



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIAMIBIANA *IN VITRO*
DE 26 ESPECIES VEGETALES USADAS EN LAS PRÁCTICAS
MÉDICAS ALTERNATIVAS DE MÉXICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

L I C E N C I A D A E N
B I O L O G Í A
P R E S E N T A:

MA. DE LA LUZ TORRES BETANCOURT

MÉXICO, D. F.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres Daniely Toñita por su apoyo, cariño y paciencia que me han tenido y se que me tendrán por siempre. Gracias por confiar en mí.

A mi hijo Mico .esa pequeña lucecita de vida, que llegó a llenarme de felicidad y alegría; por toda su paciencia y apoyo incondicional durante este tiempo, por estar siempre conmigo en todo momento. y por los momentos en que un abrazo suyo me daba confianza y ganas de seguir adelante. espero que este trabajo sea un ejemplo, para que logres cumplir tus metas.

A mis hermanas Lupita, Lili, América, Catalina, Ismael, Daniel, mis cuñados Javier, José, Héctor, Roberto y Araeli les agradezco todo su apoyo y ánimos para terminar esta tesis, y por haberme soportado por tanto tiempo Gracias.

A Todos mis sobrinos Daniela, Ismael, Jessica, Eduardo, Javier, Karlen, Toño, Samari, Daniel Alejandro, Daniel Eduardo, Yohana, Carlos, Christopher, Tania, Jairo, Héctor Miguel, Leslie Michelle, para que esta sea una inspiración a seguir estudiando, y valoren que es la mejor herencia que nuestros padres pueden dejarnos.

A mis amigos Fernando, Toño, Mauricio, Ramón, Ricardo, Elizabeth, Ana, Claudia, Adriana y Camen gracias por creer en mi y por su confianza. También por su ayuda para la realización de esta tesis.

A Abraham y Martha por ser unos grandes amigos incondicionales, por su confianza, cariño y ánimos para terminar esta tesis.

Gracias a todos ellos, por estar en mi camino en el momento y lugar oportuno.

AGRADECIMIENTOS

¡Gracias Señor! por haberme dejado vivir, por haberme dejado cumplir esta meta, que en momentos difíciles casi se me hizo imposible de lograr.

Un agradecimiento muy especial al **D r. Fernando Calzada Bernal** por su amistad, apoyo y confianza que me brindó durante todo este tiempo. Gracias por escucharme y por sus sabios consejos.

Al **Q. F. B. Antonio Cervantes** por que sin su ayuda no hubiera podido terminar. Gracias.

A la **M. en C. Claudia Velásquez González**, por brindarme su amistad, ayuda y orientación en la realización de esta tesis, y por estar siempre cuando la necesitaba.

A la **M. en C. Camen Álvarez**, por su tiempo y disponibilidad en ayudarme con sus conocimientos para la realización de esta tesis.

A la **M. en C. Elizabeth Batosa**, por su amistad y apoyo en la realización de la presente tesis

A **Samuel Castro Hill**, por su apoyo incondicional y por sus sabios consejos.

A **CONACYT** por el financiamiento para el desarrollo del presente trabajo a través del proyecto 38030-M.

La gente atribuye poder curativo a las drogas que provienen de muy lejos, drogas que son las más caras. En mi larga experiencia, he llegado a la conclusión que la gente puede ir hasta los confines de la tierra a fin de encontrar aquello que tiene a las puertas de su casa. Si tuviera más confianza en la naturaleza....

Maurice Mességué.

ÍNDICE	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
4. PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA	15
5. OBJETIVO GENERAL	16
<i>5.1 Objetivos particulares</i>	16
6. HIPÓTESIS	16
7. EXPERIMENTAL	17
<i>7.1 Adquisición del material vegetal</i>	17
<i>7.2. Preparación de los extractos metanólicos</i>	17
<i>7.3 Determinación de la actividad antituberculosa</i>	18
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
9. CONCLUSIONES	24
10. PERSPECTIVAS	24
11. BIBLIOGRAFÍA	25

RESUMEN

Como parte de un estudio multidisciplinario de plantas mexicanas utilizadas para tratar disentería y diarrea, el presente trabajo describe la evaluación de la actividad antiamebiana de 26 plantas medicinales el cual se llevó a cabo en tres etapas. En la primera se hizo la preselección de las especies vegetales, con base a un criterio etnobotánico, posteriormente se prepararon los extractos metanólicos a partir de las diferentes partes de los vegetales que se utilizan comúnmente en la medicina tradicional mexicana. Por último, se determinó la actividad antiamebiana *in vitro* contra los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS. De los extractos preparados, tres mostraron actividad antiamebiana significativa: *Chiranthodendron pentadactylon*, *Annona cherimola* y *Punica granatum* con CI_{50} menores a 30 μ g/ml. La actividad de *Ch. pentadactylon* (2.5 μ g/ml) fue similar a la emetina (1.05 μ g/ml), pero no mejora a la del metronidazol (0.04 μ g/ml). Los extractos de: *A. absinthium*, *A. sativum*, *A. ludoviciana*, *A. triphylla*, *B. frutescens*, *C. nucifera*, *Ch. ambrosoides* (verde), *Ch. ambrosoides* (roja), *Ch. mexicana*, *G. mexicanum* (a), *G. mexicanum* (R), *Ch. murale*, *D. contrajerva*, *D. argentea*, *L. alba*, *O. basilicum*, *R. chalepensis*, *T. vulgaris*, *S. villosa*, y *S. molle* mostraron actividad contra el protozooario con CI_{50} de entre 38.3 a 139.9 μ g/ml. Los extractos de las plantas restantes mostraron actividad con CI_{50} de entre 178.4 a 233.2 μ g/ml. La actividad antiamebiana demostrada para todos los extractos, explican en parte el uso de estas plantas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diarrea y la disentería.

INTRODUCCIÓN

El interés por el estudio farmacológico de las plantas medicinales de México radica en la gran variedad de las especies botánicas que caracteriza a la flora del país, además, por el amplio conocimiento que tiene la población sobre las propiedades curativas que poseen los vegetales, conocimiento basado en experiencias adquiridas a lo largo de varias generaciones (Aguilar y col., 1994; INI, 1994). Se considera que entre un 70 y 80% de la población mexicana recurre a las plantas para tratar padecimientos como resfriados, trastornos gastrointestinales, diabetes, hipertensión arterial y reumatismo, entre otros (Didier, 1995). Es de destacar que a pesar de la importancia que tienen las plantas en la población mexicana para procurarse salud, de las 4000 especies medicinales registradas en el país, solo el 10% han sido estudiadas desde el punto de vista farmacológico y fitoquímico (Eloff, 1998; Farnsworth y col., 1989). Gracias al esfuerzo conjunto de químicos, botánicos, farmacólogos y médicos entre otros, quienes se han dado a la tarea de recopilar la información actual que tienen las especies medicinales, hoy se sabe que las plantas reportadas para tratar trastornos gastrointestinales ocupan el primer lugar de uso (Lozoya y col., 1987; Heinrich, 2000) lamentablemente, son escasos los estudios experimentales que permiten corroborar los efectos atribuidos al recurso herbolario. Actualmente hay una mayor apertura hacia el fenómeno de las medicinas alternativas y se reconoce en la herbolaria medicinal mexicana potencialidades como fuente de nuevos agentes fitoterapéuticos.

ANTECEDENTES

Las enfermedades diarreicas constituyen un gran problema de salud pública en los países en desarrollo. Estos padecimientos son los responsables de una elevada tasa de morbi-mortalidad y la séptima causa de muerte. Las enfermedades diarreicas afectan a individuos de todas las edades, en especial a la población infantil, siendo la principal causa de mortalidad en menores de cinco años de edad (Olarte, 1992; SS, 1993; Torres y col., 1995; Mayoral y Torres, 1996; Arredondo y Hernández, 1998; Braga y col., 1998). De acuerdo a las estadísticas de los años noventas, anualmente en América Latina aproximadamente entre 120 a 170 niños menores de cinco años, se ven afectados por enfermedades diarreicas, y del 1 al 5% de los episodios de diarrea son causados por protozoarios (SS, 1993; Arredondo y Hernández, 1998). En el caso particular de México, se registraron en el año de 1990, alrededor de 14,011 muertes por diarrea infecciosa (Mayoral y Torres, 1996).

La diarrea es el resultado de un proceso inflamatorio del tubo gastrointestinal y puede deberse tanto a agentes no infecciosos (dietético, tóxico, inmunológicos y hormonales) como infecciosos (bacterias, virus y parásitos). La diarrea constituye un mecanismo de respuesta del organismo ante un agente agresor. Por medio de las evacuaciones, el intestino enfermo elimina las bacterias, virus o parásitos que lo agreden (SS, 1993; Arredondo y Hernández, 1998). La diarrea infecciosa se caracteriza por la presencia de heces líquidas o acuosas, que se observan generalmente en un número de tres veces en 24 horas y el grado depende de los

factores propios del hospedero y de la patogenicidad de cada agente en particular, así como de las condiciones ambientales en que ambos coexisten. Uno de los protozoarios responsables de la diarrea y la disentería en los países en desarrollo es *Entamoeba histolytica* Schudinn, organismo responsable de la amibiasis intestinal (Olarte, 1992; Wright y col., 1994). La amibiasis es definida por la Organización Mundial de la Salud “como la presencia de *E. histolytica* en el ser humano, acompañada o no de manifestaciones clínicas” (Padilla y col., 1997). La infección con *E. histolytica* tiene una distribución universal y genera una enfermedad cosmopolita (Gómez y col., 1996). A nivel mundial, la amibiasis es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Se estima que alrededor de 500 millones de seres humanos en el mundo cada año son portadores asintomáticos de *E. histolytica*. Cerca del 10% de esta población desarrolla la enfermedad de manera sintomática en las formas de disentería, absceso hepático, ameboma, colitis fulminante, y con menor frecuencia, como infección cutánea y pulmonar. La amibiasis intestinal es más frecuente y letal en los niños y adultos, mientras que en el absceso hepático es más común en varones entre 30 y 45 años y se asocia con una alta mortalidad. La amibiasis sintomática provoca entre 40 y 110 mil muertes por año y es la tercera causa de muerte provocada por protozoarios después del paludismo y la esquistosomiasis (Keene y col., 1986; Braga y col., 1998; Shukla y Das, 1988; Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992; González-Ruiz y col., 1992; Carrero y Laclette, 1996; Gómez y col., 1996; Haque y col., 1998; WHO, 1992; Sohni y col., 1995).

En los países en desarrollo, la amibiasis prevalece entre el 30 al 40%. Así, en Colombia y Brasil se calculan prevalencias de hasta un 40%, y en Costa Rica del

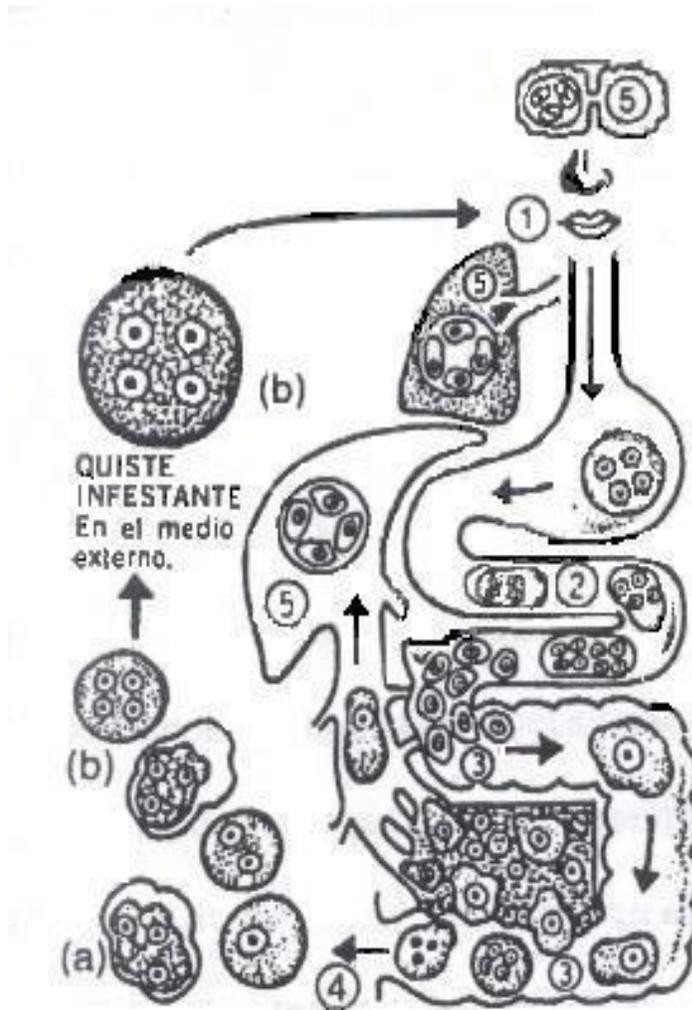
27% al 55%. En otras regiones como en Bangladesh se han reportado prevalencias del 32%, en Arabia del 30% y es endémica en la India (Keene y col., 1986). En México, durante la década de los noventa, se encontró que alrededor del 27% de la población estaba parasitada y sólo el 10% llegó a presentar alguna forma clínica de la enfermedad (Arellano y col., 1992; Olarte, 1992; Carrero y Laclette, 1996; Padilla y col., 1997). En un estudio realizado por el IMSS en el periodo comprendido entre los años 1991 y 1994, en dos unidades de medicina familiar, se demostró que las enfermedades provocadas por *E. histolytica* ocupan el primer lugar y el 0.44% correspondió a colitis amibiana (Arredondo y Hernández, 1998). La amibiasis, como otras parasitosis, es el resultado de pobreza y pobres condiciones sanitarias donde priva el hacinamiento y el mal manejo de aguas y de heces (Keene y col., 1986; Gómez y col., 1996). El espectro de las manifestaciones clínicas observadas en los individuos infectados puede ser de dos tipos. En el primer tipo, infección asintomática intestinal, el parásito puede permanecer como comensal en el intestino sin provocar ninguna perturbación del bienestar del huésped; en la segunda, sintomático, el parásito causa daños en el huésped y se manifiesta principalmente como disentería y absceso hepático (Olarte, 1992). La amibiasis intestinal (disentería) es un problema de salud que afecta a niños y adultos; es un padecimiento endémico en grandes áreas del planeta, especialmente a los países en desarrollo (Searle, 1999), donde existen múltiples factores de tipo social, económico, político y ecológico que son adversos para el control y/o disminución de la frecuencia de esta parasitosis. Es necesario seguir insistiendo en el mejoramiento de las condiciones higiénicas personales y ambientales, manejo adecuado de los alimentos y adoptar medidas profilácticas

en individuos asintomáticos, así como dar tratamiento a los pacientes con síntomas (Padilla y col., 1997). El agente causal de la amibiasis, *E. histolytica*, es un protozooario cosmopolita que parásita el intestino del hombre, y puede existir como trofozoito o como quiste. Los quistes son usualmente de 5-20 μ m de diámetro con uno o cuatro núcleos y se puede encontrar en la parte baja del intestino. El protozooario usualmente vive y se multiplica en el lumen del colon, vive en simbiosis con la flora bacteriana como comensal de los organismos o del huésped quien puede o no manifestar los síntomas de la enfermedad (Esquema 1).

Los quistes maduros tetranucleados infectantes pasan por las heces y parásita al huésped. Los trofozoitos son capaces de invadir hígado, cerebro y riñones provocando necrosis locales conocidos como abscesos. El protozooario es capaz de invadir y destruir células epiteliales del intestino grueso, causando ulceraciones y presencia de sangre en heces (disentería).

Los parásitos como *E. histolytica* desarrollan su virulencia siempre como trofozoitos, mediante la secreción de enzimas que facilitan la invasión de la mucosa colónica (Arredondo y Hernández, 1998). La destrucción celular ocurre por la liberación de mediadores líticos que incluyen proteinasas y lipasas.

Además de estos signos (presencia de sangre y moco en las evacuaciones), se observan manifestaciones clínicas tales como fiebre y malestar general.



1. Ingestión de quistes infestantes.
2. Formación intestinal de amebas nucleadas.
3. Formación de pequeñas amebas que se dirigen hacia el colon donde producen ulceraciones de la mucosa.
4. Eliminación de trofozoitos no infestantes y quistes infestantes.
5. Localizaciones extraintestinales: hepática, pulmonar y cerebral.

Esquema 1. Ciclo de vida de la *E. histolytica*.

El período en que el hombre puede ser portador varía desde meses hasta dos años. La forma básica de infección es la ingesta de quistes maduros, que se da en medios contaminados, mal saneados y con malos hábitos de higiene que propician el cierre del ciclo ano-mano-boca a través de aguas o alimentos contaminados (Conde-Bonfil y Mora Zerpa, 1992; WHO, 1992; Benítez y col., 1991; Arredondo y Hernández, 1998). En la enfermedad intestinal aguda necesariamente deben de encontrarse trofozoitos en las evacuaciones frescas que confirmen el diagnóstico. En algunas regiones como México, por razones que se desconocen, los trofozoitos se presentan con cierta frecuencia en localizaciones extraintestinales, siendo la principal el hígado, ocasionando absceso hepático. Los agentes terapéuticos más utilizados para el tratamiento de la amibiasis (Figura 1) se clasifican, de acuerdo a su sitio de acción, en tres grupos: a) los que actúan en el lumen intestinal, como la diloxanida (1), el sulfato de paromicina (2), la eritromicina (3), las 8-hidroxiquinolinas (4), la quinfamida (5) y la etofamida (6); b) los amebicidas tisulares, como la emetina (7), la deshidroemetina (8) y la cloroquina (9); y c) los que actúan en ambos niveles, como el metronidazol (10) y sus derivados (el tinidazol (10a), el nimorazol (10b), el ornidazol (10c) y el secnidazol (10d)). Cabe destacar que el fármaco de elección es el metronidazol (Noori y col., 1998; Meloni y col., 1990; Goodman y col., 1988; Guarner, 1990; Phillipson, 1991; Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992; Conde-Bonfil y Mora-Zerpa, 1992; Chávez y col., 1992; SSA, 1993; Romero-Cabello y col., 1995; Sohni y col., 1995).

Figura 1. Fármacos utilizados en el tratamiento de la amibiasis.

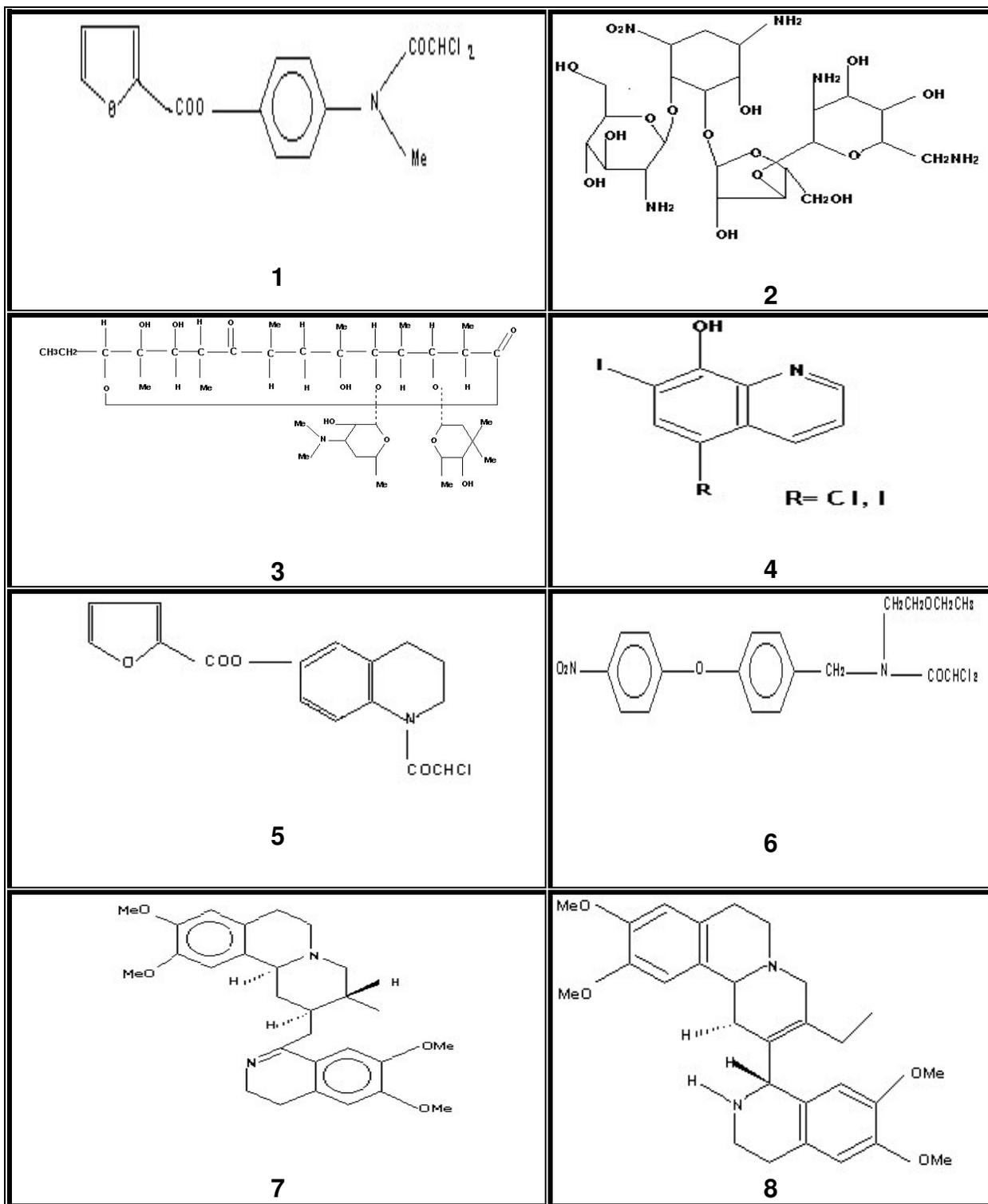
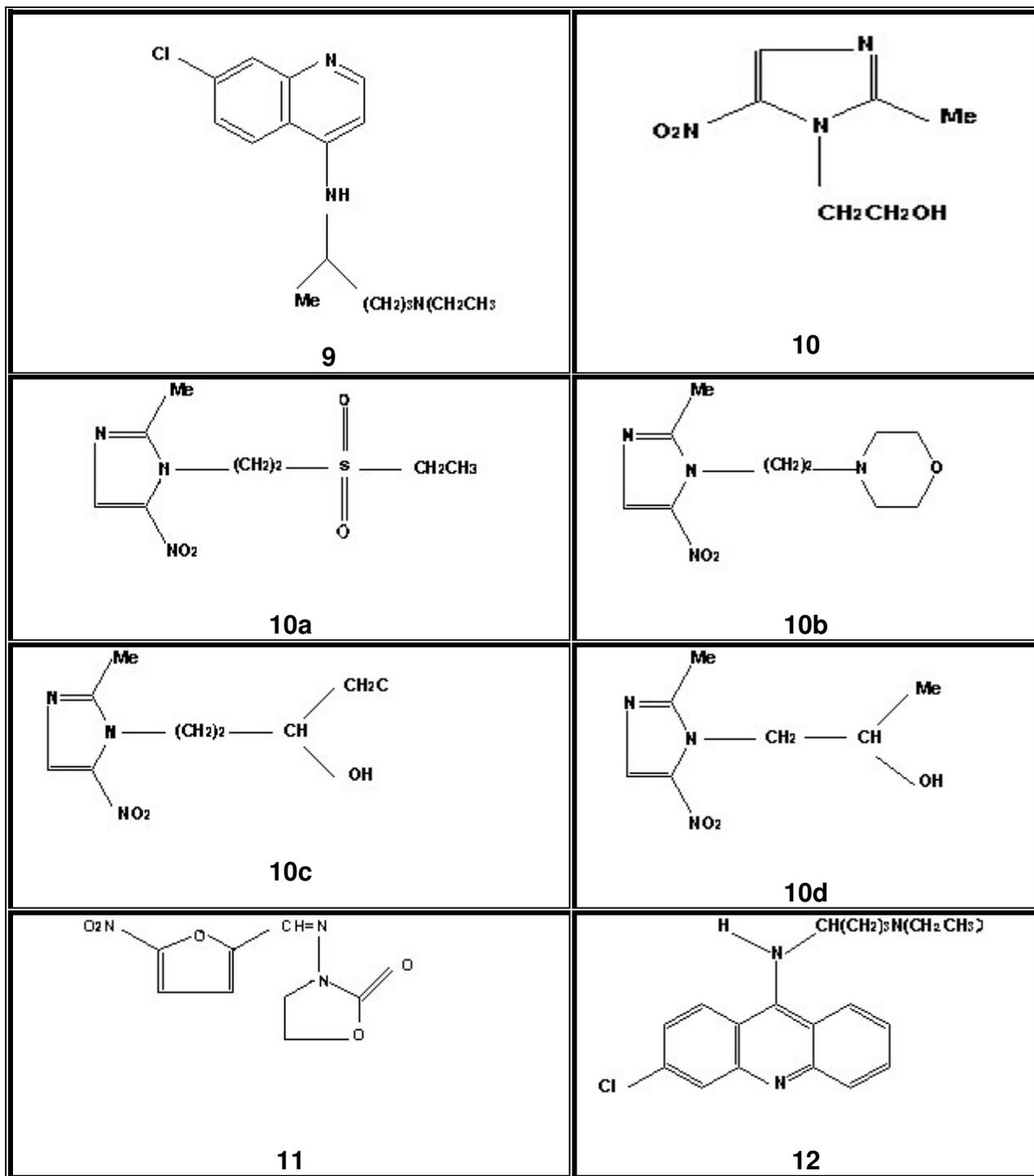


Figura 1. Continuación...



El empleo de la emetina (**7**) para el tratamiento de la disentería tiene sus orígenes en el uso de la raíz de ipecacuana (*Cephaelis ipecacuhana*, Rubiaceae) por

ciertas etnias de las selvas amazónicas del Brasil. Los indígenas de estas áreas usaban la infusión de la raíz de la planta para tratar la disentería, mucho antes de la llegada de los europeos a América. En 1912 se aisló la emetina (7) de la ipecacuana y se demostró su actividad antiamibiana *in vitro* (Kretschmer, 1990). Aunque por más de 300 años la ipecacuana constituyó el único remedio para el tratamiento de la disentería, en la actualidad el uso de la emetina es restringido debido a sus efectos indeseables como son dolor, cardiotoxicidad y necrosis en el sitio de inyección (Goodman y col., 1988., 1990; Phillipson, 1991). Los efectos colaterales observados en pacientes tratados con emetina dieron origen a la búsqueda de nuevos sustitutos sintéticos, semisintéticos y naturales. Los fármacos para el tratamiento de la amibiasis en su mayoría son eficaces, pero no siempre son bien aceptados ya que los tratamientos son largos y a menudo necesarios prescribir dos o más compuestos para obtener el efecto terapéutico deseado. Así mismo, la administración de estos fármacos causa diversos efectos colaterales indeseables (intolerancia, náuseas severas, mal sabor de boca, nula compatibilidad con el alcohol, reacciones de hipersensibilidad, dolor abdominal, vértigo, discrasias sanguíneas, entre otros), lo que en ocasiones provoca el abandono del tratamiento con el consecuente fracaso terapéutico. De manera adicional, el metronidazol es carcinogénico en roedores, mutagénico en bacterias y no tiene propiedades quísticas. También se han descrito casos de diferencia de susceptibilidad en cepas de *E. histolytica*, lo cual podría ser indicio del desarrollo de resistencia de este parásito al metronidazol (Noori y col., 1988; Wright y col., 1988; Shukla y Das, 1988; Meloni y col., 1990; Phillipson, 1991; Cedillo-Rivera y Muñoz, 1992; Chávez y col., 1992; Katelaris y col., 1994; Romero-

Cabello y col., 1995; Padilla y col., 1997; Gómez y col., 1996). Cabe destacar que en la actualidad no hay un medicamento para tratar la amibiasis que no presente efectos colaterales indeseables. Con base a lo antes expuesto, sin lugar a duda, es importante continuar con la búsqueda de nuevas fuentes de agentes antiprotozoarios alternos, más potentes, con propiedades quisticidas, menos tóxicos y que no induzcan resistencia (Keene y col., 1986; Wright y col., 1988; Gonzáles-Garza y col., 1992). Resulta evidente que la estrategia de evaluar las propiedades antiprotozoarias contra *E. histolytica* de las plantas medicinales usadas para tratar trastornos gastrointestinales constituyen una alternativa viable que debe continuar siendo abordada. Como lo demuestran las sustancias antiprotozoarias naturales, berberina, glaucarubina y esculetina (Cordel, 1993; Ekong y col., 1991). Aún más, si se considera que México es un país con una amplia variedad de flora medicinal y donde las diarreas infecciosas ocupan un importante lugar como problema de salud pública. En este sentido las plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana como agentes antiamebianos pueden constituir el punto de partida para el hallazgo de fitomedicamentos efectivos de origen natural. Refiriéndose al caso particular de la medicina tradicional mexicana, la extensa bibliografía indica que existe un gran número de especies vegetales para tratar la disentería, entre las que destacan las listadas en el Tabla 1 (Martínez, 1979; 1989; Aguilar y col., 1994; INI, 1994).

Tabla 1. Nombre botánico de las 26 especies mexicanas preseleccionadas, número de registro, nombre común, parte usada de la planta y uso tradicional

Especie botánica (Familia)	Número de registro	Nombre Común	Parte Usada	Uso Tradicional
-------------------------------	-----------------------	-----------------	-------------	--------------------

<i>Allium sativum</i> L. (Liliaceae)	14396	Ajo	Epidermis del bulbo	Dolor de estómago Disentería
<i>Aloysia triphyla</i> Britton (Verbenaceae)	126110	Cedrón	Partes aéreas	Dolor de estómago Diarrea
<i>Annona cherimola</i> Mill (Annonaceae)	14401	Chirimoya	Semillas	Disentería, diarrea, Parásitos
<i>Artemisia absinthium</i> L. (Asteraceae)	12609	Ajenjo	Partes aéreas	Dolor de estómago, Cólicos, parásitos
<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt (Asteraceae)	14409	Estafiate	Partes aéreas	Dolor de estómago, Diarrea, disentería y Cólicos
<i>Bocconia frutescens</i> L. (Papaveraceae)	12618	Gordolobo	Partes aéreas	Dolor de estómago, disentería
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> L. (Leguminosae)	13591	Tabachín	Partes aéreas	Dolor de estómago, Disentería, cólico
<i>Carica papaya</i> L. (Caricaceae)	14397	Papaya	Semillas	Diarrea, parásitos
<i>Chenopodium ambrosoides</i> L. (Chenopodiaceae)	14402 ^a 14395 ^a	Epazote	Partes aéreas	Dolor de estómago, Diarrea, parásitos
<i>Chenopodium murale</i> L. (Chenopodiaceae)	13592	Enechquelite	Partes aéreas	Disentería
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat (Sterculiaceae)	14404	Flor de manita	Flores	Disentería
<i>Chrysactinia mexicana</i> Gray (Asteraceae)	14407	San Nicolás	Partes aéreas	Diarrea
<i>Cocos nucifera</i> (Asteraceae)	14398	Coco	Exocarpo del Fruto	Parásitos, disentería
<i>Dichondra argentea</i> Humb & Bonpl (Convolvulaceae)	0103m	Oreja de ratón	Partes aéreas	Diarrea

^a variedad (roja / verde).

Tabla 1 Ccontinuación...

<i>Dorstenia contrajerva</i> L (Moraceae)	14406	Contrahierba	Partes aéreas	Dolor de estómago, Disentería, cólicos
<i>Geranium mexicanum</i> H.B.K (Geraniaceae)	14405	Geranio	Partes aéreas, raíces	Dolor de estómago, Diarrea, disentería
<i>Hippocratea excelsa</i> H.B.K. (Hippocrateaceae)	14394	Cancerina	Raíces	Dolor de estómago, Cólicos
<i>Lippia alba</i> N.E.Br (Verbenaceae)	14146	Mirto	Partes aéreas	Diarrea, dolor de estómago
<i>Lygodium venustum</i> Sw (Schizaeaceae)	13270	Culebrina	Partes aéreas	Diarrea, disentería
<i>Matricaria recutita</i> L (Asteraceae)	14399	Manzanilla	Partes aéreas	Dolor de estómago, Disentería, diarrea
<i>Ocimum basilicum</i> L (Labiatae)	14393	Albahacar	Partes aéreas	Dolor de estómago, Cólicos
<i>Punica granatum</i> L (Punicaceae)	14403	Granada	Exocarpo de Fruto	Diarrea, disentería, Parásitos
<i>Ruta chalepensis</i> L (Rutaceae)	14400	Ruda	Partes aéreas	Dolor de estómago, Cólicos, parásitos
<i>Schinus molle</i> L (Anacardiaceae)	14408	Pirul	Partes aéreas	Dolor de estómago
<i>Senna villosa</i> Mills (Leguminoceae)	14410	Tsalché	Partes aéreas	Cólicos
<i>Thymus vulgaris</i> L (Lamiaceae)	13594	Tomillo	Partes aéreas	Dolor de estómago

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las especies vegetales indicadas en la Tabla 1 son plantas de las más utilizadas en la medicina tradicional mexicana para tratar trastornos gastrointestinales que incluyen a la diarrea y la disentería (Martínez. 1989; Lozoya y col., 1987; Heinrich, 2000), sus extractos no han sido evaluados desde el punto de vista farmacológico como antimicrobianos. Los resultados derivados de esta tesis en cuanto a su efecto antimicrobiano *in vitro* aportarán evidencias que podrían explicar en parte el uso de estos vegetales en las prácticas médicas alternativas de México para tratar la disentería y la diarrea.

5. OBJETIVO GENERAL

Realizar la valoración antimicrobiana *in vitro* de 26 especies vegetales extensamente usadas en las prácticas médicas alternativas de México.

5.1 Objetivos particulares

Con la finalidad de dar cumplimiento al objetivo general se proponen los siguientes objetivos particulares.

- Realizar una investigación bibliográfica sobre las plantas usadas en la medicina tradicional para tratar trastornos gastrointestinales con la finalidad de preseleccionar las candidatas apropiadas para la determinación de su potencial antimicrobiano.
- Adquisición del material vegetal preseleccionado en cantidades apropiadas para la realización de los estudios antimicrobianos.
- Preparación de los extractos metanólicos de las 26 especies colectadas.
- Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos metanólicos.

6. HIPÓTESIS

La preselección de especies vegetales mediante un criterio etnobotánico que considera el uso de estas especies para tratar la diarrea y la disentería, conducirán a la obtención de extractos con propiedades antimicrobianas *in vitro*.

7. EXPERIMENTAL

El desarrollo de esta investigación se realizó en las siguientes etapas:

7.1 Adquisición del material vegetal.

Esta práctica se realizó en los mercados de Sonora, Tláhuac en la Ciudad de México y de Ozumba en el Estado de México, y. En todos los casos se adquirieron aproximadamente 200 g del material vegetal fresco. En el Herbario del IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro Social, se depositaron los ejemplares de referencia correspondientes y los cuales fueron clasificados por la M. en C. Abigail Aguilar. El secado del material se realizó en condiciones de luz y temperatura ambiente. La parte del vegetal que se adquirió es aquella que se utiliza comúnmente en la medicina tradicional y herbolaria.

7.2 Preparación de los extractos metanólicos de las especies objeto de estudio.

Para la realización de la evaluación antimicrobiana se prepararon los extractos a partir de 20 g del material vegetal seco y molido de cada una de las 26 especies y 300 ml de metanol como disolvente. El proceso de extracción se realizó por maceración por dos ocasiones a intervalos de una semana.

7.3 Determinación de la actividad potencial antimicrobiana in vitro de los extractos vegetales.

Los ensayos conducentes a la determinación de la actividad antiamebiana potencial de los extractos se realizará según la técnica descrita por Calzada y col. (1998a). A continuación se describen los aspectos más importantes de esta prueba biológica.

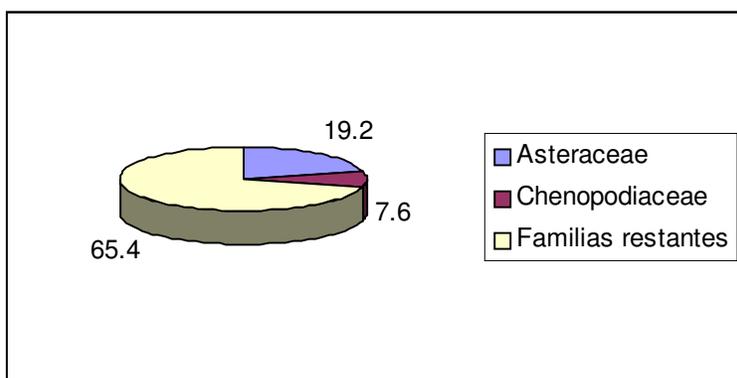
El microorganismo utilizado fue *E. histolytica* cepa HM1-IMSS. La cepa fue mantenida en medio TYI-S-33 adicionado con suero de bovino al 10%. Para el bioensayo se utilizó el parásito en fase de crecimiento logarítmica.

Las muestras a evaluar se prepararon de la siguiente forma: Los extractos metanólicos (300 mg) se disolvieron en 1 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) y 19 ml medio cultivo TYI-S-33, de la solución resultante se transfirieron 53 - 0.66 μ l a tres tubos, en forma independiente y se aforaron a 4 ml con medio de cultivo, para obtener así una concentración final de entre 200 - 2.5 μ g/ml. Cada concentración se hizo por triplicado y se repitió un mínimo de tres veces. Los tubos que contienen la muestra incorporada se inocularon con *E. histolytica* para obtener un inóculo de 6×10^3 trofozoitos/ml. Por último, los tubos se incubaron a 36°C y al cabo de 48 h se registra la viabilidad de células mediante cuenta directa al microscopio, utilizando la cámara de Newbower. Cada prueba incluyó metronidazol (Sigma) y emetina (Sigma) como controles positivos.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera fase de la investigación se efectuó una preselección de 26 especies medicinales mexicanas, utilizando como criterio de selección, el etnobotánico. La estrategia se basa en el conocimiento y uso que hacen los pobladores para procurarse salud, en este caso particular para tratar la diarrea y la disentería. Esta estrategia ha conducido a nivel mundial al descubrimiento de fármacos antiprotozoarios con aplicación terapéutica (Farnsworth y col., 1989; Phillipson, 1991a; Cordel, 1995; Cragg y col., 1997). Así, por ejemplo, tres agentes antiprotozoarios de uso terapéutico, la emetina, la glaucoribinona y la artemisina, se descubrieron de especies de reconocido uso popular para el tratamiento de la disentería, diarrea y el paludismo, respectivamente (Kretschmer, 1990; Farnsworth y col., 1987). En esta etapa inicial del proceso de preselección se analizó la información derivada de estudios de informática y de una revisión bibliográfica sobre las especies vegetales medicinales usadas para tratar padecimientos gastrointestinales que incluyen la diarrea y la disentería en las prácticas médicas populares de México. Con base a este análisis se preseleccionaron las 26 especies indicadas en la Tabla 1, de las cuales el 19.2% pertenece a la familia de las Asteraceae, 7.69% pertenece a la familia de las Chenopodiaceae y Verbenaceae y en un 65.4% las familias restantes (Gráfica 1). Cabe mencionar, que ninguna de las especies más activas pertenecen a la familia de las Asteraceae; *Annona cherimola* (Annonaceae), *Chiranthodendron pentadactylon* (Sterculiaceae) y *Punica granatum* (Punicaceae).

Gráfica 1. Familias más importantes de las plantas medicinales evaluadas.



Una vez realizado el proceso de preselección, se procedió a la compra de los vegetales para preparar a partir del material vegetal desecado y molido, los extractos metanólicos. Los extractos resultantes se valoraron para determinar su efecto antiamebiano contra los trofozoitos de *E. histolytica* (Tabla 2).

La decisión de preparar extractos metanólicos se basa en que este disolvente permite extraer compuestos de baja, mediana y alta polaridad. Además de que previamente se ha demostrado en el laboratorio de la Unidad de Investigaciones Médicas de Farmacología de Productos Naturales del IMSS en cernimientos de actividad antiamebiana que, de entre extractos acuosos, de diclorometano y metanólicos, los últimos han permitido obtener mejores resultados, en la selección de plantas medicinales con actividad antiamebiana (Calzada y col., 1998b).

En la tabla 2 se resumen los resultados de actividad antiamebiana de los 26 extractos metanólicos preseleccionados de la medicina tradicional Mexicana. Los valores se expresan como concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}).

Tabla 2. Efecto antiamebiano del extracto metanólico de las 28 plantas medicinales preseleccionadas.

Espece Botánica	CI ₅₀ ì g/mL (95%) <i>E. histolytica</i>
<i>Allium sativum</i> L.	61.8 (62.2-61.4)
<i>Aloysia triphyla</i> Britton	113.4 (113.8-113.1)
<i>Annona cherimola</i> Mill	14.8 (15.0-14.6)
<i>Artemisia absinthium</i> L.	72.3 (72.5-72.1)
<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt	82.2 (84.8-81.7)
<i>Bocconia frutescens</i> L.	96.4 (96.6-96.2)
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> L.	182.4 (183.8-181.1)
<i>Carica papaya</i> L.	153.0 (154.9-151.2)
<i>Cocos nucifera</i>	59.6 (59.7-59.5)
<i>Chenopodium ambrosoides</i> L. variedad verde	112.6 (113.0-112.2)
<i>Chenopodium ambrosoides</i> L. variedad roja	45.2 (45.4-45.1)
<i>Chenopodium murale</i> L.	90.3 (90.6-90.0)
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat	2.5 (2.7-2.4)
<i>Chrysactinia mexicana</i> Gray	45.3 (45.4-45.1)
<i>Dorstenia contrajerva</i> L	47.1 (47.4-46.8)
<i>Dichondra argentea</i> Humb & Bonpl	38.3 (38.5-37.9)
<i>Geranium mexicanum</i> H.B.K (A)	139.9 (140.6-139.3)
<i>Geranium mexicanum</i> H.B.K (R)	103.6 (104.2-102.9)
<i>Hippocratea excelsa</i> H.B.K.	233.2 (236.3-230.3)
<i>Lippia alba</i> N.E.Br	58.1 (58.4-57.9)
<i>Lygodium venustum</i> Sw	178.4 (179.8-177.1)
<i>Matricaria recutita</i> L	102.1 (102.4-101.9)
<i>Ocimum basilicum</i> L	41.7 (42.1-41.3)
<i>Punica granatum</i> L	29.5 (29.6-29.4)
<i>Ruta chalepensis</i> L	61.9 (62.1-61.8)
<i>Schinus molle</i> L	82.4 (82.9-81.8)
<i>Senna villosa</i> Mills	133.1 (133.7-132.5)
<i>Thymus vulgaris</i> L	90.9 (91.3-90.7)
Emetina ^b	1.05 (1.07-1.04)
Metronidazol ^b	0.04 (0.103-0.029)

^a Resultados expresados (n=6); ^b Controles positivos.

De los 28 extractos metanólicos evaluados, tres mostraron actividad significativa contra *E. histolytica*: *A. cherimola*, *Ch. pentadactylon*, y *P. granatum* con CI_{50} menor es a 30 μ g/ml. La actividad de *Ch. pentadactylon* (CI_{50} 2.5 μ g/ml) es similar a la emetina (1.05 μ g/ml), pero no mejora a la del metronidazol (0.04 μ g/ml) Tabla 3.

Tabla 3. Efecto antiamebiano del extracto metanólico de tres extractos con actividad significativa.

Especie botánica	CI_{50} μ g/mL (95%) <i>E. histolytica</i>
<i>Annona cherimola</i> Mill	14.8 (15.0-14.6)
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat	2.5 (2.7-2.4)
<i>Punica granatum</i> L:	29.5 (29.6-29.4)
Emetina	1.05 (1.07-1.04)
Metronidazol	0.04 (0.103-0.029)

Los extractos de: *A. absinthium*, *A. sativum*, *A. ludoviciana*, *A. triphyla*, *B. frutescens*, *C. nucifera*, *Ch. ambrosoides* (verde), *Ch. ambrosoides* (roja), *Ch. mexicana*, *G. mexicanum* (A), *G. mexicanum* (R), *Ch. murale*, *D. contrajerva*, *D. argentea*, *L. alba*, *O. basilicum*, *R. chalepensis*, *T. vulgaris*, *S. villosa*, y *S. molle* mostraron actividad contra el protozoario con CI_{50} de entre 38.3 a 139.9 μ g/ml. Los extractos de las plantas restantes mostraron actividad con CI_{50} de entre 178.4 a 233.2 μ g/ml.

Es importante destacar que en estudios previos se han podido aislar compuestos con propiedades antiamebianas de plantas con CI_{50} mayor a 158.22 μ g/ml, por lo que de este cernimiento hay posibilidad de obtener agentes antiamebianos del 90% de los extractos analizados. Siendo particular interés las tres especies más activas: *Ch. pentadactylon*, *A. cherimola* y *P. granatum* (Calzada y col., 1995; 1998b).

Si se considera que *E. histolytica* es un agente causal de diarrea y disentería, la actividad antiamebiana, demostrada para 23 de los extractos explican en parte el uso popular de estas plantas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diarrea y la disentería (Lozoya y col., 1987; Aguilar y col., 1994; Heinrich, 2000).

En relación a las plantas evaluadas algunas de ellas han demostrado efecto antiprotozoario. Así se sabe que el extracto etanólico de *A. ludoviciana*, inhibe la reproducción de *Plasmodium yoelli yoelli* en un 98% (Malagon y col., 1997). De los extractos de *A. absinthium* se demostró la actividad antiprotozoaria contra *Plasmodium berghei* (Zafar y col., 1990). El fraccionamiento biodirigido de los extractos de *A. sativum* y *A. cherimola*, se identificaron los agentes anti-giardia, los cuales incluyen compuestos azufrados en *A. sativum* (Lun y col., 1994; Harris y col., 2000), y acetogeninas en *A. cherimola* (Bories y col., 1991).

9. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la selección de plantas mediante un criterio etnobotánico constituye un método adecuado para la selección de plantas con potencial anti-amibiano.
- Los resultados derivados de la evaluación de la actividad anti-amibiana de algunas de las 28 plantas preseleccionadas explican en alguna medida su uso en las prácticas médicas populares como agentes para tratar problemas gastrointestinales como la disentería amibiana y la diarrea.
- Tres de las 28 plantas seleccionadas, fueron más activas con CI_{50} menores a 30 μ g/ml: *Ch. pentadactylon*, *A. cherimola* y *P. granatum*.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar el estudio químico biodirigido de las plantas (*Chiranthodendron pentadactylon*, *Annona cherimola* y *Punica granatum*) con mayor actividad anti-amibiana encontradas en este estudio para la obtención de agentes anti-amibianos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jácquez, P., López. M. E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. I.M.S.S. 43
- Arellano, J., Granados, J., Frenk, P., López-Osuna, M., Santos, I., Kretschmer, R. (1992). Increased frequency of HLA-DR3 in mexican mestizo pediatric patients with amebic liver abscess (ALA). *Archives of Medical Research*. **23**: 269-270
- Arredondo, G. J. L., Hernández, T. M. (1998). Diarrea infecciosa. En: Subdirección General de Investigación. Instituto Nacional de Perinatología. Ed. Schering–Plough. México.
- Benítez, O., Uribe, F., Navarro, A., Hernández, D., Ruiz, J., Cravioto, A. (1991). Etiología de diarrea con sangre en niños de una comunidad rural. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. **48**: 2483-2486
- Bhutani, K. K., Sharma, G. L., Ali, M. (1987). Plant based antiamebic drugs; Part 1. Antiamebic activity of phenanthroindolizidina alkaloids; common structural determinants of activity with emetine. *Planta Medica*. 532-536
- Biagi, F. (1981). Amibiasis, En: Antibiotics Chemotherapy. Ed. Shogeld. New York S. Karger.

- Bories, C., Loiseau, P., Cortes, D, Myiut, S. H., Hoeguemille, R., Gayral, P., Cave, A., Laurens, A. (1991). Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimola* seed. *Planta Medica*. **57**: 434-436
- Braga, L. L., Mendoca, Y., Paiva, C. A., Sales, A., Cavalcate, A. L., Mann, B. J. (1998). Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in Northeastern Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 3044-3045
- Calzada, F., Alanís, A. D., Meckes, M., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R. (1998b). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of Southern Mexico. *Phytotherapy Research*. **12**: 70-72
- Calzada, F., López, R., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R. (1995). Flavonoids of the aerial parts of *Hellianthemum glomeratum*. *International Journal of Pharmacognosy*. **11**: 351-352
- Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A., Mata, R. (1998a). Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology*. **5**: 308-308
- Carrero, J. C., Laclette, P. (1996). Molecular biology of *Entamoeba histolytica*: A review. *Archives of Medical Research*. **27**: 403-412
- Cedillo- Rivera, R., Tapia-Contreras, A., Muñoz, O. (1992). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* to fluoroquinolones, nitrofurans

and other antimicrobial agents. Utility of the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate. *Archives of Medical Research*. **28**, suppl. S295-s297

- Conde-Bonfil, M. C., Mora-Zerpa, C. (1992). *Entamoeba histolytica*: un desafío vigente. *Salud Pública de México*. **34**: 335-341
- Cordel, G. A. (1993). Pharmacognosy-new roots for an old science. En: *Studies in natural products chemistry*. Elsevier Science Publisher. **13**: 629-675
- Cordel, G. A. (1995). Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*. **40**: 1585-1612
- Cragg, G. M., Newman, D. J., Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*. **60**: 52-60
- Chávez, B., Cedillo-Rivera, R., Martínez-Palomo, P. (1992). *Giardia lamblia*: ultraestructural study of the *in vitro* effect of benzimidazoles. *Journal Protozoology*. **39**: 510-515
- Didier, H. (1995). La colección de plantas medicinales más importante de América Latina. *Ciencias* **39**. 46-47
- Ekong, R., Partridge, S. J., Anderson, M. M., Kirby, G. C., Warhusrt, D. C. (1991). *Plasmodium falciparum* effects of phaeanthine a naturally occurring bisbenzylisoquinoline-sensitive parasites *in vitro* and its influence on chloroquine activity. *Ann. Trop. Med. Parasitology*. **85**: 205

- Eloff, J. N. (1998). Which extract and should be used for the screening and isolation antimicrobial components from plants?. *Journal of Ethnopharmacology*. **60**: 1-8
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., Guo, Z. (1989). Las plantas medicinales en la terapéutica. *Bulletin of Sanit Panam*. **107**: 314-329
- Gómez, M. C., Pérez, D., Ayala, P., Samuelson, J., Orozco, E. (1996). Physiology and molecular biology of multidrug resistance in *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*. **27**: 421-425
- Gonzáles-Garza, M. T., Matlin, S. A., Mata-Cárdenas, B., Said-Fernández, S. (1992). Futher studies on the *in vitro* activity of gossypol as antiamebic agent. *Archives of Medical Research*. **23**: 69-70
- Gonzáles-Ruiz, A., Haque, R., Rehman, T., Aguirre, A., Castañon, G., Hall, A., Jul, F., Ruíz-Palacios, G., Warhurst, D. C., Miles, M. A. (1992). Further diagnostic use of an invasive-specific monoclonal antibody against *Entamoeba histolytica*. *Archives of Medical Research*. **23**: 281-283
- Goodman, A., Goodman, L., Rall, T. W. (1988). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Médica Panamericana, México. 536

- Goodman, L. G., Rall, W. T., Nies, A. S. Taylor, P. (1990). The Pharmacological basis of therapeutics. Eight Edition. Ed. Pergamon Press. 999
- Guarner, V. (1990). Amebiasis. infection and disease by *Entamoeba histolytica*. Academic Press Limited. Ed. Kretschmer, R. R. 222-235
- Haque, R., Ali, J. K. M., Akther, S., Petri, W. A. (1998). Comparison of PCR, isoenzyme analisis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**: 449-452
- Harris, J. C., Plummer, S., Turner, M. P., Lloyd, D. (2000). The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis* *Allium sativum* (Garlic) is and effective anti giardial. *Microbiology*. **146**: 3119-3127
- Heinrich, M. (2000). Ethnobotany and its role in drug development. *Phytotherapy Research*. **14**: 479-488
- Instituto Nacional Indigenista, Tomo 1. (INI). (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social: Información Etnobotánica. México. 43
- Katelaris, P. H., Naeem, A., Farthing, M. J. G. (1994). Activity of metronidazol, azithromycin and three benzimidazoles on *Giardia lamblia* growth and attachment to a human intestinal cell line. *Aliment Pharmacology Therapy*. **8**:187-192

- Keene, A. T., Harris, A., Phillipson, J. D., Warhursts, D. C. (1986). *In vitro* amoebicidal testing of natural products; Part 1. Methodology. *Planta Medica*. **28**: 278-284
- Koch-Weser, J. M. D., Goldman, P. M. D. (1980). Drug therapy. *The New England Journal of Medicine*. **303**: 1212-1218
- Kretschmer, R. R. (1990). Amebiasis. Infection and diseases by *Entamoeba histolytica*. Ed. CRC Press Boston.
- Lozoya, X., Aguilar, A., Camacho, J. R. (1987). Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Revista Médica del IMSS*. **25**: 283-290
- Lun, Z. R., Borri, C., Menzeinger, M., Kamiusky, P. (1994). Antiparasitic of diallyl trisulfide (Dasuansu) on human and animal pathogenic protozoa (*Tripanosoma sp*, *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*) in vitro. *Ann. Soc. Belg. Med Trop*. **74**: 51-59
- Malagon, F., Vázquez, J., Delgado, G., Ruiz, A. (1997). Antimalaric effect of an alcoholic extract of *Artemisia ludoviciana* mexicana in a rodent malaria model. *Parasitologia*. **39**: 3-7
- Martínez, M. (1979). Catalogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica, México.
- Martínez, M. (1989). Las plantas medicinales de México. 6^a Edición. Ed. Botas.

- Mayoral, G. R. A. , Torres, R. E. (1996). Eficacia comparativa entre quinifamida y metronidazol en el tratamiento de la amibiasis luminal. *Acta Médica Escuela Superior de Medicina I. P. N.* **31**: 53-58

- Meloni, B. P., Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A., Seville, P. (1990). Albendazole: a more effective anti giardal agent *in vitro* than metronidazole or tinidazole. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **84**: 375-379

- Noori, S., Al-Waili, N. S., Al-Waili, B. H., Sallom, K. Y. (1988). Therapeutic use of mebendazole in giardial infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* **82**: 438

- Olarte, J. (1992). Etiología de las diarreas infecciosas: viejos y nuevos agentes. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México.* **49**: 143-150

- Oliver-Bever, B. (1986). Medicinal plants in tropical west. Africa. Cambridge University Press, Cambridge.

- Padilla, R. N., Figueroa, F. R., Rivera, S. Ma. R., Alarcón, A., Muñoz, M. (1997). Estudio comparativo: una toma a un día contra dos tomas al día de quinifamida, en el tratamiento de la amibiasis intestinal asintomática en niños. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría.* **11**: 1-3

- Phillipson, J. D. (1991^a). A matter of some sensitivity. *Phytochemistry*. **38**: 1319-1343
- Phillipson, J.D. (1991^b). Assays for antimalarial and amoebicidal activities . En : Methods in plant biochemistry. *Academic Press Limited*. **6**: 135-152
- Romero-Cabello, R., Robert, L., Muñoz-García, R., Tanaka, J. (1995). Estudio aleatorio para comparar seguridad y eficacia de albendazol y metronidazol en el tratamiento de giardiasis en niños. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **37**: 315-323
- Searle. (1999). Cuarta reunión de expertos en amebiasis. *Searle*
- (SS) SECRETARIA DE SALUD. (1993). Guía para el manejo efectivo de niños con enfermedad diarreica y pacientes con cólera. S. S. A. 7^a Edición. México. Ed. Mota, H. F.
- Shukla, S. C., Das, S. R. (1988). Cure of amoebiasis by seed powder of *Cassia fistula*. *International Journal of Crude Drug Research*. **26**: 141-144
- Sohni, Y. R., Kaimal, P., Bhatt, R. M. (1995). The antiamebic affect of a crude drug formulation of herbal extracts against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*. **45**: 43-52

- Torres, J., González-Arroyo, S., Pérez, R., Muñoz, O. (1995). Inappropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbiological studies. *Archives of Medical Reserarch*. **26**: 23-29
- (W.H.O.) World Healt Organization. (1992). Tropical and intestinal parasitic disease. En: *World Health Statistics Annual*, WHO **199**: 15-18
- Wright, W. C., O'Neill, M. J., Phillipson, J. D., Warhurst, D. C. (1988). Use of microdilution to assess *in vitro* antiamebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* Stem, and a number of quassinoids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **32**: 1725-1729.
- Wright, W.C., Allen, D., Cai, Y., Chen, Z., Phillipson, J. D., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., Tits, M., Angenot, L. (1994). Selective antiprotozoal activity of some *Strychnos* alkaloids. *Phytotherapy Research*. **8**: 149-152
- Zafar, M. M., Handard, M. E., Hameed, A. (1990). Screening of *Artemisia absinthium* for antimalarial effects on *Plasmodium borghei* in mice a preliminary report. *Journal of Ethnopharmavology*. **30**: 223-226