



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA**

**Plantas medicinales del Estado de Hidalgo como  
fuente de obtención de agentes antiprotozoarios  
contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia***

**T E S I S**

Para obtener el Título de **Licenciado en Farmacia**

P R E S E N T A:

**David González Martínez**



San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo; Agosto de 2014

---

## Agradecimientos

A mi *Alma máter* la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y la Licenciatura en Farmacia. Por brindarme lo más valioso que hay en el mundo que es el conocimiento y proveer las herramientas para poder apoyar al crecimiento de mi país

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores y guías de ésta tesis Dra. Claudia Velázquez González y el Dr. Fernando Calzada Bermejo, por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ellos, por haber tenido la paciencia necesaria para ayudarme, por transmitirme su conocimiento y agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

También deseo agradecer a los sinodales comisionados de revisar y corregir este trabajo, Dra. Mirandeli Bautista Ávila, Dr. Juan Antonio Gayosso de Lúcio, Dra. Minarda De la O Arciniega, Mtra. Georgina Almaguer Vargas y al Dr. José Roberto Villagómez Ibarra muchas gracias por sus valiosas aportaciones y sugerencias a este trabajo.

---

## Agradecimientos

A mis padres, mis hermanos Lino Eduardo y Dulce María por todo el apoyo incondicional y esfuerzo que conjuntamente hemos realizado para que todo esto sea posible.

A mi esposa Monserrat Escalante por el tiempo y trabajo que invertimos juntos en esta investigación, la paciencia y motivación que siempre me has brindado.

A la Familia Olvera Martínez por sus enseñanzas, su ayuda, cariño y comprensión, han sido un pilar para mi crecimiento tanto personal como profesional y ser parte fundamental de mi vida, siempre serán como mis padres y hermanos.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página.</b>
Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Lista de abreviaturas	iii
<b>Resumen y Abstract</b>	iv
<b>I. Introducción.</b>	<b>1</b>
<hr/> <hr/>	
<b>II. Antecedentes.</b>	<b>3</b>
<hr/> <hr/>	
2.1 Antecedentes y generalidades sobre la amebiasis y giardiasis.	5
2.1.1 <i>Entamoeba histolytica</i> .	5
2.1.2 <i>Giardia lamblia</i> .	8
2.1.3 Tratamiento Farmacológico	11
2.2 Plantas estudiadas.	13
2.2.1 <i>Arenaria lycopodioides</i> .	13
2.2.1.1 Distribución en México.	13
2.2.1.2 Descripción botánica.	14
2.2.1.3 Uso medicinal.	14
2.2.1.4 Estudios Químicos y farmacológicos previos	15
2.2.2 <i>Geranium schiedeanum</i> .	15
2.2.2.1 Distribución en México.	15
2.2.2.2 Descripción botánica.	16
2.2.2.3 Uso medicinal.	16

2.2.2.4 Estudios Químicos y farmacológicos previos	16
2.2.3 <i>Lopezia racemosa.</i>	17
2.2.3.1 Distribución en México.	17
2.2.3.2 Descripción botánica.	18
2.2.3.3 Uso medicinal.	19
2.2.3.4 Estudios Químicos y farmacológicos previos	19
2.2.4 <i>Phytolacca icosandra.</i>	21
2.2.4.1 Distribución en México.	21
2.2.4.2 Descripción botánica.	22
2.2.4.3 Uso medicinal.	22
2.2.4.4 Estudios Químicos y farmacológicos previos	22
2.2.5 <i>Plantago lanceolata.</i>	23
2.2.5.1 Distribución en México.	23
2.2.5.2 Descripción botánica.	23
2.2.5.3 Uso medicinal.	24
2.3 Antecedentes y generalidades sobre el género <i>plántago.</i>	25
2.4 Antecedentes y generalidades sobre verbascósido (acteósido)	27
<b>III. Justificación.</b>	<b>30</b>
<b>IV. Hipótesis.</b>	<b>31</b>
<b>V. Objetivos.</b>	<b>32</b>
5.1 Objetivo general.	32
5.2 Objetivos específicos.	32
<b>VI. Materiales y Métodos.</b>	<b>33</b>
6.1 Recolección del material vegetal.	33
6.2 Preparación de los extractos en pequeña escala para el proceso de selección de la especie más activa.	33
6.3 Preparación a gran escala del extracto de la especie vegetal más	35

activa.	
6.4 Fraccionamiento del extracto etanólico de <i>Plantago lanceolata</i>	36
6.5 Aislamiento de verbascósido.	36
6.6 Evaluación del efecto antiprotozoario.	37
6.6.1 Medios de cultivo y material biológico.	37
6.6.2 Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> .	38
6.6.3 Conteo celular mediante cámara de Neubauer.	40
6.6.4 Ensayo MTS.	42
6.6.5 Análisis estadístico.	43
<b>VII. Resultados.</b>	<b>44</b>
<hr/>	
<b>VIII. Análisis de resultados.</b>	<b>48</b>
<hr/>	
<b>IX. Conclusiones.</b>	<b>50</b>
<hr/>	
<b>X. Referencias.</b>	<b>52</b>
<hr/>	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Pictografía de la diosa azteca Toci.	3
2	Trofozoíto y quiste de <i>Entamoeba histolytica</i> .	6
3	Ciclo vital de <i>Entamoeba histolytica</i> .	7
4	Trofozoito de <i>Giardia lamblia</i> .	8
5	Ciclo vital de <i>Giardia lamblia</i> (duodenalis).	9
6	Derivados de la serie Nitroimidazoles.	12
7	<i>Arenaria lycopodioides</i> .	13
8	<i>Geranium schiedeanum</i> .	15
9	<i>Lopezia racemosa</i> .	17
10	<i>Phytolacca icosandra</i> .	20
11	<i>Plantago lanceolata</i> .	23
12	Estructura de verbascósido.	28
13	Diagrama de obtención de los extractos.	34
14	Fraccionamiento por partición del extracto etanólico de <i>Plantago lanceolata</i> .	35
15	Diagrama de Pruebas de susceptibilidad <i>in vitro</i> .	39
16	Diagrama del conteo celular.	42
17	Biotransformación de MTT a sales de Formazan por células viables.	43
18	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del verbascósido a 400 MHz en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .	48

---

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Tabla</b>	<b>Pagina</b>
1	Manifestaciones clínicas de la giardiasis.	10
2	Composición del medio TYI-S-33 para el cultivo de <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> .	38
3	Identificación y registro de las plantas en estudio	44
4	Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> contra <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i> del extracto crudo de las plantas en estudio.	45
5	Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> de las fracciones obtenidas de <i>Plantago lanceolata</i> .	46

---

### Lista de abreviaturas

**µg:** Microgramos

**a.c:** antes de cristo

**AA:** Acido araquidónico

**ACh:** Acetil colina

**ADP:** Difosfato de adenosina

**ASA:** Ácido acetil salicílico

**BDMTM:** Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana

**CCF:** Cromatografía en capa fina

**CDC:** Centers for Disease Control and Prevention

**CENETEC:** Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud

**CI<sub>50</sub>:** Concentración Inhibitoria Media

**cm:** centímetros

**CONABIO:** Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad

**COX:** Ciclooxygenasa

**DGE:** Dirección General de Epidemiología

**DMSO:** Dimetil sulfoxido

**EA:** Efectos Adversos

---

**IGI:** Infecciones Gastrointestinales

**iNOS:** Óxido nítrico sintasa inducible

**IV:** Intravenosa

**LPS:** Lipopolisacárido

**MTT:** Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

**NaOH:** Hidróxido de sodio

**NO:** Óxido Nítrico

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**SINAVE:** Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

**RESUMEN:** De acuerdo a la OMS, cerca del 80 % de la población mundial depende de la medicina tradicional para la atención primaria de su salud, así mismo el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos patógenos ha provocado que muchos investigadores impulsen la búsqueda de compuestos activos en plantas medicinales. En este trabajo se evaluó la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los extractos etanólicos de cinco plantas (*Arenaria lycopodioides*, *Geranium schiedeanum*, *Lopezia racemosa*, *Phytolacca icosandra* y *Plantago lanceolata*) sobre los trofozoitos de *E. histolytica* y *G. lamblia*, (principales implicados en infecciones parasíticas intestinales). Estas plantas son utilizadas en la medicina tradicional de Hidalgo para tratar trastornos gastrointestinales tales como la diarrea.

Se evaluaron los extractos etanólicos a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1, 0.13, 0.15, 0.25, 0.30 y 0.7  $\mu\text{g/mL}$  sobre cultivos axénicos y utilizándose metronidazol como control positivo a concentraciones de 0.210  $\mu\text{g/mL}$  y 0.06  $\mu\text{g/mL}$  para *G. lamblia* y *E. histolytica*, respectivamente (Jiménez et al., 2013), cada concentración se probó en tres eventos independientes por triplicado, se procedió a contar el número de trofozoitos/mL, realizándose curvas dosis-respuesta para determinar la concentración inhibitoria media ( $\text{CI}_{50}$ ) mediante análisis Probit y realizándose una prueba confirmatoria mediante un ensayo de viabilidad celular. Los extractos evaluados presentaron actividad antiprotozoaria moderada, siendo el de *P. lanceolata* el que presentó una mayor potencia con una  $\text{CI}_{50}$  de 69.69  $\mu\text{g/mL}$  para *E. histolytica* y 78.71  $\mu\text{g/mL}$  para *G. lamblia*. Posteriormente se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de la especie más activa, se realizó una partición del extracto crudo de *P. lanceolata* con cloroformo/acetato de etilo/agua. La fracción obtenida con acetato de etilo obtuvo la mejor actividad antiprotozoaria con una  $\text{CI}_{50}$  de 25.4  $\mu\text{g/mL}$  para *E. histolytica* y 31.7  $\mu\text{g/mL}$  para *G. lamblia*, el estudio fitoquímico condujo al aislamiento e identificación de verbascósido (acteósido) como compuesto mayoritario, para el cual la determinación de su actividad antiprotozoaria se encuentra en proceso.

**ABSTRACT:** According to WHO, about 80% of the world population depends on traditional medicine for primary health care, also the development of resistance among pathogens has led many researchers promote the search for active compounds in medicinal plants. In this work, the *in vitro* antiprotozoal activity of the ethanolic extracts of five plants (*Arenaria lycopodioides*, *Geranium schiedeanum*, *Lopezia racemosa*, *Plantago lanceolata* and *Phytolacca icosandra*) against *E. histolytica* and *G. lamblia* trophozoites was evaluated (the main implicated in parasitic intestinal infections). These plants are used in traditional medicine to treat gastrointestinal diseases in the population of Hidalgo State, such as diarrhea.

The ethanolic extracts were evaluated at concentrations of 0.01, 0.05, 0.1, 0.13, 0.15, 0.25, 0.30 and 0.7 µg/mL on axenic cultures, metronidazole was evaluated as a positive control at concentrations of 0.210 µg / mL and 0.06 µg / mL for *G. lamblia* and *E. hystolitica*, respectively (Jiménez et al., 2013), each concentration was tested in triplicate independent events three times, we proceeded to count the number of trophozoites/mL and dose-response curves were performed to determine the mean inhibitory concentration IC<sub>50</sub> by Probit analysis and a confirmatory test denominated MTS assay was realized. The extracts evaluated showed moderate antiprotozoal activity, being the *P. lanceolata* extract which had a higher activity with IC<sub>50</sub> of 69.69 µg/mL for *E. histolytica* and 78.71 µg/mL for *G. lamblia*. Subsequently the bioguided assay of the most active specie was performed; a partition of the crude extract of *P. lanceolata* with chloroform/ethyl acetate/water was performed. The ethyl acetate fraction showed the best antiprotozoal activity with an IC<sub>50</sub> of 25.4 µg/mL for *E. histolytica* and 31.7 µg/mL for *G. lamblia*, the phytochemical research led to the isolation and identification of verbascósido (acteoside) as the major compound, for which the determination of the antiprotozoal activity is in process.

## I INTRODUCCION

A lo largo de su historia, el hombre se ha valido de las plantas para hacer frente a las diversas enfermedades que han aquejado su existencia, Entre los usos más frecuentes de las especies medicinales se encuentra el tratamiento de trastornos gastrointestinales como es el caso de la diarrea y la disentería. Dos agentes causales de estos padecimientos son los protozoarios *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, causantes de amebiasis y giardiasis, las cuales ocasionan una considerable morbi-mortalidad en países en vías de desarrollo.

De acuerdo a la OMS (Organización Mundial de la Salud) en el caso de la amebiasis, en el mundo alrededor del 10 % de los infectados (50-100 millones) presenta manifestaciones clínicas y de ellos la décima parte cursa con localización extraintestinal (la forma más complicada de la infección) y es causa de aproximadamente 100,000 muertes/año. En México se presentaron 550 muertes entre los años 2004 y 2008 así como un promedio de 978,000 nuevos casos reportados entre el 2000 y el 2006 (Naoyoshi et al., 2012) siendo la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias solo tras la esquistosomosis y el paludismo.

En el caso de *Giardia lamblia* es el parásito intestinal más común, responsable de síndromes diarreicos en todo el mundo. Se estima que alrededor de 200 millones de personas presentan la enfermedad en Asia, África y Latinoamérica, con 500, 000 casos nuevos/año (Thompson RCA. 2008), observándose un mayor grado de riesgo en la población pediátrica. Las más altas prevalencias se presentan en regiones tropicales y subtropicales, en las zonas rurales de países en desarrollo.

Para el tratamiento de la amebiasis y giardiasis el fármaco de elección es metronidazol (Kasper et al., 2006, Brooks FG et al., 2007, Dipiro TH et al., 2008); sin embargo, han ocurrido diversos problemas asociados al uso de este fármaco como lo

son: los efectos adversos, la actividad contra la flora natural del tracto gastrointestinal los cuales son afectados de manera colateral por este compuesto, además del potencial problema de farmacorresistencia del cual recientes reportes indican que estos protozoarios han mostrado, debido principalmente al uso irracional y descontrolado (Vega Gutiérrez ML. Et al.,2008 y Guerra Solís IA. Et al., 2006). Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural, que puedan ser utilizados para el tratamiento de amebiasis y giardiasis, que además presenten una menor cantidad de reacciones adversas para el ser humano, por lo cual en este trabajo se llevó a cabo la evaluación del potencial antiprotozoario de cinco plantas utilizadas en la medicina tradicional del Estado de Hidalgo para el tratamiento de trastornos gastrointestinales como es la diarrea y la disentería, se utilizó para ello los extractos etanólicos evaluados *in vitro* contra los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, posteriormente se realizó el estudio fitoquímico biodirigido de la especie que presentó la mejor actividad antiprotozoaria, el cual condujo al aislamiento e identificación de Verbascósido (acteósido) como compuesto mayoritario, para el cual la determinación de su actividad antiprotozoaria se encuentra en proceso.

## II ANTECEDENTES

Existen documentos que prueban que las plantas han sido utilizadas para tratar diversas enfermedades desde hace miles de años y comenzó probablemente, en el íntimo contacto con la naturaleza, con la observación de las costumbres de otros animales y de la experiencia acumulada tras la ingestión accidental o provocada de algunas especies vegetales. En Mesoamérica, la medicina herbolaria había alcanzado increíbles dimensiones tan es así que una de las deidades Aztecas estaba destinada a los médicos y personas que manejaban las plantas como como medio de terapéutica (Figura 1), uno de los documentos más emblemáticos y representativos sobre la utilización de plantas con fines terapéuticos en México es *El Libellus de medicinalibus indorum herbis* o Códice de la Cruz-Badiano (1552) el cual es un documento con 184 ilustraciones a color de plantas medicinales y de las cuales un 90 % de estas siguen en uso hoy en día en la práctica de la medicina tradicional en México (Campiglio, 2007).



**Figura 1. Pictografía de la diosa azteca Toci (Diosa de los médicos, parteras, temazcales, yerberas y adivinos.)**

Fuente: *Códice Borgia*, Biblioteca del Vaticano.

En muchos países del mundo, el uso de las plantas medicinales para el control, cura y tratamiento de enfermedades constituye un conocimiento que aún es transmitido de forma verbal de generación en generación como parte de sus tradiciones. De acuerdo con la OMS se estima que aproximadamente del 80 % de la población de los países en desarrollo hace uso de la medicina tradicional para resolver sus problemas de salud (OMS., 2004).

México; país con una extensa biodiversidad ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas con 4,500 plantas, después de china que tiene registradas 5,000. En tercer lugar está Colombia con 2,600 plantas (Muñeton P., 2009). Estos son los primeros lugares mundiales en herbolaria; Hidalgo es un estado con una privilegiada situación geográfica, brinda una gran variedad de plantas, se han reportado 611 especies de plantas utilizadas por los habitantes del Estado, de las cuales 461 corresponden a plantas con uso medicinal y de estas últimas, 137 ocupan el primer lugar en el tratamiento de afecciones del sistema digestivo. Las dos principales afecciones del sistema digestivo para las cuales se emplean plantas medicinales son el dolor de estómago y diarrea con 49 y 28 especies, respectivamente (Pérez et al; 2003). Sin embargo, se estima que sólo 5 % de las plantas medicinales en México han sido estudiadas para validar química, farmacológica y biomédicamente los principios activos que contienen (Pérez-Escandon et al., 2003).

De acuerdo a la OMS, la diarrea es la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años con una incidencia de hasta 1,700 millones de casos al año y con una mortandad anual de hasta 760,000 niños menores de 5 años en todo el mundo (OMS,2013), En México, en los niños de 1 a 4 años de edad las enfermedades infecciosas intestinales se mantienen entre las primeras cinco causas de muerte, en el 2010 se presentaron 266 muertes con tasa de 3.5 por 100,000 nacimientos estimados (SINAVE, 2012).

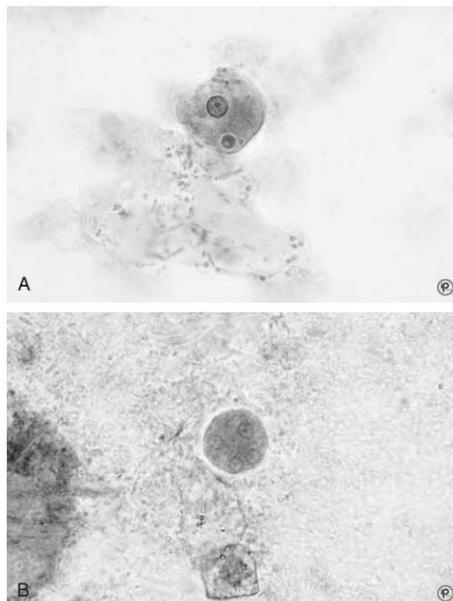
La diarrea puede tener diversas etiologías, dentro de los principales agentes etiológicos de este padecimiento se encuentran las infecciones intestinales producidas por protozoarios *E. histolytica* y *G. lamblia* (OMG, 2012)

## **2.1 Antecedentes y generalidades sobre la amebiasis y giardiasis.**

Las enfermedades parasitarias continúan siendo un problema sanitario en todo el mundo, Especialmente en los países subdesarrollados ya que constituyen grandes focos de infección y de diseminación a otras naciones así como en los países desarrollados, puesto que junto al declive de ciertas parasitosis (p. ej., el paludismo), aumentan con más fuerza otras que anteriormente tenían poca presencia, como es el caso de la giardiasis, la amebiasis y la criptosporidiasis. (Dipiro, 2008)

### **2.1.1 Entamoeba histolytica**

La amebiasis es definida por la OMS y OPS (Organización Panamericana de la Salud) como “la condición de portar al parásito *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas”. En la actualidad se reconoce que el complejo Entamoeba contiene dos especies morfológicamente idénticas 1) *Entamoeba dispar* (cerca del 90 % del complejo), que permanece en el colon como un comensal estable, es asintomática y produce un estado de portador asintomático y 2) *E. histolytica* (Figura 2) la cual muestra grados variables de virulencia que van desde un estado comensal en el colon, en donde no causa enfermedad y sin embargo es potencialmente invasiva, hasta penetrar la pared intestinal, dando como resultado diarrea aguda, disentería o diarrea crónica (Murray. 2009) (Figura 3).



**Figura 2. Trofozoíto (A) y quiste (B) de *Entamoeba histolytica*.**

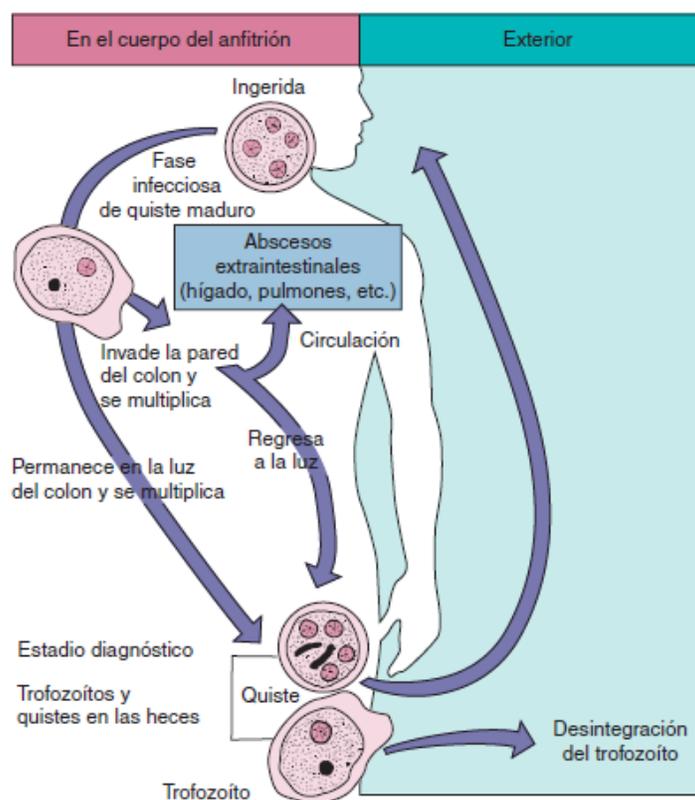
Fuente: Marler LM et al: Parasitology CD-Rom, Indiana, Pathology Images, 2003.

*E. histolytica* es un protozoario parásito el cual tiene una distribución cosmopolita en donde imperan condiciones de sanidad deficientes e inadecuadas; la mayoría de las infecciones son asintomáticas y puede aparecer meses o años después de haber sido expuesto (Pritt y Clark, 2006), es un patógeno con capacidad invasiva y de diseminación extraintestinal, en el intestino afecta al intestino grueso pero también puede ser transportada por la sangre al hígado, donde puede producir abscesos hepáticos. Rara vez se pueden infectar los pulmones, encéfalo, otros órganos, o la piel perianal (Tieney et al., 2006).

Aproximadamente el 10 % de los portadores asintomáticos de *E. histolytica* desarrollan enfermedad invasiva, por esta última se ha convertido en la tercera causa de muerte por enfermedades parasitarias en el mundo.

En países en desarrollo es un importante problema de salud y es responsable de aproximadamente 40, 000 a 100, 000 muertes a nivel mundial (Naoyoshi et al., 2012)

con una prevalencia del 1 % en países industrializados y de cerca del 50-80 % en países tropicales (Mancilla et al., 2012).



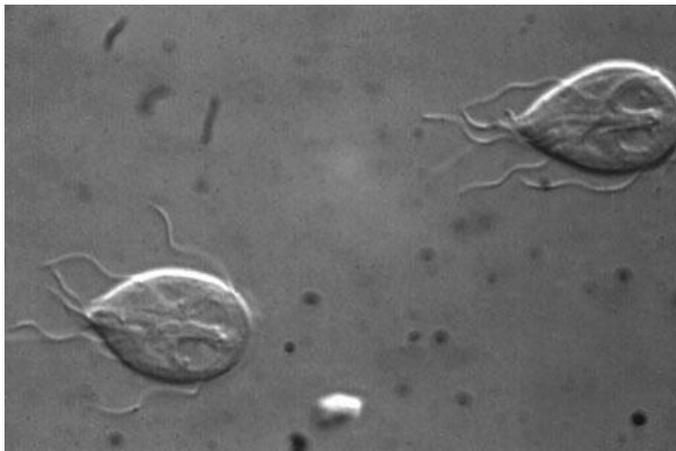
**Figura 3. Ciclo vital de *Entamoeba histolytica*.**

Fuente: Murray P., Rosenthal S. y Pfaller M. (2009). Microbiología Médica. España: Elsevier.

En México, la amebiasis se encuentra entre las primeras 20 causas de morbilidad y tan solo en el 2012 la incidencia fue de más de 319.97 casos, ocupando Hidalgo el tercer lugar con una incidencia de 739.91 casos (incidencia por 100,000 habitantes) solo detrás de Guerrero y Oaxaca (DGE, 2014).

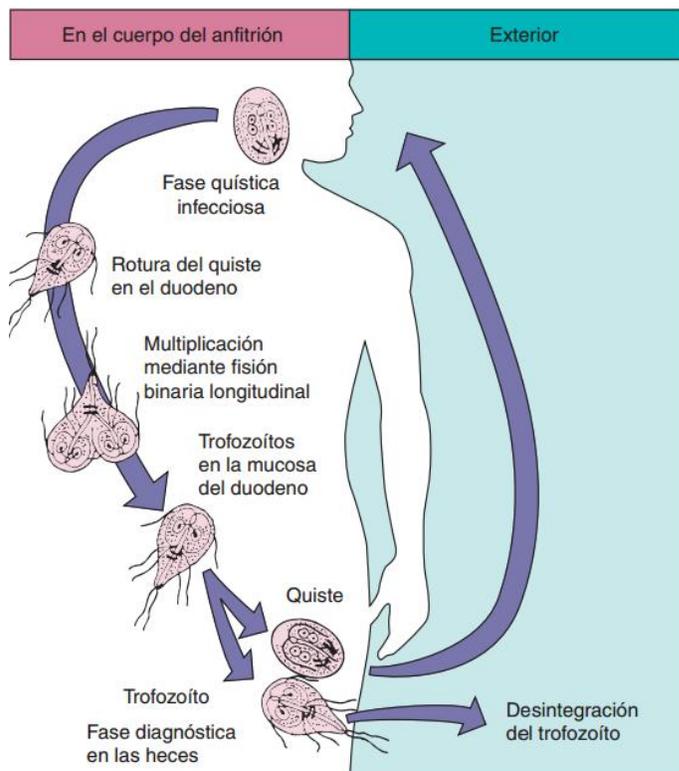
### 2.1.2 *Giardia lamblia*

*G. lamblia* (Figura 4) es un protozoo binucleado y flagelado que habita el intestino delgado de humanos (el flagelado más común del tracto gastrointestinal) y otros mamíferos; es el agente responsable de la giardiasis, una patología con manifestaciones clínicas que varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda o crónica asociada con diarrea y mala absorción de nutrientes.



**Figura 4. Trofozoíto de *Giardia lamblia*.**  
Fuente: (Kasper L.D., et al. 2006)

La infección con *G. lamblia* es la enfermedad parasitaria más común en todo el mundo y se inicia por la ingestión de los quistes del parásito, los cuales se desenquistan durante su pasaje por el contenido ácido del estómago como se esquematiza en la Figura 5, liberando los trofozoítos. Estos colonizan el intestino delgado superior y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal mediante un organelo característico llamada discoventral o de adhesión (Adam, 2001).



**Figura 5. Ciclo vital de *Giardia lamblia* (duodenalis).**

Fuente: Murray P., Rosenthal S. y Pfaller M. (2009). Microbiología Médica. España: Elsevier.

Debido a las diferencias en las condiciones sanitarias, en los países subdesarrollados es mayor la prevalencia que en los países avanzados, en algunos países pobres, la giardiasis en niños afecta cerca del 100 % de la población y cuyas manifestaciones clínicas oscilan entre el estado portador asintomático hasta diarrea fulminante con mala absorción.

El síndrome de mala absorción es un proceso importante en esta enfermedad, como se muestra en la Tabla 1, se presenta en más del 50 % de los casos, con mayor influencia e impacto en pacientes pediátricos, se puede presentar tanto en la etapa aguda como crónica de la enfermedad. Dada la menor gravedad de la enfermedad y la propensión a la cronicidad, los pacientes suelen solicitar atención médica en fases tardías del

proceso; sin embargo, la enfermedad puede ser grave, dentro de los hallazgos encontrados en los pacientes pueden incluir: enteropatía con pérdida de grasas, proteínas y vitamina B<sub>12</sub>, con deficiencia de disacaridasa y pérdida de peso importante, retraso del crecimiento, deshidratación y en casos poco frecuentes, muerte. (Tieney M.L, 2006)

**Tabla 1. Manifestaciones clínicas de la giardiasis. (SEIMC, 2014)**

Síntomas	%
Diarrea	63
Déficit de absorción de lactosa	60
Estreñimiento	55
Déficit de absorción de B12 / fólico	45
Flatulencia	46
Esteatorrea	44
Dolor / distensión abdominal	32
Fatiga	28
Anorexia / náuseas	20
Pérdida de peso	18
Vómitos	5
Moco en heces	4
Fiebre	3

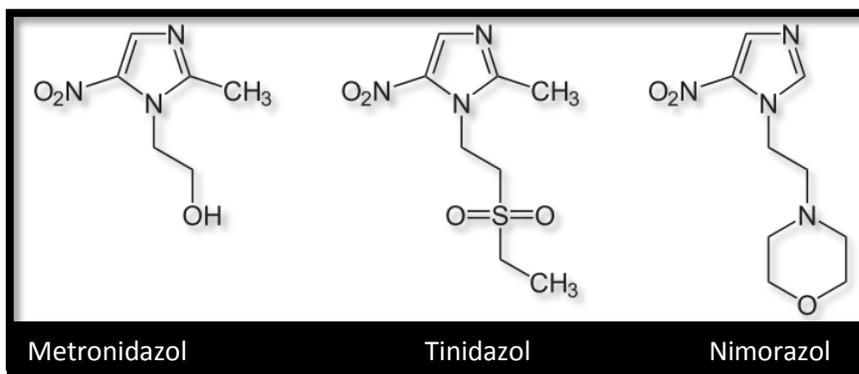
Este parásito constituye un importante problema de salud pública global (Thompson y Monis, 2004; Fayer R., et al. 2004) debido a que grandes epidemias han ocurrido por contaminación fecal de alimentos y reservorios de agua, infectando en algunos casos a miles de personas, en los EE.UU. Se considera a 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 reproducir totalmente su ciclo vital en el laboratorio. Hasta este momento, la única posibilidad de controlar la giardiasis es utilizando medicamentos cuyos principios activos no son altamente eficaces y que

pueden presentar un gran número de efectos secundarios, asimismo, se han registrado cepas resistentes a los mismos (Vega et al., 2008; Guerra y Guerra, 2006; Petri, 2003).

### **2.1.3 Tratamiento Farmacológico**

Existen diversos fármacos para el tratamiento de la amebiasis y giardiasis sin embargo, así como ha pasado con otros microorganismos en los cuales el uso inadecuado y descontrolado de los fármacos, aunado al fácil acoplamiento de los microorganismos a su entorno, ha llevado a un creciente incremento de la resistencia microbiana a los diversos compuestos descubiertos, forzando a la utilización de dosis más elevadas, además de periodos de tratamiento más largos y estancias hospitalarias de mayor duración, ya que es más rápida la adaptación de los microorganismos que la producción de nuevos fármacos para contrarrestarlos, esto incrementando día a día la morbi-mortalidad y los costos del sector salud en tratamientos.

Para el tratamiento de la amebiasis, el fármaco de elección es el metronidazol y sus derivados nitroimidazoles (Figura 6) (CENETEC, 2008; CDC, 2005; Dipiro, 2008) sin embargo; se ha reportado que *E. histolytica* ha desarrollado un mecanismo de resistencia a este fármaco sistémico (Guerra y Guerra, 2006), asimismo; se han reportado cepas que presentan multifarmacorresistencia (Orozco et al, 2002) a diversos fármacos, las cuales afectan a millones de personas alrededor del mundo sobre todo en países en vías de desarrollo donde la prevalencia de las parasitosis adquiere cifras mayores y aunque existen diversos tratamientos para estas parasitosis, muchos pacientes presentan recidivas aun después de haber realizado dos o más tratamientos (Guerra y Guerra 2006), esto haciendo referencia a la creciente resistencia de los propios microorganismos.



Aunado al problema de cepas resistentes, los derivados Nitroimidazoles son compuestos que causan graves complicaciones en la salud de los pacientes por sus diversas reacciones adversas, tales como: náuseas, disgeusia (sabor metálico desagradable), anorexia, molestias abdominales, diarrea, xerostomía; más raramente pueden aparecer cefalea, vómito, erupciones dérmicas, glositis, estomatitis, mareos y tromboflebitis tras aplicación parenteral. Las reacciones más graves son de carácter neurológico: parestesias, incoordinación, ataxia y convulsiones (Taketomo et al., 2009).

Estos fármacos son muy agresivos para la flora bacteriana natural del tracto gastrointestinal por su espectro tanto antiprotozoario como antibacteriano, ya que el espectro antibacteriano de estos fármacos está directamente enfocado sobre bacterias anaerobias, las cuales representan alrededor del 96-99% en el tracto gastrointestinal del ser humano y que son de gran importancia pues son fuente de menaquinona (vitamina K2), proveen de protección contra otras bacterias causantes de IGI (Infecciones Gastrointestinales) además de facilitar la digestión de los alimentos sobre todo de origen vegetal.

## 2.2 Plantas estudiadas

### 2.2.1 *Arenaria lycopodioides* (Figura 7)

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (p. con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Caryophyllaceae

Género: *Arenaria*

Epíteto específico: *lycopodioides*

Nombre común: Estrellita



**Figura 7.** *Arenaria lycopodioides*.

Fuente: Tenorio L. (2006). *Arenaria lycopodioides*. CONABIO.

#### 2.2.1.1 Distribución en México.

Es una planta perenne distribuida en Trópicos, se ha registrado en Chiapas, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Estado de México, **Hidalgo**, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (CONABIO, 2009).

### **2.2.1.2 Descripción botánica.**

Es una planta recostada de zonas templadas cuyas hojas angostas tienen costilla y margen engrosados, hojas secundarias en fascículos en las axilas de las primarias, flores blancas con 5 pétalos y sépalos con la costilla engrosada que se prolonga en un mucrón en el ápice.

Planta densa o poco ramificada, cespitosa, con rizomas o estolones largos.

Tamaño: Hasta 20 cm.

Tallo: De 4 a 20 cm de largo, ramificados en la base y más arriba, con pelos cortos.

Hojas: Linear-lanceoladas a lineares, de 4 a 13 mm de largo y 0.5 a 2 mm de ancho, agudas, mucronadas, costilla y márgenes conspicuamente engrosadas y lustrosas, sin pelos; hojas secundarias en fascículos en las axilas de las hojas primarias.

Inflorescencia: Flores solitarias, axilares, pedicelos de 4 a 20 mm de largo, con pelos densos y cortos.

Flores: Sépalos lanceolados, de 4 a 8 mm de largo, agudos a acuminados, mucronados, los interiores con margen escarioso, costilla conspicua, sin pelos; pétalos de 5 a 8 mm de largo, poco más largos que el cáliz, conspicuos.

Frutos y semillas: El fruto es una cápsula, en su madurez es más larga que el cáliz. Semillas de 0.7 a 0.8 mm en su dimensión más grande, café-negruzcas, lustrosas (CONABIO, 2009)

### **2.2.1.3 Uso medicinal.**

Dentro de la medicina tradicional, *Arenaria lycopodiodes* se utiliza para el tratamiento tanto de diarrea como disentería (Pérez et al., 2003)

#### 2.2.1.4 Estudios Químicos y farmacológicos previos

Gaitan, V.I (1998) realizó un estudio en donde se determinó la actividad antimicrobiana de Extractos de *Arenaria Lycopodioides* y *Gnaphalium inornatum*.

#### 2.2.2 *Geranium schiedeanum* (Figura 8)

Reino: Plante

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliaopsida

Orden: Geraniales

Familia: Geraniaceae

Género: *Geranium*

Epíteto específico: *schiedeanum*

Nombre común: Pata de león



**Figura 8.** *Geranium schiedeanum*.

Fuente: (Bautista, A. et al., 2013)

#### 2.2.2.1 Distribución en México.

Planta herbácea perene distribuida en el centro-este de la república. S.L.P., Querétaro, **Hidalgo**, México, Tlaxcala, Puebla, Veracruz y Oaxaca (IBUNAM, 2013).

### **2.2.2.2 Descripción botánica.**

Tamaño: Planta rastrera ascendente de hasta 60 cm de largo.

Tallo: A menudo varios partiendo de la base, más o menos profusamente ramificados.

Hojas: láminas de las hojas basales reniformes a pentagonales o suborbiculares en contorno general, de 2 a 5 cm de largo y de ancho, a veces un poco más anchas, divididas hasta cerca de la base en 5 (ó 7) lóbulos de contorno romboide.

Inflorescencia: Pétalos casi siempre morados o rosado-morados, de (12)15 a 20 mm de largo, obovados, enteros a emarginados en el ápice, cortamente pilosos en la base

Fruto: de 2 a 2.8 cm de largo.

Semilla: Aproximadamente 2.5 mm de largo, de color café oscuro o negro (IBUNAM, 2013).

### **2.2.2.3 Uso medicinal.**

*G. schiedeanum*, se ha utilizado como un antipirético, analgésico, antiinflamatorio y antiséptico. Se ha informado el uso de otras especies de geranio como hipoglucemiante, antihipertensivo y efecto reductor del colesterol. (Bautista A.et al., 2013)

### **2.2.2.4 Estudios Químicos y farmacológicos previos**

Bautista et al. (2013) Realizaron una investigación en la cual el tratamiento profiláctico con el extracto crudo de *Geranium schiedeanum*, en el modelo de hepatotoxicidad inducida por tioacetamida en ratas, redujo y el retraso la lesión hepática en un 66 % a las 24 h, atribuido esto a los compuestos presentes en esta planta (taninos hidrolizables, ácido gálico, geraniin acetono, ácido elágico y el glucósido flavonoide kaempherol) y que presentan un gran potencial antioxidante.

### 2.2.3 *Lopezia racemosa* (Figura 9)

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (p. con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Rosidae

Orden: Myrtales

Familia: Onagraceae

Género: *Lopezia*

Epíteto específico: *racemosa*

Nombre común: Aretillo, perita, perilla, perlilla.



**Figura 9.** *Lopezia racemosa*.

Fuente: Tenorio, L. (2000).  
CONABIO.

#### 2.2.3.1 Distribución en México.

Se ha registrado en Chiapas, Distrito Federal, Durango, Guerrero, **Hidalgo**, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Tlaxcala, Veracruz (CONABIO, 2009).

#### 2.2.3.2 Descripción botánica.

Hierba erecta a ascendente anual.

Tamaño: Hasta de 1.5 m de alto, pero generalmente 40-60 cm.

Tallo: Erecto o decumbente y arraigando en los nudos.

Hojas: Variables en tamaño, forma y pubescencia, generalmente alternas, con pecíolos de 0.1 a 4 cm de largo, pocas veces con pelos rectos y de base redondeada o con muy pocos pelos, láminas ovadas a muy angostamente lanceoladas, de 0.5 a 8 cm de largo por 0.5 a 4.5 cm de ancho, ápice subagudo a acuminado, algunas veces con una proyección apical y corta, serradas a subenteras, agudas o cuneadas a redondeadas u obtusas en la base, con pelos largos tiesos densos o esparcidos o con pelos rectos de base redondeada, generalmente con pubescencia aplicada contra la superficie, algunas veces con pocos pelos.

Inflorescencia: Generalmente paniculada, a veces racemosa, raramente corimbosa, brácteas de 2 a 30 mm de largo y 0.5 a 12 mm de ancho, pedicelos de 6 a 30 mm de largo, divergentes o ascendente-erectos en flor, reflejos (hacia atrás) a ascendentes en fruto.

Flores: Con sépalos de 3.5 a 7.5 mm de largo y 0.5 a 2 mm de ancho, con algunos pelos en el ápice; pétalos variables en color y tamaño, blancos, rosados, morados o anaranjados, pétalos superiores de 4 a 8.5 mm de largo y 0.7 a 2 mm de ancho, con una uña ciliada más corta que el limbo, linear-oblanceolados a oblongo-oblanceolados, con una glándula o sin glándula en la base de la lámina, pétalos inferiores de 3.5 a 10 mm de largo y 1.5 a 6 mm de ancho, oblongo ovados o espatulados a ovados, con una uña tan larga como la lámina; estambre fértil de 3 a 5.5 mm de largo, antera de 1 a 2 mm de largo, estaminodio de 3 a 6 mm de largo por 2 a 3 mm de ancho, generalmente ovado, más o menos retuso (redondeado con una depresión en medio) en el ápice, blanquecino a rosado o rojo; ovario subgloboso, sin pelos, estilo de 2.5 a 4.5 mm de largo, estigma de 0.4 a 1.7 mm de diámetro, blanco o rosado.

Frutos y semillas: El fruto es una cápsula de 2 a 7 mm de largo y 2 a 5 mm de grueso, globosa, algunas veces obpiriforme o elipsoide, sin pelos; semillas de 0.8 a 1.3 mm de largo por 0.6 a 0.9 mm de grueso, ovoides, irregularmente rugosas o cubierta por

estructuras más o menos cilíndricas, cortas y endurecidas, de color café (CONABIO, 2009).

### **2.2.3.3 Uso medicinal.**

En la medicina tradicional, la infusión de *L. racemosa* ya sea planta completa o sin raíz, se utiliza principalmente para el tratamiento de diarrea, dolor estomacal así como cólicos y estreñimiento (Villavicencio et al., 2005) así como para anginas, tos, e infección de garganta.- la planta (parte aérea) se prepara en decocción y se hacen gargarismos tres veces al día (Bello G.M., 2006).

La planta también es utilizada para aliviar el dolor de muela, inflamación estomacal, para padecimientos en riñones, se refiere tener efecto diurético (BDMTM, 2009).

### **2.2.3.4 Estudios Químicos y farmacológicos previos**

Se han realizado diversas investigaciones sobre los efectos terapéuticos de esta planta algunos ejemplos de ello son:

Salinas R. et al. (2014) aislaron el compuesto nuevo 6-*O*-palmitoil-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylcampesterol y 6-*O*-palmitoil-3-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$ -sitosterol, en este estudio fue evaluada la actividad anti-inflamatoria *in vivo* en el modelo de edema de la oreja del ratón inducida con 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) de 6-*O*-palmitoil-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylcampesterol el cual mostró una inhibición de 57,14 %.

Paredes C. et al. (2013) realizaron una investigación sobre los componentes obtenidos del extracto de *Lopezia racemosa*, se evaluó el efecto Antiinflamatorio, antimicrobiano, antiparasitario, antimicótico y citotóxico, hallando, en algunas fracciones actividad sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *T. rubrum*, *C. albicans*, *C. neoformans* y *L. donovani*. La mayoría de los extractos mostraron valores de citotoxicidad en macrófagos humanos THP-1 por encima del 50

% y en cuanto al efecto antiinflamatorio, la fracción HF 11-14b mostro un buen efecto al inhibir la secreción de IL-6 por parte de los macrófagos expuestos a LPS (lipopolisacaridos microbianos) hasta un 50 %.

Morales, A.C., et al (2012) realizaron la evaluación de la actividad antidiarreica y analgésica del extracto etanólico, en el modelo de motilidad gastrointestinal, el extracto mostró actividad dosis dependiente a 150 mg/Kg (25.28 %), 300 mg/kg (78.57 %) y 600 mg/Kg (92.08 %), obteniendo una mayor respuesta que el fármaco control, loperamida a 2.5 mg/kg (78.57 %). En el modelo de Tail-flick se observó el mismo efecto dosis dependiente y la actividad fue mayor que en el fármaco control, paracetamol a 250 mg/Kg. En el modelo de Writhing se observó un comportamiento de hormesis, a 150 mg/kg (88.83 %), 300 mg/kg (46.32 %) y 600 mg/kg (80.65 %), presentando mayor actividad que los fármacos control, ácido acetilsalicílico a 200 mg/kg (40.39 %) y diclofenaco a 10 mg/kg (40.39 %).

#### 2.2.4 *Phytolacca icosandra* (Figura 10)

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (p. con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Phytolaccaceae

Género: *Phytolacca*

Epíteto específico: *icosandra*



**Figura 10.** *Phytolacca icosandra*.  
Fuente: Tenorio, L. (2000). CONABIO.

Nombre común: Jaboncillo, mazorquilla, carricillo, namole, mora etc.

#### **2.2.4.1 Distribución en México.**

Se ha registrado en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, **Hidalgo**, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán (CONABIO, 2009).

#### **2.2.4.2 Descripción botánica.**

Planta herbácea anual o perenne de vida corta, con frecuencia robusta, sin pelos o poco pubescente, algo succulenta.

Tamaño: Hasta de 2 m de alto.

Tallo: Ramificado, hueco, anguloso.

Hojas: Elípticas u ovado-elípticas, de 7 a 20 cm de largo por 2.5 a 9.5 cm de ancho, ápice agudo, acuminado y a veces mucronado, base atenuada a acuminada; pecíolos bien manifiestos, de 1 a 6 cm de largo.

Inflorescencia: Racimos pedunculados, numerosos, axilares y terminales, de 8 a 15 cm o más de largo en estado de fructificación, ráquis frecuentemente pubescente.

Flores: Subsésiles o sobre pedicelos de 2 a 5 mm de largo, brácteas subuladas, tépalos verdosos, blancos o rojizos, elípticos a ovados, de 2.5 a 3.2 mm de largo por 1.5 a 3 mm de ancho, persistente; estambres 8 a 20; ovario subgloboso, con 6 a 10 carpelos, estilos encorvados.

Frutos y semillas: Fruto carnoso, globoso-aplanado, de 6 a 8 mm de diámetro, verde cuando tierno, pasando a rojo oscuro y luego negro en la madurez; semilla negra, brillante, de unos 2.5 mm de largo (CONABIO, 2009).

#### **2.2.4.3 Uso medicinal.**

En la medicina tradicional *P. icosandra* se utiliza en infusión ya sea la raíz o la planta completa para problemas de diarrea y para disminuir la temperatura en personas con fiebre (Villavicencio et al., 2005).

Tanto el jugo del fruto como la decocción, aplicados de manera local, se utilizan para una gran variedad de padecimientos tales como: Piquetes de insectos, llagas, granos (Bello G.M., 2006), como antidermatítico, contra los hongos de la piel (por ejemplo caspa), caída del cabello, también por acción analgésica se utiliza en dolor de espalda, cabeza, reumático y post contusión.

La decocción por vía oral se utiliza para: adelgazar, dolor de estómago, cólicos, diurético y anticonceptivo (BDMTM, 2009).

#### **2.2.4.4 Estudios Químicos y farmacológicos previos**

Se han realizado diversas investigaciones sobre los efectos terapéuticos de esta planta un ejemplo de ello es:

Hernández V. et al. (2012) evaluaron la actividad antihelmíntica *in vivo* del extracto etanólico de las hojas de *Phytolacca icosandra* evaluado en cabras infectadas artificialmente con *Haemonchus contortus*. El extracto fue administrado por vía oral mediante cápsulas de gelatina (250 mg / kg de peso corporal) que fueron dosificados en dos días consecutivos, obteniendo una reducción significativa máxima en cuanto al número de huevos por gramo de heces del 72 %, al día 11 después del tratamiento.

Santos, L.J., et al. (2010) Evaluaron la actividad antisecretora del extracto metanólico y clorofórmico tanto de hojas y tallo como de flores de *Phytolacca icosandra*, utilizando loperamida como fármaco antisecretor control, los extractos clorofórmicos de hojas y tallo, así como de flores mostraron 89.16 % y 58.3 % de inhibición y del extracto metanólico de hojas y tallo, así como de flores mostraron 41.66 % y 75 % respectivamente, mientras que loperamida mostro una inhibición del 43.33 %.

### 2.2.5 *Plantago lanceolata* (Figura 11)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Plantaginales

Familia: Plantaginaceae

Género: *Plantago*

Epíteto específico: *lanceolata*

Nombre común: Llantén de hoja angosta,

llantén menor, alpiste, pajarero,

siete venas, plantén y plantago.



**Figura 11. *Plantago lanceolata*.**

Fuente: Royal Museum for Central  
África. Disponible en:

[http://www.africamuseum.be/collections/external/prelude/view\\_plant?pi=10120](http://www.africamuseum.be/collections/external/prelude/view_plant?pi=10120)

### **2.2.5.1 Distribución en México.**

Se ha registrado en Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, **Hidalgo**, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Veracruz (CONABIO, 2009).

### **2.2.5.2 Descripción botánica.**

Planta herbácea perenne.

Tamaño: De 10 a 30 cm.

Tallo: Perenne, corto y grueso, subterráneo (cáudice) indiviso en la juventud, pero fuertemente ramificado en individuos maduros.

Hojas: Alternas, todas basales, pecíolo acanalado, de 5 a 15 cm de largo, láminas lanceoladas a linear-lanceoladas, raramente elípticas, de 3 a 30 cm de largo y de 0.5 a 4.5 cm de ancho, ápice agudo, margen entero o con frecuencia irregularmente dentado, con o sin pelos, a veces la pubescencia concentrada en los nervios principales, nervios 3 a 5 (7), generalmente divergentes desde la base.

Inflorescencia: De 1 a 10 por individuo (o ramificación), generalmente del doble de la longitud de las hojas; pedúnculo acanalado, más o menos densamente piloso, con pubescencia más abundante en la base del raquis, de 15 a 80 cm de largo.

Flores: Agrupadas en espigas cónico-ovoides en la juventud, cilíndricas al madurar, de 2 a 8 cm de largo, con las flores densamente apretadas, brácteas ovado-acuminadas, de 2 a 4 mm de longitud, con la quilla gruesa, café, más o menos del doble del ancho del margen; sépalos anteriores connados (unidos para formar una estructura), de 2 a 3 mm de largo, vilosos hacia el ápice y sobre el dorso de la quilla, ésta aproximadamente de la mitad del ancho del margen; lóbulos de la corola angostamente ovados, sin pelos, de más o menos 2 mm de largo, ápices agudos con pigmento café-rojizo en su base, estambres blancos.

Frutos y semillas: El fruto es una cápsula oblongo-ovoide, de más o menos 4 mm de longitud, con dehiscencia transversal; semillas 1 o 2 por cápsula, en forma de barco, cóncavas, de  $\pm$  2 mm de longitud, superficie casi lisa, punteggiada, lustrosa, de color ámbar a café oscuro (CONABIO, 2009).

### **2.2.5.3 Uso medicinal.**

En la medicina tradicional, *P. lanceolata* se emplea como antiinflamatorio, expectorante, antidiarreico, astringente, emoliente, diurético, también es empleada para el tratamiento de la cistitis y hematuria, así como para el alivio de las hemorroides (Schmelzer, G.H. y Gurib-Fakim, A. 2008)

También es utilizada de forma empírica con olivo y cera (receta conocida desde la época de los egipcios) como antiinflamatorio, regenerador de piel y cicatrizante, así como antiséptico para heridas. Por su riqueza en mucílago, tanino, pectina y otras sustancias, tiene acreditadas virtudes como astringente, antiinflamatorio, antitusivo y antibacteriano.

## **2.3 Antecedentes y generalidades del género *Plantago***

*Plantago* es un género de plantas con flores, pertenecientes a la familia Plantaginaceae y compuesto de alrededor de 270 especies. La mayoría son plantas herbáceas, aunque hay arbustos que alcanzan los 60 cm de altura. Las hojas son sésiles (sentadas) con pseudopeciolo. Tienen 3 ó 5 venas paralelas. Las hojas pueden ser anchas o estrechas, según la especie. La inflorescencia son los tallos típicos con 5-40 cm de altura, con las flores minúsculas y muy numerosas, que son polinizadas por el viento (CONABIO. 2009)

*Plantago lanceolata* es una planta herbácea, perenne, natural de toda Europa, Norteamérica y Asia occidental, donde crece en terrenos secos, taludes, bordes de

caminos y lugares no cultivados es conocida comúnmente como llantén menor, alpiste pajarero o siete venas.

De esta especie vegetal se han aislados diversos metabolitos secundarios tales como:

- Feniletanoides: acteosido (también denominado verbascósido), cistanosido F, lavandulifoliosido, plantamajosido e isoacteosido.
- Glucósidos iridoideos: aucubina y cartapol.

Se han reportado además, resultados de diversos estudios entorno a la actividad farmacológica de *P. lanceolata* algunos ejemplos son:

Montiel, J.G., et al. (2012) Realizaron la evaluación de la actividad antidiarreica del extracto metanólico de *Plantago lanceolata* en el modelo de motilidad gastrointestinal en ratas, obteniendo una inhibición del 64.5 %, el estudio fitoquímico dio como resultado el aislamiento de verbascósido el cual presentó una importante actividad antidiarreica a dosis de 10 mg/Kg (42.1 %), la cual fue comparable al control loperamida a dosis de 2.5 mg/Kg (48.5%).

Vigo E. *Et al*, (2005) determinaron que *P. lanceolata* presenta inhibición de la producción *in vitro* de NO en forma dependiente de la concentración en la línea celular de macrófagos murinos J77A.1.

Yoshida T. *Et al*, (2013) investigaron los efectos anti-obesidad del polvo de la hoja de *P. lanceolata*, esta no afectó a la ingesta de alimentos pero redujo significativamente la eficiencia alimentaria, suprimió el aumento de peso corporal y acumulación de grasa visceral, la reducción de ácido graso libre en suero además de los niveles de glucosa, los hallazgos sugieren que la dieta con *P. lanceolata* ejerce efectos anti-obesidad al estimular el metabolismo de todo el tejido adiposo visceral mediante la activación de la lipólisis, la aceleración de la  $\beta$ -oxidación y la supresión de la sintasa de ácidos grasos en tejido adiposo.

Melese E. *et al.*, (2011) evaluaron el efecto protector del extracto acuoso de la hoja contra la formación de úlcera gastroduodenal en diversos modelos en roedores, demostrando una mejor protección global contra las úlceras gastroduodenales que los fármacos estándar empleados como antiseoretos (ranitidina) y mecanismos citoprotectores (misoprostol).

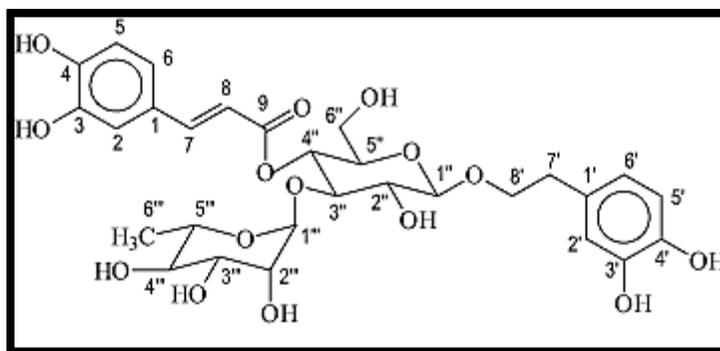
Gonda S. *et al.*, (2007) determinaron la actividad antioxidante de cinco variedades de Plantago, en donde se encontró que la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios son equivalentes a la capacidad antioxidante del ácido ascórbico.

Fleer H y Verspohl EJ., (2006) Evaluaron la actividad antiespasmódica del extracto etanólico de las partes aéreas de *P. lanceolata*, el cual inhibía las contracciones inducidas por acetilcolina (ACh), histamina y de iones de bario en el íleon de cobayo, además las contracciones inducidas en tráquea por los iones de bario fueron también inhibidas.

#### **2.4 Antecedentes y generalidades sobre verbascósido (acteósido)**

Verbascósido (Acteosido) pertenece a un conjunto de compuestos llamados feniletanoides los cuales son los derivados hidrosolubles de los fenilpropanoides, y se caracterizan por una fracción hidroxifeniletíl vinculado a una  $\beta$ -glucopiranososa (apiose, galactosa, ramnosa o xilosa) a través de un enlace glucosídico. En los últimos años se han logrado aislar varios feniletanoides en diferentes familias de plantas entre ellas Labiatae, Asteraceae, Oleaceae, Liliaceae, Scrophulariaceae, Orobanchaceae y Bignoniaceae. Diversos estudios farmacológicos han demostrado que poseen un amplio espectro de actividades biológicas tanto *in vitro* como *in vivo*, incluidos los antiinflamatorios, antimicrobianos, anticancerígenos, antioxidantes, función neuroprotectora y hepatoprotectora además de actividad inmunomoduladora (Campo G. *et al.*, 2012; Huan SK. *et al.*, 2012; Isacchi B. *et al.*, 2011; Esposito E. *et al.*, 2010).

El glucósido feniletanoide denominado verbascósido está caracterizado por la presencia del 4,5 dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) como se esquematiza en la Figura 12, estructura relativamente rara en los metabolitos secundarios, además esta conjugado con dos azúcares (glucosa y ramnosa). Este feniletanoide se ha logrado identificar en diversos géneros como Verbascum, Buddleja, Lantana, Cistanche, Olea entre muchas otras (Melese et al., 2011) y ha sido objeto de diversos estudios:



**Figura 12. Estructura de verbascósido.**

Fuente: Pereira Aline C., et al. 2008

Campo G. *et al*, (2012) encontraron que verbascósido inhibía significativamente la agregación plaquetaria inducida por difosfato de adenosina (ADP) mejorando el efecto de ASA (ácido acetil salicílico) el cual inhibe agregación plaquetaria actuando sobre el AA.

Huan SK. *et al*, (2012) evaluaron el efecto hepatoprotector de un vino medicinal llamado “Wu Chia-Pi”, al reducir el stress oxidativo, el cual está compuesto por nueve plantas medicinales y presenta altas concentraciones de verbascósido.

Wang HQ. *et al.*, (2012) evaluaron el efecto neuroprotector de verbascósido contra la beta-amiloide ( $\beta$ A) inducida por la citotoxicidad *in vitro*, mediante la inducción de la expresión de la hemo oxigenasa-1 (HO-1) el cual es un factor crucial en la respuesta a la lesión oxidativa y por lo tanto protege a las células PC12 contra la muerte celular

inducida por  $\beta$ -amiloide, los resultados moleculares demuestran que verbascósido actúa como un buen inductor de la expresión de HO- tanto *in vitro* como *in vivo* esto colocándolo como neuroprotector.

Ali I. *et al.*, (2011) evaluaron la actividad antifúngica de Anfotericina B junto con verbascósido en donde este último por sí solo no presento ningún efecto pero en combinación presento un claro y potente sinergismo contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*.

Isacchi B. *et al.*, (2011) valoraron la actividad antihiperalgésica de verbascósido en la prueba de Randall-Sellito (presión mecánica de la pata) en dos modelos animales de dolor neuropático: una mononeuropatía periférica producida o bien por una lesión por constricción crónica del nervio ciático (CCI) o por una inyección intra-articular de monoiodoacetato de sodio (MIA). Verbascósido se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg/kg revirtiendo la hiperalgnesia mecánica tanto en CCI y ratas tratadas con MIA, Verbascósido también es eficaz contra la hiperalgnesia mecánica después de la administración oral a dosis de 300 y 600 mg/kg.

Esposito E. *et al.*, (2009) publicaron un estudio el cual hace referencia al efecto protector de verbascósido en células de glioma C6 activadas, en un modelo de inflamación del sistema nervioso central, inducido por una endotoxina/citoquina bacteriana (lipopolisacárido (LPS)/interferón (IFN)-gamma, 1 ug/mL y 100 U/mL, respectivamente). Los resultados mostraron que el tratamiento con LPS/IFN-gamma durante 24 h provocó la inducción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y en donde los resultados demuestran que en los cultivos preincubados con verbascósido mostraban una inhibición de la síntesis de NO y de la enzima ciclooxigenasa proinflamatoria COX-2 en células de glioma sin la inhibición simultánea de la enzima COX-1, además de reducir la expresión de enzimas proinflamatorias en LPS/IFN-gamma a través de la inhibición de la activación del factor nuclear kappa B y la proteína quinasa vía de señalización activada por mitógenos.

### III JUSTIFICACIÓN

La primera línea de tratamiento tanto para giardiasis como para amebiasis es un antimicrobiano derivado de los nitroimidazoles denominado metronidazol, el cual posee un amplio espectro no solo como antiparasitario sino también como antibacteriano, siendo esto tanto un beneficio por su utilidad farmacológica en diversas infecciones anaerobias, como un grave problema para su uso tanto en animales como en el ser humano ya que es un compuesto muy agresivo para la flora bacteriana natural del tracto gastrointestinal. Otro problema relacionado al uso de este fármaco son las reacciones adversas, que en general no revisten gravedad y su incidencia es relativamente baja, pero son muy variadas. Las más frecuentes son de carácter digestivo: náuseas, disgeusia (sabor metálico desagradable), anorexia, molestias abdominales, diarrea, xerostomía; más raramente pueden aparecer cefalea, vómito, erupciones dérmicas, glositis, estomatitis, mareos y tromboflebitis tras aplicación parenteral.; Las reacciones más graves son de carácter neurológico: parestesias, incoordinación, ataxia y convulsiones. (Taketomo et al., 2009). Además el uso de este medicamento de forma irracional y descontrolada ha llevado a la aparición de cepas resistentes, que en pacientes enfermos aun después de haber tenido varios ciclos de tratamiento presentan recidivas.

Todos estos inconvenientes exigen al ser humano a buscar nuevos compuestos que puedan brindar una alternativa efectiva para lograr combatir a los diversos agentes patógenos que se encuentran en nuestro entorno, como lo son las enfermedades parasitarias del tracto digestivo, además de intentar encontrar compuestos que no presenten efectos adversos y la principal fuente de la cual la humanidad se ha valido para obtener compuestos bioactivos han sido las plantas, las cuales representan un universo que a pesar de tanto tiempo de su uso, no se ha logrado conocer ni una mínima fracción.

#### **IV HIPÓTESIS**

La evaluación del potencial antiprotozoario *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* de los extractos etanólicos de *Lopezia racemosa*, *Arenaria lycopodioides*, *Plantago lanceolata*, *Phytolacca icosandra* y *Geranium schiedeanum*, plantas utilizadas en la medicina tradicional del Estado de Hidalgo para el tratamiento de la diarrea y la disentería, permitirá la selección de al menos una especie activa y cuyo posterior estudio fitoquímico biodirigido conducirá a la obtención de principios activos con propiedades antiprotozoarias.

## V OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los extractos etanólicos obtenidos de *Lopezia racemosa*, *Arenaria lycopodioides*, *Plantago lanceolata*, *Phytolacca icosandra* y *Geranium schiedeanum*, posteriormente realizar el estudio fitoquímico biodirigido de la especie vegetal que presente la mayor actividad antiprotozoaria.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Obtener los extractos etanólicos a partir de las cinco especies seleccionadas en pequeña escala.
2. Evaluar la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los extractos etanólicos sobre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*.
3. Determinar la Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>).
4. Aislar los compuestos de la especie vegetal que presente la mejor actividad antiprotozoaria, mediante métodos cromatográficos e identificarlos por técnicas de análisis espectrométrico.

## VI MATERIALES Y MÉTODO

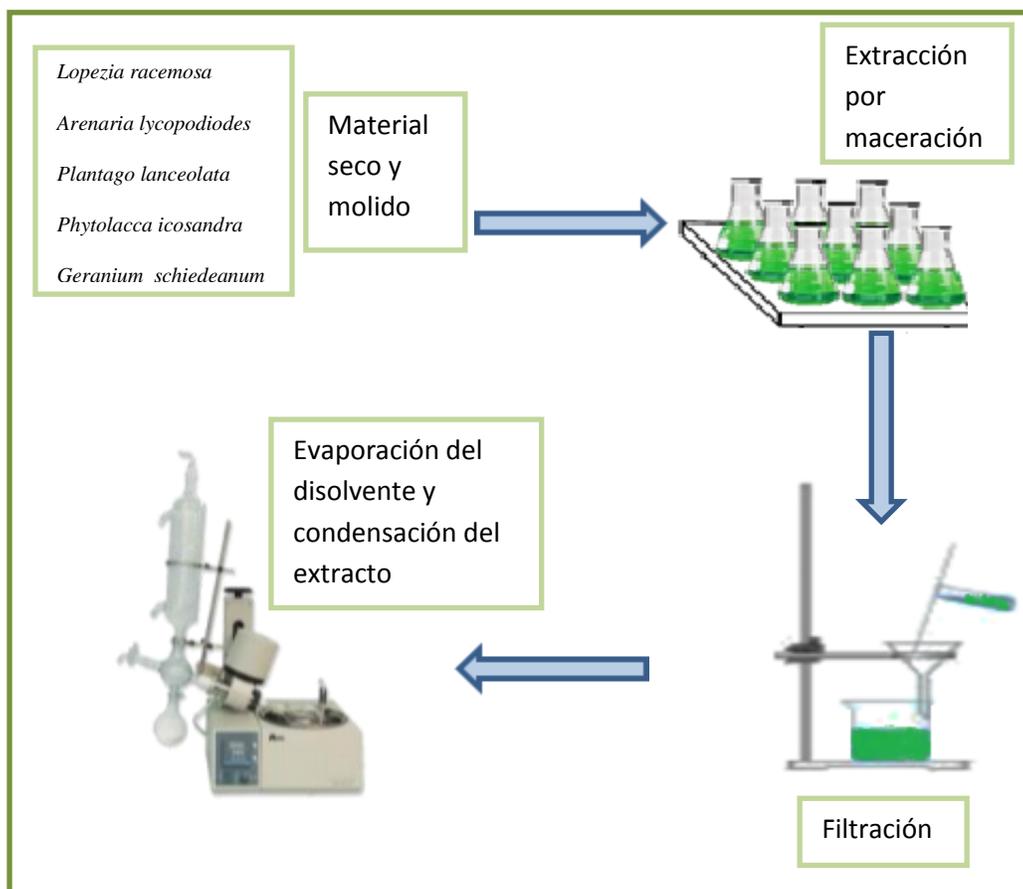
### 6.1 Recolección del material vegetal

Se colectaron las especies vegetales; *Phytolacca icosandra*, *Plantago lanceolata*, *Lopezia racemosa*, *Arenaria lycopodioides*, y *Geranium schiedeanum*, plantas utilizadas para el tratamiento de trastornos gastrointestinales entre los que se incluye la diarrea y la disentería, de cada especie vegetal se colectó material fresco en diferentes regiones del Estado de Hidalgo (Acaxochitlan y El guajolote), parte del material vegetal, se utilizó para obtener los ejemplares que se depositaron como referencia en el herbario HgoM de la UAEH para su clasificación taxonómica.

El material vegetal se desecó a temperatura ambiente, en un medio con humedad relativa baja y evitando el contacto directo con la luz del sol, durante un periodo aproximado entre 15 y 20 días (rotando la superficie expuesta al aire), procediendo posteriormente a separar las diferentes partes de la planta seca y triturándose por separado en un molino eléctrico (Marca Del Rey de 1hp de potencia).

### 6.2 Preparación de los extractos en pequeña escala para el proceso de selección de la especie más activa.

Para la selección de las especies con mayor actividad antiprotozoaria y candidatas a un posterior estudio fitoquímico biodirigido, se prepararon los extractos etanólicos, a partir de 100 g de material vegetal seco y molido de cada una de las especies vegetales preseleccionadas. Los extractos etanólicos se obtuvieron por maceración con etanol (300 mL X triplicado X 1 semana) a temperatura ambiente en sus respectivos matraces Erlenmeyer de 500 mL sellados herméticamente para evitar la evaporación del disolvente durante el proceso de extracción (Figura 13).

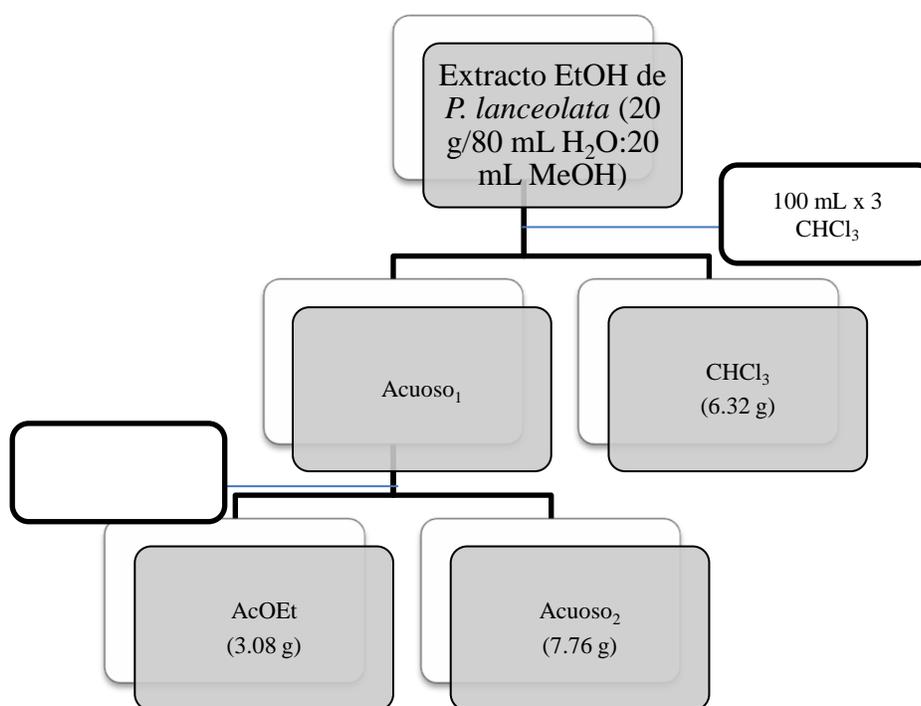


**Figura 13. Diagrama de obtención de los extractos.**

El etanol se eliminó con ayuda de un rotaevaporador (Büchi Vacobox B-177 con controlador de vacío Büchi B-720) a presión reducida hasta sequedad, el extracto fue conservado en frascos tapados lejos de la radiación directa del sol.

### 6.3 Preparación a gran escala del extracto de la especie vegetal más activa.

Debido a que el extracto que presentó la mejor actividad antiprotozoaria fue el de *Plantago lanceolata*, el estudio biodirigido se encausó a la investigación de esta última especie vegetal. El material vegetal (3 kg) de *P. lanceolata* se desecó a temperatura ambiente y se molió, posteriormente se preparó el extracto por maceración con etanol (20 L X 1 semana) hasta obtener el extracto crudo.



**Figura 14. Fraccionamiento por partición del extracto etanólico de *Plantago lanceolata*.**

#### **6.4 Fraccionamiento del extracto etanólico de *Plantago lanceolata*.**

Para la obtención de los compuestos con actividad antiprotozoaria, una porción del extracto etanólico (20 g) se sometió a un fraccionamiento por partición, con el empleo de cloroformo (100 mL X 3), acetato de etilo (100 mL X 3) y agua (80 mL de agua: 20 mL de metanol) en un embudo de separación, los rendimientos se muestran en la Figura 14.

#### **6.5 Aislamiento de verbascosido**

En una primera instancia se realizó una reproducción de la metodología utilizada por Montiel, J.G., (2012), en donde La fracción de AcOEt (1.48 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria gel de sílice (10 g); se utilizó como eluyente una mezcla ternaria de MeOH-AcOEt-Hexano (1:2:1). Se obtuvieron 10 fracciones de 37 mL cada una las cuales fueron agrupadas en función a sus características cromatográficas, quedando cuatro fracciones secundarias (F1 a F4).

La fracción secundaria F2 (0.450 g) se purificó mediante cromatografía en columna abierta empleando una columna (10 mm x 80 cm) y como fase estacionaria gel de sílice (10 g), empleando una mezcla ternaria de CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O-MeOH [(50:0.2:4); (45:0.2:3.1); (40:0.2:3.0); (35:0.2:2.8); (30:0.2:2.6); (25:0.2:2.4); (20:0.2:2.3); (15:0.2:2.0); (10:0.2:1.8); (5:0.2:1.5); (0:0.2:1.4)]. Se obtuvieron 95 fracciones de 14 mL cada una las cuales se agruparon en función a sus características cromatográficas, quedando 14 fracciones terciarias (F2-1-F2-14). De la fracción F2-10, eluida con CHCl<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O-MeOH (5:0.2:1.5), se obtuvieron 243.5 mg de Verbascósido (acteósido), como un sólido ámbar soluble en metanol, con un rendimiento del 1.2 %.

Con el objetivo de hacer más eficiente el rendimiento, se procedió a purificarlo siguiendo la siguiente metodología: 20 g del extracto fueron fraccionados mediante cromatografía en columna sobre Sephadex LH 20 (Pharmacie), se utilizó como fase

móvil H<sub>2</sub>O/Metanol, en polaridad decreciente. Las cromatografías en capa fina (ccf) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio (cromatofolios en aluminio TLC 20 X 20 cm sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck), se utilizó como fase móvil, Acetato de etilo 10 mL/metanol 1mL/H<sub>2</sub>O 0.5mL (Rf 0.3-0.5), como revelador se utilizó sulfato cérico y cloruro férrico, se determinó la posible presencia de glucósidos feniletanoides por la coloración azul que estos presentaron ya que estos presentan varios grupos fenoles en su estructura.

El estudio fitoquímico del extracto etanólico, condujo al aislamiento de 4.33 g de un compuesto mayoritario puro con un rendimiento del 21.67 %, el cual fue identificado como Verbascósido en base al análisis de su espectro de RMN<sup>1</sup>H. Este compuesto está en proceso de evaluación para determinar su actividad antiprotozoaria.

## **6.6 Evaluación del efecto antiprotozoario.**

### **6.6.1 Medios de cultivo y material biológico.**

*Entamoeba histolytica*: se empleó la cepa HM1-IMSS la cual se cultivó axénicamente a 37 °C en un medio TYI-S-33 suplementado con 10 % de suero bovino inactivado con calor.

*Giardia lamblia*: se utilizó la cepa IMSS: 0989:1 la cual fue cultivada en un medio modificado TYI-S-33, suplementado con 10 % de suero bovino y bilis de bovino (Tabla 2).

Para la producción del medio TYI-S-33 se mezclaron todos los componentes (Tabla 2) y se disolvieron en 300 mL de agua bidestilada desionizada.

Se ajustó a un pH de 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 500 mL con agua bidestilada desionizada. Se distribuyó en alícuotas de 10 mL. En tubos de 13x100 mm con tapón

de rosca, se esterilizó a 121°C/15 min y se almacenó a congelación hasta su empleo (-20°C puede durar hasta varios meses).

**Tabla 2. Composición del medio TYI-S-33 para el cultivo de *E. histolytica* y *G. lamblia*.**

Componentes	Concentración
	(g/500 mL de agua bidestilada desionizada)
Peptona de caseína	10.00
Extracto de levadura	5.00
NaCl	1
L-cisteína	0.50
Ácido ascórbico	0.10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50
Citrato férrico de amonio	0.00114
D-glucosa anhidra	5.00

Cada tubo con 10 mL de medio se le adicionó 1 % (0.1 mL) de una solución de Penicilina-Estreptomina (1000 X)

Los trofozoitos fueron axénicamente mantenidos y para los ensayos se emplearon en la fase logarítmica de crecimiento. (Bautista et al., 2011)

### **6.6.2 Pruebas de susceptibilidad *in vitro*.** (Figura 15)

La solución madre o stock se preparó disolviendo 30 mg/mL del extracto etanólico de cada una de las especies, fracciones y compuestos puros a evaluar en 1.0 mL de DMSO y a partir de esta solución stock se tomaron las cantidades necesarias para obtener la concentración deseada.

Diferentes concentraciones del extracto etanólico (0.01, 0.05, 0.1, 0.13, 0.15, 0.25, 0.30 y 0.7 mg/mL) se incubaron con trofozoitos de *E. histolytica* ( $6 \times 10^3$ ) o *G.*

*lamblia* ( $5 \times 10^4$ ) por 48 h a 37 °C (Barbosa et al., 2007) en tubos con 5 mL de medio TYI-S-33, adicionados con 0.5 mL de suero bovino y 0.05 mL de antibiótico, cada concentración se probó en tres eventos independientes por triplicado, los compuesto puros se evaluaron a concentraciones de 2,5-200  $\mu\text{g/mL}$ .

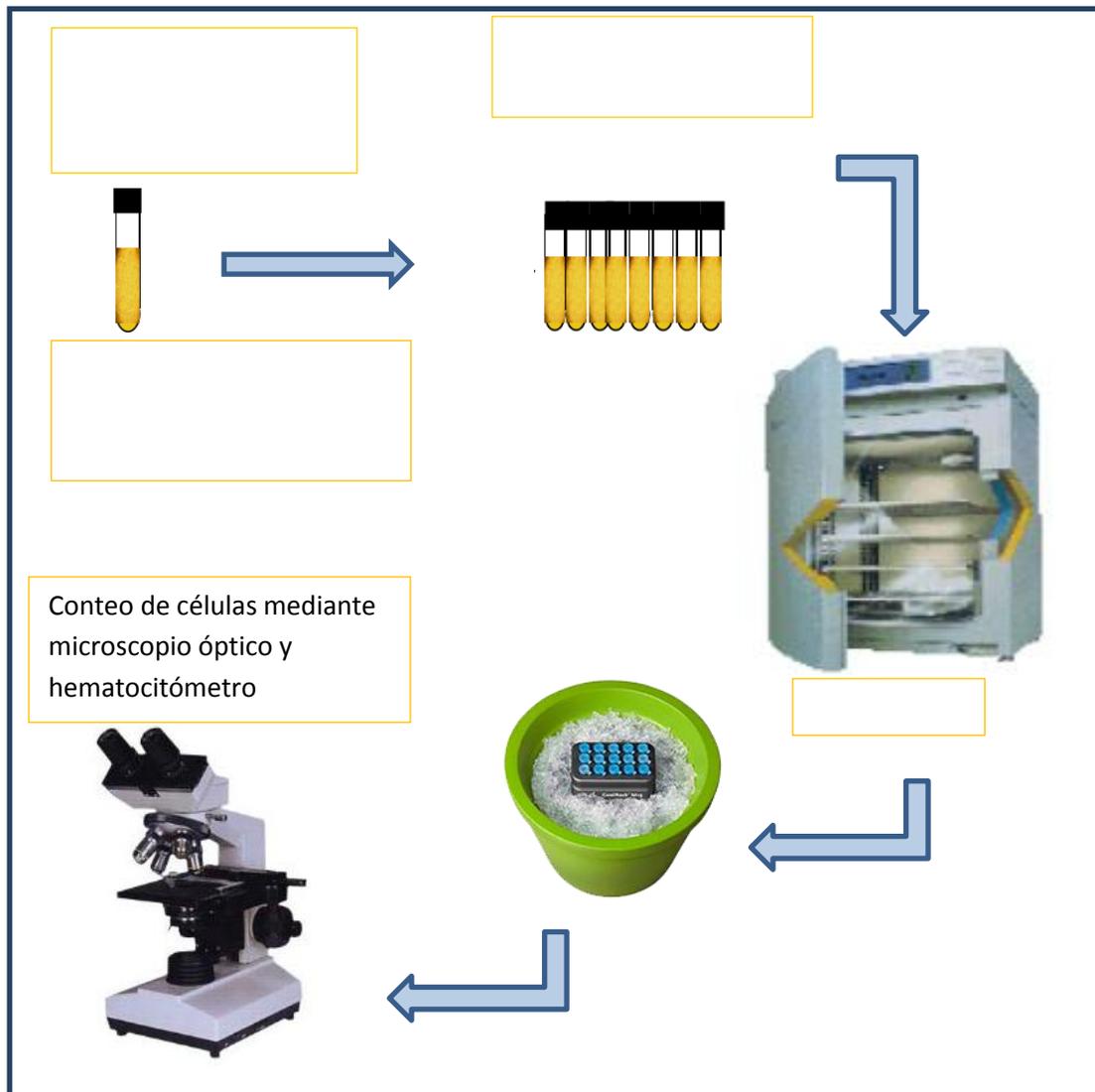


Figura 15. Diagrama de Pruebas de susceptibilidad *in vitro*.

La prueba incluyó metronidazol como estándar antiprotozorio, 0.210 µg/mL en el caso de *G. lamblia* y 0.06 µg/mL en el caso de *E. hystolitica* (Jiménez et al., 2013), un control (medio de cultivo más trofozoitos y DMSO) y un blanco (medio de cultivo).

Después de la incubación de los trofozoitos, se enfriaron los tubos a una temperatura entre 0-4 °C para despegar las células adheridas a las paredes del tubo (colocando los tubos en agua con hielo y agitando suavemente por inversión 15 veces) y 50 µl de la muestra de cada tubo fueron cultivadas en medio fresco por otras 48 h sin compuestos antiprotozoarios. (Bautista et al., 2011).

### **6.6.3 Conteo celular mediante cámara de Neubauer.**

El número final de parásitos fue determinado con un hematocitómetro o cámara de Neubauer (Figura 16).

Para el cálculo de la concentración celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (células / mL)} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen (en mL)}}$$

**Número de células:** suma de todas las células contadas en todos los cuadros.

**Volumen:** volumen total de todos los cuadros donde es hecho el recuento.

Como el volumen de 1 cuadro grande es:

$0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2$  de superficie

$0,01 \text{ cm}^2 * 0,1 \text{ mm}$  (profundidad) =

$0,01 \text{ cm}^2 * 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ mL}$

La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} \times 10.000}{\text{Número de cuadros}}$$

En el caso de que se haya aplicado una dilución, se debe transformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original.

En este caso tendremos que dividir el resultado por la dilución aplicada.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

La fórmula queda:

Para una dilución de 1: 10. Dilución = 0,1

Para una dilución de 1: 100, Dilución = 0,01

Los porcentajes de inhibición de crecimiento protozoario fueron calculados mediante la comparación con el cultivo control.

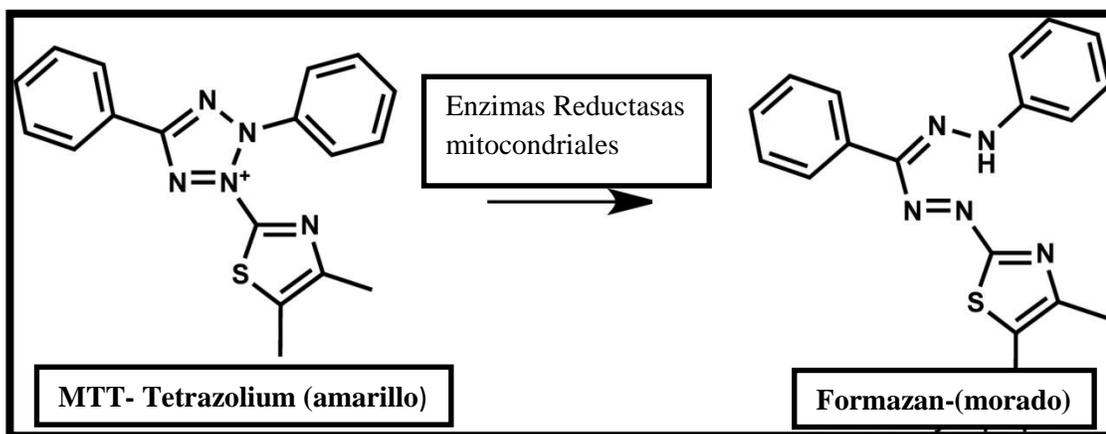


**Figura 16. Diagrama del conteo celular.**

#### **6.6.4 Ensayo MTS.**

Los resultados fueron confirmados por un método colorimétrico denominado ensayo MTS en donde se mide la actividad metabólica de las células, mediante la evaluación

de la viabilidad celular (Vendrell, 2006). NADPH potenciales reductores y enzimas oxidoreductasas celulares las cuales pueden, bajo condiciones definidas, reflejar el número de células viables presentes, los trofozoitos fueron lavados e incubados por 45 min a 37 °C (evitando la radiación solar) en un buffer de fosfatos con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) en presencia de PMS (metosulfato de fenazina). El colorante producido por reducción (formazán) (Figura 17) fue extraído y la absorbancia fue determinada a 570 nm. (Bautista et al., 2011)



**Figura 17. Biotransformación de MTT a sales de Formazan por células viables.**

Fuente: [http://www.itsbio.co.kr/main/goods\\_view.php?category2=58&no=122](http://www.itsbio.co.kr/main/goods_view.php?category2=58&no=122)

### 6.5.5 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando un análisis probit. (Fleer and Verspohl, 2007) mediante el paquete estadístico de IBM SPSS Statistics vigésima versión.

El porcentaje de trofozoitos sobrevivientes fue calculado mediante comparación con el crecimiento del grupo control.

## VII RESULTADOS

Las especies vegetales fueron identificadas por el M en C Manuel González Ledezma (Tabla 3) y un ejemplar se depositó en el herbario HgoM del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

**Tabla 3. Identificación y registro de las plantas en estudio.**

Registro de las plantas en estudio en el herbario HgoM				
Familia	Genero	Especie	Nombre comun	#de registro <sup>2</sup>
<i>Phytolaccaceae</i>	<i>Phytolacca</i>	<i>Icosandra</i>	Jaboncillo, mazorquilla o mora	CVG-03
<i>Caryophyllaceae</i>	<i>Arenaria</i>	<i>Lycopodioides</i>	Estrellita	CVG-04
<i>Onagraceae</i>	<i>Lopezia</i>	<i>Racemosa</i>	Aretillo,perilla o perilla	CVG-05
<i>Plantaginaceae</i>	<i>Plantago</i>	<i>Lanceolata</i>	Siete venas, llantén de hoja angosta o plantén	CVG-01
<i>Geraniaceae</i>	<i>Geranium</i>	<i>Schiedeanum</i>	Pata de leon	JGDL-01

Los resultados *in vitro* de la actividad antiprotozoaria del extracto etanólico de las partes aéreas de las cinco plantas evaluadas contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* se muestran en la Tabla 3 y fueron clasificados de la siguiente manera: buena actividad antiprotozoaria ( $CI_{50}$  menor a 20  $\mu\text{g/mL}$ ), moderada actividad antiprotozoaria (20  $\mu\text{g/mL}$  y 150  $\mu\text{g/mL}$ ), escasa actividad antiprotozoaria (150  $\mu\text{g/mL}$  a 400  $\mu\text{g/mL}$ ), por encima de los 400  $\mu\text{g/mL}$  las muestras fueron consideradas como inactivas o con actividad nula. (Calzada et al., 2006) Todo esto con base a la potencia con la que inhiben el crecimiento celular (acción antiprotozoaria).

Todas las especies vegetales estudiadas obtuvieron actividad antiprotozoaria con moderada potencia, siendo *Plantago lanceolata* la especie más potente con una  $CI_{50}$  de 69.69  $\mu\text{g/mL}$  para *Entamoeba histolytica* y 78.71  $\mu\text{g/mL}$  en el caso de *Giardia lamblia* seguida muy de cerca por *Geranium shiedeantum* con una  $CI_{50}$  de 69.66  $\mu\text{g/mL}$  y 81.85  $\mu\text{g/mL}$ , la especie vegetal con menor potencia fue *Phytolacca icosandra* con una  $CI_{50}$  de 109.34  $\mu\text{g/mL}$  y 132.79  $\mu\text{g/mL}$  para *E. histolytica* y *G. lamblia* respectivamente (Tabla 4).

**Tabla 4. Actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *E. histolytica* y *G. lamblia* del extracto crudo de las plantas en estudio.**

Muestra	$CI_{50}^d$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) (IC) <sup>a</sup>	
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
<i>Phytolacca icosandra</i>	109.34	132.79
<i>Arenaria lycopodioides</i>	77.3	86.69
<i>Lopezia racemoza</i>	79.20	94.87
<b><i>Plantago lanceolata</i></b>	<b>69.69</b>	<b>78.71</b>
<i>Geranium shiedeantum</i>	69.66	81.85
Metronidazol <sup>c</sup>	0.06 <sup>b</sup>	0.210

<sup>a</sup> IC = 95 % intervalos de confianza

<sup>b</sup> Control positivo

<sup>c</sup> Dato reportado en (Calzada F. et al.,2007;Calzada F. et al.,2006)

<sup>d</sup> Dosis requerida para inhibir el crecimiento del 50% de los organismos.

Con base a los resultados obtenidos de la actividad antiprotozoaria de los extractos etanolicos, se realizó un fraccionamiento de 20 g del extracto crudo de las partes aéreas de *plantago lanceolata* con cloroformo/acetato de etilo/agua, determinándose la actividad antiprotozoaria de cada una de las fracciones obtenidas, la fracción de acetato de etilo mostró mejores resultados con una  $CI_{50}$  de 25.4  $\mu\text{g/mL}$  para *E. histolytica* y 31.7  $\mu\text{g/mL}$  para el caso de *G. lamblia*, seguido por la fracción acuosa con  $CI_{50}$  de 27.4 y 35.2, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 4. Actividad antiprotozoaria *in vitro* de las fracciones obtenidas de *Plantago lanceolata*.

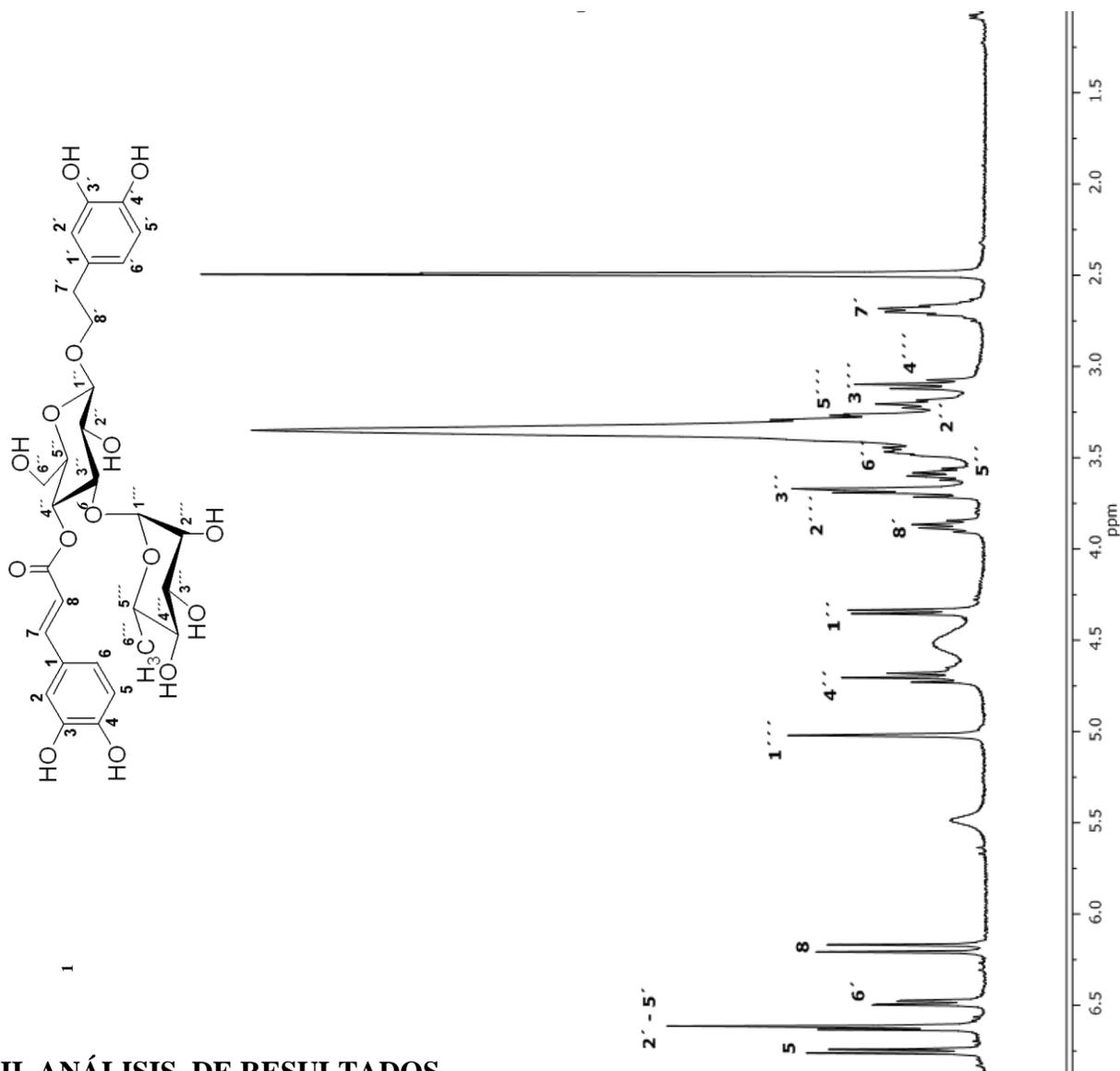
Fracción	<i>E. histolytica</i> CI <sub>50</sub> µg/ml	<i>G. lamblia</i> CI <sub>50</sub> µg/ml
Acuosa	27.4 (27.6-27.2)	35.2 (35.4-35.1)
Acetato de etilo.	<b>25.4 (25.6-25.1)</b>	<b>31.7 (32.0-31.4)</b>
Cloroformo.	42.6 (42.9-42.29)	63.2 (63.6-63.0)

La fracción de AcOEt (1.48 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria gel de sílice, tras sucesivas cromatografías en sílica se obtuvieron 243.5 mg de Verbascósido (acteósido), con un rendimiento del 1.2 %. El extracto etanólico de *P. lanceolata* fue fraccionado mediante cromatografía en columna de Sephadex LH-20 eluida con agua: MeOH, en la fracción F-5 (H<sub>2</sub>O:Metanol 06:04) se obtuvo el verbascósido como compuesto mayoritario con un rendimiento del 21.67 %, como una resina de color ámbar, el cual fue visualizado en cromatografía de placa fina como un compuesto de color azul intenso con la aplicación de Cloruro Férrico, tras la elución de la placa con Acetato de etilo 10 mL/metanol 1mL/H<sub>2</sub>O 0.5 mL, con un R<sub>f</sub> medio en torno a 0.3-0.5.

La estructura del Verbascósido (acteósido Figura 12) fue elucidada mediante el espectro de RMH <sup>1</sup>H en DMSO-d<sub>6</sub> a 400 MHz (Figura 18) y realizando una comparación con el espectro obtenido en la investigación de Montiel, J.G. et al (2012) trabajo realizado en la UAEH, donde anteriormente fue aislado verbascósido a partir de *plantago lanceolata*.

Se observaron dos señales dobles a  $\delta_H$  7.45 (J=15.8, H7) y  $\delta_H$  6.19 (J=15.8, H8), correspondientes al doble enlace trans, así como la presencia de dos señales dobles en  $\delta_H$  7.02 (J=1.7) y 6.75 (J=8.1) para las posiciones 2 y 5 del anillo bencénico y una señal doble de dobles para la posición 6 en  $\delta_H$  6.97 (J=8.1, 1.7) atribuidas a la presencia un residuo caféico. Se estableció la presencia de otro anillo aromático orto-sustituido por las tres señales aromáticas a  $\delta_H$  6.62 (s, H2') y 6.62 (d, J=8.3, H5'), y una tercera doble de dobles a  $\delta_H$  6.49 (J=8.2, 1.77, H6') así como dos multipletes correspondientes al etileno, a  $\delta_H$  2.69 y 3.59 (figura 10) atribuidas al feniletanoide. Las señales en la región de  $\delta_H$  3.10-3.7 sugieren la presencia de azúcares; la señal doble a  $\delta_H$  0.95 (J=6.1) permite determinar la presencia de una unidad de ramnosa; la señal simple a  $\delta_H$  5.01 se asignó al H anomérico de la ramnosa, lo que nos indica que se encuentra unido en posición  $\alpha$  a otra unidad de azúcar. En de  $\delta_H$  4.34, se observa como una señal doble (J=7.8) asignado a la glucosa en posición  $\beta$  (Montiel *et al.*, 2012)

Figura 18. Espectro de RMNH del verbascósido a 400 MHz en DMSO-d



## VIII ANÁLISIS DE RESULTADOS

A lo largo de la historia un sinnúmero de investigadores se han dado a la tarea de buscar compuestos procedentes de plantas como fuente de compuestos con actividad terapéutica, de las cerca de 200,000 especies de plantas de la tierra se han estudiado químicamente sólo un pequeño porcentaje de estas o sus constituyentes se ha investigado para probar actividad antiprotozoaria, en el conocimiento actual sobre los productos naturales con actividad antiprotozoaria se derivan de la vía de shikimato

(lignanós, cumarinas, derivados del ácido cafeico), quinonas de diversas clases estructurales, compuestos formados a través de las vías de policétidos (flavonoides y compuestos relacionados, cromenos y relacionados con benzopiranos y benzofuranos, xantonas, acetogeninas de Annonaceae y poliacetilenos), así como diversas clases de alcaloides.

Compuestos derivados de glucosinolatos (Benzil glucosinolato) (Calzada *et al.*, 2003), Lactonas (Incomptina A e Incomptina B) (Calzada *et al.*, 2009) así como Flavonoides (Epicatequina, Tilirosido y Kampferol) (Barbosa *et al.*, 2007) han sido estudiados y probada su actividad antiprotozoaria sobre *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Las plantas evaluadas en este trabajo fueron seleccionadas con base a los siguientes criterios: por los antecedentes reportados de usos etnobotánicos sobre padecimientos gastrointestinales (principalmente diarrea) y por su distribución en el estado de Hidalgo.

Se evaluó la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los extractos etanólicos de *Lopezia racemosa*, *Arenaria lycopodioides*, *Plantago lanceolata*, *Phytolacca icosandra* y *Geranium shiedeanum* sobre cultivos axénicos de *E. histolytica* y *G. lamblia* mostrando todos ellos actividad antiprotozoaria, con una moderada potencia que aunque inferior a la de metronidazol (tomando en cuenta que este es un compuesto puro) el cual fue utilizado como control positivo, resultado ya esperado debido a la gran cantidad de metabolitos tanto primarios como secundarios presentes en las plantas y a que estos últimos se encuentran comúnmente en concentraciones ínfimas. Empero el que estas plantas hayan presentado una actividad moderada (Calzada *et al.*, 2006), es indicativo de que uno o varios metabolitos mostrarían actividad antiprotozoaria que en base a sus concentraciones se piensa pudiesen ser bastante significativas.

De las cinco plantas en estudio la mejor potencia antiprotozoaria fue por parte de *Plantago lanceolata* y *Geranium shiedeanum* siendo equivalente el efecto sobre *E.*

*histolytica* pero con una ligera ventaja sobre *G. lamblia* por parte de *P. lanceolata* (Tabla 4). Los resultados obtenidos para los extractos de *Plantago lanceolata* y *Geranium shiedeanum* sustentan en parte su uso tradicional para tratar infecciones gastrointestinales ocasionadas por *E. histolytica* y *G. lamblia*; al igual que las otras plantas ya mencionadas correspondientes a este estudio.

De las fracciones obtenidas del extracto etanólico crudo de las partes aéreas de *P. lanceolata*, la fracción con acetato de etilo mostro una mayor potencia antiprotozoaria superior a la del extracto crudo con una  $CI_{50}$  de 25.4  $\mu\text{g/ml}$  para *E. histolytica* y 31.7  $\mu\text{g/mL}$  para el caso de *G. lamblia*.

El estudio fitoquímico biodirigido condujo al aislamiento de un glicósido de fenilpropanoide denominado verbascósido (acteósido) el cual fue aislado a partir del extracto etanólico de las partes aéreas de *Plantago lanceolata* con un rendimiento del 21.67 %, al ser compuesto mayoritario podemos suponer que pudiera ser el probable responsable del efecto antiprotozoario de esta planta.

Es importante destacar que es la primera vez que se describe la actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *E. Histolytica* y *G. lamblia* de las especies evaluadas.

Este trabajo es una contribución y sustenta en parte el uso de *P. lanceolata* en la medicina tradicional de México y del estado de Hidalgo en el Tratamiento de la diarrea y la disentería.

## **IX CONCLUSIONES.**

- Los extractos etanólicos obtenidos de *Arenaria lycopodioides*, *Geranium schiedeanum*, *Lopezia racemosa*, *Phytolacca icosandra* y *Plantago lanceolata*

presentaron actividad antiprotozoaria todos ellos con una moderada potencia inhibitoria.

- *Plantago lanceolata* fue la especie vegetal con mayor potencia antiprotozoaria, con una  $CI_{50}$  de 69.69  $\mu\text{g/mL}$  para *Entamoeba histolytica* y 78.71  $\mu\text{g/mL}$  en el caso de *Giardia lamblia*.
- El estudio fitoquímico biodirigido de las partes aéreas del extracto etanólico de *Plantago lanceolata* condujo al aislamiento de Verbascósido (acteósido) siendo el compuesto mayoritario y probable responsable de la actividad antiprotozoaria mostrada por esta especie vegetal.

## Referencias

- Adam, R. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev, 14: 447-75
- Ali, I., Sharma, P., Suri, KA., Satti, NK., Dutt, P., Afrin, F., et al. (2011). *In vitro antifungal activities of amphotericin B in combination with acteoside, a phenylethanoid glycoside from Colebrookea oppositifolia*. J Med Microbiol, 60(Pt 9):1326-36.
- Barbosa, E., Calzada, F. y Campos, R. (2007). *In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea*. J. Ethnopharmacol, 109 552–554.
- Bautista, A., Gayosso, de Lucio, Vargas, M., Velázquez, G., De la O, A. and Almaguer, V. (2013). *Geranium Species as Antioxidants, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*, Dr. Jose Antonio Morales-Gonzalez (Ed.), ISBN: 978-953-51-1123-8, InTech, DOI: 10.5772/52002. Disponible en:  
<http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/geranium-species-as-antioxidants>
- Bautista, E., Calzada, F., Ortega, A. y Yépez-Mulia, L. (2011). *Antiprotozoal activity of flavonoids isolated from Mimosa tenuiflora (Fabaceae-Mimosoidae)*. J. Mex. Chem. Soc. 55(4), 251-253.
- Bello, G.M. (2006). *Catálogo de plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México*. México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Lopezia racemosa*. Fecha de consulta: 27 de febrero de 2014. Disponible en internet: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Perilla&id=8003>.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). *Phytolacca icosandra*. Fecha de consulta: 27 de febrero de 2014. Disponible en internet: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Congora\\_o\\_mazorquilla&id=7261](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Congora_o_mazorquilla&id=7261).

- Braden, J.B. y Duchin, J.S. (2002). *Preparing for and responding to Bioterrorism. Information for the Public Health Workforce*. Northwest Center for Public Health Practice. University of Washington. Disponible en:  
<http://nwcphp.org/training/courses-exercises/courses/bttrain-phw>
- Brooks, F.R., Carroll, C.K., Butel, S.J. y Morse A.S. (2007). *Medical Microbiology*. 24<sup>th</sup> Edit. USA: McGraw-Hill Cap 46.
- Calzada, B. and Alanís, A.D. (2007). *Additional Antiprotozoal Flavonol Glycosides of the Aerial Parts of Helianthemum glomeratum*. J. of Phytotherapy Res 21: 78–80.
- Calzada B., Barbosa E., y Cedillo R. (2003). *Antiamoebic Activity of Benzyl glucosinolate from Lepidium virginicum*. Phytother. Res. 17, 618–619.
- Calzada, B., Yépez-Mulia L., and Aguilar, A. (2006): *In vitro susceptibility of Entamoeba histolytica and Giardia lamblia to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders*. J. Ethnopharmacol. 08: 367-370.
- Calzada, B., Yépez-Mulia, Tapia C., y Ortega A. (2009): *Antiprotozoal and antibacterial properties of Decachaeta incompta*. Rev. Latinoamer. Quím. 37/2.
- Campiglio, P.J. (2007). *La cuestión de la variedad en las primeras crónicas hispanoamericanas*. University of Mississippi. 2-17
- Campo, G., Marchesini, J., Bristot, L., Monti, M., Gambetti, S., Pavasini, R., et al. (2012). *The in vitro effects of verbascoside on human platelet aggregation*. J Thromb Thrombolysis, 34(3):318-25.
- Carus, S. (2001). *Bioterrorism and Biocrimes. Working paper. Center for Counter Proliferation Research*. Washington DC: National Defense University. 209 12-16.

- Center for disease control and prevention. (2005). *Information for Healthcare Providers, "Guidelines for the Management of Acute Diarrhea", USA, GOB.* Fecha de consulta: 8 de noviembre de 2013. Disponible en: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5304a1.htm>
- CENETEC. (2008). *Prevención, diagnóstico y tratamiento de diarrea aguda en adultos en el primer nivel de atención.* Secretaría de Salud, 23-24.
- CONABIO (2009). Malezas de México, *Arenaria lycopodioides*, MEX, GOB. Fecha de consulta: 13 de enero de 2014. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/caryophyllaceae/arenaria-lycopodioides/fichas/ficha.htm>
- CONABIO (2009). Malezas de México, *Lopezia racemosa*, MEX, GOB. Fecha de consulta: 5 de enero de 2014. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=8003>
- CONABIO (2009). Malezas de México, *Phytolacca icosandra*, MEX, GOB. Fecha de consulta: 5 de enero de 2014. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/phytolaccaceae/phytolacca-icosandra/fichas/ficha.htm>
- CONABIO (2009). Malezas de México, *Plantago lanceolata*, MEX, GOB. Fecha de consulta: 8 noviembre de 2013. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/plantaginaceae/plantago-lanceolata/fichas/ficha.htm>
- Cruz, P., Bolívar, B., Gómez, V., Nelly, J., Sánchez, A., Ricardo, H., Bach, H. (2013). *Antimicrobial, Antiparasitic, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities of Lopezia racemosa.* ScientificWorldJournal, Article ID 237438, 6 pages. . Retrieved from <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/237438/abs/>

- Cruz, S.J. (2007). *Medicina Naturista Fitoterapia*. España. UVL, 2-10
- Dipiro, T.H., Talbert, L.R., Yee, C.G., Matzke, R.G., Wells, G.B. y Posey, M.L. (2008). *Pharmacotherapy a Pathophysiologic Approach*. 7th edit. USA: McGraw-Hill: 1887-1898.
- Dirección General de Epidemiología. (2014). *Incidencia de Amebiasis Intestinal*. SSA. Disponible en:  
<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
- Esposito, E., Dal Toso, R., Pressi, T., Bramanti P., Meli, R., S Cuzzocrea. (2010). *Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 381(1):93-105.
- Fayer, R., Dubey y J Lindsay, D. (2004). *Zoonotic protozoa: from land to sea*. Trends Parasitol, 20: 531-6.
- Fleer, H. y Verspohl, EJ. *Antispasmodic activity of an extract from Plantago lanceolata L. and some isolated compounds*. (2007). Phytomedicine, 14 (6):409-15.
- Gaitan, V.A. (1998). Determinación de la Actividad Antimicrobiana y Concentración Mínima Inhibitoria de Extractos de *Arenaria Lycopodioides* Willd ex Schldl y *Gnaphalium inornatum* DC. Tesis de (Licenciatura) no publicada. UAEH, Hidalgo, Mexico.
- Gonda, S., L. Tóth, Parizsa, P., Nyitrai, M. y T. Vasas. *Screening of common Plantago species in Hungary for bioactive molecules and antioxidant activity*. 2010. Acta Biol. Hung, 61 Suppl: 25-34.
- Guarner, F. (2007). *Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad*. Nutr Hosp. 2007,22(Supl. 2):14-9
- Guerra, S.I. y Guerra, H.R. (2006). *Respuesta al tratamiento antiamebiano y anti giardiasico en el Instituto de Gastroenterología Boliviano Japonés de Cochabamba*. Gaceta médica, 11-16.

- Hernández, V.M., Borges, A.R., Rodríguez, V.R., Torres, A.J., Méndez, G.M. y Cáceres, F.M.(2012). *In vivo anthelmintic activity of Phytolacca icosandra against Haemonchus contortus in goats*. Vet. Parasitol., (189) 284-290.  
Recuperado de  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401712002154>
- Huan, S.K., Wang, K.T., Lee, C.J., Sung, C.H., Chien, T.Y., Wang, C.C., et al. (2012). *Wu-Chia-Pi solution attenuates carbon tetrachloride-induced hepatic injury through the antioxidative abilities of its components acteoside and quercetin*. Molecules. 17(12):14673-84.
- Huang, D., Nie, S., Tang, Y., Wan, Y., Chen, Y. y Xie, M. *Effects of phenylethanoid glycosides from seeds of Plantago asiatica on maturation of dendritic cells*. (2009). Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 34(14):1831-4.
- Isacchi, B., Iacopi, R., Bergonzi, M.C., Ghelardini, C., N. Galeotti, Norcini, M. et al. (2011). *Antihyperalgesic activity of verbascoside in two models of neuropathic pain*. J Pharm Pharmacol, 63(4):594-601.
- Instituto de Biología. "*Geranium schiedeanum* - IBUNAM: MEXU: OAX239".UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-08-12.Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2013-12-18.: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX239>
- Instituto de Biología. "*Plantago lanceolata* L. - IBUNAM: MEXU: PA1138852".UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2008-10-13.Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2013-12-30. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PA1138852>.
- Jiménez, A.A., Luna, H.J., Ruiz, N.R., Cornejo, G.J., Tapia, A. y Yépez, M.L. (2013). *Antiprotozoal and antimycobacterial activities of Persea americana seeds*. BMC J. Altern. Complement; 13:109
- Kasper, L.D., Braunwald, E., Fauci, S.A., Hauser, L.S., Longo, L.D., Jameson, L.J., et al. (2006). *Harrison's principles of Internal Medicine*. 16<sup>th</sup> Edit. USA: McGraw-Hill 1270-1280.

- Leos, R.C. (2010). *Estudio de la actividad biológica de los extractos de tres plantas de la familia boraginaceae*. (tesis doctoral). Nuevo león: UANL.
- Mancilla, H.I., Mendez, T. A., Wong, B.I., Jimenez, U.A., Alcántara, H.M., Ocadiz R.R., et al. (2012). *A Toll/IL-1R/resistance domain-containing thioredoxin regulates phagocytosis in Entamoeba histolytica*. Parasites Vectors, 5:224.
- Martínez, P., Pérez, E. y Villavicencio, N. (2010). *Plantas medicinales de Plomosas Actopan Hidalgo*. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 239-271.
- Melese, E., Asres, K., M, Asad. y Engidawork, E. (2011). *Evaluation of the antipeptic ulcer activity of the leaf extract of Plantago lanceolata L. in rodents*. Phytother Res, 25 (8):1174-80.
- Avendaño, M. C. (2012). Evaluación de la actividad antidiarreica y analgésica del extracto etanólico de las partes aéreas de *Lopezia racemosa*. Tesis de (Licenciatura). UAEH, Hidalgo, México.
- Morales, R.M., Morales, V.M., Treviño, N.J., Garza, P.R., Rodríguez, G., Mar, A.F., et al. (2010). *Actividad amebicida de extractos de tejido in vivo e in vitro de cuatro especies de cactáceas sobre E. histolytica*. Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica, 1:2.
- Muñeton Pérez, Patricia "*Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo*". Revista Digital Universitaria [en línea]. 10 de septiembre de 2009, Vol. 10, No. 9 [Consultada: 11 de septiembre de 2009]. Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm> ISSN: 1607-6079.
- Morón, R.J. y Levy, R.M. (2002). *Farmacología General*. Habana Cuba: Ciencias Médicas, 3-8.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. y Pfaller, M.A. (2009). *Microbiología Médica*. Sexta edición. USA: edit. Elsevier. 822-834.

- Naoyoshi, N., Takuro, S, Junichi, A., Ryo, N., So, N., Tomoyuki, Y., et al. (2012). *Risk Factors for Intestinal Invasive Amebiasis in Japan, 2003–2009*. Emerg Infect Diseases, 18:717-724.
- Organización Mundial de Gastroenterología. (2012). *Diarrea aguda en adultos y niños: una perspectiva mundial (guía práctica)*. Recuperado de [http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012\\_Acute%20Diarrhea\\_SP.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012_Acute%20Diarrhea_SP.pdf)
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Enfermedades diarreicas*. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- Orozco, E., López, C., Gómez, C., Pérez, D.G., Marchat, L., Banuelos, C., et al. (2002). *Multidrug resistance in the protozoan parasite Entamoeba histolytica*. Parasitol Int, 51: 353-359.
- Paniagua, G.L., Monroy, E., García, G.O., Alonso, J., Negrete, E., Vaca, S., et al. (2007). Ann Clin Microbiol Antimicrob; 6-17.
- Panoto-S. *Historia de los fitofármacos en la medicina*. (2007). Editorial Siegfried Rhen, 9-20.
- Pereira, Aline C, Carvalho, Hudson WP, Silva, Geraldo H., Oliveira, Denilson F., Figueiredo, Henrique CP, Cavalheiro, Alberto J., y Carvalho, Douglas A.. (2008). La purificación de un compuesto antibacteriano de *Lantana lilacina*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18 (2), 204-208.
- Pérez, E. Villavicencio, N. y Aguirre, R.A. (2003). *Listado de plantas útiles del Estado de Hidalgo*. Pachuca, Hgo. México. UAEH. Pp 3-12, 54-85.
- Pérez, M.P. (2009). "*Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo*". Revista Digital Universitaria [en línea]. Vol. 10, No. 9 [Consultada: 11 de septiembre de 2009]. Disponible en Internet:

<<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>>ISSN: 1607-6079.

- Petri, W. (2003). Therapy of intestinal protozoa. Trends Parasitol, 19: 523-6.
- Pritt, B.S. y Clark, C.G. (2008). *Amebiasis*. Clin Proceedings, 83: 1154-1160.
- Salinas R, Arellano-García J, Perea-Arango I, Alvarez L, Garduño-Ramírez ML , Marquina S, Zamilpa A y Castillo-España P. (2014). Production of the Anti-Inflammatory Compound 6-O-Palmitoyl-3-O-β-D-glucopyranosylcampesterol by Callus Cultures of *Lopezia racemosa* Cav. (Onagraceae). Moléculas, 19 (6):8679-90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962399>
- Santos, L.J., Villagómez, I.J. López, R.A., Montiel, J.G., Bautista, A.M., Gayosso de Lucio, J.A. y Velázquez, G.C. (2010). Actividad antiseptora de los extractos metanólico y clorofórmico de las partes aéreas y flores de *Phytolacca icosandra* L. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 41: 1-5. Obtenida de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220509065>
- Schmelzer, G.H. y Gurib-Fakim, A. (2008) . Plant Resources of Tropical Africa 11(1). Medicinal plantas 1. PROTA Foundation, Wageningen Neterlands/ Backhuys Publishers, Leiden, Neterlands. 791 pp. 461-463.
- SINAVE/DGE/SALUD. (2010). *Panorama Epidemiológico y Estadístico de la Mortalidad en México 2010*. [Consultado: octubre 2012] Disponible en: [http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/2012/A\\_Morta\\_%202010\\_FINAL\\_Junio%202012.pdf](http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/2012/A_Morta_%202010_FINAL_Junio%202012.pdf)
- Taketomo, C.K. y Kraus, D.H. (2009). *Manual de prescripción pediátrica*. 14a edición. EUA: LEXI-COMP.
- Thompson, R.C.A. y Monis, P.T. (2004). *Variation in Giardia: Implications for taxonomy and epidemiology*. Adv Parasitol, 58: 69-137.

- Thompson, R.C.A. Giardiasis: *Conceptos modernos sobre su control y tratamiento*. Ann Nestle 2008; 66:23-29. doi: 10.1159/000151270 (en español, en formato PDF). Obtenida de:  
<http://www.karger.com/Article/Pdf/151270>
- Tieney ML, Mcphee JS y Papadakis AM. (2006). *Diagnóstico clínico y tratamiento*. 41<sup>a</sup> ed. México: Manual Moderno, 1281-1285.
- Vega, G.M., Alfaro, G.M., Triguez, G.M. y Calvo R.C. (2008). *Giardiasis resistente a metronidazol: a propósito de un caso*. Rev Pediatr Aten Primaria, 10:261-6.
- Vendrell, M.I. (2006). *Evaluación y desarrollo de modelos in vitro para la predicción de neurotoxicidad. Aproximación Proteómica a la neurotoxicidad inducida por metilmercurio*. Tesis doctoral, Universidad de Barcelona, Barcelona, España.
- Vigo, E., A Cepeda, Gualillo, O. y Pérez, F.R. (2005). *Evaluación In-vitro de la actividad anti-inflamatoria de Pinus sylvestris y Plantago lanceolata extractos: efecto de la NOS inducible, la COX-1, COX-2 y sus productos en J774A.1 macrófagos murinos*. J Pharm Pharmacol, 57 (3):383-91.
- Villavicencio, N. y Pérez, E. (2005). *Guía de la flora útil de la huasteca y zona otomí-tepehua Hidalgo I*. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 1-15
- Wang, H.Q., Xu, Y.X. y Zhu, C.Q. (2012). *Upregulation de hemooxigenasa-1 por acteosido a través de ERK y PI3 K / Akt vía confiere neuroprotección contra la neurotoxicidad del beta-amiloide inducida*. Res Neurotox, 21 (4):368-78.
- Ximénez, C., Morán, P., Rojas, L., Valadez, A. and Gómez, A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. Infect Genet Evol, Dec 2009; 9(6): 1023-1032. doi:10.1016/j.meegid.2009.06.008.

---

Yoshida, T., Rikimaru, K., Sakai, M., Nishibe, S. and Fujikawa, T. (2013). *Plantago lanceolata* L. leaves prevent obesity in C57BL/6 J mice fed a high-fat diet. Nat. Prod. Res, 27 (11):982-7.