la población acuda al uso de plantas medicinales, ya que los medicamentos disponibles, presentan efectos adversos o tienen costos muy elevados (López-Sáez y Pérez-Soto 2010).

La parasitosis tiene distribución mundial, aunque están estrechamente ligadas a la pobreza y a las malas condiciones higiénico-sanitarias, por lo que aparecen más frecuentemente en países en vías de desarrollo y en especial en zonas Geográficas donde las condiciones ecológicas favorecen la persistencia de los parásitos (Sánchez-Vega *et al.*, 2000).

Las infecciones intestinales causadas por parásitos en el ser humano representan uno de los principales problemas de salud pública. Las prevalencias más altas se observan en países en vías de desarrollo y en regiones tropicales y subtropicales donde es frecuente la contaminación de agua o alimentos con materia fecal (Perez-Arellano *et al.*, 2007).

La frecuencia de la parasitosis en México es muy variable, con cifras que fluctúan del 2 al 39% (Diagnóstico y Tratamiento de la Giardiasis en Niños y Adolescentes de 1 a 18 años en el Primer y Segundo Nivel de Atención, Año de asignación de la GPC). La parasitosis intestinal es una de las causas de morbilidad y se calcula que las infecciones intestinales, en donde se incluye la enteroparasitosis, producen la pérdida de aproximadamente 1.6 millones de años de vida potencial (Sánchez-Vega *et al.*, 2000).

Por otro lado, las infecciones de transmisión sexual (ITS) constituyen un severo problema de salud pública a nivel mundial. Los agentes causales incluyen bacterias,

virus, hongos y protozoos. Dan lugar a un gran número de complicaciones y secuelas, además, existe una importante correlación entre las ITS y la infección por el VIH. Las vulvovaginitis infecciosas son una causa muy frecuente de consulta ginecológica y pueden agruparse en función de los agentes patógenos involucrados, la vaginitis, es un síndrome polimicrobiano asociado a la disminución de lactobacilos y a altas concentraciones de organismos anaerobios, entre ellos *Trichomonas vaginalis*, el agente no viral de transmisión sexual más frecuente (Uribarren-Berrueta, 2014).

E. histolytica, *G. lamblia* y *T. vaginalis*, son denominados parásitos de las mucosas (Das, *et al.* 2005), mientras que los trofozoítos de *E. histolytica* y *G. lamblia* colonizan el intestino delgado, *T. vaginalis* habita el tracto genitourinario de humanos. Estos parásitos demuestran varias características bioquímicas y biológicas comunes, tales como metabolismo de carbohidratos anaeróbico y la carencia de una típica mitocondria, además de la falta de un bien desarrollado aparato de Golgi y otros organelos típicos de los eucariotes (Bansal *et al.* 2005)

Para el tratamiento contra estos tres parásitos, la droga de predilección es el metronidazol ya que su mecanismo de acción antiprotozoaria depende de su reducción química intracelular, en estas condiciones interactúa con el ADN y produce la pérdida de la estructura helicoidal y rompimiento de las bandas, estas acciones inhiben la síntesis de ácidos nucleicos y producen muerte celular (Pal *et al* 2009).

4.1 Metronidazol

El metronidazol pertenece al grupo de compuestos de los nitroimidazoles, los cuales fueron sintetizados por primera vez por los laboratorios franceses Rhone-Poulenc a finales de los 50's. En 1959, se descubrió que los extractos de *Streptococcus spp* tenían actividad biológica contra *Trichomonas vaginalis*. Estudios posteriores aislaron el compuesto azomicina, como el agente activo, el metronidazole fue creado como un

derivado sintético. Rápidamente se convirtió en un tratamiento común contra la infección por *Trichomonas vaginalis*.

En 1962, se descubrió accidentalmente su actividad antibacterial al tratar a un paciente contra tricomonas y que padecía de gingivitis bacterial. En 1970 el metronidazole se popularizó como un antibiótico para bacterias anaeróbicas y protozoarios. En los 80's se descubrió que este antibiótico era específico para *Entamoeba histolytica*. (Samuelson 1999).

Los parásitos del lumen tienen dos características las cuales los distinguen de los otros eucariotas 1) viven en condiciones anaeróbicas, 2) Carecen de mitocondrias y enzimas de la fosforilación oxidativa, de hecho a estos parásitos se les conoce como fósiles vivos, los cuales reflejan los tipos de vida de los primeros eucariotas hasta la oxigenación del planeta y la adquisición de mitocondrias por endosimbiosis. En estudios recientes se describe que tanto ameba, giardia y tricomonas carecen de enzimas de fermentación como la lactato-deshidrogenasa y la piruvato Descarboxilasa, las cuales están presentes en levaduras y otros eucariotas, se deduce pues, que estos parásitos adquirieron por transferencia horizontal de bacterias los genes que codifican las enzimas de fermentación, esto incluye la proteína llamada piruvato:ferredoxin oxidoreductasa (PFO), la cual está envuelta en la activación del metronidazol (Samuelson 1999).

Se ha establecido que los electrones necesarios para activar al metronidazol, se liberan a partir de piruvato por la actividad de la piruvato: ferredoxina oxidoreductasa y transferido a la droga por medio de un transportador de bajo potencial redox como la ferredoxina (Hrdy *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de los nitroimidazoles se refleja en una toxicidad selectiva para los microorganismos anaeróbicos o microaerófilos y para células anóxicas e hipóxicas.

Para explicar el mismo se puede dividir en 4 fases:

1. Penetración del fármaco:

Es por difusión pasiva a través de la pared celular del protozoo que puede aumentar por el nivel de reducción intracelular.

2. Reducción del grupo nitro a un intermediario transitorio tóxico:

El grupo nitro actúa como aceptor de electrones provenientes de proteínas para el transporte de electrones como las ferredoxinas en el caso de *T. vaginalis*, desviándola de su ruta normal productora de energía.

3. Acción sobre el ADN del parásito:

Inhiben la síntesis y degradan el ADN, siendo mayor cuanto más contenido de A+T tiene el ADN, pues las roturas se producen entre estos residuos, sobre todo en la timina, y liberan una mezcla de timina y timidina fosfato. *T. vaginalis* tiene un contenido de A+T mayor del 70%, por eso la mínima concentración letal (CLM) está alrededor de 1 µg/ml.

4. Liberación de productos finales inactivos:

Estos hallazgos son consistentes con los efectos antimicrobianos y mutagénicos del Metronidazol. Los dos metabolitos principales que resultan de la oxidación de las cadenas laterales, ambostienen actividad antitrichomonas (Bendesky y col. 2002; Vázquez *et al.*, 2001).

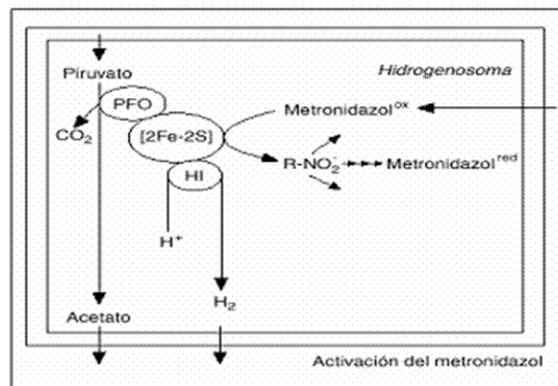


Fig. 1 Mecanismo de acción de los nitroimidazoles. PFO: piruvato: ferredoxin oxidoreductasa; [2Fe-2S]: Ferredoxina; HI: hidrogenasa; R-NO₂⁻: radicales libres (Vázquez *et al.*, 2001).

4.1.2 Resistencia al fármaco.

4.1.2.1 Resistencia de *Entamoeba histolytica* al metronidazol

Se ha reportado resistencia al metronidazol por parte de la cepa HTH-56: MUTMde *E. histolytica* (Samarawickream *et al.*, 1997). En el 2006 Bansal y col. mencionan que la cepa H1-IMSS expuesta a sobredosis de metronidazol mostraba resistencia inducida, (resultados no publicados).

El estudio de las cepas resistentes ha mostrado cuáles son los mecanismos de esta resistencia que dependen de uno o más de los factores siguientes:

1. Una actividad enzimática de PFO reducida.
2. Una conformación alterada del hidrogenosoma.
3. Ferredoxina con un potencial redox excepcional.
4. Una cantidad reducida de ferredoxina intracelular (Vazquez *et al.*, 2001).

4.1.2.2 Resistencia de *Giardia lamblia* al metronidazol

Según algunos autores referenciados por Land y Johnson en 1999 se debe a una reducción de la actividad o alteración mutagénica de la enzima PFO (piruvato ferredoxin oxidoreductasa).

4.1.2.3 Resistencia de *Trichomonas vaginalis* al metronidazol

La resistencia al metronidazol se clasifica de dos tipos; i) tipo aeróbico y ii) tipo anaeróbico. En la de tipo aeróbico, involucra vías de depuración de oxígeno y posiblemente esté involucrada la enzima, piruvato: ferredoxina oxidoreductasa, que es un sistema muy sensible a la presencia molecular del oxígeno ya que este compete como aceptor de electrones e inhibe la actividad de la enzima. En el tipo anaeróbico el proceso de resistencia se da por reducción o por el cese de la actividad de la PFO (Cudmore *et al.*, 2004).

4.1.3. Efectos secundarios del metronidazol

Se han reportado efectos secundarios que puede provocar el medicamento en pacientes tratados con esta droga como: cefaleas, visión borrosa ocasional y pasajera, vómito, diarrea, malestar estomacal, cosquilleo o adormecimiento de las manos o pies y fiebre, algunas de las contraindicaciones son la hipersensibilidad, evitar el consumo de bebidas alcohólicas ya que aumenta el efecto de anticoagulantes orales y puede producir sangrados(Morales-Rubio *et al.*, 2010).

4.2. Características de *Entamoeba histolytica*. (Schaudinn)

CLASIFICACION TAXONÓMICA (Levine et al, 1980):

Reino: Protista

Phylum: Sarcomastigophora

Clase: Lobosea

Orden: Amoebida

Familia: Endamoebidae

Género: *Entamoeba*

Especie: *E.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).

La frecuencia en México de la amibiasis en la última semana de Marzo del 2013 fue de 79,370 casos de amibiasis (FUENTE: SINAVE/DGE/Salud/Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades 2013).

Dobell en 1928 describió el ciclo de vida de la *E. histolytica* en el ser humano, *E. 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 tetra-nucleados 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, infectiva) que son los responsables de producir la enfermedad. Las personas se infectan por consumir alimentos o aguas contaminadas con quistes (figura 1) (Pinilla *et al.*, 2008). 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 (Ximénez *et al.*, 2010).

Para el tratamiento de la infección por *E. histolytica* 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 quinoleínas y 3) las que actúan en ambas, extra e intra-intestinales como el metronidazol y sus derivados (Ali y Nozaki, 2007).

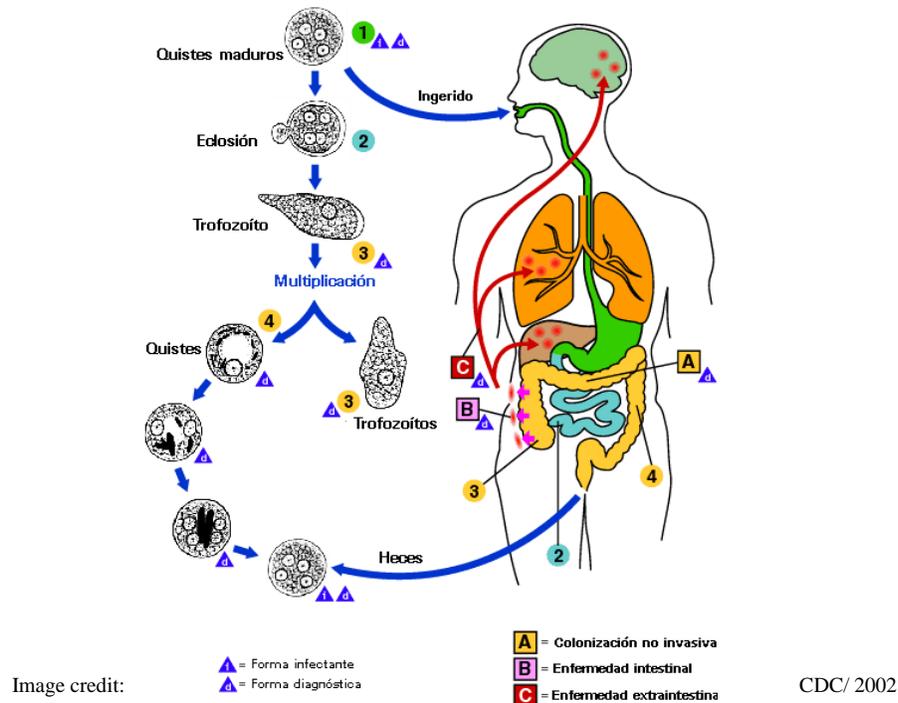


Fig. 2. Ciclo vital de *Entamoebahistolytica*. La infección por *Entamoeba histolytica* ocurre por ingestión de quistes maduros (1) en alimentos, agua o manos contaminados con heces. El desenquistamiento (2) ocurre en el intestino delgado y los trofozoítos (3) son liberados y migran al colon. Los trofozoítos se reproducen por fisión binaria y producen quistes (4) que se eliminan con las heces. Debido a la protección de la pared, los quistes pueden sobrevivir días o semanas en el medio externo y son los responsables de transmisión. Los trofozoítos en el medio externo mueren rápidamente. En muchos casos los trofozoítos permanecen confinados en la luz intestinal (A, infección no invasiva) de los infectados, quienes son entonces portadores asintomáticos o eliminadores de quistes. En algunos individuos los trofozoítos invaden la mucosa intestinal (B: enfermedad intestinal), o, a través de la circulación, invaden el hígado, pulmones cerebro etc. (C: enfermedad extraintestinal). Se ha establecido que las formas invasivas y no invasivas representan especies separadas: *E. histolytica* y *E. dispar* respectivamente, que son morfológicamente indistinguibles. La transmisión también puede ocurrir por exposición fecal durante el contacto sexual (en tal caso no solo los quistes sino también los trofozoítos son infectantes).

4.2.1. Efecto amebicida de 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).

En 1995 se estudió el efecto del extracto etanólico de *Boerhavia difusa*, *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.*, 1995).

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*; *Psidium guajava*, *Dialium 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*, *Cnidoscolus 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).

En el 2000 se estudiaron 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).

González–Garza y colaboradores en el 2000, estudiaron la actividad antiprotozoaria de los extractos acuosos y metanólicos de dos especies del género *Acacia* sobre la cepa HM-IMSS de *E. histolytica* y comprobaron la actividad inhibitoria de los extractos acuosos de hojas en ambas especies, con un 67.5% de inhibición para *A. farnesiana* y un 58.8% de inhibición para *A. rigidula*.

En el año 2001 Arrieta y colaboradores, 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.

Calzado y colaboradores en el 2001 encontraron que extractos de *Castela texanainhiben* un 50% el proceso de enquistamiento de *E. invadens*.

Alanís y colaboradores en el 2003 realizaron un estudio de las partes aéreas de *Rubus corrifolius*, 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- α - β - σ -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 $\mu\text{g/mL}$.

Said y colaboradores, en el 2005, encontraron que extractos acuosos y metanólicos de *Artemisa ludoviciana* fueron efectivos contra *E. histolytica* y *G. lamblia* con un porcentaje de inhibición mayor al 50%.

En el 2006 Calzada y colaboradores, encontraron que extractos metanólicos de partes aéreas de *Lippia alba* (Mill) tienen moderada capacidad antiprotozoaria frente a *E. histolytica* y más alta contra *G. lamblia*.

En el 2006 Calzada y colaboradores, encontraron que los extractos metanólicos de *Chiranthodendron pentadactylon*, *Annona cherimola* and *Punica granatum* tuvieron actividad inhibitoria contra *Entamoeba histolytica* con un $CI_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$.

Barrón-González y colaboradores en el 2008 encontraron que extractos de *Castela texana* son efectivos contra *E. histolytica* con una CI_{50} de 218.5 $\mu\text{g/mL}$.

En el 2010 Garza–Padrón y colaboradores reportan actividad amebicida de extractos metanólicos de *Astrophyton myristogama* (Cactacea) obtenidos de cultivo de callo (CI_{50} de 0.0553 mg/mL) y tallos de cactus silvestres (CI_{50} de 0.0270 mg/mL).

En este mismo año, Morales-Rubio y colaboradores, reportan que extractos metanólicos de callo de *Lophocereus schottii* inhibe en un 91.49% el crecimiento de *E. histolytica* con un CI_{50} de 19.5 $\mu\text{g/mL}$.

Quiñones-Gutiérrez y colaboradores Evaluaron la actividad biológica del extracto metanólico de *Pimpinella anisum* determinando un CI_{50} de $0.034\mu\text{g/mL}$ (Quiñones-Gutiérrez *et al*, 2013).

Leos-Rivas y col. en el 2013, encontraron que los extractos metanólicos de *Heliotropium amplexicaule* que es una planta perteneciente a la familia Boraginacea con antecedentes de contenido de compuestos con interés farmacológico, mostraron un efecto amebicida significativo de los extractos de raíz, tallo, flor y hojas sobre *Entamoeba histolytica* con CI_{50} de 2, 8, 36 y $114.2\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Mfotie Njoya y col. en el 2014, reportaron que en la planta africana *Codiaeum variegatum*, se determinó un CI_{50} de $73\mu\text{g/mL}$ en extracto metanólico de las hojas de dicha planta.

4.3. Características de *Giardia lamblia* (Kunstler)

CLASIFICACION TAXONÓMICA (Levine et al, 1980):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Diplomonadida

Familia: Hexamitidae

Género: *Giardia*

Especie: *G. lamblia*

G. lamblia (sinónimos; *G. duodenalis*, *G. intestinalis*) es un protozoo binucleado y flagelado que habita el intestino delgado de humanos y otros mamíferos y es el agente responsable de la giardiasis, una patología que se presenta con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática, a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes (Rivera, *et al.* 2002).

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 (Hawrelak, 2003).

La infección con *G. lamblia* es una de las enfermedades parasitarias más comunes en todo el mundo y se inicia con la ingestión de quistes del parásito, los cuales se desenquistan durante su pasaje por el contenido ácido del estómago, liberando los trofozoítos (figura 2) (Lujan, 2006).

Estos colonizan el intestino delgado superior y readhieren a la superficie del epitelio intestinal mediante un organelo característico llamado disco ventral o de adhesión (Adam, 2001).

Los medicamentos más comunes en contra de la giardiasis han sido el metronidazol, tinidazol, furazolidona, quinacrina, albendazol y paromomicina (Ali y Nozaki, 2007).

El protozoo flagelado, *Giardia lamblia* es mundialmente el parásito protozoario entérico más frecuente en el humano y también el parásito entérico más común en los animales domésticos incluyendo el ganado, los perros y los gatos. Se calcula que en México hay 9 millones de personas parasitadas con *Giardia lamblia*, siendo esta protozosis la causa más común de parasitosis intestinal y en niños suele ser más frecuente que en los adultos (Thompson, 2008).

En el 2010 de acuerdo a las estadísticas del CENEVACE (Centro Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades (www.cenevace.salud.gob.mx), se detectaron un total de 20,678 casos nuevos de enfermedad por *Giardia lamblia*, siendo el grupo etéreo más afectado el de los lactantes y preescolares de 1 a 4 años de edad y los estados con la más alta incidencia fueron Sinaloa, Yucatán y Baja California Sur.

La frecuencia en México de esta enfermedad en la última semana de Marzo del 2013 fue de 3,843 casos (FUENTE: SINAVE/DGE/Salud/Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades2013).

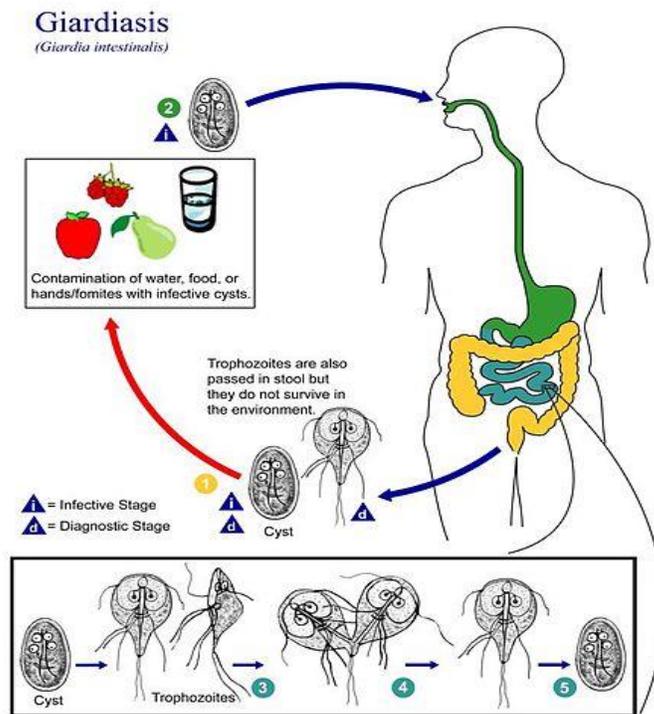


Image credit: CDC/2002

Fig. 3. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. *Giardia lamblia* vive en forma de trofozoíto en la luz del intestino delgado (principalmente en el duodeno) adherido a las vellosidades intestinales por medio de los discos bilobulados. Se alimenta y se reproduce hasta que el contenido intestinal inicia el proceso de deshidratación, momento en el que comienza el enquistamiento del trofozoíto. Pierde los flagelos, adquiere una morfología ovalada, se rodea de una pared quística y madurez. Los quistes expulsados junto a las heces ya son infectantes. Cuando dichos quistes son ingeridos por un nuevo hospedador, llegan al duodeno, donde se disuelve la pared quística, dando así lugar a un individuo tetranucleado que se divide inmediatamente en dos trofozoítos binucleados que se anclan al epitelio intestinal, cerrando así su ciclo vital.

4.3.1. Efecto de 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* (Fabaceae) 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, mostrandouna marcada mejoría en el perfil clínico de estospacientes (Saxena *et al.*, 1997).

En 1998 Calzada y colaboradores, 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

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 inmuno-estimulador y su actividad como giardicida. Encontraron que los extractos acuosos y etanólicos presentaron ambas actividades ya mencionadas.

En este mismo año Meckesy colaboradores, 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 un CI_{50} de 8.73 $\mu\text{g/mL}$.

Arrieta y col., en el 2000 reportaron que los compuestos de las hojas de *Zanthoxylum liebmannianun* presentan un CI_{50} =3.48 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. histolytica* y un CI_{50} = 58.00 $\mu\text{g/mL}$ contra *G lamblia*.

En el 2001 Echeverría y Torres en Cuba reportan que un extracto de la planta *Petiveriaalliacea* (Linn.), mostraron altos porcentajes inhibitorios (96.81%) contra *G. lamblia* con la mayor concentración (17.2 mg/mL).

Alanísy colaboradores, en el 2003, realizaron un estudio de las partes aéreas de *Rubus 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 μ g/mL.

En el 2006 Calzada y colaboradores, encontraron que los extractos metanólicos de *Dorstenia contrajerva*, *Senna villosa* y *Ruta chalepensis* tuvieron actividad contra *Giardia lamblia* con un CI₅₀ < 38 μ g/ml.

En el 2011 Anthony y colaboradores, encontraron que las plantas productoras de bayas y ricas en polifenoles como *Ribes nigrum* L, *Vaccinium myrtillus* L. *Rubus chamaemorus* L. *Rubus stellatus*, *R. arcticus* y *Punica granatum* L. tienen un CI₅₀ \leq 60 μ g/mL contra *Giardia lamblia*.

Ahmed Hassan y colaboradores en el 2011 determinaron la actividad anti-giardia de *Citrullus lanatus* Var. *citroides* en extractos de éter de petróleo, acetato de etilo y butanol encontrando que el extracto de acetato de etilo fue el que mejor actividad tiene con un CI₅₀ 0.1 μ g/mL.

Donfack y col. en el 2012, encontraron que las plantas *Phoenix reclinata* Jacob y *Solanacia mannii* Hook. F., nativas de Camerún tiene un CI₅₀ de 100 μ g/mL sobre *Giardia lamblia*.

Elhadi y colaboradores, en el 2013 que los extractos de éter de petróleo de *Cucurbita maxima* D., tiene un CI₅₀ de 548.80 ppm a 48h.

Rahimi-Esboei y colaboradores en el 2013, determinaron un CI₅₀ de 100 mg/mL en 60 minutos con un 78 \pm 4% de inhibición contra *G. lamblia* con extractos metanólicos de *Sambucus ebulus*

Jiménez-Arellanes y colaboradores en el 2013 probaron extractos clorofórmicos y etanólicos de *Persea americana* y encontraron un $CI_{50} = <0.634 \mu\text{g/mL}$ en contra de *E.histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*

4.4. Características de *Trichomonas vaginalis*. (Donné)

CLASIFICACION TAXONÓMICA (Levine et al, 1980):

Reino: Protista

Phylum: Sarcomastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Trichomonadida

Familia: Trichomonadidae

Genero: *Trichomonas*

Especie: *T. vaginalis*

T. vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis, una causa común de vaginitis. A pesar de que ya se le considera una enfermedad sexualmente transmitida (STD) diagnosticada y tratada como tal, la tricomoniasis no es reportada como una infección y el control de la infección ha recibido poco énfasis de los programas de control de STD. Más recientemente, sin embargo, la determinación de altas tasas de la enfermedad y de la asociación de la tricomoniasis en mujeres con resultados adversos de embarazos y un aumento en el riesgo de contraer la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), sugiere una necesidad de aumentar los esfuerzos por controlar esta enfermedad (Schwebke y Burgess, 2004).

La incidencia anual de las infecciones por *T. vaginalis* en los Estados Unidos ha sido estimada en cerca de cinco millones de casos (Schwebke, 2007).

Mientras que la frecuencia en México de esta enfermedad en el 2013 fue de 24,882 casos de tricomoniasis urogenital (FUENTE: SINAVE/DGE/Salud/Sistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades 2013).

Costamagna y Figueroa (2001) refieren que *T. vaginalis* es un protozoo de forma ovoide o piriforme que mide de 7 – 30 μm de longitud y de 5 – 15 de ancho.

El Trofozoíto se caracteriza por presentar cuatro flagelos dispuestos de dos en dos en la parte anterior, y un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante, que no

llega a la parte posterior del cuerpo (Alderete, et al. 2002). El flagelo libre y la membrana ondulante le confieren al parásito la motilidad espasmódica característica (Petrin, et al. 1998).

Los quistes no existen, observándose solo el estado de trofozoíto, sin embargo aunque carece de formas de resistencia, la quitina asociada a estructuras de superficie le permiten sobrevivir en condiciones ácidas (pH 4.0-4.5). De esta manera *T. vaginalis* vive en el moco vaginal y en la secreción ventral de la mujer, además vive en la uretra, próstata y epidídimo del hombre y se multiplica por fisión binaria longitudinal (Figura 3) (Alderete, et al. 2002).

El tratamiento es necesario para prevenir la transmisión a parejas sexuales y evitar problemas más tarde. Los únicos fármacos que han demostrado ser eficaces son los 5-nitroimidazoles. Entre estos se incluye al metronidazol, ornidazol y tinidazol, las dos últimas drogas están disponibles en Europa. Si en la pareja ambos son tratados, las proporciones de curación se acercan al 100%. (Lossick, 1982).

Otros medicamentos pueden usarse para aliviar los síntomas. El clotrimazol, un imidazol fuera del grupo 5-nitro, elimina síntomas pero no erradican la infección tan eficazmente como el metronidazol. (Lossick, 1982).

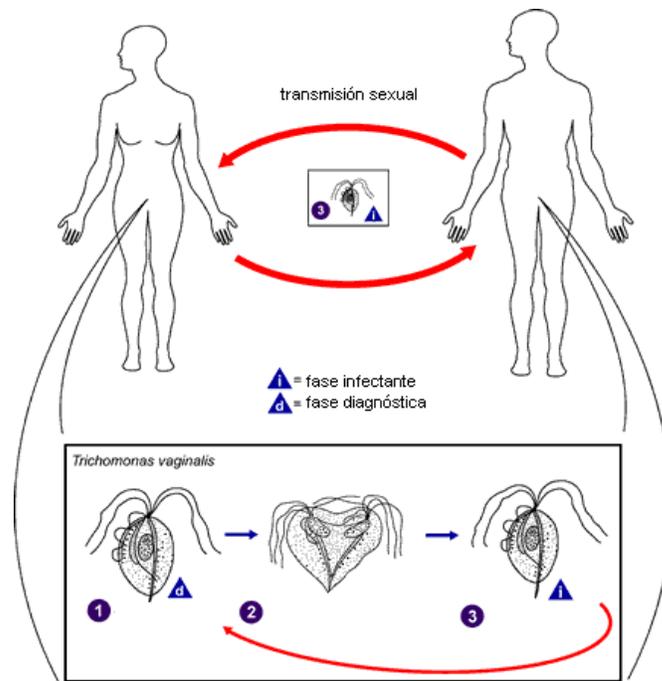


Image credit: CDC/2002

Fig. 4. Ciclo biológico de *T. vaginalis* (Alderete et al., 2002).

1. Trofozoítos en secreciones vaginales, prostáticas y en orina.
2. Multiplicación por fisión binaria longitudinal
3. Trofozoíto en vagina y en orificio de la uretra.

4.4.1. Efecto de extractos de plantas sobre *T. vaginalis*

En el 2004, Monzote-Fidalgo y colaboradores, reportaron que extractos de *Chenopodium ambrosioides* mostró una actividad promisorio en contra de *T. vaginalis* con un CI_{50} de 25 μ g/mL.

En este mismo año, Ramos–Guerra y colaboradores, encontraron que *Artemisia ludoviciana* “Istafiate”, presenta actividad antiprotozoaria contra *T. vaginalis*, *E.histolytica* y *G. lamblia* con CI_{50} de 3.6 mg/mL, 2.23 mg/mL y 1.90 mg/mL respectivamente.

En el 2007 Calzada y colaboradores mostraron que el extracto crudo de *Cocos nucifera* L. (Arecaceae) tiene capacidad inhibitoria contra *T vaginalis*.

Orestes-Guerra y colaboradores en el 2008, identificaron 2 saponinas de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) la yucagenina y la diosgenina, las cuales mostraron actividad contra *T. vaginalis* a concentraciones de 100µg/ML.

Cantillo-Ciau y colaboradores, en el 2010, encontraron que extractos cloroformicos de la alga café *Lobophora variegata*, tienen una gran actividad contra *T. vaginalis* con un CI_{50} de 3.2 µg/mL y tiene una baja actividad contra *G. lamblia* y *E. histolytica* con un CI_{50} de 10.5 µg/mL y 10.8 µg/mL respectivamente.

Dahab y colaboradores en el 2011 evaluaron la actividad de 2 plantas, *Xanthium brasilicum*Vell y *Argemone mexicana* L. y reportaron que los extractos metanólicos de *X. brasilicum* exhiben un 100% de inhibición a una concentración de 500µg/mL después de 192 h mientras los extractos acuoso de *Agave mexicana* tiene 100% de inhibición a una concentración de 1000µg/mL a 192 h de exposición.

Naemi y colaboradores en el 2013, probaron aceites esenciales de *Rheum ribes* L. a diferentes concentraciones contra *T. vaginalis*, encontrando actividad a 1 mg/mL.

Hassani y colaboradores en el 2014, probaron el actividad anti-tricomonas con diferentes extractos de *Eucalyptus camaldulensis* y reportan que la fracción de acetato de etilo es el extracto que muestra mejor porcentaje de inhibición a una concentración de 12.5 mg/mL después de 24 y 48 h.

4.5. Descripción de las plantas seleccionadas para este proyecto

Según estudios de mercado, la gran mayoría de las plantas usadas tradicionalmente como remedios o como especie para dar sabor en la cocina, son traídas del Sur o del Centro del País, pero no todas las que se venden en el mercado son nativas, de hecho existen comercializadoras que se dedican a la importación de plantas para su posterior comercialización (Gutiérrez y Betancourt, 2008), tal es el caso de *Tamarindus indica* L. Tamarindo (www.conabio.gob.mx consultado el 11 de Marzo del 2014) que tiene origen Africano y *Thymus vulgaris* L. Tomillo originaria de la región Mediterránea (Rivero y Osbón 2007) y que fueron seleccionadas para este proyecto.

4.5.1. Descripción de la planta Epazote



Fig 5 epazote (Wikimedia foundation 2010)

Nombre científico: *Chenopodium ambrosioides* L.

Sinónimos: *C. anthermanticum* A. Gray, *Botrys ambrosioides* L., *Blitum ambrosioides* L.

Nombres comunes: Epazote o Hierba del zorrillo (Nacimiento *et al.*, 2006; Quinlan *et al.*, 2002).

4.5.1.1. Clasificación taxonómica:

Reino: Plantae.

División: Traqueobionta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Amaranthaceae

Subfamilia: Chenopodioieae

Género: *Chenopodium*

Especie: *C. ambrosioides*.

4.5.1.2. Descripción:

Planta aromática, anual, más o menos pubescente, tallo usualmente postrado, aproximadamente de 40 cm de altura; Las hojas son oblongo-lanceoladas y serradas de entre 4 cm de longitud y 1 cm de ancho, con pequeñas flores verdes en panículas terminales densos, cada uno con cinco sépalos; el cáliz persistente circunda al fruto y las semillas son negras no mayores a 0.8 mm de longitud

Esta especie es originaria de [América](#), y ya era conocida y utilizada por los [aztecas](#) en el actual [México](#) bajo el nombre [náhuatl](#) de epazotl, de donde proviene el nombre actual utilizado en ese país. (www.conabio.gob.mx/malezasdemexico, consultado el 13 de marzo del 2014).

4.5.1.3. Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos:

Se cree que fue introducida en [Europa](#) en [1577](#) por Francisco Hernández, quien fue también médico del rey [Felipe II](#). De él proviene la primera mención que se conoce en el Viejo Mundo sobre el *epazotl*, y donde también se citan por primera vez las virtudes medicinales que ya le otorgaban los nativos de [México](#), quienes la utilizaban como [antihelmíntico](#) (Gadano *et al.*, 2006; Jamali *et al.*, 2006).

C. ambrosioides es una planta que se encuentra comúnmente en los hogares como remedio a un gran número de enfermedades, así como ingrediente culinario (Taylor, 2005), se prepara a partir de las hojas secas, como infusión, resultando una preparación amarillo intenso (Pardo de Santayana *et al.*, 2005; MacDonald *et al.*, 2004), es irritante a las mucosas del tracto gastrointestinal y la sobredosis causa fatalidades en hombres y ratones (De Pascual *et al.*, 1980). Extractos acuosos de hojas de *C. ambrosioides* se administraron por seis semanas en ratas albinas, y se encontró un decrecimiento en el peso con respecto a los animales control, así como daños hepáticos, necrosis renal y congestión pulmonar (Amole e Izebu, 2004).

Se ha reportado actividad antiprotozoaria contra *Trypanosoma cruzi* (Kiuchi *et al.*, 2002), *Plasmodium falciparum* (Pollack *et al.*, 1990) y *Leishmania amazonensis* (Patricio *et al.*, 2006). En Nigeria, se usa como remedio tradicional contra lombrices intestinales (Odugbemi, 2006). Ensayos de laboratorio han demostrado su capacidad antihelmíntica contra *Ancylostoma duodenalis*, *Trichuris trichura* y *Ascaris lumbricoides* (Gómez-Castellanos, 2008).

Se cultivaron y alimentaron larvas y adultos de *Drosophila melanogaster*, un lote con medio de cultivo y 0.1% de extractos acuosos de *C. ambrosioides* y el otro lote con medio estándar, el resultado fue que los adultos alimentados con medio tratado, tuvieron menos descendencia y la tasa de sexo de las larvas varió significativamente, la esperanza de vida entre los sexos también varió en donde las hembras murieron en forma temprana con respecto a los machos (Wohlenberg y Lopes-da-Silva, 2008).

C. ambrosioides presenta propiedades de insecticida, al exponer insectos de granos almacenados contra extractos acuosos, encontrando valores de LC₅₀ de 0.05g/kg para *Callosobruchus maculatus* y 2.57g/kg para *Sitophilus zeamais* y *Tribulium castaneum* (Denloye *et al.*, 2009).

Ruffa y colaboradores en el 2002 estudiaron el efecto del aceite esencial de *C. ambrosioides* contra líneas celulares carcinómicas en células hepáticas sin encontrar actividad.

Gadano y colaboradores en el 2002, estudiaron genotoxicidad de las infusiones de *C. ambrosioides*. Sus estudios revelaron que existe una interacción entre el DNA y los principios activos en solución acuosa.

Los extractos de *C. ambrosioides* son capaces de inhibir la telomerasa sin exhibir actividad mutagénica o tóxica *in vivo* (Sowemimo *et al.*, 2007).

Los principales componentes químicos se encuentran en el aceite esencial de *C. ambrosioides*, son de naturaleza monoterpénica (C₁₀) y sesquiterpénica (C₁₅) como el ascaridol, que es un peróxido terpénico en concentraciones de hasta el 70%, así como limoneno, transinocarveol, aritasona, β-pineno, mirceno, felandreno, alcanfor y α-terpinol (Sagrero-Nieves y Bartley, 1995; De Pascual, 1980).

En un estudio analítico de los constituyentes de *C. ambrosioides*, encontraron 1.5% de sabineno, 0.29% de β-pineno, 55.55% de α-terpeno, 16.71% de ρ-cimeno, 1.09% de limoneno, 0.279% de (E)-β-ocimeno, 0.97% de γ-terpeno, 17.2% de 1,4-epoxy-ρ-ment-2-eno, 0.14% de 1,2,3,4-diepoxi-ρ-mentano y 0.38% de fitol (Kassali *et al.*, 2006)

4.5.2. Descripción de la planta Cola de Caballo



Fig 6 cola de caballo(CONABIO.Gob. mx)

Nombre científicos: *Equisetum robustum* variedad *affine* Engelman

Sinónimos: *Equisetum hyemale* L:

4.5.2.1. Clasificación taxonómica:

Nombre común: Cola de caballo, Carricillo, Cañuela (Palacios-Ríos, 1992)

Reino: Plantae.

División: Equisetophyta

Clase: Equisetopsida

Orden: Equisetales

Familia: Equisetaceae

Género: *Equisetum*

Especie: *E. robustum*

4.5.2.2. Descripción:

Hierba erecta en forma de junco, generalmente no ramificada, de tallos acanalados, de hasta 10 mm de diámetro; con hojas diminutas, verticiladas, unidas en la base formando una vaina tan larga como ancha que presenta un anillo oscuro en la base, los estróbilos (partes donde se producen las esporas; no tiene flores) terminados en

punta negra. El anillo oscuro en la base de la vaina es característico de esta especie, pero a veces este es irregular o no se presenta, tamaño de hasta 2 m de alto.

No presenta flores, las esporas se producen en esporangios alargados (que abren longitudinalmente) que se encuentran en la superficie interna de estructuras hexagonales, peltadas llamadas esporangióforos, que se disponen verticiladas en estrobilos ubicados en las puntas de los tallos y que son elípticos u oblongos, de aproximadamente 15 mm de largo, las esporas son esféricas verdes con cuatro aláteres en forma de banda. Rizoma largo y ramificado. Se encuentra en [Norteamérica](#), [México](#), [Centroamérica](#) en [Guatemala](#), [Europa](#) y [Asia](#). (Mickel y Smith, 2004; Hauke, 1995; McVaugh, 1992; Palacios-Ríos, 1992)

4.5.2.3. Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos:

Para el tratamiento de las enfermedades renales y de las vías urinarias es el uso más común entre los mexicanos. Para resolver la retención de orina, malestares de riñones y vejiga, para eliminar los cálculos de la vejiga, es un estimulante de la función renal y de las vías urinarias. Interna como externamente (bajo la forma de baños completos o de asiento) se ha acreditado especialmente en el tratamiento de las enfermedades de las vías urinarias, como cistitis y pielitis que se presenta con dolores predominantes en la región renal, contra arenillas o micciones frecuentes con dolores punzantes, ardientes o penetrantes en la uretra. En infusión se utiliza popularmente contra los cálculos vesicales y renales, como diurético y astringente útil en las disenterías, para el tratamiento de hemorragias, úlceras, tumores y afecciones del hígado, bazo y vejiga. También es útil para el tratamiento de algunas enfermedades del aparato digestivo. El cocimiento se utiliza en el tratamiento de las gastritis, las úlceras, dolor e inflamación del estómago vómitos de sangre procedente del estómago. El cocimiento se bebe para tratar los flujos hemorroidales, es un eficaz astringente en las hemorragias capilares y en las enfermedades del flujo sanguíneo. Se utiliza también para combatir las hemorragias intestinales, rectales, y vaginales, para las hemorragias de la nariz. Los baños con la cola de caballo como aditivo, son estimulantes del metabolismo cutáneo y eficaz tanto contra

los trastornos circulatorios, tumefacciones debidas a fracturas óseas, sabañones y úlceras varicosas. Tallos tiernos machacados se aplican sobre las heridas, favoreciendo la cicatrización. Al exterior, es eficaz en las úlceras, caries de los huesos, detergente, resolutorio y cáustico, para lo mismo, se emplea el polvo a dosis de 24 a 50 g y se agrega en una taza de caldo o en una copa de vino. Para las dolencias bronquiales, en té se puede emplear también como expectorante, con beneficios importantes en pacientes asmáticos. En té endulzado con miel, sirve para prevenir los resfríos ya que activa el sistema inmunológico, en el invierno puede tomarse con asiduidad. El té de cola de caballo es útil en el tratamiento del cansancio. Usos contra el mal aliento, úlceras y cáncer. Para las afecciones de la garganta contra la tuberculosis, como terapia de apoyo en las enfermedades de la piel, la medicina popular lo utiliza contra el reumatismo y gota (Gallardo-Pérez *et al.*, 2006; Rojas-Alba 2001)

E. robustum, contiene los alcaloides nicotina, palustrina y palustrinina. Flavonoides como la isoquercetina y equicetrina. Esteroles, incluyendo colesterol y otros. Entre 5 y 10 % de ácido silícico, sustancias diversas, incluyendo un equisetonino, la saponina, dimetil sulfona, tiaminasa y ácido aconítico. De manera general, hay dos principios activos: Primeramente, un amplio conjunto de sustancias minerales, incluyendo el sílice en concentraciones que fluctúan entre 3.21 y 16.25%, de los cuales el 46% del sílice se encuentra en forma de anhídrido, en segundo lugar, una serie de glucósidos que tienen roles coadyuvantes del sílice, especialmente un saponósido (el equise-onósido) que favorece la solubilidad del sílice. Contiene además los minerales: carbonato de calcio, sulfato de potasio, cloruro de potasio, magnesio, fosfato de calcio, fierro, manganeso, entre otros. Estrechamente relacionados entre sí, están los ácidos tribásicos, cítrico, isocítrico y aconítico. El aconítico es un ácido de tipo anhidrocítrico que forma parte del ciclo de Krebs, y del ciclo del glioxalato en los microorganismos. En las partes aéreas de *E. robustum*, se han encontrado los carotenoides alfa y beta-caroteno, lutein su epóxido, licofil, violaxantín y zeaxantín; los flavonoides triglucopiranosidos de herbacetín y camferol (Gierlinger *et al.*, 2008; Park y Jeón, 2008; Gallardo-Pérez *et al.*, 2006).

4.5.3. Descripción de la planta: Gobernadora



Fig 7 gobernadora (www.fireflyforest.com)

Nombre científicos: *Larrea tridentata* DC.

Sinónimos: *Larrea mexicana* Moric.; *L. glutinosa* (Correl y Johnston, 1970); *Zygophyllum tridentatum* Sessó Moc. (Shreve y Wiggins 1964).

Nombre Común: Creosote, hediondilla, guamis, huamis (Martínez, 1979; Correl y Johnston, 1970); Falsa alcaparra (Rzedowski y Rzedowzki, 1994).

4.5.3.1. Clasificación taxonómica:

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Zygophyllaceae

Género: *Larrea*

Especie: *L. tridentata*

4.5.3.2. Descripción:

Arbusto perenne xerófito siempre verde. La raíz solo crece 170cm hacia abajo, pero se ramifica más de 4m lateralmente (Binker, 1993).

El tamaño varia de 0.5 m a 4m de altura dependiendo de la lluvia de invierno o verano y la altura promedio dependerá de la raza de ploídia (diploide 86 cm, hexaploide 112 cm y tetraploide 138 cm). No hay un tallo principal, las ramas crecen vertical u oblicuamente desde la corona radicular y se hace dicotómica lateralmente. Las hojas son pequeñas y bifoliadas, de un verde oscuro a verde amarillento con cutículas gruesas y una capa resinosa, tienen pecíolos cortos y crecen opuestas en las ramas (Coyle y Roberts, 1975).

Las flores son amarillas, usualmente aparecen al final del invierno o a principio de la primavera. Los frutos son pequeños (4 a7 mm de diámetro), tienen una cubierta vellosa y contienen 5 semillas que se esparcen en primavera y al principio del otoño Es una planta muy corriente en los [desiertos](#) de [Mojave](#), [Sonora](#), y [Chihuahua](#) del oeste de [Norteamérica](#), incluyendo partes de [California](#), [Arizona](#), [Nevada](#), [Utah](#), [New Mexico](#) y el oeste de [Texas](#) en los [Estados Unidos](#), y el norte de [Chihuahua](#) en [México](#). Está estrechamente emparentada con la especie suramericana [Larrea divaricata](#), y anteriormente era considerada como la misma especie. (Coyle y Roberts, 1975; Shreve y Wiggins, 1964).

4.5.3.3. Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos:

La gobernadora ha sido usada tradicionalmente para tratar más de 50 enfermedades. Los usos más comunes, están asociados a enfermedades renales y de origen ginecológico. La planta es usada como extractos acuosos o alcohólicos de hojas y brotes; está disponible en cápsulas y tabletas para uso oral. Los indios del Suroeste de Norteamérica lo usaban como té.

En México se reporta el uso de infusiones de hoja que disuelve las piedras de los riñones y los cálculos biliares, para lo cual el té se consume como agua de uso (Arteaga *et al.*, 2005; Lara y Márquez 1996; Díaz 1976; Martínez 1969).

Esta planta es usada como tónico en el tratamiento de enfermedades del hígado (Brent, 1999; Seikh *et al.*, 1997). En el tratamiento de infecciones del tracto urinario y enfermedades venéreas (Brent, 1999; Mabry *et al.*, 1979; Timmermann, 1977). En México, decocciones y extractos son usados para el tratamiento de la diabetes (Winkelman, 1989).

La gobernadora se describe como uno de los mejores antibióticos herbales y ha sido usado contra bacterias, virus y parásitos, tanto interna como externamente (Smith, 1994).

Entre las múltiples propiedades medicinales de la gobernadora se menciona como antiamebiasis a bajas dosis (Brent, 1999). Extractos etanólicos y clorofórmicos de gobernadora y el Ac. Nordihidroguaiarético (NDGA) muestran una marcada inhibición en el crecimiento de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba invadens* (Calzado-Flores *et al.*, 1995; Mabry *et al.*, 1979; Segura, 1978).

Los componentes químicos que destacan por su mayor contenido en base al peso seco del follaje son los lignanos fenólicos, seguidos por las saponinas, flavonoides, aminoácidos y minerales. El ácido nordihidroguaiarético (NDGA), es el compuesto más importante y se encuentra en la resina de las células cercanas a las capas epidermales superior e inferior de las hojas y tallos, es uno de los antioxidantes mejor conocidos (Seigler *et al.*, 1974). Químicamente se describe como beta, gamma dimetil-alfa, delta-bis(3,4-dihidroxifenil) butano. Se ha determinado que tiene propiedades como antioxidante, antiinflamatorio, citotóxico, antimicrobial e inhibidor de enzimas (Binker, 1993; Fernández, 1979; Mabry *et al.*, 1977). Exhibe propiedad inhibitoria contra el proceso de transcripción en el virus del SIDA HIV (Gnabre *et al.*, 1995). Años más tarde también se reporta actividad contra virus del herpes (Clark, 2003).

Extractos etanólicos de *L. tridentata* resultaron efectivos en la reducción de incidencia de cálculos de colesterol en hámster alimentados con dieta litogénica (Arteaga *et al.*, 2005)

Se evaluó la actividad antifúngica de extracto de resina hidrosoluble de *Larrea tridentata* (D.C). Coville (L.) combinado con quitosán (Ch.) que es un polímero parecido a la quitina y a la celulosa contra los hongos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum coccodes* y *Fusarium oxysporum* obteniendo resultados muy prometedores (Lira-Saldivar *et al.*, 2006).

Suárez-Jiménez y colaboradores en el 2007, reportaron actividad inhibitoria de *L. tridentata* contra los hongos *Fusarium verticillioides*, *A. flavus* y *A. parasiticus*.

4.5.4. Descripción de la planta Tamarindo



Fig 8 tamarindoconabio.gob.mx)

Nombre científico: *Tamarindus indica* L.

Sinónimos: *Tamarindus occidentales* Gaertn; *Tamarindus officinalis* Hook;
Tamarindus umbrosa Salisb.

Nombres comunes: Tamarindo, Pachuhuk, Pachuchul

4.5.4.1. Clasificación taxonómica:

Reino: Plantae.

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Subfamilia: Caesalpinoideae

Tribu: Detarieae

Género: *Tamarindus*

Especie: *T. indica* L.

4.5.4.2. Descripción:

Árbol de tamaño mediano a grande, inerme, perennifolio, bajo optimas condiciones, subcaducifolio, de 10 a25 m de altura (hasta 30 m), con un diámetro a la altura del pecho de 1m o más, copa redondeada, grande extendida y abierta, con una cobertura de 6 a 10m. Follaje denso o ralo, plumoso en apariencia y ofreciendo una sombra atractiva. Hojas alternas, parapinnadas, pecioladas, de 5 a 15cm de largo, con (5) 10 a 20 pares de pinnas enteras oblongas, con la base oblicua y el ápice redondeado, casi sésiles, con longitud fluctuante de 0.3 a2.5 cm y un ancho de 2 a8 mm, de color verde pálido, tronco corto, derecho y grueso, ramas ampliamente extendidas con las ramillas en forma de zig-zag (Pubescentes cuando jóvenes). Corteza externa con tonalidades que van desde grises hasta pardo oscuras (Tostado o café). Inflorescencias en racimos cortos y laxos, axilares o terminales, pedúnculos de 5 a10 cm de largo por 2.2 cm de diámetro con (5) 8 a 14 flores, zigomórficas, vistosas(Los botones rojos o rosas); cáliz 4-lobulado, blanco amarillento con tonos rojizos, corola con 5 pétalos de diferentes tamaños, 2 reducidos y escamiformes y 3 grandes oblanceolados, glabros de color amarillo pálido matizados de naranja o rojo, de 0.5 a1 cm de largo y unidos a la mitad. Fruto en vaina, indehiscente, oblonga o linear, algo comprimida lateralmente y curvada, con epicarpio pardo delgado seco y escamoso, mesocarpio pulposo combinado con fibras y una capa coriácea interna (Endocarpio) septada entre las semillas de 1.7 a15 cm de largo por 2 a 3.5 de ancho y 1.5 cm de espesor, conteniendo 1 a 12 semillas, indehiscentes, ovaladas, comprimidas lateralmente, lisa con la testa café, lustrosas de 1cm de largo y unidas entre si, carecen de endospermo como reserva nutritiva, presentan un par de cotiledones gruesos y la radícula es pequeña y recta es un [árbol](#) tropical, originario del este de [África](#) pero que ahora existe en gran parte de [Asia](#) tropical así como [Latinoamérica](#). El [género](#)*Tamarindus* es monotipico, es decir, sólo tiene una especie. [.\(www.conabio.gob.mx/conocimiento/tamarindusindica\)](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/tamarindusindica)

4.5.4.3. Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos:

En Nigeria se reporta que el tamarindo se usa tradicionalmente para resfriados, fiebre, desorden estomacal, diarrea y como aclarador de piel, esto mediante la decocción de tallos tiernos y hojas frescas para uso como potaje. Se ha encontrado que la pulpa de tamarindo funciona como laxante, usada por el contenido de ácidos orgánicos y pectinas (Doughari, 2006).

Mallikarjuna y colaboradores en el 2009 reportan que extractos acuosos a una concentración de 160 mg/mL causa la parálisis en 25 min. y la muerte en 35 min. del helminto *Phretima posthuma*.

Havinga y colaboradores en el 2010, reportan el uso del tamarindo en África para la expulsión de helmintos mediante la decocción de las diferentes partes de la planta.

El extracto etanólico del fruto es activo contra *B. Subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Aureus*, *S. Typhi* y *V. Cholerae* Estudios farmacológicos demuestran que la maceración de pulpa del fruto por vía oral en ratas induce actividad diurética (Cáceres 1996).

Los constituyentes fitoquímicos como taninos, flavonoides, alcaloides y otros compuestos aromáticos, son metabolitos secundarios que sirven como defensa contra la depredación de microorganismos, insectos y herbívoros (Lutterdot *et al.*, 1999; Marjorie, 1999). Esto explica de algún modo, porque los extractos elaborados de tallos de *Tamarindus indica* Linn. muestran una gran actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, indicando un amplio espectro de compuestos antibióticos (Srinivasan *et al.*, 2001). Se reporta para *Staphylococcus aureus* una MIC de 18 mg/mL y para *Salmonella paratyphi* y *Bacillus subtilis* una MIC de 8 mg/mL (Doughari, 2006; Cáceres 1996).

Se ha usado en medicina tradicional para el manejo de diabetes mellitus en humanos y en animales experimentales (Chaterjee *et al.*, 2009; Maiti *et al.*, 2004). Se ha reportado una potencial actividad antioxidante (Dighe *et al.*, 2009). La cubierta de la semilla del tamarindo juega un rol importante en la protección química contra daños oxidativos al poseer antioxidantes endógenos como los compuestos fenólicos. Se han aislado compuestos antioxidantes como 2-hidroxibenzoato, 3,4-dihidroxibenzoato, 3,4-dihidroxifenilacetato y (-)-epicatequina en adición a proantocianidinas oligoméricas (Kabir-Khanzada *et al.*, 2008). En la pulpa del fruto se reporta también la presencia de antraquinonas, flavonoides glicósidos y cardioglicósido (Abukakar *et al.*, 2010).

La hoja contiene vitexina, isovitexina, orientina e isorientina, es rica en ácidos a-oxo-glutárico, glioxílico, oxalo-acético y oxalosuccínico. El fruto tiene 25 - 40% de azúcares, 8 - 18 % de ácidos orgánicos (sobre todo tartárico, málico y ascórbico), pectinas, sustancias aromáticas: monoterpenos como limoneno, geraniol, geranial; compuestos aromáticos como safrol, aldehído cinámico, salicilato de metilo; pirazinas (Havinga 2010).

4.5.5. Descripción de la planta “Tomillo”



Fig 9 tomillo (Mail.sdr.gob.mx)

Nombre científicos: *Thymus vulgaris* L.

Nombre común: Tomillo

4.5.5.1. Clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetodiaceae

Tribu: Mentheae

Género: *Thymus*

Especie: *T vulgaris*

4.5.5.2. Descripción:

Arbusto aromático, perenne, de tallos leñosos, erectos o postrados, poblados de numerosas hojas menudas, lanceoladas, muy estrechas, blanquecinas y pilosas por el

envés, flores rosadas, agrupadas en ramilletes terminales, fruto seco con pequeñas semillas ovaladas, su estatura aproximada de 10 a 50 cm.

Es de origen Europeo, aunque se cultiva en muchas partes del mundo (Bruneton, 2001; Davis, 1982).

4.7.5.3. Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos:

El tomillo es usado para sazonar peces, sopas y vegetales, como saborizante en licores y tés herbales preparados para resfriados y diarreas.

El aceite de tomillo se ha usado como fumigante, antiséptico, antioxidante y enjuague bucal. Otros aceites esenciales como el timol es activo contra *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus* y contra vermicífugos. Constituyentes químicos como el borneol, carvacrol, linalool, timol, taninos y saponinas, son supresores de coágulos, congestión pectoral y producción de saliva (Barnes *et al.*, 2002; Jellinet *et al.*, 2000; Lueng and Foster, 1996; Baytop, 1984)

Estudios posteriores confirmaron propiedades antibacterianas de los constituyentes químicos contra *Salmonella typhimurum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y otras especies bacterianas. (WHO, 1999).

Según Behnia y colaboradores el aceite esencial de *Thymus vulgaris* mostró una gran actividad contra trofozoitos de *E. histolytica* con una MIC de 0.7 mg/mL, mientras el metronidazole presentó una MIC de 2 µg/mL (Behnia *et al.*, 2008).

Extractos hidroalcohólicos de *Thymus vulgaris* presentan efectos contra el dolor, en el rango de 100 a 1000 mg/kg aunque la dosis de 500 mg/kg fue más potente que la droga dexametasona (Taherian *et al.*, 2009).

Se evaluó daños al DNA al ser expuesto a diferentes concentraciones del timol de *Thymus vulgaris* y se encontró que a altas concentraciones (0.2 0.5 1 y 2 mM) se incrementa el daño al DNA significativamente comparado con el control (Aydin *et al.*, 2005)

Los compuestos característicos de *Thymus vulgaris* son los aceites esenciales, como el timol (44.4-58.1%), p-cimeno (9.1-18.5%), gamma-terpineno (6.9-18.9%) y carvacrol (2.4-4.2%)(Baransuskiene *et al* 2003).

4.6. Estrategias generales en la investigación de Química de Productos Naturales

El área de los productos naturales se ha desarrollado ampliamente a lo largo de la existencia de la humanidad, iniciando con el interés de los pueblos indígenas por el uso empírico que le dieron a las plantas y otros organismos para satisfacer sus necesidades de alimentación y salud, así como, para el desarrollo de actividades religiosas. Con el paso del tiempo la confluencia de disciplinas científicas como la Botánica, Etnobotánica, Fitoquímica, Farmacología, etc. han dado soporte al estudio de los metabolitos de los productos naturales que se obtienen de las plantas y otros organismos. Asimismo, una gran cantidad de fármacos provienen de los productos naturales que generan los organismos vivos. Es por ello que surge la necesidad de que se conozcan los principales métodos, procedimientos y técnicas de obtención de los metabolitos secundarios que conforman el vasto campo de los productos naturales (Valencia-del Toro y Garín-Aguilar, 2010).

Un problema que con frecuencia se encuentra en las investigaciones con productos naturales es la extracción, el fraccionamiento, la identificación de sustancias y la determinación de su pureza. De inicio para la obtención de extractos vegetales hay una gran diversidad de técnicas tales como la extracción con solventes, que se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así, para compuestos de baja polaridad como los lípidos, se utilizan solventes apolares como el hexano o el cloroformo; para compuestos de mediana o alta polaridad se utilizan solventes polares como el etanol, metanol y la acetona (Lizcano y Vergara, 2008).

La maceración es una técnica de extracción con solvente (un líquido capaz de disolver otra sustancia) para separar o retirar compuestos de una fase homogénea, esta técnica está basada en el reparto entre fases.

El fundamento de la separación se basa en el reparto selectivo del soluto entre dos fases no miscibles, que pueden ser una acuosa y una orgánica.

La distribución del soluto entre las dos fases inmiscibles es un fenómeno de equilibrio que se describe por medio de la ley de distribución, cuya constante de equilibrio se denomina coeficiente de distribución o coeficiente de reparto. Las constantes de distribución permiten calcular la concentración del soluto que permanece en una solución después de un número de extracciones y permiten determinar la manera más eficiente de realizar una separación por extracción.

Es importante tener en cuenta que las sustancias iónicas y los compuestos orgánicos polares, estarán en mayor proporción en la fase acuosa, mientras que los compuestos orgánicos no polares, estarán en mayor proporción en la fase orgánica



$$K_D = [S(\text{fase 2})] / [S(\text{fase 1})]$$

Dado en concentraciones molares:

K_D es el coeficiente de reparto, si K_D es suficientemente grande el soluto pasará de la fase 1 a la fase 2, pero si K_D es pequeño el soluto permanecerá en la fase 1. Los estados físicos de ambas fases se identifican al describir el proceso de separación nombrando primero la fase que contiene el soluto; así si el soluto se encuentra en la fase sólida y se desea extraerlo con un solvente líquido el proceso se llama extracción sólido-líquido (Skoog *et al.*, 2009).

Una vez obtenido el o los extractos, es necesario obtener un perfil químico de los extractos de plantas mediante la aplicación de técnicas colorimétricas. Este análisis se efectúa para determinar los principales grupos de metabolitos presentes en los extractos de plantas y hongos, los extractos obtenidos se ponen en contacto con diferentes reactivos químicos y se observan las reacciones de coloración y/o precipitación que se obtengan y a partir de ellas se determina la presencia o ausencia de los diferentes metabolitos (Valencia-del Toro y Garín-Aguilar, 2010).

Posteriormente, se efectua el fraccionamiento por medio de particiones, donde se usa la extracción líquido-líquido. Para estas extracciones, donde una fase es orgánica (org) y otra es acuosa (aq) se pueden utilizar las siguientes ecuaciones:

La fracción de soluto presente en la fase acuosa $q(aq)_1$ en la extracción número 1 es:

$$q(aq)_1 = \frac{V_{aq}}{D V_{org} + V_{aq}}$$

$$q(org)_1 = 1 - q(aq)_1 = 1 - \frac{D V_{org}}{D V_{org} + V_{aq}}$$

Donde D es una relación de distribución más simple que se puede describir como:



$$D = \frac{(S_{org})_{tot}}{(S_{aq})_{tot}}$$

S_{aq} = soluto en la fase acuosa en concentración molar

S_{org} = soluto en la fase orgánica en concentración molar

Se pueden observar algunas desviaciones de la ley de distribución, cuando se producen otro tipo de equilibrios como de disociación, dimerización o formación de complejos con alguno de los solventes o con otro componente (Skoog *et al.*, 2009)

Se puede proseguir con el fraccionamiento del extracto mediante diferentes técnicas cromatográficas como papel, capa fina, preparativa, columna, etc. Estas técnicas son un método de separación y purificación de compuestos orgánicos que depende de la distribución de ellos en una fase estacionaria. Para efectuar una separación cromatográfica se requiere de una fase estacionaria sólida (material adsorbente como alúmina, gel de sílice, carbón o celulosa) y de una fase móvil (eluyente). Se elige el

adecuado para efectuar la separación considerando las solubilidades relativas de los componentes de la mezcla. La muestra se aplica en el adsorbente (en la columna, placa o en tira de papel) y luego se deja que pasen a través del adsorbente los componentes de la mezcla, que se desplazarán dependiendo de su solubilidad relativa en el eluyente y en el adsorbente. Aquellos que son más solubles y que son menos atraídos por la fase estacionaria se desplazarán más rápido, mientras que componentes insolubles quedan en el punto de aplicación. Para el caso del papel, placa fina y preparativa después del proceso se tiene como resultado un cromatograma en el cual los componentes separados se revelan, ya sea por su color inherente o por medio de un método físico o químico (Valencia-del Toro y Garín-Aguilar, 2010).

Actualmente para caracterizar sustancias se emplean técnicas modernas de análisis, tales como espectroscopia en sus diversas modalidades Ultravioleta-Visible (UV-Vis), Infrarrojo (IR), Resonancia Nuclear Magnética (RNM)), Espectrometría de masas (EM), cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)(Fessenden y Fessenden, 2001; Rubinson y Rubinson, 2001; Canell, 1998;).

Una manera moderna de guiarnos a través del proceso de investigación química, es mediante la aplicación de pruebas de actividad biológica, ya sea de tipo antibiótico, citotóxica, anticancerígena, antidepresiva etc. Los bioensayos es una herramienta rápida de realizar, relevante que nos permite establecer la presencia o ausencia de la actividad específica en una muestra determinada, a esto se le llama ensayo biodirigido (Mohamed y Aus El-Sharkiya, 2006).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material biológico.

5.1.1 Material Vegetal:

Las plantas fueron adquiridas comercialmente y se identificaron en el herbario de la Facultad de Ciencias Forestales de la UANL.

Tabla I

Plantas en estudio y número de registro asignado:

Nombre Común	Origen de la planta	Nombre Científico	No. de registro	Identificó
Epazote	Cultivado	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L. Amaranthaceae	20984 herbario CFNL	E. Estrada 20-Ago-2011
Cola de Caballo	Vegetación secundaria 1680 m. Cumbres de Monterrey ejido La Trinidad.	<i>Equisetum hyemale</i> L. Equisetaceae	21765 herbario CFNL	E. Estrada 16-Jul- 2011
Gobernadora	Matorral microfilo 1450 m. san Roberto Municipio de Galeana N.L.	<i>Larrea tridentata</i> Zucc. Zygophyllaceae	24987 herbario CFNL	E. Estrada 12-May-2013
Tamarindo	Cultivado 360m. Linares N.L.	<i>Tamarindus indica</i> L. Fabaceae	22287 herbario CFNL	E. Estarda 15-Abr-2012
Tomillo	Cultivado Zaragoza N.L.	<i>Thymus vulgaris</i> L. Lamiaceae	21344 Herbario CFNL	E. Estrada 20-Ago-2011

5.1.2 Protozoarios:

Las cepas de *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS, *Trichomonas vaginalis* GT-15 y *G. lamblia* 0989:IMSS se utilizaron en este estudio. *E. histolytica* y *T. vaginalis* fueron crecidas y mantenidas en medio PEHPS, el cual es el acrónimo de sus principales componentes (Peptona de caseína, extracto de hígado y páncreas, y suero bovino) (Said-Fernández, *et al.*, 1988) y *G. lamblia* fue crecida y mantenida en TYI-S-33 suplementado con bilis bovina (Keister 1983). Las tres especies fueron subcultivadas tres veces a la semana y cosechadas a la mitad de su respectiva fase logarítmica.

5.2 Medios de cultivo:

5.2.1. Suero bovino estéril.

El suero bovino se obtuvo de sangre bovina colectada del rastro municipal en la ciudad de Monterrey. La sangre se dejó coagular a 37 °C por 12 h, posteriormente se separó el coágulo del suero por centrifugación a 2,000 rpm durante 15 min. Después de este tiempo, el suero fue esterilizado usando papel Whatman No. 1 y un sistema de filtros diferentes (desde 10 mm a 0.22 micras de porosidad) (Corning, Inc, N.Y., E.U.A). El suero estéril se descomplementó por calentamiento a 56 °C durante 30 min (agitando cada 5 min). Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionaron 25 mL de la mezcla vitamínica 107 de Diamond (JRH Bioscences, Lenexa, Ks) por cada litro de suero. Finalmente se distribuyó en alícuotas de 100 mL y se almacenó en frascos de 125 mL a -20 °C hasta su uso (Said-Fernández *et al.*, 1988).

5.2.2 Preparación de los medios de cultivo.

5.2.2.1 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.

5.2.2.2. Medio basal TYI-S-33 (Diamond *et al.*, 1978).

Trypticasea 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 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.

5.2.2.3. Medio completo PEHPS y TYI-S-33.

Se adicionó a los tubos conteniendo 5 mL de los medios PEHPS y TYI-S-33 10% de suero bovino, 48 h antes de inocularse con amibas, giardias y tricomonas 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.

5.3 Cultivo axénicos de protozoarios.

5.3.1. Resiembra:

Las cepas de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS, de *Giardia lamblia* IMSS:0889y *Trichomonas vaginalis* GT-15 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, 1×10^4 giardias y 1×10^4 por mL en cada uno de otros tres tubos (5.0 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), fresco (Keister, 1983). Se conservaron los cultivos de la penúltima resiembra hasta comprobar el crecimiento celular de los protozoarios. Las resiembras se realizaron cada 72 y 48h respectivamente.

5.4 Reactivos y estándares químicos:

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron grado reactivo: metanol, n-hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona, y n-butanol marca J. T: Baker, cromatoplasmas de 20 x 20 cm de silica gel en vidrio de uso general marca Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA. Dimetilsulfoxido (DMSO), metronidazol y los estándares químicos, ácido ursólico y ácido betulínico de marca Sigma-Aldrich Chemical Co., St Louis, MO, USA.

Peptona de caseína y dextrosade la marca Bioxón (Becton Dickinson de México S.A. de C.V.), fosfato de potasio monobásico y dibásico de Control Técnico y Representaciones, S.A. de C.V. (Monterrey, N. L. México), cloruro de sodio de Merck México, S. A.L-

cisteína hidrociorada monohidratada, ácido ascórbico, fosfato de potasio monobásico, lauril sulfato de sodio, Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, E.U.A), Formalina al 10% (Sigma, Saint Luis, Missouri, EUA).

5.5 Obtención de los extractos metanólicos



Fig. 10. Obtención de los extractos de las plantas en estudio

Las partes aéreas de las plantas se colocaron en Horno (J.M. Ortiz. Aparatos Eléctricos S.A. de C.V. Monterrey, N.L. México) a 40°C para su secado y se molieron mediante molino eléctrico (Molino del Rey, S.A. de C.V. San Nicolás de los Garza, N.L. México).

El extracto crudo se obtuvo por maceración con metanol. Se pesaron 150 g del material seco y molido y se colocaron en matraces con 500 mL del metanol. Los matraces se mantuvieron en agitación continua por 72 h en agitador rotatorio (PC Corning 622, New York, NY, USA), el proceso se repitió 3 veces. El extracto metanólico crudo se filtró y se dejó a temperatura ambiente hasta sequedad total, posteriormente se guardaron en viales de cristal color ambar en refrigeración a 4°C hasta su uso.



Fig. 11. Extractos en agitación constante.

A todos los extractos se determinaron rendimientos, se realizaron pruebas químicas colorimétricas y pruebas biológicas (Molina-Salinas *et. al.*, 2008).

5.6 Rendimiento

Se refiere a la cantidad de extracto obtenido de la planta expresado en porcentos, para esto es necesario llevar a sequedad total el extracto y pesarlo, así mediante la formula:

Rendimiento= (peso del extracto obtenido/ peso inicial del material seco y molido) X 100

5.7 Pruebas colorimétricas:

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.

5.7.1 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 μ L 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.

5.7.2. 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.

5.7.3. 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 roja o naranja persistentes por 24 h nos indica una prueba positiva.

5.7.4. Prueba de permanganato de potasio

Para dobles enlaces. Se disolvieron 2.0 g de permanganato de potasio 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.

5.7.5. 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.

5.7.6. 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.

5.7.7 Prueba de Shinoda

Determinación de flavonoides se disuelven 1-2 mg de la muestra en 1 ml de etanol agregando unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y una o dos limaduras de magnesio; si la solución se torna de color rojo intenso, la prueba es positiva, otro color como anaranjado, verde o azul pueden estar presentes, flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

5.7.8 Saponinas

En un tubo de ensaye se coloca la muestra (1-2 mg) disuelta en 1 ml de agua, se sacude y se forma una espuma abundante, la prueba se considera positiva.

5.7.9 Coumarinas

Se disuelven 1-2 mg de la muestra en una solución de hidróxido de sodio al 10 %; si aparece una coloración amarilla, la cual desaparece al acidular, la prueba es positiva.

5.7.10 Dinitrofenilhidrazina

Grupo carbonilo.- Prueba de la 2, 4-dinitrofenilhidrazina (100 mg de 2,4, DFNH + 10 mL de ETOH + 3 ml de HCL aforar a 100 mL con agua destilada) y se añaden unas gotas de este reactivo a la muestra disuelta en etanol, la formación de un precipitado amarillo, rojo o naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

5.7.11 Prueba de la Antrona

Determinación de carbohidratos; en un tubo de ensaye se colocan 1-2 mg de la muestra disuelta en agua, después se deja resbalar por las paredes del tubo una solución reciente de Antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado; la prueba es positiva si en la interfase aparece un anillo azul-verdoso o violeta.

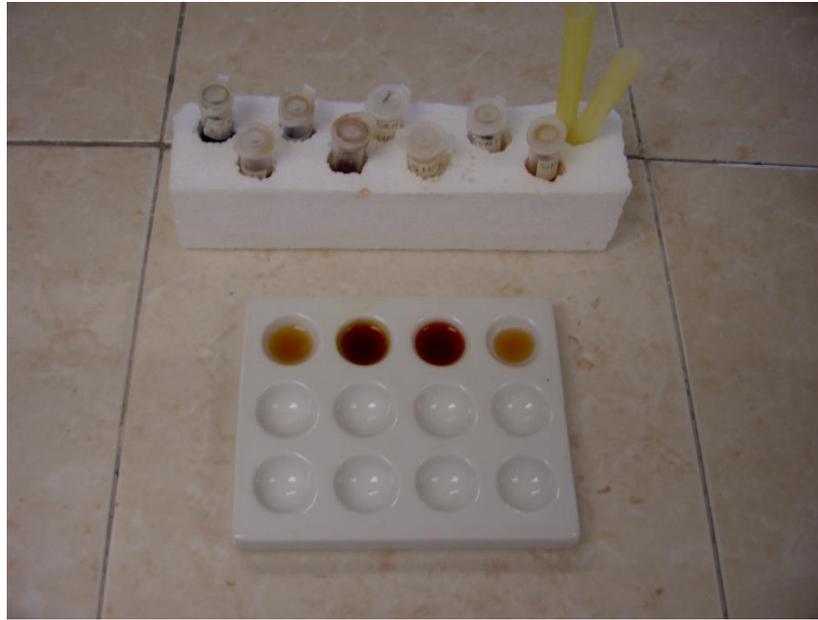


Fig. 12. Pruebas coloridas de los extractos en estudio.

5.8 Parámetros de crecimiento de los parásitos seleccionados:

5.8.1 Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica*:

Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado para cada cepa. Se revisaron bajo microscopio invertido (Reich, No. de serie WI-54220) los tubos de la última resiembra, se escogieron los mejores y se enfriaron en agua-hielo por 10 min, se agitaron suavemente y se determinó la densidad celular de cada tubo con un hemacitómetro (Americal Optical Scientific Instruments Div.).

Se inocularon 5,000 trofozoítos/mL a 45 tubos de 13 X 100 mm (Bellco, Glass, Inc. N.Y. EUA) con tapón de rosca conteniendo 5.5 mL de medio PEHPS. Cada 24 h se determinó número de trofozoítos por mL por tubo.

5.8.2 Cinética de crecimiento de *Giardia lamblia*:

Se utilizó el procedimiento antes descrito para *E. histolytica* con la siguiente modificación: se determinó la densidad celular haciendo una dilución de 1:10 para contar a las giardias (usando 100 mL de medio de cultivo enfriado y homogenizado en 900 mL de formalina al 10%), se obtuvo usando un hemacitómetro el número de trofozoítos por mL por tubo. Se inocularon 45 tubos (Bellco, Glass, Inc. N.Y. EUA) con tapón de rosca con 5.5 mL de medio de cultivo TYI-S-33 y un inóculo de 5×10^3 trofozoítos/mL, los cuales se contaron cada 24 h.

5.8.3 Cinética de crecimiento de *T. vaginalis*:

Se procedió igual que con giardia, se prepararon 45 tubos de ensayo de 13 x 100 mm (Bellco, Glass, Inc. N.Y. EUA) con tapón de rosca con 5.6 mL de medio PEHPS. Se inoculó cada tubo con 5×10^3 trofozoítos/mL a partir de los tubos de resiembra y se incubaron a 37 °C. El conteo se realizó cada 24 h.

Para la obtención de los parámetros de crecimiento tiempo de generación y tiempo de duplicación de los protozoarios se utilizó la prueba estadística de regresión lineal.

5.9 Pruebas de actividad biológica (Mata-Cárdenas *et al.*, 2008):

5.9.1 Actividad inhibitoria.

La actividad antiprotozoaria de los extractos y de las fracciones obtenidas se realizaron como se describe previamente (Mata-Cárdenas *et al.*, 2008) técnica de microensayo.

Del extracto metanólico crudo, se pesaron 30 mg y se disolvieron en 250 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% en tubo eppendorf estéril, se tapó en papel aluminio

y se guardó a 4°C hasta su uso (cuando menos por 24h para que se esterilice). Esta es la solución madre.

De la solución madre se tomaron 50 µL y se diluyó en 950 µL de agua estéril, la concentración será de 300 µg en 50 µL, de la solución.

En tubos de cultivo de 1 mL (Vial micro storage Cat. No. 2070-00001, Bellco Biotechnology, BellcoGlass Inc., Vineland, NJ, USA) con medio PEHPS y/o TYI-S33, se depositaron 200 X 10³ trofozoítos de *Giardia lamblia*, 100 X 10³ de *Trichomonas vaginalis* y 20 X 10³ para *Entamoeba histolytica* en fase logarítmica. A cada tubo se les adicionaron 300 µg del extracto metanólico crudo, de las fracciones y de los compuestos purificados del o los extractos más activos, así como 10 µg de los compuestos puros: ácido ursólico y ácido betulínico, todos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Como control positivo se utilizó el metronidazol a una concentración de 2.5 µg/mL y como control negativo DMSO al 5%. En el caso de *G. lamblia* y *T. vaginalis* se incubaron a 36.6°C por 24 h y para *E. histolytica* 36.6°C por 72 h. Después del período de incubación se enfriaron en agua-hielo por 10 min y se contabilizó el número de trofozoítos por mL⁻¹ de cada tubo con un hemacitómetro. Los resultados fueron estimados como el porcentaje de inhibición de los crecimientos comparados con los controles no tratados.

5.9.2 Determinación de CI50

5.9.2.1.- Del extracto metanólico crudo, se pesaron 30 mg y se disolvieron en 250 µL de Dimetilsulfoxido (DMSO) al 100% en tubo eppendorf estéril, se tapó en papel aluminio y se guardó a 4°C hasta su uso (cuando menos por 24h para que se esterilice). Esta es la solución madre.

5.9.2.2 Diluciones:

5.9.2.2.1- Se tomaron 50 μL de la solución madre y se diluyó en 950 μL de agua estéril, la concentración será de 300 μg en 50 μL , esta es la solución 1.

5.9.2.2.2.- A partir de la solución 1 se hicieron 4 diluciones 1:1 tomando 500 μL de esta solución y se añadieron 500 μL de la solución testigo y se obtuvieron las siguientes concentraciones: 150, 75, 37.5, y 18.75 μg respectivamente.

5.9.2.2.3.- La solución testigo se preparó tomando 400 μL de DMSO y se diluyó en 7600 μL de agua estéril.

5.9.2.3 - Bioensayo:

5.9.2.3.1.- Del cepario de cada protozoario se tomó un tubo, que se revisó al microscopio comprobando que estuvieran en buenas condiciones, se enfrió en agua hielo por 10 min. para despegar al protozoario y se contaron en hemacitómetro.

5.9.2.3.2.- Una vez contado el número de células, se calculó la cantidad de inóculo para ajustar la cantidad de células por mL para cada caso, se inocularon en un tubo de 15 X 150 con tapa roscada para formar un solo inóculo, se agitaron suavemente y se dejó momentáneamente en una gradilla. Se etiquetaron los viales de la marca Bellco con capacidad de 1 mL, se tomaron 50 μL de las diluciones ya preparadas del extracto correspondiente y se agregaron 950 μL de medio con células ajustadas y se incubaron por 24 h a 36.5°C en el caso de *G. lamblia* y *T. vaginalis*, para el caso de *E. histolytica*, se incubaron por 72h a 36.5 °C.

5.9.2.3.3.- Pasado este tiempo se colocaron los viales en agua hielo por 10 min., y se procede al conteo con hemacitómetro.

5.9.2.3.4.- Este resultado se dividió entre 8 (8 cuadrantes de la cámara) y el resultado es $\times 10^5$ en el caso de *G.lambli*a y *T. vaginalis* considerando la dilución previa con formalina al m10% y en el caso de *E. histolytica* es $\times 10^4$.

5.9.2.3.5.- Para llevar a cabo el análisis estadístico en forma manual del experimento, se hicieron por triplicado cada uno y se procedió de la siguiente manera:

5.9.2.3.5.1 - Se sacaron promedios de cada tratamiento

5.9.2.3.5.2,- Se obtuvo \log_{10} de la concentración de la solución problema.

5.9.2.3.5.3.- Se determinó el número de células muertas, restando el resultado del tratamiento al resultado del testigo.

5.9.2.3.5.4.- Se obtuvo la relación de células muertas entre vivas.

5.9.2.3.5.5.- El resultado se relacionó en tabla de valores PROBIT.

5.9.2.3.5.6.- Se graficó el \log_{10} de la concentración eje de las X contra el número obtenido en las tablas Probit en el eje de las Y.

5.9.2.3.5.7.- De esta gráfica se obtuvo la línea de tendencia, ecuación de la recta ($y= a + bx$) y R^2 .

5.9.2.3.5.8. En base a esta ecuación se despeja la x donde:

y= es el valor 5 de PROBIT.

x= \log_{10} de la concentración del extracto.

5.10 Fraccionamiento de los extractos:

El o los extractos con mayor actividad se sometió a partición sucesiva por triplicado con n-hexano (2:1, 1:1, v n-hexano /v metanol), la parte insoluble en n-hexano se extrajo por triplicado con acetato de etilo (2:1, 1:1 v acetato de etilo /v metanol) y la parte insoluble en acetato de etilo se extrajo con n-butanol (1:4 v n-butanol/v metanol); todas las partes obtenidas se llevaron a sequedad y se realizó prueba de actividad biológica. La parte más activa se extrajo con cloroformo, se filtró y se llevaron a sequedad total, se realizó prueba de actividad biológica. La parte con mayor actividad antiprotozoaria se re-suspendió en metanol, se filtró y la parte soluble en metanol se extrajo con n-hexano (3:1 v n-hexano/v metanol) por 3 veces y la parte insoluble en metanol se extrajo en acetona, se filtró y todas las partes obtenidas se llevaron a sequedad, se corrió cromatografía en placa fina y se realizó prueba de actividad biológica.

A la fracción con mayor actividad se procedió a su caracterización por métodos químicos y métodos espectrométricos por HPLC acoplada a masas (Espectrometro TOFA-Orthogonal (masas) y se compararon los resultados de los datos obtenidos con la base de datos Mascot-blast espectrofotométrico (Molina-Salinas *et. al.*, 2008).

5.11 Citotoxicidad en células VERO

Se utilizó el método de recuento de células vivas integras por exclusión de azul tripano.

Células VERO (ATCC No. CCL-81. *Cercopithecus aethiops* (monkey, African green)

Estas líneas celulares crecen a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂ en medios MEM y RPMI completos adicionados con 1 mM de piruvato y 10% de suero fetal bovino.

Las líneas celulares obtenidas de ATCC se propagaron en cajas de poliestireno de 25 cm (Sigma C-6921) y con 4.5 mL de medio RPMI completo.

Se realizó pase a placa de 96 pozos de 4.0×10^5 células/pozo y se agregaron 100 μL de las muestras (en concentraciones de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 9.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$) disueltas en DMSO 5% v/v y se mantuvieron en iguales condiciones de suplementos e incubación por 48h, al cabo de este tiempo se realizó conteo del número de células viables, en cada caso se determinó la concentración citotóxica media CC_{50} . Como control negativo se utilizó cultivo celular sin adición de la muestra y como control positivo se utilizó DMSO al 10 %. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado (Gil R. *et al*, 2009).

5.12 Análisis estadístico

En cada experimento se obtuvieron el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes por triplicado. La CI_{50} se calculó por prueba de PROBIT en cada cepa (González-Garza, *et al*. 1989). Para el análisis se utilizó el paquete estadístico de ciencias sociales (SPSS, versión estándar 15.0) con 95% de confianza.

6. RESULTADOS

6.1 Rendimientos de los extractos metanólicos:

El peso inicial del material vegetal seco y molido fue de 150 g, en la siguiente tabla se muestran los rendimientos en porcentajes:

Tabla II

Rendimientos de los extractos metanólicos de las plantas seleccionadas:

Nombre de la planta	% de rendimiento
Epazote	8.66
Cola de caballo	4.69
Gobernadora	15
Tamarindo	13.31
Tomillo	12.15

La tabla II nos muestra que la gobernadora obtuvo el mayor rendimiento con 15%, seguida por el tamarindo con 13.31% y el tomillo con 12.15%.

6.2 Pruebas químicas colorimétricas de los extractos metanolicos de las plantas seleccionadas:

Tabla III.

Pruebas químicas de los extractos metanolicos de las plantas en estudio:

Prueba Química	Que detecta la prueba	Epazote	Cola de Caballo	Gobernadora	Tomillo	Tamarindo
Permanganato de potasio	Dobles enlaces	+	+	+	+	+
Lieberman-Buchard	Esteroles y triterpenos	-	-	+	+	-
Shinoda	Flavonoides	-	-	+	-	+
Cloruro férrico	Taninos o grupos fenólicos	-	-	+	+	-
Saponinas	Saponinas	-	-	-	-	-
Dinitrofenil-hidrazina	Gpos. Carbonilo	-	-	+	+	+
Cumarinas	Cumarinas	-	-	+	+	+
Dragendorf	Alcaloides	-	-	+	-	-
Bicarbonato de sodio	Gpos. Carboxilos	-	-	-	-	-
Baljet	Sesquiterpen-lactonas	-	+	+	-	+
Antrona	Carbohidratos	+	+	+	+	+

Se aplicaron 11 pruebas colorimetricas con el objetivo de tener un perfil de cada extracto, donde se determinó que:

La gobernadora fue positiva en 9 pruebas ; dobles enlaces, esteroles y triterpenos, flavonoides, taninos, grupos carbonilos, cumarinas, alcaloides, sequiterpenlactonas y carbohidratos, resultando negativa en 2 pruebas; para grupos carboxilos y saponinas.

El tomillo resultó positivo en 6 pruebas; dobles enlaces, esteroles y triterpenos, taninos, grupos carbonilos, cumarinas y carbohidratos, negativo en 5 pruebas; flavonoides, saponinas, alcaloides, grupos carboxilos y sequiterpenlactonas.

El tamarindo resultó positivo en 6 pruebas; dobles enlaces, flavonoides, grupos carbonilos, cumarinas, sequiterpenlactonas y carbohidratos, negativo en 5 pruebas; esteroles y triterpenos, taninos, saponinas, alcaloides y grupos carboxilos.

El epazote soloresulto positivo en 2 pruebas; dobles enlaces y carbohidratos, negativo en el resto.

La cola de caballo resulto positiva en tres pruebas; dobles enlaces, sequiterpenlactonas y carbohidratos, negativa en el resto

6.3 Parámetros de crecimiento de los protozoarios en estudio

6.3.1 Cinética de crecimiento de *E. histolytica*:

Se determinó matemáticamente por medio de regresión lineal en curvas de crecimiento de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* 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 protozoario.

La fig 13 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:

$$\text{Número de amibas/mL} = e^{0.020(\text{horas de cultivo})+3.816}$$

Correlación con la recta $r^2 = 0.938$

A partir de esta ecuación se determinó un tiempo de generación $\tau_g = 14.76$ h y un tiempo de duplicación $\tau_d = 21.30$ h

Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica*:

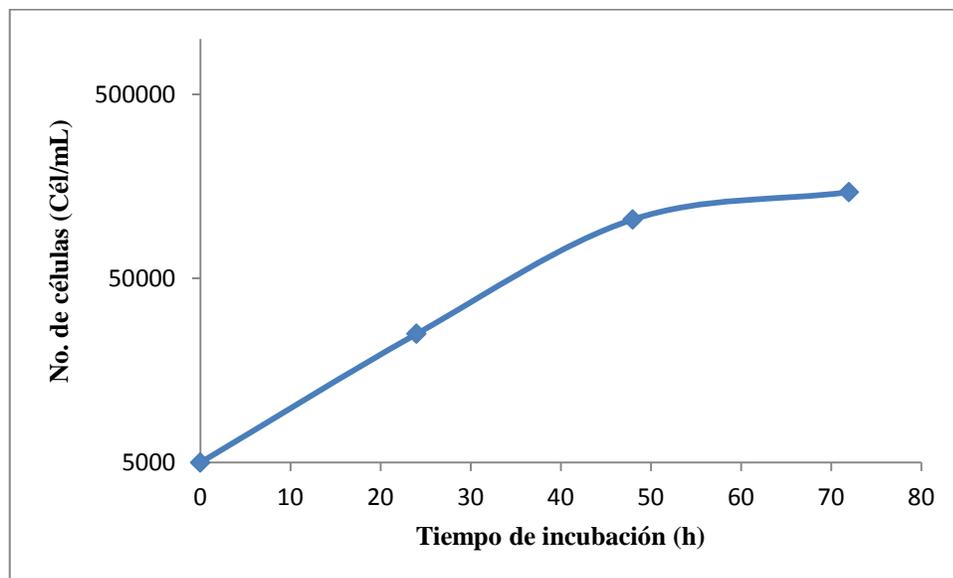


Fig 13 Relación temporal del crecimiento de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica*. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes en tres ensayos diferentes. El coeficiente de correlación con la recta ($r^2 = 0.93$; $P < 0.001$).

6.3.2 Cinética de crecimiento de *Giardia lamblia*:

La fig. 14 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:

$$\text{Número de trofozoítos/mL} = e^{0.724(\text{horas de incubación})+3.668}$$

Correlación con la recta $r^2 = 0.989$

A partir de esta ecuación se determinó un tiempo de generación $\tau_g = 9.086$ h tiempo de duplicación $\tau_d = 13.11$ h

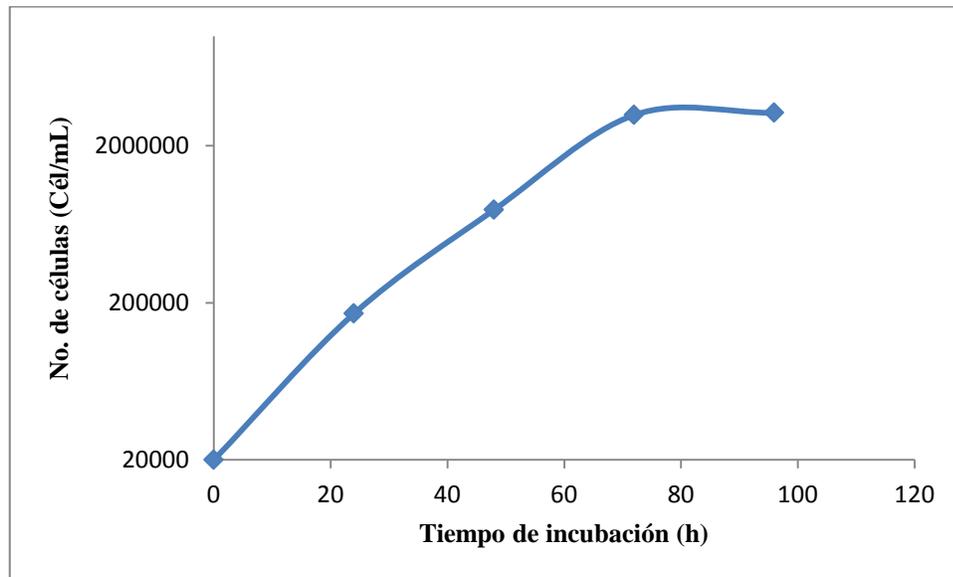


Fig. 14. Relación temporal del crecimiento de la cepa IMSS 0989 de *G. lamblia*. Cada punto corresponde a tres determinaciones independientes de tres experimentos diferentes. El coeficiente de correlación con la recta (r^2) = 0.989 $P < 0.001$.

6.3.3 Cinética de crecimiento de *Trichomonas vaginalis*:

La Fig 15 corresponde a una curva típica de crecimiento de la cepa GT-15 de *Trichomonas vaginalis*. De esta gráfica determinamos los parámetros de crecimiento que nos serviría para tener las condiciones óptimas en nuestro laboratorio. La función matemática que se obtuvo en la fase exponencial del crecimiento de los trofozoítos de *T. vaginalis* correspondió a la siguiente ecuación:

$$\text{Número de trofozoítos/mL} = e^{0.057(\text{horas de incubación})+3.614}$$

Encontramos que la correlación con la recta (r^2) = 0.989.

A partir de esta ecuación se determinó un tiempo de generación $\tau_g = 8.16$ h y un tiempo de duplicación $\tau_d = 11.77$ h

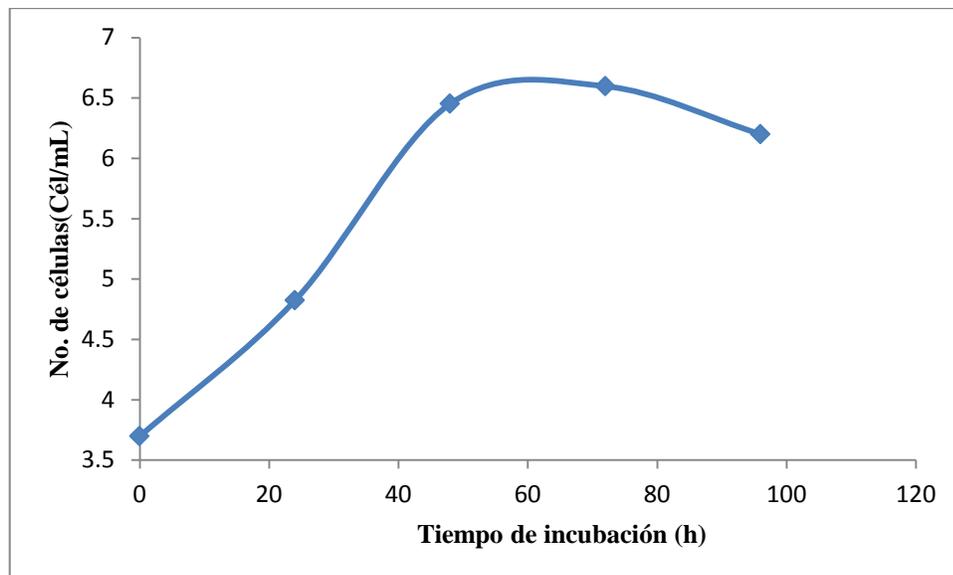


Fig. 15 Relación temporal del crecimiento de la cepa GT-15 de *T. vaginalis*.

Se inocularon por triplicado 5×10^3 trofozoítos por mililitro en tubos con 5.6 mL de medio PEHPS. Después de diferentes tiempos de incubación a 37 °C. Se determinó la densidad de los cultivos de cada tubo cada 24 h, donde se hizo una dilución de 1:10 con formalina para contar los trofozoítos. Después se determinó la densidad de los cultivos contando en un hemacitómetro. Cada punto corresponde a tres determinaciones en tres experimentos independientes.

Con estos resultados establecimos los parámetros como tamaño de inóculo y tiempo de incubación para cada uno de los parásitos en cada una de las pruebas biológicas.

Tabla IV

Tiempos de incubación y tamaño del inóculo

Protozario	Tiempo de incubación (h)	Inóculo (Cél/mL)
<i>Entamoeba histolytica</i>	72	20,000
<i>Giardia lamblia</i>	24	200,000
<i>Trichomonas vaginalis</i>	24	100,000

6.4 Determinación del CI50 del metronidazol sobre el crecimiento de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*:

Una vez obtenido los parámetros de crecimiento y las condiciones óptimas de cultivo de los protozoarios, determinamos la CI50 del metronidazol (control positivo), ya que este medicamento se usa por excelencia para tratar a estos parásitos. Para ello adaptamos el método de micro ensayo (Mata-Cárdena 2008).

Se encontró que las concentraciones crecientes de 0.05-0.5 µg/mL del metronidazol en los medios de cultivo, disminuyeron el crecimiento de los tres parásitos. Con el uso de la prueba estadística de Probit determinamos un CI50 para *E. histolytica* de 0.1716 ± 0.146 µg/mL, para *G. lamblia* de 0.205 ± 0.149 µg/mL y para *T. vaginalis* de $0.09 \mu\text{g/mL} \pm 0.105$.

6.5 Prueba de actividad biológica de los extractos metanólico de las plantas seleccionadas contra los tres parásitos en estudio.

Tabla V

Actividad de los extractos a una concentración inicial de 300 µg/mL contra los tres protozoarios expresado en porcentos de inhibición:

Extracto	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>
Epazote	0	21,71	18,81
Cola de caballo	14,35	0	0
Gobernadora	95,21	95,52	91,26
Tomillo	14,12	95,86	96,42
Tamarindo	3,55	10,37	69,55

En estos ensayos se determinó que la gobernadora tiene actividad contra los tres parásitos con 95.22, 95.52 y 91.26% de inhibición contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente.

El tomillo presentó actividad contra dos parásitos, 95.86 y 96.42% contra *G. lamblia* y *T. vaginalis*, respectivamente. Contra *E. histolytica* obtuvo baja actividad con 14.12% de inhibición.

El tamarindo presentó actividad relevante contra *T. vaginalis* con 69.56% de inhibición, contra los otros dos parásitos presentó baja actividad..

Tanto el epazote y la cola de caballo presentaron bajas o nulas actividades contra los tres parásitos.

Con estos resultados se decidió continuar trabajando con los extractos metanólicos de gobernadora y tomillo.

6.6. Determinación de CI_{50} de los extractos metanólicos más activos

Se determinaron los CI_{50} de los extractos que resultaron más activos que en este caso fueron los extractos metanólicos de gobernadora y tomillo, la concentración inicial fue de 300 $\mu\text{g/mL}$.

6.6.1 CI_{50} del extracto metanólico de gobernadora contra los tres parásitos

Tabla VI

CI_{50} del extracto metanólico de gobernadora

Protozooario	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
<i>E. histolytica</i>	90,38 \pm 2,19
<i>T. vaginalis</i>	130,57 \pm 2,09
<i>G. lamblia</i>	98,47 \pm 2,27

El CI_{50} del extracto metanólico de gobernadora contra *E. histolytica* y *G. lamblia* fue más bajo de 100 $\mu\text{g/mL}$., sin embargo contra *T. vaginalis* fue mayor de los 100 $\mu\text{g/mL}$.

6.6.2 Determinación de CI_{50} del extracto metanólico de tomillo contra *G. lamblia* y *T. vaginalis*

Tabla VII

CI₅₀ del extracto metanólico de tomillo

Protozooario	CI₅₀ μg/mL
<i>T. vaginalis</i>	115.47 ± 1,41
<i>G. lamblia</i>	86,41 ± 2,152

La tabla VII nos muestra que el CI₅₀ contra *G. lamblia* fue de 86.41 μg/mL y contra *T. vaginalis* fue arriba de los 100 μg/mL. Contra *E. histolytica* no se determinó el CI₅₀ por resultar con baja actividad biológica en la prueba preeliminar.

6.7 Fraccionamiento de los extractos más activos:

Una vez determinados los CI₅₀ de los extractos más activos que en este caso fue el extracto metanólico de gobernadora y el extracto metanólico de tomillo, se procedió a el fraccionamiento inicial de los mismos mediante particiones, se obtuvo lo siguiente:



Fig.16 Partición de los extractos.

6.7.1 Particiones del extracto metanólico de gobernadora

Tabla VIII

Rendimientos de las particiones del extracto metanólico de gobernadora

Extracto	Rendimiento %
hexánico	1.87
acetato de etilo	39.09
butanólico	10.33
metanólico	8.64

La tabla VIII nos muestra que la parte soluble en acetato de etilo obtuvo el mayor rendimiento con 39.09%, seguido por la parte soluble en n-butanol con 10.33%

6.7.2 Particiones del extracto metanólico de tomillo

Tabla IX

Rendimiento de las particiones del extracto metanólico de tomillo.

Extracto	Rendimiento %
hexánico	14.44
acetato de etilo	27.91
butanólico	9.02
metanólico	7.2

Igual que en gobernadora la parte soluble en acetato de etilo se obtuvo el mayor porcentaje de rendimiento con 27.91%, seguida por la parte soluble en hexano con 14.44%.

6.8 Determinación de la actividad biológica de las particiones de los extractos metanólicos de gobernadora y tomillo contra los tres parásitos.

6.8.1 Actividad biológica de las particiones de gobernadora

Tabla X

Actividad biológica de las particiones de gobernadora a una concentración inicial de 300µg/mL expresado en % de inhibición:

Extracto	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>
hexánico	0	20.79	12.77
acetato de etilo	96.34	87.61	98.35
butanólico	0	15.03	15.43
metanólico	11.61	20.79	12.28

Como se puede apreciar en la tablaX, la partesoluble en acetato de etilo presentó la mayor actividad biológica con 96.34, 87.61 y 98.35 % de inhibición de crecimiento contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente. Las otras particiones fueron menores al 50% de inhibición de crecimiento contra los tres parasitos.

6.8.2 Actividad biológica de las particiones de tomillo

Tabla XI

Actividad biológica de las particiones de tomillo a una concentración de 300 µg/mL expresado en % de inhibición:

Extracto	<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>
hexánico	0	9.15
acetato de etilo	97.06	97.37
butanólico	30.18	24.21
metanólico	22.77	14.66

Como se observa en la tabla XI la parte soluble en acetato de etilo presentó los mayores porcentajes de inhibición de crecimiento con 97.06 y 97.37% contra *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente. Las otras particiones fueron menores del 50% de inhibición de crecimiento.

Con los resultados obtenidos se tomó la decisión de continuar el fraccionamiento de las partes de acetato de etilo de las dos plantas (governadora y tomillo).

6.9 Fraccionamiento de la parte más activa:

Para continuar el proceso de fraccionamiento, se necesitó de mayor cantidad de material, se adquirió otro lote de gobernadora, el cual al obtener el extracto metanólico y hacer la prueba biológica correspondiente se perdió la actividad y ya no se continuó con el proceso para esta planta.

Se continuó el trabajo de fraccionamiento con la parte soluble en acetato de etilo del extracto metanólico de tomillo:

Se tomaron 7.52g de la parte obtenida con acetato de etilo y se disolvió con cloroformo caliente, se obtuvieron la parte soluble en cloroformo y la parte insoluble en cloroformo, se llevaron a sequedad total, se calcularon los porcentajes de rendimiento y se corrieron pruebas de actividad biológica respectivas.

TablaXII

Rendimientos y actividad biológica de las fracciones obtenidas con cloroformo caliente de la parte soluble en acetato de etilo del extracto metanólico de tomillo:

	Insoluble en cloroformo	Soluble en cloroformo
Rendimiento en %	38.56	61.43
% de inhibición		
<i>T. vaginalis</i>	96.87	5.32
<i>G. lamblia</i>	97.42	79

Como lo indica la tabla XII, la parte soluble en cloroformo obtuvo el mayor rendimiento con 61.43%, sin embargo la parte insoluble en cloroformo fue la más activa, con 96.87 y 97.42 % de inhibición de crecimiento contra *T. vaginalis* y *G. lamblia* respectivamente.

Esta parte insoluble en cloroformo se continuó particionando, se tomaron 2.9 g y se re-suspendió en MeOH caliente, se obtuvieron la parte soluble en metanol y la parte insoluble en metanol, la parte soluble en metanol, se extrajo con n-hexano 2:1 hexano: metanol/v (extracción líquido-líquido) varias veces. La parte insoluble del metanol se re-suspendió en acetona caliente, obteniendo una parte soluble en acetona e insoluble en acetona, todas las partes se llevaron a sequedad total, se midieron rendimientos y se realizaron las pruebas biológicas correspondientes.

Tabla XII

Rendimientos de las particiones obtenidas de las partes solubles e insolubles en metanol:

Extracto	Rendimiento %
Soluble en metanol	
soluble en metanol	69
soluble en hexano	21
Insoluble en metanol	
soluble en acetona	6
insoluble en acetona	4

La parte soluble en metanol obtuvo mayor rendimiento con 69%, seguida de la parte soluble en hexano con 21%, la parte soluble en acetona con 6% y 4% de la parte insoluble en acetona respectivamente.

Una vez obtenidos los porcentajes de rendimiento, la Fig. 17 corresponde a la cromatografía en placa fina de las partes extraídas para monitorear la pureza de las diferentes muestras.



Fig17 Cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos de las parte soluble e insoluble en metanol caliente, como eluente se uso un sistema benceno-acetona 8:2 v/v, de izquierda a derecha en el carril 1 parte soluble en metanol, en el carril 2 parte soluble en hexano y carril 3 parte soluble en acetona.

La Fig. 17, nos muestra en el carril 1 que es la parte soluble en MeOH presentó un $R_f = 0.707$; en el carril 2, parte soluble en hexano presentó un $R_f = 0.605$ en el carril 3, parte soluble en acetona presentó un $R_f = 0.606$.

El carril 1, que corresponde a la parte soluble en metanol, al compararlo con los carriles 2 y 3 que corresponden a las parte soluble en hexano y parte soluble en acetona respectivamente, presenta 4 manchas, la mancha del extremo superior presentó una coloración rojiza como la de los otros dos carriles, pero muy disminuida, por lo que se pudo corroborar que la extracción con hexano arrastro básicamente el total del compuesto en color rojizo, como se observa en este carril 2 es la única mancha, mostrando la pureza de la muestra, en el carril 3 que es la parte soluble en acetona se observa de manera muy oscura debido a que se aplicó calor para el revelado y no se controló el tiempo de exposición, quemando un poco el cromatograma, pero se observó igual a la del carril 2, con una sola mancha rojiza, por lo que se tomó la decisión de juntar las parte soluble en hexano y parte soluble en acetona, cabe mencionar que la

parte insoluble en acetona no se corrió cromatografía en placa fina debido a un rendimiento insuficiente y se reservó solo para prueba biológica.

6.10 Prueba de actividad biológica de las diferentes partes obtenidas.

Tabla XIII

Actividad biológica de los extractos obtenidos de las partes soluble e insoluble en metanol expresados en % de inhibición a una concentración de 300 µg/mL:

Extracto	<i>T. vaginalis</i>	<i>G. lamblia</i>
Parte soluble en metanol	76.76	78.28
Mezcla de parte soluble en hexano + parte soluble en acetona.	99	96.16
parte insoluble en Acetona	≤ 50	≤ 50

En la tabla XIII, se observa que tanto la parte soluble en metanol como la mezcla de la parte soluble en hexano+ la parte soluble en acetona tienen actividad relevante, mayor al 50% de inhibición de crecimiento, sin embargo, la mezcla de la parte soluble en hexano + parte soluble en acetona presenta mayor porcentaje de inhibición de crecimiento y cromatográficamente son las que se observan con mayor pureza, por lo que se decidió continuar trabajando con esta parte.

De aquí en adelante a la mezcla de estas dos partes: la parte soluble en hexano + la parte soluble en acetona le llamaremos: psh/psa

A la mezcla de parte soluble en hexano +soluble en acetona (psh/psa), se le realizó la prueba colorimétrica de Liebermann-Burchard, que resultó positiva para triterpenos.

6.11 Identificación del o los compuestos contenidos en la muestra de psh/psa mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas:

Cromatografía de gases y espectrometría de masas.

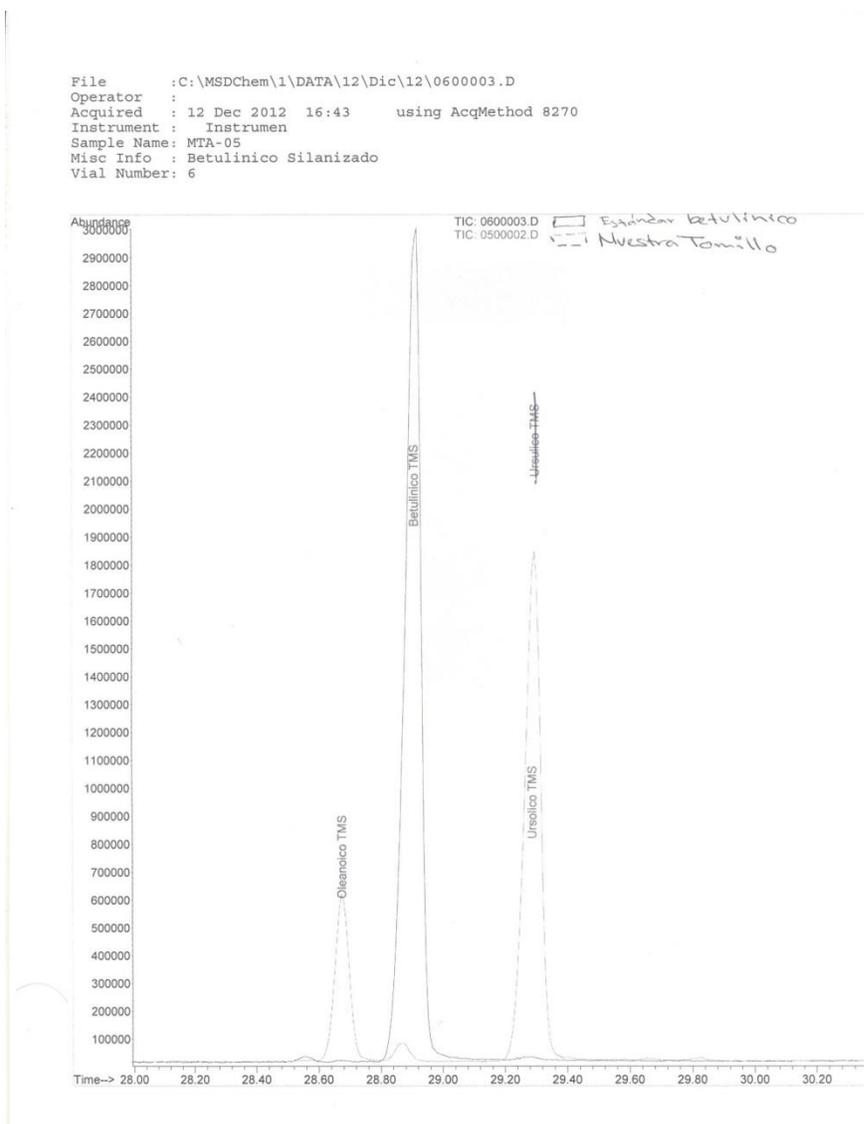


Fig. 18 Cromatografía de *Thymus vulgaris* y estándar de ácido betulínico

En esta cromatografía se corrió como control el ácido betulínico como estándar con tiempo de retención de 28.87 seg. Con esta curva se establecieron los tiempos de retención para la identificación de los compuestos contenidos en la muestra de psh/psa: se identificaron como una mezcla de triterpenos pentacíclicos de ácido oleanoico tiempo de retención de 28.68 seg y ácido ursólico tiempo de retención de 29.30 seg.

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Dic\12\0500002.D
Operator :
Acquired : 12 Dec 2012 15:55 using AcqMethod 8270
Instrument : Instrumen
Sample Name: MTA-04
Misc Info : Tomillo Silanizado
Vial Number: 5

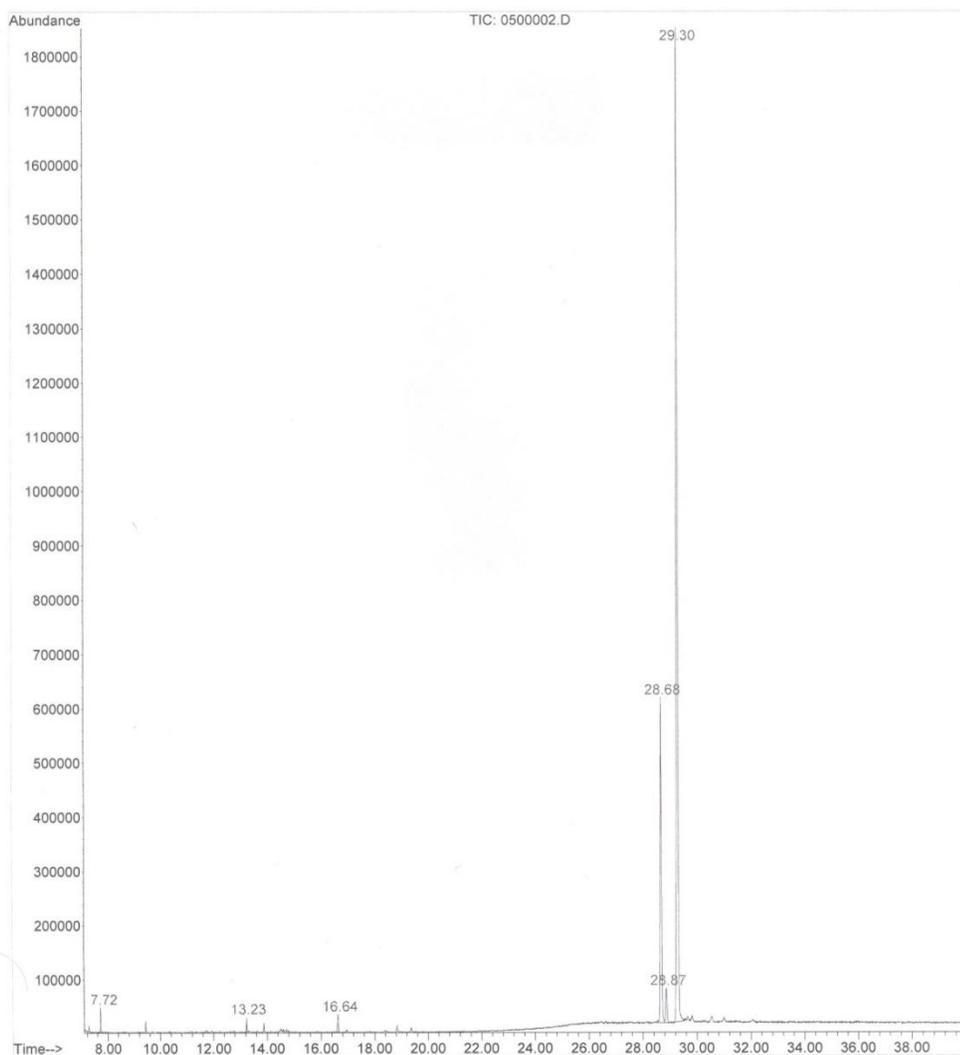


Fig.19 Cromatografía de muestrade psh/psa de *Thymus vulgaris*

En la cromatografía se observa que el pico más intenso corresponde al ácido ursólico, seguido de ácido oleanólico y en forma disminuida la señal del ácido betulínico.

En este cromatograma se puede establecer que el ácido ursólico se encuentra en mayor concentración seguido del ácido oleanólico y en forma disminuida el ácido betulínico en la muestra obtenida de *Thymus vulgaris*.

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Dic\12\0500002.D
Operator :
Acquired : 12 Dec 2012 15:55 using AcqMethod 8270
Instrument : Instrumen
Sample Name: MTA-04
Misc Info : Tomillo Silanizado
Vial Number: 5

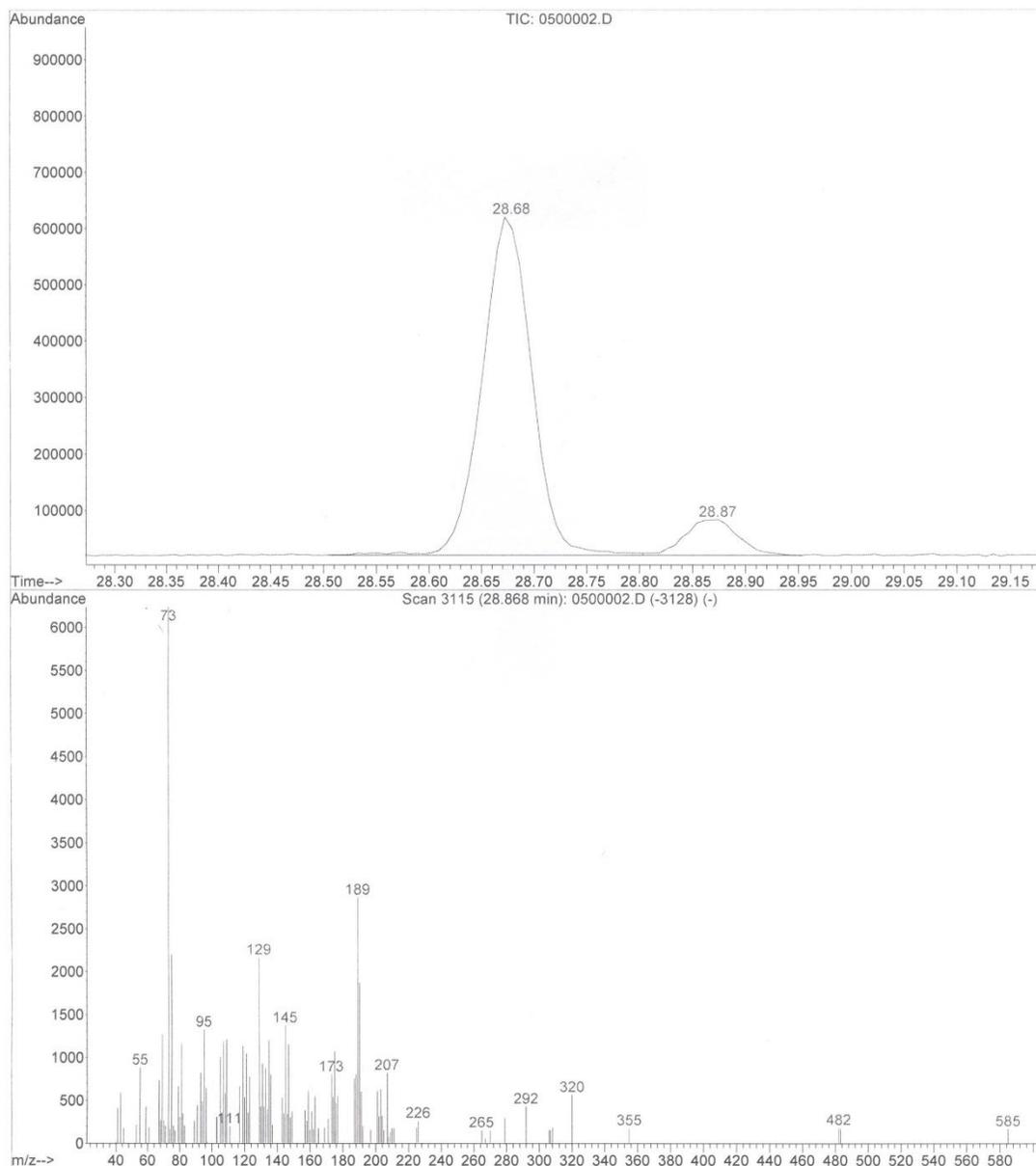


Fig 20 Cromatografía y espectrometría de masas de muestra de psh/psa de *Thymus vulgaris*.

En este cromatograma se amplifican y se observan las dos señales de ácido oleanólico y de ácido betulínico, el espectro no está bien definido por lo que se repitió el ensayo.

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Dic\12\0500002.D
Operator :
Acquired : 12 Dec 2012 15:55 using AcqMethod 8270
Instrument : Instrumen
Sample Name: MTA-04
Misc Info : Tomillo Silanizado
Vial Number: 5

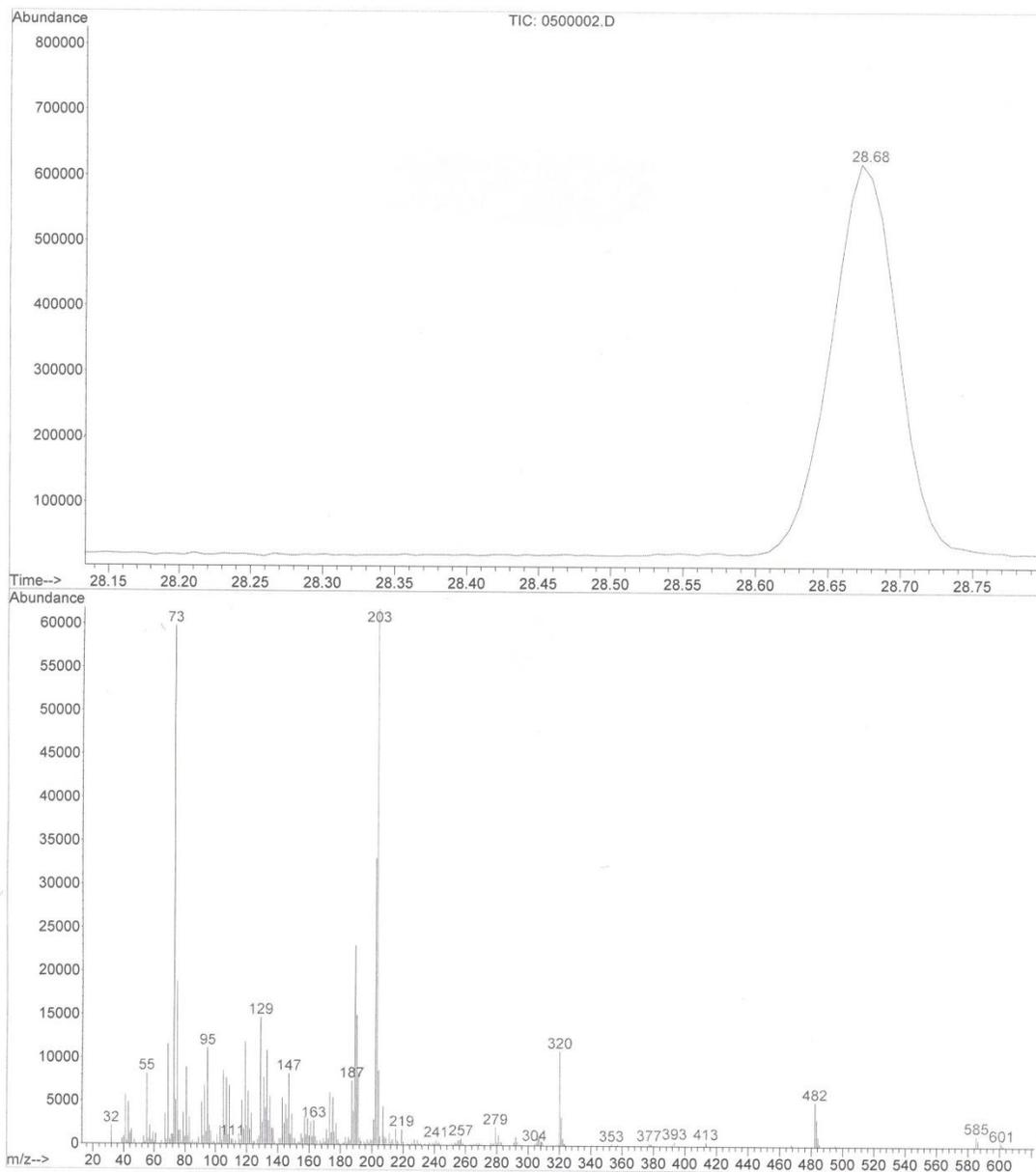


Fig 21 Cromatografía y espectro de masas de psh/psa de *Thymus vulgaris*.

Cromatografía y espectro de masas, donde se amplifica la señal del ácido oleanólico, en el espectro de ácido oleanólico, con pico base de 203 m/z y ion molecular de 585 m/z.

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\12\Dic\12\0600003.D
Operator :
Acquired : 12 Dec 2012 15:55 using AcqMethod 8270
Instrument : Instrumen
Sample Name: MTA-04
Misc Info : Tomillo Silanizado
Vial Number: 5

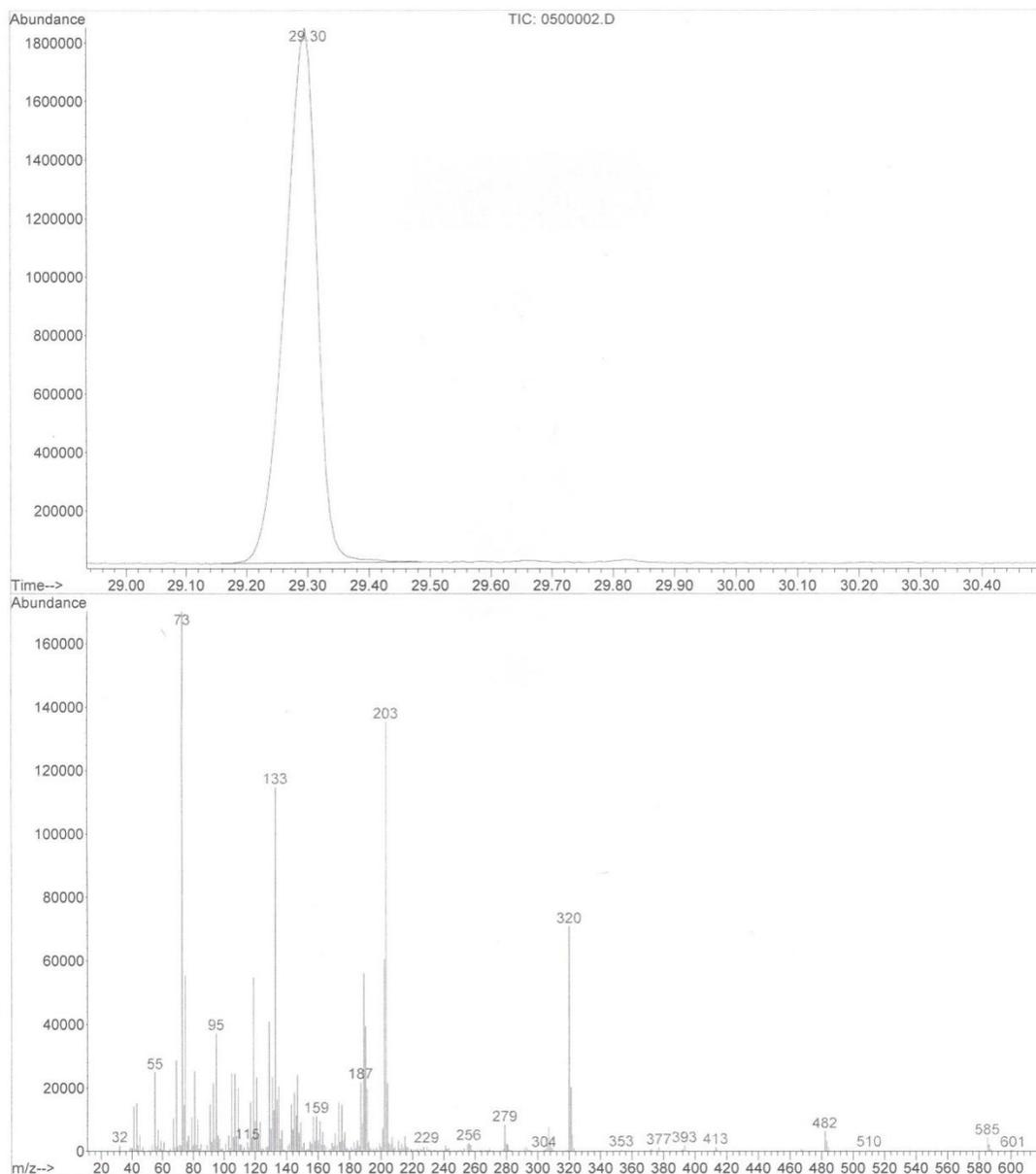
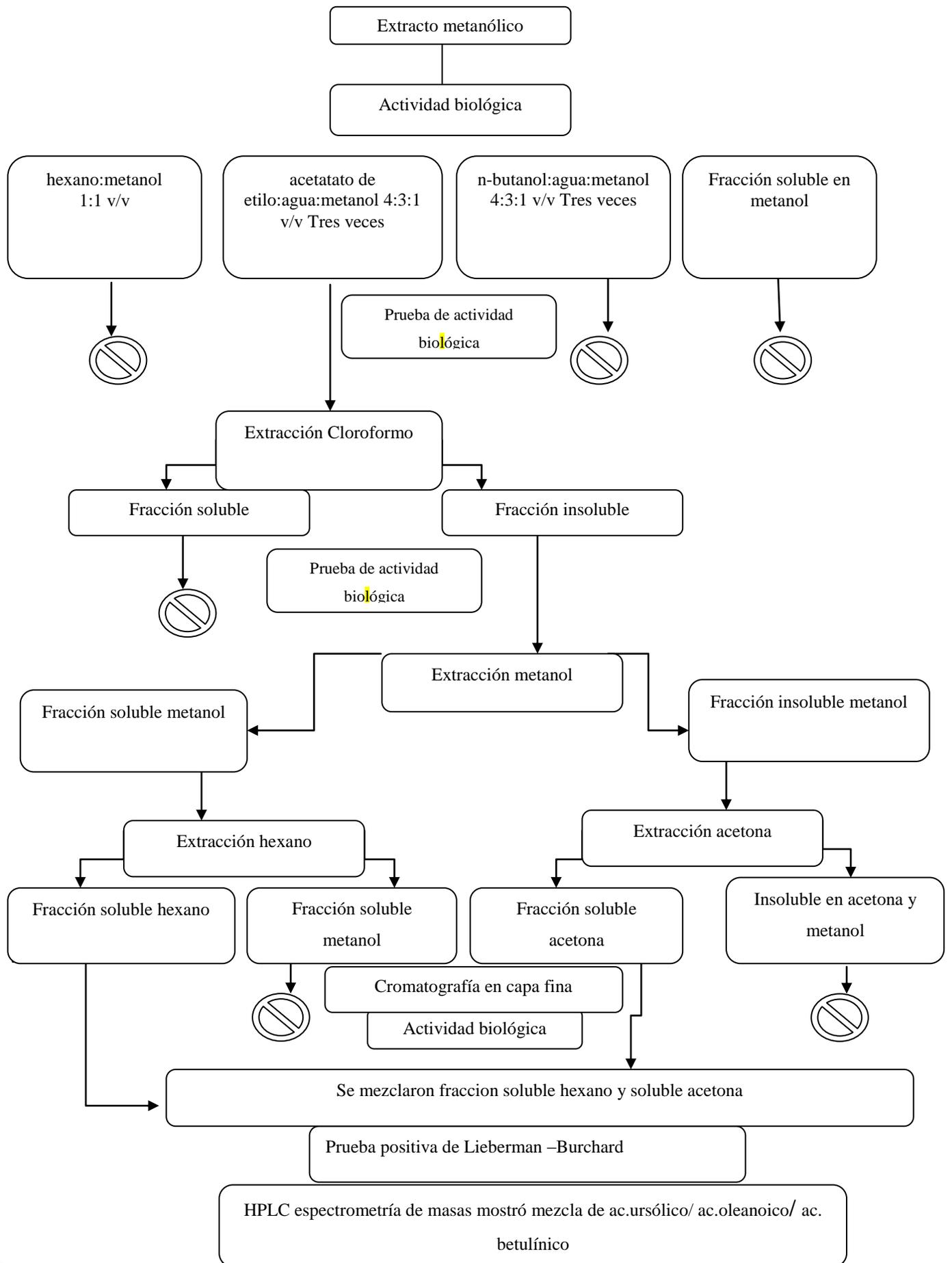


Fig 22 Cromatografía y espectro de masas de psh/psa con señales amplificadas para ácido ursólico.

Cromatografía y espectro de masas, donde se amplifica la señal del ácido ursólico, el espectro con pico base de 73 m/z y un ion molecular de 585 m/z.

El ácido oleanólico y el ácido ursólico comparten el mismo ion molecular diferenciándose por el pico base.

En la Fig. 23 se muestra un diagrama de flujo del proceso hasta la identificación de la mezcla de compuestos triterpénicos pentacíclicos mediante métodos directos (particiones).



 : Actividad biológica baja

Fig. 23 Diagrama de flujo del ensayo

6.12 Comparación cromatografica de la muestra del extracto metanólico de tomillo, mezcla de psh/psa y estándar de acido ursólico.



Fig. 24 Cromatografía en capa fina del extracto metanólico crudo del tomillo, de la mezcla de psh/psa y ácido ursólico comercial, se usó como eluyente un sistema de benceno-acetona 9:1 v/v. En el carril 1 extracto metanólico crudo de tomillo, carril 2 mezcla de parte soluble en hexano + soluble en acetona del extracto, carril 3 ácido ursólico comercial.

En la Fig. 24, el extracto metanólico crudo de tomillo muestra un $R_f = 0.64$ hasta la mancha roja, en la mezcla de parte soluble en hexano + soluble en acetona (psh/psa) del extracto metanólico de tomillo, se obtuvo un $R_f = 0.64$ y en la muestra de ácido ursólico comercial con un $R_f = 0.64$ (en el carril 3 se observa la mancha muy extendida debido a que se aplicó mucha muestra). Esta cromatografía se desarrolló con el objetivo

de comparar el Rf de la mancha rojiza de las tres muestras y reafirmar la identificación ya obtenida, el Rf obtenido de los tres carriles es del mismo valor

6.13 Comparación de los CI₅₀ de las muestras de extracto metanólico de tomillo, psh/psa y estándar de ácido ursólico.

Tabla XIV

Tabla comparativa de los CI₅₀ del extracto metanólico crudo, de la mezcla psh/psa y el ácido ursólico comercial.

Parásito	CI ₅₀ µg/mL		
	Extracto crudo	Mezcla de psh/psa	Ac. ursólico comercial
<i>G. lamblia</i>	86.41 ± 2.15	41.68±4.24	8.122 ±2.19
<i>T. vaginalis</i>	115.47 ± 1.41	75.93 ± 2.29	5.01± 1.48

En la tabla XIV se presentan los CI₅₀del extracto crudo, la mezcla de psh/psa y ácido ursólico comercial. Se observa que el CI₅₀ fue bajando conforme hay más pureza en la muestra, en el caso de *G. lamblia* el valor de la mezcla de psh/psa disminuye el valor 2.03 veces con respecto al extracto metanólico crudo y el valor del ácido ursólico disminuye 10.63 y 5.13 veces con respecto al extracto crudo y a la mezcla de psh/psa respectivamente.

En el caso de *T. vaginalis* el valor de la mezcla de psh/psa disminuye 1.52 veces con respecto al extracto metanólico crudo y el valor del ácido ursólico disminuye 23.04 y 15 15 veces con respecto al extracto crudo y a la mezcla de psh/psa respectivamente.

No se determinó CI_{50} del ácido betulínico por que en prueba preliminar obtuvo actividad biológica no significativa.

6.14 Pruebas de citotoxicidad en células VERO ATCC No. CCL-81. *Cercopithecus aethiops* (monkey, African green):

Tabla XV

Pruebas de citotoxicidad con células VERO del extracto metanólico crudo de tomillo, mezcla de psh/psa de tomillo y de estándares comerciales de ácido ursólico y ácido betulínico

Muestra	CC_{50} µg/mL
Extracto metanólico crudo de tomillo	260.46 ± 5.34
Mezcla de psh/psa de tomillo	260.74 ± 3.16
ácido ursólico comercial	$\geq a 300$
ácido betulínico comercial	$\geq a 300$

En la tabla XV se observa que el extracto metanólico crudo y las particiones obtenidas de tomillo tienen un grado de citotoxicidad bajo y los compuestos comerciales de ácido ursólico y ácido betulínico presentaron grados de citotoxicidad por arriba de la concentración inicial.

7. DISCUSIÓN

El término productos naturales es quizás un término mal utilizado, ya que hablando de moléculas biológicas, todas son productos naturales, sin embargo, se ha reservado para referirse a metabolitos secundarios, los cuales son moléculas producidas por el organismo, que no son de primer orden en el metabolismo, unos son producidos como desechos, mecanismos de defensa, o como moléculas reguladoras etc. (Cannell, 1998).

Las estrategias para la investigación en el área de productos naturales han evolucionado significativamente en las últimas décadas, por lo que se han dividido en dos categorías:

1 Estrategias antiguas:

- A) El enfoque es la química de los compuestos de fuentes naturales, más no su actividad
- B) Separación sencilla e identificación de compuestos, seguido de su actividad biológica en el organismo (*in vivo*).
- C) Investigación quimiotaxonómica
- D) Selección de organismos basados primariamente en información etnofarmacológica, reputación folklórica, o usos tradicionales.

2 Estrategias modernas:

- A) Ensayos bio-dirigidos (*in vitro*) aislamiento e identificación del compuesto activo principal de fuentes naturales.
- B) Producción de librerías (o bibliotecas?) de productos naturales
- C) Producción de compuestos activos en células o cultivos de tejidos, manipulación genética, química combinatoria natural.
- D) El enfoque mayoritariamente hacia la bioactividad
- E) Introducción de los conceptos de replicación, huellas químicas y metabolómica.
- F) Selección de organismos basado en información etnofarmacológica, reputación farmacológica, usos tradicionales y también selección al azar (Sarker 2006).

Se espera que los productos naturales jueguen un rol importante como una de las fuentes de drogas en años venideros por:

- 1) Su incomparable diversidad estructural.
- 2) Sus dimensiones relativamente pequeñas.
- 3) Sus propiedades muy similares a las drogas como lo son su fácil absorción y su habilidad de ser metabolizados.

Tomando en consideración que las plantas contienen miles de constituyentes, el proceso de extracción, separación y purificación, puede ser largo y tedioso. El aislamiento en productos naturales combina varias técnicas las cuales dependen de la solubilidad, volatilidad y estabilidad de los compuestos a separar. El escoger entre las diferentes metodologías de separación es de gran importancia (Sticher 2008).

Cada separación, fraccionamiento o purificación en química de productos naturales es diferente y las metodologías no son como una receta de cocina que se siguen paso a paso (Cannell, 1998).

El enfoque del presente trabajo se puede catalogar como moderno, ya que se implementó de forma biodirigida, en el cual se buscaron los compuestos biológicamente activos, previos a información etnobotánica de las fuentes naturales que en este caso fueron 5 plantas., continuando con una metodología de extracción, de bioensayo, de fraccionamiento, de aislamiento y de identificación.

El *Chenopodium ambrosioides* o epazote, es de uso tradicional para varias afecciones tales como antihelmíntico, vermífugo, emenagogo, abortifaciente, es usado como tratamiento de problemas digestivos, respiratorios, desordenes vasculares y contra la diabetes (Dembitsky et al., 2008).

C. ambrosioides es una planta que se encuentra comúnmente en los hogares como remedio a un gran número de enfermedades, así como ingrediente culinario (Gomez-Castellanos 2008).

:

En estudios de la medicina tradicional de Veracruz, se ha encontrado que la cocción de la planta *E. hyemale* es usada para tratar padecimientos del aparato digestivo como gastritis, úlceras, dolor e inflamación del estómago; inclusive se bebe cuando hay flujo hemorroidal o contra el cansancio.

Se ha reportado que esta planta es tóxica; entre los síntomas que se le atribuyen está la pérdida de condición física, afectaciones en el ritmo del pulso, el cual se torna débil y rápido, así como decaimiento (Gallardo-Pérez *et al.*, 2006).

Los metabolitos secundarios de la resina de *Larrea tridentata* (entre los que destacan fenoles, lignanos y flavonoides), son defensas bioquímicas para repeler la agresión de animales herbívoros, hongos y otros microorganismos, ya que no se conocen plagas, enfermedades o animales que ataquen esta planta. Numerosos estudios han demostrado que los extractos de gobernadora tienen acción antifúngica bajo condiciones *in vitro* en al menos 17 hongos fitopatógenos de importancia económica.

Por otro lado, bioensayos con microorganismos que atacan a humanos han indicado que más de 45 bacterias son susceptibles a la resina de *L. tridentata* o sus constituyentes, así como levaduras y hongos.

El efecto antiviral de la gobernadora también se ha documentado, indicando que los flavonoides de la resina son activos contra virus que afectan el RNA (Lira-Saldívar, 2003; Arteaga *et al.*, 2005)

Para *Tamarindus indica* se ha reportado en África su uso en el tratamiento de heridas, dolores abdominales seguidas por diarrea, infecciones por helmintos, fiebre, malaria, problemas respiratorios y disentería (Havinga *et al.*, 2010).

Numerosos estudios han reportado que *Thymus vulgaris* tiene propiedades nutricionales y farmacológicas (Cañigueral y Vanaclocha 2000). Se ha citado en publicaciones previas que los componentes del aceite esencial como el thymol y el carvacrol son responsables de propiedades analgésicas, antioxidantes, antiespasmódicas, repelentes de insectos, anti fúngicas y antimicrobianas (Oluwatosin *et al* 2013).

Se extrajo por maceración con metanol en frío, ya que se ha demostrado que los extractos de plantas obtenidos mediante este solvente, muestran actividad antimicrobiana, además, de que algunas actividades se pierden por aplicación de calor (caso de Soxhlet) y que estas actividades se preservan en solventes polares y medianamente polares (Ríos y Recio, 2005).

Decidimos evaluar el extracto a 300 µg/mL que es una concentración aceptable ya que algunos investigadores consideran inactivos a los extractos con valores mayores de 1000 µg/mL (Ríos y Recio, 2005), y que los que resultan con un CI_{50} alrededor de 100 µg/mL podrían ser candidatos para realizar fraccionamiento biodirigido, buscando compuestos hidrofílicos mediante el uso de solventes polares, como grupo hidroxilos y aminos mayoritariamente polares (Touchstone, 1992., Cannell, 1998).

Para el metronidazol determinamos un $CI_{50} = 0,1716 \mu\text{g/mL} \pm 0,146 \mu\text{g/mL}$ contra *E. histolytica* y encontramos que es un valor variable con respecto a otros autores que reportan CI_{50} de 0,1441 µg/mL, (Quiñones-Gutiérrez 2013), 0.0846 µg/mL (Leos-Rivas 2013) y 0.04 µg/mL con un límite de confianza = (0.103–0.029 µg/mL) reportado por Calzada en el 2006

Calzada y colaboradores reportan un CI_{50} de metronidazol de 0.21 (0.27–0.14) contra *G. lamblia* que coincide con el valor que determinamos de 0.205 µg/mL \pm 0.149 µg/mL.

Calzada y colaboradores en el 2007 reportan un CI_{50} del metronidazol de 0.037 µg/mL, contra *T. vaginalis* que varía un poco con respecto a lo determinado, que fue de 0.09 µg/mL \pm 0.105.

En cuanto a los rendimientos de los extractos de las diferentes plantas encontramos que Calzada y colaboradores en el 2006 reportan rendimientos de 10.7% para extractos metanólicos de *Chenopodium ambrosioides*, y 9.4% para *Thymus*

vulgaris variando un poco con los porcentajes que obtuvimos 8.66%, 12.15% respectivamente.

Para la cola de caballo, Huacuja-Ruiz y colaboradores reportan un 16.72% de rendimiento para extracto hidroalcohólico de *Equisetum hyemale* nosotros obtuvimos un 4.69%, en extracto metanólico que representa 3.56 veces menos rendimiento que el de ellos. Hay que aclarar que ellos usaron una mezcla de solventes (Etanol + agua) diferente al que usamos en el proyecto (metanol), por lo tanto los extractos son diferentes.

Moreno-Limón y colaboradores en el 2011 reportan 10.66% de rendimiento para un extracto metanólico de gobernadora contra un 15% que obtuvimos, la diferencia se puede deber a que primero utilizaron solventes con polaridad creciente y en el caso de este trabajo, fue directo.

Para *Tamarindus indica* Doughari en el 2006 reportó 17% de rendimiento para un extracto crudo etanólico, comparativamente mayor con el extracto metanólico ya que obtuvimos un 13.31%.

Como puede observarse existe una variabilidad en cuanto a los porcentajes de rendimiento obtenidos con respecto a los reportados por otros autores, esto puede ser debido a las diferentes técnicas utilizadas por los investigadores, ya que unos agotan la extracción (polaridad creciente), otros usan el Soxhlet en el cual hay presencia de calor y otros tal vez dejen más tiempo en presencia del solvente, otras veces puede deberse al origen del material vegetal como el clima, suelo, altitud, si el material se usa fresco o seco, también se puede deber al equipo, ya que normalmente el material seco se muele, si las partículas obtenidas no son suficientemente finas el área de exposición se reduce (Daset al., 2010).

En cuanto la actividad biológica determinada en este trabajo para todos los extractos, encontramos datos muy variados, en el caso de Calzada y colaboradores

reportan para extracto metanólico de *Chenopodium ambrosioides* un CI_{50} de 45.2 (45.4–45.1) $\mu\text{g/mL}$ contra *E. histolytica* y 106.5 (106.6–106.4) $\mu\text{g/mL}$ contra *G. lamblia* en nuestro caso no encontramos actividad significativa contra los tres parásitos a una concentración inicial de 300 $\mu\text{g/mL}$.

Gheno-Heredia y colaboradores en el 2011, reportan para la *Equisetum hyemale* usos contra malestares renales y hepáticos en el Estado de Veracruz. No hay reportes científicos de actividad antibiótica de esta planta, nosotros encontramos actividad baja o nula contra los tres parásitos.

Calzado-Flores y colaboradores en 1995 reportan actividad del ácido nordihidroguaiarético obtenido de *Larrea tridentata* sobre *Entamoeba invadens* y *Entamoeba histolytica*, el extracto metanólico obtenido, mostró actividad con CI_{50} de 90.38 \pm 2.19, 98.47 \pm 2.27, 130.57 \pm 2.18, contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *Trichomonas vaginalis* respectivamente.

Calzada y colaboradores reportan un CI_{50} para extracto metanólico de *Thymus vulgaris* de 90.9 (91.3–90.7) $\mu\text{g/mL}$ contra *E. histolytica* y 68.7 (68.3–68.2) $\mu\text{g/mL}$ contra *G. lamblia*, y nosotros encontramos baja actividad o no significativa contra *E. histolytica* se determinó un CI_{50} más alto: 86,41 \pm 2,152 $\mu\text{g/mL}$ contra *G. lamblia*.

Se ha reportado que el aceite esencial de *Thymus zizis* subesp *sylvestris* (mayoritariamente compuesto de timol y carvacrol) tiene un CI_{50} de 185 $\mu\text{g/mL}$ contra *Giardia lamblia*, (Machado et al, 2010), mientras en nuestro caso el extracto metanólico de *Thymus vulgaris* presentó un CI_{50} de 86.41 $\mu\text{g/mL}$ contra el mismo parásito, que es más bajo (\leq de 100 $\mu\text{g/mL}$) que el determinado con el aceite esencial.

En prueba de actividad biológica del extracto metanólico de tomillo consideramos que el porcentaje de inhibición obtenido contra *E. histolytica* fue considerablemente bajo con 14.12%, sin embargo, Behnia y col. reportan actividad biológica positiva en un extracto hidroalcohólico de *Thymus vulgaris* con un CI_{50} de 4

mg/mL (4,000 µg/mL) (Behnia et al, 2008). Podemos apreciar que el criterio para considerar la actividad biológica de un extracto de plantas u otros organismos, es muy variable, por lo tanto nos apegamos al criterio descrito por Calzada y colaboradores (2006).

Identificamos que la mezcla de psh/psa como una mezcla de ácidos oleanoico/ursólico/betulínico mediante CG-MS, cotejando los espectros de masas obtenidos con la biblioteca de espectros del equipo, coincidiendo los cromatogramas y espectro de masas con lo encontrado por Sáenz-Esqueda y col. en *Carya illinoensis* (Sáenz-Esqueda *et al*, 2012)

Se ha reportado el aislamiento de una mezcla de ácidos oleanoico/ursólico con actividad anti-tuberculosis, obtenidos de extracto metanólico de tomillo, fraccionando mediante cromatografía en columna (Jiménez *et al*, 2006) en este trabajo se pudo identificar una mezcla de ácidos oleánoico/ursólico/betulínico mediante métodos directos (particiones).

Rocha y colaboradores en el 2012 aislaron de extractos acuosos de las plantas *Quillaja sp*, *Passiflora sp*, e *Ilex sp* originarias de Brasil 6 saponinas (publicadas como clave de las fracciones obtenidas) y que muestran en sus moléculas triterpenos parecidos a los ácidos oleanólico y ursólico, y en pruebas de actividad biológica mostraron más de 90% de inhibición contra el crecimiento *in vitro* de *Trichomonas vaginalis*, en el extracto metanólico de tomillo encontramos 96.42% y en la mezcla de ácidos oleanólico, ursólico y betulínico encontramos 99 % de inhibición contra el mismo parásito concidiendo en cuanto a los porcentajes y confirmando que los triterpenos pentacíclicos muestran actividad contra el crecimiento *in vitro* de *Trichomonas vaginalis*.

Silva y colaboradores en el 2012 probaron un extracto hexánico de *Maytenus gonoclada* Mart. que es una planta brasileña, contra *G. lamblia*, con un CI₉₀ de 9.28 ± 0.03 µg/mL y probaron 5 triterpenos pentacíclicos aislados del extracto hexánico: [1] el

3-oxofriedelano; 2) 3 β -hydroxifriedelano; 3) 3,11- dioxofriedelano; 4) 3,16-dioxofriedelano y el 5) 3-oxo-12 α -hydroxyfriedelano] los cuales no fueron activos en su forma pura. Nuestra mezclade psh/psa identificados como mezcla de ácido oleoico, ácido ursólico y ácido betulínico aislados de *Thymus vulgaris* que son triterpenos pentacíclicos, resultaron con un CI₅₀ de 41.68 \pm 4.24 μ g/mL y el ácido ursólico en su forma pura, obtuvo un CI₅₀ de 8.122 \pm 2.19 μ g/mL lo cual nos muestra que su extracto hexánico que ellos obtuvieron tenía una sinergia de compuestos y en nuestro caso la forma pura presentó mejor actividad que en la forma de mezcla (Jaki et al., 2008)

Innocente y colaboradores en Agosto del 2014 publicaron que probaron actividad anti-tricomonas de derivados semisintéticos de ácido betulínico y ácido ursólico, ellos encontraron que los derivados del ácido betulínico tiene mayor actividad que los derivados del ácido ursólico, con un valor de MIC de 91.12 μ M, en nuestro caso encontramos que el ácido ursólico comercial tiene mayor actividad que el ácido betulínico. Hay que aclarar que ellos usaron como base las estructuras de los ácidos ya mencionados, nosotros utilizamos las moléculas puras comerciales para confirmar la actividad de estas mismas como tal.

8. CONCLUSIONES

Larrea tridentata mostró el rendimiento más alto con 15% seguido por *Tamarindus indica* y *Thymus vulgaris* con 13.31 y 12.15% respectivamente.

Los extractos crudos de *Larrea tridentata* presentaron actividad inhibitoria contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* con 95.22, 95.52 y 91.26 % respectivamente. *T. indica* presentó actividad contra *T. vaginalis* con 69.55 % y *T. vulgaris* presentó actividad contra *G. lamblia* y *T. vaginalis* con 95.86 y 96.42 % respectivamente.

La CI_{50} del extracto metanólico crudo de *L. tridentata* fue de 90.38, 98.32 y 130.35 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente.

La CI_{50} del extracto metanólico crudo de *T. vulgaris* fue de 86.41 y 115.47 $\mu\text{g/mL}$ contra *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente.

La parte activa del extracto metanólico de tomillo fue fraccionada mediante particiones y se identificó mediante espectrometría de masas como una mezcla de ac. oleanólico, ac. ursólico y ac. betulínico con un CI_{50} de 41.68 y 75.93 $\mu\text{g/mL}$ contra *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente.

Los estándares comerciales de ácido ursólico presentó una CI_{50} de 8.12 $\mu\text{g/mL}$ y 5.51 $\mu\text{g/mL}$, contra *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente y el ac. betulínico mostró una actividad baja o nula contra los dos protozoarios antes mencionados.

El extracto metanólico crudo de tomillo, la mezcla de ácido oleanólico, ácido ursólico y el ácido betulínico; así como los estándares comerciales de ácido ursólico y ácido betulínico no presentaron citotoxicidad sobre las células normales. VERO

LITERATURA CITADA

Abukakar M.G., Yerima M.B., Zahriya A. G. and, Ukwuani AN., 2010. Acute toxicity and antifungal studies of ethanolic leaves, stem and pulp extract of *Tamarindus indica*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. RJPBCS 1(4) pp. 104-111

Adam R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Review, 14:447-475.

Ahmed-Hassan L.E., Waleed S. Koko W. S., Osman E.B.E., Dahab M. M., and Sirat H.M., 2011. *In vitro* anti-giardial activity of *Citrullus lanatus* Var. *citroides* extracts and cucurbitacins isolated compounds. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(15), pp. 3338-3346

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.

Alderete JF, Benchimolb M, Lehkera MW, □ Croucha ML, 2002. Mini review. The complex fibronectin-*Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomoniasis. Parasitology International 51: 285-292.

Ali V y Nozaki T. 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing.-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondrial” protozoan parasites. *Clinical Microbiology Review*, 20:164-187.

Amole, O.O., and Izegbu, M.C., 2004. Chronic toxicity of *Chenopodium ambrosioides* in rats. *Biomedical Reserch* 16(2):111-113.

Anthony J. P., Fyfe L., and Smith H., 2005. Plant active components – a resource for antiparasitic agents *Review Trends in Parasitology* Vol.21 No.10.

Anthony J.P, Fyfe L, Stewart D. and Mcdougall G.J., 2011. Differential effectiveness of berry polyphenols as anti-giardial agents. *Parasitology*, 138, 1110–1116

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): pp. 295-597.

Arteaga, S., Carmona, A. Andrade-Cetto, A., Cárdenas, R. 2005. Effects of *Larrea tridentata* (Creosote bush) on cholesterol gallstones and bile secretion in hamster. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 57: 1-7.

Arteaga, S.; Andrade-Cetto, A.; Cárdenas R. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote Bush), an abundant plant of mexican and US-American Deserts and its metabolite nordihidriguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 98: 231-239.

- Aydin, S., Bassaran, A.A., Basaran, N., 2005. The effects of Thyme volatiles on the induction of DNA damage by heterocyclic amine IQ and Mitomycin C. *Elsiever*. 581: 43-54.
- Bansal D, Singh-Bhatti H, Sehgal R, 2005. Role of cholesterol in parasitic infections. *Lipids Health Disease*, 4:10-16.
- Bansal D., Malla N. Mahajan R.C., 2006. Drug resistance in amoebiasis. *Review Journal Medical Research* No 123: 115-118
- Barrón-González, M.P., Villarreal-Treviño, L., Reséndez-Pérez, D., Mata-Cárdenas B.D., Morales-Vallarta, M.R., 2008. *Entamoeba histolytica* cyst like structures *in Vitro* induction. *Experimental Parasitology*, 118:600-603.
- Behnia, M., Haghighi, A., Komeylizadeh, H., Seyyed-Jauad, Seyyed Tabaei, and Abadi, A. 2008. Inhibitory effect of Iranian *Thymus vulgaris* extracts on *In Vitro* growth of *Entamoeba histolytica*. *Korean Journal of Parasitology* Volumen 46, No 3 pp 153-156.
- Bendesky A., Menéndez D, Ostrosky-Wegmanb P., 2002. Is metronidazole carcinogenic? *Review Mutation Research* 511: 133–144.
- Bermúdez, A., Oliveira, M.A. and Velásquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una relación de sus objetivos y enfoques actuales: *Interciencia*, 30(8): 453-459.
- Binker, F. 1993. *Larrea tridentata* (DC) Chaparral or Creosote Bush. *British Journal of Phytotherapy*, 3, 10-31.

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. 1998. Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology*.36 (No. 55):305-309.

Calzada, F., Yépez, L. y Tapia, A. 2007.Effect of mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalistrophozoites*. *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 248-251.

Calzada, F., Yépez-Mulia, L. y Aguilar A. 2006. *In Vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 108: 367-370.

Calzado-Flores C.; Segura-Luna, J.; Guajardo-Touche, E. 1995. Effects of Chaparrin Nordihidroguaiaretic Acid and Their Structural analogues on *Entamoeba histolytica* Cultures *Proceedings of the West Pharmacological Society*, 38: 105-106.

Calzado-Flores, C. Guajardo-Touche,E.M., Carranza-Rosales, M.P., Segura-Luna, J.J., 1998. *In Vitro* anti-trichomonic activity of *Castela texana*. *West Pharmacology Society*, 41: 173-174.

Calzado-Flores, C., Verde-Star, M.J., Morales-Vallarta, M., Segura-Luna, J.J., 2007. Inhibición del proceso de enquistamiento de *Entamoeba invadens* por *Castela texana*. *Ciencia UANL Vol. X Universidad Autonoma de Nuevo León* pp 44-48.

- Cannell, R.J.P. 1998. Natural Products Isolation. (Methods in Biotechnology volume 4). Editorial Humana Press Inc. Totowa, New Jersey USA pp (1-53) (343-363).
- Cantillo-Ciau, Z., Moo-Puc, R., Quijano, L., Freile-Peregrín, Y., 2010. The tropical Brown alga *Lophophora variegata*: A Source of antiprotozoal compounds. *Marine Drugs* (8).1292-1304.
- Chatterjee, K., Alí, K.M., Mallick, C., Ghosh, D., 2009. Antihyperglycaemia antioxidative activities of a formulated polyherbal drug MTEC (modified) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research* (6): 466-480.
- Clark, W. D., 2003. Treating Herpes Naturally with *Larrea tridentata*. Publication rights licensed to the International Medical Larrea Society. Tempe, Arizona. pp 1-54
- Costamagna SR, Figueroa MP, 2001. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. *Parasitología al Día*, 25: 100-108.
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12: 564-582.
- Cragg, C.M., Newman, D.J., 1999. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. *Cancer Investigation*. 17(2): 153-163.

- Cudmore S.L., Delgaty K.L., Hayward-McClelland S.F., Petrin D.P., and Garber G.E., 2004. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant, *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*. Volume. 17, No. 4, p. 783–793
- Dahab M. M., Koko W. S. and Osman E. E., 2011. *In vitro* antitrichomonal activity of *Xanthium brasiliicum* Vell and *Argemone mexicana* L different extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* Volume. 5(2), pp. 151-155
- Das S, Stevens T, Castillo C, Villasenõr A, Arredondo H, Reddy Int K. 2002. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Journal of Parasitology*, 32: 655-75.
- Das K., Tiwari R. K. S. and Shrivastava D. K. 2010. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* Volume. 4(2), pp. 104-111.
- Denloye, A.A., Ajekra, O.K. Olowu, R.A., Eshilokum, A.O., Makanjuola, W.A., 2009. Insecticidal activity of petroleum ether extracts and essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodaceae) against *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) *Acta Entomologica Sinica*, 52(8): 923-928.
- Diagnóstico y Tratamiento de la Giardiasis en Niños y Adolescentes de 1 a 18 años en el Primer y Segundo Nivel de Atención. México: Secretaría de Salud, Año de asignación de la GPC Esta guía puede ser descargada de Internet en: www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html
- Dighie, N.S., Pattan, S.R. Nirmal, S.A., Kalkotwa, R.S., Gawar, V.M., and Hole, M.B., 2009. Analgesic activity of *Tamarindus indica* *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1(1):69-71

Dibyarupa Pal, Sulagna Banerjee, Jike Cui, Schwartz A., Sudip K. Ghosh and Samuelson J., 2009. *Giardia*, *Entamoeba* and *Trichomonas* Enzymes Activate Metronidazole (Nitroreductases) and Inactivate Metronidazole (Nitroimidazole Reductase). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. P. 458-464.

Donfack, J.H., Nkenfou C, Boampong N.J., Ngueguim T Florence, Ngadjui T B., Isha G., Reddy G.V., Singh I. P., and Sehgal R., 2012. Ethnopharmacological investigation and in vitro anti-giardial activity of some Cameroonian medicinal plants. *Pharmacologia* 3(12): 672-678.

Doughari, J.H., 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Reserch*. 5(2): 597-603.

Echeverría, A., Torre-Idavoy, D., 2001. Efecto de un extracto de *Pteris alliacea* Lin. Sobre el crecimiento *In Vitro de Giardia lamblia*. *Revista Cubana de Medicina Militar*; 30(3): 161-165.

Elhadi I. M., Koko W. S., Dahab M. M., Imam Y. M. E., Elmonem M. A., El Mageed A. 2013. Antigiardial Activity of some Cucurbita Species and *Lagenaria siceraria*. *Journal of Forest Products & Industries*, 2(4), 43-47.

Fabricant D. S. and Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*; 109 Supplement 10: 69-75.

- Fessenden R J, Fessenden J S, Feist J. 2002 Organic Laboratory Techniques, 3rd Edition, Brooks/Cole publishing.
- Gadano, A.B.; Gurni, A.A.; Carballo, M.A..2006. Argentine Folk Medicine: Genotoxic Effect of Chenopodiaceae Family. Journal of Ethnopharmacology, 103(3): 246-251.
- Gallardo-Pérez J. C., Esparza-Aguilar m: L., Gómez-Campos A., 2006. Importancia etnobotánica de una planta vascular sin semilla en México: *Equisetum*. Polibotánica Núm.21, pp.61-74.
- García C.L., Martínez, A., Ortega, S.L., Castro, B., 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Revista Química Viva. Num. 2
- Garza-Padrón, R.A., Verde-Star, M.J., Morales-Rubio, M.E., Oranday-Cárdenas, A. Rivas-Morales, C., Núñez-González, M.A., and Barrón-González M.P., 2010. Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y de cactus silvestre. Polibotánica, Núm.30 pp 111-121
- Gheno-Heredia Y. A., Nava-Bernal G., Martínez-Campos A. R., y Sánchez-Vera E., 2011. Las plantas medicinales de la organización de parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. Polibotánica Núm. 31, pp. 199-251, ISSN 1405-2768; México.
- Ghoshal S, B.N.K. Prasad, V. Lakshmi. 1996. Antiamoebic activity of *Piper longum* fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. Journal of Ethnopharmacology.50 (Supl. 3) : pp. 167-170.

- Gierlinger N., Sapei L. and Paris O., 2008. Insights into the chemical composition of *Equisetum hyemale* by high resolution Raman imaging. *Planta* 227:969–980
- Gómez-Castellanos J. R., 2008. Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7 (1), 3 - 9
- González-Garza, M.T., Mata-Cárdenas, B.D., Said-Fernández, S. (1989). High susceptibility of five axenic *Entamoeba histolytica* strains to gossypol. *Transaction of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 522–524.
- Guerra-Santos M., Kelecom A., Ribeiro de Paiva S., Gomes de Moraes M., Rocga L., and Garrett R., 2010. Phytochemical studies in Pteridophytas growing in Brazil: a review. *The Americas of Journal of plant science and biotechnology*. 4 (Special Issue 1), 113-125.
- Gutiérrez G, Muñoz O. 1994. Epidemiología de la amibiasis. Editor. Kretschmer R. En *Amibiasis, Infección y Enfermedad por Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas México. Páginas. 207-226.
- Gutiérrez-Dominguéz M.A., y Betancourt-Aguilar, Y., 2008. Caracterización del mercado mexicano de plantas medicinales. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Jardín Botánico Universitario. Publicado por www.herbotecnia.com.
- Hammer KA, Carson CF, Riley. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 985-990.

Hassani S., Asghari G., Yousefi H., Kazemian A., Rafieiean M., Darani H. Y., 2014. Effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. *Advanced Biomedical Research* Vol 2 Issue 2

Havinga R.M., Hartl A., Putscher J., Prehler S., Buchmann C, Vogl C. R., 2010. *Tamarindus indica* L. (Fabaceae): Patterns of use in traditional African medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 127 573–588

Hawrelak J. 2003. Giardiasis: pathophysiology and management. *Alternative Medicine Review*, 8:129-142.

Hoareau L, DaSilva EJ. 1999 Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Plant Biotechnology*, Volumen 2, No. 2

Hrdy I., Cammack R., Stopka P., Kulda J., and Tachezy J., 2005. Alternative Pathway of Metronidazole Activation in *Trichomonas vaginalis* Hydrogenosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 49, No. 12p. 5033–5036

Huacuja-Ruiz L., López-Velázquez A. L., Panduro A., Mondragón P., María de la Luz Miranda-Beltrán M. L., 2007 Fitoterapia de la hepatitis viral B crónica *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal* Sistema de Información Científica Vol. IX • Número 3.

[Innocente AM](#), [Vieira Pde B](#), [Frasson AP](#), [Casanova BB](#), [Gosmann G](#), [Gnoatto SC](#), [Tasca T](#). 2014 Anti-*Trichomonas vaginalis* activity from triterpenoid derivatives. *Parasitology Research*; 113(8):2933-40

- Jamali, A.; Kouhils, M.; Ait, M.L.; Jaouharis, J.T.; Idlimam; A.; Abdenouri, N. 2006. Sorption Isotherms of *Chenopodium amrosioides* Leaves at three temperatures. Journal of Food Engineering, 72(1): 77-84.
- Jaki BU Franzblau SG, Chadwick LR, Lankin DC, Zhang F, Wang Y, Pauli GF., 2008. Purity-activity relationships of natural products: the case of anti-TB active ursolic acid. Journal of Natural Products; 71(10):1742-8.
- Jean, A.A., Robert, P.B., Quirico, J., Nelson, Z., Giselle, T., Guy, H.H., 2001. Separation of crude plant extract with high speed ccc. For primary screening in drug discovery. Journal of Liquid Chromatographic Related Technology, 24(11 y 12): 1827-1440.
- Jiménez-Arellanes A., Luna-Herrera J., Ruiz-Nicolás R, Cornejo-Garrido J, Tapia A. and Yépez-Mulia L., 2013. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea Americana* seeds. BMC Complementary and Alternative Medicine, 13:109.
- Kabir-Khanzada S., Shaikh W., Sofia s., Kazi T.G., Usmanghani K. , Kabir A. and Sheerazi T.H., 2008. Chemical constituents of *Tamarindus indica* L. Medicinal Plant in Sindh. Pakistan Journal of Botanical. 40(6): 2553-2559.
- Keister DB. 1983. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 77: 487 – 488.
- Kiuchi, F.; Itano, Y.; Uchiyama, N.; Honda, G.; Tsubouchi, A.; Nakajina-Shimada, J.; Auki, T. 2002. Monoterpene Hydroperoxides With Trypanocidal Activity From *Chenopodium ambrosioides* .Journal of Natural Products. 65(4): 509-512.
- Land K. M., and Johnson P. J., 1999. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. Drug Resistance Updates. Harcourt Publishers Ltd 2, 289–294

- Laza, L.D., Rodríguez, L.I., Sardina, C.G., 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de plantas medicinales*, 8(3): 1
- Leos-Rivas C., Verde-Star M. J., Cruz-Vega D. E., Barrón-González M. P., Rivas-Morales C., Oranday-Cárdenas A., 2013 Actividad biológica de extractos metanólicos de *Heliotropium amplexicaule* *Revista Mexicana de Ciencia Farmacologica*. 44 (3)
- Levine ND, Carlis JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honingerg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lin D, Lom J, Merinfeld EG, Page FC, Poljanski G, Sprague V, Vavra J and Walalace F.G., 1980. A new Revised Classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*, 7: 37.
- Lira-Saldívar, R. H., 2003. Estado Actual del Conocimiento Sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, núm. 2, pp. 214-222, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México
- Lira-Saldivar, R.H., Hernández-Suárez, M., Hernández-Castillo, F.D., 2006. Activity of *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (L) extracts and Chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo*, Vol. 12 No. 002 pp 212-216.
- Lizcano-Ramón, A.J., Vergara-González, J.L., 2008. Evaluación antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *pasiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Tesis para optar a título de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá Colombia.

- López-Sáez J.A.y Pérez-Soto J., 2010. Etnobotánica medicinal y parasitosis intestinales en la isla de Ometepe, Nicaragua. Polibotánica Núm. 30, pp. 137-161, ISSN 1405-2768; México.
- Lossick JG, 1982. Treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. Review of Infect Disease;4 (suppl):801-818.
- Lujan H. D., 2006. Giardia y giardiasis. Artículo Especial. Medicina (Buenos Aires) 66:70-74.
- Lutterdott, G.D., Ismail,A., Basheer, R.H., Baharudin, H.M., 1999. Antimicrobial effects of *Psidium guajava* extracts as one mechanism of antidiarrhoeal action. Malaysian, Journal of.Medicine Science, 6(2): 17-20.
- Maiti, R., Jana, D., 2004. Antidiabetic effect of aqueous extracts of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin induced diabetics rats. Journal of Ethnopharmacology, 92(7): 1172-1176.
- Mallikarjuna Rao K., Gobinath M., William, Carey M, Praveen-Kumar Ch., Penabaka V., 2009.studies on antihelmintic activity of roots extract of *Tamarindus indica* L. by using different solvent systems. International Journal of Pharma Research and Development – Online.Publication Ref No.: IJPRD/2011/PUB/ARTI/VOV-2/ISSUE-12/FEB/009
- Marjurie, M.C., 1999. Plants products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review, 12(4):564-582.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

- Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, González-Salazar F, Palacios-Corona R, Said-Fernández S. 2008. A new vial microassay to screen antiprotozoal drugs. *Pharmacology on line*. 1: 529-537.
- McDonald, D.; VAncrey, K.; Harrison, P.; Rangachari, P.K.; Rosenfeld, J.; Warren, C.; Sorger, G. 2004. Ascaridole Less Infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology* 92(2-3): 215-221.
- 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.
- Meingasser JG, Thurner J 1979. Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazol and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 15:254-259.
- Mfotie Njoya E., Weber C., Hernandez-Cuevas N.A., Chung-Chau H., Janin Y., Kamini M.F.G., Moundipa P.F., Guille' N., 2014 Bioassay-Guided Fractionation of Extracts from *Codiaeum variegatum* against *Entamoeba histolytica* Discovers Compounds That Modify Expression of Ceramide Biosynthesis Related Genes. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Volume 8 | Issue 1 | e2607

- Mohamed, A.A.A. and Aus El-Shaykiya, A. 2006. Structure elucidation of bioactive marine natural products using modern methods of spectroscopy. Tesis doctoral. Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Facultat der Heinrich-Heine-Universität Dusseldorf Germany.
- Molina-Salinas G. M., Peña-Rodríguez L. M, Mata-Cárdenas B. D., Escalante-Erosa F., Said-Fernández S. 2008. Antimycobacterial activity of *Flourensia cernua* leaf extracts. A comparison of extraction methods and fractionation strategies. Letters Application Microbiology, submitted; the manuscript reference number is: LAM-2008-0964.
- Monis P.T., Caccio SM, and Thompson RCA. 2009. Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitology, 25(2):93-100.
- Monzote-fidalgo, L., Sarriego-Ramos, I., Montalvo-Alvarez, A.M., Garrido-Lorente, N., Schull-Lizama, R., Abreu-Payrol, J., 2004. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. Revista Cubana de Medicina Tropical, 56(3): 230-233.
- Morales-Díaz, D.L. 1998. Determinación de la Actividad Antiinflamatoria de *Crescentia alata* HBK. Tesis de Licenciatura para Título de Químico Farmacéutico. Universidad San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala. 66p.
- Morales-Rubio, M.E., Morales-Vallarta, M., Treviño-Neávez, J.F., Garza-Padrón, R.A., Rodríguez-Garza, R.G., Mar-Aguilar, F., Reséndez-Pérez, D., Verduzco-Martínez J.A., Cavazos-González, R., Elizondo-Herrera, A., y Barrón -González., 2010. Actividad amebicida de extractos de tejidos *In Vivo* e *In Vitro* de cuatro especies de cactáceas sobre *Entamoeba histolytica*. Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica Tocte.
- Moreno-Limón S., González-Solís L. N., Salcedo-Martínez S.M., Cárdenas-Avila M.Ly Perales-Ramírez A., 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora

(*Larreatridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. Polibotánica Núm. 32, pp. 193-205, ISSN 1405-2768; México.

Muller M, 1988. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. Annual Review of Microbiology. 42: 465-488.

Nacimiento, F.R.F.; Cruz, G.V.B.; Pereira, P.V.S.; Maciel, M.C.G.; Silva, L.A..2006: Ascitic and Solid Ehrlich Tumor Inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. Tratament. Life Science. 78 (22): 2650-2653

Naemi F., a Asghari G., Yousofi H., Yousefi H. A., 2013. Chemical composition of essential oil and anti trichomonas activity of leaf, stem, and flower of *Rheum ribes* L. extracts. Avicenna Journal of Phytomedicine. Epub ahead of print.

Nilforoushzadeh M.A., Shirani-Bidabadi L., Zolfaghari-Baghbaderani A., Saberi S., Siadat A.H. and Mahmoudi M., 2008. Comparison of *Thymus vulgaris* (Thyme), *Achillea millefolium* (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic glucantime in treatment of cutaneous leishmaniasis in balb/c mice. Journal Vector Borne Dis 45. Pp. 301-306.

Rivera-Núñez D. y Obón de Castro C., 2007. Etnobotánica Capítulo 12, Manual de teoría y prácticas, España. <http://www.correofarmaceutico.com/documentos/260307libro>

Ocegueda, S., E. Moreno y P. Koleff. 2005. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. Biodiversitas 62:12-15

Odugbemi, T., 2006. Outlines and pictures of medicinal plants from Nigeria University of Lagos Press, Lagos Nigeria 283pp.

- Orestes Guerra J., Meneses A., Ana María Simonet A. M., Macías F. A., Nogueiras C., Gómez A. and Escario J. E. 2008. Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. *Revista de Biología Tropical* Vol. 56 (4): 1645-1652.
- Pal D., Banerjee S., Cui J., Schwartz A., Ghosh S.K., and Samuelson J., 2009. *Giardia*, *Entamoeba*, and *Trichomonas* Enzymes Activate Metronidazole (Nitroreductases) and Inactivate Metronidazole (Nitroimidazole Reductases). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 53, No. 2 p. 458–464
- Padrón-Marquez B, Oranday-Cardenas A, Rivas-Morales C, Verde-Star MJ. 2003. Identificación de compuestos de *Melia azederach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. *Ciencia* 6:333-338.
- Palomino, O. 2001. Métodos analíticos para la identificación de plantas medicinales. Apuntes del curso de la asociación Española de Farmacéutico de la Industria (AEFI).
- Park E. Y., and Jeon H., 2008. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Equisetum hyemale*. *Natural Product Sciences*. 14(4): 239-243.
- Pardo de Santayana, M.; Blanco, E.; Morale, R. 2005. Plants Known As Té in Spain. *Ethnopharmacology Botanical Review. Journal of Ethnopharmacology*, 98(1-2): 1-19.
- Patricio, F.J.; Costa, G.C.; Pereira, P.U.S.; Aragao-Filho, W.C.; Sousa, S.M.; Pereira, W.S.; Maciel, M.C.G.; Silva, L.A.; Amaral, F.M.M.; Rebelo, R.M.M.; Guerra R.N.M.; Ribeiro, M.N.S.; Nascimento, F.R.F. 2007. Efficacy of The Intraintestinal Treatment With *Chenopodium ambrosioides* in the Murino Infection by *Leishmania amazonensis*. *Journal Ethnopharmacology* in Press.

Pérez, A.E. 1956. Plantas Útiles de Colombia. 1ª. Edición. Editorial Victor Hugo. Medellín Colombia. 832p.

Pérez-Arellano J.L, Hernández-Cabrera M., Pisos-Álamo E, Carranza-Rodríguez C., Castillo-de-Vera M., Aparicio-Azcárraga P., 2007. Tratamiento de las enfermedades parasitarias (I): Protozoosis Informe del Sistema Nacional de Salud. Volumen 31, N° 1 Madrid España.

Petri WA., Haque R, Lyerly D, Vines RR, 2000. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitology Today*, 16:320-321.

Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G, 1998. Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Review*, 1: 300-317.

Pinilla A.E., Myriam Consuelo López M.C., Viasus D. F., 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica* *Rev Méd Chile*; 136: 118-124

Pollack, Y.; Segal, R.; Golenser, J. 1990. The Effect of Ascaridole on The *in vitro* Development of *Plasmodium falciparum* *Parasitology Research*, 76(7): 570-572.

Qinlan, M.B.; Quinla, R.J.; Nolan, J.M..2002. Ethnophysiology and Herbal Treatment of Intestinal Worms in Dominicana. *West Indies. Journal of Ethnopharmacology.*, 80(1): 75-83

Quiñones-Gutiérrez Y., Verde-Star M. J., Rivas-Morales C., Oranday-Cárdenas A., Mercado-Hernández R., Chávez-Montes A. and Barrón-González M. P. 2013. *In vitro* study of

antiamoebic activity of methanol extract of fruit of *Pimpinella anisum* on trophozoites of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS African Journal of Biotechnology Vol. 12(16), pp. 2065-2068,

Rahimi-Esboei B., Ebrahimzadeh M. A., Gholami S. H., Falah-Omrani V. 2013. ***Anti-giardial activity of Sambucus ebulus.***European Review for Medical and Pharmacological Sciences.17: 2047-2050.

Rates SMK, 2001. Plants as source of drug.Toxicon 39: 603-613.

Ramawat K.G., Dass S. and Mathur M., 2009. The Chemical Diversity of Bioactive Molecules and Therapeutic Potential of Medicinal Plants, *Herbal Drugs: Ethnomedicine to Modern Medicine*, (pp 7-32) DOI 10.1007/978-3-540-79116-4 2, _c Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2009

Rivera, M., de la Parte MA, Hurtado P, Magaldi L, Collazo M, 2002. Giardiasis intestinal. Mini-revisión de Investigación Clínica, 43:119-128.

Rocha T. D., de Brum-Vieira P., Baggio-Gnoatto S. C., Tasca T. y Gosmann G., 2012. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species Parasitology Research 110:2551–2556

Rojas Alba Mario, 2001. Cola de Caballo. Instituto Mexicano de Medicinas Tradicionales Tlahuilli A.C. Tlahui-Medic. No. 11, I.

Rojas, E., Morales, C., Juárez, E., Pineda, N., 2006. Tratamiento de la leishmaniasis cutánea con plantas medicinales en Trujillo, Venezuela. Academia, 19-25.

Rubinson, K. A. y Rubinson J. F. 2001 Análisis Instrumental. Prentice Hall. USA.

Ruffa, M.J.; Ferrero, G.; Wagner, M.L.; Calcagno, M.C.; Campos, R.H.; Cavallaro, L. 2002. Cytotoxic Effects of Argentine Medicinal Plant Extracts on Human Hepatocellular carcinoma Cell Line. Journal of Ethanopharmacology, 79(3): 335-339.

Rzedowski, J. RzedowskiG. 1994. Zygophyllaceae, Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 30. Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán Mex.

Sagrero-Nieves, L.; Bartley, J.P. 1995. Volatile Constituents From The Leaves of *Chenopodium ambrosioides* L. Journal of Essential Oil Reserch, 7: 221-223.

Said-Fernández S, Vargas-Villarreal J, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, Navarro-Marmolejo L, Lozano-Garza G, Martínez-Rodríguez H. 1988. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Higiene, 82: 249 – 253.

Said-Fernández, S., Ramos-Guerra, M.C., Mata-Cárdenas, B.D., Vargas-Villarreal, J., Villarreal-Treviño, L. 2005. *In Vitro* antiprotozoal activity of leaves of *Artemisia ludoviciana*. Fitoterapia. 76: 466-468.

- Salvadores-U Y, Silva-A G, Tapia-V M, Hepp-G R. 2007. Polvos de especias aromáticas para el control del gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, en trigo almacenado. *Agricultura Técnica (Chile)*, 67:147-154.
- Samarawickream, N.A., Brown, D.M., Upcroft, J.A., Thammapalerd, N., Upcroft, P., 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate ferredoxin oxidoreductase in mechanism of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 833-834.
- Samuelson, J. 1999. Why metronidazole is active both bacteria and parasites. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(7): 1533
- Santander, C.R. 1994. Etnobotánica del “Cuatecomate” (*Crescentia sp*) en Regiones Tropicales de México. Tesis de Maestría. Centro de Botánica, Colegio de Posgrado. Montecillos, México. 153p.
- Sánchez-Vega J.T., Tay-Zavala J., Robert-Guerrero L., Romero-Cabello R., Ruíz-Sánchez D., Rivas-García C., 2000. Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. *Revista Facultad de Medicina UNAM Vol.43 No.3 pp 80-83*
- Sarker S. D., Latif Z., and Alexander I. Gray A. I., 2006. *Natural Product Isolation*. Second Edition. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey 07512 U.S.A.
- 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.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. y Crouch S. R., 2009. *Fundamentos de Química analítica*. Octava Edición. Editorial Cengage Learning Editores S.A. de C.V. México D.F.

Schwabe JR, 2002. Update of trichomoniasis. *Sexual Transmission Information*, 76: 378-379.

Schwabe JR, Burgess D, 2004. Trichomoniasis. *Clinical Microbiology Review*, 17: 794-803.

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). *Archivos de Investigación Médica*, 21: 235-239.

Segvic, M.S., Klaric, I. Kosalek, J., Mastelic, E., Pieckova, S., and Pepeljnak, A., 2007. Antifungal activity of Thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Journal of Letters in Applied Microbiology* 44: 36-42.

Shiraki K, Yukawa T, Kurokawa M, Kageyama S. 1998. Cytomegalovirus infection and its possible treatment with herbal medicines. , 56:156-60.

Silva F. C., Busatti h. G. N. O., Gomez M.A., Duarte L. P., Grácia D. F. Silva G. D. F. and Vieira-Filho S. A., 2012. Antigiardial activity of the hexane extract of *maytenus gonoclada* mart. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* Vol 4, Suppl 1. Brazil.

Simjee AE, Gathiram V, Jackson TF, Khan BF, 1985. A comparative trial of metronidazole and tinidazole in the treatment of amoebic liver abscess. *South Africa Medical Journal*, 68:923-924.

Singh J, Kumar A, Budhiraja S, Hooda A. 2007. Ethnomedicine: use in dental caries. *Brazilian Journal of Oral Science*, 6: 1308-1312.

Subsistema de Notificación Semanal de Casos Nuevos de Enfermedades Estados Unidos Mexicanos, marzo 2013

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*. *Journal of Ethnopharmacology*, 45: 43-52.

Solares –Arena, F. 2004. Etnobotánica y Usos Potenciales del Cirian (*Crescentia alata* HBK) en el Estado de Morelos. *Polibotánica*, No. 18 del Instituto Politécnico Nacional Distrito Federal pp 13-31.

Souza-Fagundes E. M., Queiroz A. B. R., Martins-Filho O. A., Gazzinelli G., Corrêa-Oliveira R., Alves T. M. A., Zan C. L., 2002. Screening and Fractionation of Plant Extracts with Antiproliferative Activity on Human Peripheral Blood Mononuclear Cells *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 97(8): 1207-1212.

Sowemimo, A.A.; Fakoya, F.A.; Awopetu, I.; Omobuwajo, O.R.; Adesanya, S.A. 2007. Toxicity and Mutagenic Activity of Some Selected Nigerian Plants. *Journal Ethnopharmacology*, 113(3): 427-432.

Sridhar SB, Sheetal UD, PAi MRSM, Shastri MS. 2005. Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed powder in streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 463-468.

- Srinivasan, D., Perumalsamy, L.P., Nathan, S., Surest, T., 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 217-222
- Standley, P.C. 1974. Flora de Guatemala. *Fieldiana Botany*, U.S.A. 24 (10): 185
- Sticher O., 2008. Natural product isolation. *Natural Product Reports*, 25, 517–554. The Royal Society of Chemistry.
- Suárez-Jiménez, G., Cortéz-Rocha, O., Rosa-Burgos, E.C., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomes, M., and Cinco-Moyoroqui, J. 2010. Antifungal activity of plants methanolic extracts against *Fusarium verticillioides* (SAAC.) Nirenb and fumonisin B production. *Revista Mexicana de Fitopatología* Vol. 25 Núm. 002 pp 134-142.
- Taharian, A.A., Babae, M., Vafaei, A.A., Jarrahi, M., Jadid, M., and Sadeghi, H., 2009. Antinociceptive effects of hydroalcoholic extracts of *Thymus vulgaris*. *Pakistan Journal of Pharmacology Science*, Volumen 22, No. 1, pp. 83-89.
- Taylor, L. 2005. *The Healing Power of Rain Forest Herbs*. Square One Publishers ,Inc., Garden City Park U.S.A. 535 p
- Thuille, N., 2003. Bactericidal activity of herbal extracts *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206: 1-5.
- Thompson R, C. A., 2008. Giardiasis: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. *Ann Nestle*; 66: 23-29. DOI: 10.1159/000151270.

- Tona, L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K. y Vlietinck A.J. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 61 (Suppl. 1): 57-65.
- Touchstone, Joseph C. 1992. *Practice of Thin Layer Chromatography*. 3rd Edition. John Wiley and Sons, INC.
- Tripathi, D.M., 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.
- Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C. 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytotherapy Reserch*, 19:303-9
- Uribarren-Berrueta, T., 2014. Tricomoniasis Urogenital. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina UNAM.
- Valencia-del Toro G. y Garín-Aguilar M. E., 2010. *Manual de prácticas de productos naturales*. Primera edición Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.
- Vazquez-Yanes, C., Batis-Muñoz, M.I., Alcocer-Silva, M., Gual-Díaz M., Sánchez-Dirzo, C., 1999. Árboles y Arbustos Potencialmente Valiosos Para la Restauración Ecológica y la Reforestación. Proyecto J-084-CONABIO, Instituto de Ecología, Universidad Autónoma de México.

- Vázquez, F., García, M. J., Pérez, F. and Palacio, V., (2001). *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 19(3), 114-124.
- Verpoorte, R., 1998. Exploration of nature's chemodiversity. The role of secondary metabolites as leads in drugs development. *Drug Development Trends*. 3:332-333.
- Vigo, E. Cepeda, A., Gualillo, O., and Pérez-Fernández, R., 2004. *In Vitro anti-inflammatory effect of Eucalyptus globulus and Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J 774A.1 murine macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(2): 257-263.
- Wohlenberg, V.C. and Lopes-Da-Silva, M., 2008. Effect of *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodaceae) aqueous extract on reproduction and life span of *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae). *Bioscience Journal of Uberlandia Region*, V.25 No.6 pp. 129-132.
- Ximénez C., Rene Cerritos R.C., Rojas L., Dolabella S, Morán P., Shibayama M., González E., Valadez A., Hernández E., Valenzuela O., Limón A., Partida O. and Silva E.F. 2010. Human Amebiasis: Breaking the Paradigm? *Int. Journal of Environmental Research in Public Health*, 7, 1105-1120.
- Yesilada E, 2005. Past and future contributions to traditional medicine in the health care system of the Middle-East. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:135-137.

Resumen Bibliográfico

Jesús Norberto Garza González

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de pProductos Naturales

Tesis: “Evaluación de la actividad antiprotozoaria de plantas con antecedentes etnobotánicos en México”

Campo de estudio: Química de Productos Naturales

Datos personales: Nacido en Monterrey Nuevo León el 19 de Abril de 1964, hijo de Norberto Garza Garza (†) y Francisca González Alvarado (†).

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Biólogo en 1986.

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestría en Ciencias con acentuación en Microbiología en 2009.