



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO ANTI-
GIARDIASICO DE CATORCE ESPECIES DE
PLANTAS MEXICANAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

IRMA ARACELI NAVARRO ALEGRIA



San Juan Iztacala, Méx.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO
EN EL LABORATORIO DE PARASITOLOGIA
DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA (INP)
BAJO LA DIRECCION DE M EN C:
JOSEFINA TORRES GOMEZ (UNAM, ENERI) Y
DRA. EN PARASITOLOGIA: MARTHA PONCE MACOTELA (INP)

A LA MEMORIA DE MIS PADRES
ADOLFO NAVARRO PEREZ
Y
MATILDE ALEGRIA DE NAVARRO
POR SU AMOR, ESTIMULO Y APOYO

A LA MEMORIA DE UN HERMANO
EJEMPLAR DAVID NAVARRO ALEGRIA

A MI HERMANA CAROLINA NAVARRO ALEGRIA
POR HABERME APOYADO DURANTE TODA MI VIDA.

A MI SOBRINO CARLOS ADOLFO SERRANO NAVARRO
POR SU ALEGRIA Y TERNURA.

A MI CUÑADO CARLOS SERRANO TORRES POR
SUS VALIOSAS OPINIONES

INDICE

TITULO	PAG
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	6
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE <u>GIARDIA</u>	6
CICLO BIOLÓGICO DE <u>GIARDIA DUODENALIS</u>	7
MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.....	9
MANIFESTACIONES CLINICAS DE LA GIARDIASIS.....	10
TRATAMIENTOS Y ESTUDIOS SOBRE DROGAS ANTI GIARDIA.....	12
ACTIVIDAD METABOLICA DE LA GIARDIA.....	13
RESPIRACION.....	13
PRODUCTOS FINALES DEL METABOLISMO.....	14
ENZIMAS DE GIARDIA.....	15
ESTUDIOS DE VIABILIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD.....	16
SALES DE TETRAZOLIO.....	17
SALES DE TETRAZOLIO Y CADENA RESPIRATORIA.....	18
<u>CAPSICUM ANNUM</u>	20
<u>CASTELLA TORTUOSA</u>	20
<u>CUPRESUS SEMPERVIRENS</u>	23
<u>HEMATOXILON CAMPECHANUM</u>	24
<u>JUSTICIA SPICIGERA</u>	25
<u>LIPIA BERIANDIERI</u>	26
<u>MANGIFERA INDICA</u>	27
<u>ORIZA SATIVA</u>	28

TITULO	PAG
<u>PERSEA AMERICANA</u>	29
<u>PLANTAGO MAJOR</u>	31
<u>PROSOPIS JULIFLORA</u>	32
<u>PSIDIUM GUAJAVA</u>	33
<u>PUNICA GRANATUS</u>	35
<u>RIZOPHORA MANGLE</u>	37
OBJETIVO.....	38
HIPOTESIS.....	38
METODOLOGIA.....	39
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45
RESULTADOS.....	47
DISCUSION.....	68
CONCLUSIONES.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	76

RESUMEN

Estudio *in vitro* del efecto anti*giardiasico* de catorce especies de plantas mexicanas.

Laboratorio de Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría.

Existe la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de la *giardiasis* debido a que están surgiendo cepas que son resistentes a los tratamientos convencionales y además éstos provocan reacciones secundarias indeseables; por lo que se estudio *in vitro*, el efecto anti*giardiásico* de catorce plantas con actividad anti*diarreica* y/o anti*parasitaria* y para determinar la susceptibilidad a los extractos, se uso la técnica colorimétrica, que se basa en la reducción de la sal de tetrazolio (MTD) a formazán por células vivas.

Se trabajó 1.5×10^6 trofozoitos de *Giardia duodenalis*, como grupo control se usó: a) - trofozoitos muertos por frío/calor b).- vivos c).- un grupo con las sales de un fármaco comercial. El grupo experimental los constituyeron los extractos de las plantas a estudiar.

Se encontró que los extractos de cinco plantas no presentaron diferencias significativas respecto al control de los trofozoitos vivos (D O = 0.65); por otra parte, los extractos de *Justicia spicigera*; *Lippia berlandieri*; *Psidium guajava*; *Punica granatus*; *Mangifera indica*; *Plantago major*; *cupressus sempervirens*; *Castella* *tortuosa* y *Hematoxilon campechanum* presentaron efectos anti*giardiasicos* con un rango de mortalidad desde 91.082 al 76.289 %; en tanto que la actividad de Tinidazol fue del 77.12 % respecto a los trofozoitos muertos por el calor.

Se demostró que nueve de las especies tienen actividad anti-giardíaca, por lo que consideramos que es necesario aislar los principios activos de cada especie.

INTRODUCCION

A lo largo del desarrollo de las culturas humanas, la relación entre el hombre y el reino plantas ha sido de importancia vital. Después de las plantas alimenticias, para la construcción y vestimenta las plantas medicinales ocupan un lugar relevante ya que de estas se ha generado conocimientos específicos y de gran importancia para nuestro país, dentro de un marco ecológico y social cambiante, para la creación de nuevas alternativas de salud.

El interés por conocer la flora medicinal se remonta desde los tiempos prehispánicos. En Coahuila se han encontrado restos de plantas con una antigüedad de 800 años, plantas que hasta la fecha se ocupan como ceremoniales, alucinógenas, y/o medicinales (1). El registro escrito más antiguo de América sobre plantas medicinales lo constituye el mal llamado codice Badiano de México, el cual fue escrito en náhuatl por Martín de la Cruz y traducido al latín por Juan Badiano en 1552 (2).

En la actualidad la literatura existente sobre la Farmacopea mexicana registra el total de 168 familias, 915 géneros y 2237 especies con un total de 5785 nombres vulgares, sumando a estas cifras la cantidad de trabajos dispersos que sobre las plantas medicinales se han realizado en diferentes partes de la republica se estima que hay aproximadamente 3000 especies registradas de las cuales no se ha estudiado ni un 10 % en el laboratorio (2,3). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 66.6 % de la población de países con escasos recursos económicos recurren a la medicina tradicional para curar enfermedades como catarros, diarreas y parasitosis (4).

Dentro de las parasitosis más frecuentes en la población se

encuentra la causada por el protozoo Giardia duodenalis que produce cuadros diarreicos, hiporexia , dolor abdominal posprandial inmediato y síndrome de mala absorción entre otros (5,6,7).

El cultivo de Giardia ha permitido realizar pruebas de sensibilidad a algunos antiparasitarios tales como el metronidazol, tinidazol y furazolidona, así como también detectar resistencia a estos. (8,9). Boreham, 1988; propone que algunas cepas de Giardia con actividad de la enzima piruvato ferredoxin oxidoreductasa insuficiente, presentaron resistencia al metronidazol, tinidazol, furazolidona y quinacrina. (10).

Por otra parte es importante señalar que el uso de estas drogas tienen efectos colaterales indeseables, irritación intestinal , mareos, somnolencia (11) y anemia hemolítica por el uso constante de quinacrina (12). Vooget, en 1974, reportó que los derivados del nitromidazol tienen acción mutagénica (13), Mitelman en 1976, encontró aberraciones cromosómicas en linfocitos de pacientes tratados con metronidazol. (14,15).

Debido a los problemas que implica la toxicidad de los fármacos a la selección de cepas resistentes y al problema que representa la inaccesibilidad de cura para la población rural y de escasos recursos, en nuestro país es necesario implementar estudios que nos permitan encontrar nuevos agentes para tratar la giardiasis.

Se han reportado varias metodologías para medir la viabilidad celular: asimilación de colorantes orgánicos, curvas de crecimiento e incorporación de elementos radioactivos, entre otros, algunos son costosos, requieren de mucho tiempo y otros son poco confiables.

Una forma sencilla barata y altamente sensible es la técnica

colorimétrica que se basa en la reducción de las sales de tetrazolio MTT (bromuro de 4, 5 dimetil tiazol 2, 5 difenil tetrazolio) a formazán por células viables.

Se propone ensayar el efecto anti-giardiasis de: Capsicum annum, L. Castella tormentosa, Liebm, Cupresus sempervirens, L., Hematoxilon campechanum; Justicia spicigera, S, Lipia beriandieri S, Mangifera indica, Criza nativa, Persea americana, M, Plantago major, Prosopis juliflora S, Psidium guajava, L, Punica granatus, y Rizophora mangle, que se usan como anti-diarreicos y/o antiparasitarios. (15-24).

ANTECEDENTES

Giardia fue descubierta por el científico holandés Antonio Van Leeuwenhoek, al que se le atribuye el descubrimiento del microscopio. Sus observaciones fueron escritas en cartas que envió a la Royal Society de Inglaterra, estas fueron traducidas al latín y al inglés y aun se conservan. (25-26)

Por más de dos centurias se le consideró a las giardias como comensales del intestino humano, recientemente, la acumulación de evidencias clínicas, epidemiológicas y anatomopatológicas tornaron en indiscutible su patogeneidad, lo cual despertó un inusitado interés por estudiar al parásito y a la enfermedad que produce. (27)

Giardia duodenalis (Giardia lamblia, G. intestinalis, G. enterica Lamblia intestinalis) pertenece a la familia Hexamitidae, orden Diplomonadida, Clase Zoomastigophora (7,25,28) los miembros de este género son considerados como los más evolucionados del orden. (28) Giardia duodenalis se caracteriza por su trofozoito piriforme de 5 a 7 micrómetros de ancho y 10 a 12 micrometros de longitud. Poseen cuerpos mediales en forma de coma dispuestos transversalmente en ocasiones puede ser único, su disco adhesivo comprende una porcion menos de la mitad de la dimensión total corporal. (29)

Este trofozoito se ha descrito en una amplia variedad de mamíferos, perros, gatos, conejos, ganado y en el hombre. (7,25,28,30)

La infección por Giardia duodenalis es de distribución cosmopolita pero con cifras de distribución muy variable, dependiendo de las condiciones sanitarias de cada región y del

nivel educativo de cada persona.(31). Estimaciones hechas por Martucelli a finales de la década de los setentas, supone que en la República Mexicana este parásito se encuentra en 23.7 % en los niños lactantes, 20.7 % en preescolares y 14.1 % en escolares (32)

En México el riesgo de contraer gardiasis es muy elevado (33) ya que se presenta actualmente en 20 y 40 % en la población del país (31). En el laboratorio de parasitología se reporta a Giardia como el parásito más frecuente en comparación con Entamoeba Histolitica y Tricomonas (34).

Esta infección se inicia por la ingestión de una cantidad entre 10 y 100 quistes maduros tetranucleados que comienzan su desenquistamiento en el estómago del hospedero a un pH ácido, los trofozoitos no toleran este pH, por lo que el proceso de desenquistamiento se completa en el duodeno una vez en el intestino delgado, el parásito se moviliza en el interior del quiste que se rompe por la parte posterior y emerge hacia atrás y completa su división por plasmotomía los dos organismos nuevos son morfológicamente similares pero son menor en tamaño, por medio de sus flagelos anteriores y posteriolaterales son propulidos a la superficie de las microvellosidades del duodeno y yeyuno a los cuales se les adhieren y mantienen unidos por su cara ventral en esa posición adquiere nutrientes a través de su cara dorsal por pinocitosis o absorción directa.(7,29)

Por razones desconocidas los parásitos se desprenden de la pared intestinal y son arrastrados por la corriente fecal cambiando de la fase de trofozoito a la fase quística, hay sugerencias de que el desprendimiento dispara el enquistamiento y que en ello tiene que ver la respuesta inmune del hospedero.(35).

Un paciente sintomático puede excretar hasta 300 millones de quistes por mililitro de materia fecal (36)

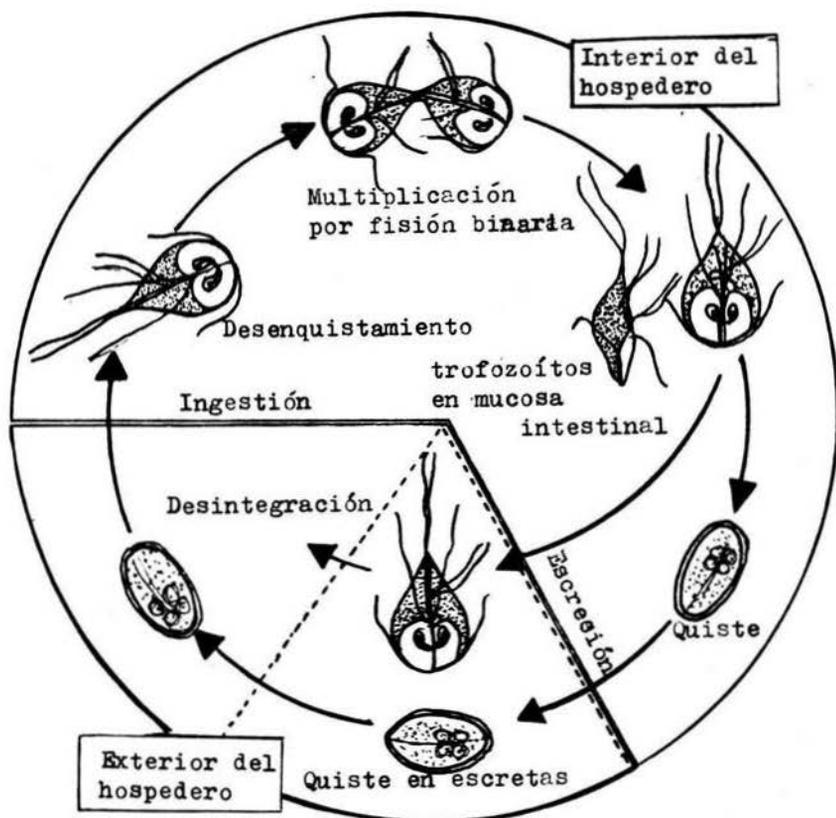


FIGURA 1. CICLO BIOLÓGICO DE GIARDIA DUODENALIS

Por lo que respecta al mecanismo de patogenicidad los más ampliamente aceptados son los siguientes:

EFFECTO DE BARRERA MECANICA. - se menciona que gran cantidad de Giardia duodenalis en el intestino provoca la formación de la barrera mecánica que impide la absorción de nutrientes. Mediante técnicas de microscopía electrónica se ha observado como el parásito se adhiere a las microvellosidades de las células epiteliales de la mucosa intestinal, interponiéndose entre las membranas de las células entéricas y los alimentos que se encuentran en el lumen del intestino (37,38).

Para algunos autores este mecanismo explica de manera razonable que la absorción intestinal; se vea afectada.

INVASION DE LA MUCOSA. - G. duodenalis invade las estructuras de la mucosa intestinal, sin presentarse reacción inflamatoria (38). Este hallazgo no ha sido confirmado por otros autores.

INFLAMACION DE LA MUCOSA. - este parásito es capaz de generar un proceso inflamatorio de la mucosa intestinal, localizada particularmente en las criptas que da lugar a la destrucción de las células epiteliales. En regiones determinadas la inflamación se acompaña de una infiltración de leucocitos, polimorfonucleares y eosinófilos, además de acortamiento de las vellosidades y alteraciones morfológicas irritables en estas al parecer son producidas por el disco succionario mediante el cual el parásito se adhiere a la mucosa (31,38,39)

PROLIFERACION DE LAS BACTERIAS. - este ha sido considerado factor contribuyente en el desarrollo del síndrome de mala absorción intestinal en algunos enfermos. Se considera que la

proliferación de las bacterias en el intestino delgado puede potencializar el efecto adverso del parásito sobre la mucosa alterando de manera sustancial la absorción. (40,41)

DESCONJUGACION DE LAS SALES BILIARES. - los estudios de Tandon en 1977, permiten explicar la razón por la cuál, en los enfermos de giardiasis que presentan una población cuantitativamente elevada manifiestan un síndrome de mala absorción intestinal. En estas personas se ha comprobado que hay un incremento en la concentración de sales biliales libres y por tanto la solubilización de las grasas se lleva a cabo deficientemente, además se ha sugerido que G duodenalis por si sola sea capaz de desconjugar las sales biliares (40,42, 43,45)

MANIFESTACIONES CLINICAS. - La infección por Giardia duodenalis presenta un aspecto clínico amplio, varía en severidad desde asintomática hasta pacientes con infección aguda y subaguda (44,45). En la infección aguda se señala que el periodo de incubación es de 1 a 3 semanas los síntomas encontrados con más frecuencia son diarrea, pérdida de peso, cólicos, heces de grasas, flatulencia, vómitos, eructos y fiebre. En dos tercios de los casos estos síntomas se presentan por una semana antes que el parásito aparezca identificado en las heces. (44)

Los síntomas de infección aguda pueden confundirse por los causados por las enterobacterias (45). En la infección aguda los pacientes tienen periodos intermitentes de evacuaciones flojas en la que se observa la presencia de grasas, también hay distensión abdominal. La enfermedad pasa gradualmente de etapa subaguda a crónica en ésta los periodos de diarrea son más frecuentes (31), finalmente se convierten en permanentes y hay una esteatorrea definida acompañada del síndrome de mala absorción, vómitos y fiebres. (31,46)

DIAGNOSIS.- esta se hace con la demostración de los quistes o trofozoitos en las excretas, en el contenido y en las paredes de duodeno.(47)

Los exámenes coproparasitológicos es la prueba más fácil y barata para evidenciar la infección por Giardia por desgracia su eficiencia es de 76 % para una sola muestra según algunos autores (48) y este porcentaje se aumenta a más de 90 % con la evaluación de tres muestras de días alternos.(47,48)

Existen otros métodos más confiables si los exámenes coproparasitológicos son repetidamente negativos estos son: la obtención de una muestra del contenido intestinal con una sonda nasogástrica y aspiración, la muestra debe ser examinada lo más rápidamente posible antes de la destrucción de los trofozoitos (48,49)

Otro método menos desagradable para la obtención del líquido duodenal, es la cápsula de Beal, que consiste en una cuerda de nylon unida con una cápsula de gelatina, el extremo libre de la cuerda se fija con tela adhesiva al ángulo del labio y la cápsula es ingerida, en tres o cuatro horas la cuerda logra alcanzar el yeyuno, entonces se retira y se exprime la cápsula con la mano enguantada, el líquido obtenido se observa al microscopio (50)

Cuando los otros métodos fallan la biopsia yuvenal ha demostrado ser eficiente para evidenciar los trofozoitos.(51,52)

Recientemente, se ha desarrollado ensayos inmunológicos entre ellos se incluye la inmunofluorescencia, radioinmuno, ensayos, y elisa (Enzima Linked Inmunosorbent Assay) todos estos nos permiten realizar estudios epidemiológicos mas completos (53,54)

TRATAMIENTO

Desde principios de siglo, un buen número de drogas son utilizadas en el tratamiento de la giardiasis, las drogas más empleadas son el metronidazol cuya toxicidad fue probada en perros a los que se les administró 75 mg/kg diarios, exhibiendo ataxia, rigidez muscular y temblores.(55)

Prolongada exposición de esta droga en monos incrementó la incidencia de tumores, en estudios separados hubo incremento de neoplasia linfocítica en animales femeninos.(56,57) En el humano a dosis de 10 ó 15 mg. diarios por kg. de peso durante 7 ó 10 días se reporta que causa náuseas, dolor de cabeza, vértigos, disuria, coluria, erupciones en la piel y leucopenia transitoria.(55,56)

Una dosis prolongada causa parestesia y neuropatías periféricas.,(58)

Recientemente se ha demostrado que causan alteraciones estructurales cromosómicas mediante el cultivo de linfocitos de pacientes que han recibido metronidazol en dosis terapéuticas elevadas y por tiempo prolongado.(59)

Tinidazol. 5-nitromidazol tiene la misma farmacodinámica que el metronidazol a excepción de mayores niveles plasmáticos y un tiempo de actividad de 13 horas., se considera anti-giardiasis por excelencia (60)

ACTIVIDAD METABOLICA DE LOS TROFOZOITOS DE GIARDIA

El tener un cultivo axénico de Giardia ha permitido obtenerla en cantidades suficientes para estudiar su metabolismo así como también la susceptibilidad a las drogas ya mencionadas (8,9) Aunque carece de mitocondrias y organelos, G. duodenalis es un eucariota típico cuyo contenido lisosomal da una reacción histoquímica positiva por fosfatasa ácida y puede acumular ferritina (61) Esta organización celular, se caracteriza por la ausencia de mitocondrias, esta también presente en Entamoeba sp y Tricomonadidos. (62,63)

Los carbohidratos y metabolismo energético de Giardia duodenalis fueron estudiados por Lindmark (64), Weindaich y col (65), Jarrol y Col (66)

Ha sido caracterizada como un anaerobio aerotolerante que toxida sustancias endógenas y exógenas (glucosa) no completamente a productos orgánicos finales (etanol, acetato) y CO₂, la energía es obtenida por el binomio sustrato-fosforilación; patrones similares existen en Entamoeba sp, Tricomonadidos y otros grupos anaerobios aerotolerantes. (67,68)

RESPIRACION

Lindmark demostró que Giardia lamblia presento una alta tasa de respiración endógena (93 + 10(50))moles O₂ de consumo/min/mg de proteína a 37°C la respiración es lineal en tiempo independiente de la concentración de O₂ entre el rango de 10-210 M de O₂ la respiración endógena es estimulada solo por la glucosa y no por otro carbohidrato, ácidos orgánicos o intermediarios del ciclo de Krebs, Weindaich y col (65) reporto la estimulación de la respiración por Etanol, Malato, NADH y NADPH.

El efecto de inhibidores de la respiración sugiere la ausencia de un ciclo funcional de Krebs y de un mediador de citocromos en la fosforilación oxidativa indicando la existencia de una vía glucolítica que involucra flavoproteínas en el transporte de electrones junto con la presencia de proteínas ricas en cisteína, las cuales forman complejos con hierro (complejos hierro-azufre). (64,65)

Su forma de vida presenta características aerobias y anaerobias, metaboliza glucosa a lactosa y O_2 con producción de ATP y consumo de oxígeno (64). Resiste más a estos elementos que las tricomonas y las amibas (67,68)

PRODUCTOS FINALES DEL METABOLISMO

Los trofozoitos de Giardia suspendidos en solución balanceada de sales, produce etanol y acetato utilizando como sustancia endógena a la glucosa (64). El dióxido de carbono, pero no el hidrógeno molecular es producido bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (N_2). Los estudios de ácido silico con C_{14} en cromatografía de columna apoya estos resultados (66). Bajo condiciones aeróbicas, la producción total de productos orgánicos finales fue duplicada significativamente con más acetato y menor producción de etanol (64). Los productos finales son producidos también por Entamoeba histolítica dentro de las mismas proporciones con más productos oxidados finales producidos tanto aeróbica como anaeróticamente. (69) Los patrones de producción de productos finales oxidados y reducidos aunque de diferente naturaleza también se presentan en tricomonádidos. (68)

ENZIMAS

Varias de las enzimas del metabolismo energético de Giardia han sido demostradas y caracterizadas por Lindmark (64) y se presentan en el siguiente cuadro:

ACTIVIDADES DE LAS ENZIMAS DE GIARDIA LAMBLIA

ENZIMA	pH OPTIMO	ACTIVIDAD U / % PROTEINA
AMILASAS		241-8
FRUCTUOSA-BIFOSFATO ALDOLASA		611-21
FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXILASA	8.2	211-5
MALATO DESHIDROGENASA (DE CARBOXILASA)	7.3	1281-31
PIRUVATO SINTETASA	7.5	1611-63
ACETIL COENZIMA SINTETASA		281-8
ALCOHOL DESHIDROGENASA		4611-35
NADPH OXIDOREDUCTASA	7.3	3121-25
NADPH DESHIDROGENASA	7.3	3181-326
NADH DESHIDROGENASA		2841-23
SUPEROXIDO DISMUTASA		24881-588
FOSFATASA ACIDA		771-15
MALATO DESHIDROGENASA	7.3	3211-52
PIRUVATO CINASA		1221-15

Las enzimas con límites bajos de detección son: citratosintetasa, isocitrato deshidrogenasa, fumato hidrolasa, lactato cinasa, fosfato acetiltransferasa, hidrogenasa y catalasa.(64)

LOCALIZACION DE LAS ENZIMAS

La localización de la actividad de las enzimas del metabolismo energético de Giardia lamblia fue hecha centrifugando homogeneizados osmóticamente protegidos y se concluye que las enzimas no son sedimentables (64), los resultados concuerdan con la evidencia morfológica en relación a la ausencia de organelos típicos del metabolismo energético y de carbohidratos con aparato de golgi y ribosomas. (69). Weindaich y Col reportan la naturaleza particulada de NADH y NADPH oxidasa.(65)

ESTUDIOS DE VIABILIDAD Y SUSCEPTIBILIDAD

Para determinar la susceptibilidad a las drogas se han implementado técnicas de viabilidad tales como la reportada por Jokipii en 1980 en la que por conteo directo de motilidad flagelar ante metronidazol y tinidazol, encuentra que Giardia presenta mayor susceptibilidad al tinidazol y menor al metronidazol. (60). Boreham en 1984 inicia estudios sobre nuevas pruebas para medir resistencia a drogas anti giardia logrando estandarizar la prueba de incorporación de timidina [H3] (70).

Gorts y col en 1985 emplea para el mismo fin de medio sólido TPS-1 complementando con los diferentes fármacos en este se observo ayudado por el microscopio invertido el crecimiento de Giardia (8). Siguiendo la trayectoria de los estudios de Boreham, para 1987 realizó pruebas de susceptibilidad al metronidazol, tinidazol, furazolidona y quinacrina en 13 aislados y 2 estándares, reportando que cada aislado tiene diferentes susceptibilidades (71) en 1988 menciona que la resistencia al

metronidazol se debe probablemente a la deficiencia de piruvato ferredoxin oxido reductasa o a defectos en el transporte mecánico a través de la membrana celular (10).

Para 1990, Upcroft y col hacen una revisión de los trabajos de Boreham concluyendo que la resistencia de Giardia al metronidazol se correlaciona negativamente con la concentración intracelular de la enzima piruvatoferrooxidin oxidoreductasa y a nivel molecular menciona que existe una asociación de la resistencia a cambios en el arreglo de las secuencias repetitivas de D.N.A. como se evidenció por la hibridación de sondas marcadas para dichas secuencias en sus experimentos (72).

SALES DE TETRAZOLIO

Las sales de tetrazolio son compuestos cuaternarios de amonio solubles en agua, que son convertidos por reducción a formazan son insolubles en agua, solubles en solventes orgánicos, no son auto-oxidables a causa de estas propiedades este grupo de compuestos ha sido empleado en la medición de agentes reductores y como aceptores de electrones sobre catalizadores enzimáticos (73).

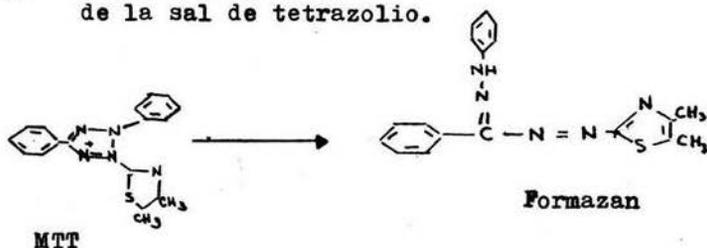
La producción de formazan insoluble por la reducción enzimática de sales de Tetrazolio ha sido extensamente empleada para la determinación histoquímica de la actividad de deshidrogenasas (74)

Sin embargo, otros autores concluyen que la deshidrogenasa esta parcialmente involucrada en la reducción de las sales de tetrazolio por células intactas y su actividad redox, probablemente esta relacionada a un sistema NAD (P)H oxidasa confinado a membrana celular. (75)

La tinción de tetrazolio es estable cuando se almacena a 4 °C por algunos días y conservada en frascos ambar. (75)

De las sales de tetrazolio más comunes, el nitrozul de tetrazolio (NBT) reacciona casi completamente en un sitio de la cadena respiratoria posiblemente a nivel de coenzima Q (COQ) (Ubiquinona), sin embargo el bromuro de 4.5 dimetil 2.5 difenil tetrazoim (MTT) parece reaccionar en dos sitios de igual importancia uno de los cuales es sensible a antimicina (este sitio es una región del citocromo C); el otro sitio de reducción es con una oxidasa. (76)

Fig II Estructura química de la sal de tetrazolio.



Otras sales de tetrazolio son: NT= clorhidrato de neotetrazolio; INT= clorhidrato de 2-nitrofenil-3 tiofenil-5-fenil- tetrazolio; TTC=clorhidrato de trifeniltetrazolio. Los sitios donde otras sales de tetrazolio reaccionan con elementos conocidos de la cadena terminal de transporte de electrones segun Slater y Col (76) están representados en el cuadro.

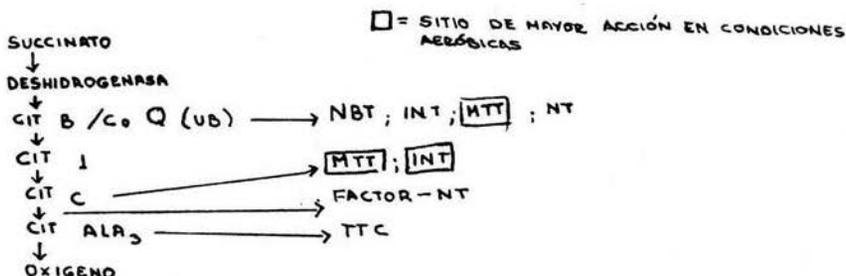


Fig III Puntos postulados de acción en la cadena respiratoria de cinco sales de Tetrazolio.

Entre las ventajas de las sales de tetrazolio es que han permitido desarrollar pruebas colorimétricas para medir viabilidad in vitro. Las sales de tetrazolio más empleadas en la actualidad es a base de MTT. Así se ha utilizado la medición de tetrazolio/formazan para evaluar la inhibición de la actividad de la deshidrogenasa por drogas quimioterápicas contra el cáncer (76). Otro empleo práctico en la determinación de colonias viables de células de mamífero dentro de un medio de cultivo en agar blando. Y para ensayar la medición de sensibilidad a drogas in vitro de células humanas en cultivos primarios.

Igualmente, MTT se ha utilizado para medición de viabilidad de células linfoides y su respuesta a linfocinas (78) con respecto a su utilidad en microorganismos recientemente Levitz y Diamond demostraron su utilidad para la medición de la viabilidad de diversos hongos como Aspergillus fumigatus, Rhizopus bryzaz, Candida albicans entre otros. Se fundamenta en que las células (79) vivas reducen el colorante y las muertas no, por lo tanto se ha demostrado que la magnitud de la reducción se haya en proporción directa al número de células vivas.

El ensayo con MTT detecta específicamente células vivas eliminando la necesidad de pasos adicionales en los lavados o bien en tinciones especiales como eosina o rojo neutro (80).

A pesar de la diversidad de fármacos aun no se dispone del indicado para erradicar la giardiasis por lo que, se hace evidente la necesidad de implementar soluciones basadas en una valoración de los recursos de nuestro país. En este sentido la medicina tradicional y la etnobotánica son las fuentes más importantes de los elementos para constituir una vía alternativa que México necesita dentro de este campo el lugar que la herbolaria medicinal, justifica que importantes esfuerzos de investigación

científica deban destinarse a su valoración. Así podemos mencionar los antecedentes que se tienen de algunas plantas que popularmente son conocidas con efecto antidiarreico y/o antiparasitario.

CAPSICUM ANNUM, (Pimiento)

Familia: Solanaceae

CARACTERISTICAS: planta herbácea anual, de tallo ramoso que alcanza alturas de 40-50 cm. hojas pecioladas, opuestas, ovoides, enteras, sinuosas en la base, lisas y de un matiz verde claro. Sus flores pequeñas, pedunculadas, solitarias de color blanco están distribuidas en las axilas foliares. Florea entre primavera y verano dando lugar a una baya hueca, lisa, cilíndrica, larga que termina en punta torcida, de color rojo brillante cuando está madura.

HABITAT: se cultiva en climas templados (81).

En México se cultiva en el Estado de Hidalgo (84).

OTROS NOMBRES: Pimiento de cayena y chilis (84)

USOS MEDICINALES: Antidiarreico, antifímico, antiinflamatorio, antineurálgico, antirreumático, carminativo, catártico, antidispepsia, emenagogo y eupeptico (22). La cocción del fruto en concentraciones de 60 g/l se dice que cura diarreas. (81,101)

ESTUDIOS: sobre su composición química el fruto contiene capsaina y vitamina C (81) se reporta además la presencia de diterpenos acíclicos, glicósidos de nombre capsanoide A-F (1-6) y I-V (7, 16 10, 9, 8) (83)

CASTELLA TORTUOSA, Liebm. (Chaparro amargoso) Familia: simaroubacea

CARACTERISTICAS: Es un arbusto leñoso de 1 a 2.5 m de altura, tallos y ramas armados de espinas alternas, de 5 a 6 cm de longitud de las que en ocasiones salen otras, laterales más

pequeñas , sus hojas son pequeñas de 8 a 15 cm de longitud, alternas, en grupos hasta de 4, con el borde doblado hacia el envés. Flores solitarias dioicas, las masculinas son rojas o anaranjadas con 8 estambres, las femeninas son de color morado rojizo, unas y otras tienen caliz de 4 sépalos y corola de 4 pétalos. El fruto es una drupa pequeña de 6 a 7 mm de longitud, de color rojo anaranjado. (84).

HABITAT: zonas desérticas y semidesérticas se encuentra en Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, San Luis Potosí, Puebla y Oaxaca.

SINONIMOS: se le conoce como amargoso, hierba de perro y palo amargo. (22)

USOS MEDICINALES: ramas y hojas se emplean para tratar la disenteria amibiana con cocciones de 60 g/l. (23,22,88,85,86)

ESTUDIOS: se encontraron tres glucósidos; castelina, castelagenina y castelamargina con los que preparan un medicamento al que llaman castamargina. Además contiene resinas, cera grasa, taninos, flavenos, saponinas, azúcar y material albuminoide (85,86,87).

ACCION FISIOLOGICA: Los resultados de la experimentacion en animales con un preparado inyectable conteniendo los tres glucósidos se resume así:

1. La dosis mínima letal para el cuyo fue sensiblemente 1 g/kg de peso por vía subcutánea.
2. Para el perro la dosis mínima mortal fue de 25 CET por kg de peso vía subcutánea y de 15 CTM por kg de peso por vía intravenosa.
3. Los principales efectos observados por la administración de la Castella tortuosa fueron:

- a) Disminución de los glóbulos rojos.
- b) Intensa congestión generalizada y de predominio venenoso
- c) Las dosis tóxicas determinó fenómenos de nefritis tubular y hepatitis congestiva aguda. (88)

CUPRESUS SEMPERVIRENS, (Cipres)

Familia: Cupresaceae

CARACTERISTICA: es un árbol que mide hasta 20 m de altura las ramas erguidas que forman una copa columnar hojas escamiformes, pequeños frutos globosos leño formado de 8 a 14 escamas peltadas. (81)

HABITAT: existe en casi todos los países de alturas superiores a 2000 m o mas suele cultivarse en parques y jardines como ornamentales. (81)

SINONIMOS: También se le conoce como cipres de los cementerios(22)

USOS MEDICINALES: la decocción de las hojas y ramas en una concentración de 50 g/l se emplea como antidiarreico, también tiene uso como antiséptico y tónico (18,81).

ESTUDIOS: se ha reportado la presencia de flavones (89) así como procianidina diméricas B1 y B5 y de oligoméricas, quercetinas, quercitrinas e isoquercitina (90).

HEMATOXILON CAMPECHANUM, (Palo de campeche)

Familia: Leguminosae

CARACTERISTICAS: es un árbol que llega a medir de 1 a 3 m de longitud, con numerosas venas finas paralelas, flores de olor no muy agradable, la madera dura tiene un olor característico, la madera por donde circula la savia es de color amarillento, en tanto la del centro es de color rojizo café que al ser expuesto al sol adquiere un tono rojizo intenso. (91)

HABITAT: lo encontramos distribuido en los estados de Chiapas, Campeche, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán. (22)

SINONIMOS: también se le conoce como catalajá, campeche, ek, palo tinto, entre otros. (22)

USOS MEDICINALES: es antidiarreico, antiséptico, astringente, cicatrizante y regenerativo, se dice que la corteza en 30 g/500 ml así como el tronco en la misma concentración en decocción elimina la diarrea. (91,93,94,100)

ESTUDIOS: Johnstone y col aislaron en 1953 etilgalato de la corteza de esta planta y la probaron en contra de Micobacterium tuberculosis observaron un efecto bactericida a concentraciones de 75 microgramos por mililitro ajustando a un pH de 6.4 (92), en composición principal sin fermentar es la hematoxilina de la cual contiene aproximadamente 10%, además resinas, quercetina e indicios de ácido úrico. (93). En general se observó por otros autores el efecto bactericida positivo en Salmonella typhy, Staphilococcus aureus , Streptococcus fecalis y Escherichia coli (94)

JUSTICIA SPICIGERA (schlechtend) Bailey. MUCILE

Familia: Acanthaceae

CARACTERISTICAS: árbol que mide de 1 a 1.5 m de altura, las ramas pubescentes o globosas, hojas pecioladas cortas, lanceoblongas, a ovales de 6 a 17 cm de longitud, flores agrupadas en cimas axiales o terminales corola de color rojo a anaranjado de 3 a 3.5 cm de longitud. (19)

HABITAT: en México la podemos encontrar en Chiapas, Guanajuato, Hidalgo, Edo de México, Michoacán, Oaxaca, Quintana Roo, Veracruz, Puebla y San Luis Potosí. (23)

SINONIMOS: anilillo, hierba azul, micle, mohuite, moitli, moyote entre otros. (23)

USOS MEDICINALES: contra aire, alferecia, anginas, antiparasitario, antiescarbiatico, fiebre, gonorrea, granos, hemorragia vaginal, mareos, piquetes de insecto, salpullido y tos. (22) El cocimiento de las hojas, ramas, tallos o de toda la planta funciona como antidiarreico. (23,131)

ESTUDIOS: se han aislado las siguientes sustancias, de las hojas Bis-ramnócido de conferol y canferitina con triamnósido canferol, (95) por otra parte se encontró que el extracto acuoso tiene efecto bactericida sobre cultivos de Shigella dysenteriae (24), en el pasado y actualmente las hojas son procesadas por tener un colorante de tono púrpura (similar al índigo) para teñir lana (88).

LIPIA BERIANDIERI Schauer (Orégano)

Familia: Verbenaceae

CARACTERISTICAS: es un arbusto que llega a medir de 1 a 2.5 m de alto las ramas presentan en general una pubescencia extendida, hojas pecioladas, ovales, obtusas o generalmente redondeadas en el ápice, redondeadas en la base, cabezuelas de 4 a 12 mm de longitud, flores de color blanco.

HABITAT: en México lo encontramos en Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Guanajuato, Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, (23) Sinaloa, San Luis Potosí, Tamaulipas y Zacatecas.

SINONIMOS: también se le conoce como hierba dulce y como salvia (23)

USOS MEDICINALES: contra amenorrea, angiocolitis, antidontálgico, antipalúdico, antiséptico, colecistitis, demulcente, enteritis, estimulante, sedante. (22,19,129,130)

ESTUDIOS: posee carvacinol, cimenol, eugenol, limoneno, linol y timol. (96) Otros estudios revelan un efecto bactericida del extracto de óregano en contra de Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Phytomonas campestris, Salmonella typhosa, Bacillus subtilis y Mycobacterium avium (91, 97)

MANGIFERA INDICA, (Mango)

Familia: Anacardiaceae

CARACTERISTICAS: árbol frutal ramoso que tiene altura de 20 a 25 m, hojas persistentes pecioladas, ovales largas y estrechas, lanceoladas elípticas, de matiz verde oscuro las mas viejas y ligeramente rojizas las jóvenes. Sus flores numerosas perpendiculares de color blanco rosado están reunidas en pequeños ramilletes terminales, su fruto es grande oblongo, redondeado pulposo, jugoso y comestible. (81)

HABITAT: la variedad manila se cultiva en Yucatan, Oaxaca, y Veracruz. (81)

SINONIMOS: mangotina, palo de mango. (22,81,100)

USOS MEDICINALES: se usa popularmente como antiparasitario, antidontálgico, antiescorbutico, como cura contra algunas enfermedades de transmisión sexual, catarros, dermatitis, se prepara en forma de cocción de las hojas, corteza y/o fruto. (22,81) Para reducir las fiebres se prepara la cocción de corteza de 30 g/l también se dice que tiene efecto purgante. Las hojas secas en cocción en dosis de 40 g/l de agua actúan contra las afecciones de la encia, piorrea y dolor de muelas. (81)

ESTUDIOS: se reporta su composición química, conteniendo taninos, resinas y ciertos ácidos. (81) además en el fruto, estudios a nivel de género señala que presenta: ácido galico, geraniol, ácido hidrocianfínico, limoneno, ácido oxálico, felandreno y ácido tánico. (17). Terpenos hidrocarbonados en un 62%, monoterpenos en un 54% y sesquiterpenos en un 14%. (98)

ORIZA SATIVA. (Arroz)

Familia: Gramineae

CARACTERISTICAS: planta anual herbacea de tallo simple y ramoso, que alcanza alturas de 60 a 80 cm., hojas lineales, planas lanceoladas envainadas, agudas, lisas y de matiz verde oscura. Sus flores son pequeñas y numerosas, de color blanquecino, fruto sillonado, envuelto por una gluma o cascara.

HABITAT: se cultiva en Veracruz, Tabasco, Morelos, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Sinaloa, Colima y Michoacán. (84)

SINONIMOS: no se conocen otros nombres.

USOS MEDICINALES: el arroz es la especie que bajo condiciones de cultivo han dado lugar a innumerables variedades, las cuales difieren en color, forma, tamaño y aroma; sin embargo se reporta que todas tienen uso medicinal común. Antidiarreico, contra abscesos, aftas, amigdalitis, carminativo, contusiones, dermatosis y enteritis. (22,17,96).

ESTUDIOS: a nivel de genero se reporta la composicion quimica conteniendo: lanina, colina, ácido citrico, ácido hidrocianico, ácido malico, maltosa, naftalina, ácido oxalico, ácido pantoteico, pectina y trigonelina. (17)

PERSEA AMERICANA Mill (Aguacate)

Familia: Lauraceae.

CARACTERISTICAS: árbol que mide 20 m de altura, con tronco de 60 cm de ancho, la corteza es de color gris claro, las hojas son ovales a elípticas que mide a lo largo de 10 a 30 cm y a lo ancho de 3.5 a 20 cm, agudas, obtusas y completamente pubescentes cuando son jóvenes. Las flores son de color verdusco y tienen un perianto de 5.5 a 7 mm de longitud, drupas en forma de pera, subglobosas con una amplia capa de pulpa aceitosa (100)

HABITAT : se cultiva en todos los estados de la Republica Mexicana (100)

SINONIMOS: aguacate oloroso, aguacachile, aguacate xinene, ahoacacuáhuatl, ahoxaquahuitl, cinene cupandra, paga, palta y tlatzan (22)

USOS MEDICINALES: facilita el parto, contra diarreas, manchas, antihelmítico, antitusivo, astringente, contra catarros, emenagogo, contra sustos, abscesos, aftas, anginas, antiescabiático, antineurálgico, antipalúdico, antiparasitario, antirreumático, antitumoral, catártico, cicatricial, regenerativo, contra contusiones, diaforetico, eupéptico, hemostático, resolutivo, aumenta la secreción espermática, se usa contra la sordera, tiña y como tónico capilar (19,22,26,100,101,131)

ESTUDIOS: se reportan estudios sobre su composición química los que se menciona que contiene diversos compuestos derivados de los ácidos grasos, aminoácidos, glucósidos, carotenoides, y aceites esenciales (102). Acido ascórbico y dehidroascórbico, estos dos últimos se encuentran en el fruto (103) además del ácido 4-O-B-glucósido que es metabolito conjugado del ácido dihidrofaseico, y sustancias antioxidantes como: l-epicatequina

en la cáscara del fruto (104). En otro estudio se encontró que el fruto además presenta citocromo-P-450 y P-cloroanilina. Acido hidroxinámico y protoantacidina glucosa, fructosa, sacarosa, manoheptulosa y triasilglicerosa (105) , hipoterosas, los extractos de la semilla tienen cierta actividad antibiótica sobre Basilus, Micrococcus, Escherichia, Salmonella, por otra parte tienen una acción tóxica por la presencia de saponina. Varias pruebas farmacológicas han sido llevadas a cabo con extractos acuosos y alcohólicos de las yemas foliares, tienen acción tóxica al ser inyectados intraperitonealmente, hay espasmos sobre el intestino aislado del cobayo y sobre el útero de rata también se observó fase de hipotensión. (106) Las yemas foliares tienen una acción anticancerígena en tumores transplantados de adenocarcinoma 755 (106)

El extracto acetonico de la semilla tiene acción antibiótica sobre E coli, pseudomonas, también tiene efecto fungicida en Penicillium camembersi (100)

Con los extremos de las hojas se demostró un efecto insecticida. Varios compuestos alifáticos se han aislado de la semilla principalmente los de la cadena larga son los que provocan el efecto bactericida estos son 1,2,4- Trihidroxi- N- Heptadeca- 16 ano. Los extractos son capaces de inhibir bacterias gram positivas en dosis de 4 mg/ml (100)

PLANTAGO MAJOR (Lanten)

Familia: Plantaginaceae

CARACTERISTICAS: hierba perene rizomática con la superficie globosa o algo pubescente, hojas arrosetadas, largamente pecioladas, con el limbo aovado, prominente venoso, mide de 6 a 15 cm de largo, las flores en densas espigas y frutos con 6 y hasta 30 semillas. (16)

HABITAT: se encuentra en los Estados de Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Quintana Roo, Tlaxcala y Veracruz.

SINONIMOS: lanté, llanté, planten, vitsuacua siptati (22)

USOS MEDICINALES: se usa popularmente para prevenir el aborto, angicolitis, comezon del ano, antihelmintico, antiinflamatorio, antipirético, antitusivo, astringente, desórdenes biliares, dolor de cabeza, principio de cancer, catarro, contusiones, diabetes, enfermedades del higado, llagas, dolores de muelas, infecciones del utero, enfermedades del pulmón y vejiga.

Se prepara en forma de cocción de las hojas, tallos, semillas, o de toda la planta. (22,23,131)

ESTUDIOS: a nivel de género se reporta su composición química: contiene ac. cítrico, histamina y saponinas. (17)

De las hojas de la especie se aislaron, catapitol, iridiodes, epigenina, lutenia, escuatelarina, nepetina, hispidulina, ac. cefálico, plantaquisidas, acubina, ac. geniposídico, secingina, ac. linoleico, linólico, mirístico, estearico y palmítico. En la semilla: ac. ascórbico, vitamina C, ac. dihidroascórbico, fenilpropanoides, asperulósidos, (107) N-N-diethilnitrosamida y N-N-dimetilnitrosamida.

Los estudios hechos por King-Li-Ping y Woo-Ping Soung en 1934 probaron el efecto diurético de la semilla en humano con resultados positivos. (108)

Arroyo, J. en 1963 reportó la inhibición del crecimiento de tumores como el carcinoma.<< Ehrlich>> gracias a esta planta.(109).

También se ha visto que tiene efectos inhibitorios en el crecimiento de Staphilococcus aureus. (110, 111)

Se ha demostrado en perros y humanos la propiedad antiulcerosa del extracto de la planta, se cree que las pectinas de este extracto protegen la zona dañada permitiendo la regeneración del epitelio. Otras sustancias, aún no identificadas tienen efecto evidente antiinflamatorio, evitan la secreción de los jugos gástricos, y reducen la actividad motora del estómago por lo que hay una reducción de los síntomas dispépsicos. (112)

PROSOPIS JULIFLORA . (SWARTZ) Mezquite Familia: Mimosaceae
CARACTERISTICAS: Arbusto que llega a medir 12 m. de altura con tronco de 1.2 m de diámetro, la corteza es delgada de color café negrusca, ligeramente fisurada, hojas aproximadamente 5-60mm de longitud, lineales oblongas, flores amarillas verdosas. Frutos generalmente de 10 a 20 centímetros de longitud y aproximadamente de 1 cm de ancho.

Madera dura leñosa de color rojo oscuro o café con madera amarilla por donde pasa la savia. (81)

HABITAT: Se encuentra distribuido en Chihuahua, Colima, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y San Luis Potosí. (23)

SINONIMOS: Algarroba, Biia, Chúcata, Huupa, Mezquitl, Taji y Mimi squitl. (23)

USOS MEDICINALES: Popularmente se reporta como antiemético, contra dolor de estómago, laringitis, gastritis, detiene menstruación, sirve como tónico, para limpieza de ojos, es además de uso antidiarréico, y contra la uretritis hemorrágica.

Se prepara en forma de cocción la corteza, tallo, la goma, la semilla y los brotes. Se administra en forma oral.

Las hojas corteza y raíz se preparan en forma de cocción 30 g/l de agua y se administra en forma oral, también se utiliza el fruto (19,22,96,131)

ESTUDIOS: Se reporta que en las hojas se encontraron alcaloides, cromófilos, lipófilos, indoles, juliflorina, julipresina, juliflorisina. El brote nuevo contiene heterósidos de Ac, elágico. (17)

La corteza presente taninos y heterósidos de gluconoles. En las raíces fueron detectadas nuevas flavonas. La juliflorina inhibe el crecimiento de bacterias gram positivas. (113)

Se probó in vitro el efecto bactericida contra E. coli, Bacillus subtilis, Stafilococcus aureus. (114)

El extracto etanol-Agua tuvo efecto antiespasmódico sobre el ileon de cobayo y como diurético en la rata. (104)

PSIDIUM GUAJAVA (Guayaba) Familia: Mirtaceae.

CARACTERISTICAS: Arbol de 8 m. de altura, el tronco mide 20 cm de ancho, corteza blanca amarillenta, hojas oblongas de 4-8 cm agudas y obtusas pubescentes y con nervios prominentes debajo, lobulos del caliz de 1-1.5 cm unidos en un botón, pétalos blancos de 1.5-2 cm, frutos globosos o piriformes, rosado o amarillos de 5 a 6 cm de diametro. (81,23,94)

SINONIMOS: Guabasim, jalocote, manzana calcooroti, palo de guayaba, picho pajosh, yaga-huii, entre otros. (22,23)

HABITAT: Se cultiva en America tropical, en Mexico en los estados de Chiapas, Colima Guerrero, Jalisco, Michoacan, Nayarit, San Luis Potosi, Tabasco, Veracruz y Yucatan. (23)

USOS MEDICINALES: Popularmente se usa como antiespasmódico, antihelmíntico, contra asma, diarreas, antiinflamatorio, antiilógico, contra gastritis, antihidrópico, obstrucción del bazo, sordera, vulneraria y como antitetánico (19,22,21,96,99,100)

ESTUDIOS: Se reportan sobre su composición química en el fruto gran cantidad de azúcares, minerales y vitaminas, como vitamina C pectina (62 a 72 %), ácido galacturónico (8 a 12 %), galactosa y arabinosa (4 a 5 %), citoquininas, zeatina, ribósido zeatina y nucleótidos zeatina. (115)

En las hojas cineol (eucaliptol) que tienen propiedades antisépticas, celulosa en 50%, proteína 2.9%, taninos 7.4%.

Taninos pirocentricos 2.9% y taninos pirogenicos en 4.25 %, fitosterol, ac. cratególico, ac. guajavólico, beta-sitosterol, carotenos, vitamina B1, B2 y C, niacina, entre otros derivados flavonicos: queratina, aviculina y gualjavenina. (115,116)

En la corteza se encontró: oxalato de calcio en un 30%, taninos 12%, polifenoles, amaritosina, leucocytarina, ac. luteico, ac. elágico y compuestos minerales.

Se menciona que los extractos de las hojas tienen efecto contra E. coli, Micobacterium thei, Pasteurella testis, Proteus mirabilis, Salmonella typhosa, Shigella dysenteriae, Staphilococcus aureus y Staphilococcus albus (117,118). Tiene además efecto fungicida ha sido estudiado sobre Ustilago iriticum y hordeii. (119)

PUNICA GRANATUS, (Granada)

Familia: Punicáciae

CARACTERISTICAS: árbol ramoso, espinoso y que alcanza alturas de 4 a 5 m, hojas caducas opuestas pecioladas verticiladas, lisas enteras, rojizas al principio y después de matiz verde claro y brillante. Sus flores de cáliz tubular, solitarias de color rojo escarlata y pendunculadas están reunidas de 3 a 5 en el extremo de la rama. Florece en verano dando lugar a un fruto bayoso, grueso, globoso, de corteza gruesa color amarillo y coronada con el cáliz. (81)

SINONIMOS: no se reportan sinónimos.

HABITAT: se cultiva en zonas tropicales.

USOS MEDICINALES: se usa popularmente como antiparasitario, astrigente, hemático, contra la estomatitis, refrescante, tenífugo y como vermífugo (22,98,99,100)

ESTUDIOS: se reportan estudios sobre su composición química, contienen alcaloides, peletierina, pseudopeletierina, metilsopeletierina, ácido tánico, resina, fécula, materias minerales y el alcaloide A-N-metilpiperidil-2-propano-B (120). En la raíz y ramas.: N-metilisopletierina (alcaloides derivados de la lisina). Estos alcaloides son menos abundante en el tronco contiene además materias tánicas (25%), glucosa, ácido cítrico, ácido málico en los granos del fruto (104). Aminoácidos esenciales valina y metionina en gran cantidad en el jugo del fruto (121), granatina, ácidos insaturados, conjugados entre ellos seis ácidos trienoicos isoméricos (122).

Flavonoides, polisacáridos, galactoninas en el fruto (123). El contenido de nitrógeno es alto en las hojas de edad media, el potasio en hojas jóvenes y el fierro en las viejas. el contenido de calcio aumenta con la edad y el de nitrógeno y potasio disminuye cuando la floración y la fructificación se lleva a cabo (124).

RIZOPHORA MANGLE, (Mangle rojo)

Familia: Rhizophoraceae

CARACTERISTIAS: árbol que llega a medir hasta 25 m de altura con un tronco que mide 1.2. m de diámetro en general de tallo pequeño, corteza delgada de color café grisáceo exteriormente y rojiza en el interior, hojas opuestas pecioladas, aovadas o elípticas, de 5 a 15 cm de longitud de color verde oscuro, estipuladas de 25 a 4 cm de longitud pétalos amarillos, de 7 a 8 mm de longitud estambres de 2.5 a 3.5 cm de longitud, las semillas suelen germinar en el fruto. (24)

SINONIMOS: candelilla, candelón, mangle dulce, mangle tinto, tabché xtabache (23).

HABITAT: se distribuye en zonas tropicales, en México lo encontramos en Campeche, Guerrero, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Yucatán y Veracruz. (23)

USOS MEDICINALES: se emplea popularmente contra angiocolitis, se considera como astringente, contra colecistitis, elefantiasis, lepra, como tónico antidiarreico, en forma de cocción de 5 a 10 g. en 150 ml de agua administrada oralmente (19,22,96,131).

ESTUDIOS: se reporta su composición química, conteniendo: grasas 0.73% , caucho huellas solamente, resinas ácidas 6.88%, ác. málico 0.09%, ác. tánico 6.77% glucosa 1.12%, cenizas 5.21%, celulosa 63.69%, humedad 9.77%. (126)

La corteza astringente de un 20 a 30% de taninos quienes le dan su propiedad astringente a estos taninos se les atribuye propiedades antimicrobianas pues extractos alcalinos de la corteza tuvieron efecto inhibitorio sobre Escherichia coli, Staphilococcus aureus (126) y Shigella disenteriae (24).

OBJETIVO

DETERMINAR IN VITRO EL EFECTO ANTIGIARDIASICO
DE 14 ESPECIES DE PLANTAS CON USO ETNOBOTANICO

HIPOTESIS

LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS Y EL
TINIDAZOL TIENEN EFECTO ANTIGIARDIASICO SIMILAR

METODOLOGIA

Los criterios de selección de las plantas utilizadas en el presente estudio fueron los siguientes:

1: Que popularmente las plantas fueran conocidas como antidiarreicos y/o antiparasitarios.

2: Que fueran de fácil adquisición en México.

3: No tuviera estudios sobre algún efecto en Giardia duodenalis.

Las plantas seleccionadas fueron adquiridas en el mercado de Sonora en la ciudad de México.

La clasificación científica de dichas plantas fue corroborada en el herbario de la E.N.E.P. Iztacala.

Los extractos fueron preparados respetando las siguientes condiciones; cantidad de planta, tiempo de cocción y volumen de solvente, en el presente estudio fue sustituida el agua como solvente por solución salina balanceada de Hank (SSBHD pH 7.2, sin rojo de fenol con el fin de mantener el pH óptimo para los trofozoitos en los diferentes ensayos.

PLANTAS SELECCIONADAS

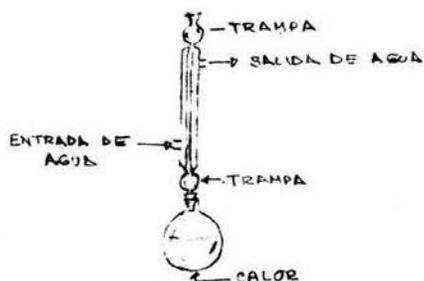
NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE POPULAR	CONCENTRACION EMPLEADA g/l
1. PROSOPIS JULIFLORA	MEZQUITE	60
2. RIZOPHORA MANGLE	MANGIE	60
3. LIPIA BERLANDIERI	OREGANO	30
4. PSIDIUM GUAJAVA	GUAYABO	40
5. JUSTICIA SPICIGERA	MUICLE	40
6. MANGIFERA INDICA	MANGO	40
7. PLANTAGO MAJOR	LANTEN	60
8. CASTELLA TORTUOSA	CHAPARRO AMARGOSO	60
9. HEMATOXILON CAPECHANUM	PALO DE CAMPECHE	50
10. CUPRESUS SEMPERVIRENS	CIPRES	50
11. PUNICA GRANATUS	GRANADO	30
12. CAPSICUM ANNUM	PINTENTO	60
13. PERSEA AMERICANA	AGUACATE	04
14. ORIZA SATIVA	ARROZ	20

SOLUCION SALINA BALANCEADA DE HANS SSBH

NaCL	-	8.0 g
KCl	-	0.4 g
MgSO4	-	0.1 g
MgCL2	-	0.1 g
CaCl2	-	0.14 g
GLUCOSA-	-	1.0 g
KH2PO4	-	0.06 g
NaHCO3	-	2.06 g
Na2HPO4-	-	0.06 g

Se ajustó a pH 7.2

Para evitar la pérdida de volumen durante la cocción fue empleado un sistema de reflujo. (fig 2)



Posteriormente fueron filtrados en la campana de flujo laminar con las membranas de 0.60, 0.45, 0.22 mm de malla. Con el fin de esterilizarlos y almacenados en frascos ambar a 4^o hasta su uso. (ver tabla 1)

A su vez, se prepararon las siguientes soluciones:

1. PBS Buffer Fosfatos.

NaCl - 6.5 g
K₂HPO₄ - 2.8 g
KH₂PO₄ - 0.4 g
H₂O - 1000 ml se ajustó a pH 7.2.

se esterilizó en autoclave.

2. Solución MTT

5 mg - MTT
1 ml - PBS

Solución PMS (Fenasin Fosfato)

2 mg - PMS
1 ml - PBS

esterilizados por filtración con membrana 0.22 mm y almacenados a 4°C hasta su uso.

CURVA DE CRECIMIENTO:

Los trofozoitos de Giardia duodenalis se cultivaron en el medio TYIS-33 complementados con 10% suero de bovino inactivado a 56°C por 30 min. (9)

MEDIO TYIS-33

GLUCOSA - 5 g
NaCl - 1 g
CISTEINA - 1 g
BILIS BOBINA- 500 mg
EXTRACTO DE LEVADURA - 10 g
KH₂PO₄ - 300 mg
Ac. ASCORBICO - 100 mg
CITRATO FERRICO - 15 mg
H₂O - 500 ml

y esterilizado por filtración.

Los tubos incubados a 37°C con monocapa de trofozoitos en las paredes del tubo fueron colocados en un baño a 4°C durante 30 min. para someterlos posteriormente a conteo con la cámara de Neubauer (Hemocitómetro).

Se resembraron para el tiempo cero 125,000 trofozoitos por milimetro y se realizaron conteos a las 17; 24, 41, 48, 65, 72, 89 y 96 horas de incubación.

Determinación de la viabilidad de los trofozoitos de Giardia duodenalis mediante la técnica colorimétrica. Los cultivos en fase logarítmica en baño a 4°C fueron centrifugados a 2000 r.p.m. por 5 minutos y posteriormente lavados con PBS y para determinar la viabilidad 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 y 3.0 $\times 10^6$ trofozoitos se les incubo con 10 μ l de MIT y 10 μ l de PMS, este último para reducir el tiempo de incubación que originalmente solo con el MIT en el diseño experimental era de 2 horas, después se centrifugaron a 2000 r.p.m. y fue eliminado el sobrenadante para extraer el formazán contenido en los trofozoitos se les agrego 1000 microlitros de isopropanol ácido 0.04 N, las concentraciones de color fueron leídas en un espectrofotómetro a 560 nm. Cabe citar que solamente las células vivas reducen las sales de tetrazolio de esta manera se conoce la relación de trofozoitos vivos y la concentración de colorante reducido (formazan) expresados en unidades de densidad óptica (D.O), como control se usaron los trofozoitos muertos mediante el siguiente procedimiento: los trofozoitos fueron congelados con nitrógeno líquido durante 10 segundos y posteriormente descongelados en baño maria a 80°C por 5 minutos, este procedimiento fue repetido en tres ocasiones para evitar cualquier reacción enzimática de los trofozoitos muertos y las sales de tetrazolio.

Posteriormente se sometieron los trofozoitos muertos a los pasos ya descritos para obtener las D.O.

Determinación del efecto del Tinidazol como anti giardiasico por la reducción del MIT.

Para determinar la susceptibilidad al tinidazol la concentración apropiada de trofozoitos (1.5×10^6) determinada en el ensayo anterior, se expusieron a 10, 20, 30, 40, 50, 100 y 200 microgramos por mililitro de tinidazol, se lavaron con PBS pH 7.2 y se les agregó 10 microlitros de MIT y 10 microlitros de PMS después de 30 minutos de incubación a 37°C se extrajo el colorante reducido (formazán) con isopropanol ácido y se leyeron en el espectrofotómetro a 560 nm. Como control positivo se usaron trofozoitos muertos por el procedimiento antes descrito.

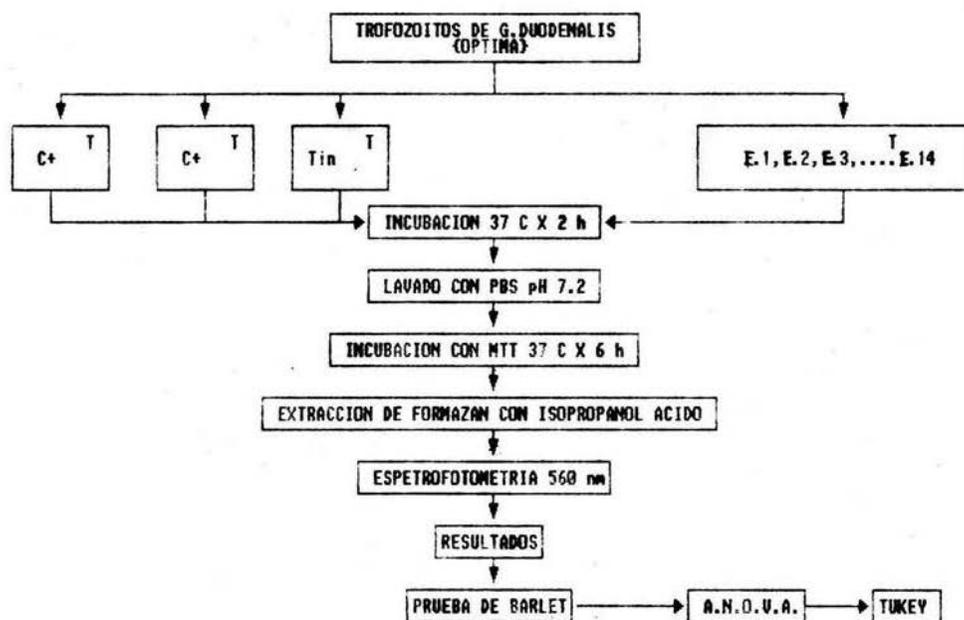
El porcentaje de trofozoitos muertos se calculó con la siguiente ecuación (79)

$$\% \text{ MUERTOS} = \frac{\text{D.O TROFOZOITOS CON TINIDAZOL}}{\text{D.O TROFOZOITOS SIN TINIDAZOL}} \times 100$$

Determinación del efecto anti giardiasico de 14 extractos por medio de la reducción del MIT.

Los procedimientos antes descritos se usaron para determinar el efecto anti giardiásico de cada uno de los extractos de las catorce plantas seleccionadas, la metodología se muestra en el siguiente diseño experimental.

DISEÑO EXPERIMENTAL



ABREVIATURAS

T : Trofozoitos de Giardia duodenalis.

C+ : Control positivo Trofozoitos vivos, sin tratamiento.

C- : Control negativo Trofozoitos muertos por calor/frío.

PBS : Solución salina fosfatos.

MTT yPMS : Sales de tetrasodio y catalizador.

560 nm: Longitud de onda expresada en nanómetros.

A.N.O.V.A: Análisis de varianza (127).

Prueba de Barlet : Estadístico anterior al A.N.O.V.A. prueba de homogeneidad de varianzas. (127)

Tukey : Prueba de estadístico posterior al A.N.O.V.A., para determinar cual o cuales pares de medias (X), son las que difieren significativamente de los grupos de controles.

RESULTADOS

CRECIMIENTO DE GIARDIA DUODENALIS

El seguimiento del comportamiento de la población de Giardia duodenalis aislado MM mostró una curva de tipo logístico ;

$$N = \frac{k}{1 + e^{-rt}}$$

N= No. DE INDIVIDUOS/UNIDAD DE VOLUMEN

k= DENSIDAD CELULAR MAXIMA

t= TASA DE CRECIMIENTO O TIEMPO DE GENERACION

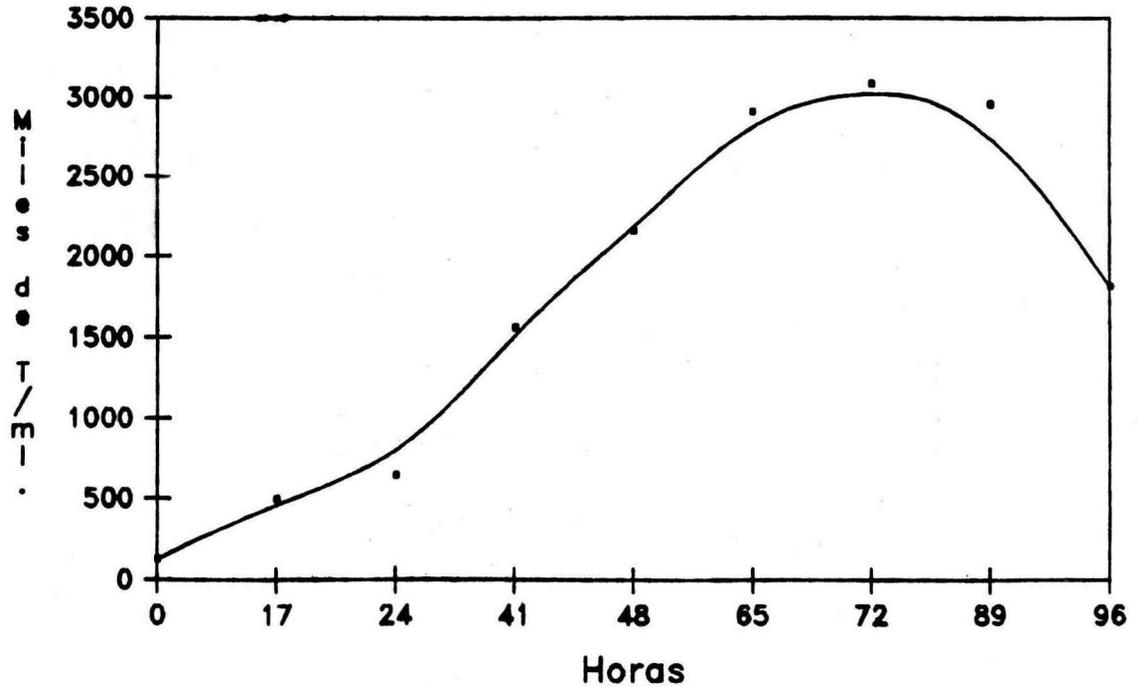
a= ORDENADA AL ORIGEN

r= PENDIENTE

encontrando un tiempo de duplicación de generación de 8 horas.

Todos los experimentos fueron realizados en tubos con población de Giardia cuando alcanzaron un tiempo de incubación de 72 horas.

Curva de crecimiento de *G. duodenalis* en medio de cultivo TYI-S-33, aislado MM.



GRAFICA I

Proyecto Giardia.
Laboratorio de Parasitología, I N P

VIABILIDAD DE LOS TROFOZOITOS

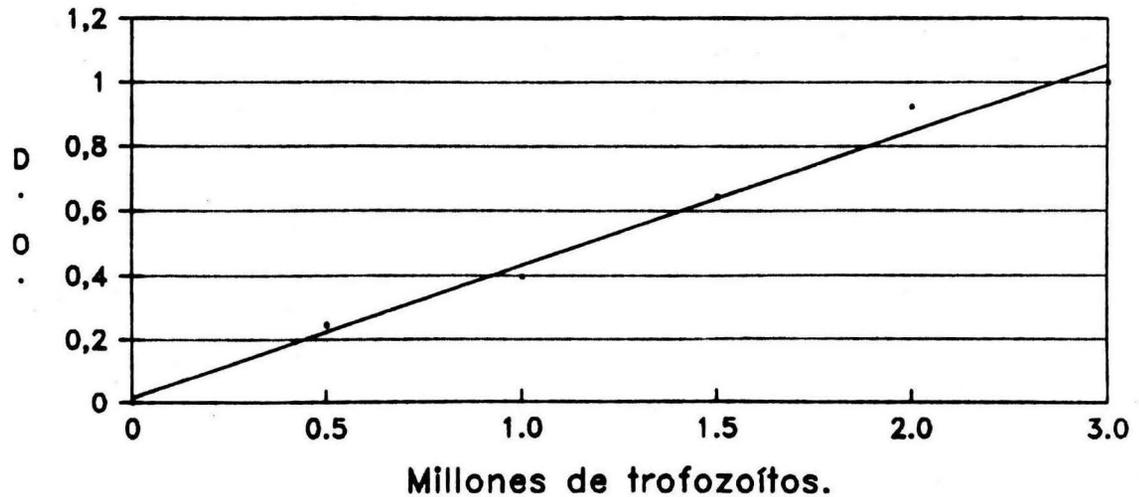
En esta parte del trabajo, se incubaron los trofozoitos de Giardia duodenalis con MTT y PMS encontrando que la adición de PMS Fenasin metazulfato reduce en gran medida el tiempo de reacción de 6 horas a 30 minutos.

Además se apreció que los trofozoitos vivos se tiñen intensamente de color morado y que contienen cristales de formazan en su interior. Se observó que los trofozoitos muertos por frío/calor tiene una ligera reacción ya que en todos los ensayos la densidad óptica en el control negativo (N-) fue de 0.05.

En la siguiente gráfica se observa la linealidad de los resultados.

En todos los experimentos se trabajó con 1.5×10^4 trofozoitos; esta cantidad se consideró óptima.

Determinación de la reducción de MTT
a sales de tetrazolio por trofozoítos
de *G. duodenalis*.



— [Formazán]

GRAFICA II

Laboratorio de Parasitología INP.
Proyecto: *Giardia*.

TABLA DE ANOVA PARA LOS RESULTADOS DE CRECIENTE CONCENTRACIONES DE TROFOZOITOS

(UNIDADES DE D.O. DENSIDADES OPTICAS)

FUENTE DE VARIANZA	G.L. GRADOS DE LIBERTAD	S.C. SUMA DE CUADRADOS	C.M. CUADRADOS MEDIOS	F
TRATAMIENTO	4	0.6724	3.287	F _c = 2.74
ERROR	26	12.4786	0.479	F _o = 6.862
TOTAL	29	13.151		

REGLA DE DECISION: $F_o > F_c$
 $\begin{matrix} 0.05 \\ 4,26 \end{matrix}$

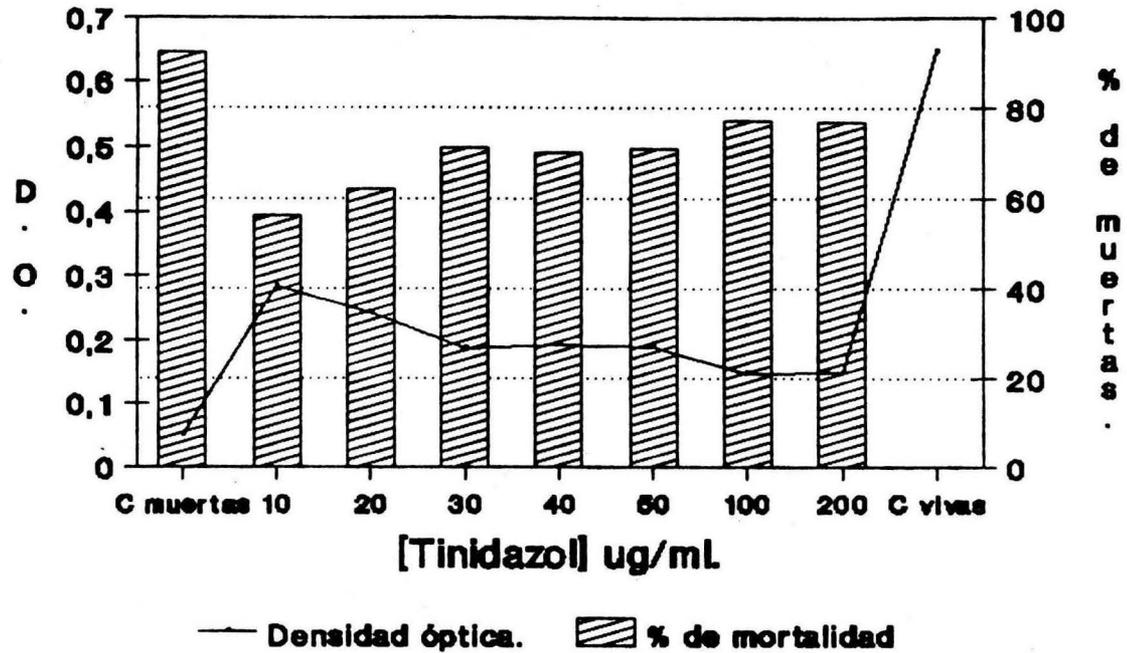
EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS, EN AL MENOS EN UN PAR DE MEDIAS DE LAS CONCENTRACIONES CRECIENTES DE TROFOZOITOS. SE EVIDENCIA QUE, ESTAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS SON CON RESPECTO AL GRUPO DE CONTROL NEGATIVO.

MORTALIDAD DE TROFOZOITOS DE GIARDIA DUODENALIS
CON CRECIENTES CONCENTRACIONES DE TINIDAZOL

La mortalidad de Giardia en las concentraciones de 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$ fueron las menores ya que solo se obtuvo 56.26 y 62.19% de trofozoitos muertos respectivamente.

También podemos apreciar que las concentraciones más efectivas fueron las de 100 y 200 mg/ml presentando 77.12 y 76.82% de mortalidad en el tiempo de incubación de 2 horas.

Mortalidad de trofozoítos de *Giardia* a distintas concentraciones de Tinidazol



GRAFICA III

Proyecto Giardia.
Laboratorio de Parasitología. I N P

**TABLA DE ANOVA PARA LOS RESULTADOS
OBTENIDOS CON LAS CONCENTRACIONES
CRECIENTES DE TINIDAZOL**

FUENTE DE VARIANZA	G.L. ₂ GRADOS DE LIBERTAD	S.C. SUMA DE CUADRADOS	C.M. CUADRADOS MEDIOS	F
DEBIDO AL TRATAMIENTO	8	1.795	0.224	$F_0 = 392.8$
DEBIDO AL ERROR	63	8.836	5.71×10^{-4}	$F_0 = \frac{8.85}{8.63} = 2.88$
TOTAL	71	1.831		

REGLA DE DECISION: $F_0 > F_c$ $\frac{8.85}{8.63}$ SE RECHAZA H_0 ES DECIR

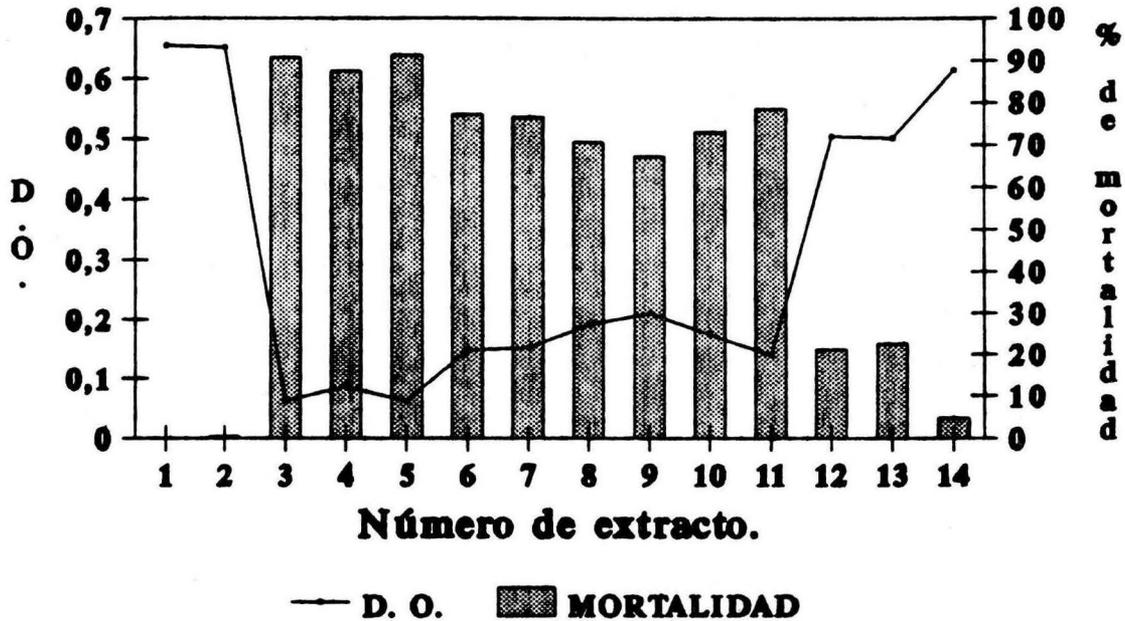
EXISTEN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS, DE LAS CONCENTRACIONES
CRECIENTES EN AL MENOS UN PAR DE ESTAS.
EN ESTE CASO TAMBIEN SE EVIDENCIA QUE, DICHAS CONCENTRACIONES
TIENE LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS, AL COMPARAR VISUALMENTE
ESTAS CON EL GRUPO CONTROL POSITIVO D.O. = $\times 8.665 = 8\%$ MORTA-
LIDAD.

COMPORTAMIENTO DE GIARDIA DUODENALIS ANTE LOS 14 EXTRACTOS DE PLANTAS

PLANTA	X DE LOS % DE MORTALIDAD	σ (exponente 10 ⁻³)
1. PROSOPIS JULIFLORA	0.00	8.9
2. RIZOPHORA MANGIE	0.46	8.9
* 3. LIPIA BERTANDIERI	90.52	8.9
* 4. PSIDIUM GUAJAVA	87.42	8.9
* 5. JUSTICIA SPISIGERA	91.08	8.9
* 6. MANGIFERA INDICA	77.17	8.9
* 7. PLANTAGO MAJOR	76.39	8.9
* 8. CASTELLA TORTUOS	70.49	9.5
* 9. HEMATOXILON CAMPECHANUM	67.29	8.9
* 10. CUPRESUS SEMPERVIRENS	72.89	9.5
* 11. PUNICA GRANATUS	78.41	8.9
12. CAPSICUM ANNUM	21.13	8.4
13. PERSEA AMERICANA	22.56	3.5
14. ORIZA SATIVA	4.66	8.9
CONTROL +	0.00	8.9
CONTROL -	93.64	9.1

* PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIGIARDIASICA
ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVA

Mortalidad de *G. duodenalis*. Extractos de catorce plantas



GRAFICA IV

Proyecto: *Giardia*
Laboratorio de Parasitología, INP 1992.

ESTADISTICOS

Las pruebas de Barlet aplicada a los datos de efecto de plantas indican que:

* Las varianzas son homogéneas ya que $X_0^2 = -9.44$ en tanto que $X_{0.05, 15}^2 = 25$ siendo éste último valor mayor al calculado no se rechaza H_0 .

El siguiente paso fue realizar tres análisis de varianza, uno para considerar la comparación de varianzas con el grupo de tinidazol, el segundo con el control + (Giardias vivas) y el tercero con el control - (giardias muertas)

A continuación presentaremos las tablas de A.N.O.V.A. :

RESULTADOS DE ANOVA CONSIDERANDO AL GRUPO CONTROL +

(TROFOZOITOS VIVOS)

FUENTE DE VARIANZA	G.L. GRADOS DE LIBERTAD	S.C. SUMA DE CUADRADOS	C.M. CUADRADOS MEDIOS	F
DEBIDO AL TRATAMIENTO	14	332332.2	23936.8	$F_0 = 24.5$
DEBIDO AL ERROR	136	132824.3	976.6	$F = \frac{0.05}{14,136} 1.76$
TOTAL	149	199507.9		

SE RECHAZA H_0 POR LO QUE SE DICE QUE EN AL MENOS
UN PAR DE MEDIAS TIENE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

RESULTADOS DE ANOVA CONSIDERANDO AL GRUPO CONTROL -

(TROFOZITOS MUERTOS)

FUENTE DE VARIANZA	G.L. GRADOS DE LIBERTAD	S.C. SUMA DE CUADRADOS	C.M. CUADRADOS MEDIOS	F
DEBIDO AL TRATAMIENTO	14	992570	28848.9	$F_0 = 18.43$
DEBIDO AL ERROR	136	266848.4	1520.9	$F = \frac{0.85}{14,136} = 1.76$
TOTAL	149	185732.6		

SE RECHAZA H_0 ES DECIR AL MENOS UN PAR DE MEDIAS
TIENE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

**TABLA DE ANOVA
CONSIDERANDO LOS GRUPOS CON TINIDAZOL**

FUENTE DE VARIANZA	G.L. GRADOS DE LIBERTAD	S.C. SUMA DE CUADRADOS	C.M. CUADRADOS MEDIOS	F
DEBIDO AL TRATAMIENTO	14	489733.4	29266.66	$F_0 = 17.00$
DEBIDO AL ERROR	136	200014.5	1710.3	$F_{0.05} = 1.179$ 14.136
TOTAL	149	176718.84		

SE RECHAZA H_0 AL MENOS EN UN PAR DE MEDIAS
TIENE DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.

Resultado DMSR al comparar los extractos con el grupo control (+) DMSR = 45.84

Resultado DMSR al comparar los extractos con el control (-) DMSR = 57.22

Resultado DMSR al comparar los extractos con el grupo Tinidazol DMSR = 60.73

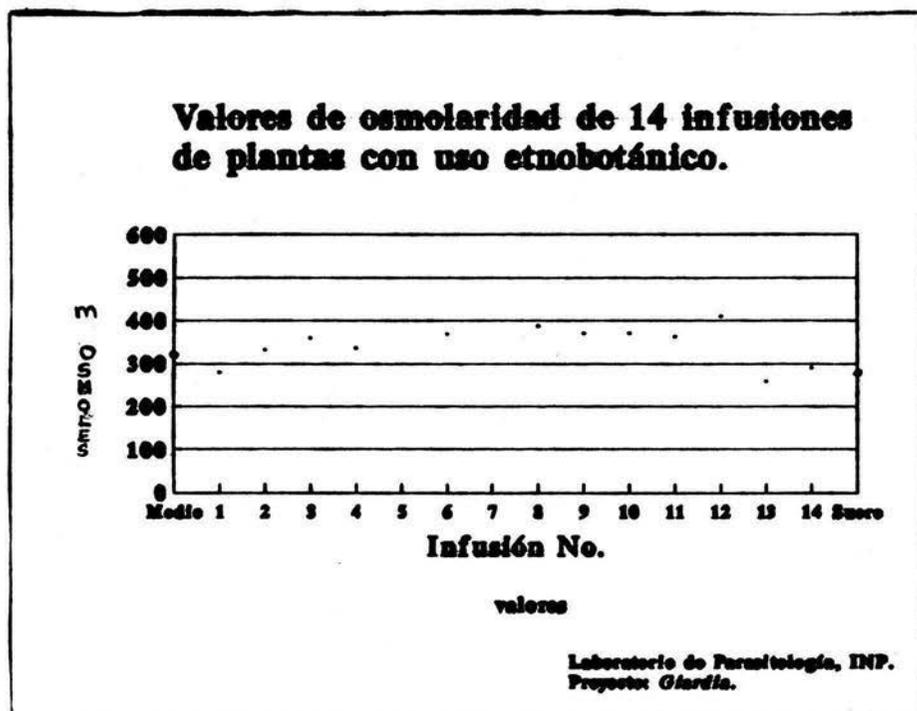
Al aplicar este estadístico (prueba de Tukey) se llega a la siguiente decisión:

Los extractos 9,8,10, 7, TIN, 11,6,4,3 y 5 tienen diferencias significativas con respecto a los controles, es decir si tienen efecto significativamente representativo sobre los trofozoitos de Giardia duodenalis aislado MM.

EXTRACTO.

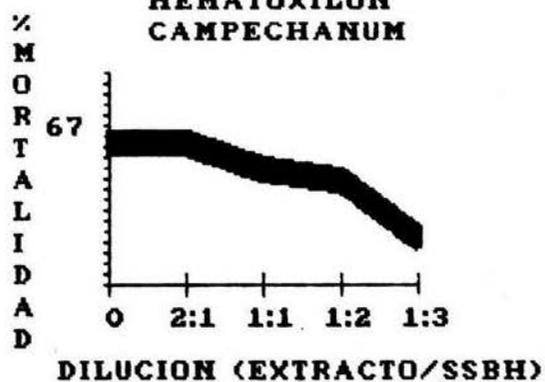
- 9 = HEMATOXILON CAMPECHANUM
- 8 = CASTELLA TORTUOSA
- 10 = CUPRESUS SEMPERVIRENS
- TIN = TINIDAZOL
- 11 = PUNICA GRANATUS
- 6 = MANGIFERA INDICA
- 4 = PSIDIUM GUAJAVA
- 3 = LIPIA BERLANDIERI
- 5 = JUSTICIA SPICIGERA
- 7 = PLANTAGO MAJOR

En la siguiente gráfica se presentan los valores de presiones osmóticas para cada extracto así como la del medio de cultivo y del suero humano. Todas las presiones oscilan entre los 300 millosmoles solo las de los extractos 5 y 7 que no fueron registradas por el osmómetro no se presentan.



Para descartar la posibilidad de efecto por presión osmótica, también se hicieron diluciones de los 9 extractos con actividad anti-giardiasia, los resultados se expresan en las gráficas, en las que se puede ver que Lippia berlandieri, Mangifera indica, Justicia spicigera y Hematoxylon campechanum pierden lentamente su efecto en dichas diluciones.

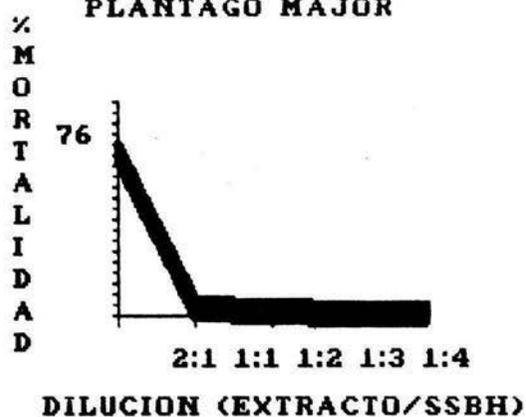
GRAFICA VI
HEMATOXILON
CAMPECHANUM



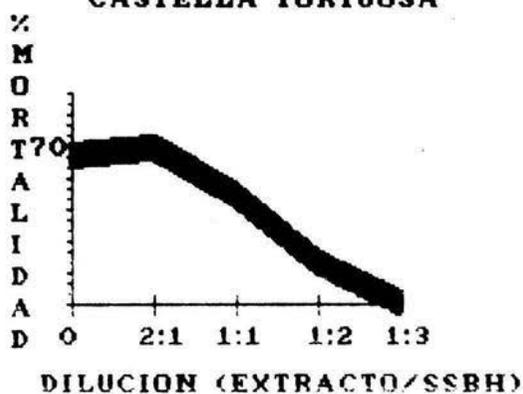
GRAFICA VII
PUNICA GRANATUS



GRAFICA VIII
PLANTIAGO MAJOR



GRAFICA IX
CASTELLA TORTUOSA



GRAFICA X
MANGIFERA INDICA



GRAFICA XI
JUSTICIA SPICIGERA



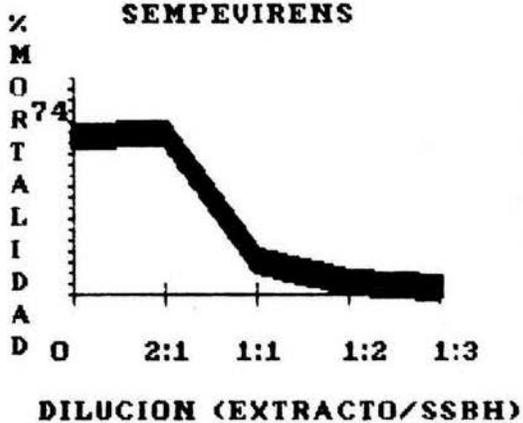
LIPIA BERIANDIERI
GRAFICA XII



GRAFICA XIII
PSIDIUM GUAJAJUA



GRAFICA XIU:
CUPRESUS
SEMPEVIRENS



DISCUSION

SAL DE TETRAZOLIO

El uso de las sales de MIT constituye un metodo nuevo, rápido, sensible cuantitativo, reproducible y barato para la determinación de la viabilidad de trofozoitos de Giardia duodenalis. Los trofozoitos vivos metabólicamente activos, reducen la sal MIT color amarillo al derivado formazan color morado.

Al observar en el microscopio invertido los trofozoitos incubados con la sal se aprecia una coloración intensa, cuando los trofozoitos están vivos, así como también la presencia de numerosos cristales de formazan dentro de dichas células, esto nos indica que la prueba de viabilidad con MIT puede ser útil para determinar este parámetro en forma individual para cada trofozoito.

El contar con una metodología de viabilidad de trofozoitos es importante ya que permite realizar numerosos estudios sobre susceptibilidad a diferentes compuestos naturales y sintéticos.

Las bases químicas y el sitio anatómico de reducción de MIT por los trofozoitos de Giardia no se ha estimado pero podría ser similar a lo que sucede en otras células eucariotas tanto de mamíferos como de plantas. " El contenido de deshidrogenasa mitocondrial rompería los anillos de las sales de Tetrazolio ".
(10)

Habiendo establecido que los trofozoitos viables producen formazán cuando son incubados con MIT, el siguiente paso fue determinar si existe una relación entre el número de trofozoitos viables y la cantidad de producción de formazán expresado en F.O. Se demostró que el método es sensible ya que permite detectar a un

pequeño número de trofozoitos viables de 0.5×10^6 y que existe una relación lineal entre el número de trofozoitos viables y el grado de reducción de la sal hasta 3.0×10^6 trofozoitos.

Se decidió trabajar con la concentración óptima de 1.5×10^6 ya que fue el punto intermedio de la recta formada.

Se aplicó un análisis de varianzas a los datos obtenidos, encontrando una F calculada mayor que la F de tablas por lo que se rechaza H_0 , es decir; al menos un par de concentraciones de trofozoitos tienen diferencias significativas. Es notorio que estas diferencias de D.O son con respecto al grupo control negativo (Trofozoitos muertos F D.O. = 0.05).

COMPORTAMIENTO DE GIARDIA DUODENALIS MM ANTE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TINIDAZOL

En todos los estudios donde se evalúa la potencia de productos farmacéuticos y/o naturales, debe existir un patrón que tenga el efecto que se espera. En el presente trabajo el patrón de comparación fué el tinidazol ya que se reporta a ésta como droga específica así como también con mayor actividad in vitro sobre trofozoitos de Giardia. (60).

Al observar los resultados obtenidos es evidente que las concentraciones de 100 y 200 microgramos/ml tienen el mayor efecto en solo dos horas de incubación.

Jokipii y col en 1980 reportan que con 50 microgramos/ml existe una mortalidad de 12% de su aislado, en 9 horas de incubación, (60). Al comparar estos datos con los obtenidos vemos que con 2 horas de incubación con el mismo fármaco en dosis de 50 microgramos/ml existe mayor mortalidad. Esto comprueba que, en realidad, existen diferentes susceptibilidades de Giardia a las diferentes tratamientos con Tinidazol in vitro, lo que probablemente explicaría que en muchos de los casos de giardiasis no sea eficiente esta y otras drogas.

El observar la diferencia en susceptibilidades hace que no se descarte la posibilidad de que Giardia desarrolle resistencia a las drogas comúnmente empleadas.

El análisis estadístico, de los resultados de esta fase del trabajo señalan una F calculada mayor que la F de la tablas por lo que al rechazar la H_0 decimos que, en al menos un par de

concentraciones hay diferencias significativas, si se observa la gráfica III se puede apreciar que en efecto, cada concentración de trofozoitos tienen diferentes densidades ópticas al compararlo con el grupo control positivo (giardias vivas)

COMPORTAMIENTO DE GIARDIA DUODENALIS MM ANTE LOS 14 EXTRACTOS DE LAS PLANTAS SELECCIONADAS

Giardia no presentó ninguna alteración al exponerla a los extractos de Prosopis juliflora, Rizophora mangle en tanto que Oriza sativa, Persea americana y Capsicum annum sólo tienen un ligero efecto menor al de 50% de mortalidad se considera a este valor como no significativo ya que la mínima mortalidad que existe no es mayor a la obtenida para la mínima concentración de Tinidazol (10 mg/ml, 56.26% de mortalidad).

El análisis estadístico reveló que los extractos de Hematoxilon campechanum, Castella tortuosa, Cupresus sempervirens, Psidium guajava, Plantago major, Mangifera indica, Punica granatus, Lipia berlandieri y Justicia spicigera, tienen diferencias significativas con respecto a los grupos Tinidazol, control positivo y control negativo.

Al observar, el efecto favorable de estos extractos sobre los trofozoitos de Giardia, surgió la duda ¿ La presión osmótica cambia ? y ¿ por esta razón los trofozoitos mueren ?. Esta suposición fue descartada con la medición de dichas presiones para cada uno de los extractos y el medio de cultivo. Se encontró que en efecto al oscilar los valores entre los 300 miliosmoles este factor no se altera de ninguna manera a los trofozoitos.

Así mismo, al realizar diluciones de los extractos con actividad anti-giardiasica descartamos aun mas la posibilidad de efecto por presion osmotica variable en los resultados obtenidos Lipia beriandieri, Psidium guajava, Justicia spicigera, Mangifera indica, Hematoxilon campechanum, conserva su actividad anti-giardiasica (>50% trofozoitos muertos), en la dilucion 1:2 y Lipia beriandieri hasta 1:4.

Esto nos indica que él o los compuestos con actividad anti-giardiasica contenidos en estas plantas sean de gran potencia o quizá se encuentren en mayor cantidad, siendo estas plantas, las más factibles para aislar principios activos.

No se debe descartar la posibilidad de que el efecto anti-giardiasico sea potencializado por una probable reaccion entre algún compuesto de la planta y alguna o algunas sales contenidas en la solución salina balanceada de Hans.

Algunas de estas plantas también son reportadas con efecto in vitro sobre Entamoeba histolitica, Shigella dysenteria, Shigella flexniers (Lipia beriandieri, Justicia spicigera, Plantago major y Hematoxilon campechanum) es agradable pensar que dentro de la composición química de estas plantas, exista un antimicrobiano eficaz no solo para Giardia duodenalis sino también para algún otro microorganismo causante de diarreas, resulta conveniente seguir experimentando el efecto de estas plantas sobre otros microorganismo que ocasionen síndrome diarreico, en este aspecto, no se debe descartar las plantas que no tuvieron efecto sobre Giardia. Hay que recordar que estas plantas son usadas popularmente contra diarreas y que la diarrea no necesariamente es de origen infeccioso por lo que también, sería importante diseñar experimentos en los que se simulara lo mas posible las condiciones intestinales y ver el efecto de estas plantas.

Extracto de Castella tortuosa que presentó una mortalidad de 70.49% también es reportada como antiambiático eficaz. En las primeras décadas de este siglo, confirmaron la acción de los glucosidos de dicha planta (23) es de suponer que estos mismos glucosidos sean los que tengan el efecto antiambiático.

La presencia de taninos en, Mangifera indica, H campechanum, Psidium guajava, Justicia spicigera y Cupressus sempervirens, así como también los aceites de Lipia beriandieri son compuestos de los cuales se derivan los fenoles que tiene elevada acción antimicrobiana al inactivar el sistema enzimático de bacterias (128, 24) algo similar puede ocurrir en los trofozoitos de Giardia.

Otro factor importante de mencionar es el posible efecto sobre la inhibición de la adhesión de los trofozoitos a las paredes del intestino, esta propiedad de Giardia es fundamental en el mecanismo de agresión en el hospedero.

Al no adherirse, los trofozoitos serían arrastrados junto con las heces a través del conducto intestinal eliminándose así el problema. El observar al microscopio invertido la evolución del efecto de los extractos sobre los trofozoitos nos sugiere lo anterior ya que en el caso específico de Psidium guajava los trofozoitos no se adhirieron a las paredes del portaobjetos escabado además de presentar un movimiento no usual en estos trofozoitos.

La propiedad astringente de los taninos (polifenoles) contenidos en estas plantas podrían evitar el contacto con la mucosa intestinal como consecuencia de la coagulación y unión de algunas partículas contenidas en el líquido intestinal (23) o bien por daños en la estructura de los trofozoitos a nivel del disco suctor.

Para confirmar esta hipótesis se necesita diseñar un estudio más amplio sobre el efecto de estas plantas.

Por último se debe mencionar que los conocimientos obtenidos en el presente trabajo son en gran medida parte del quehacer etnobotánico y que además la etnobotánica se encuentra en inmejorables condiciones de servir por un lado con un riquísimo apoyo de la investigación experimental y por otro en guiar un proceso de activación de sectores desatendidos por los programas sanitarios.

CONCLUSIONES

- ** Se demostró que la técnica colorimétrica con MIT (sal de tetrazolio) es sensible, rápida y permitirá seguir conociendo la susceptibilidad de otros aislados clínicos de paciente y monitorizar la aparición de resistencia a las drogas.
- ** Se encontró actividad anti-giardíasis en nueve de las catorce plantas estudiadas.
- ** El efecto anti-giardíasis fue, independiente de las presiones osmóticas, como lo sugieren las pruebas de dilución de los extractos.
- ** La actividad de los extractos mostró un efecto similar e incluso superior al de Tinidazol.
- ** Se considera, que es necesario aislar e identificar los principios activos de cada una de las plantas.

BIBLIOGRAFIA

1. Tomsom, D.M. y Willam, A.C. 1980 Guia práctica de plantas medicinales. Blume. Barcelona.
2. Martínez, Maximino. 1985. Jardín botánico de plantas medicinales. U.A.CH. México.
3. Estrada Lugo, E.T. 1984. Las plantas medicinales y los sistemas tropicales de curación del municipio Dr.Mora Guanajuato. Tesis. Biología. UNAM ENEPI.
4. Caballero. N. Javier. 1976 Perspectivas para el quehacer botánico en México. Simposio de Etnobotánica. UNAM Facultad de Ciencias.
5. Wolfe. M. S. 1984. Syntomatology diagnosis and tratamient giardiasis. Biology Pathogenesis and Epidemiology. Erlandsen S.L. Meyer, E. New York.
6. Bastien Cué, A. y Barragan Hernandez, B. 1970. Lambliasis importancia del problema y su tratamiento Revista Medica del I.S.S.S.T.E. 9(5) : 237-239.
7. Meyer E. A. y Jarrol, E. 1980 Giardiasis. J. Epidemiology. 3:1-12.
8. Gorts , B; Hemenihof, W. Asseiman, C. y Butzler, J. P. 1985. In vitro suseptivity ot 25 Giardia lamblia isolated of human origin to six commonly, used antiprozoal, agents, antymicrob agents chemiother. 28: 378-380.
9. Ponce Macotella Martha, Martinez Gordillo, M. y Alvarez Chacon, R.S. 1989 Excystation and culture of Giardia spp for human source. Arch Inv. Méd. (Méx) 20:123-127.

Falta página

N° 77

20. Esquivel Romero, E.A. 1989. Contribucion al conocimiento de la flora medicinal del poblado de Santa Catarina del Monte municipio de Texcoco. Tesis. Biol. U.N.A.M. E.N.E.P.I.
21. Volak, J. y Stodola. J. 1988. Plantas medicinales. Susaeta. España.
22. Diaz. J. 1976. Uso de las plantas medicinales de México monografia cientifica II. I.M.E.P.L.A.N. México.
23. Reyes, Mata y Valverde M.V. 1990. Convalidación de la información ednobotanica sobre cultivo axenico de Entamoeba Histolitica. CEPA HM-1IMSS. Tesis biol. U.N.A.M. E.N.E.P.I.
24. Gutierrez, Arroyo, Ignacio. 1989. Determinación del efecto antimicrobiano in vitro de 10 plantas de la subclase Dicotiledonea, utilizadas popularmente contra disenteria. (causada por Shigella Dysenteriae y Shigella flexnieri) Tesis Biol. U.N.A.M. E.N.E.P.I.
25. Boreham, P.F.L.; Upcroft, J.A. y Upcroft P. 1990 Chaning aproaches to the study of Giardia Epidemiology International Journal of Parasitology. 20 (4) : 479-489.
26. Rajfer. J. 1976 Antonio Van Leeuwenhoek (1632-1723) Of. Investigative Urology. 14:83.
27. Wilson, Annete. 1984. Giardia Misteriosa . Salvo Médica. Marzo
28. Owen R.L. 1984. Direct Fecal-Oral Transmission of Giardiasis. Biology Pathogenesis and Epidemiology. Eriandson, S.L. Nueva York.

29. Stave Héctor. 1983. Giardia y Giardiasis Infectologia 12:613 - 620.
30. Owen, R.L. 1980. The Ultrastructural Basis of Giardia Funcion. Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.74(21): 429-435.
31. Vega, Franco. L 1983. Absorción intestinal en niños con Giardiasis. Bol. Med. Hosp. Infantil de México. 40(11):598-603
32. Martuselli, A. 1968. Las Parasitosis más comunes en México Rev. Fac. Med. Méx. 10:21
33. González Saldaña, N. 1987. Infectología clínica pediátrica 4a. Edición TRILLAS. México.
34. Reporte del Laboratorio de Parasitología 1979.
35. Rentorff, R.C. 1954. The Experimental Transimission of Human Intestinal Protozoan Parasites. II Giardia lamblia CYSTS Given in Capsules. AM. J. HYG> 59:209-220.
36. Porter. A. 1976. An Enumerative Study of the Cysts de Giardia lamblia Intestinal in Human Dysenteric Faeces Lancet 1:1166 - 1169.
37. TAKano, J. and Yaroley, J.H. 1965 Jejunal Lesion in Partients with Giardiasisand Malabsortion an Electron. Microscope study. Bull Johns, Hopkins, Hosp. 116:413-429.

38. Anad B.S. 1985 Experimental Examination of the demargin of fecals of Giardia lamblia on intestinal mucosa suraping of nice Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene. 79:613-617

39. Brandborg, I.L. 1967 Histological demostration of mucosal invasion by Giardia lamblia in man, Gastroenterology. 52:43

40. Chavez, B. 1986. Estudio electrofisiologico y ultraestructura del efecto citopático de G. lamblia en células epiteriales en cultivo. Memorias del VIII Congreso Nacional de Parasitologia. 63.

41. Tomkins, A.W. 1978. Bacterian Colonization of Jejunal Mucosa in Giardiasis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene. 72:30

42. Hill, R.D. 1986. Giardia lamblia acture Methodo for determing parasite viability. Am.J. Trop. Med. Hig. 35(6):1129-1133.

43. Biagi, F. 1988. Enfermedades parasitarias 2a. Ed. La Prensa Médica Mexicana México.

44. Burke J.A. 1975. Giardiasis in Childhood. Am. J. Dischild. 129:1304-1310.

45. Tandon, B.N.; Tandon R.K.; Stapathy, B.K.; Shrinwas 1977 Mechanism of malabsortion in Giardiasis a study of bacterias flora and bile sait deconjugation in uper jejunum. Gut. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Higiene 18:176

46. Tay Lara y Velasco G. 1985. Parasitologia Médica. M.C. México.

47. Kumate J, Gutierrez C. 1980. Manual de infectologia 7a. Ed. Ediciones Medicas del Hosp. Inf. Méx. Dr. Federico Gomez. Mexico.
48. Veghelyi P.V. 1938. Giardiasis In Children. Am. J. Dis. Child. 56:1231
49. Danciger, M. y Lopez M. 1979. Numer of in the Feces of infected children. A.m.J. Trop. Med. Hyg. 24:237-242.
50. Kamathi, X. 1974. A comparative study of four methods for detecting Giardia lamblia in children diarrheal and malabsortion. Gastroenterology. 66:16-21
51. Stave, Héctor y Monroy Amalia. 1984. Giardia y Giardiasis infectologia 4(1):16-21
52. Bezjak, B. 1972. Evaluation of a new. Technic for asampling duodenal contents in parasitologic infections. Dig. Dis. 17: 848-850.
53. Craft, J.C. y Nelson, J.D. 1982. Diagnosis of Giardiasis by counter, immunoelectrophoresis of feces. J. of infectious disease. 145:499-504.
54. Ungar B.L.P.; Yocken, P.H.; Nasht, I.E. y Quinn T.C. 1984. Enzyme-Linked immunsorbent assay for the detection of Giardia lamblia in fecal specimens J. of infections disease. 149:90-97
55. Roe Francis. J.C. 1983. Toxicological evaluation of metronidazole with particular reference to carcinogenic, mutagenic and teratogenic potential. Surgery 1:158-164

55. Willson R.L. 1974. Acute drug and control. *Lancet* 1:810-811.
57. Ursing B, Kamme. 1975. Metronidazole for chronic disease. *Lancet*. 1:775-777.
58. Cella, P.C. 1969. Experimental studies on the tratology of metronidazole. *Rev. Pat. Clin* 24:529-537.
59. Howes, H.L. Lynch J.E.; Klulin, J.L. 1970. tinidazol a new protozoa. *Antimicrob agent chemother.* 69:261-266.
60. Jokipii. L , y Jokipii, M.M.A. 1980 in vitro suseptibility tinidazol. *The J. of infectuos disease.* 14(3): 317-325.
61. Bockman D.E. winborn W.W.1968 Electron Microscopy Localization of Exogenous Ferritin Vacuoles Giardia lamblia. *J. Protozool.* 15:26-30.
62. Lindmark D.G.; Muller M. 1973 Hidrogenosome, A Cytobiasmic organeile of the anaerobic fiagellate. Tricomonas Foetus *J. Biol. Chem.* 248:7724-7728.
63. Mayer E.A. 1976. Giardia lamblia isolation and axenic cultivation. *Exp. Parasitol.* 39:101-105.
64. Lindmark, D.G. 1980. Energy Metabolism of Anaerobic Protozoon, Giardia Lamblia. *Mol Biochem parasitol* 1:1-12
65. Weindaich. E.C.; Ciagget E.C.; keister D.B.; Diamond L.S. 1980 respiratory metabolism of Giardia lamblia. *J Parasitol* 66:347-350.

66. Jarrol E.L.; Muller P.J. ; Mayer S.A. 1981. Lipid and carbohydrate metabolism of Giardia lamblia. Mol Biochem parasitol 2:187-196.
67. Reeves R.E. 1972 Carbohydrate Metabolism of Entamoeba histolitica. Biochemistry of parasites. Academic Press. Nueva York.
68. Rylesy J.F. 1980. Studies on the metabolism of protozoa. V. Metabolism of the parasitic flagellate. Trochomonas foetus. International Journal for Parasitology. 5(3):496-502
69. Fried. D.S. 1960. The fine structure of Giardia muris J. Cell Biol. 29:317-331.
70. Boreham P.F.L.; Phillips R.E. y Shepher R.W. 1984. The sensitivity of Giardia intestinalis to drugs in vitro. J. of Antimicrobial Chemoterapy. 14:449-461.
71. Boreham P.F.L.; Phillisp R.E. y Shepher R.W. 1987. Heterogeneity in the responses of clones of Giardia intestinalis to anti-giardial drugs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 81:406-407.
72. Upcroft J.A.; Upcroft P; Boreham P.F.L. 1990. Drugs resistance in Giardia intestinalis. International Journal for Parasitology. 20(4): 489-496.
73. James Carmichae; De Graf G.W.; Gazdar A. 1987 Evaluation of a tetrazolio based semiautomated colorimetric assay assessment of radiosensitivity. Cancer research. 47:943-946.

74. Puck T.I. y Marcus P.I.A. 1975. Radio method of viable cel in tissue the use of x-irradiated cells to sopply conditioning factors. Proc. Natl. Acad. Sci. Una. 41:432-437.
75. Romero Zamora J.L. 1990. Empleo de la sal de MIT para determinación de viabilidad de Giardia lamblia y para estudios de susceptibilidad a agentes anti giardiásicos. Tesis maestria en ciencias medicas. Fac. de Medicina U.N.A.M.
76. Slater T.F.; Sawyer S. y Strauli, V. 1963. studies on succinate-tetrazolium reductasa systems III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochimbiophys. ACTA. 77:383.
77. Cote S.P.C. 1986. Rapid Chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay, Cancer Chemother Pharmacol. 17:257-268.
78. Green M.L.; Reade L.J. y Ware F.C. 1984 rapid colorimetric assay for cells viability growth inhibitory lymphokines Journal of Inmunological Methods 70:257-268.
79. Levitz, S.M. y Diamond D.R. 1985, Rapid colorimetric assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. The journal of infecttous diseases. 152(5):938-945.
80. Gerler, D. y Thomasset N. 1986. Use of MIT colorimetric assay to measure cel activity , J. of inmunological methods. 94:57-63.
81. Baudilio, J. 1975. Enciclopedia ilustrada de flora. Med. Toxica aromatica condimentica. A.E.D.O.S. España.

82. Hill, Aldert F. 1965. Botánica económica. Omega, Barcelona.
83. Izumitan Yokio, Sh and y Toshihiro N. 1990. Novel Acyclic diterpene glycosides; Capsianosides A-F and I-v from capsicum Annum. Biol abstr. (4):875.
84. Reades D. 1987. Galeria de plantas medicinales. Selecciones, México.
85. Geissman T.A. 1964. New substances of plants origin ann. Rev. Pharmacol 4:305-316.
86. De Carneri J. E.; Casinovi C.G. 1964. Potente antiamebico de origen vegetal L. Alantoine principio activo Alantus glandulosa. Parasitologia 4:305-316.
87. Gillin D.F. y Reiner S.P. 1982 in vitro activity of certain quassindio anti-tumor agent agains entamoeba histolitica. Arch. Invest. Med. 13(3):43-49.
88. Martinez Maximino. 1944. Las plantas medicinales de México. 3a. Ed. BOTAS. México.
89. Sheeja, M.J. Daniel, M y Sabmis, D. 1989. Chemosystematics of some conifere of indian Biol. Abst. 3:28-30.
90. Tisserat, N.A. y Nus, L.W. 1991. Variación in composition of the italian Cypress. Biol. Abst. 8:61-68
91. Barquin L.M. y Zamora M.L. 1991. Estudio etnobotanico de los municipios de Mineral del Monte y Mineral del Chico edo. de Hidalgo. Tesis Biol. I.P.N. E.N.C.B.

92. Johnstone D.; Donald B. y Murray W. 1953. Ethylgallate a mycobacterial-specific antibiotic isolated from Hematoxilom Campechanum. Biol. Abst. 27:11.
93. Burlington. 1953. An antibiotic proved to be et gallate(I) was extd from Hematoxilom campechanum. 47:1055.
94. Sánchez M. 1958. Brazilin antibacterial substance from Hematoxilom campechanum. Rev. Lat. Microbiol. 1:225-232.
95. Euler K.L. y Alan M. 1982. Isolation of Kaepfericrim from Justicia spicigera Chem. Abst. 1:3600.
96. Gonzales E. M. 1984. Las plantas medicinales de Durango. 1(2) C.I.D.I.R.-I.P.N. Cuaderno de investigación Técnica. México.
97. Antonescu V.L.; Summer J. 1983. Physico chemical study flavonoids from Oreganumm vulgare Chem. Abst 3:376.
98. Macledo J.A. y Gonzalez de troconnis N. 1982. Volatile flavour component of mango fruit phytochemistry. 2(10):2523-2526.
99. Museo de herbario de plantas medicinales subjefatura de investigación del IMSS. México.
- 100 Lozoya L.X. y Lozoya M. 1982. Flora medicinal de Mexico. Primera parte. Plantas indigenas del IMSS. México.
- 101 Espinoza Alvaro J. 1985. Plantas medicinales de la Huasteca Hidalguense. Tesis Biol. Fac. Ciencias.

102. Hirai N. y Koshimizu K. 1985. A new conjugate of Dihyord phaseic acid from avocado fruits. Chem. Abst. 92(210):386.
103. Halz F. y Fujino A. 1982. Automated photometric determination of ascorbic acid and dehidroascorbic acid (vitamina c) in food of plant origin part II. Determination of dehidroascorbic acid. Chem. Abst. 97(23):463.
104. Nose, M y Fujino, A. 1983. Antioxidant activities of some vegetables food and active component of avocado epicara. Chem Abst. 98(1):387.
105. Marchal J. y Bertin H. 1985. Change in certain phisico chemical characteristic of avocado after harvesting. Chem. Abst. 98(1):337.
106. Staat R.M.; D.L. sharon and Ron S.D.1980. Streptococcus mutants adherence, presumtive evidence from protein medated attactiment followed by giucan-dependient cellular acumulation. Biol. Abst. 70(3):172.
107. Endo T.; Taguchi I. 1981. The glucosides of Plantago major var. Juponica Nakari a new flavone glucoside, plantaguside. Chem. Abst. 95(11):312.
108. King-Li-Pin and Woo-Ping-Soung. 1934. Diuretic effect of the seeds of Plantago major L. var Asiatica. Chem. Abst. 30(35):530.
109. Arroyo J.J.N. and Rodriguez C. 1963. Cytostatic agents of plants and synthetic origin. Chem. Abst. 60(11):137.

110. Lambey, I.M.; Markoy y N. Pavlova. 1981. Study of the antiinflammatory and capillary retorative activity of a dispersed substances from Plantago major. Chem. Abst. 98(9):652.
111. Gorin A.G. 1964 Plantagucid New Ulcer Remedy from the Leaves of Plantago major. Chem. Abst. 18(21):17581.
112. Anonimo. 1965. Plantaglycitsio (Plantaglycidium). Nouye Lekarstvennye Sredstra Meditsina. Moscow. 8:118-129.
113. Ahmad V.V. 1978. New alkaloids from Prosopis juliflora. Naturforsch 338:347.
114. Le Grand A. y Wondergerm P. 1986. Actividades antimicrobianas de 10 especies medicinales caribes'. Seminario TRAMIL 2. Rep. Dominicana.
115. Guzzy A. MA. T. 1987. Etnobotanica de Psidium Guajava L. 'GUAYABA'. Tesis biologia. Fac. Ciencias U.N.A.M.
116. Macleod J.A. and Gonzalez de Troconis, N. 1982. Volatile Flavour components of guava. Phitochemistry 21(6):1339-1342.
117. Collier W.A. and Van De Pijl. 1949. Over antibiotische werking, special van hogere plante, met hyerb resultante BIJ indonesische plante. Biol. Abst. 24(3):6653.
118. Bushnell, O.A.; Mitsuno Fokuda and Takashi Makinoba. 1950. The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. Biol. Abst. 24(12):3460.

119. Misra, S.B. y Dixit S.N. 1979. Antifungal activity of leaf extracts of some higher plants. Med. y aromal plants. Chem. Abstract. 4(1):32.
120. Garcia. 1975. Flora medicinal de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales. Tomo II. Universidad Nacional de Bogotá. D.E. Colombia.
121. Seepi A. y A. Franciosi. 1980. Chemical composition of pomegranate juice Punica granatus, amino acid contents. Chem. Abst. 93(21):539.
122. Tulloch A.P. 1983. Carbon-13 N.M.R. Spectroscopic analysis of seed oil containin conjugated unisaturad acids. Biol. Abst. 75(10):7835.
123. Nakov, N.M.; Koleva, G.; Kitanov y Akhtordshiev. 1983. Analysis of the preparatiuon perigran, the raw material and its production intermediate III. Cuantitative determination of flavonoids. Chem Abst. 9898):362.
124. Munde, S.S.; V.K. Patil y S.D. Chavans. 1983. Chemical composition of pomegranate (Punica Granatus, L.) leaves sampied during different stages of crud. Chem. Abst. 97(21):443.
125. Standley C.P. 1961. Flora de Guatemala. Vol 24. Chicago Natural History Museum. Press Fieldiana. EEUU.
126. Smhn. 1987. La naturaleza. Sociedad Mexicana de Historia Natural. Primera Serie. Vol. VII. México.

127. Duran Díaz A. 1989. Manual de Técnicas Estadísticas U.N.A.M. E.N.E.P.I.
128. Norton T. 1920. Tanning materials from native source in Latin American Countries. Chem Abst. 14(6):1061.
129. Castro R.A.E. Estudio comparativo del conocimiento sobre plantas medicinales utilizadas para dos grupos Etnicos del Municipio de Pahuatlan, Puebla. Tesis Biología. UNAM. E.N.E.P.I.
130. Lopez V., Ma. E. 1988 Contribución a la Etnobotanica en plantas medicinales utilizadas por dos grupos etnicos del Municipio de Pantepec. Puebla. Tesis Biología. UNAM. E.N.E.P.I.
131. AMO R.S. del 1979. Plantas medicinales del Estado de Veracruz. I.N.I.R.E.B., Xalapa. Ver.