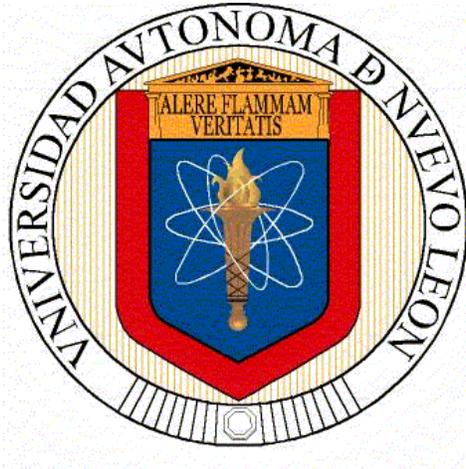


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Actividad anti-*Giardia in vitro* de los compuestos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia*

POR

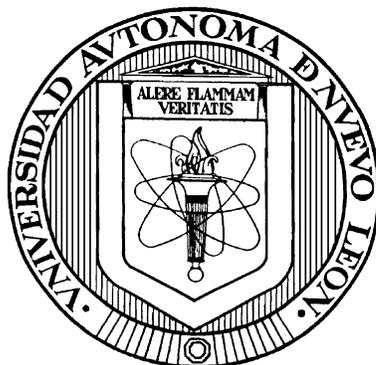
IRMA GUADALUPE DOMÍNGUEZ VIGIL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
FARMACIA**

JULIO, 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



Actividad anti-*Giardia in vitro* de los compuestos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia*

Por

Q.F.B. IRMA GUADALUPE DOMÍNGUEZ VIGIL

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación en
Farmacia**

J u l i o, 2015

Actividad anti-*Giardia in vitro* de los compuestos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia*

Revisión de tesis:

Dr. Benito David Mata Cárdenas †
Director de Tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Directora de Tesis

Dr. Isaías Balderas Rentería
Comité Tutorial

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Comité Tutorial

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Comité Tutorial

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

Julio de 2015

**Actividad anti-*Giardia in vitro* de los compuestos de *Foeniculum vulgare* y
*Citrus aurantifolia***

Aprobación de tesis:

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Presidente

Dr. Isaías Balderas Rentería
Secretario

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos
Vocal

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

Julio de 2015

*Fue difícil aceptar la ausencia de tu cuerpo, pero la presencia de tu alma
permanecerá en nuestros corazones...*

Descanse en paz Dr. Benito David Mata Cárdenas

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Benito David Mata Cárdenas.

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Javier Vargas Villarreal.

DEDICATORIA

A mi pequeña hija Andrea, por el cariño y ternura que me brindaste en cada momento de este camino, alentándome con tu bella sonrisa. Por enseñarme a aprender contigo en cada uno de tus primeros pasos.

A mi pequeño bebé Román, porque tu llegada me motivó aún más a esforzarme y ser mejor para ustedes.

A mi marido Alejandro, por la paciencia y comprensión.

A mi madre Irma, por estar siempre lista para brindarme su apoyo y cuidar de mis pequeños cuando más lo necesité. Por alentarme en mis momentos de debilidad.

A mí persona, por ser paciente y amable cuando las situaciones lo ameritaban.

¡Gracias por su apoyo!

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, maestro y amigo el Dr. Benito David Mata Cárdenas (+), por cada motivación que me brindó en este tiempo para lograr mis sueños. Por su paciencia y fé en mí. Porque sus conocimientos y experiencias me realzaron el gusto por éste camino. Por las travesías de la vida que juntos atravesamos con éxito y porque a pesar de que se adelantó en el trayecto jamás olvidaré sus enseñanzas.

A mi co-asesora, maestra y amiga la Dra. María del Rayo Camacho Corona, “Dra. Rayito”, por sus enseñanzas, tiempo y aliento que otorgó a mí y a los míos. Por la amistad y confianza brindada y porque a pesar de su carácter estricto, aprendí.

A mis maestros, por su tiempo, consejos y observaciones en la revisión de éste trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por crear un ambiente de trabajo de sana convivencia.

A mis alumnos de servicio social y de parasitología, porque al tratar de enseñarles, aprendí mucho más de ustedes.

A todos y cada uno de ustedes les dedico cada una de éstas páginas de mi tesis.

¡Gracias!

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su apoyo y facilidades brindadas en la formación de investigadores.

A la Facultad de Ciencias Químicas por el apoyo en cuanto a instalaciones y equipo, Especialmente a la Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas por su valiosa ayuda en el programa de posgrado del área de Farmacia.

A la Coordinación de Químico Farmacéutico Biólogo por la ayuda para solicitud de beca otorgada, especialmente a la Dra. Yolanda Gracia Vásquez. Así como al personal administrativo que amablemente colaboró en este proceso.

Al laboratorio de Biotecnología por las prestaciones brindadas al proyecto, especialmente a la Dra. María Elena Cantú Cárdenas.

Al Centro de Investigación Biomédica del Noreste por su interés en la realización de éste proyecto, especialmente al Dr. Javier Vargas Villarreal por su colaboración y amabilidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado, gracias al número de beca 365046.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	PÁGINA
DESARROLLO EXPERIMENTAL	V
DEDICATORIA	Vii
AGRADECIMIENTOS	Viii
LISTA DE TABLAS	XiV
LISTA DE FIGURAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVii
RESUMEN	XiX
CAPITULO 1	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Giardia lamblia</i>	1
1.2 Taxonomía	1
1.3 Características morfológicas	2
1.3.1 Trofozoíto	2
1.3.2 Quiste	3
1.4 Ciclo biológico	4
1.5 Transmisión	6
1.6 Patogenia	7
1.7 Manifestaciones clínicas	8
1.8 Epidemiología	10
1.9 Tratamiento	11
1.9.1 Metronidazol	13
1.9.1.1 Mecanismo de Acción	13
1.9.1.2 Resistencia al Metronidazol	14
1.9.1.3 Efectos Secundarios	15
1.10 Productos Naturales como alternativa terapéutica antiparasitaria	16
1.11 Citotoxicidad Celular	18
1.11.1 Definición de Citotoxicidad Celular	19
1.11.2 Línea Celular Vero	20
CAPITULO 2	
2. ANTECEDENTES	22
2.1 <i>Foeniculum vulgare</i>	23
2.1.1 Clasificación taxonómica	23
2.1.2 Descripción	24
2.1.3 Usos Etnobotánicos	25
2.1.4 Algunos estudios químicos y farmacológicos	25

2.2	<i>Citrus aurantifolia</i>	27
2.2.1	Clasificación taxonómica	27
2.2.2	Descripción	28
2.2.3	Usos Etnobotánicos	29
2.2.4	Algunos estudios químicos y farmacológicos	30
CAPITULO 3		
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		
3.1	HIPÓTESIS	31
3.2	OBJETIVOS	32
3.2.1	Objetivo general	32
3.2.2	Objetivos específicos	32
CAPITULO 4		
4. MATERIALES Y MÉTODOS		
4.1	Reactivos y Equipos	33
4.2	Material biológico	35
4.2.1	Material Vegetal	35
4.2.1.1	<i>F. vulgare</i>	35
4.2.1.2	<i>C. aurantifolia</i>	36
4.2.2	Cepa de <i>G. lamblia</i>	36
4.3	Medio de Cultivo	36
4.3.1	Preparación del suero bovino	36
4.3.2	Preparación de bilis bovina	37
4.3.3	Preparación del medio basal TYI-S-33	37
4.3.4	Medio Completo TYI-S-33	38
4.4	Cultivo Axénico de <i>G. lamblia</i>	39
4.4.1	Resiembra	39
4.5	Parámetros de Crecimiento de <i>G. lamblia</i>	41
4.5.1	Cinética de Crecimiento de <i>G. lamblia</i>	41
4.6	Pruebas de Actividad biológica	43
4.6.1	Actividad inhibitoria	43
4.6.2	Determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀)	45
4.6.2.1	Preparación de la muestra y diluciones	45
4.6.2.2	Bioensayo	46
4.7	Ensayo de Citotoxicidad de los compuestos puros más activos	47
4.7.1	Mantenimiento de la línea celular Vero	47
4.7.2	Ensayo de Citotoxicidad con azul de tripano	47
4.7.2.1	Azul de tripano	48
4.7.2.2	Ensayo	49
4.7.2.2.1	Preparación de la muestra y diluciones	49
4.8	Análisis Estadístico	54
4.9	Manejo y disposición de residuos	55

CAPITULO 5	
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
5.1 Parámetros de Crecimiento de <i>G. lamblia</i>	57
5.1.1 Cinética de Crecimiento de <i>G. lamblia</i>	58
5.2 Determinación de Cl ₅₀ de Metronidazol sobre el crecimiento de <i>G. lamblia</i>	59
5.3 Determinación de Cl ₅₀ de extractos hexánicos de <i>F. vulgare</i> y <i>C. aurantifolia</i>	60
5.3.1 <i>F. vulgare</i>	60
5.3.2 <i>C. aurantifolia</i>	61
5.4 Prueba de Actividad Biológica de los compuestos puros identificados por CG-EM	62
5.4.1 <i>F. vulgare</i>	62
5.4.2 <i>C. aurantifolia</i>	64
5.5 Determinación de Cl ₅₀ de los compuestos puros identificados por CG-EM	66
5.5.1 <i>F. vulgare</i>	66
5.5.1.1 Determinación de Cl ₅₀ de <i>Trans,trans</i> -2,4-undecadienal	66
5.5.1.2 Determinación de Cl ₅₀ de (+)-Canfeno	68
5.5.1.3 Determinación de Cl ₅₀ de <i>p</i> -Anisaldehído	70
5.5.1.4 Determinación de Cl ₅₀ de (-)-Carvona	72
5.5.2 <i>C. aurantifolia</i>	75
5.5.2.1 Determinación de Cl ₅₀ de Citral	75
5.5.2.2 Determinación de Cl ₅₀ de Geraniol	80
5.5.2.3 Determinación de Cl ₅₀ de 3-Metil-1,2-ciclopentanediona	83
5.5.2.4 Determinación de Cl ₅₀ de 4-Hexen-3-ona	85
5.5.2.5 Determinación de Cl ₅₀ de (-)-Carvona	86
5.6 Ensayo de Citotoxicidad de los compuestos puros más activos	87
5.6.1 <i>F. vulgare</i>	87
5.6.2 <i>C. aurantifolia</i>	90
CAPITULO 6	
6.1 CONCLUSIONES	93
6.2 PERSPECTIVAS	95

CAPITULO 7	
7.1 BIBLIOGRAFÍA	96
7.2 RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO	109
APÉNDICES	110
APÉNDICE A- Artículo publicado	111
APÉNDICE B- Constancias de Participación en Congresos	116
APÉNDICE C- Tabla Probit	118

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Manifestaciones clínicas asociadas con infección por <i>Giardia</i>	9
2. Actividad anti- <i>Giardia</i> de extractos metanólicos, hexánicos y clorofórmicos de <i>F. vulgare</i> y <i>C. aurantifolia</i>	22
3. Medio Basal TYI-S-33	38
4. Parámetros de crecimiento de <i>G. lamblia</i>	57
5. % de Inhibición del crecimiento de <i>G. lamblia</i> vs Compuestos puros de <i>F. vulgare</i>	62
6. % de inhibición del crecimiento de <i>G. lamblia</i> vs Compuestos puros de <i>C. aurantifolia</i>	64
7. Cl_{50} de compuestos puros de <i>F. vulgare</i> contra células Vero	87
8. IS de compuestos puros de <i>F. vulgare</i>	89
9. Cl_{50} de compuestos puros de <i>C. aurantifolia</i> contra células Vero	90
10. IS de compuestos puros de <i>C. aurantifolia</i>	92

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Micrografía Electrónica de Barrido de trofozoítos de <i>G. lamblia</i> .	2
2. Micrografía Electrónica de Barrido de quistes de <i>G. lamblia</i> .	3
3. Ciclo biológico de <i>G. lamblia</i>	5
4. Estructuras químicas de agentes quimioterapéuticos para tratar la giardiasis	12
5. Forma profármaco de metronidazol y su forma activa	14
6. Células Vero	21
7. <i>F. vulgare</i> en su hábitat natural	24
8. <i>C. aurantifolia</i> en su hábitat natural	29
9. Suero bovino, bilis bovina y medio TYI-S-33 completo	39
10. Cultivo axénico de <i>G. lamblia</i> en medio TYI-S-33	40
11. Experimento de compuestos puros para determinación de actividad inhibitoria en viales de microcultivo.	44
12. Conteo de trofozoítos en Hemacitómetro	46
13. Estructura química del azul de tripano	48
14. Cinética de crecimiento de <i>G. lamblia</i> con % de error estándar	58
15. Cl_{50} del Metronidazol contra <i>G. lamblia</i> con IC 95%	59
16. Cl_{50} del extracto hexánico de <i>F. vulgare</i> sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%	60
17. Cl_{50} del extracto hexánico de <i>C. aurantifolia</i> sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%	61
18. Cl_{50} de <i>Trans,trans</i> -2,4-undecadienal sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%.	66
19. Estructura química de <i>Trans,trans</i> -2,4-undecadienal	67

20. Cl ₅₀ de (+)-Canfeno sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%.	68
21. Estructura química de (+)-Canfeno	69
22. Cl ₅₀ de <i>p</i> -Anisaldehído sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%	70
23. Estructura química de <i>p</i> -Anisaldehído	71
24. Cl ₅₀ de (-)-Carvona sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%	72
25. Estructura química de (-)-Carvona	73
26. Cl ₅₀ de Citral sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%	75
27. Estructura química del Citral	76
28. Cl ₅₀ de Geraniol sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%	80
29. Estructura química del Geraniol	81
30. Cl ₅₀ de 3-Metil-1,2-ciclopentanediona sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%	83
31. Estructura química de 3-Metil-1,2-ciclopentanediona	84
32. Cl ₅₀ de 4-Hexen-3-ona sobre <i>G. lamblia</i> con IC 95%	85
33. Estructura química de 4-Hexen-3-ona	86

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
<	Menor a
>	Mayor a
≤	Menor o igual a
≥	Mayor o igual a
°C	grados centígrados
µg	microgramos
µg/ml	microgramos/mililitro
µm	micrómetro
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media ó 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.U.A.	Estados Unidos de América
<i>et al</i>	y colaboradores
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
g	gramos
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro
h	horas
H ₂ O	agua
HCl	ácido clorhídrico
IC 95 %	Intervalo de Confianza del 95 %
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IS	Índice de Selectividad

IUPAC	Unión internacional de Química Pura y Aplicada
Kg	Kilogramos
L	Litros
Log P	Coeficiente de reparto
log	logaritmo
MCP	3-Metil-1,2-ciclopentanediona
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetro
N	Concentración normal
N°	número
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCI	Instituto Nacional de Cáncer
OMS	Organización Mundial de la Salud
ρ	Prefijo “para”
PBS	Buffer salino de fosfatos
PEHPS Suero	Peptona Extracto de Hígado-Páncreas
PFOR	Piruvato Ferredoxina Oxido Reductasa
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
TYI-S-33	Tripticasa Extracto de Levadura Suero
v/v	Relación volumen sobre volumen
vs	Versus

RESUMEN

Irma Guadalupe Domínguez Vigil Obtención de Grado: Julio 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: **Actividad anti-*Giardia in vitro* de los compuestos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia***

Número de páginas: 119

Candidato para el Grado de
Maestría en Ciencias con
Orientación en Farmacia

Área de Estudio: Biología Celular de Protozoarios, Productos naturales

Propósito y Método del Estudio: *Giardia lamblia* es un protozoo parásito que habita el intestino delgado de humanos y otros vertebrados además de ser el agente responsable de la giardiasis. El fármaco de primera línea para tratar esta parasitosis es el metronidazol, el cual posee efectos adversos considerables, presenta potencial teratogénico y embriotóxico y está considerado como posible carcinógeno en humanos. Los productos naturales son una alternativa eficaz y con menos efectos secundarios para el tratamiento de la giardiasis. En el presente trabajo se determinó la Concentración Inhibitoria media (CI₅₀) de los extractos hexánicos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia* y algunos de sus constituyentes principales en contra de los trofozoítos de *G. lamblia* utilizando la técnica del microensayo. También se evaluó la citotoxicidad de los compuestos más activos sobre células Vero empleando el método de exclusión con azul de tripano.

Contribuciones y Conclusiones: Los extractos hexánicos de *F. vulgare* (CI₅₀ 89.33 µg/ml) y *C. aurantifolia* (CI₅₀ 185.78 µg/ml) presentaron actividad anti-*Giardia in vitro*. Los compuestos puros más activos presentes en el extracto hexánico de *F. vulgare* son *Trans,trans*-2,4-undecadienal (CI₅₀ 72.11 µg/ml), (+)-Canfeno (CI₅₀ 181.13 µg/ml), *p*-Anisaldehído (CI₅₀ 196.78 µg/ml) y (-)-Carvona (CI₅₀ 207.01 µg/ml). Mientras que los compuestos puros más activos presentes en el extracto hexánico de *C. aurantifolia* son Citral (CI₅₀ 58.44 µg/ml), Geraniol (CI₅₀ 229.01 µg/ml), 3-Metil-1,2-ciclopentanediona (CI₅₀ 207.01 µg/ml), 4-Hexen-3-ona (CI₅₀ 34.35 µg/ml) y (-)-Carvona (CI₅₀ 207.01 µg/ml). De todos ellos el 4-hexen-3ona es el compuesto puro más activo y con el mejor índice de selectividad (IS 19.6820). Ninguno de los compuestos fue tan activo como el metronidazol, sin embargo, ninguno fue tan citotóxico como este.

Firma del Asesor

Firma del Co-Asesor

Dr. Benito David Mata Cárdenas †

CAPITULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Giardia lamblia*

G. lamblia, también llamada *G. duodenalis* o *G. intestinalis*, es un protozoo parásito eucariota unicelular cosmopolita que habita el intestino delgado de humanos y otros vertebrados, especialmente de perros y gatos (Thompson, 2000). *G. lamblia* existe en dos distintas formas morfológicas, el trofozoíto y el quiste, los cuales son la fase de reproducción y de resistencia, respectivamente (Ford, 2005).

1.2 Taxonomía

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Diplomonadida

Familia: Hexamitidae

Género: *Giardia*

Especie: *lamblia*

(Tsuji & Rivera, 2009)

1.3 Características morfológicas

1.3.1 Trofozoíto

La característica principal del trofozoíto (Figura 1) es la forma de pera, mide de 12-15 μm de largo y 5-9 μm de ancho. El citoesqueleto incluye un cuerpo medio y cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral), y un disco ventral que está relacionado a la adherencia del parásito. Los trofozoítos tienen dos núcleos sin nucléolos que están localizados simétricamente en la parte anterior (Carranza & Lujan, 2010). En el citoplasma se localizan las vacuolas lisosomales así como los ribosomas y los gránulos de glucógeno. El complejo de Golgi se observa en trofozoítos en proceso de enquistamiento, pero no se ha confirmado su presencia en los trofozoítos en fase de reproducción (Adam, 2001; Tsuji & Rivera, 2009).

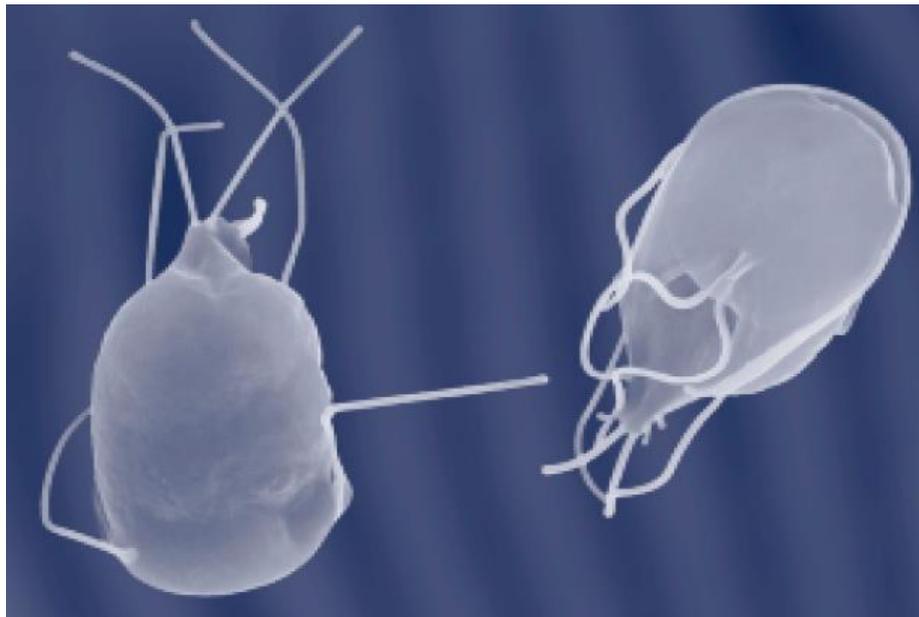


Figura 1. Micrografía Electrónica de Barrido de trofozoítos de *G. lamblia*. (Hawrelak, 2003)

1.3.2 Quiste

El quiste (Figura 2) presenta una forma oval, mide aproximadamente de 5 a 7-10 μm de diámetro y contiene cuatro núcleos. El citoplasma del quiste contiene 2-4 núcleos dependiendo de su estadio de maduración, flagelo contraído y porciones fragmentadas del disco ventral. Está cubierto por una pared que mide 0.3-0.5 μm de espesor y está compuesta por una capa filamentosa que se localiza por fuera (red de 7-20 nm) y dos membranas internas. El componente mayoritario de la pared celular es galactosamina en la forma de *N*-acetilgalactosamina (Bazán-Tejeda, 2008; Carranza & Lujan, 2010; de Souza, Lanfredi-Rangel, & Campanati, 2004). Al ser el estadio de resistencia, el quiste utiliza de 10-20 % de su metabolismo para sobrevivir en el ambiente por largos periodos de tiempo (Adam, 2001; Tsuji & Rivera, 2009).

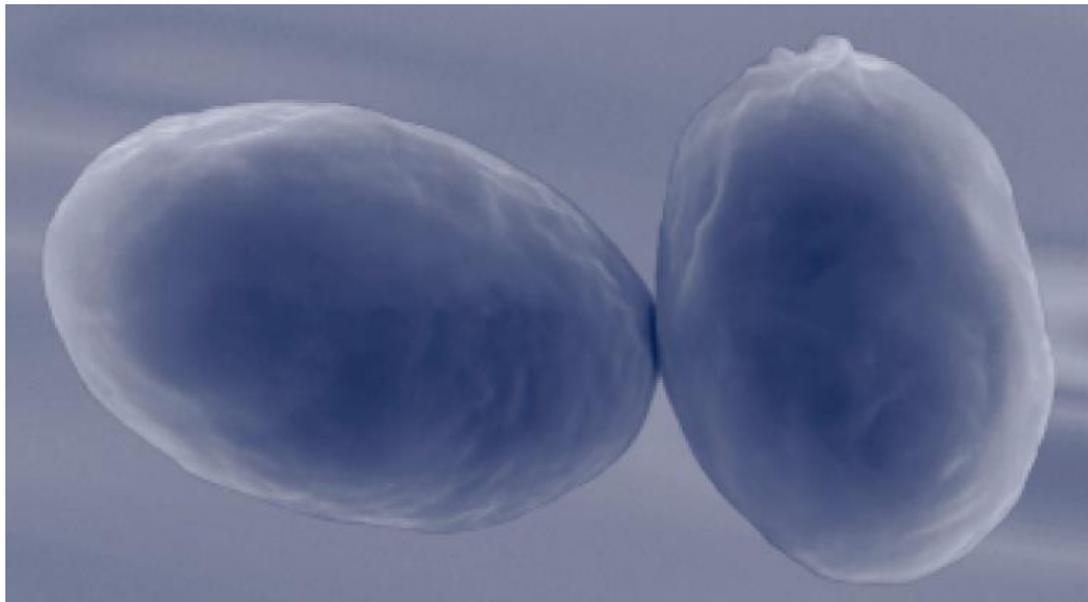


Figura 2. Micrografía Electrónica de Barrido de quistes de *G. lamblia*. (Hawrelak, 2003)

1.4 Ciclo biológico

El ciclo biológico (Figura 3) por *Giardia* se inicia mediante la ingesta de quistes provenientes de agua o alimentos contaminados o a través del contacto directo fecal-oral (Carranza & Lujan, 2010). Los quistes pasan al estómago y son expuestos al ácido gástrico donde el pH bajo y las proteasas pancreáticas promueven el desenquistamiento y la fragmentación del mismo. Es así como de cada quiste emergen dos trofozoítos, los cuales rápidamente se replican por fisión binaria y colonizan el tracto gastrointestinal causando los primeros síntomas (Hawrelak, 2003; Lujan, 2006). El rápido movimiento del tránsito intestinal, conduce a que los trofozoítos sean arrastrados junto con el bolo hacia el intestino grueso donde el pH ligeramente alcalino y la elevada concentración de sales biliares conducen a su enquistamiento. Los trofozoítos no enquistados y quistes infectivos se eliminan en las heces; sin embargo, sólo los quistes pueden sobrevivir fuera del hospedero (Thompson, 2008).

1.5 Transmisión

Este parásito infecta a millones de personas causando Giardiasis, una infección caracterizada por ser asintomática o manifestarse de manera crónica que conlleva a diarrea y malabsorción de nutrientes especialmente en niños (Carranza & Lujan, 2010). Además de ser una enfermedad re-emergente y descuidada, según la Organización Mundial de la salud (OMS), desde el 2004 (Robertson, Hanevik, Escobedo, Mørch, & Langeland, 2010).

En Estados Unidos de América se considera a *Giardia* un posible agente de bioterrorismo por su capacidad de ser transmitido por el agua, por su potencial de ser genéticamente manipulado y por la posibilidad de reproducirse totalmente su ciclo en el laboratorio (Lujan, 2006).

G. lamblia puede transmitirse mediante tres mecanismos: a través del agua, mediante alimentos y mediante transmisión fecal oral directa. Los brotes a través de agua se han descrito en Estados Unidos, Canadá, Japón, San Petesburgo, entre otros (Tsuji & Rivera, 2009). La transmisión mediante alimentos se ha reportado en restaurantes, hospitales psiquiátricos, casas de reposo e iglesias. La transmisión por vía fecal oral directa se presenta principalmente en guarderías (Heresi, Murphy, & Cleary, 2000; Thompson, 2000); además de presentarse en instituciones que atienden pacientes psiquiátricos, pacientes con deficiencia mental y orfanatorios. Este tipo de

transmisión también se presenta en parejas homosexuales o heterosexuales que practican contacto sexual oro anal, con una prevalencia del 20% y una recurrencia de más del 90 % (Ali & Nozaki, 2007; Tsuji & Rivera, 2009).

Además, la OMS considera a la infección por *Giardia* con potencial zoonótico (Rahimi-Esboei, Ebrahimzadeh, Gholami, & Falah-Omrani, 2013; Upcroft & Upcroft, 2001; Yaoyu & Xiao, 2011).

1.6 Patogenia

La patogenia de la giardiasis no ha sido completamente elucidada. Existen teorías de que los trofozoítos causan daño directo hacia los bordes intestinales, con el acortamiento o atrofia de las microvellosidades intestinales las cuales están involucradas en la absorción; reducción de la actividad de la disacaridasa y daño a la mucosa (Thompson, 2008).

Por otra parte, *G. lamblia* interfiere con la absorción de nutrientes, lo cual conlleva a la respuesta inmune del hospedero que resulta en una secreción de fluidos, alterando así el contenido biliar o la flora duodenal que contribuye a la diarrea. Adicionalmente, existe la hipótesis de que *G. lamblia* puede inducir apoptosis a las células epiteliales del intestino delgado (Ali & Hill, 2003; Upcroft & Upcroft, 2001).

1.7 Manifestaciones clínicas

La giardiasis produce un amplio espectro de manifestaciones clínicas, incluyendo el pase de los quistes de manera asintomática, diarrea auto limitante y síndrome crónico con diarrea y malabsorción de nutrientes (Robertson et al., 2010).

La colonización asintomática es la forma más común de infección. Los factores relacionados con el desarrollo de síntomas incluyen el estatus inmune del hospedero, edad, exposición previa, cepa, tamaño del inóculo y la duración de la infección.

Los signos y síntomas aparecen en un promedio de 9.1 días (rango de 6-15 días) posterior a la infección, mientras que los parásitos son encontrados en las heces de 5-41 días después de la ingestión de los quistes, dicha excreción es intermitente (Hawrelak, 2003; Heresi et al., 2000; Robertson et al., 2010).

Los síntomas asociados con evidencia clínica de infección con *G. lamblia* se enlistan en la tabla 1.

Las infecciones sintomáticas persistentes se asocian con malestar abdominal, diarrea, esteatorrea y pérdida de peso (Ali & Hill, 2003). La anorexia, el dolor de cabeza y el dolor abdominal difuso son exacerbados por los alimentos. La intolerancia a la lactosa se presenta en el 30 % de los pacientes y puede persistir por periodos variables después del tratamiento específico. La malabsorción de nutrientes, principalmente de grasas, carbohidratos, hierro y

vitaminas A y B12 es asociada con retardo en el crecimiento y desnutrición donde los niños sufren las más serias consecuencias (Huang & White, 2006; Neiva et al., 2014; Robertson et al., 2010).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas asociadas con infección por *Giardia*
(Heresi et al., 2000)

Manifestación clínica	%
Diarrea	70-100
Dolor abdominal	55-80
Calambre	64-70
Náusea	58-64
Flatulencia	56-75
Distensión	55-58
Pérdida de peso	48-65
Anorexia	40-58
Vómito	20-33
Fiebre baja	17-28

1.8 Epidemiología

G. lamblia es el protozoo que con mayor frecuencia se encuentra en exámenes coproparasitológicos (Tsuji & Rivera, 2009).

Giardia generalmente se relaciona con la pobreza, la falta de higiene y agua potable, es por ello que en algunas comunidades indígenas el grado de infección puede llegar al 95 % de la población (Pérez-Soto & López-Sáez, 2010) y en áreas endémicas, la re-infección es común.

Giardia es un protozoo de distribución mundial, con una alta prevalencia y una morbilidad significativa (Neiva et al., 2014). A nivel mundial se ha estimado una frecuencia de 200,000,000 de individuos infectados, de los cuales 500,000 sufren enfermedad.

Se calcula que en México hay 9 millones de personas parasitadas por *G. lamblia*, siendo esta protozoosis la causa más común de parasitosis intestinal a nivel nacional y mundial (Pérez-Soto & López-Sáez, 2010; Tsuji & Rivera, 2009).

1.9 Tratamiento

Existe una gran variedad de agentes quimioterapéuticos disponibles para tratar la giardiasis (Figura 4), incluidos los fármacos derivados del 5-nitroimidazol (metronidazol, tinidazol, secnidazol, ornidazol) los cuales causan daño irreversible en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y pérdida de la estructura helicoidal; los derivados del benzimidazol (albendazol y mebendazol) los cuales se unen a la β -tubulina e inhiben la función del citoesqueleto; la nitazoxanida que causa daño al ADN; la furazolidona la cual causa daño en los componentes celulares incluido el ADN; la quinacrina que inhibe la síntesis de ADN; y paromomicina que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas (Farthing, 2006; Tian, Chen, & Wen, 2010).

Sin embargo, el metronidazol es el fármaco de primera línea (Petri, 2003), siendo utilizado desde hace 35 años, además de aparecer como fármaco esencial en la lista de fármacos de la Organización Mundial de la Salud (Bendesky, Menéndez, & Ostrosky-Wegman, 2002).

Sin embargo, la falla en el tratamiento ocurre del 10-20 % de los casos, resultando en un pobre cumplimiento, reinfección y resistencia del parásito (Heresi et al., 2000).

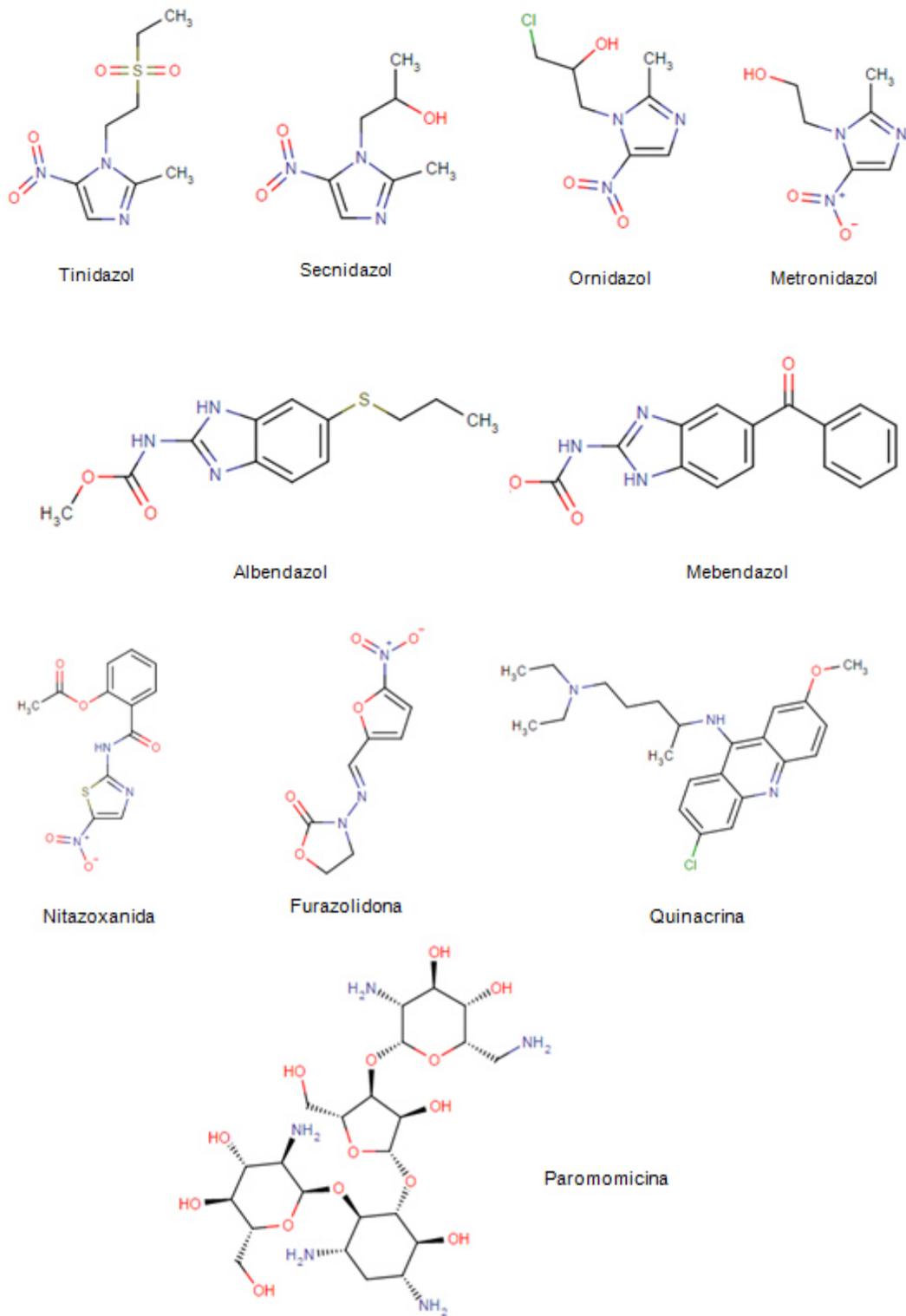


Figura 4. Estructuras químicas de agentes quimioterapéuticos para tratar la giardiasis

1.9.1 Metronidazol

El metronidazol es un derivado del 5-nitroimidazol, tiene un peso molecular de 171.16 g/mol, una fórmula molecular de $C_6H_9N_3O_3$ y un log P teórico de -0.15 a -0.46 (“metronidazole - chemicalize.org”, “DrugBank: Metronidazole (DB00916)”). Su nombre IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada, por sus siglas en inglés) es 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il)etan-1-ol.

1.9.1.1 Mecanismo de Acción

El metronidazol es el fármaco de elección y ha sido ampliamente estudiado, siendo el primer tratamiento efectivo y aprobado. Su mecanismo de acción involucra 4 fases: (a) introducción a la célula por difusión pasiva en una forma inactiva; (b) es convertido a su forma activa y tóxica en el citoplasma mediante la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa (PFOR), reduciendo al grupo nitro del fármaco (Figura 5) ; (c) El efecto citotóxico del producto reducido daña las células mediante la formación de aductos de proteínas y ADN, interfiere con la respiración por obstrucción de la transferencia de electrones y la motilidad, de esta manera, entra al núcleo y se une al ADN dañando la estructura e integridad del mismo; y (d) liberación de los productos finales que son inactivos (Bendesky et al., 2002; Freeman, Klutman, & Lamp, 1997; Samuelson, 1999; Tian et al., 2010).

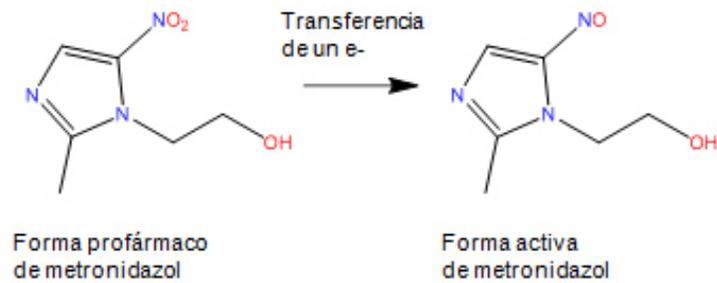


Figura 5. Forma profármaco de metronidazol y su forma activa (Land & Johnson, 1999).

1.9.1.2 Resistencia al Metronidazol

La OMS definió la fármaco-resistencia basada en aspectos clínicos y parasitológicos como la habilidad de un parásito a sobrevivir y/o multiplicarse después de la administración y absorción de un fármaco en dosis iguales o más altas que las usualmente recomendadas pero con los límites de tolerancia del sujeto (Minenoa & Avery, 2003).

La resistencia al metronidazol puede estar relacionada con la reducción de la actividad o inhibición de la enzima PFOR con la cual interacciona el fármaco (Land & Johnson, 1999; Tian et al., 2010; Upcroft & Upcroft, 2001).

La prevalencia de la resistencia clínica de *Giardia* se encuentra por arriba del 20 % de los casos reportados, incluyendo la resistencia cruzada entre tinidazol-metronidazol, nitazoxanida-metronidazol y metronidazol-albendazol (Ali & Nozaki, 2007; Samuelson, 1999; Tian et al., 2010).

1.9.1.3 Efectos Secundarios

Los efectos adversos del metronidazol incluyen perturbaciones gastrointestinales, náuseas, dolor de cabeza, leucopenia y sabor metálico, además puede conducir a efectos neurotóxicos gracias a su buena penetración hacia los fluidos cerebroespinales y sistema nervioso central (Freeman et al., 1997). También se han presentado efectos como ataxia, convulsiones y vértigo, lo cual conlleva a la interrupción del tratamiento y por consiguiente a la resistencia al fármaco (Amaral et al., 2006; Robertson et al., 2010).

Dada la facilidad de atravesar la barrera placentaria, este fármaco tiene un potencial teratogénico y embriotóxico en ratones, ratas y conejos; en humanos no se recomienda su uso durante el primer trimestre de embarazo. Por otra parte, el metronidazol presenta reacciones tipo disulfiram (Heresi et al., 2000), en las que existe un acúmulo de acetaldehído y el consiguiente cuadro clínico caracterizado por síntomas como taquicardia, hipertensión arterial y síntomas de intoxicación etílica.

La Agencia Internacional para la Investigación contra el cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) clasifica al metronidazol dentro del grupo 2B (posible carcinogénico para humanos), siendo un agente con evidencia insuficiente para ser considerado carcinógeno humano, pero con suficiente evidencia de carcinogenicidad animal. (Bendesky et al., 2002; Bendesky, 2001; Monographs, 1987).

El metronidazol es mutagénico en sistemas bacterianos, produciendo sustitución de pares de bases; sin embargo, en mamíferos su mutagenicidad es controvertida ya que existen suficientes evidencias para aceptar su actividad carcinogénica en animales experimentales, produciendo linfomas, cáncer pulmonar y fibroadenomas mamarios y adenocarcinomas.

1.10 Productos naturales como una alternativa terapéutica antiparasitaria

El uso de productos naturales con propiedades terapéuticas es tan antiguo como la civilización (Rates, 2001). Las plantas han sido utilizadas por siglos para el tratamiento de diversas infecciones y son una importante fuente para el descubrimiento de nuevos fármacos, particularmente para los antiparasitarios, debido a la larga asociación entre los parásitos, los humanos y los remedios herbales (Anthony, Fyfe, & Smith, 2005).

El uso de la medicina tradicional en los países desarrollados es una regla básica para mantener una buena salud (Hoareau & DaSilva, 1999). Sin embargo, en los países subdesarrollados donde la Giardiasis es endémica y la disponibilidad de los fármacos está limitada, las plantas y sus extractos son el único tratamiento disponible realzando el uso de la medicina tradicional (Tagboto & Townson, 2001); es por ello que su conocimiento debe ser examinado a profundidad (Anthony et al., 2005). Sin embargo, sólo en los últimos 20-30 años se han investigado científicamente para determinar su

efectividad, y si es posible, su modo de acción (Anthony et al., 2005; Anthony, Fyfe, Stewart, & McDougall, 2011).

En las plantas se encuentra una amplia gama de sustancias químicas con potencial activo, (Ocegueda, Moreno, & Koleff, 2005) las cuales fundamentan el desarrollo de nuevos fármacos selectivos, eficaces y con menos efectos adversos al huésped para tratar las parasitosis, siendo éstos los principales objetivos del uso de las plantas como agentes terapéuticos (Fabricant & Farnsworth, 2001; Singh, Verma, Kulshreshtha, & Agrawal, 2012). Además de que el costo y/o disponibilidad de los tratamientos convencionales no es accesible (Rates, 2001).

En nuestro país, aproximadamente el 15 % de la flora total tiene atributos medicinales. Sin embargo, se estima que sólo el 5% de las especies han sido validadas química, farmacológica y biomédicamente. Así mismo, la lista de especies de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos corresponde a tan sólo el 1 % del total de la flora de México (Ocegueda et al., 2005).

Las plantas representan una fuente importante de fármacos, considerando la amplia diversidad de moléculas con potencial medicinal que pueden hacer una contribución en la búsqueda de nuevos productos bioactivos. La explotación potencial de estos recursos requiere el estudio etnobotánico, químico, biológico, farmacológico y toxicológico, siendo así un proceso multidisciplinario (Amaral et al., 2006; Anthony et al., 2005; Rates, 2001) .

En los últimos años, se ha reportado actividad anti-giardiasica de plantas tales como *Justicia spicigira* (muicle), *Lippia berlandieri* (orégano), *Psidium guajava* (guayabo), *Punica granatus* (granado), *Magnifera indica* (mango) (Ponce-Macotela, Navarro-Alegria, Martinez-Gordillo, & Álvarez-Chacón, 1994), *Lippia* spp. (Ponce-Macotela, Rufino-González, González-Maciel, Reynoso-Robles, & Martínez-Gordillo, 2006), *Achyrocline satureioides* (marcela), *Eugenia uniflora* L. (pitanga) (Brandelli, Giordani, De Carli, & Tasca, 2009), *Syzygium aromaticum* (ajo) (Machado et al., 2011), *Phlebophyllum kunthianum* (Singh et al., 2012), *Sambucus ebulus* (Rahimi-Esboei et al., 2013), entre otras.

A pesar del avance científico referente a las plantas y a sus compuestos químicos con potencial bioactivo, se necesita buscar y desarrollar nuevos medicamentos utilizando la medicina tradicional y que éstos no sean tóxicos. (Said-Fernández, 2007).

1.11 Citotoxicidad Celular

La evaluación de la actividad citotóxica de productos derivados de plantas medicinales, se ha convertido en un método de uso muy frecuente en los últimos años, como parte de un largo y laborioso proceso de evaluación y desarrollo de un fitofármaco o de un nuevo medicamento.

En dichos experimentos se incuban células de una línea celular específica, a una serie de la preparación de interés, para obtener valores reproducibles de citotoxicidad de cada producto evaluado. (Said-Fernández *et al.* 2007)

1.11.1 Definición de Citotoxicidad Celular

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado.

Los ensayos de citotoxicidad capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Arencibia-Arrebola, Rosario-Fernández, & Cuerverco-Sánchez, 2003).

La citotoxicidad suele llevarse a cabo en líneas celulares establecidas y obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés) tales como: Células Vero, Células CHO, Células SiHa, Células Hela, entre otras (Said-Fernández, 2007).

1.11.2 Línea Celular Vero

La línea celular Vero (Figura 6) son células epiteliales derivadas de un mono verde africano adulto (*Cercopithecus aethiops*), las cuales datan del 27 de Marzo de 1962 aisladas por Y. Yasumura y. Kawakita en la Universidad de Chiba, Japón.

Es una línea celular que ha sido ampliamente utilizada para estudios de replicación de virus y ensayos en placa. Dichas células fueron sometidas a la ATCC con la finalidad de establecer un banco de células, registradas como ATCC CCL-81.

Adicionalmente, el uso continuo de animales es un problema ético y económico desde diversos puntos de vista (Sheets, 2000). Por lo cual, el uso de una línea celular como esta es utilizada ampliamente para extrapolar la citotoxicidad en humanos.

La morfología de las células Vero es epitelial, mientras que las propiedades de cultivo son adherentes. Las condiciones de cultivo de esta línea celular son 95% de aire y 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C (“Vero ATCC ® CCL-81™ *Cercopithecus aethiops* kidney normal”)

ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**

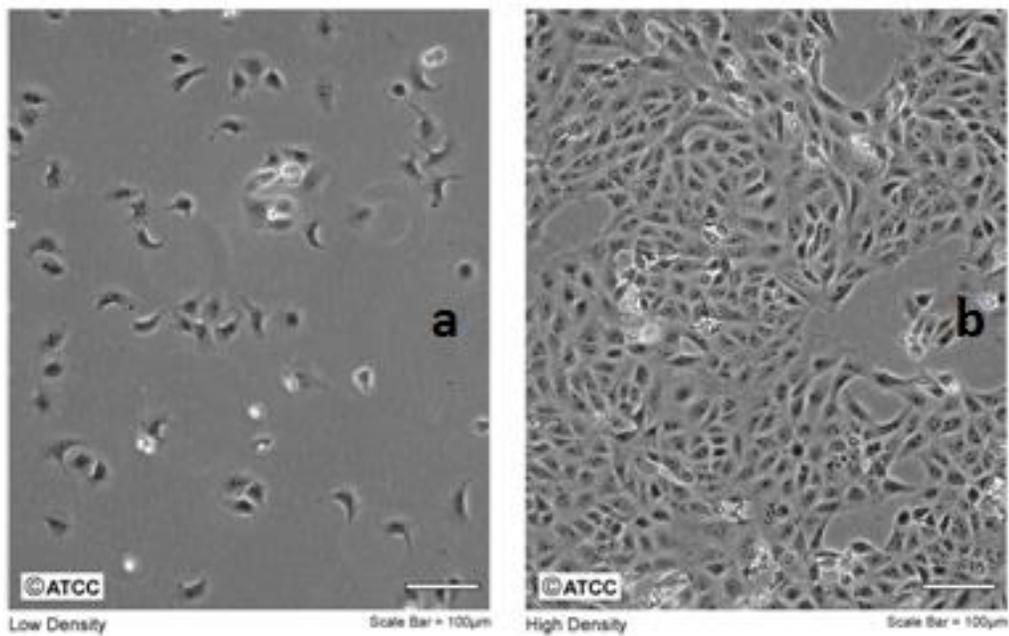


Figura 6. Células Vero. a) Baja densidad y b) Alta densidad (“Vero ATCC ® CCL-81™ Cercopithecus aethiops kidney normal”)

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

Previamente, nuestro equipo de trabajo analizó los extractos hexánicos, clorofórmicos y metanólicos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia* a una concentración de 300 µg/ml para observar su potencial anti-*Giardia*. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Actividad anti-*Giardia* de extractos metanólicos, hexánicos y clorofórmicos de *F. vulgare* y *C. aurantifolia*

Planta	Extracto	% Inhibición a 300µg/ml
<i>F. vulgare</i>	E. Hexánico	94
	E. Clorofórmico	83
	E. Metanólico	79
<i>C. aurantifolia</i>	E. Hexánico	75
	E. Clorofórmico	87
	E. Metanólico	70

Acorde a los resultados, el extracto hexánico de *F. vulgare* presentó la mayor inhibición del crecimiento de *G. lamblia* a 300 µg/ml, mientras que de *C. aurantifolia* lo presentó el extracto clorofórmico. Sin embargo, en este proyecto se usarán compuestos puros identificados previamente por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM) de los extractos hexánicos de ambas plantas, debido a su disponibilidad.

2.1 *Foeniculum vulgare*

Nombre Botánico: Foeniculum vulgare Mill. Sinónimos: *Foeniculum foeniculutn*

Nombres Comunes: Hinojo (Bolivia, México, Ecuador, España), Fenykl (República Checa), Fenchel (Alemania), Fenouil (Francia) y Finocchio (Italia) (Badgujar, Patel, & Bandivdekar, 2014)

2.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Orden: Apiales

Familia: Apiaceae

Género: *Foeniculum*

Especie: vulgare

(Badgujar et al., 2014)

2.1.2 Descripción

F. vulgare (Figura 7) es una planta aromática originaria de la región sur del mediterráneo pero gracias a su cultivo se distribuye en Asia, Norteamérica y Europa. Alcanza a crecer cerca de los dos metros de altura, es recta y cilíndrica con múltiples ramas. Las hojas crecen 40 cm de longitud, sus frutos son pequeños y oscuros (Badgujar et al., 2014; Swaminathan et al., 2012).

El aceite esencial del fruto de *F. vulgare* está compuesto mayoritariamente por trans-anetol, fenchona, estragol y α -felandreno (Senatore et al., 2013). Contiene además, flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos, cumarinas y taninos (Rahimi & Ardekani, 2013).

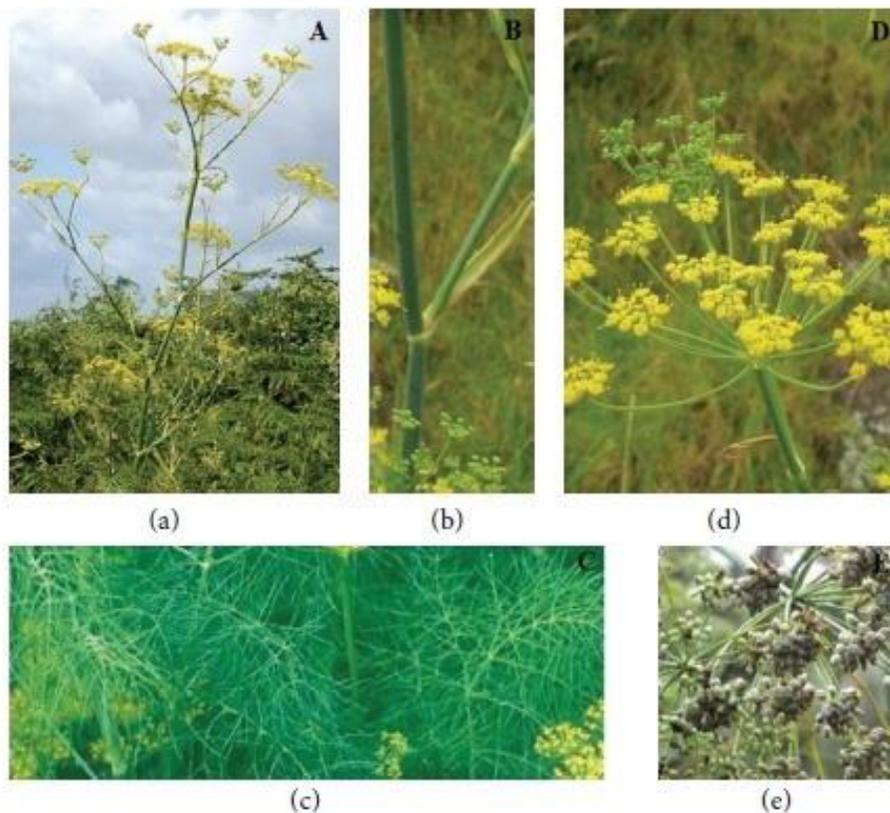


Figura 7. *F. vulgare* en su hábitat natural (a), tallos (b), hojas (c) inflorescencias y flores (d) y frutos (e) (Badgujar et al., 2014)

2.1.3 Usos Etnobotánicos

Se cree que *F. vulgare* es una de las más antiguas plantas medicinales usadas en el mundo (Rahimi & Ardekani, 2013)

En la medicina tradicional se recomienda con mucha frecuencia para el tratamiento de numerosas enfermedades y sintomatologías, por ejemplo, antiemético, artritis, cáncer, cólicos infantiles, colon irritable, conjuntivitis, constipación, diarrea, dolor abdominal, dolor estomacal, fiebre, flatulencia, gastritis, insomnio, laxante, úlceras bucales, entre otras (Badgujar et al., 2014; Swaminathan et al., 2012). Ha sido utilizado para el aumento de libido y la concepción; como galactogogo y diurético.

F. vulgare se ha destacado por tratar problemas respiratorios como catarro, dolor de garganta y gripa (Özbek et al., 2003; Rahimi & Ardekani, 2013); así como carminativo, gastroprotector y hepatoprotector (Khazaei, Montaseri, Khazaei, & Khanahmadi, 2011; UNAM).

2.1.4 Algunos estudios químicos y farmacológicos

En el 2003, Özbek y colaboradores realizaron un estudio donde indican que el aceite esencial de *F. vulgare* tiene una potente acción hepatoprotectora contra el daño hepático inducido por tetracloruro de carbono en ratas (Özbek et al., 2003).

En el 2007, Birdane y colaboradores demuestran que el extracto acuoso de *F. vulgare* tiene efecto gastroprotector y propiedades antioxidantes (Birdane, Cemek, Birdane, Gülçin, & Büyükokuroğlu, 2007).

En 2011, Khazaei y colaboradores descubrieron que el fruto de *F. vulgare* induce la foliculogénesis en ratas (Khazaei et al., 2011).

En 2012, Swaminathan y colaboradores analizaron el extracto acuoso de las semillas de *F. vulgare* y encontraron que contribuye al funcionamiento de las células endoteliales (Swaminathan et al., 2012).

En ese mismo año, Esquivel-Ferriño y colaboradores encontraron que varios constituyentes del extracto hexánico de hojas y tallos de *F. vulgare* mostraron actividad antituberculosa ante cepas sensibles y resistentes (Esquivel-Ferriño et al., 2012).

Recientemente, en 2014 Zeng y colaboradores analizaron el aceite esencial de las semillas de *F. vulgare* y encontraron potencial antifúngico sobre *T. rubrum* ATCC4005, *T. tonsurans* 10-0400, *M. gypseum* 44693-1 y *T. mentagrophytes* 10-0060, resultando en una mejor actividad antifúngica que Fluconazol y Anfotericina B (Zeng, Chen, & Liang, 2015).

2.2 *Citrus aurantifolia*

Nombre Botánico: Citrus aurantifolia. Sinónimos: Limonia aurantiifolia Christm.

Nombres comunes: Lima, Limón agrio, Limón liso o Limonero (México), Citronvert (Francia), Limette o Limone (Alemania) y Limeira (Portugal) (Loizzo et al., 2012) (USDA, ARS, Program National Genetic Resources, & Germplasm Resources Information Network).

2.2.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: *Citrus* L.

Especie:

Citrus aurantiifolia
(Christm.) Swingle

(USDA, PlantsDatabase, & Natural Resources Conservation Service)

2.2.2 Descripción

C. aurantifolia (Figura 8) es originaria de la India y sureste asiático, principalmente habita en climas cálido y semicálido, además de semiseco y templado, desde el nivel del mar hasta los 2600m. Esta planta está adaptada a distintos hábitats, es cultivada en huertos familiares, asociada con vegetación circundante de bosque tropical caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, pastizal, bosque mesófilo de montaña y bosque mixto de pino-encino.

Es un árbol pequeño de unos 4 m de altura, de ramificación irregular y espinas fuertes y agudas. Las hojas son más anchas en la punta y en el centro que en la base, el soporte de la hoja es un poco alado. Sus flores son pequeñas, solitarias y blancas. Los frutos son pequeños, de 3 a 6cm de largo, y de color verde amarillento cuando maduros. La pulpa es abundante, muy ácida y las semillas son de color blanco y pequeñas (UNAM).

Los constituyentes no polares más abundantes de hojas y cáscara de *C. aurantifolia* son terpenos, como limoneno, linalol y acetato de linalil; y ácidos grasos como ácido palmítico y palmitato de metilo (Loizzo et al., 2012).



Figura 8. *C. aurantiifolia* en su hábitat natural (USDA, ARS, et al.).

2.2.3 Usos Etnobotánicos

C. aurantiifolia es utilizada frecuentemente para disminuir la fiebre, el resfriado común y la indigestión (Loizzo et al., 2012), ya que posee una amplia gama de ingredientes bioactivos con propiedades anti infecciosas y antiinflamatorias (Aibinu, Adenipekun, Adelowotan, Ogunsanya, & Odugbemi, 2007; Gharagozloo, Doroudchi, & Ghaderi, 2002). Además, es usada contra la obesidad, asma, hipertensión y sarampión (Ahounou et al., 2012).

2.2.4 Algunos estudios químicos y farmacológicos

En 2002, Gharagozloo y colaboradores analizaron el concentrado del jugo de lima y demostraron una inhibición significativa de la línea celular MDA-MB-453 de cáncer de mama humano y en la línea celular BRPMI-8866 (Gharagozloo et al., 2002).

En 2012, Loizzo y colaboradores demostraron que el extracto metanólico y fracciones hexánicas de *C. aurantifolia* poseen actividad inhibitoria acetilcolinesterasa (Loizzo et al., 2012).

En ese mismo año, Sandoval-Montemayor y colaboradores encontraron que varios compuestos del extracto hexánico de *C. aurantifolia* demostraron capacidad antituberculosa de cepas sensibles y resistentes (Sandoval-Montemayor et al., 2012).

Igualmente, en 2012, Spadaro y colaboradores analizaron el aceite esencial de *C. aurantifolia* y encontraron que posee una importante propiedad espasmolítica, la cual se debe a sus componentes mayoritarios: limoneno, beta-pineno, gamma-terpineno y citral (Spadaro, Costa, Circosta, & Occhiuto, 2012).

CAPÍTULO 3

3.1 HIPÓTESIS

La viabilidad de los trofozoítos de *G. lamblia* se ve afectada cuando son expuestos a los compuestos puros de *C. aurantifolia* y *F. vulgare*

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo general

Determinar el porcentaje de inhibición de los compuestos puros identificados en *C. aurantifolia* y *F. vulgare* sobre trofozoítos de *G. lamblia* *in vitro* así como determinar la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) de los compuestos más activos.

3.2.2 Objetivos Específicos

- Obtener la cinética de crecimiento de *G. lamblia* bajo condiciones axénicas.
- Determinar la CI₅₀ de metronidazol sobre trofozoítos de *G. lamblia*.
- Determinar la CI₅₀ de los extractos hexánicos de *F. vulgare* y *C. aurantifolia* sobre los trofozoítos de *G. lamblia*
- Determinar la CI₅₀ de los compuestos más activos de *F. vulgare* y *C. aurantifolia* sobre trofozoítos de *G. lamblia*.
- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los compuestos más activos de *F. vulgare* y *C. aurantifolia*.

CAPITULO 4

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos, Equipos y Materiales

Los reactivos utilizados para el mantenimiento celular y experimentación con *G. lamblia*, se indican a continuación:

El extracto de levadura fue obtenido de BD Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, USA). El ácido ascórbico, Cloruro de Sodio, Fosfato de Potasio Monobásico y Fosfato de Potasio Dibásico fueron obtenidos de J.T. Baker (Center Valley, PA, USA). La peptona de Caseína fue obtenida de Bioxon de México. La bilis bovina fue obtenida de MCD Lab (Tlalnepantla, Edo. de México, México). El hidróxido de sodio fue obtenido de MacronChemicals (Center Valley, PA, USA).

La Cisteína, Glucosa, Citrato de Fierro y Amonio, Dimetilsulfóxido, Formalina, Γ -terpineno, (1R)-(-)-Fenchona, Trans-anetol, Resorcinol, *Trans,trans*-2,4-undecadienal, (+)-Canfeno, Metilchavicol, Undecanal, (-)- α -Tujona, 2-Hidroxi-1-metil-1-ciclopenten-3-ona, 3-Metil-1,2-ciclopentanediona, Citronelol, Ácido Oléico, Ocimeno, Acetato de Fenchilo, (+)-Fenchona, *p*-Anisaldehído, Estragol, Terpinoleno, Pinacol, (-)-Carvona, Geranil Formato, Citral, Geraniol, Resorcinol, Óxido de linalol, 3-Metil-3-penten-2-ona, (+)-

Terpinen-4-ol, Ácido Palmítico, 4-Hexen-3-ona, *p*-Cimeno, Palmitato de Metilo y Metronidazol fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

El suero bovino fue amablemente donado por el Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social. La mezcla vitamínica 107 de Diamond utilizada para enriquecer el suero bovino fue adquirida de JRH Bioscences, Lenexa, Ks.

Los equipos utilizados fueron: Vórtex (Thermo Scientific, modelo m37615), Plancha de calentamiento con agitación (Thermo Scientific, modelo Cimarec), pH-metro (Fisher Scientific, modelo Orion 3 star), Incubadora (Lab-line barnstead, modelo 302), Refrigerador (Revco, modelo reb2304aba), Congelador vertical (Tor-rey, modelo CVPS-15MO), Microscopio óptico (Carl-zeiss, modelo Kf-2), Microscopio Invertido (Euromex), Balanza analítica (Ohaus, pionner), Autoclave automática (Tuttnauer, modelo 2540M), Estufa de secado (Thelco, modelo 17) , Máquina para hielo (Polar, modelo zb-20b) y una campana de acrílico de bioseguridad nivel 1.

Como materiales se emplearon viales de microcultivo de 1 ml que se adquirieron de Bellco, Vineland, E.U.A., los acrodiscos para esterilización por filtración de Millipore (Massachusetts, EUA), los filtros de papel Whatman (GE Healthcare, U.K.), y las cámaras de Neubauer o Hemacitómetro de Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Alemania.

Para los ensayos de citotoxicidad, los reactivos a utilizar se indican enseguida:

El medio RPMI 1640 1X + L-Glutamina y el Suero Fetal Bovino se obtuvieron de Gibco (E.U.A), el Azul de Tripano, la Tripsina-EDTA y el Dimetilsulfóxido fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA).

Se utilizó una incubadora de CO₂ marca Sanyo Modelo MCO-19 AIC (México), Microscopio invertido Reichert N° 368076 (Munich, Alemania), una Centrifuga marca Eppendorf y una campana de acrílico de bioseguridad nivel 1. Las cajas de poliestireno de 25 cm con filtro y las microplacas de 96 pozos fueron obtenidas de Sigma (St. Louis, MO, USA).

4.2 Material biológico

4.2.1 Material Vegetal

4.2.1.1 *F. vulgare*

Tallos y hojas de *F. vulgare* fueron recolectados en Pesquería, Nuevo León, México, en Julio de 2007. El material vegetal fue identificado y depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, con número de registro 024771.

4.2.1.2 *C. aurantifolia*

Las ramas y frutos de *C. aurantifolia* fueron recolectados en Montemorelos, Nuevo León, México en Mayo de 2009. El material vegetal fue identificado y depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México, con número de registro 024769.

4.2.2 Cepa de *G. lamblia*

Se utilizó la cepa de *G. lamblia* IMSS: 0989, la cual fue donada por el Dr. Javier Vargas Villarreal al Dr. Benito D. Mata Cárdenas del Laboratorio de Parasitología del Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Esta cepa se ha mantenido en resiembras continuas cada 72 h con un inóculo de 5,000 trofozoítos/ml en medio TYI-S-33 suplementado con 0.5ml de suero bovino y 0.5 mg/ml de bilis bovina (Keister, 1983).

4.3 Medio de Cultivo

4.3.1 Preparación del suero bovino

El suero bovino se obtuvo de sangre bovina colectada del rastro municipal en la ciudad de Monterrey, Nuevo León.

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 minutos. Después de este tiempo, el suero fue esterilizado utilizando papel filtro de diferentes tamaños (desde 10 mm a 0.22 micras de porosidad). El suero estéril se descomplementó por calentamiento a 56°C durante 30 minutos, agitando cada 5 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le adicionaron 25 ml de la mezcla vitamínica 107 de Diamond por cada litro de suero. Se esterilizó por filtración con acrodiscos Millipore de 0.22 µm y finalmente se distribuyó en alícuotas de 100 ml y se almacenó en frascos ámbar estériles de 125 ml a -20 ° C hasta su uso (Said-Fernández et al., 1988).

4.3.2 Preparación de bilis bovina

Se disolvieron 0.3 g de bilis bovina en 20 ml de PBS. Se esterilizó mediante filtración usando acrodiscos Millipore de 0.22 µm y la solución se almacenó en tubos estériles de borosilicato de 13 x 100 mm con tapón de rosca en alícuotas de 10 ml a 4° C hasta su uso (Keister, 1983).

4.4.3 Preparación del medio basal TYI-S-33

Para la preparación del medio de crecimiento de *G. lamblia* se disolvieron los reactivos de la tabla 3 en 900 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 10 N.

Tabla 3. Medio Basal TYI (Keister, 1983).

Reactivo	gramos/litro
Extracto de Levadura	10.00
Peptona de Caseína	20.00
Ácido Ascórbico	1.00
Cisteína	2.00
Cloruro de Sodio	3.30
Glucosa	10.00
Fosfato de Potasio Monobásico	1.00
Fosfato de Potasio Dibásico	0.60
Citrato Férrico Amónico	0.028

El medio se distribuyó en alícuotas de 5 ml en tubos de 13 x 100 mm de borosilicato con tapón de rosca. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min con 15 libras de presión. Los tubos se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

4.3.4 Medio Completo TYI-S-33

Al medio basal TYI-S-33 se le adicionó 0.5 ml de suero bovino (Figura 9.a) y 0.2 ml de bilis bovina (Figura 9.b). Posteriormente se incubaron 24 h a 37°C para confirmar su esterilidad; una vez aceptada la prueba de esterilidad se utilizaron para resiembras y experimentos (Figura 9.c).

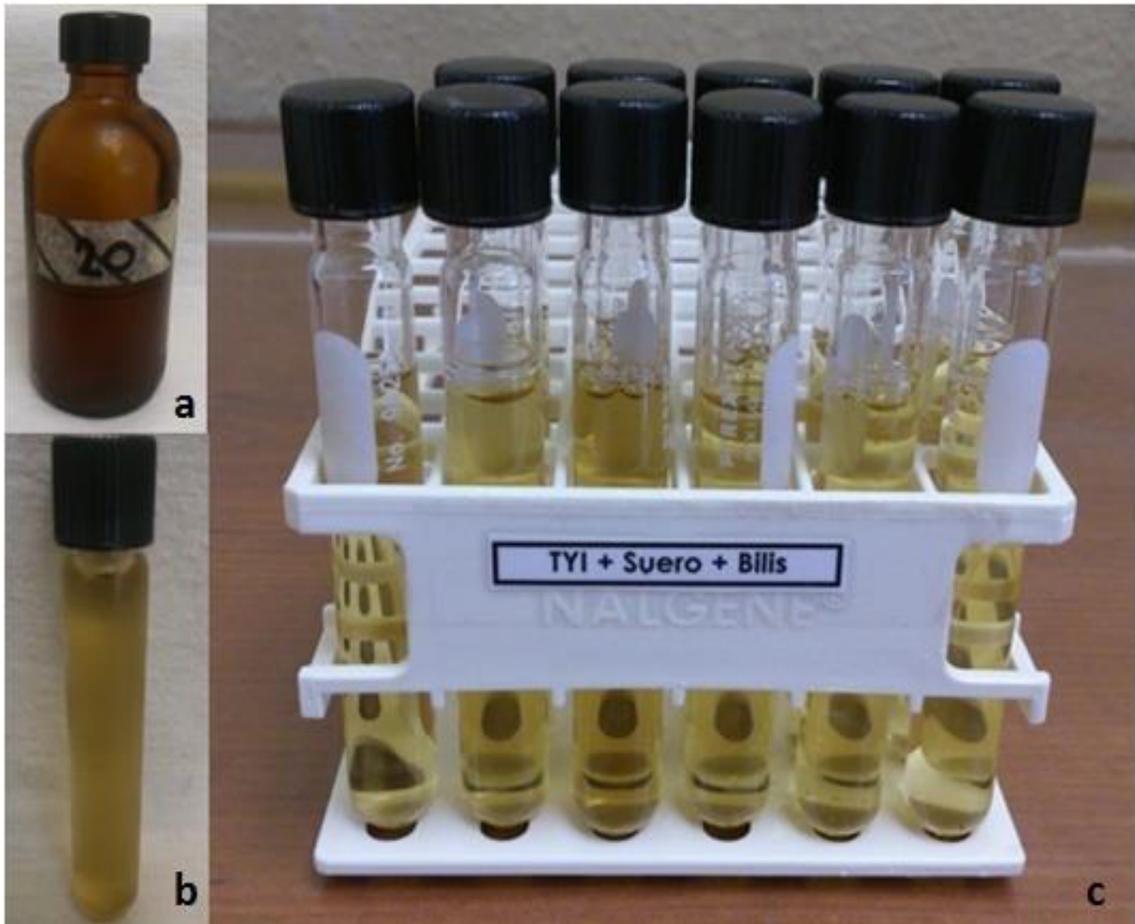


Figura 9. a) Suero bovino, b) Bilis bovina y c) Medio completo TYI-S-33

4.4 Cultivo axénico de *G.lamblia*

4.4.1 Resiembra

La cepa 0989: IMSS de *G. lamblia* se cultivó en 5 ml de medio basal TYI adicionado con 0.5 ml de suero bovino y 0.5 mg/ml de bilis bovina en tubos de borosilicato con tapón de rosca de 13 x 100 mm en incubación a 36.5 °C durante 72 h. Antes de cada resiembra, los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado fisiológico y su movilidad (Figura 10).

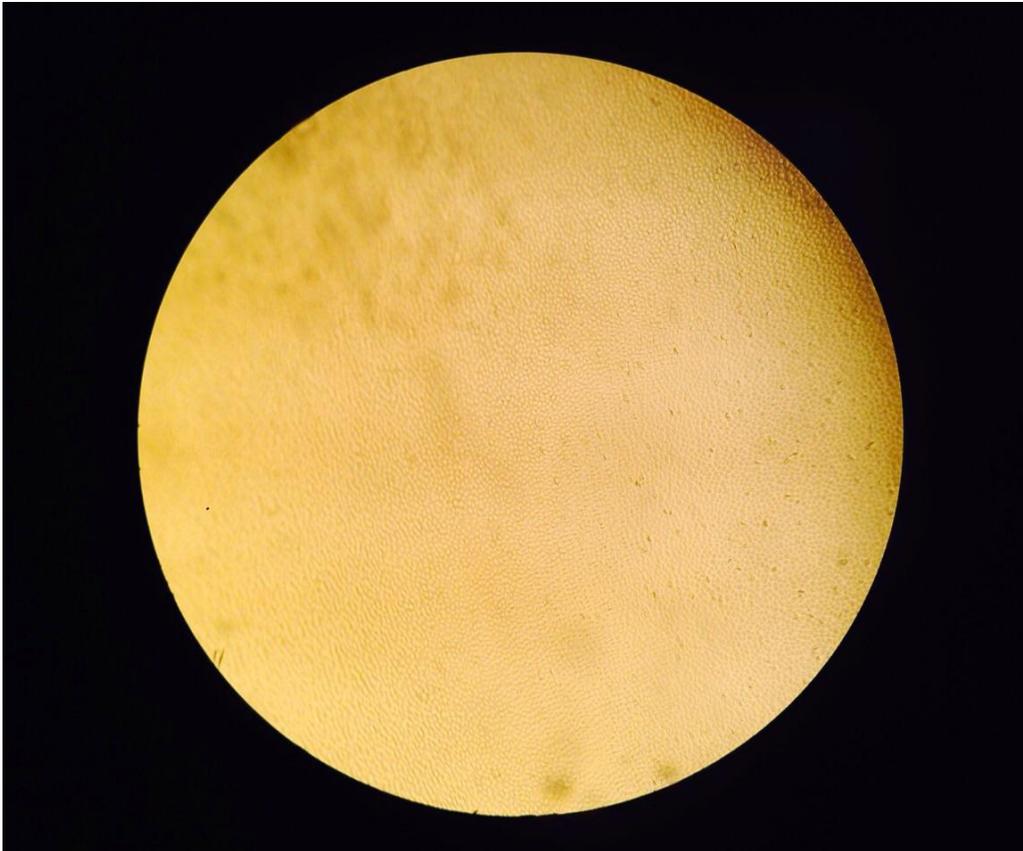


Figura 10. Cultivo axénico de *G. lamblia* en medio TYI-S-33

El cultivo que mostró la mayor densidad de trofozoítos fue colocado en agua-hielo por 10 minutos y el número de trofozoítos se determinó usando un hemacitómetro.

Posteriormente se inocularon 5,000 trofozoítos/ml a cada tubo con medio fresco. Los cultivos se sembraron cada 72 horas en la fase logarítmica de crecimiento (MATA-CÁRDENAS et al., 1998).

4.5 Parámetros de Crecimiento de *G. lamblia*

4.5.1 Cinética de Crecimiento de *G. lamblia*

La curva de crecimiento de *G. lamblia* se llevó a cabo por 144 horas inoculando 10,000 trofozoítos/ml en 5 ml de medio basal suplementado con 0.5 ml de suero bovino y 0.5 mg/ml de bilis bovina en tubos de borosilicato con tapón de rosca de 13 x 100 mm.

Los tubos se incubaron por 144 horas a 36.5°C y cada 24 horas se determinó el número de trofozoítos mediante el uso de un hemacitómetro para la obtención de sus parámetros de crecimiento. Cada ensayo se realizó por triplicado.

La densidad celular se determinó haciendo una dilución 1:10, utilizando 100µl de la cepa en 900 µl de formalina al 10%, utilizando un hemacitómetro para realizar los conteos celulares.

Se determinó el tiempo de generación mediante la ecuación 1:

$$G = \frac{t}{3.3} \log \frac{b}{B} \text{ (Ecuación 1)}$$

Dónde:

G es el tiempo de generación

t es el intervalo de tiempo de la fase exponencial

B es el número de organismos al comienzo del intervalo de tiempo

b es el número de organismos al final del intervalo de tiempo

Para determinar el tiempo de duplicación se utilizó la ecuación 2:

$$T_d = 0.693 G \quad (\text{Ecuación 2})$$

4.6 Pruebas de Actividad biológica

4.6.1 Actividad inhibitoria

La actividad anti-*Giardia* de los compuestos identificados mediante CG-EM de *C. aurantifolia* y *F. vulgare* se realizaron conforme a la metodología previamente descrita por (Mata-Cárdenas, Vargas-Villarreal, & González-Salazar, 2008; Molina-Salinas et al., 2006)

De los compuestos puros se pesaron 15 mg y se disolvieron en 125 μ l de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% en tubos eppendorf estériles y se dejaron incubar a temperatura ambiente cuando menos 24 h para que se esterilicen. Dicha concentración es la solución madre.

Se tomaron 50 μ L de la solución madre y se diluyeron en 950 μ L de agua destilada estéril, la nueva concentración será de 300 μ g en 50 μ l (6 μ g/ μ l).

A viales de microcultivo de 1ml se les adicionó 50 μ l que contenían 300 μ g de los compuestos puros y posteriormente se les añadieron 950 μ l de TYI-S-33 con una suspensión celular de 200,000 trofozoítos de *G. lamblia* en fase logarítmica (Figura 11). Se incubaron 24 h a 36.5°C. Como control se utilizaron 50 μ l de solución testigo adicionada con 950 μ l de agua bidestilada la cual contiene DMSO al 0.25%, esterilizada por filtración; dicha concentración no resulta tóxica para las células de *G. lamblia* (Rowley & Anderson, 1993).

Después del periodo de incubación los viales se enfriaron en agua hielo por 10 min y se determinó el número de trofozoítos/ml presentes en cada vial con ayuda de un hemacitómetro. Se utilizaron 100 μ l de la cepa en 900 μ l de formalina al 10% como fijador y se tomó en cuenta esta dilución para los cálculos. Los resultados fueron estimados como porcentaje de inhibición del crecimiento respecto a los controles no tratados. Cada ensayo se realizó por triplicado.

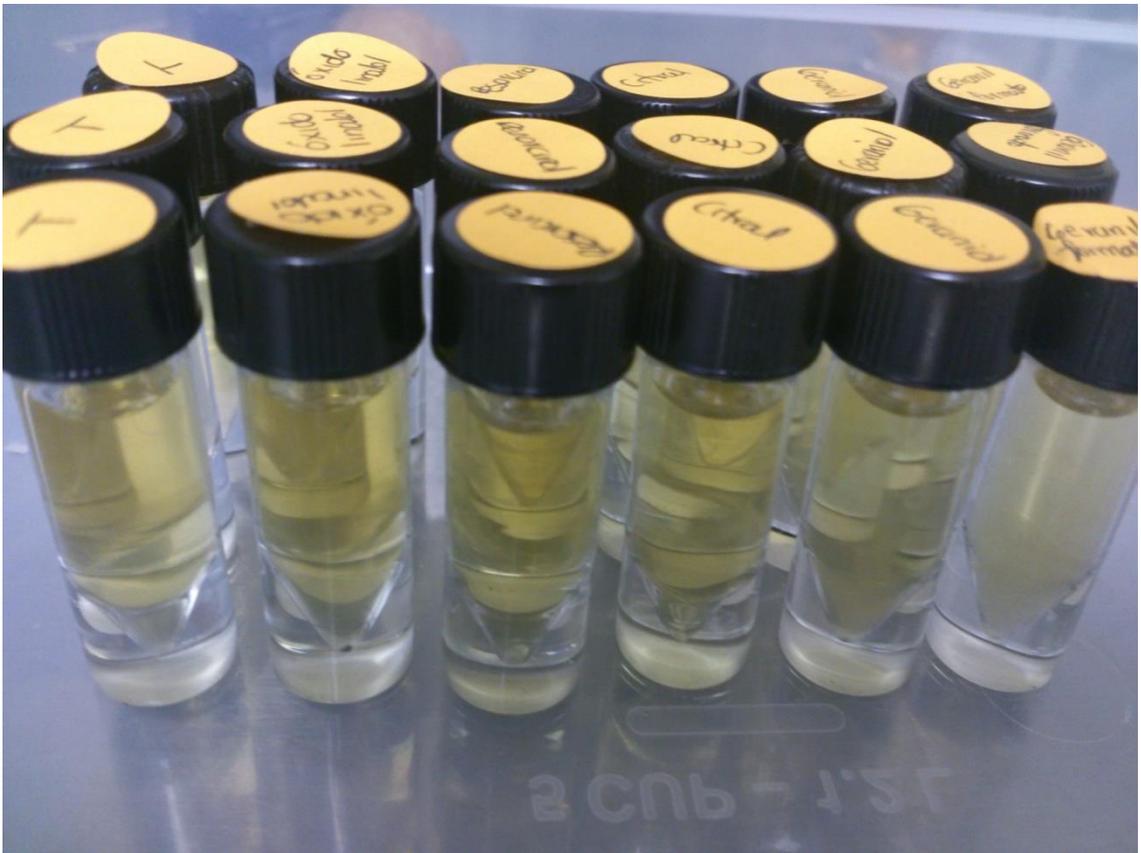


Figura 11. Experimento de compuestos puros para determinación de actividad inhibitoria en viales de microcultivo.

4.6.2 Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀)

4.6.2.1 Preparación de muestras y diluciones

De los extractos hexánicos y los compuestos puros se pesaron 15 mg y se disolvieron en 125 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) al 100% en tubos eppendorf estériles y se dejaron incubar a temperatura ambiente cuando menos 24 h para que se esterilicen. Dicha concentración es la solución madre.

Se tomaron 50 µL de la solución madre y se diluyeron en 950 µL de agua destilada estéril, la concentración será de 300 µg en 50 µl, ésta es la solución 1.

A partir de la solución 1 se realizaron 4 diluciones 1:1 tomando 500 µl de dicha solución con adición de 500 µl de solución testigo (400 µl de DMSO disueltos en 7,600 µl de agua estéril) hasta obtener concentraciones de 150, 75 37.5 y 18.75 µg en 50 µl respectivamente.

Para algunos compuestos donde el porcentaje de inhibición fue intermedio (50 %), se realizó una concentración de 600 µg en 50 µl, tomando 25 µL de la solución madre y se diluyeron en 975 µL de agua destilada estéril.

4.6.2.2 Bioensayo

A viales de microcultivo de 1ml se les adicionaron 50 μ l con concentraciones de 300, 150, 75, 37.5 y 18.75 μ g del extracto hexánico o de los compuestos puros y posteriormente se les adicionaron 950 μ l de TYI-S-33 con una suspensión celular de 200,000 trofozoítos de *G. lamblia* en fase logarítmica. Se incubaron 24 h a 36.5°C. Como control se utilizaron 50 μ l de solución testigo.

Después del periodo de incubación los viales se enfriaron en agua hielo por 10 min y se determinó el número de trofozoítos/ml presentes en cada vial con ayuda de un hemacitómetro (Figura 12). Se utilizaron 100 μ l de la cepa en 900 μ l de formalina al 10% como fijador y se tomó en cuenta esta dilución para los cálculos. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se utilizó la metodología Probit para la obtención de la CI₅₀ (Mata-Cárdenas et al., 2008) la cual se describe en la página 54.



Figura 12. Conteo de trofozoítos en Hemacitómetro.

4.7 Ensayo de Citotoxicidad de los compuestos puros más activos

El ensayo de citotoxicidad de exclusión con azul de tripano se llevó a cabo en el Centro de Investigación Biomédica del Noreste mediante la metodología escrita por Salvador Said-Fernández, 2007 .

4.7.1 Mantenimiento de línea celular Vero

La línea celular Vero fue mantenida y propagada en cajas de polipropileno de 25 cm con filtro con 3.5 ml de medio RPMI 1640 1X + L-Glutamina adicionado con suero fetal bovino (medio completo) tomando 1×10^5 células para cada resiembra. Las condiciones necesarias para este mantenimiento celular fueron la incubación por 5 días a una temperatura de 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

4.7.2 Ensayo de Citotoxicidad con azul de tripano

El ensayo de exclusión con azul de tripano es un método rápido que evalúa la viabilidad celular en respuesta a las condiciones desfavorables del ambiente. Es simple y económico.

Está basado en la habilidad de las células vivas de ser impermeables al azul de tripano. Cuando la integridad de la membrana está comprometida, hay

un consumo de colorante hacia el interior de las células, tornándolas azul oscuro con un anillo no refráctil alrededor de sí mismas, mientras que las células viables no son teñidas y aparecen claras con un anillo refráctil alrededor de ellas (Celis, 2005).

4.7.2.1 Azul de Tripano

El azul de tripano (Figura 14) es un colorante aniónico tetrasulfatado compuesto por un largo sistema planar, presenta una fórmula de $C_{34}H_{28}N_6O_{14}S_4$ y una masa molecular de 872.05. Es moderadamente soluble en agua, moderadamente soluble en etilen glicol y es insoluble en etanol. Es utilizado en tinciones biológicas con particular interés como colorante vital (Lundblad & Macdonald, 2010).

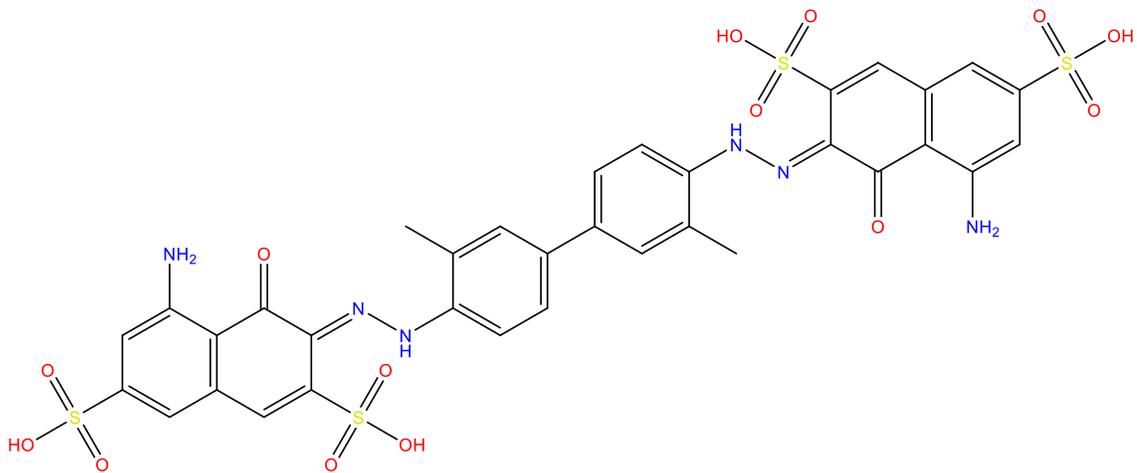


Figura 13. Estructura química del azul de tripano

4.7.2.2 Ensayo

4.7.2.2.1 Preparación de muestras y diluciones

Para llevar a cabo la preparación de las muestras se realizaron los siguientes procedimientos:

Se pesaron 1.8 mg de *Trans,trans*-2,4-undecadienal y se diluyó en 0.03125 ml de DMSO (solución madre de 57,600 µg/ml). De dicha solución madre se tomó un volumen de 5.2×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de 1,461.07 µg/ml. Las diluciones posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 5.2×10^{-3} ml de la solución madre con 5.2×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de 91.32 µg/ml.

Del compuesto (-)-Carvona se pesaron 2.5 mg y se diluyó en 0.03125 ml de DMSO (solución madre de 80,000 µg/ml). De dicha solución madre se tomó un volumen de 3.75×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de 1,472.39 µg/ml. Las diluciones posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 3.75×10^{-3} ml de la solución madre con 3.75×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de 92.02 µg/ml.

Del compuesto Citral se pesaron 3.2 mg y se diluyó en 0.03125 ml de DMSO (solución madre de 102,400 µg/ml). De dicha solución madre se tomó un volumen de 2.9296×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de 1,478.30 µg/ml. Las diluciones

posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 2.9296×10^{-3} ml de la solución madre con 2.9296×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de 92.39 $\mu\text{g/ml}$.

Del compuesto Geraniol se pesaron 3.4 mg y se diluyó en 0.03125 ml de DMSO (solución madre de 108,800 $\mu\text{g/ml}$). De dicha solución madre se tomó un volumen de 2.757×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de 1,479.41 $\mu\text{g/ml}$. Las diluciones posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 2.757×10^{-3} ml de la solución madre con 2.757×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de 92.46 $\mu\text{g/ml}$.

Del compuesto 4-Hexen-3-ona se pesaron 2.1 mg y se diluyó en 0.03125 ml de DMSO (solución madre de 67,200 $\mu\text{g/ml}$). De dicha solución madre se tomó un volumen de 4.464×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de 1,465.89 $\mu\text{g/ml}$. Las diluciones posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 4.464×10^{-3} ml de la solución madre con 4.464×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de 91.62 $\mu\text{g/ml}$.

Del compuesto *p*-Anisaldehído se pesaron 2.6 mg y se diluyó en 0.03125 ml de DMSO (solución madre de 83,200 $\mu\text{g/ml}$). De dicha solución madre se tomó un volumen de 3.6×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de 1,471.12 $\mu\text{g/ml}$. Las diluciones posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 3.6×10^{-3}

ml de la solución madre con 3.6×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de $91.94 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Del compuesto (+)-Canfeno se pesaron 3.9 mg y se diluyó en 0.0625 ml de DMSO (solución madre de $62,400 \mu\text{g}/\text{ml}$). De dicha solución madre se tomó un volumen de 4.80×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de $1,462.50 \mu\text{g}/\text{ml}$. Las diluciones posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 4.80×10^{-3} ml de la solución madre con 4.80×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de $91.41 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Del compuesto 3-Metil-1,2-ciclopentanediona se pesaron 5.1 mg y se diluyó en 0.0625 ml de DMSO (solución madre de $81,600 \mu\text{g}/\text{ml}$). De dicha solución madre se tomó un volumen de 3.676×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de $1,472.73 \mu\text{g}/\text{ml}$. Las diluciones posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 3.676×10^{-3} ml de la solución madre con 3.676×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de $92.05 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Finalmente del control positivo Metronidazol se pesaron 2.1 mg y se diluyó en 0.5 ml de DMSO (solución madre de $4,200 \mu\text{g}/\text{ml}$). De dicha solución madre se tomó un volumen de 4.76×10^{-3} ml para adicionar a un pocillo con una suspensión celular de 0.200 ml, la concentración final fue de $97.64 \mu\text{g}/\text{ml}$. Las diluciones posteriores se realizaron en relación 1:1 del volumen 4.76×10^{-3} ml

de la solución madre con 4.76×10^{-3} ml de DMSO puro hasta obtener una concentración final de $6.10 \mu\text{g} / \text{ml}$.

Las células Vero adheridas a las cajas de polipropileno se procedieron a despegar de la misma, utilizando 1 ml de Tripsina-EDTA 0.25% por 30 minutos hasta que la mayoría de las células se despeguen de la caja.

Después de este tiempo se tomó 1 ml de tripsina con las células y se colocó en tubos eppendorf estériles, se centrifugaron a 1,500 rpm por 5 minutos. Se retiró la tripsina y se le agregó 1 ml de medio completo RPMI.

Posteriormente se determinó la cantidad de células presentes, usando un hemacitómetro y se tomaron 15,000 células en $200 \mu\text{l}$ de medio, se depositó esta cantidad en cada pozo de una microplaca de 96 pozos y se incubaron 24 h a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 .

Trascurrido el tiempo, se aspiraron los $200 \mu\text{l}$ de medio y se les adicionaron $200 \mu\text{l}$ de medio RPMI completo nuevo y las diferentes concentraciones de los compuestos puros, el metronidazol y el control positivo (SDS al 1 %). Se incubaron otras 24 h a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Cada concentración se realizó por triplicado.

A cada pozo se le retiraron los $200 \mu\text{l}$ del medio gastado y se le adicionaron $50 \mu\text{l}$ de Tripsina-EDTA 0.25% y se dejaron incubar 30 minutos. Se agitaron suavemente y se aspiró la tripsina con las células despegadas colocándose en tubos eppendorf de 1.5 previamente etiquetados.

A cada pozo se le adicionó 50 µl de medio RPMI para lavarlo, se aspiró y se juntó en su tubo eppendorf, posteriormente se procedieron a contar en el hemacitómetro.

Se determinó el porcentaje de viabilidad de cada eppendorf tomando 60 µl de cada uno de ellos y se le adiciona 20 µl de azul de tripano al 0.2 %, se les dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente, se tomaron 20 µl de cada tubo y se colocaron en portaobjetos. Se contaron 100 células determinando el número de células muertas (teñidas de azul oscuro). El cálculo de porcentaje de viabilidad se realizó mediante la ecuación 3:

$$\% \text{ de viabilidad: } \frac{\text{Número de células no teñidas}}{\text{Número total de células}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Además de determinarles los porcentajes de viabilidad, se les determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀), mediante la prueba estadística Probit la cual se describe en la página 54.

De acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) de E.U.A. para el tamizaje de las plantas, un compuesto puro es considerado generalmente con efecto citotóxico activo si su valor de CI₅₀ es de 4µg o menos (Malek, Phang, Ibrahim, Norhanom, & Sim, 2011).

4.8 Análisis Estadístico

En cada experimento se obtuvo el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

La CI_{50} se calculó mediante la prueba estadística Probit (Gonzalez-Garza, Mata-Cárdenas, & Said-Fernández, 1989), el análisis Probit es un tipo de regresión usada para analizar variables de respuesta binomial (muertas o no), en donde se transforma la curva dosis-respuesta sigmoidea a una línea recta que después puede ser analizada por regresión. Además, es ampliamente utilizada en toxicología para determinar la toxicidad relativa de sustancias químicas en organismos vivos, mediante pruebas de la respuesta de dichos organismos bajo diferentes concentraciones de las sustancias (Kim Vincent).

Para ello la respuesta acumulada de los organismos se transforma a unidades probit (eje Y) (apéndice C, página 119) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual podemos interpolar el 50% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta (CI_{50}) (Alonso-Fernández, 2015).

En este proyecto se utilizó el programa estadístico GraphPadPrism 5.0 (E.U.A.) para las gráficas y los análisis Probit.

4.9 Manejo y disposición de Residuos

Los residuos biológicos generados se dispondrán conforme a lo establecido por el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, en los cuales los parásitos se colocarán en soluciones de cloro al 3 % durante 24 h y posteriormente se eliminarán mediante drenaje.

Los demás residuos generados se dispondrán conforme a lo establecido por los lineamientos de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

CAPÍTULO 5

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Numerosos estudios han demostrado que las plantas de diversas regiones del mundo poseen compuestos con actividad antiparasitaria.

Por ello, los esfuerzos para la búsqueda de dichos compuestos son muy importantes, así como también demostrar que sean seguros y eficaces al combatir las parasitosis.

En este trabajo nos enfocamos en evaluar algunos de los compuestos puros de *F. vulgare* y *C. aurantifolia* contra los trofozoítos de *G. lamblia* además de la evaluación de la citotoxicidad de los compuestos más activos con la finalidad de proponerlos como alternativa terapéutica anti-*Giardia*.

5.1 Parámetros de Crecimiento de *G. lamblia*

Los parámetros de crecimiento tales como el tiempo de generación (tiempo en el que toda la población de *G. lamblia* se divide) y el tiempo de duplicación (tiempo en el que una sola célula de *G. lamblia* se divide) que son necesarios para el mantenimiento celular en fase exponencial y condiciones fisiológicas adecuadas se mencionan en la tabla 4; además, se añaden el tamaño del inóculo y el tiempo de incubación previamente establecidas para llevar a cabo las pruebas biológicas.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento de *G. lamblia*

Parámetro	Resultado
Tiempo de generación	6.71 h
Tiempo de duplicación	4.65 h
Tamaño del inóculo	200,000 células/ml
Tiempo de Incubación	24 h

El tiempo de generación de la cepa IMSS: 0989 de *G. lamblia* es comparable con el tiempo de generación promedio de aislados *in vitro* reportados, el cual oscila de 6.6 h a 24.5 h (Lujan & Svård, 2011).

5.1.1 Cinética de crecimiento de *G. lamblia*

La figura 14 corresponde a una cinética de crecimiento típica de la cepa IMSS 09:89 de *G. lamblia*, la cual carece de la fase de adaptación del protozooario, indicando un estado metabólico y fisiológico óptimo.

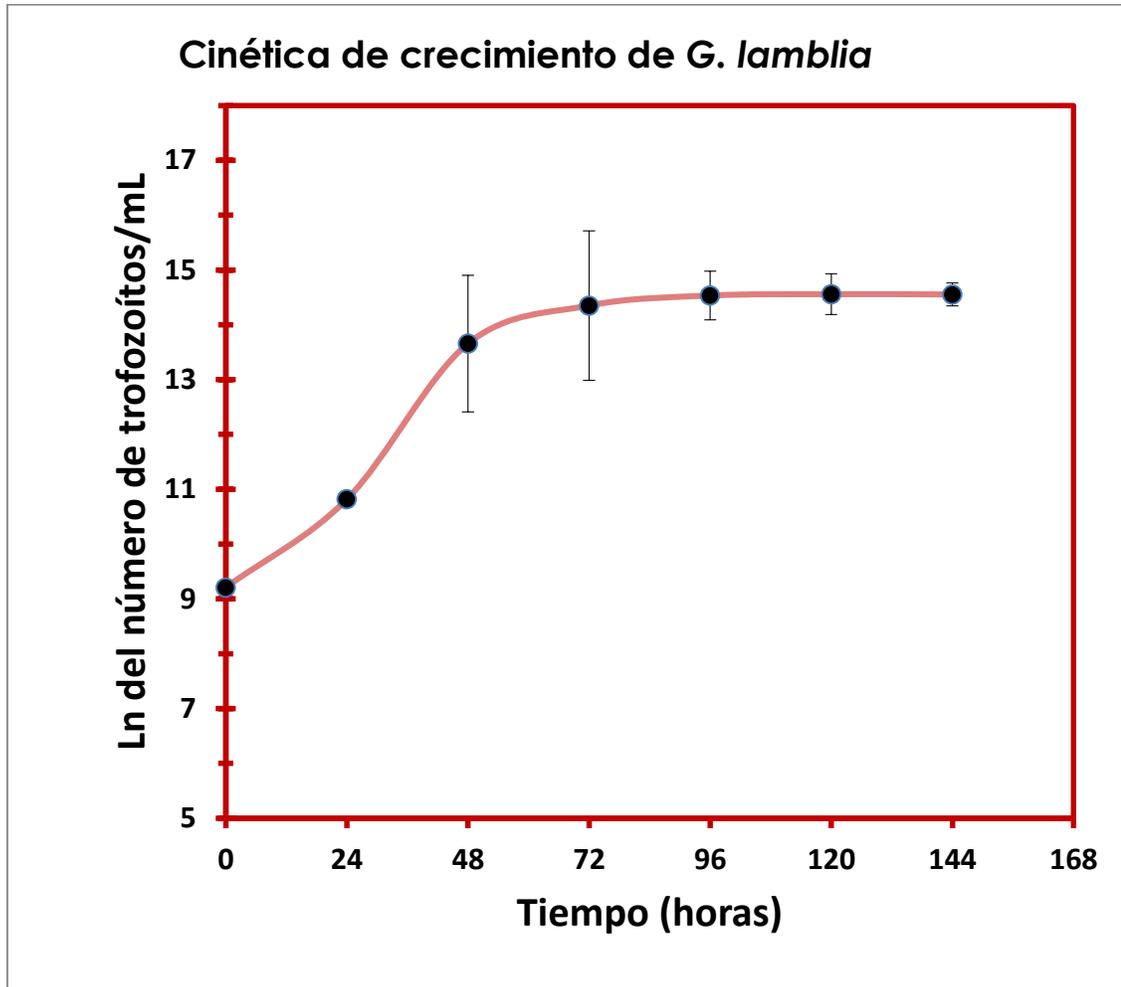


Figura 14. Cinética de crecimiento de *G. lamblia* con % de error estándar

5.2 Determinación de CI_{50} de Metronidazol sobre el crecimiento de *G. lamblia*

Para la determinación de la CI_{50} del metronidazol se realizó el método del microensayo (Mata-Cárdenas et al., 2008). Se graficó el número PROBIT vs concentraciones crecientes de 156.25 - 2,500 ng/ml de metronidazol. Para fines prácticos, al graficar se utilizaron concentraciones en ng/ml para obtener números positivos, el resultado se transformó a $\mu\text{g/ml}$.

La CI_{50} del metronidazol contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 15. La CI_{50} fue de 0.5213 $\mu\text{g/ml}$ (521.3 ng/ml) con un intervalo de confianza (IC) del 95% de 0.453-0.587 $\mu\text{g/ml}$, la cual se encuentra dentro del rango en la literatura reportada de 0.2 – 1 $\mu\text{g/ml}$. (Argüello-García, Cruz-Soto, Romero-Montoya, & Ortega-Pierres, 2004; Cruz et al., 2003; Gault, Reiner, & Gillin, 1985; Sousa & Poiars-Da-Silva, 1999).

CI_{50} de Metronidazol contra *G. lamblia*

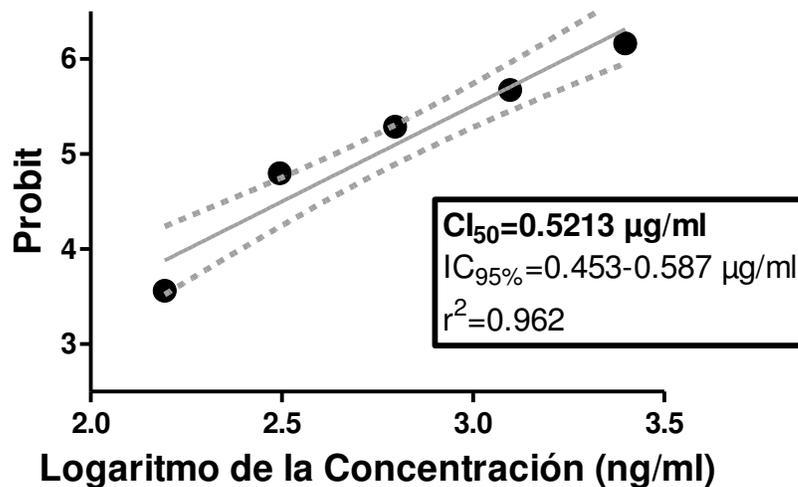


Figura 15. CI_{50} del Metronidazol contra *G. lamblia* con IC 95%

5.3 Determinación de CI_{50} de extractos hexánicos de *F. vulgare* y *C. aurantifolia*

5.3.1 *F. vulgare*

La CI_{50} del extracto hexánico de *F. vulgare* contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 16. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 37.5 – 600 $\mu\text{g/ml}$ del extracto. El resultado obtenido fue de 89.33 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 66.68 – 116.68 $\mu\text{g/ml}$.

CI_{50} del Extracto hexánico de *F. vulgare* contra *G. lamblia*

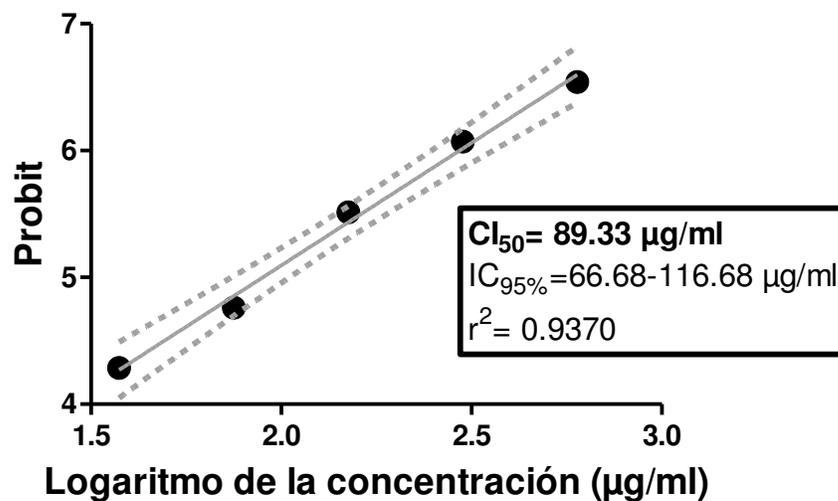


Figura 16. CI_{50} del extracto hexánico de *F. vulgare* sobre *G. lamblia* con IC 95%

5.3.2 *C. aurantifolia*

La CI_{50} del extracto hexánico de *C. aurantifolia* contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 17. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 75 – 600 $\mu\text{g/ml}$ del extracto. El resultado obtenido fue de 185.78 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 154.52 – 222.33 $\mu\text{g/ml}$.

CI_{50} del Extracto hexánico de *C. aurantifolia* contra *G. lamblia*

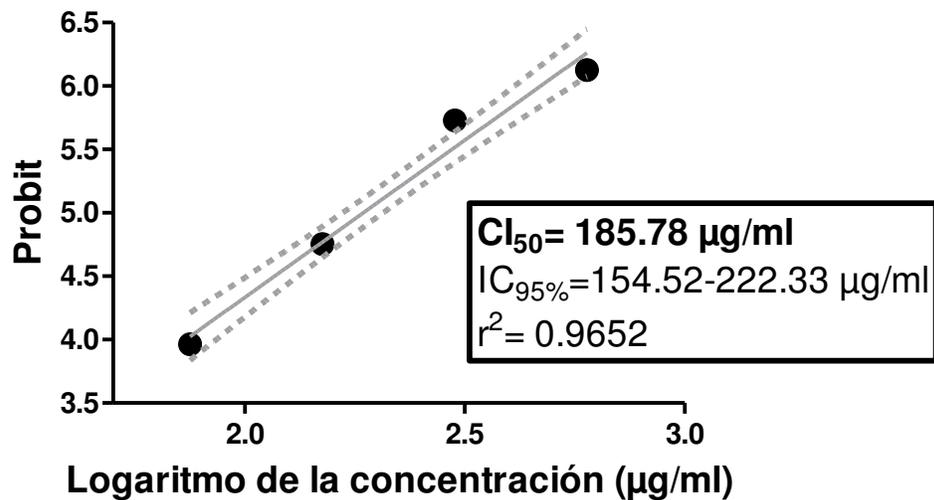


Figura 17. CI_{50} del extracto hexánico de *C. aurantifolia* sobre *G. lamblia* con IC 95%

5.4 Prueba de Actividad Biológica de los compuestos puros identificados por CG-EM

5.4.1 *F. vulgare*

La actividad biológica de los compuestos puros de *F. vulgare* se expresa en la Tabla 5 como porcentaje (%) de inhibición del crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* a una concentración de 300 µg/ml.

Tabla 5. % de Inhibición del crecimiento de *G. lamblia* vs compuestos puros de *F. vulgare*

Compuesto Puro	% Inhibición a 300 µg/ml
<i>Γ</i> -Terpineno	24 %
(1 <i>R</i>)-(-)Fenchona	6.5 %
Trans-anetol	17 %
Resorcinol	56 %
<i>Trans,trans</i> -2,4-undecadienal	97 %
(+)-Canfeno	61 %
Metil chavicol	20 %
Undecanal	25 %
(-)- α -Tujona	14%
2-Hidroxi-1-metil-1-ciclopenten-3-ona	53 %
Citronelol	38 %
Ácido oléico	24 %
Ocimeno	30 %
Acetato de fenchilo	38.5 %

Continuación de Tabla 5. % de Inhibición del crecimiento de *G. lamblia*
vs compuestos puros de *F. vulgare*

(+)-Fenchona	16 %
<i>p</i> -Anisaldehído	67 %
Estragol	49 %
Terpinoleno	30 %
Pinacol	2 %
(-)-Carvona	66 %

Los compuestos que tuvieron un % de inhibición ≥ 60 se consideraron activos. En base a esto, se observa que sólo 4 de ellos tuvieron actividad contra de *G. lamblia* a 300 $\mu\text{g/ml}$. Dichos compuestos son: *Trans,trans*-2,4-undecadienal (97 %), (+)-Canfeno (61 %), *p*-Anisaldehído (67 %) y (-)-Carvona (66 %), por lo cual fue necesario determinar la Cl_{50} .

Para los compuestos cuyo % de inhibición resultó ser < 60 % se les asignó una $\text{Cl}_{50} > 300 \mu\text{g/ml}$.

5.4.2 *C. aurantifolia*

La actividad biológica de los compuestos puros de *C. aurantifolia* se expresa en la Tabla 6 como porcentaje de inhibición del crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* a una concentración de 300 µg/ml.

Tabla 6. % de inhibición del crecimiento de *G. lamblia*
vs compuestos puros de *C. aurantifolia*

Compuesto Puro	% Inhibición a 300 µg/ml
Geranil Formato	32 %
Citral	92.5 %
Geraniol	65 %
Resorcinol	56 %
Óxido de Linalol	4%
3-Metil-3-penten-2-ona	51 %
(+)-Terpinen-4-ol	14 %
Ácido palmítico	0%
4-Hexen-3-ona	92 %
<i>p</i> -Cimeno	31 %
3-Metil-1,2-ciclopentanediona	72.5 %
(-)-Carvona	66 %
Ácido oléico	24 %
Pinacol	2 %
Palmitato de metilo	0 %

Como se observa en la tabla anterior, los compuestos que resultaron activos contra *G. lamblia* fueron 5: Citral (92.5 %), Geraniol (65 %), 3-Metil-1,2-ciclopentanediona (72.5 %), 4-Hexen-3-ona (92 %) y (-)-Carvona (66 %) por lo cual fue necesario determinar la CI_{50} .

Para los compuestos cuyo % de inhibición resultó ser < 60 % se les asignó una $CI_{50} > 300 \mu\text{g/ml}$.

5.5 Determinación de CI_{50} de los compuestos puros identificados por CG-EM

5.5.1 *F. vulgare*

5.5.1.1 Determinación de CI_{50} de *Trans,trans-2,4-undecadienal*

La CI_{50} del *Trans,trans-2,4-undecadienal* contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 18. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 18.75 – 300 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. El resultado obtenido fue de 72.11 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 57.67 – 90.15 $\mu\text{g/ml}$.

CI_{50} de *Trans,trans-2,4-undecadienal* contra *G. lamblia*

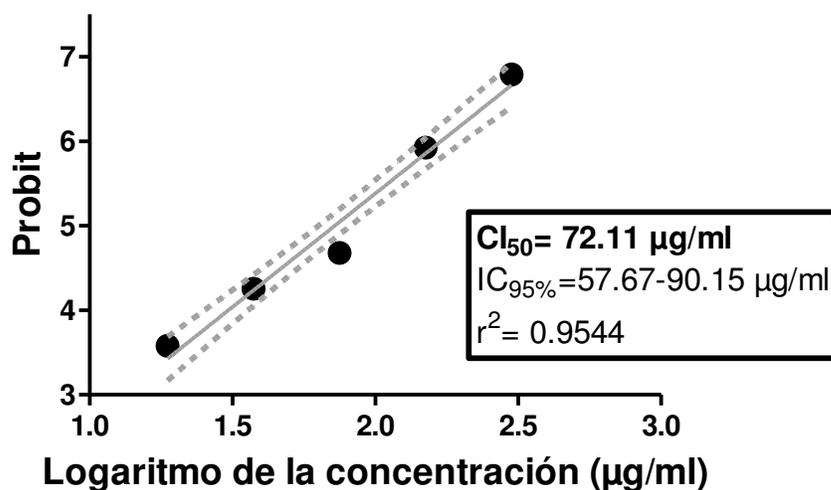


Figura 18. CI_{50} de *Trans,trans-2,4-undecadienal* sobre *G. lamblia* con IC 95%.

El compuesto *Trans,trans*-2,4-undecadienal (figura 19) es un aldehído insaturado de cadena larga, con una fórmula molecular de C₁₁H₁₈ O y un peso molecular de 166.26 g/mol, además cuenta con un Log P (coeficiente de reparto que mide la solubilidad de una sustancia y que indica su carácter hidrófilo [<0.5] o hidrófobo [>0.5]) de 3.08 (Parámetros calculados con el programa ChemBio Draw Ultra 13.0, PerkinElmer).

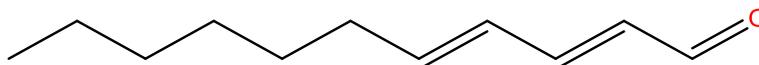


Figura 19. Estructura química de *Trans,trans*-2,4-undecadienal

Existe escasa información acerca de las propiedades del *Trans,trans*-2,4-undecadienal, ya que sólo se ha reportado que posee actividad antituberculosa frente a *Mycobacterium tuberculosis* (cepa sensible y fármacorresistente) a una concentración mínima inhibitoria de 25-50 µg/ml, donde además se indica que los aldehídos insaturados de cadena larga tienen un papel importante en su actividad antimicrobiana pudiendo actuar como surfactantes no iónicos (Esquivel-Ferriño et al., 2012).

En base a ello, nuestro estudio indica que además de presentar un efecto antituberculoso, el *Trans,trans*-2,4-undecadienal también presenta un efecto anti-*Giardia*.

5.5.1.2 Determinación de CI_{50} de (+)-Canfeno

La CI_{50} del (+)-Canfeno contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 20. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 37.5 – 600 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. El resultado obtenido fue de 181.13 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 158.12 – 207.96 $\mu\text{g/ml}$.

CI_{50} de (+)-Canfeno contra *G. lamblia*

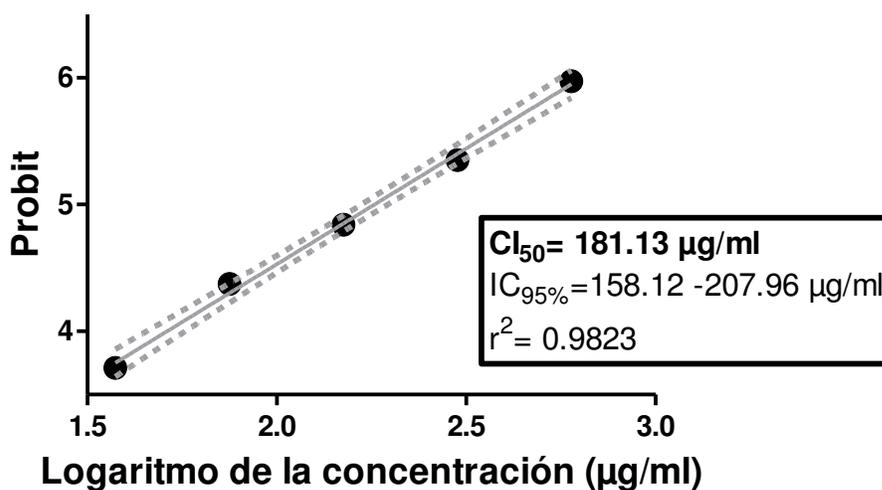


Figura 20. CI_{50} de (+)-Canfeno sobre *G. lamblia* con IC 95%.

El compuesto (+)-Canfeno (figura 21) es un monoterpeno bicíclico, con una fórmula molecular de $C_{10}H_{16}$ y un peso molecular de 136.24 g/mol, además cuenta con un Log P de 2.95.

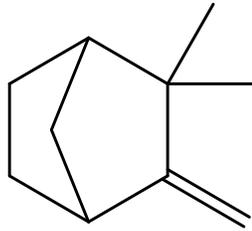


Figura 21. Estructura química de (+)-Canfeno

Es usado como aditivo alimenticio saborizante y es bien conocido para la preparación de fragancias y como ingrediente cosmético. Además, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) le ha concedido un estatus GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro, por sus siglas en inglés) (Tiwari & Kakkar, 2009).

Se ha reportado que el (+)-Canfeno podría ser utilizado como agente hipolipidémico debido a sus excelentes resultados *in vivo* e *in vitro* (Vallianou, Peroulis, Pantazis, & Hadzopoulou-Cladaras, 2011). Además podría presentar propiedades farmacológicas relacionadas con el dolor y la inflamación (Quintans-Júnior et al., 2013). Dicho compuesto, presenta propiedades crioprotectivas y antioxidantes en estudios sobre macrófagos alveolares murinos (Tiwari & Kakkar, 2009).

5.5.1.3 Determinación de CI_{50} de *p*-Anisaldehído

La CI_{50} del *p*-Anisaldehído contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 22. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 37.5 – 600 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. El resultado obtenido fue de 196.78 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 165.57 – 234.42 $\mu\text{g/ml}$.

CI_{50} de *p*-Anisaldehído contra *G. lamblia*

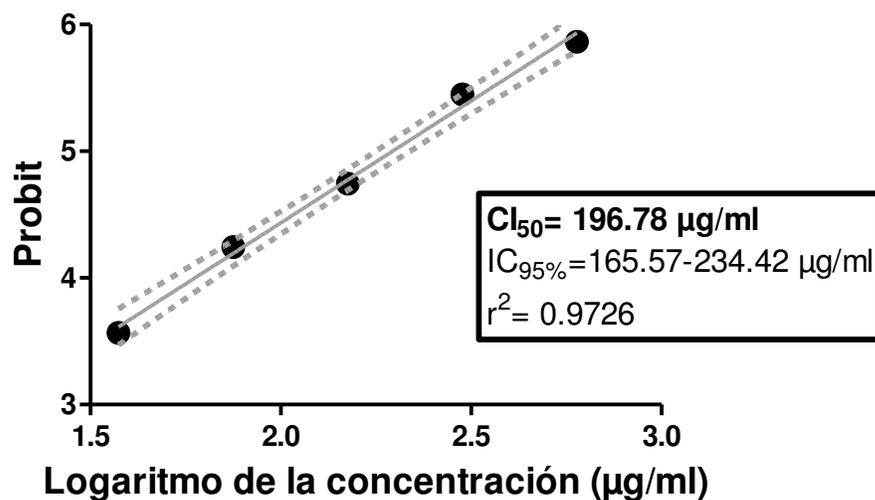


Figura 22. CI_{50} de *p*-Anisaldehído sobre *G. lamblia* con IC 95%.

El compuesto *p*-Anisaldehído (figura 23), también llamado 4-metoxibenzaldehído, pertenece al grupo de los aldehídos. Presenta una fórmula molecular de $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2$ y un peso molecular de 136.15 g/mol, además cuenta con un Log P de 1.65.

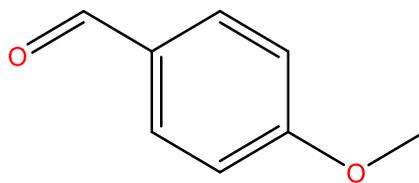


Figura 23. Estructura de *p*-Anisaldehído

Previamente se ha reportado que este compuesto posee una potente actividad antifúngica contra *Saccharomyces cerevisiae* a una concentración de 1% v/v, al afectar genéticamente al metabolismo normal de los aldehídos (Yu et al., 2010).

Por otra parte, el *p*-Anisaldehído es un fungicida efectivo contra diferentes especies de *Candida*, tanto sensibles como resistentes al fluconazol a concentraciones de 250-600 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Shreaz et al., 2011). Además, se ha reportado que el compuesto presenta actividad frente a los ácaros *Dermatophagoides farinae* y *Dermatophagoides pteronyssinus* (Lee, 2004).

5.5.1.4 Determinación de CI_{50} de (-)-Carvona

La CI_{50} del (-)-Carvona contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 24. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 37.5 – 600 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. El resultado obtenido fue de 207.01 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 162.18 – 267.30 $\mu\text{g/ml}$.

CI_{50} de (-)-Carvona contra *G. lamblia*

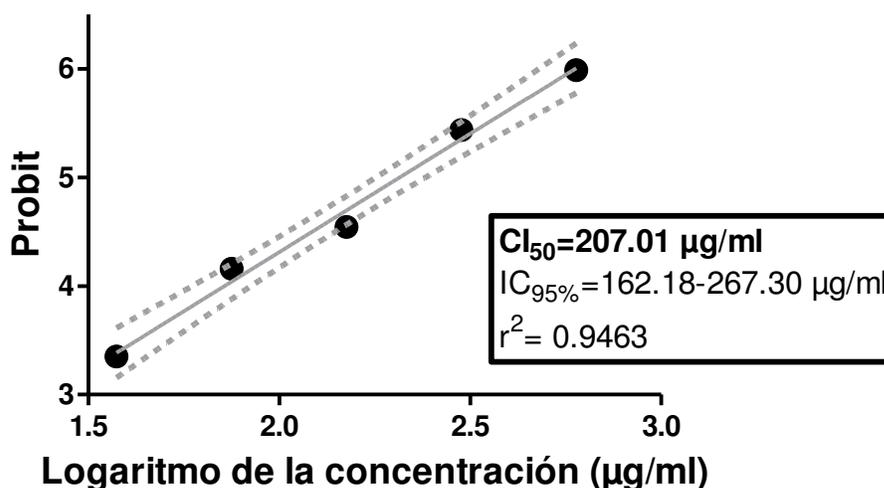


Figura 24. CI_{50} de (-)-Carvona sobre *G. lamblia* con IC 95%

La Carvona es un monoterpeno cetónico enantiomérico que existe como (-)-Carvona y (+)-Carvona. Sin embargo, para nuestros estudios analizamos la (-)-Carvona (Figura 25) debido a su accesibilidad. Este enantiómero es también llamado R(-)-carvona, L-carvona. Presenta una fórmula molecular de $C_{10}H_{14}O$ y un peso molecular de 150.22 g/mol, además cuenta con un Log P de 1.75.

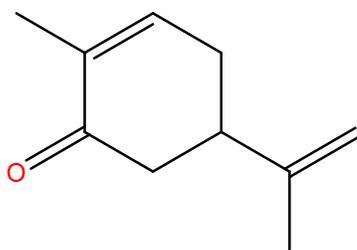


Figura 25. Estructura química de (-)-Carvona

Se ha reportado que la carvona, en sus formas enantioméricas, tiene actividad frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; sin embargo, a nivel ultraestructural solo la (-)-carvona causa daño en la membrana celular de la bacteria, por lo cual se sugiere que las carvonas presentan alta afinidad por la membrana celular de la bacteria y podrían influenciar sus propiedades estructurales o funcionales (Mun et al., 2014).

Por otra parte, dicho compuesto tiene un efecto antiespasmódico *in vivo*, actuando como un bloqueador de los canales de calcio (Souza, Da Rocha, De Souza, & Marçal, 2013). Presenta también actividad antinociceptiva pudiendo ser asociada con un decremento de la excitabilidad de los nervios periféricos en animales de experimentación (Gonçalves et al., 2008). La (-)-Carvona, interacciona con el receptor GABA_A como un bloqueador no competitivo, el mayor blanco terapéutico de los insecticidas (Sánchez-Borzzone, Delgado-Marín, & García, 2014).

Es necesario mencionar que los terpenos pueden contener uno o más carbonos asimétricos que exhiban actividad óptica y además se ha visto que la

quiralidad de los terpenos influye en las propiedades del olor, actividad biológica y modo de acción (Souza et al., 2013).

Aundado a esto, el carácter lipofílico de los monoterpenos cíclicos favorece su migración de la solución acuosa a la membrana celular con una consecuente expansión e incremento en la fluidez. Esta incorporación a la membrana celular produce una inhibición de las enzimas embebidas a la membrana (Zanini, Silva-Angulo, Rosenthal, Rodrigo, & Martínez, 2014).

5.5.2 *C. aurantifolia*

5.5.2.1 Determinación de CI_{50} de Citral

La CI_{50} del Citral contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 26. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 37.5 – 600 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. El resultado obtenido fue de 58.44 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 43.51 – 73.33 $\mu\text{g/ml}$.

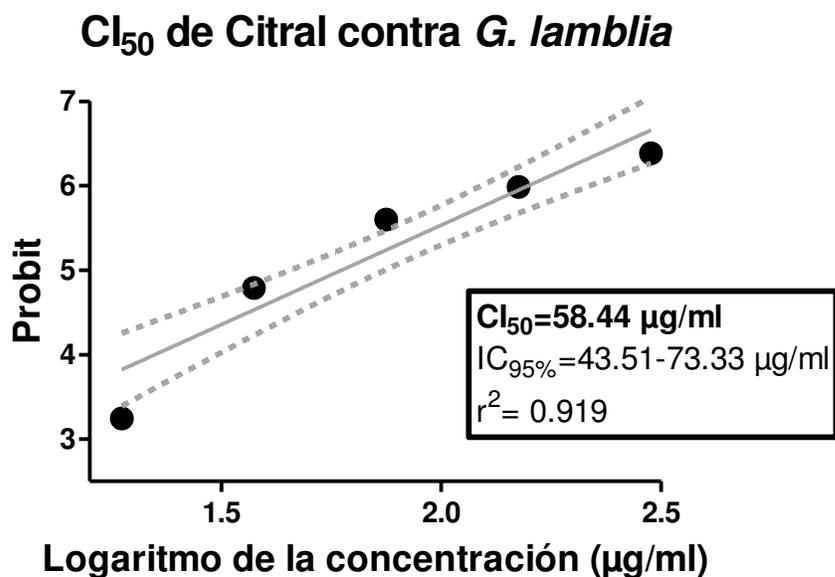


Figura 26. CI_{50} de Citral sobre *G. lamblia* con IC 95%

El Citral (figura 27), también llamado 3,7-dimetil-2,6-octadienal, es un monoterpeno de cadena abierta. Es una mezcla de 2 isómeros, cis-isómero neral y trans-isómero geranial y es un monoterpeno de cadena abierta

(Nishijima et al., 2014). Presenta una fórmula molecular de $C_{10}H_{16}O$ y un peso molecular de 152.24 g/mol, además cuenta con un Log P de 2.18.

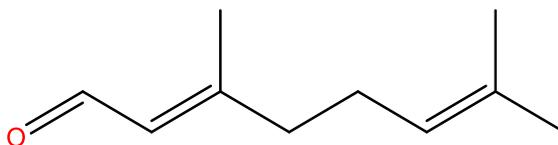


Figura 27. Estructura química del Citral

Este compuesto es el componente mayoritario de muchos aceites esenciales de plantas medicinales (Nishijima et al., 2014; Shen, Sun, & Guo, 2015) y es usado como aditivo alimenticio y como material de fragancia en los cosméticos. Tiene una gran aceptación en las organizaciones regulatorias de Estados Unidos de América y Europa y se le ha concedido un estatus GRAS (Chaouki, Leger, Liagre, Beneytout, & Hmamouchi, 2009).

Se ha reportado que el citral posee actividad antiparasitaria, debido a que bloquea la metacicloogénesis (proceso de diferenciación de epimastigote a trypomastigote) de *Trypanosoma cruzi in vitro*. Además la CI_{50} del citral sobre los epimastigotes y trypomastigotes fue de 42 y 14.2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A nivel ultraestructural se observó que induce a daños estructurales en los parásitos como redondeo del cuerpo, vacuolización celular y mitocondrias abultadas las cuales resultan de cambios en la cadena de electrones que puede producir radicales libres que oxidan y dañan a los lípidos, proteínas y ADN (Cardoso & Soares, 2010).

Además, es activo frente a *Leishmania amazonensis* en su forma promastigote y amastigotes con un CI_{50} de 8.0 $\mu\text{g/ml}$ y 25 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. A nivel ultraestructural mostró drásticas alteraciones en la morfología de los parásitos (Santin et al., 2009). Ha mostrado actividad frente a otras especies de *Leishmania* como *Leishmania tropica*, *Leishmania major* y *Leishmania infantum* con un CI_{50} de 34,36 y 42 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente; causando apoptosis, desorganización nuclear y arresto del ciclo celular en las fases G0/G1 donde G0 es la fase de reposo y la G1 es la fase de periodo de crecimiento del citoplasma y organelos (Machado et al., 2012).

Por otra parte, el citral posee actividad antimicótica frente a una gran variedad de microorganismos como: *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* a concentraciones de 125, 39.72, 250 y 62.5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Mesa-Arango et al., 2009). También, es activo frente a *Trichophyton mentagrophytes* a una concentración de 0.1 mg/ml donde a nivel ultraestructural produce una degeneración celular prominente, causando daños en la membrana y en las mitocondrias principalmente (Park et al., 2009). Se ha reportado también, actividad antifúngica *in vitro* contra *Candida albicans* a una concentración mínima inhibitoria de 64 $\mu\text{g/ml}$ (Clerya et al., 2014). Igualmente, posee actividad antifúngica *in vitro* contra *Magnaporthe grisea* con un IC_{50} de 40.71 $\mu\text{g/ml}$. Además, causa un daño significativo a nivel ultraestructural dañando la pared celular de la hifa.

Se ha demostrado también, que el Citral es un efectivo antimicrobiano que no cuenta con el riesgo de desarrollar resistencia en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Listeria monocytogenes* (Apolónio, Faleiro, Miguel, & Neto, 2014); además de aumentar la susceptibilidad de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* a los antibióticos. (Zanini et al., 2014). Se ha reportado su efecto antituberculoso sobre *Mycobacterium tuberculosis* a una concentración mínima inhibitoria de 50-100µg/ml en cepa sensible y resistente, respectivamente (Sandoval-Montemayor et al., 2012).

Aunado a esto, el Citral presenta un efecto antiinflamatorio (Shen et al., 2015). En modelos experimentales inhibe las respuestas al dolor neurogénico e inflamatorio, reduce la hiperalgesia mecánica y exhibe una significativa acción gastroprotectiva inducida por fármacos anti-inflamatorios no esteroides (Nishijima et al., 2014). Presenta además, un efecto relajante en las contracciones de íleon *in vivo* (Sadraei, Ghannadi, & Malekshahi, 2003).

Otros autores han investigado al Citral como un prometedor agente anticancerígeno, ya que posee actividad antitumoral frente a la línea celular MCF-7 de cáncer de mama por inducción apoptótica (Chaouki et al., 2009) y antiproliferativo frente a la línea celular NB4 de leucemia promielocítica aguda por inducción apoptótica (Xia et al., 2013).

Ante tales investigaciones que indican que el Citral es un compuesto prometedor, las investigaciones han sido más profundas. Tanto que se realizó

un ensayo de mutación en *Salmonella typhimurium* y se reportó que el citral no presenta actividad mutagénica (Gomes-Carneiro, Felzenszwalb, & Paumgartten, 1998). En 2001 el Programa Nacional de Toxicología (NTP, por sus siglas en inglés) realizó un reporte técnico acerca de la toxicología y carcinogénesis del Citral en ratas y ratones hembras y machos y reportaron que no causa cáncer en dichos animales de investigación. Sin embargo, existe un incremento en linfomas en ratones hembras pudiendo ser asociado a la ingesta de 2,000 ppm de citral (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 2003).

El efecto de los terpenos puede ser atribuído a su habilidad para afectar el embalaje de los lípidos intracelulares. Asimismo, son conocidos por causar disrupción en la membrana de las bacterias (Zanini et al., 2014).

5.5.2.2 Determinación de CI_{50} de Geraniol

La CI_{50} del Geraniol contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 28. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 75 – 600 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. El resultado obtenido fue de 229.61 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 180.45 – 278.44 $\mu\text{g/ml}$.

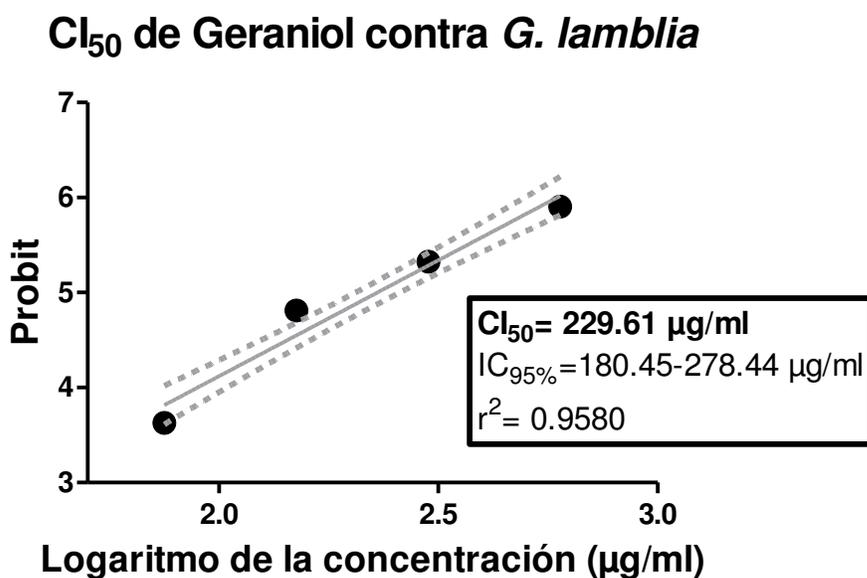


Figura 28. CI_{50} de Geraniol sobre *G. lamblia* con IC 95%

El Geraniol (figura 29), también llamado 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol, es un monoterpeno acíclico que presenta una fórmula molecular de $C_{10}H_{18}O$ y un peso molecular de 152.25 g/mol, además cuenta con un Log P de 2.49.

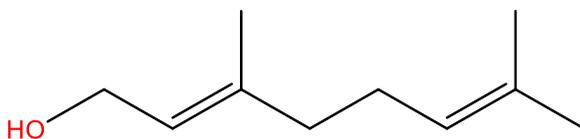


Figura 29. Estructura química del Geraniol

Este compuesto es utilizado en perfumes, como ingrediente de cosméticos (Tiwari & Kakkar, 2009), como aditivo del sabor y repelente de insectos. Le ha sido concedido el estatus GRAS por la FDA de EUA (Ahmad et al., 2011; de Carvalho et al., 2013) y aprobado por el comité de expertos en aditivos de saborizantes de la FAO/WHO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/ Organización Mundial de la Salud) (Tiwari & Kakkar, 2009).

Se ha reportado que el Geraniol presenta actividad antihelmíntica *in vitro* frente a *Caenorhabditis elegans* a una CI_{50} de 66.7 $\mu\text{g/ml}$; además posee efecto anti-larvicida *in vitro* contra el parásito nemátodo *Contracaecum* sp presente en los peces (Barros et al., 2009).

Por otra parte, el Geraniol incrementa significativamente la eficacia de las β -lactamas (efecto sinergista), quinolonas (efecto pleiotrópico) y del cloranfenicol contra aislados farmacoresistentes de especies gram negativas (Lorenzi et al., 2009).

También se ha reportado que el Geraniol presenta efecto gastroprotectivo en animales de experimentación (de Carvalho et al., 2013),

eficacia neuroprotectora en desórdenes neurodegenerativos como enfermedad de Parkinson *in vivo* (Rekha, Selvakumar, Sethupathy, Santha, & Sivakamasundari, 2013) y efecto neuroprotector *in vivo* tras la exposición crónica a acrilamida (Prasad & Muralidhara, 2014). Además, reduce los niveles plasmáticos de lípidos, optimiza las actividades de las enzimas metabolizadoras de lípidos y previene la inflamación inducida por dieta aterogénica (Jayachandran, Chandrasekaran, & Namasivayam, 2014). Por otra parte, presenta efecto inmunomodulatorio y antiinflamatorio en monocitos humanos *in vitro* (Murbach Teles Andrade, Conti, Santiago, Fernandes, & Sforcin, 2014).

Sin embargo, se ha explorado más su uso como anticancerígeno ya que ha sido capaz de potenciar el efecto anti-tumoral del 5-fluorouracilo a través de su acción en la permeabilidad de la membrana celular en el cáncer colorrectal TC118 (Carnesecchi et al., 2004). También, inhibió el crecimiento de Cáncer de Colon Humano (Caco-2) en un 70 % a una concentración de 400 μ M. Adicionalmente, inhibió (solo o en combinación con gencitabina) la proliferación de la línea celular BXPC-3 de cáncer pancreático humano (Jin, Sun, Miao, Liu, & Zhong, 2013). Por otra parte, presenta efecto anticancerígeno (solo o en combinación con docetaxel) en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata *in vivo* e *in vitro* (Kim et al., 2011), igualmente presenta efecto antiproliferativo en el cáncer de piel de modelos *in vivo* (Chaudhary, Siddiqui, Athar, & Alam, 2013). Todo lo anterior lo hace un candidato prometedor en la quimioprevención de la carcinogénesis renal en modelos animales (Ahmad et al., 2011).

5.5.2.3 Determinación de CI_{50} de 3-Metil-1,2-ciclopentanediona

La CI_{50} de 3-Metil-1,2-ciclopentanediona (MCP) contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 30. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 75 – 600 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. El resultado obtenido fue de 207.01 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 167.49 – 255.27 $\mu\text{g/ml}$.

CI_{50} de 3-metil-1,2-ciclopentanediona contra *G. lamblia*

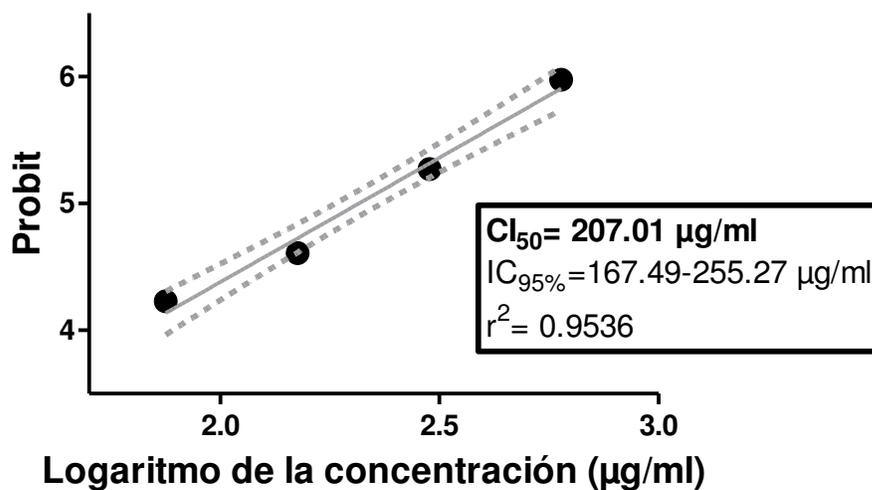


Figura 30. CI_{50} de 3-Metil-1,2-ciclopentanediona sobre *G. lamblia* con IC 95%

El MCP (figura 31), es una cetona cíclica que presenta una fórmula molecular de $C_6H_8O_2$ y un peso molecular de 112.13 g/mol, además cuenta con un Log P de 0.13.

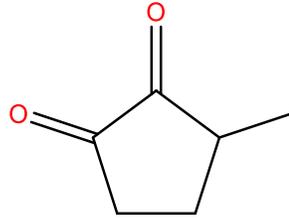


Figura 31. Estructura química de 3-Metil-1,2-ciclopentanediona

En la literatura existen relativamente pocos usos del MCP, ya que se ha reportado hasta la fecha que este compuesto reduce significativamente la expresión de genes pro-inflamatorios *in vivo* en riñones de rata (Chung et al., 2007), y que podría tener aplicaciones terapéuticas para trastornos relacionados con la inflamación en un estudio *in vitro* en el modelo celular YPEN-1 (Choi et al., 2007). Además, se ha reportado que el MCP del extracto del café posee actividad antioxidante (Kim et al., 2002).

Nuestro estudio brinda la primera evidencia de que el MCP podría ser utilizado como un compuesto con actividad anti-*Giardia*.

5.5.2.4 Determinación de CI_{50} de 4-Hexen-3-ona

La CI_{50} de 4-Hexen-3-ona contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 32. Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 18.75-300 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto. El resultado obtenido fue de 34.35 $\mu\text{g/ml}$ con IC 95% de 26.73 – 42.46 $\mu\text{g/ml}$.

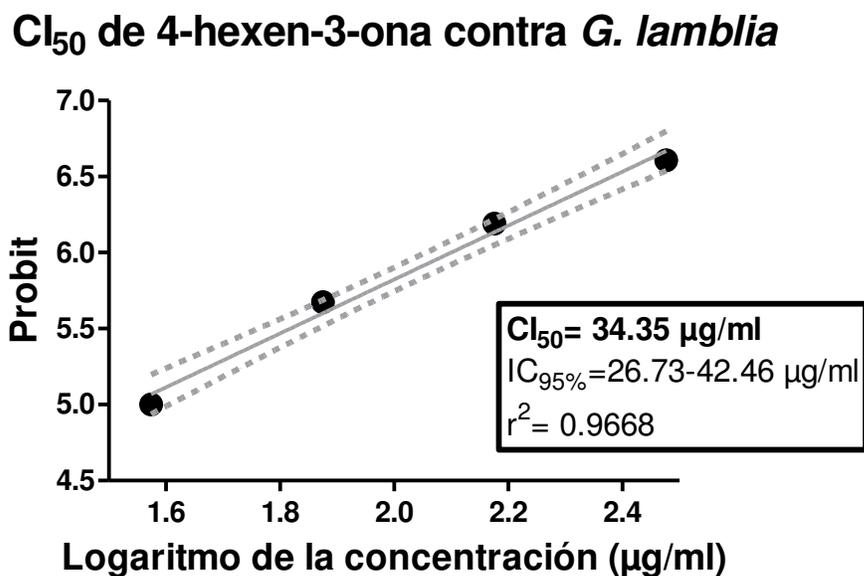


Figura 32. CI_{50} de 4-Hexen-3-ona sobre *G. lamblia* con IC 95%

El compuesto 4-Hexen-3-ona (figura 33), es una cetona acíclica que presenta una fórmula molecular de $C_6H_{10}O$ y un peso molecular de 98.14 g/mol, además cuenta con un Log P de 1.25.

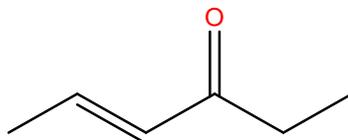


Figura 33. Estructura química de 4-Hexen-3-ona

En la literatura se ha reportado que posee actividad antituberculosa frente a la bacteria *M. tuberculosis* a una concentración de 50-100 µg/ml en las cepa sensible y resistente, respectivamente (Sandoval-Montemayor et al., 2012).

Nosotros sugerimos que el bajo peso molecular y la lipofilicidad ayudan al compuesto 4-Hexen-3-ona a difundirse a través de la membrana celular e inducir reacciones biológicas ya que esta cetona α,β insaturada es susceptible de ataque nucleofílico por grupos amino o tiol (RNH_2 , RSH) presentes en proteínas desencadenando reacciones desfavorables en el parásito.

5.5.2.5 Determinación de CI_{50} de (-)-Carvona

La CI_{50} del (-)-Carvona contra los trofozoítos de *G. lamblia* se observa en la figura 24 (ver página 72). Se utilizó la prueba estadística PROBIT vs concentraciones crecientes de 37.5 – 600 µg/ml del compuesto. El resultado obtenido fue de 207.01 µg/ml con IC 95% de 162.18-267.30 µg/ml.

5.6 Ensayo de Citotoxicidad de los compuestos puros más activos

5.6.1 *F. vulgare*

La tabla 7 indica la citotoxicidad de los compuestos puros de *F. vulgare* expresado como CI_{50} contra células Vero.

Tabla 7. CI_{50} de compuestos puros de *F. vulgare* contra células Vero

Compuesto	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC 95% ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Trans,trans</i> -2,4-undecadienal	588.84	586.68 – 591.00
(+)-Canfeno	494.31	492.17 – 496.45
<i>p</i> -Anisaldehído	540.75	538.64 – 542.87
(-)-Carvona	350.75	348.44 – 353.06
Metronidazol*	83.56	80.98 – 86.14

*Control positivo

En lo que concierne al (+)-Canfeno, se ha reportado que este compuesto no es citotóxico en células hepáticas humanas HepG2 a concentraciones de hasta 100 μM (13.624 $\mu\text{g/ml}$) (Vallianou et al., 2011).

Respecto a la citotoxicidad del *p*-Anisaldehído, se ha reportado que dicho compuesto presenta muy baja toxicidad (15% a 320 $\mu\text{g/ml}$) en mioblastos cardiacos H9c2 (Shreaz et al., 2011).

Por otra parte, se ha reportado que la (-)-Carvona induce un efecto citotóxico menor a neuronas de rata con concentraciones inferiores a 4mM (600.880 µg/ml) no causando daño en la membrana celular, en tanto que en células de riñón de embrión humano HEK293 exhibe baja citotoxicidad (Concentración Efectiva 50 cerca de 5 mM (751.100 µg/ml)) (Gonçalves et al., 2013).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer (NCI, por sus siglas en inglés) de E.U.A. para el tamizaje de las plantas, un compuesto puro es considerado generalmente con efecto citotóxico activo si su valor de CI_{50} es de 4 µg o menos (Malek et al., 2011). En base a esto, los compuestos puros de *F. vulgare* no presentan citotoxicidad.

Los resultados de citotoxicidad y los de actividad anti-*Giardia* nos permiten hacer uso del Índice de Selectividad (IS), el cual es la relación cuantitativa entre la actividad citotóxica frente a una línea celular de mamífero y la actividad antiprotozoaria de un compuesto determinado. Para realizar dicho IS se hace uso de la ecuación 3:

$$IS = \frac{IC\ 50\ actividad\ citotóxica}{IC\ 50\ actividad\ antiprotozoaria} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Un valor > 1 es considerado ser más selectivo hacia el parásito, mientras que un valor < 1 es considerado ser más selectivo hacia las células de mamífero (Camacho et al., 2003).

Basados en la ecuación 3, los IS de los compuestos de *F. vulgare* se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. IS de compuestos puros de *F. vulgare*

Compuesto	IS
<i>Trans,trans</i> -2,4-undecadienal	8.1658
(+)-Canfeno	2.7290
<i>p</i> -Anisaldehído	2.7479
(-)-Carvona	1.6943
*Metronidazol	160.2915
*Control positivo	

Los resultados indican que los compuestos de *F. vulgare* presentan un IS > 1 por lo cual se consideran selectivos hacia el parásito, indicando también que el compuesto *Trans,trans*-2,4-undecadienal fue el compuesto más selectivo.

5.6.2 *C. aurantifolia*

La tabla 9 indica la citotoxicidad de los compuestos puros de *C. aurantifolia* expresado como CI_{50} contra células Vero.

Tabla 9. CI_{50} de compuestos puros de *C. aurantifolia* contra células Vero

Compuesto	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC 95 % ($\mu\text{g/ml}$)
Citral	972.75	970.44 – 975.05
Geraniol	87.90	85.73 – 90.07
3-Metil-1,2-ciclopentanediona	552.08	549.88 – 554.27
4-Hexen-3-ona	676.08	673.96 – 678.20
(-)-Carvona	350.75	348.44 – 353.06
Metronidazol*	83.56	80.98 – 86.14

*Control positivo

Numerosos estudios han realizado ensayos de citotoxicidad sobre el Citral, y se ha reportado que presenta actividad citotóxica frente a macrófagos J774G8 con una Concentración Citotóxica Media (CC_{50}) de $50 \mu\text{g/ml}$ (Santin et al., 2009). Por otra parte, en un estudio frente a macrófagos alveolares murinos la viabilidad no se vio afectada a concentraciones de hasta $12 \mu\text{g/ml}$ (Shen et al., 2015). En un estudio diferente, se evaluó la citotoxicidad del citral frente a células Vero y HeLa, reportándose una CC_{50} de 124.1 y $< 0.1 \mu\text{g/ml}$,

respectivamente (Mesa-Arango et al., 2009). Asimismo, en macrófagos de ratón el Citral exhibe potencial genotóxico a 50 y 100 µg/ml a tiempo 0, pero esto desaparece 4 horas después, se añade además que el compuesto es capaz de reducir la genotoxicidad inducida por el fármaco doxorubicina (de Paula Porto et al., 2014).

Respecto al Geraniol, se ha reportado que no presenta efecto citotóxico en células Caco-2 a concentraciones de hasta 1mM (152.250 µg/ml) por 24 y 48 h (Carnesecchi et al., 2001). También, se ha reportado que el Geraniol no presenta efecto citotóxico frente a monocitos humanos a concentraciones de hasta 5.74 µg/ml ya que su viabilidad celular resultó en 100% comparado con el control (Murbach Teles Andrade et al., 2014).

Los resultados indican que el compuesto puro más citotóxico de ambas plantas es el Geraniol, sin embargo, bajo el criterio del NCI, ningún compuesto presenta citotoxicidad.

Por otra parte, se presentan en la tabla 10 los IS de los compuestos presentes en *C. aurantifolia*.

Tabla 10. IS de compuestos puros de *C. aurantifolia*

Compuesto	IS
Citral	16.6452
Geraniol	0.3828
3-Metil-1,2-ciclopentanediona	2.6669
4-Hexen-3-ona	19.6820
(-)-Carvona	1.6943
Metronidazol*	160.29 15

*Control positivo

Los resultados indican que el compuesto Geraniol presentó un índice de selectividad < 1 y es considerado ser más selectivo hacia las células de mamífero, mientras que los compuestos 4-Hexen-3-ona y Citral presentan un IS > 1 siendo más selectivos hacia el parásito *G. lamblia*.

CAPÍTULO 6

6.1 CONCLUSIONES

- Los valores de CI_{50} de los extratos hexánicos de *C. aurantifolia* y *F. vulgare* fueron 185.78 $\mu\text{g/ml}$ y 89.33 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.
- El extracto hexánico de *F. vulgare* resultó más activo comparado con el extracto hexánico de *C. aurantifolia*.
- Los compuestos puros más activos de *C. aurantifolia* son Citral (58.44 $\mu\text{g/ml}$), Geraniol (229.61 $\mu\text{g/ml}$), 3-Metil-1,2-ciclopentanediona (207.01 $\mu\text{g/ml}$), 4-Hexen-3-ona (34.35 $\mu\text{g/ml}$) y (-)-Carvona (207.01 $\mu\text{g/ml}$).
- Los compuestos puros más activos de *F. vulgare* son *Trans,trans*-2,4-undecadienal (72.11 $\mu\text{g/ml}$), (+)-Canfeno (181.13 $\mu\text{g/ml}$), *p*-Anisaldehído (196.78 $\mu\text{g/ml}$) y (-)-Carvona (207.01 $\mu\text{g/ml}$).
- El compuesto puro más activo fue el 4-hexen-3-ona (CI_{50} 34.35 $\mu\text{g/ml}$), el cual está presente en *C. aurantifolia*. Este compuesto también presentó el mejor índice de selectividad (IS 19.6820)
- Los compuestos puros más activos presentes en ambas plantas no presentan citotoxicidad en células Vero ATCC CCL-81 bajo los criterios del Instituto Nacional de Cáncer.

- Los compuestos puros presentes en *C. aurantifolia* y *F. vulgare* resultaron ser menos activos que el Metronidazol; sin embargo, fueron menos citotóxicos que el control positivo.
- Es la primera vez que se determina actividad anti-*Giardia* a los compuestos puros de *C. aurantifolia* y *F. vulgare*.

6.2 PERSPECTIVAS

Nuestra investigación representa una parte muy importante en la búsqueda de compuestos naturales con actividad antiprotozoaria; sin embargo, a fin de enriquecer nuestro trabajo, se podría realizar lo siguiente:

- Analizar mediante Microscopía Electrónica de Transmisión y/o de Barrido alteraciones morfológicas que pudieran observarse al exponer a los trofozoítos de *G. lamblia* a los compuestos puros de ambas plantas.
- Realizar la combinación de los compuestos activos puros intra e interplanta a fin de obtener la mejor combinación (es) que afecte la viabilidad de los trofozoítos de *G. lamblia* para observar sinergia, antagonismo o potencialización de actividad anti-*Giardia*.
- Realizar mediante síntesis química modificaciones a las estructura de los compuestos más activos a fin de potencializar su efecto antiprotozoario.
- Realizar un microarreglo de expresión a fin de poder establecer un posible mecanismo de acción del compuesto puro más activo.
- Evaluar la actividad de ambos extractos y compuestos puros sobre otros protozoarios como *Trichomonas vaginalis* y *Entamoeba histolytica*, así como la evaluación frente a otros microorganismos donde no se han estudiado.

CAPÍTULO 7

7.1 BIBLIOGRAFÍA

- Adam, R. D. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(3), pp. 447–469. (2001).
- Ahmad, S. T., Arjumand, W., Seth, A., Nafees, S., Rashid, S., Ali, N., et al. Preclinical renal cancer chemopreventive efficacy of geraniol by modulation of multiple molecular pathways. *Toxicology*, 290(1), pp. 69–81. (2011). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.08.020>
- Ahounou, J. F., Ouedraogo, G. G., Gbenou, J. D., Ouedraogo, S., Agbodjogbe, W. K., Dansou, P. H., et al. Spasmolytic effects of aqueous extract of mixture from *Aframomum melegueta* (K Schum) - *Citrus aurantifolia* (Christm and Panzer) on isolated trachea from rat. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 9(2), pp. 228–233. (2012).
- Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T., Ogunsanya, T., & Odugbemi, T. Evaluation of the antimicrobial properties of different parts of citrus *aurantifolia* (lime fruit) as used locally. *African J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, 4(2), pp. 185–190. (2007).
- Ali, S. a, & Hill, D. R. *Giardia intestinalis*. *Curr Opin Infect Dis*, 16, pp. 453–60. (2003). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14501998>
- Ali, V., & Nozaki, T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20(1), pp. 164–187. (2007).
- Alonso-Fernández, Á. PRÁCTICA MÓDULO ECOTOXICOLOGÍA: CÁLCULO DE LAS CONCENTRACIONES LETALES 50 (CL50) A 96 HORAS PARA LA TOXICIDAD DEL NITRITO EN DOS ESPECIES DE INVERTEBRADOS DE AGUA DULCE (*Eulimnogammarus toletanus* y *Polycelis felina*). *recursosecotoxicología*. (2015). Retrieved April 9, 2015, from <http://alvaroalonsodocencia.wikispaces.com/Probit-CL50>
- Amaral, F. M. M., Ribeiro, M. N. S., Barbosa-Filho, J. M., Reis, A. S., Nascimento, F. R. F., & Macedo, R. O. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16, pp. 696–720. (2006).
- Anthony, J. P., Fyfe, L., & Smith, H. Plant active components - A resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol.*, 21(10), pp. 462–468. (2005).

- Anthony, J.-P., Fyfe, L., Stewart, D., & McDougall, G. J. Differential effectiveness of berry polyphenols as anti-giardial agents. *Parasitology*, *138*, pp. 1110–1116. (2011).
- Apolónio, J., Faleiro, M. L., Miguel, M. G., & Neto, L. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. *FEMS Microbiol. Lett.*, *354*(2), pp. 92–101. (2014).
- Arencibia-Arrebola, D. F., Rosario-Fernández, L. A., & Cuerveco-Sánchez, D. L. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia , algunas consideraciones y su utilidad . *Rev. Toxicol. En Linea*, pp. 40–52. (2003).
- Argüello-García, R., Cruz-Soto, M., Romero-Montoya, L., & Ortega-Pierres, G. Variability and variation in drug susceptibility among *Giardia duodenalis* isolates and clones exposed to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.*, *54*(4), pp. 711–721. (2004).
- Badgujar, S. B., Patel, V. V., & Bandivdekar, A. H. *Foeniculum vulgare* Mill : A Review of Its Botany , Phytochemistry , Pharmacology , Contemporary Application , and Toxicology. , 2014. (2014).
- Barros, L. a., Yamanaka, a. R., Silva, L. E., Vanzeler, M. L. a, Braum, D. T., & Bonaldo, J. In vitro larvicidal activity of geraniol and citronellal against *Contraecaecum* sp (Nematoda: Anisakidae). *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, *42*(10), pp. 918–920. (2009).
- Bazán-Tejeda. MODELO DE DIFERENCIACIÓN UNICELULAR María Luisa Bazán-Tejeda , Raúl Argüello-García y Guadalupe Ortega-Pierres. , *XXXII*, pp. 25–38. (2008).
- Bendesky, A. Metronidazol: una visión integral. *Rev Fac Med UNAM*, *44*(6), pp. 255–259. (2001). Retrieved from <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no44-6/RFM44605.pdf>
- Bendesky, A., Menéndez, D., & Ostrosky-Wegman, P. Is metronidazole carcinogenic? *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, *511*, pp. 133–144. (2002).
- Birdane, F. M., Cemek, M., Birdane, Y. O., Gülçin, I., & Büyükkokuroğlu, M. E. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *World J. Gastroenterol.*, *13*(4), pp. 607–611. (2007).
- Brandelli, C. L. C., Giordani, R. B., De Carli, G. A., & Tasca, T. Indigenous traditional medicine: In vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitol. Res.*, *104*, pp. 1345–1349. (2009).

- Camacho, M. D. R., Phillipson, J. D., Croft, S. L., Solis, P. N., Marshall, S. J., & Ghazanfar, S. a. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *J. Ethnopharmacol.*, 89(2-3), pp. 185–191. (2003).
- Cardoso, J., & Soares, M. J. In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 105(8), pp. 1026–1032. (2010).
- Carnesecchi, S., Bras-Gonçalves, R., Bradaia, A., Zeisel, M., Gossé, F., Poupon, M. F., et al. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.*, 215(1), pp. 53–59. (2004).
- Carnesecchi, S., Schneider, Y., Ceraline, J., Durantou, B., Gosse, F., Seiler, N., et al. Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 298(1), pp. 197–200. (2001).
- Carranza, P. G., & Lujan, H. D. New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes Infect.*, 12(1), pp. 71–80. (2010). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.008>
- De Carvalho, K. I. M., Bonamin, F., dos Santos, R. C., P??rico, L. L., Beserra, F. P., de Sousa, D. P., et al. Geraniol-a flavoring agent with multifunctional effects in protecting the gastric and duodenal mucosa. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.*, pp. 1–11. (2013).
- Celis, J. E. *Cell Biology, Four-Volume Set: A Laboratory Handbook*. Academic Press. (2005). Retrieved April 3, 2015, from <https://books.google.com/books?id=uHOAs665BOEC&pgis=1>
- Chaouki, W., Leger, D. Y., Liagre, B., Beneytout, J.-L., & Hmamouchi, M. Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 23(5), pp. 549–556. (2009).
- Chaudhary, S. C., Siddiqui, M. S., Athar, M., & Alam, M. S. Geraniol inhibits murine skin tumorigenesis by modulating COX-2 expression, Ras-ERK1/2 signaling pathway and apoptosis. *J. Appl. Toxicol.*, 33(8), pp. 828–837. (2013).
- Choi, S. Y., Chung, J. H., Kim, D. H., Chung, S. W., Kim, J. Y., Yu, B. P., et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist action of 3-methyl-1,2-cyclopentanedione. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 1770(12), pp. 1612–1619. (2007).

- Chung, J. H., Choi, S. Y., Kim, J. Y., Kim, D. H., Lee, J. W., Choi, J. S., et al. 3-Methyl-1,2-cyclopentanedione Down-Regulates Age-Related NF- κ B Signaling Cascade. *J. Agric. Food Chem.*, 55(16), pp. 6787–6792. (2007). Retrieved April 5, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629301>
- Clerya, M., Leite, A., Parente, A., Bezerra, D. B., Sousa, J. P. De, Queiroga, F., et al. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of Citral against *Candida albicans*. , 2014. (2014).
- Cruz, A., Sousa, M. I., Azeredo, Z., Leite, E., de Sousa, J. C. F., & Cabral, M. Isolation, excystation and axenization of *Giardia lamblia* isolates: In vitro susceptibility to metronidazole and albendazole. *J. Antimicrob. Chemother.*, 51(March), pp. 1017–1020. (2003).
- Esquivel-Ferriño, P. C., Favela-Hernández, J. M. J., Garza-González, E., Waksman, N., Ríos, M. Y., & Del Rayo Camacho-Corona, M. Antimycobacterial activity of constituents from *Foeniculum vulgare* var. Dulce Grown in Mexico. *Molecules*, 17(7), pp. 8471–8482. (2012).
- Fabricant, D. S., & Farnsworth, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Heal.*, 109 Suppl (March), pp. 69–75. (2001). Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1240543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Farthing, M. J. G. Treatment options for the eradication of intestinal protozoa. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 3(8), pp. 436–445. (2006).
- Ford, B. The Discovery of *Giardia*. *Microscope*, 53(September 2004), pp. 147–153. (2005). Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:The+Discovery+of+Giardia#0>
- Freeman, C. D., Klutman, N. E., & Lamp, K. C. Metronidazole. A therapeutic review and update. *Drugs*, 54(5), pp. 679–708. (1997). Retrieved April 5, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360057>
- Gault, M. J., Reiner, D. S., & Gillin, F. D. Tolerance of axenically cultured *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to a variety of antimicrobial agents. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79(1), pp. 60–2. (1985). Retrieved April 4, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2859675>
- Gharagozloo, M., Doroudchi, M., & Ghaderi, a. Effects of *Citrus aurantifolia* concentrated extract on the spontaneous proliferation of MDA-MB-453 and RPMI-8866 tumor cell lines. *Phytomedicine*, 9, pp. 475–477. (2002).

- Gomes-Carneiro, M. R., Felzenszwalb, I., & Paumgartten, F. J. R. Mutagenicity testing of (??)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 416(1-2), pp. 129–136. (1998).
- Gonçalves, J. C. R., Oliveira, F. D. S., Benedito, R. B., de Sousa, D. P., de Almeida, R. N., & de Araújo, D. A. M. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. *Biol. Pharm. Bull.*, 31(5), pp. 1017–1020. (2008).
- Gonçalves, J. C. R., Silveira, A. L., de Souza, H. D. N., Nery, A. a., Prado, V. F., Prado, M. a M., et al. The monoterpene (-)-carvone: A novel agonist of TRPV1 channels. *Cytom. Part A*, 83 A(2), pp. 212–219. (2013).
- Gonzalez-Garza, M. T., Mata-Cárdenas, B. D., & Said-Fernández, S. High susceptibility of five axenic *Entamoeba histolytica* strains to gossypol. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 83(4), pp. 522–4. (1989). Retrieved April 9, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2559507>
- Hawrelak, J. Giardiasis : Pathophysiology and Management. , 8(2). (2003).
- Heresi, G. P., Murphy, J. R., & Cleary, T. G. Giardiasis. *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 11(3), pp. 189–195. (2000).
- Hoareau, L., & DaSilva, E. J. Medicinal plants: A re-emerging health aid. *Electron. J. Biotechnol.*, 2(2), pp. 56–70. (1999).
- Huang, D. B., & White, A. C. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 35(2), pp. 291–314, viii. (2006). Retrieved April 6, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16880067>
- Jayachandran, M., Chandrasekaran, B., & Namasivayam, N. Effect of geraniol, a plant derived monoterpene on lipids and lipid metabolizing enzymes in experimental hyperlipidemic hamsters. *Mol. Cell. Biochem.*, 398(1-2), pp. 39–53. (2014). Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s11010-014-2203-3>
- Jin, X., Sun, J., Miao, X., Liu, G., & Zhong, D. Inhibitory effect of geraniol in combination with gemcitabine on proliferation of BXP-3 human pancreatic cancer cells. *J Int Med Res*, 41 (4), pp. 993–1001. (2013). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1177/0300060513480919>
- Keister, D. B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77(4), pp. 487–8.

(1983). Retrieved February 21, 2015, from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6636276>

Khazaei, M., Montaseri, A., Khazaei, M. R., & Khanahmadi, M. Study of foeniculum vulgare effect on folliculogenesis in female mice. *Int. J. Fertil. Steril.*, 5(3), pp. 122–127. (2011).

Kim, A. R., Zou, Y., Kim, H. S., Choi, J. S., Chang, G. Y., Kim, Y. J., et al. Selective peroxy nitrite scavenging activity of 3-methyl-1,2-cyclopentanedione from coffee extract. *J. Pharm. Pharmacol.*, 54(10), pp. 1385–92. (2002). Retrieved April 5, 2015, from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12396301>

Kim, S. H., Bae, H. C., Park, E. J., Lee, C. R., Kim, B. J., Lee, S., et al. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 407(1), pp. 129–134. (2011). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.124>

Kim Vincent. Probit Analysis. Retrieved April 9, 2015, from
<http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>

Land, K. M., & Johnson, P. J. Molecular basis of metronidazole resistance in pathogenic bacteria and protozoa. *Drug Resist. Updat.*, 2(5), pp. 289–294. (1999). Retrieved April 6, 2015, from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504503>

Lee, H.-S. p -Anisaldehyde: Acaricidal Component of Pimpinella anisum Seed Oil against the House Dust Mites Dermatophagoides farinae and Dermatophagoides pteronyssinus. *Planta Med.*, 70(3), pp. 279–281. (2004). Retrieved April 4, 2015, from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15114512>

Loizzo, M. R., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., De Luca, D., Colica, C., et al. Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *J. Sci. Food Agric.*, 92(February), pp. 2960–2967. (2012).

Lorenzi, V., Muselli, A., Bernardini, A. F., Berti, L., Pagès, J. M., Amaral, L., et al. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53(5), pp. 2209–2211. (2009).

Lujan, H. D. Giardia y giardiasis. *Medicina (B. Aires)*, 66, pp. 70–74. (2006).

Lujan, H. D., & Svärd, S. *Giardia: A Model Organism*. Springer Science & Business Media. (2011). Retrieved April 7, 2015, from

http://books.google.com.mx/books/about/Giardia.html?id=VPbnbDY_0TcC&pgis=1

- Lundblad, R. L., & Macdonald, F. M. *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Edition* (R. L. Lundblad & F. M. Macdonald, Eds.). CRC Press. (2010). Retrieved April 6, 2015, from <https://books.google.com/books?id=sUDSBQAAQBAJ&pgis=1>
- Machado, M., Dinis, a. M., Salgueiro, L., Custódio, J. B. a, Cavaleiro, C., & Sousa, M. C. Anti-Giardia activity of Syzygium aromaticum essential oil and eugenol: Effects on growth, viability, adherence and ultrastructure. *Exp. Parasitol.*, 127(4), pp. 732–739. (2011). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.01.011>
- Machado, M., Pires, P., Dinis, a. M., Santos-Rosa, M., Alves, V., Salgueiro, L., et al. Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: Activity of Cymbopogon citratus and citral on L. infantum, L. tropica and L. major. *Exp. Parasitol.*, 130(3), pp. 223–231. (2012). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.12.012>
- Malek, S. N. A., Phang, C. W., Ibrahim, H., Norhanom, A. W., & Sim, K. S. Phytochemical and cytotoxic investigations of Alpinia mutica rhizomes. *Molecules*, 16(1), pp. 583–9. (2011). Retrieved April 9, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21240148>
- Mata-cárdenas, B. D., Vargas-villarreal, J., & González-salazar, F. *Pharmacologyonline* 1: 529-537 (2008). , 537, pp. 529–537. (2008).
- MATA-CÁRDENAS, B. D., VARGAS-VILLARREAL, J., MARTINEZ-RODRIGUEZ, H., NAVARRO-MARMOLEJO, L., GONZÁLEZ-GARZA, M. T., & SAID-FERNÁNDEZ, S. In-vitro Giardia lamblia Growth Inhibition by Gossypol. *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 4(7), pp. 361–363. (1998). Retrieved April 3, 2015, from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-7158.1998.tb00712.x/abstract>
- Mesa-Arango, A. C., Montiel-Ramos, J., Zapata, B., Durán, C., Betancur-Galvis, L., & Stashenko, E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian Lippia alba (Mill.) N.E. Brown: Composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104(6), pp. 878–884. (2009).
- Minenoa, T., & Avery, M. a. Giardiasis: recent progress in chemotherapy and drug development. *Curr. Pharm. Des.*, 9, pp. 841–855. (2003).
- Molina-Salinas, G. M., Ramos-Guerra, M. C., Vargas-Villarreal, J., Mata-Cárdenas, B. D., Becerril-Montes, P., & Said-Fernández, S. Bactericidal

activity of organic extracts from *Flourensia cernua* DC against strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Med. Res.*, 37(1), pp. 45–9. (2006). Retrieved March 17, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16314185>

Monographs, I. Metronidazole. *Cancer*, (1978), pp. 1978–1980. (1987).

Mun, S. H., Kang, O. H., Joung, D. K., Kim, S. B., Choi, J. G., Shin, D. W., et al. In vitro anti-MRSA activity of carvone with gentamicin. *Exp. Ther. Med.*, 7(4), pp. 891–896. (2014).

Murbach Teles Andrade, B. F., Conti, B. J., Santiago, K. B., Fernandes, A., & Sforcin, J. M. Cymbopogon martinii essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/anti-inflammatory effects in human monocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 66(10), pp. 1491–1496. (2014). Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1111/jphp.12278>

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. NTP TECHNICAL REPORT ON THE TOXICOLOGY AND CARCINOGENESIS STUDIES OF CITRAL (MICROENCAPSULATED) (CAS NO. 5392-40-5) IN F344/N RATS AND B6C3F1 MICE (FEED STUDIES). *NIH Publ.*, No. 03-443(25265), pp. 1–268. (2003).

Neiva, V. D. a, Ribeiro, M. N. S., Nascimento, F. R. F., Cartágenes, M. D. S. S., Coutinho-Moraes, D. F., & do Amaral, F. M. M. Plant species used in giardiasis treatment: Ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. *Brazilian J. Pharmacogn.*, 24(2), pp. 215–224. (2014). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2014.04.004>

Nishijima, C. M., Ganev, E. G., Mazzardo-Martins, L., Martins, D. F., Rocha, L. R. M., Santos, A. R. S., et al. Citral: A monoterpene with prophylactic and therapeutic anti-nociceptive effects in experimental models of acute and chronic pain. *Eur. J. Pharmacol.*, 736, pp. 16–25. (2014). Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299914003252>

Ocegueda, S., Moreno, E., & Koleff, P. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. *Biodiversitas*, pp. 12–15. (2005).

Özbek, H., Uğraş, S., Dülger, H., Bayram, I., Tuncer, I., Öztürk, G., et al. Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia*, 74(03), pp. 317–319. (2003).

Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Kim, K. W., Jeung, E. B., Chang, J. W., et al. Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, 80(5), pp. 290–296. (2009).

- De Paula Porto, M., da Silva, G. N., Luperini, B. C. O., Bachiega, T. F., de Castro Marcondes, J. P., Sforcin, J. M., et al. Citral and eugenol modulate DNA damage and pro-inflammatory mediator genes in murine peritoneal macrophages. *Mol. Biol. Rep.*, 41(11), pp. 7043–7051. (2014). Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/s11033-014-3657-9>
- Pérez-Soto, J., & López-Sáez, J. a. Etnobotánica medicinal y parasitosis intestinales en la Isla de Ometepe, Nicaragua. *Polibotánica*, 30, pp. 137–161. (2010).
- Ponce-Macotela, M., Navarro-Alegria, I., Martinez-Gordillo, M. N., & Álvarez-Chacón, R. Efecto anti-giardiasico in vitro de 14 extractos de plantas | [In vitro anti-giardiasic activity of plant extracts]. *Rev. Investig. Clínica*, 46(5), pp. 343–7. (1994). Retrieved April 3, 2015, from <http://dspace.biblioteca-innsz.org/handle/123456789/20992>
- Ponce-Macotela, M., Rufino-González, Y., González-Maciél, A., Reynoso-Robles, R., & Martínez-Gordillo, M. N. Oregano (*Lippia* spp.) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: Anti-giardiasic activity and ultrastructural damage. *Parasitol. Res.*, 98, pp. 557–560. (2006).
- Prasad, S. N., & Muralidhara. Neuroprotective effect of geraniol and curcumin in an acrylamide model of neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: Relevance to neuropathy. *J. Insect Physiol.*, 60(1), pp. 7–16. (2014). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.10.003>
- Prevention, C.-C. for D. C. and. CDC - *Giardia* - Biology. Retrieved April 8, 2015, from <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>
- Quintans-Júnior, L., Moreira, J. C. F., Pasquali, M. a B., Rabie, S. M. S., Pires, A. S., Schröder, R., et al. Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. *ISRN Toxicol.*, 2013, p. 459530. (2013). Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3658412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rahimi, R., & Ardekani, M. R. S. Medicinal properties of *Foeniculum vulgare* Mill. in traditional Iranian medicine and modern phytotherapy. *Chin. J. Integr. Med.*, 19(1), pp. 73–79. (2013).
- Rahimi-Esboei, B., Ebrahimzadeh, M. a., Gholami, S. H., & Falah-Omrani, V. Anti-giardial activity of *Sambucus ebulus*. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 17, pp. 2047–2050. (2013).
- Rates, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, pp. 603–613. (2001).

- Rekha, K. R., Selvakumar, G. P., Sethupathy, S., Santha, K., & Sivakamasundari, R. I. Geraniol ameliorates the motor behavior and neurotrophic factors inadequacy in MPTP-induced mice model of parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.*, 51(3), pp. 851–862. (2013).
- Robertson, L. J., Hanevik, K., Escobedo, A. a., Mørch, K., & Langeland, N. Giardiasis - why do the symptoms sometimes never stop? *Trends Parasitol.*, 26(January), pp. 75–82. (2010).
- Rowley, S. D., & Anderson, G. L. Effect of DMSO exposure without cryopreservation on hematopoietic progenitor cells. *Bone Marrow Transplant.*, 11(5), pp. 389–393. (1993). Retrieved March 30, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8504273>
- Sadraei, H., Ghannadi, a., & Malekshahi, K. Relaxant effect of essential oil of *Melissa officinalis* and citral on rat ileum contractions. *Fitoterapia*, 74(5), pp. 445–452. (2003).
- Said-Fernández, S. *Manual de técnicas de bioevaluación de nuevos agentes contra la tuberculosis*. CYTED. (2007). Retrieved April 7, 2015, from http://books.google.com.mx/books/about/Manual_de_t%C3%A9cnicas_de_bioevaluaci%C3%B3n_de.html?id=JEsoygAACAAJ&pgis=1
- Said-Fernández, S., Vargas-Villarreal, J., Castro-Garza, J., Mata-Cárdenas, B. D., Navarro-Marmolejo, L., Lozano-Garza, G., et al. PEHPS medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82(2), pp. 249–53. (1988). Retrieved April 3, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903589>
- Samuelson, J. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(7), pp. 1533–1541. (1999).
- Sánchez-Borzzone, M., Delgado-Marín, L., & García, D. A. Inhibitory Effects of Carvone Isomers on the GABA A Receptor in Primary Cultures of Rat Cortical Neurons. *Chirality*, 26(8), pp. 368–372. (2014). Retrieved April 4, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24890627>
- Sandoval-Montemayor, N. E., García, A., Elizondo-Treviño, E., Garza-González, E., Alvarez, L., & Del Rayo Camacho-Corona, M. Chemical composition of hexane extract of *Citrus aurantifolia* and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some of its constituents. *Molecules*, 17(9), pp. 11173–11184. (2012).
- Santin, M. R., Dos Santos, A. O., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P., Ferreira, I. C. P., & Ueda-Nakamura, T. In vitro activity of the essential oil of

- Cymbopogon citratus and its major component (citral) on Leishmania amazonensis. *Parasitol. Res.*, 105(6), pp. 1489–1496. (2009).
- Senatore, F., Oliviero, F., Scandolera, E., Taglialatela-Scafati, O., Roscigno, G., Zaccardelli, M., et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [Foeniculum vulgare Mill. ssp. vulgare var. azoricum (Mill.) Thell]. *Fitoterapia*, 90, pp. 214–219. (2013). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.021>
- Sheets, R. History and Characterization of the Vero Cell Line. *Open Sess.*, pp. 1–12. (2000).
- Shen, Y., Sun, Z., & Guo, X. Citral inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury by activating PPAR- γ . *Eur. J. Pharmacol.*, 747, pp. 45–51. (2015). Retrieved from <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299914006967>
- Shreaz, S., Bhatia, R., Khan, N., Muralidhar, S., F Basir, S., Manzoor, N., et al. Exposure of Candida to p-anisaldehyde inhibits its growth and ergosterol biosynthesis. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 57(3), pp. 129–136. (2011).
- Singh, D. N., Verma, N., Kulshreshtha, D. K., & Agrawal, A. K. In-vitro anti-giardial activity of ethanolic extract and fractions from Phlebophyllum kunthianum. , 12, pp. 68–71. (2012).
- Sousa, M. C., & Poiares-Da-Silva, J. A new method for assessing metronidazole susceptibility of Giardia lamblia trophozoites. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43(12), pp. 2939–42. (1999). Retrieved April 9, 2015, from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89591&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Souza, F. V. M., Da Rocha, M. B., De Souza, D. P., & Marçal, R. M. Carvone: Antispasmodic effect and mode of action. *Fitoterapia*, 85(1), pp. 20–24. (2013).
- De Souza, W., Lanfredi-Rangel, A., & Campanati, L. Contribution of microscopy to a better knowledge of the biology of Giardia lamblia. *Microsc. Microanal.*, 10(5), pp. 513–27. (2004). Retrieved April 6, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15525427>
- Spadaro, F., Costa, R., Circosta, C., & Occhiuto, F. Volatile composition and biological activity of key lime Citrus aurantifolia essential oil. *Nat. Prod. Commun.*, 7(11), pp. 1523–6. (2012). Retrieved April 6, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285822>

- Swaminathan, A., Sridhara, S. R. C., Sinha, S., Nagarajan, S., Balaguru, U. M., Siamwala, J. H., et al. Nitrites Derived From *Foeniculum Vulgare* (Fennel) Seeds Promotes Vascular Functions. *J. Food Sci.*, 77(12), pp. H273–H279. (2012). Retrieved from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2012.03000.x>
- Tagboto, S., & Townson, S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Adv. Parasitol.*, 50, pp. 199–295. (2001).
- Thompson, R. C. A. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.*, 30(12-13), pp. 1259–1267. (2000).
- Thompson, R. C. A. Giardiasis: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. *Ann. Nestlé (Ed. española)*, 66(1), pp. 23–29. (2008).
- Tian, H.-F., Chen, B., & Wen, J.-F. Giardiasis, drug resistance, and new target discovery. *Infect. Disord. Drug Targets*, 10, pp. 295–302. (2010).
- Tiwari, M., & Kakkar, P. Plant derived antioxidants - Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress. *Toxicol. Vitr.*, 23(2), pp. 295–301. (2009). Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.014>
- Tsuji, O. V., & Rivera, T. C. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Rev. del Cent. Investig. Univ. La Salle*, 8(31), pp. 75–90. (2009). Retrieved April 7, 2015, from <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=34211305006>
- UNAM. Hinojo *Foeniculum vulgare* (L.) Mill. Umbelliferae. Retrieved April 8, 2015a, from http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Foeniculum_vulgare&id=7703
- UNAM. Limón *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle Rutaceae. Retrieved April 6, 2015b, from http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Citrus_aurantifolia&id=7410
- Upcroft, P., & Upcroft, J. a. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clin Microbiol Rev*, 14(1), pp. 150–164. (2001).
- USDA, ARS, Program National Genetic Resources, & Germplasm Resources Information Network. *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle. Retrieved April 3, 2015, from <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?10683>

- USDA, PlantsDatabase, & Natural Resources Conservation Service. Citrus ×aurantiifolia (Christm.) Swingle (pro sp.) [medica × sp.] Show All key lime. Retrieved April 6, 2015, from <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CIAU7>
- Vallianou, I., Peroulis, N., Pantazis, P., & Hadzopoulou-Cladaras, M. Camphene, a plant-derived monoterpene, reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic rats independently of HMG-CoA reductase activity. *PLoS One*, 6(11). (2011).
- Xia, H., Liang, W., Song, Q., Chen, X., Chen, X., & Hong, J. The in vitro study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. *Cytotechnology*, 65(1), pp. 49–57. (2013).
- Yaoyu, F., & Xiao, L. Zoonotic potential and molecular epidemiology of Giardia species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24(1), pp. 110–140. (2011).
- Yu, L., Guo, N., Yang, Y., Wu, X., Meng, R., Fan, J., et al. Microarray analysis of p-anisaldehyde-induced transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37(3), pp. 313–322. (2010).
- Zanini, S. F., Silva-Angulo, a. B., Rosenthal, a., Rodrigo, D., & Martínez, a. Effect of citral and carvacrol on the susceptibility of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* to antibiotics. *Lett. Appl. Microbiol.*, 58(5), pp. 486–492. (2014).
- Zeng, H., Chen, X., & Liang, J. In vitro antifungal activity and mechanism of essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.*, 64(Pt 1), pp. 93–103. (2015). Retrieved April 6, 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351709>
- metronidazole - chemicalize.org. Retrieved April 8, 2015, from <http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=metronidazole&source=fp>
- DrugBank: Metronidazole (DB00916). Retrieved April 6, 2015, from <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00916>
- Vero ATCC ® CCL-81™ *Cercopithecus aethiops* kidney normal. Retrieved April 3, 2015, from <http://www.atcc.org/en/Global/Products/8/3/5/8/CCL-81.aspx>

7.2 RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO

Irma Guadalupe Domínguez Vigil
Candidata para el Grado de
Maestría en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: **Actividad anti-*Giardia in vitro* de los compuestos de *Foeniculum vulgare* y *Citrus aurantifolia***

Campo de Estudio: Biología Celular de Protozoarios y Productos Naturales

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 18 de Marzo de 1991, hija de María Irma Vigil y Arturo Domínguez Méndez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2013

APÉNDICES