



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

BO 1270/96
Ej 1

EVALUACION *in vitro* DE LA ACTIVIDAD
AMEBICIDA DE COMPUESTOS OBTENIDOS DE
Buddleia cordata SOBRE VARIAS ESPECIES DE
Acanthamoeba, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*

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 :
CYNTHIA ORDAZ PICHARDO

ASESOR: M. EN C. SALVADOR RODRIGUEZ-ZARAGOZA



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

1993



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Vicky y Luis por el apoyo recibido durante mi carrera, la confianza brindada aun en los momentos difíciles y en especial por su cariño para el cual no existen palabras que expresen lo que ha significado en el transcurso de mis estudios, por esto y mucho más mil gracias.

A mis hermanos Yeshica y Luis por su compañía y comprensión cuando más los necesité.

De una manera muy especial a Salvador que siempre estuvo conmigo, gracias por tu apoyo y por tu gran paciencia, además de ser el mejor de los amigos.

A Guillermo, José Luis y Gabriel porque además de ser mis profesores, me ofrecieron una amistad incondicional y siempre me apoyaron en el laboratorio de Productos Naturales.

A todos mis amigos que de alguna forma siempre me estuvieron alentando para concluir este trabajo, en especial a ti Hugo por todo lo que me has enseñado.

A la maestra Graciela que me motivó para seguir con esta línea de investigación.

Parte del trabajo experimental de esta tesis se llevó a cabo en el Instituto de Química de la UNAM, bajo la co-dirección del Dr. Alfonso Romo de Vivar, con apoyo del proyecto IN204794 de la DGAPA y con una beca del SNI.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	2
RESUMEN	3
INTRODUCCION	4
Especies de <i>Acanthamoeba</i>	6
Características de <i>Buddleia cordata</i>	13
ANTECEDENTES	15
OBJETIVOS	19
METODOLOGIA	20
Recolecta y secado de la planta	20
Obtención de los extractos	22
Bioensayos	24
RESULTADOS	31
DISCUSION	42
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	46
APENDICE	52

ABREVIATURAS

AVA = Acido Vainillínico Acetilado

AVL = Amebas de Vida Libre

EAG = Encefalitis Amebiana Granulomatosa

LCR = Líquido Cefalorraquídeo

LD50 = Dosis Letal Media

MAP = Meningoencefalitis Amebiana Primaria

Medio NNE = Medio de Cultivo: Agar No Nutritivo + *Enterobacter aerogenes*
(muerta por calor)

MeOH = Metanol

MIC = Concentración Mínima Inhibitoria

SNC = Sistema Nervioso Central

SSN = Solución Salina de Neff

RESUMEN

Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* tienen importancia clínica porque algunas producen infecciones tales como la encefalitis amebiana granulomatosa y la queratitis amebiana. Por lo que es necesaria la búsqueda de fármacos capaces de eliminar a los agentes etiológicos y que sean de baja toxicidad para el hospedero. Para ésto, se hicieron bioensayos con los extractos acuoso y metanólico y algunos compuestos puros (linarina y ácido vainillínico acetilado) de *Buddleia cordata* (comúnmente conocida como tepozán) sobre 22 cepas de referencia de *Acanthamoeba*, 3 de *Hartmannella* y 4 de *Vahlkampfia*. Cabe mencionar que esta planta se usa para curar enfermedades epiteliales, gastrointestinales y oftálmicas. La actividad de los extractos no fueron significativos sobre las cepas de AVL probadas; de los compuestos puros la linarina tuvo un efecto amebostático en todas las cepas y el AVA un efecto amebicida en una cepa, efecto amebostático en 27 cepas y sin efecto en una cepa. La linarina daña aparentemente a los trofozoítos a partir de una concentración de 2 mg/ml y el AVA de 1 mg/ml. En el estado de quiste todas las cepas fueron resistentes a los extractos y a los compuestos.

INTRODUCCION

Los protozoarios pertenecen al reino protista, son un grupo heterogéneo formado por aproximadamente 50 000 especies unicelulares que poseen organelos rodeados por una membrana. Los podemos encontrar dondequiera que haya humedad: en el mar, en todo tipo de aguas dulces y en el suelo; hay especies comensales, mutualistas y muchas parásitas. Aunque casi todos viven como individuos solitarios, existen muchas formas coloniales que tienen tal grado de interdependencia celular que se aproximan a un verdadero nivel estructural pluricelular. Las especies coloniales o solitarias pueden ser móviles o sésiles. (Barnes R.D.,1992)

Un grupo importante dentro de los protozoarios son las amebas, las cuales pueden ser de vida libre, patógenas y no patógenas. Dentro de las parásitas obligadas *Entamoeba histolytica* es un microorganismo que se encuentra en el intestino grueso del hombre y que al extenderse por vía hematogena puede producir abscesos cerebrales; a diferencia de otros organismos comensales como *Entamoeba coli*, *Dientamoeba fragilis*, *Iodamoeba bütschlii* y *Endolimax nana*. En el caso de las amebas de vida libre (AVL), recientemente estas han generado un gran interés entre médicos y microbiólogos ya que varias especies de *Acanthamoeba*, pueden entrar por la piel o los ojos e invadir el sistema nervioso y llegar al cerebro, pudiendo causar una muerte rápida. (Jawetz et al.,1992)

Culbertson (1959) fue el primero en descubrir que algunas especies de AVL son patógenas para animales. Fowler y Carter (1965) aislaron *Naegleria fowleri* de líquido cefalorraquídeo (LCR) y reportaron el primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), una enfermedad que ataca el sistema nervioso central (SNC) y llega a ser fulminante para el hombre. Posteriormente se encontró que los organismos del género *Acanthamoeba* producen una enfermedad muy parecida a la MAP, a la que denominan encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) y en 1993, Visvesvara et al., descubrieron un nuevo microorganismo del género *Balamuthia* que también produce este tipo de enfermedad. Por otro lado, Nagington et al. (1974) describieron los primeros casos de queratitis producida por organismos del género *Acanthamoeba*, enfermedad que se ha ido incrementando principalmente en usuarios de lentes de contacto. Se han reportado pocos casos de enfermedades en tejidos, agallas y contenidos intestinales de peces (Kingston y Taylor, 1976) y de heces de caracol

(Taylor 1977), así como del tracto intestinal de reptiles (Franke y Mackiewicz, 1982) producidas por *Acanthamoeba* y *Hartmannella*. No se ha reportado el género *Naegleria* en animales. (John, 1993)

Las clasificaciones de las AVL constantemente se están modificando; anteriormente se utilizaban parámetros como son los morfológicos, la división nuclear, la tolerancia a la temperatura, el análisis de isoenzimas y grados de patogenicidad y en la actualidad se utilizan técnicas bioquímicas más específicas y sofisticadas. En la Tabla No. 1, se menciona de manera general la clasificación del reino protista, donde se incluyen a las AVL, ésta fue promulgada por la Sociedad de Protozoólogos en 1985. (Visvesvara, et al., 1990)

Nivel	Clasificación				
Reino	Protista				
Subreino	Protozoa				
Phylum	Sarcomastigophora				
Subphylum	Sarcodina				
Superclase	Rhizopoda				
Clase	Lobosea			Acarpomyxea	
Subclase	Gymnamoebia				
Orden	Amoebida		Schizopyrenida		Leptomyxida
Suborden	Acanthopodina	Tubulina			
Familia	Acanthamoebidae	Entamoebidae	Vahlkampfiidae	Hartmannellidae	Leptomyxidae
Género	Acanthamoeba	Entamoeba	Naegleria Vahlkampfia	Hartmannella	
Especies	<i>A. astronyxis</i> <i>A. castellanii</i> <i>A. comandoni</i> <i>A. griffini</i> <i>A. hatchetti</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. palestinensis</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. rhyodes</i> <i>A. spp.</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>N. fowleri</i> <i>N. gruberi</i> <i>N. jadini</i> <i>N. lovaniensis</i> <i>N. australiensis</i> <i>V. avara</i> <i>V. inornata</i>	<i>H. vermiformis</i>	<i>B. mandrillaris</i>

Tabla No. 1 Clasificación del reino Protista

Especies de *Acanthamoeba*

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* tiene únicamente dos estadios: el de trofozoito y el de quiste (Fig. No. 1). El tamaño del trofozoito varía en las diferentes especies (24-56 μm), se caracteriza por un núcleo simple y un largo cariosoma o endosoma. La motilidad de *Acanthamoeba* es lenta, forma espinas o pseudópodos filosos llamados acantópodos; se les puede observar una vacuola contráctil que se vacía y reaparece en 1-2 minutos y se desplazan en líneas rectas, ya que dejan surcos en las placas de agar. La división nuclear es metamitótica, durante ésta (cariocinesis) desaparece la membrana nuclear y la del nucleolo. Estos microorganismos se alimentan de bacterias como *Escherichia coli* y algunas especies de *Enterobacter*, así como de otros bacilos entéricos gram negativos.

El quiste consta de una doble pared, el ectoquiste que por lo general es arrugado y el endoquiste que es liso. El tamaño de los quistes varía de 13 a 20 μm en las diferentes especies. Los poros u ostiolas son visibles en ciertos intervalos de las paredes de los quistes, donde el ectoquiste tiene contacto directo con el endoquiste. El número de poros también varía en las diferentes especies, pues pueden tener de 3 hasta 7. Los quistes son muy resistentes al calor, al frío e incluso a varios agentes antimicrobianos; cuando el ambiente es favorable, las amebas exquistan hasta en 3 días.

Ahora, las especies patógenas y no patógenas son reconocidas como microorganismos comunes del suelo, del agua, del polvo, de los filtros de aire, de las heces humanas y de animales, así como en tejidos y órganos enfermos (Visvesvara et al., 1990).

Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG)

La EAG por lo general se presenta en personas enfermas, que se encuentran bajo terapias inmunodepresivas. Las enfermedades fundamentales que se reportan en EAG son la enfermedad de Hodgkin, sistema lupus eritematoso, diabetes mellitus, deficiencia G6PD, alcoholismo y SIDA entre otras. Sin embargo, no todos los enfermos son víctimas de la EAG por el hecho de estar

inmunocomprometidos o debilitados, ya que algunas veces se presenta en individuos completamente sanos (John, 1993).

Esta enfermedad no esta bien definida como la que produce *N. fowleri*. El curso de la infección en EAG es subaguda o crónica, puede durar de semanas a meses y en algunos casos hasta años. Se caracteriza por una lesión focal granulomatosa en el cerebro y su curso clínico es más prolongado.

La infección por *Acanthamoeba* ocurre a través del tracto respiratorio bajo o a través de úlceras en la piel o mucosas. La invasión al SNC es por vía hematogena y a partir de ésto se bloquean los canales linfáticos en el cerebro.

El periodo de incubación en la EAG no es conocido, pero probablemente sea de varias semanas o meses. Es característico un estado mental alterado, dolores de cabeza, parálisis y rigidez del cuello así como la presencia de náusea y vómito (Martínez J., 1987).

Martínez (1980) resume las características neuropatológicas de 15 pacientes con EAG, entre las que destacan: leptomeninges con exudados purulentos, hemisferios cerebrales con edemas y lesiones en la corda espinal.

La diagnosis se determina al analizar el LCR y el tejido cerebral, en el que se encuentran trofozoitos y/o quistes de *Acanthamoeba*. La identificación de especies puede hacerse indirectamente usando la técnica de anticuerpos por inmunofluorescencia. Las especies que con más frecuencia se encuentran en los casos de EAG son *A. castellanii* y *A. culbertsoni* (Martínez J., 1985).

En el caso de las infecciones producidas por *Acanthamoeba* hay reportes de tres personas que han logrado sobrevivir a diversos tratamientos. Un paciente (hombre de 30 años) del que se aisló e identificó *A. rhysodes* de su LCR, no se reestableció completamente por abandonar su tratamiento con sulfametazina (Cleland et al., 1982); un individuo de 40 años del que se aisló *A. culbertsoni* de su LCR, se recuperó con un tratamiento de penicilina y cloranfenicol (Lalitha et al., 1985) y una niña de 7 años, la cual logró recuperarse con un tratamiento de ketoconazol y de la que se cultivó *A. palestinensis* de una biopsia de su cerebro (Ofori-Kwakye et al., 1986).

Inicialmente se mostró que la sulfadiazina protege a ratones de la infección por *Acanthamoeba*. Sin embargo, el reporte no tuvo valor quimioterapéutico, ya que las amebas

comenzaron a recuperarse en el SNC (Culbertson et al., 1965). Posteriormente, estudios "in vitro" demostraron que *A. culbertsoni* es altamente sensible a polimixina E (0.02 µg/ml), sulfisoxazol (0.78 µg/ml), sulfadiazina (1.56 µg/ml), polimixina B (1.56 µg/ml) y a compuestos antipsicóticos como fenotiazina, dihidrocloruro de trifluoperazina e hidrocloreuro de clorpromazina. Algunos compuestos de fenotiazina también mostraron ser activos contra *A. polyphaga* (Schuster y Mandel, 1984). En estudios de laboratorio con ratones infectados por *A. culbertsoni*, la rifampicina demostró ser una completa protección para ellos luego de 24 hs (Das et al., 1991).

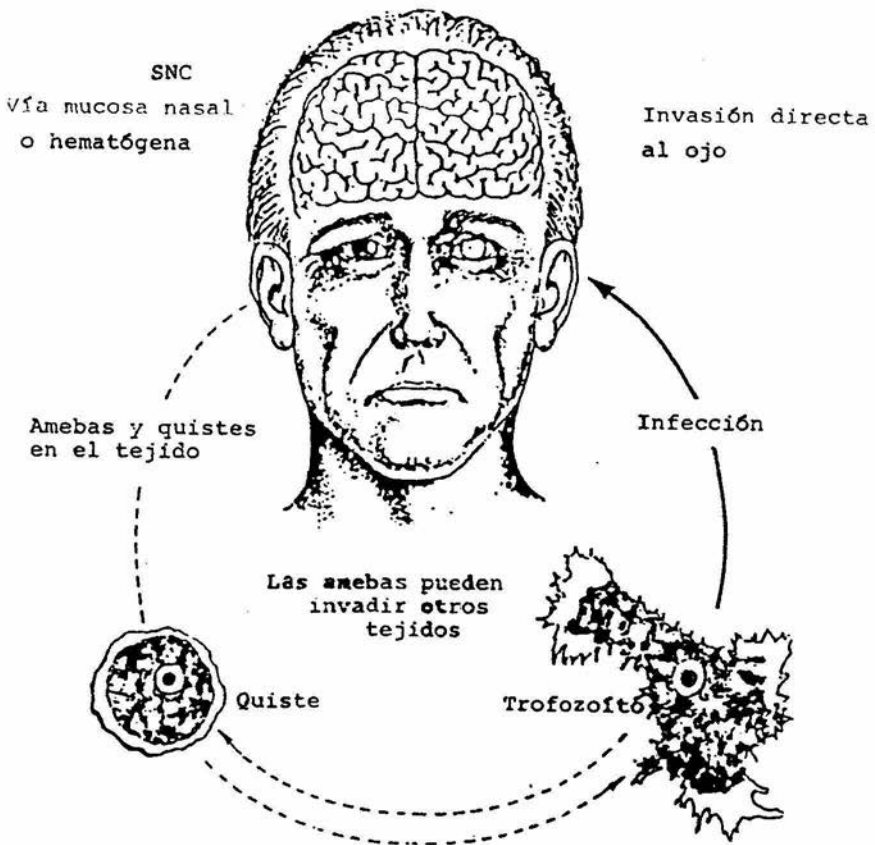


Fig. No. 1 Ciclo de vida de Acanthamoeba spp.
y su forma de infección

Queratitis por *Acanthamoeba*

Esta enfermedad es una infección crónica de la córnea causada por varias especies de *Acanthamoeba*. Desde que se diagnosticó esta enfermedad, el número de casos se ha ido incrementando exponencialmente (Stehr-Green et al., 1989).

La infección se establece por contacto directo de la ameba con la córnea, la ameba puede introducirse por algún trauma o por exposición a aguas contaminadas o lentes de contacto sucios. El manejo de los lentes de contacto y el uso de soluciones salinas hechas en casa son factores importantes de riesgo asociados a este tipo de enfermedad. Las soluciones salinas contaminadas con residuos lipídicos promueven el crecimiento de bacterias y levaduras, lo cual es una fuente de alimento para las amebas. Las amebas se adhieren a los lentes de contacto y se transfieren al ojo cuando los lentes son colocados sobre las córneas. Después comienzan a establecerse e invaden el estroma corneal por una rotura en el epitelio o cuando aún éste se encuentra intacto, produciendo una infección que progresa hasta convertirse en queratitis por *Acanthamoeba* (Fig. No. 2) (John et al., 1989).

Este padecimiento se desarrolla en un periodo de semanas a meses y se caracteriza por un dolor ocular, inflamación, disminución de la visión y una infiltración estromal que frecuentemente tiene una apariencia circular, además se pueden presentar ulceraciones crónicas progresivas. Durante la infección corneal temprana se pueden observar figuras pseudodendríticas en el epitelio o debajo de éste en el estroma anterior (Johns et al., 1987). En casos avanzados se puede observar una infiltración estromal marcada y necrosis, inflamación y aparentes ulceraciones. Las ulceraciones corneales pueden progresar hasta perforar el tejido (Lindquist et al., 1988). Las infecciones de queratitis producidas por *Acanthamoeba* son serias y si no son atendidas adecuadamente, pueden disminuir la visión y hasta se puede llegar a la pérdida del ojo (Key et al., 1980).

Las infecciones oculares producidas por *Acanthamoeba* también se han descrito junto con las de conjuntivitis (Nagington et al., 1974), iritis (Bos et al., 1981; Lund et al., 1978), escleritis (Mannis et al., 1986) y uveitis (Jones et al., 1975). Tanto los trofozoítos como los quistes de *Acanthamoeba* pueden infectar el tejido corneal..

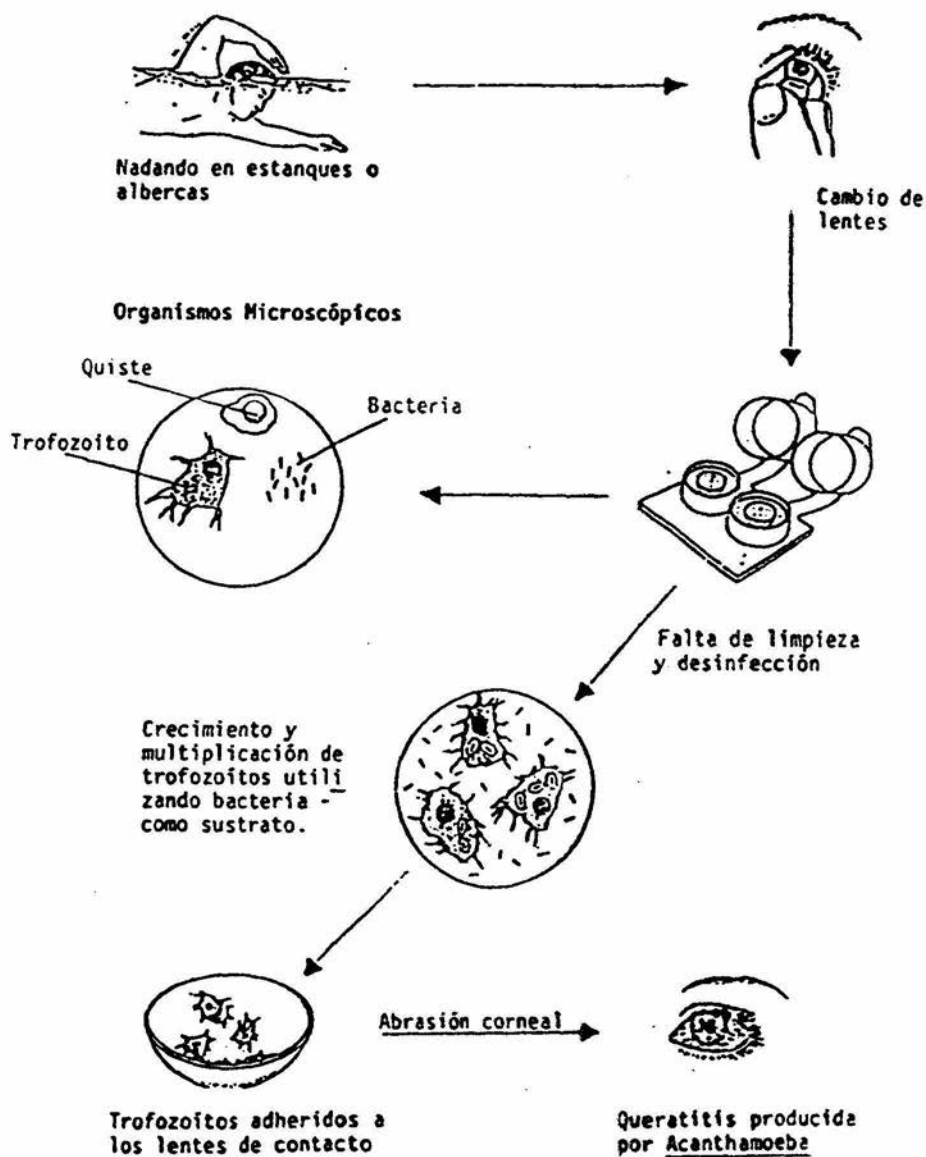


Fig. No. 2 QUERATITIS PRODUCIDA POR Acanthamoeba spp.
Forma de infección

La diagnosis de queratitis por *Acanthamoeba* se hace por identificación de la ameba en cultivos de raspados corneales o por examen histológico del tejido corneal infectado. El cultivo de materia corneal puede ser en Agar NNE a 30-37°C. También puede hacerse mediante tinciones de Giemsa. tinciones blancas con calcofluor y por inmunofluorescencia (Wilhelmus et al., 1986).

En cuanto a tratamientos, Wright et al. (1985), reportaron el primer caso de queratitis que fue curado, en el cual utilizaron una combinación de dibromopropamidina e isotionato de propamidina con gotas de neomicina. El éxito del régimen de este tratamiento fue probado por otros investigadores; sólo en un paciente se comprobó que dichos medicamentos le fueron tóxicos, por lo cual se le retiraron y la queratitis volvió a aparecer (Yeoh et al., 1987). Las enfermedades del SNC producidas por *Acanthamoeba* y *Naegleria* pueden ser estudiadas en ratones u otros animales de laboratorio, pero en el caso de la queratitis producida por *Acanthamoeba* no hay un modelo animal adecuado hasta el momento (John, 1993).

Como se ha mencionado, las infecciones por *Acanthamoeba* son difíciles de erradicar. El detectar el agente causal y el tratar de combatirlo es una tarea difícil, ya que en la actualidad no existen fármacos tan eficaces y que no sean dañinos para el paciente. En la queratitis se tiene que usar la combinación de fármacos que si bien no eliminan la enfermedad, por lo menos disminuyen los síntomas, la mayoría de estos fármacos son de origen sintético (John, 1993).

En la actualidad, una nueva alternativa en la búsqueda de fármacos para resolver este tipo de enfermedades, es sin duda el uso de plantas como en la medicina tradicional (López, 1988).

Recientemente, se ha incrementado el estudio de plantas medicinales, ya que muy pocas se han estudiado adecuadamente; la tradición del uso de ellas se está perdiendo en algunos casos y otras se han ido extinguiendo sin ser estudiadas (Avila, 1996). Un punto importante y por el cual también se han incrementado dichos estudios, es porque en estos días el adquirir cualquier tipo de fármaco es de un costo muy elevado y por ejemplo el adquirir un manojo de determinada planta es más costeable.

Lozoya y cols. (1987), mencionan que en México, la información sobre el uso, la distribución geográfica, las formas de preparación, etc. de plantas medicinales, es ambigua y obsoleta y además aún no logramos contar con un inventario amplio y confiable de tales recursos vegetales. Para ampliar esta información, se han hecho encuestas a nivel nacional para conocer

cuales son las plantas más frecuentemente utilizadas por los terapeutas tradicionales y para tener una mayor organización se han clasificado de la siguiente manera:

PLANTAS MEDICINALES

1. Para el tratamiento de diversos trastornos del aparato digestivo.
2. Para el tratamiento de trastornos de las vías urinaria y/o diurético.
3. Para aliviar la tos y otras manifestaciones de afección respiratoria.
4. Para aliviar trastornos de la circulación sanguínea.
5. Para el tratamiento de padecimientos del sistema nervioso.
6. Utilizada en el tratamiento de lesiones de la piel.
7. Utilizado como analgésico y/o antipirético.
8. Específicamente para el tratamiento de las picaduras de animales ponzoñosos.
9. Para tratar padecimientos infecciosos de los ojos.
10. Para aliviar síntomas en un Síndrome de Filiación Cultural.
11. Para el tratamiento externo del dolor reumático
12. Para el tratamiento de padecimientos de las mucosas y de la infección bucal.
13. Su utilización se vincula con la biología de la reproducción en la mujer.
14. Para el manejo de los síntomas del diabético.
15. Utilizada en el tratamiento de traumatismos, golpes e inflamaciones.

Como las enfermedades que producen los microorganismos aquí estudiados se relacionan con padecimientos del sistema nervioso, tratamientos de lesiones de la piel y padecimientos infecciosos de los ojos, se comenzó a hacer un análisis general del tipo de plantas que abarcaba cada una de estas categorías (incluyendo características, distribución, época de floración, disponibilidad de la planta, etc.) y se buscó cual de esas plantas era la menos estudiada (fitoquímica y microbiológicamente) y que estuviera a nuestro alcance. Se encontró que *Buddleia cordata* podría ser una buena opción para buscar compuestos con actividad amebicida, ya que en la medicina

tradicional de México y de otros países, en el Centro y Sur de América y en Asia; las especies de *Buddleia* se utilizan de la siguiente manera: (Houghton, 1985)

USOS DE *B. cordata* EN LA MEDICINA TRADICIONAL

**Agente para curar heridas
**Agente antiinflamatorio para ojos y piel
**Como antiséptico local
*Para el tratamiento de enfermedades del hígado
*Como diurético, antipirético, hipnótico
*Ayuda a sanar tumores y úlceras
*Como veneno para peces

** Importantes por la vía de entrada de la AVL.

Por lo general, la forma en la que se aplica la planta no se describe, sólo en algunos estudios fitoquímicos se menciona que para probar algunos compuestos puros de la planta sobre bacterias, se necesitan sacar primero extractos alcohólicos, en los cuales utilizan principalmente hojas y raíz. (Pardo et al., 1993)

Rzedowski (1985) menciona las características principales para identificar a la planta y son las siguientes:

Buddleia cordata (Fig. No. 3), pertenece a la familia Loganiaceae, representada por 32 géneros y alrededor de 800 especies. En el Valle de México solo se encuentra el género *Buddleia*.

Es un árbol o arbusto de 1 a 20 m de alto, dioico; tallos tetragonales y densamente tomentoso-estrellados en las ramas jóvenes; hojas con líneas estipulares y en ocasiones con estipulas foliosas, peciolo de 1 a 7 cm de largo, limbo lanceolado, oblongo, ovalado o elíptico, de 5.5 a 24 cm de largo por 1.5 a 10.5 cm de ancho, ápice agudo, acuminado o muy acuminado, margen entero, serrado, serrulado, irregularmente serrulado o en ocasiones dentado, base obtusa, cuneada, cordada truncada o raramente atenuada u oblicua, venación muy prominente en el envés,

textura algo coriácea, pubescencia de pelos estrellados aplicados y pelos estrellados laxos, grandes, candelabroiformes, muy densa en el envés, de color blanco brillante, caduca con el tiempo; inflorescencia formada por grandes panículas terminales de 4-14 a 25-32 cm de largo ramificadas por 2 a 4 veces y con brácteas en cada ramificación; corola amarillenta, generalmente con un toque anaranjado en la garganta, flores campanuladas; cáliz tomentoso de 1.5 a 3 mm de largo; corola de 3 a 4 mm de largo con lóbulos más largos que el tubo, oblongos y extendidos, imbricados en el botón, pubescentes interna y externamente; estambres subsésiles o con filamentos cortos y fuertes; ovario ovoide, estilo conspicuo, estigma claviforme, muy ligeramente bilabiado; fruto ovoide-eclipsoidal de 2.5 a 6 mm de largo por 1.5 a 4 mm de diámetro, con dehiscencia septicida y loculicida, con numerosas semillas aladas de 1 a 1.5 mm de largo por 0.2 a 0.4 mm de ancho.

Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en el Valle de México. Altitud 2250-3000 m.s.n.m. Matorrales, pastizales y bosques, pero preferentemente en la vegetación secundaria y en lugares intensamente perturbados, incluyendo zonas urbanas.

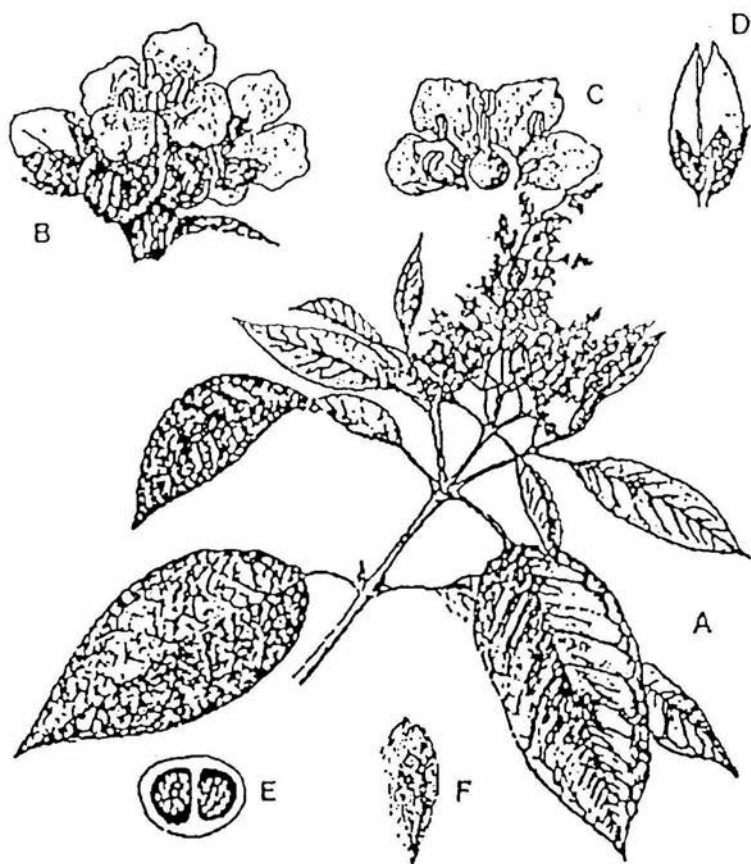


Fig. No. 3 Buddleia cordata HBK ssp. cordata: A. rama con inflorescencia; B. aspecto de un grupo de botones y dos flores; C. flor abierta; D. fruto maduro; E. corte de ovario; F. semilla.

ANTECEDENTES

El género *Buddleia* es conocido mundialmente por sus características medicinales. Las especies más comunes son *B. americana*, *B. cordata*, *B. davidii*, *B. globosa* y *B. variabilis*. De algunas de ellas se han realizado estudios fitoquímicos y algunos compuestos aislados han sido los siguientes:

1. Esteroles: sitosterol, condilasterol, estigmasterol (Houghton, 1984)
2. Flavonoides: linarina, kaempferol, quercetina, luteolina, rutina, salvigenina, escutellareina-7-O-glucósido, acacetin-7-O-rutinósido, quercetin-3-O-rutinósido (Marín et al., 1977)
3. Triterpenos: β -amirina, acetato de β -amirina, 11-ceto- β -amirina (López et al., 1979)
4. Lignanósidos: compuestos tipo lignano (Houghton, 1984)
5. Sesquiterpenos tipo cariofileno: buddledina A, B y C tóxicos y buddledina D y E no tóxicos (Yoshida et al., 1978)
6. Fenil etanoides: 2-(4-hidroxifenil) etanol éster de ácido lignocérico, éster de 2-(4-hidroxifenil) etanol éster de ácido decosanoico, éster de ácido lignocérico (Houghton, 1989)
7. Fenil propanoides: los ácidos cafeico, ferúlico y p-cumárico, buddlenol A, B, C, D, E, F, verbascósido (3,4-dihidroxi- β -feniletil), martinósido, jionósido, angorósido (Houghton, 1985)
8. Iridoides: aucubina, catalpol, metilcatalpol (Houghton, 1984)
9. Iridoides unidos a lignanos: 6-feruloil ajugol (Yamamoto, 1993)

Algunos de estos compuestos, como el verbascósido se ha probado contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) (Pardo et al., 1993); además se sabe que inhibe el hambre en gusanos del género *Spodoptera* y actúa como agente antineoplásico (Ortíz, 1996).

Los óxidos de β -cariofileno, citranelol y α -cariofileno son sustancias que han presentado actividad antibiótica (Garg, 1992).

También se sabe que la aucubina sujeta a una hidrólisis ácida se descompone en dos sustancias: glucosa y aucubigenina, esta última tiene actividad antifúngica y antibacteriana (Rombouts and Links, 1956).

Recientemente se aisló el ácido vainillínico (con un anillo aromático), el cual fue bactericida contra *Vibrio cholerae* cepas CDCV 12, INDRE 206 y un caso clínico así como en *Shigella boydii* ATCC 8700 (Ortíz, 1996).

Por lo que respecta a las AVL muchos han sido los compuestos que se han probado contra estos organismos, pero pocos son los que han tenido éxito en pruebas "in vitro" pero "in vivo" son muy tóxicos. Por ejemplo Casemore (1970) sugiere el uso de anfotericina B, 5-fluorocitosina, paromomicina e hidroxistilbamidina contra microorganismos del género *Acanthamoeba* ya que son muy eficaces. Pringle et al. (1979) encontraron que el 1-metoxi- Δ -tetrahidrocanabinol, inhibe a *N. fowleri* en bajas concentraciones. Gupta et al. (1987) estudiaron la inhibición del crecimiento de *A. culbertsoni* con metilglioxal bis (guanil-hidrazona) y se dieron cuenta que este compuesto inhibe a la enzima 5-adenosilmetionina descarboxilasa, lo cual resultó de gran interés para la evaluación de su actividad antiamebiana. En el caso de personas con queratitis producida por *Acanthamoeba*, los reportes están enfocados a la sustancia que se les aplica a los pacientes para disminuir los síntomas. Kilvington et al. (1990) probaron isotionato de propamidina (broleno), isotionato de pentamidina, isotionato de 2 hidroxistilbamidina, espiramicina, nitrato de miconazol, fluconazol, sulfato de paromomicina, sulfato de neomicina y polimixina B, en pacientes lográndose la recuperación total en algunos de ellos. Ficker et al. (1990) en contraste, probaron mezclas de ellos y encontraron que una combinación de broleno y neomicina por lo menos detiene los daños producidos por la queratitis y en algunos casos la puede eliminar. Sharma et al. (1990) trataron pacientes con queratitis que no usaban lentes de contacto y también encontraron que combinaciones de neomicina-polimixina B-neosporina con nitrato de miconazol o quetoconazol ayudan a recuperar al paciente en un alto porcentaje. Varga et al. (1993) dieron tratamientos de propamidina, neomicina y polihexametileno biguanida a cinco pacientes, los cuales en menos de 4 meses recuperaron la vista al 100 %. Recientemente, Place et al. (1994) probaron colistina, metronidazol, fluconazol y polimixina B en *Acanthamoeba* y *Naegleria* sin obtener resultados positivos; también probaron bleomicina, ciclopirox, olamina, clorpromazina, paromomicina y sanguinerina los cuales fueron más eficaces y sulfametoxazol, sulfametoxazol-trimetoprim, sulfadiazina, pentamidina, primaquina, 5-fluorocitosina, neomicina y trifluoperazina con los que mostraron actividades variadas. En un estudio posterior demostraron que la

sulfadiazina y el sulfametoxazol son amebicidas para *Acanthamoeba* spp y que *Naegleria* es resistente a todos los compuestos antes mencionados.

Las maganinas son compuestos aislados de la uña de rana que fueron probados en trofozoítos y quistes de *A. polyphaga*, resultando ser eficaces contra los trofozoítos, pero no contra los quistes (Schuster and Jacob, 1992), estos compuestos son unos de los pocos probados de origen animal ya que por lo general todos son sintéticos y muy tóxicos. Otro compuesto, aislado de *Bacillus licheniformis*, se probó contra *N. fowleri* y resultó ser amebicida ya que mató tanto a trofozoítos como a quistes, solo que este no ha sido probado "in vivo" (Cordova et al., 1993; Lebbadi et al., 1995).

Más de la mitad de los casos reportados en infecciones por *Acanthamoeba* pertenecen a los E.U. Como ya se mencionó, esta infección ocurre frecuentemente en personas débiles o inmunodeprimidas. Se han reportado dos casos, ambos fatales, en personas con SIDA (Gordon et al., 1992; Di Gregorio et al., 1992). En uno de los pacientes con SIDA, las características clínicas fueron más parecidas a las de MAP, que a las de EAG, quizá debido a la inmunodepresión. Con el incremento de las personas inmunodeprimidas es probable que ocurra un incremento en la cantidad de casos de infección por *Acanthamoeba*.

Los primeros casos de queratitis por *Acanthamoeba* fueron reportados en Inglaterra en 1974 y E.U. en 1975, siendo asociados a traumatismos en el ojo y a la exposición a aguas contaminadas, aunque también se han reportado casos en Australia, la India y Holanda. A partir de 1985, el número de casos se ha incrementado, asociándolo al aumento en el uso de lentes de contacto, en particular los de consistencia suave.

En la Cd. de México se han realizado estudios biomédicos de queratitis producida por *Acanthamoeba*, en los cuales se han encontrado casos de amebas patógenas, pero por lo que respecta al paciente, a este no se le han dado los medicamentos adecuados para combatir este tipo de microorganismos. Por lo general, los casos de estas personas se pierden, ya que no se ha dado la información adecuada sobre la enfermedad y el microorganismo que la produce, y como los pacientes se desesperan, no se dejan tratar y llegan a perder la vista (González, 1994).

Día con día se incrementa el número de personas infectadas con este tipo de microorganismos (AVL) y como ya se ha mencionado, pocos son los medicamentos capaces de

eliminar tales enfermedades pues la mayoría tienen consecuencias para el hospedero. Las fuentes de obtención de estos medicamentos también han estado limitadas ya que aun no están bien explorados los recursos animales ni mucho menos las vegetales. Por otro lado, pocos son los estudios realizados a fondo (fitoquímica y microbiológicamente) de plantas medicinales, lo cual hace un poco más difícil la obtención de información sobre los fármacos de origen vegetal. Nosotros sugerimos el estudio de *B. cordata*, comúnmente conocida como “tepozán” por sus características y principalmente por los usos (antiséptico, para el tratamiento de enfermedades oculares, para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso, etc.), ya que podría ofrecer una alternativa de tratamiento contra las amebas de vida libre patógenas o por lo menos serviría de base para continuar con la búsqueda de fármacos exitosos de origen vegetal que puedan ser asequibles para nuestra comunidad.

OBJETIVOS

- * Evaluación in vitro de los extractos acuoso y metanólico de la corteza de raíz de *Buddleia cordata* (Tepozán) en cepas de catálogo de amebas de vida libre.

- * Determinación de la actividad amebicida de los compuestos puros obtenidos del extracto metanólico del tepozán.

- * Obtención de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la dosis letal media (LD₅₀) de los compuestos que presenten actividad amebicida.

- * Valoración de la resistencia al metanol.

METODOLOGIA

La metodología comprendió 3 fases: La etapa de recolecta y secado de la planta, la obtención de los extractos vegetales y los bioensayos.

A. RECOLECTA Y SECADO DE LA PLANTA

1.- Zona de colecta

La *Buddleia cordata* se recolectó en el área del Pedregal de San Angel; dentro de esta zona se ubica Ciudad Universitaria (C.U.) cuyas coordenadas geográficas son 19° 20' 00" y 19° 19' 20" latitud norte y 99° 10' 40" y 99° 11' 20" longitud oeste (Fig. No. 4) (CETENAL topográfica, 1980).

El Pedregal de San Angel se encuentra al Sur de la Ciudad de México, a una altitud de 2250-2400 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) y es una región formada por una capa de lava, producto de la erupción del volcán Xitle y cráteres adyacentes hace 2500 años (CETENAL geológica, 1978).

La colecta se realizó manualmente y algunos de estos ejemplares (ramas con inflorescencia) se prensaron y se depositaron en el herbario IZTA para su identificación, donde se les asignó el número de registro 9101.

2.- Secado de la planta

Una vez transportada la planta al laboratorio, los ejemplares se extendieron sobre papel periódico que se colocó en la azotea del edificio de la Unidad de Investigación (UIICSE) y se dejaron secar por exposición directa al sol durante 96 hs. Una vez transcurrido el tiempo se recogieron los ejemplares y se guardaron en cajas de madera para almacenar.

B. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS

1.- Obtención de los extractos acuoso y metanólico.

Los extractos de *B. cordata* se llevaron a cabo de la siguiente manera:

Para el extracto metanólico, se pesó 1 kg de corteza de raíz seca, la cual se maceró en mortero y se le agregaron 8 litros de metanol; se extrajo a temperatura ambiente por 72 horas y posteriormente se destiló en un rotavapor al vacío hasta llevarlo a sequedad. En el caso del extracto acuoso, éste se extrajo a 40°C y se destiló de la misma forma que en el extracto metanólico; una vez obtenidos los extractos crudos se procedió a la realización de las pruebas biocidas y se almacenaron en frascos herméticamente cerrados con el fin de evitar la contaminación por microorganismos del ambiente.

2.- Separación de los principios activos por técnicas cromatográficas

Una vez obtenidos los extractos acuoso y metanólico por separado, éstos se percolaron sobre una columna de carbón activado y se realizó una primera elución con agua para eliminar azúcares y sales minerales. Posteriormente, se continuó con soluciones hidroalcohólicas en proporciones crecientes de metanol para eliminar algunos pigmentos como las clorofilas.

Una vez "limpiados" los extractos, se realizaron cromatografías en placa fina (Cromatofolios de sílica Gel SILG-UV 254 de 0.25 mm de espesor, de 1 X 5 cm), las cuales fueron reveladas con sulfato sérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y luz ultravioleta (Nathan P.J., 1974).

También se realizaron cromatografías en columna para separar las fracciones y los compuestos, procediendo de la siguiente manera: El extracto se disolvió en una mínima cantidad de solvente (agua o metanol), se absorbió en celita, se dejó evaporar en un baño maría y una vez seco, se montó sobre una columna de sílica (Sílica 60 GF₂₅₄ art. 7730, Kieselgel, marca Merck) en una relación de 20 g de sílica por cada gramo del compuesto problema y posteriormente se eluyó con una mezcla de disolventes (hexano, acetato de etilo, cloroformo, acetona o metanol) (Merck y Darmstadt, sin año de impresión).

La cantidad de las fracciones obtenidas dependió de la variedad y polaridad de los compuestos eluidos y aquellas fracciones que presentaron compuestos similares se reunieron nuevamente y se volvieron a correr en cromatografía de placa fina.

Como fueron muy pocos los volúmenes de las fracciones obtenidas, y por tanto el de compuestos puros, solo se probaron los que dieron el mayor rendimiento: La **linarina**, que es una flavona glucosidada constituida de ramnosa, glucosa y flavona (Apéndice Fig No. 5) y el **Acido Vainillínico** (Fig No. 6), que es un anillo aromático precursor de lignina, el cual se acetiló para aumentar su solubilidad (Fig No. 7).

Una parte de los compuestos puros se obtuvieron con el apoyo de personal del Instituto de Química, en particular del Dr. Alfonso Romo de Vivar, pero al igual que nosotros, se obtuvieron cantidades muy pequeñas y por tanto no pudimos probarlas, ya que para los bioensayos con cada cepa se requieren por lo menos 32 mg.

3.-Aislamiento de la linarina

Una vez obtenido el extracto metanólico del tepozán, una parte se dejó reposar después de destilarlo en un rotavapor. Se obtuvo un precipitado de color amarillo (la linarina) que se filtró, se dejó secar al vacío y se cromatografió en columna con solventes como cloroformo-metanol y acetato de etilo-metanol en una proporción 8 : 2 (de acuerdo a las cromatografías de placa fina) y conseguir un compuesto con un grado de pureza elevado. Cabe mencionar que una vez obtenido el compuesto puro, se analizaron algunas propiedades físicas como color y apariencia, punto de fusión y análisis espectrométricos.

4.- Acetilación del Acido Vainillínico

Se utilizaron 4 matraces Erlenmeyer de 50 ml los cuales contenían 0.5 g de ácido vainillínico (Sigma V-2250). A cada uno se le agregó 2 ml de ácido acético anhidrido manteniéndose en agitación constante y posteriormente ácido sulfúrico concentrado, hasta llevarlos a pH 1-3 de 5 a 10 minutos; transcurrido el tiempo se les agregó poco a poco agua destilada para detener la reacción y cada uno de los matraces se envolvió con papel aluminio y

se refrigeraron durante 24 horas. Por último, se dejó secar el compuesto al vacío por 6 horas en un matraz Buchner y se obtuvieron los cristales. La estructura química se determinó por características físicas (punto de fusión en un aparato de Fisher-Jones) y espectrométricas (espectro de infrarrojo Perkin-Elmer, Mod. 283). Además se recromatografiaron en placa fina para ver el grado de pureza y tener la seguridad de que fuese AVA.

Cabe mencionar que los análisis espectrométricos realizados fueron los siguientes: espectros de infrarrojo, de masas y resonancia magnética nuclear H^+ y ^{13}C ; todos ellos se realizaron en el Instituto de Química.

5.-Diluciones de los extractos y los compuestos puros

Los extractos se diluyeron con los mismos disolventes para realizar las pruebas biocidas. Por cada mililitro de metanol o agua destilada se utilizaron 32 mg de cada extracto (fracción semisólida), según la concentración máxima utilizada en compuestos con actividad antimicrobiana.

En el caso de los compuestos puros, la linarina se diluyó en N,N-dimetilformamida (C_3H_7NO) y el AVA en metanol (MeOH) a la concentración antes mencionada.

C. BIOENSAYOS

1.- Cultivo de las cepas

Se trabajaron 29 cepas, 7 se obtuvieron de aislamientos ambientales y las restantes directamente de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland), las cuales se eligieron por ser del mismo género pero con diferentes grados de patogenicidad (según especificaciones del catálogo): de éstas, 22 cepas pertenecen al género *Acanthamoeba*, 3 cepas al género *Hartmannella* y 4 al género *Vahlkampfia* (Tabla No. 2).

Las cepas se cultivaron en agar no nutritivo + *Enterobacter aerogenes* (ATCC 35048) muerta por calor (medio NNE). La formulación del medio fue la siguiente:

Agar bacteriológico.....	16.0 g
Agua destilada	900 ml
Agua corriente	100 ml

Una vez disuelto el agar, se le dió una precocción y posteriormente se esterilizó junto con las cajas de Petri durante 15 minutos a 121°C y 15 libras de presión. Una vez vertido el agar se tuvo la precaución de que las placas fueran delgadas para poder observar bien a los organismos en el microscopio invertido (Modelo CK2, Olympus Optical Co, LTD), y se les agregaron 4 gotas de una suspensión de bacteria muerta (*E. aerogenes*). La bacteria se cultivó en cajas de Petri de 90 mm de diámetro con agar nutritivo por 24 h a 30 °C. Una vez cumplido el tiempo de incubación, ésta se colectó con agua destilada y un asa de vidrio y se pasó a tubos con tapón de rosca, para posteriormente inactivarla poniéndola a baño maría (80 °C durante una hora) y finalmente se dejó en refrigeración por tiempo indefinido.

Los subcultivos de amebas se incubaron a 30 °C por 24 hs, después de lo cual se revisaron para estar seguros del buen desarrollo de la población y tener inóculos suficientes de trofozoítos o quistes para realizar los bioensayos.

ESPECIE	Clave	Sitio de aislamiento	Origen	Grado de Patogenicidad
<i>Acanthamoeba astronixis</i>	30137	Suelo	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30011	Cultivo de Levadura	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30234	Cultivo de Levadura	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30869	Suelo	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30010	Suelo	ATCC	Patógeno
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30898	Pozo	ATCC	Patógeno
<i>Acanthamoeba comandoni</i>	32	Aire	AMBIENTAL	No Patógeno
<i>Acanthamoeba griffini</i>	30731	Agua	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	30730	Sedimento	ATCC	Patógeno
<i>Acanthamoeba healyi</i>	30866	Cultivo de Células de Riñón de Mono	ATCC	Patógeno
<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	30732	Sedimento Marino	ATCC	Patógeno
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	30841	Alberca	ATCC	Patógeno
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	30	Aguas Tratadas	AMBIENTAL	Patógeno
<i>Acanthamoeba palestinesis</i>	30870	Suelo	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	31	Aire	AMBIENTAL	No Patógeno
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30461	Córnea	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30486	Suelo	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30173	Cavidad Nasal	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30899	Tracto Respiratorio	ATCC	Patógeno
<i>Acanthamoeba rhyssodes</i>	30973	Suelo	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Acanthamoeba royreba</i>	30844	Células Coriocarcinomas Humanas	ATCC	Patógeno
<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	30867	Suelo	ATCC	No Patógeno.
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	22	Aguas Subterráneas	AMBIENTAL	No Patógeno
<i>Hartmannella vermiformis</i>	23	Aguas Subterráneas	AMBIENTAL	No Patógeno
<i>Hartmannella vermiformis</i>	30966	Agua Dulce	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Vahlkampfia avara</i>	30964	Agua Dulce	ATCC	No Patógeno
<i>Vahlkampfia inornata</i>	30965	Agua Dulce	ATCC	Patógeno Oportunista
<i>Vahlkampfia sp.</i>	13	Aguas Subterráneas	AMBIENTAL	No Patógeno
<i>Vahlkampfia sp.</i>	14	Aguas Subterráneas	AMBIENTAL	No Patógeno

ATCC=American Type Culture Collection

Tabla No. 2 Cepas a las que se les evaluó la actividad amebicida de algunos compuestos obtenidos de *Buddleia cordata*

2.-Bioensayos para determinar la actividad amebicida de los extractos y los compuestos puros

Para esta prueba se utilizaron cajas de Elisa constituidas de 12 filas con 8 pozos cada fila (Kilvington et al., 1990).

Los trofozoítos, y por otro lado los quistes de cada cepa, se transfirieron a los pozos mediante la colecta de las cajas de petri con solución salina de Neff (SSN) (NaCl 1.2 g/100 ml, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/100 ml, $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.4 g/100 ml, Na_2HPO_4 1.42 g/100 ml, KH_2PO_4 1.36 g/100 ml). Se depositaron 150 μl del barrido con 200 trofozoítos/quistes por pozo cuando menos. Se utilizaron 4 filas por cepa, para el extracto acuoso, extracto metanólico, linarina y ácido vainillínico acetilado. Después de 30 minutos, las amebas se fijaron en el fondo de los pozos y se les agregó 150 μl de la solución problema a 6 pozos de cada fila y los otros 2 se utilizaron uno como control con SSN y el otro como testigo con cada uno de sus disolventes, agua destilada, metanol, N,N-dimetilformamida y otro con metanol respectivamente.

Las placas de 96 pozos se incubaron a 30 °C por 24 hs; transcurrido el tiempo se lavaron los pozos con agua destilada estéril dos veces y se llenaron nuevamente cada uno de los pozos con 300 μl de una suspensión de bacteria inactiva + SSN estéril en una proporción de 0.2:3.8 ml. Las cajas se incubaron nuevamente entre 24 y 48 horas y posteriormente se observaron al microscopio invertido; de acuerdo con las características morfológicas observadas se anotó la presencia de trofozoítos, quistes, células redondeadas, quistes vacíos, trofozoítos o quistes granulados, parámetros que sirvieron para notar la existencia de actividad amebicida, amebostática o si no hubo actividad en el estado de quiste y de trofozoito. Para corroborar esto, de algunos pozos experimentales, del control y el testigo se tomó una muestra que se sembró en cajas de petri con medio NNE. Estas se revisaron al tercer día de incubación en un microscopio invertido para saber si los trofozoítos y los quistes estaban viables o no, lo mismo se hizo para los quistes aparentemente vacíos y para las células redondeadas (Place et al., 1993).

Definición de los parámetros establecidos:

Amebicida (M): Célula totalmente muerta ya sea en estado de trofozoíto o de quiste, aunque se le proporcione alimento no se recupera ni presenta movimiento.

Amebostático (A): Parámetro establecido sólo para trofozoítos, una vez que se les aplica cualquier sustancia enquistan, pero cuando se les dan las condiciones adecuadas de alimento y espacio vuelven al estado de trofozoíto.

Sin efecto (X): En el caso de los quistes, una vez que se les aplica cualquier sustancia por un tiempo y esta se les retira y se les dan las condiciones adecuadas los microorganismos vuelven al estado de trofozoíto y en el caso de los trofozoítos, aun con la presencia de cualquier sustancia estos permanecen en el mismo estado, se detecta fácil por el movimiento vacuolar.

Otros parámetros establecidos principalmente para los compuestos puros son:

Trofozoítos dañados (D): Se observa el entorno de un trofozoíto normal, solo que por dentro el citoplasma no es muy claro, se llegan a observar granulosidades y nunca se ve la vacuola ni presentan movimiento; también les llamamos trofozoítos fantasmas por que a veces la membrana no se observa bien delimitada y por el contrario se observa difusa (aquí cabe aclarar que aunque se reportan dañados a las 24 hs, los microorganismos recuperan sus características como un trofozoíto normal).

Partículas de linarina (P): Se refiere a que en los pozos lo que se encuentra principalmente son espículas o residuos de linarina, puede o no haber amebas.

Sin inóculo (*): En los pozos no se observan microorganismos, solo residuos de alguno de los compuestos.

3.-Bioensayos para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de la Linarina y del Acido Vainillínico Acetilado.

Se utilizaron 11 concentraciones: 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.03125 mg/ml de solvente, por cada compuesto puro a partir de una solución madre (32 mg/ml) para obtener la MIC.

Los bioensayos para la linarina, se realizaron en tubos de vidrio, donde a cada tubo se le agregaron 200 µl de una suspensión de trofozoítos o quistes en SSN y posteriormente 200

μl de la sol. madre al primer tubo. El líquido de cada uno de los tubos se resuspendió y nuevamente se tomaron 200 μl y se pasaron al siguiente tubo y así sucesivamente hasta llegar a la última dilución (0.03125 mg/ml). En este caso, se presentaron algunos problemas metodológicos: el solvente utilizado reacciona con las cajas de policarbonatos por lo que el bioensayo se tuvo que hacer en tubos de vidrio; el compuesto no fue muy soluble y se dividió en dos fases, por lo cual los tubos se mantuvieron inclinados todo el tiempo e incubaron en la misma posición para tener un mayor contacto de la ameba con el compuesto; las diluciones fueron difíciles de manipular, en este caso se utilizaron puntas de micropipeta delgadas y por último al revisar los tubos en el microscopio las células no se distinguieron bien, por lo que se tuvo que sembrar cada uno de los tubos y observar directamente al microscopio; con todo esto no se pudieron manejar los parámetros establecidos y por tanto se manejaron otras claves.

En los bioensayos con AVA se utilizaron cajas de Elisa constituidas de 8 filas con 12 pozos cada una. A cada fila, se le agregaron 150 μl de la suspensión de microorganismos con SSN y 150 μl de AVA siguiendo el mismo procedimiento que en los bioensayos para la linarina. En cuanto a la obtención de resultados, se siguieron los mismos pasos y parámetros que se utilizaron en los bioensayos con extractos.

Cabe mencionar que con los resultados obtenidos en la MIC, no fue necesaria la realización de los bioensayos para obtener la LD₅₀, como se verá posteriormente.

4.- Tolerancia al metanol

En esta parte, solo se valoró de manera cualitativa y en algunas cepas, el daño que podría haber causado el metanol en las AVL y la sinergia que éste podría haber tenido con algún compuesto de la planta.

Para realizar las pruebas se utilizaron cajas de cultivo celular con 12 pozos. A cada uno de ellos se le agregó 1 ml de ameba, ya sea en estado de trofozoito o de quiste y se le agregó una suspensión de bacteria muerta (2.8 ml de SSN + 0.2 ml de *E. aerogenes*), se dejó incubando la caja a 30 °C de 24 a 48 hs, posteriormente se observaron al microscopio invertido para corroborar la presencia solo de trofozoitos y una vez obtenido el inóculo

suficiente, se desechó la suspensión de bacteria y a cada uno de los pozos se les agregó lo siguiente:

A = 4.0 ml de MeOH

B = 3.6 ml de MeOH + 0.4 ml (0.2 bact. inactiva + 0.2 SSN)

C = 3.2 ml de MeOH + 0.8 ml (0.2 bact. inactiva + 0.6 SSN)

D = 2.8 ml de MeOH + 1.2 ml (0.2 bact. inactiva + 1.0 SSN)

E = 2.4 ml de MeOH + 1.6 ml (0.2 bact. inactiva + 1.4 SSN)

F = 2.0 ml de MeOH + 2.0 ml (0.2 bact. inactiva + 1.8 SSN)

G = 1.6 ml de MeOH + 2.4 ml (0.2 bact. inactiva + 2.2 SSN)

H = 1.2 ml de MeOH + 2.8 ml (0.2 bact. inactiva + 2.6 SSN)

I = 0.8 ml de MeOH + 3.2 ml (0.2 bact. inactiva + 3.0 SSN)

J = 0.4 ml de MeOH + 3.6 ml (0.2 bact. inactiva + 3.4 SSN)

K = 4.0 ml (0.2 bact. inactiva + 3.8 SSN)

A = 100%, B = 90%, C = 80%, D = 70%, E = 60%, F = 50%, G = 40%, H = 30%, I = 20%, J=10%, K = 0%.

Una vez agregadas las soluciones, nuevamente se revisaron las cajas y en cada uno de los pozos se contaron 5 cuadrantes al azar con ayuda del microscopio invertido. Después todas las cajas se metieron a incubar por 24 hs a 30 °C y finalmente se volvieron a contar las amebas.

RESULTADOS

* Análisis fitoquímico

Por cada 1015 g de corteza de raíz de *Buddleia cordata* se obtuvieron 81.15 g del extracto metanólico (rendimiento del 8 %) y un poco más del extracto acuoso (no cuantificado).

De las fracciones y compuestos se obtuvieron muy pocas cantidades, la linarina se encuentra presente en la planta en un 0.29 % y el ácido vainillínico en un 0.053 %, por lo cual se decidió probar sólo estos dos. La linarina obtenida a partir de la planta y el ácido vainillínico adquirido por proveedores de la compañía Sigma.

Los solventes con los que se pudo separar la linarina por cromatografías de columna fueron cloroformo-metanol y acetato de etilo-metanol en una proporción 8:2 y para el ácido vainillínico una mezcla de agua-metanol en orden decreciente (1:9, 2:8, 3:7, etc.).

Por cada gramo de ácido vainillínico se obtuvieron 100 mg de ácido vainillínico acetilado (rendimiento del 10 %). En el siguiente cuadro se mencionan las propiedades físicas de los compuestos puros trabajados.

PROPIEDADES FISICAS

COMPUESTO	COLOR	APARIENCIA	PTO. DE FUSION (°C)
Linarina	verde-blanquecino	Polvo	275
Acido vainillínico	Blanco	Polvo	140
Acido vainillínico acetilado	Transparente	Espículas	140

* Análisis microbiológico

El efecto amebicida de los extractos acuoso y metanólico del tepozán, así como de los dos compuestos puros obtenidos, se muestran en el Cuadro No. 1 en el apéndice. El extracto acuoso del tepozán fue inocuo para 15 cepas e indujo el enquistamiento en 14 de ellas, pues una vez retirado el extracto, los quistes volvieron al estado de trofozoitos (Tabla 1). Las cepas sensibles a dicho extracto fueron *A. castellanii* 30234, 30869, 30010 y 30898, *A. jacobsi* 30732, *A. lenticulata* 30841, *A. palestinensis* 30870, *A. polyphaga* 30461 y 30173, *H. cantabrigiensis* 22, *H. vermiformis* 23 y 30966 y *V. inornata* 13 y 30965.

En el caso del extracto metanólico 13 cepas fueron resistentes y 16 sensibles (Tabla 1). Las cepas sensibles son *A. astronixis* 30137, *A. castellanii* 30011, 39234, 30869, 30010 y 30898. *A. hatchetti* 30730, *A. polyphaga* 30486 y 30173, *A. royreba* 30884, *A. tubiashi* 30869, *H. cantabrigiensis* 22, *H. vermiformis* 30966, *V. avara* 30964, *V. inornata* 30965 y *Vahlkampfia sp* 13. Ninguna cepa en estado de quiste fue sensible a los dos extractos.

En estado de trofozoito todas las cepas fueron aparentemente sensibles a la linarina a 32 mg/ml cuando se leyeron a las 24 horas, pues aunque la mayoría no enquistan, se alcanzan a diferenciar algunos trofozoitos granulosos o espículas de la linarina. Al hacer la segunda lectura a las 96 hs, todas las cepa se encontraron en estado de trofozoito o en mezclas de trofozoitos con quistes. En las pruebas con quistes, estos no sufren daño aparente y aunque en algunos casos algunas cepas exquistaron más rápido que otras, a las 96 hs también se encontraron trofozoitos o mezclas de trofozoitos con quistes.

A. tubiashi 30867 fue resistente al AVA ya que permaneció en estado de trofozoito y en contraste *V. inornata* 30965 fue sensible, pues después de la segunda lectura los trofozoitos no se recuperaron; en las demás cepas, el AVA indujo al enquistamiento (Tabla 1).

	Amebicida (cantidad de cepas)		Amebostático (cantidad de cepas)	Sin Efecto (cantidad de cepas)	
	T	Q	T	T	Q
Ext. acuoso	0	0	14	15	29
Ext. metanólico	0	0	16	13	29

	Amebicida (cantidad de cepas)		Amebostático (cantidad de cepas)	Sin Efecto (cantidad de cepas)	
	T	Q	T	T	Q
LINARINA	0	0	29*	0	29
AVA	1	0	27	1	29

*Trofozoítos aparentemente dañados, pero que no enquistan.

AVA= Acido vainillínico acetilado T= Trofozoito Q= Quiste

Tabla 1. Evaluación “in vitro” de los extractos acuoso y metanólico, así como de algunos compuestos puros de *B. cordata* en amebas de vida libre.

Las 5 cepas de *A. castellanii* y las 5 cepas de *A. polyphaga*, mostraron una gran variedad de respuestas (Tabla 2). Por ejemplo, las cepas 30234, 30869, 30010 y 30898 de *A. castellanii* fueron sensibles en estado de trofozoíto (efecto amebostático) tanto a los extractos como a los compuestos puros y la cepa 30011 fue resistente al extracto acuoso y sensible a los demás. Las cepas 31, 30486 y 30899 de *A. polyphaga* fueron resistentes al extracto acuoso, a diferencia de las cepas 30461 y 30173 en quienes induce al enquistamiento. Las cepas 31, 30461 y 30899 son resistentes al extracto metanólico y éste tiene un efecto amebostático en las cepas 30486 y 30173. El AVA induce el enquistamiento en todas las cepas y la linarina daña aparentemente a los trofozoítos.

Acanthamoeba castellanii

Características de las cepas				Extractos y compuestos de <i>Buddleia cordata</i>							
Clave	Aislamiento	Origen	G. de P.	Tep H ₂ O		Tep MeOH		Linarina		AVA	
				T	Q	T	Q	T	Q	T	Q
30011	C. de Lev.	ATCC	P.O.	X	X	A	X	D	X	A	X
30234	C. de Lev.	ATCC	P.O.	A	X	A	X	D	X	A	X
30869	Suelo	ATCC	P.O.	A	X	A	X	D	X	A	X
30010	Suelo	ATCC	P	A	X	A	X	D	X	A	X
30898	Pozo	ATCC	P	A	X	A	X	D	X	A	X

Acanthamoeba polyphaga

Características de las cepas				Extractos y compuestos de <i>Buddleia cordata</i>							
Clave	Aislamiento	Origen	G. de P.	Tep H ₂ O		Tep MeOH		Linarina		AVA	
				T	Q	T	Q	T	Q	T	Q
31	Aire	AMB.	N.P.	X	X	X	X	D	X	A	X
30461	Cornea	ATCC	P.O.	A	X	X	X	D	X	A	X
30486	Suelo	ATCC	P.O.	X	X	A	X	D	X	A	X
30173	Cav. Nasal	ATCC	P.O.	A	X	A	X	D	X	A	X
30899	Tract. Resp.	ATCC	P	X	X	X	X	D	X	A	X

Tep H₂O= Extracto acuoso de tepozán Tep MeOH= Extracto metanólico de tepozán AVA= Acido vainillínico acetilado C. de Lev.= Cultivo de levaduras Cav. Nasal = Cavidad nasal Tract. Resp.= Tracto respiratorio ATCC= American Type Culture Collection AMB.= Aislamiento ambiental G.de P.= Grado de patogenicidad P= Patógena P.O.= Patógena oportunista N.P.= No patógena T= Trofozoito Q= Quiste X= Sin efecto A= Amebostático M= Amebicida D= Trofozoito dañado

Tabla 2. Sensibilidad a los extractos y compuestos puros de *B. cordata* a una concentración de 32 mg/ml.

Por otro lado, la sensibilidad de las AVL a las diferentes concentraciones de linarina se muestran en el Cuadro No. 2 del apéndice. *A. astronixis* 30137, *A. castellanii* 30010, *A. comandoni* 32, *A. griffini* 30731 y *A. polyphaga* 30486, fueron resistentes en estado de trofozoito de la concentración de 0.03125 hasta 8 mg/ml. En contraste, *A. castellanii* 30869, a partir de 0.25 mg/ml enquistada y es dañada

aparentemente de 1 a 32 mg/ml, *H. vermiformis* 23 es dañada a partir de 1 mg/ml, *V. inornata* 30965 a partir de 0.125 mg/ml, *Vahlkampfia sp.* 13 en quista a partir de 0.0625 hasta 1 mg/ml y de ahí hasta 32 mg/ml es dañada y *Vahlkampfia sp.* 14 quien a partir de 1 hasta 32 mg/ml es dañada.

En estado de quiste, *A. castellanii* 30011, *A. healyi* 30866, *A. jacobsi* 30732 y *A. rhyodes* 30973 aparentemente no sufrieron daños, ya que al realizar la primera lectura a las 24 hs se encontraron en estado de trofozoito y por ejemplo *A. astronixis* 30137, *A. castellanii* 30010 y 30234, *A. lugdunensis* 30 y *A. polyphaga* 31, entre otras, tardaron hasta 96 hs (2ª lectura) para cambiar al estado de trofozoito (Tabla 3).

Cepas resistentes en estado de trofozoito

ESPECIE	Clave	Concentraciones de Linarina										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Acanthamoeba astronixis</i>	30137	P	P	X	X	X	X	X	X	P	X	P
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30010	D	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba comandoni</i>	32	D	D	D	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba griffini</i>	30731	P	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30486	D	D	X	X	X	X	X	A	*	X	X

Cepas más o menos sensibles en estado de trofozoito

<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30869	D	D	P	D	D	D	A	D	*	X	X
<i>Hartmannella vermiformis</i>	23	D	D	D	D	D	D	X	X	X	X	X
<i>Vahlkampfia inornata</i>	30965	D	D	D	D	D	D	D	D	D	X	X
<i>Vahlkampfia sp.</i>	13	D	D	D	D	D	A	X	A	A	A	X
<i>Vahlkampfia sp.</i>	14	D	D	D	D	D	D	X	X	X	X	X

Concentraciones de linarina (mg/ml):

1= 32 2= 16 3= 8 4= 4 5= 2 6= 1 7= 0.5 8= 0.25 9= 0.125 10= 0.0625 11= 0.03125

X= Sin efecto A=Amebostático D= Trofozoito dañado P= Partículas de linarina *= Sin inóculo

Cepas en quiste que se recuperan a las 24 horas

<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30011
<i>Acanthamoeba healyi</i>	30866
<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	30732
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	30973

Cepas en quiste que tardan hasta 96 horas para recuperarse

<i>Acanthamoeba astronixis</i>	30137
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30010
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30234
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	30
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	31

Tabla 3. Sensibilidad de las AVL a diferentes concentraciones de Linarina.

En el caso del AVA, la sensibilidad de las AVL a las diferentes concentraciones, se pueden observar en el Cuadro No. 3 del apéndice. Por ejemplo, *A. polyphaga* 30461 y 30899, *A. rhyodes* 30973, *H. cantabrigiensis* 22 y *Vahlkampfia sp.* 13 fueron sensibles a todas las concentraciones (efecto amebostático). Por el contrario, *A. tubiashi* 30867 fue resistente a todas las concentraciones y *A. polyphaga* 31 resiste a todas las concentraciones excepto a 16 y 32 mg/ml en donde enquistó.

Un caso especial fue el de *V. inornata* 30965, quien resistió 8 mg/ml, con 16 mg/ml se enquistó y con 32 mg/ml fue sensible, aún después de la segunda lectura. *A. castellanii* 30898, *A. griffini* 30731, *A. polyphaga* 30486, *A. tubiashi* 30867 y *H. vermiformis* 30966 son cepas que se bioensayaron en estado de quiste y a las 24 horas volvieron al estado de trofozoito; por otra parte *A. castellanii* 30010, 30011 y 30869, *A. jacobsi* 30732, *H. vermiformis* 23 y *V. inornata* 30965 tardaron 96 horas para cambiar al estado de trofozoito (Tabla 4).

Cepas sensibles en estado de trofozoito

Concentraciones de AVA

ESPECIE	Clave	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30461	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30899	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	30973	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	22	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
<i>Vahlkampfia sp.</i>	13	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Cepas resistentes a la mayoría de las concentraciones

<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	31	A	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	30867	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Cepa en estado de trofozoito sensible a la más alta concentración

<i>Vahlkampfia inornata</i>	30965	M	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X
-----------------------------	-------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Concentraciones del AVA (mg/ml):

1 = 32 2 = 16 3 = 8 4 = 4 5 = 2 6 = 1 7 = 0.5 8 = 0.25 9 = 0.125 10 = 0.0625 11 = 0.03125

X = Sin efecto A = Amebostático M = Amebicida

Cepas en estado de quiste que tardaron 24 horas para recuperarse

<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30898
<i>Acanthamoeba griffini</i>	30731
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30486
<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	30867
<i>Hartmannella vermiformis</i>	30966

Cepas en estado de quiste que tardaron hasta 96 horas para recuperarse

<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30010
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30011
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30869
<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	30732
<i>Hartmannella vermiformis</i>	23
<i>Vahlkampfia inornata</i>	30965

Tabla 4. Sensibilidad de las AVL a diferentes concentraciones de AVA.

En algunas cepas se probaron diferentes concentraciones de metanol. Para estandarizar la técnica se utilizó *A. castellanii* 30010 y 30011. En la cepa 30010 se excedió la cantidad de inóculo inicial y al revisar los pozos a las 24 hs, en todas las concentraciones se pudo apreciar una gran cantidad de quistes y por tanto un número menor de trofozoitos, motivo por el que se expresan valores negativos en la gráfica (debido a las condiciones adversas como son la falta de espacio y alimento y no al metanol) (Gráfica No.1). En la cepa 30011 se realizaron dos lecturas a las 24 y 96 hs, en la primera el incremento de microorganismos fue escaso y en algunos pozos el metanol casi se había evaporado por lo cual se les agregó más metanol y se mantuvieron en el solvente durante más tiempo. En la segunda lectura se notó un incremento, por ejemplo en concentraciones de metanol absoluto y alcoholes al 60, 50 y 20 % se observaron más de 900 amebas y aunque no se realizaron conteos de metanol al 10 % y en el control con SSN por falta de inóculo, éstos detalles se consideraron para los demás conteos (Gráfica No. 2).

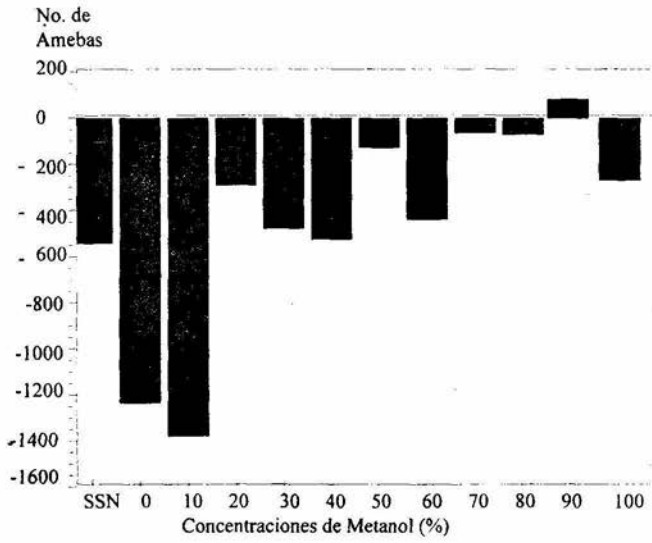
Las cepas a las que se les hicieron las pruebas de tolerancia al metanol son las siguientes: *A. castellanii* 30011 y 30869, *A. healyi* 30866 y *A. palestinensis* 30870 (Gráfica No. 3) y el incremento (reproducción de las amebas) o disminución (enquistamiento) de los microorganismos se muestran en la Tabla 5.

CONCENTRACIONES DE METANOL

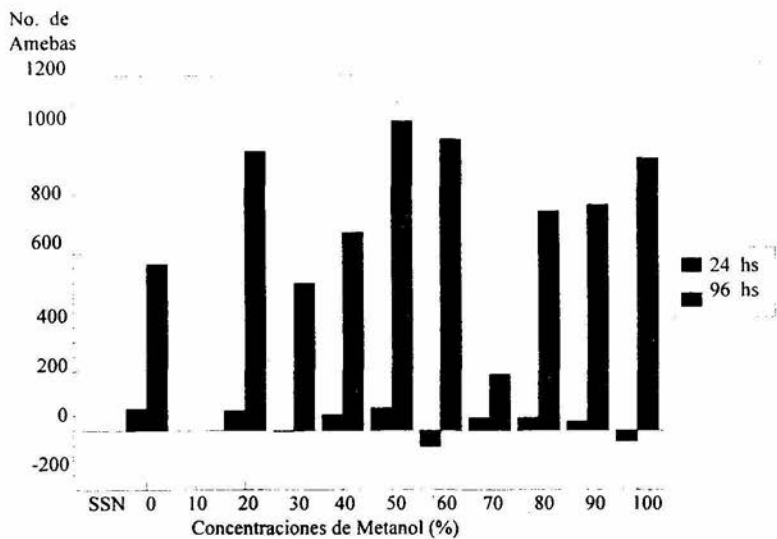
CEPA	SSN	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>A. castellanii</i> 30011	141	-182	15	114	369	176	105	-9	525	149	183	261
<i>A. castellanii</i> 30869	-82	-38	-7	2	36	78	114	44	131	105	102	-23
<i>A. healyi</i> 30866	-15	65	56	78	190	6	51	70	40	41	2	95
<i>A. palestinensis</i> 30870	53	6	93	52	61	98	199	66	77	153	77	-254

Tabla 5 Cepas a las que se les hicieron pruebas de tolerancia al metanol.

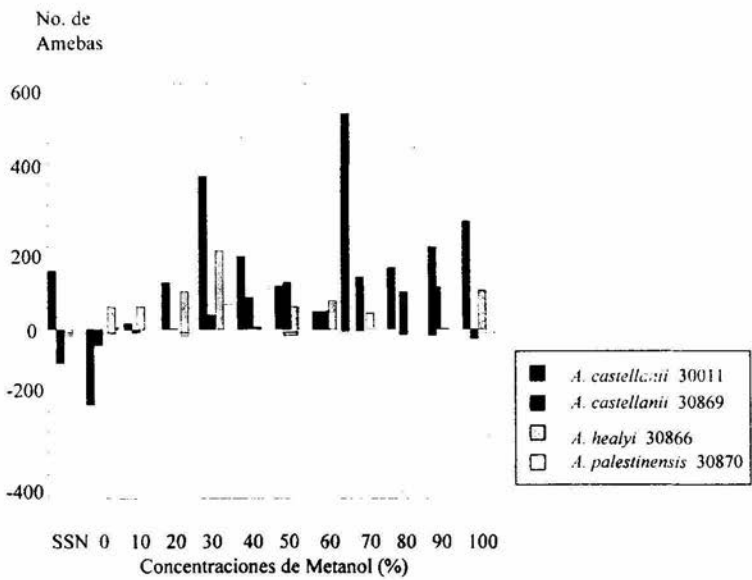
**** NOTA:** Los datos representan la diferencia de microorganismos que hubo de la lectura al tiempo cero (al momento de agregarles metanol) y a las 24 horas (tiempo de incubación).



Gráfica No. 1 Tolerancia al metanol de *A. castellanii* 30010 (Estandarización)



Gráfica No. 2 Tolerancia al metanol de *A. castellanii* 30011 (Estandarización)



Gráfica No. 3 Tolerancia al metanol de diferentes especies de *Acanthamoeba*

DISCUSION

En el presente estudio se evaluó la actividad amebicida de los extractos acuoso y metanólico, así como algunos compuestos puros de *B. cordata*.

En el caso de los extractos, el que mayor efectividad presentó fue el metanólico ya que indujo el enquistamiento en 16 de las 29 cepas probadas. Para descartar daños provocados por el metanol se realizaron pruebas de tolerancia al solvente en algunas cepas. Tomlinson (1991) probó diferentes fármacos contra *A. castellanii* y algunos de ellos (Clotrimazol y Miconazol) se disolvieron en etanol y metanol respectivamente y aunque estos solventes pudieran ser tóxicos, él los sugiere como buenos vehículos para la administración de medicamentos, lo cual fue de nuestro interés, ya que en el sondeo general que fue realizado en algunas cepas se supone que quizá se incrementa la velocidad de reproducción, como en *A. castellanii* 30011 donde se observó un aumento considerable. Podría pensarse que de alguna forma la ameba toma la molécula, la incorpora a una vía metabólica y esto le beneficia en su reproducción. Es necesario aclarar que no se da lo mismo en todas las cepas, pues en algunas el número de trofozoítos mas o menos se mantiene y en otras lo que más se observan son quistes; en este último caso se supone que la ameba se alimenta de metanol, se reproduce y conforme pasa el tiempo ya no existe espacio suficiente ni alimento por lo cual los microorganismos enquistan, una vez transcurrido el tiempo de la prueba, a los quistes se les agregó SSN + bacteria y todos ellos fueron viables (volvieron al estado de trofozoíto). Cabe mencionar, que en los casos donde el número de amebas se incrementó respecto al control, las condiciones morfológicas de los trofozoítos fueron diferentes; en el caso del metanol absoluto, los trofozoítos se observaron granuloso, la membrana más oscura y su vacuola no tan activa, lo que hizo suponer que dentro del organismo hubo cambios o adaptaciones debido al metanol. Por otra parte en los controles se observaron movimientos en las amebas e incluso la vacuola presentó actividad.

A los compuestos puros no se les pudo determinar la MIC ni la LD₅₀ sobre los quistes, ya que la dosis máxima utilizada en compuestos antimicrobianos es de 32 mg/ml y a esta concentración, los quistes no fueron afectados aparentemente, excepto en el tiempo de exquistamiento ya que una vez que se les retiró el compuesto, algunas cepas exquistaron a las 24

horas y otras a las 96 hs. Esto pudo deberse a que el manejo de cultivos no fueron sincrónicos y por eso algunos trofozoítos exquistaron antes que otros. Otra cosa que pudo haber sucedido es que el compuesto de alguna forma penetró en el quiste ya sea por ósmosis o a través de los ostiolas y quizá dañó un poco al microorganismo retrasando su salida. En otros casos, al realizar la primera lectura se encontraron trofozoítos dañados, lo que hizo suponer que las muestras iniciales iban con algunos quistes inmaduros que exquistaron (probablemente debido a la falta de control en la edad de los cultivos) y como en el medio se encontraba el compuesto, este pudo inhibirlos o causarles daño, por eso se veían granulados en ciertos casos y con apariencia difusa en otros, además de algunos quistes; por eso al realizar la segunda lectura ya se observaban trofozoítos totalmente recuperados y mayor cantidad de quistes.

En el caso de los trofozoítos, se calculó la dosis a la cual fueron dañados aparentemente (por su morfología principalmente). En el caso de la linarina, la mayoría de las cepas comenzó a presentar daño a partir de 2 mg/ml y en el caso del AVA a partir de 1 mg/ml, pero de acuerdo a lo reportado en la bibliografía estos valores son dosis muy altas para destruir amebas, pues en la mayoría reportan valores de microgramos y son compuestos sintéticos de familias como los aminoglucósidos, cefalosporinas, diamidinas, fluoroquinolonas, azoles, penicilinas y polienos, entre otros, razón por la cual a *V. inornata* 30965 no se le continuaron probando más dosis de AVA a pesar de que a 32 mg/ml resultó ser sensible (es decir, después de 96 hs la ameba no presentó movimiento, ni actividad vacuolar, manteniendo las mismas características reportadas en la primera lectura, con membrana más oscura en algunos casos y granulosis o con apariencia difuminada en otros).

Ahora bien, aquí cabe aclarar que en este y en otros estudios los investigadores aún no se ponen de acuerdo en la estandarización de este tipo de técnicas. Osato et al. (1991), mencionan que esta falta de estandarización ha llevado a la obtención de resultados dudosos y que no se pueden reproducir en otros laboratorios, por lo cual proponen tomar en cuenta los siguientes parámetros: **edad de los cultivos**; que como se pudo observar en nuestro estudio son un factor importante ya que en donde se suponía que habían sólo trofozoítos también se encontraron quistes o en donde se suponía que solo había quistes se encontraron trofozoítos dañados; **tiempo de exposición al fármaco**, que en nuestro experimento fue de 24 hs y por ejemplo Schuster y Jacob (1992) sugieren

dejar los cultivos hasta 21 días para ver realmente el efecto de la droga probada y Place et al. (1994), sugieren una doble exposición a los fármacos lo cual daría una mayor seguridad de que se está actuando directamente sobre el microorganismo; **fase morfológica**, como ya se mencionó, es difícil erradicar a los quistes, por ser una fase de resistencia, en nuestro experimento se decidió probar en los dos estadios; **el tamaño del inóculo**, se controló poniendo 200 trofozoítos o quistes por pozo; **la composición del medio de cultivo y el método de preparación**, aunque se trabajaron medios de cultivo monoxénicos, estos son difíciles de controlar por la invasión de otros microorganismos como bacterias y hongos, así como por el tiempo de adaptación y lo más importante **el criterio para identificar células después de la exposición al fármaco** de lo cual depende el éxito de este tipo de trabajos. Con respecto a este punto, Schuster y Jacob (1992) mencionan que es muy difícil definir este criterio; ya que por ejemplo en un hematocitómetro se cuentan por igual células vivas y muertas, situación que dificulta el distinguir a los microorganismos solo por su actividad vacuolar. Buck y Rosenthal (1996), propusieron dos métodos para identificar bien a los microorganismos; el del hematocitómetro (donde cuentan células vivas y muertas) y la técnica de microlitros (donde sólo cuentan células vivas). Esta última está basada en pequeños bloques de agar con bacteria y si bien tiene algunas desventajas, con ello pudieron demostrar que es más confiable que el método del hematocitómetro utilizado por la mayoría de los investigadores. En esta investigación, es notorio que también nos costó algo de trabajo dicho parámetro y aunque se sembraron algunos experimentos, control y testigo, el hecho de no realizar las lecturas directas del lugar donde se pusieron en contacto la ameba con los extractos/compuestos puros de la planta (en este caso en los pozos), podría ser una variable que explique los resultados que se obtuvieron, por eso se sugiere para estudios posteriores la implementación de la técnica utilizada por Buck y Rosenthal.

Un hecho interesante, son el grupo de amebas del género *A. castellanni* y *A. polyphaga* con las que se trabajaron, pues si bien cada especie constó de 5 cepas diferentes, todas ellas se comportaron de distinta manera, lo cual hizo suponer que quizá se trataba de especies diferentes, a pesar de que se obtuvieron de una misma colección.

Finalmente, por lo que respecta a la planta no podemos decir que esta tiene un efecto significativo sobre las AVL, pero tampoco que no lo tiene, pues faltarían más pruebas por realizar.

Como se mencionó en los antecedentes, la planta está estudiada fitoquímicamente, pero microbiológicamente hay muy pocos estudios y estos generalmente están enfocados a bacterias. En cuanto a los extractos solo se probaron dos de ellos y por tanto cabría la posibilidad de evaluar otros de diferente polaridad. En cuanto a los compuestos puros, solo se probaron dos pero faltaría analizar otros por separado y quizá hasta la combinación de algunos de ellos para ver si éstos pueden actuar en sinergia.

Este trabajo puede ser útil para estudios posteriores en los cuales se desee probar otros compuestos puros y fármacos de origen vegetal.

CONCLUSIONES

- ◆ Los extractos acuoso y metanólico no presentaron un efecto significativo sobre las cepas de AVL probadas.
- ◆ De los compuestos puros analizados, la linarina mostró tener un efecto amebostático en todas las cepas y el AVA efecto amebicida en una cepa, efecto amebostático en 27 cepas y sin efecto en una cepa. En estado de quiste todas las cepas fueron resistentes a los extractos y compuestos de *B. cordata*.
- ◆ La concentración a la que aparentemente los trofozoítos son dañados en linarina fue de 2 mg/ml y en el AVA de 1 mg/ml.
- ◆ Podría suponerse que el metanol utilizado quizá es un factor importante que puede acelerar la velocidad de reproducción de algunas AVL.
- ◆ Las diferentes cepas de *A. castellanii* y *A. polyphaga* responden de diversas formas a la aplicación de los extractos y de los compuestos puros de *B. cordata*.

BIBLIOGRAFIA

1. AVILA A. G., 1996. "Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha" Tesis de Maestría en Ciencias (Microbiología) FES-Cuautitlán, UNAM. Edo. de México.
2. BARNES R.D., 1987. "Zoología de los invertebrados" 5a. Edición. Ed. Interamericana. PP.:13-38.
3. BOS H., Volker-Dieben H. and Kok-van A., 1981. "A case of *Acanthamoeba* keratitis in The Netherlands" Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 75: 86-91.
4. BUCK S. and Rosenthal R., 1996. "A quantitative method to evaluate neutralizer toxicity against *Acanthamoeba castellanii*" Appl. Environ. Microbiol. 62 (9): 3521-3526.
5. CARTER R.F., Cullity G., Ojeda V., Silberstein P. and Willaert E., 1981. "A fatal case of meningoencephalitis due to a free-living amoeba of uncertain identity probably *Acanthamoeba* sp." Pathol. 13: 51-68.
6. CETENAL, carta geológica, 1978 E 14 A 39, Ciudad de México. Escala 1:50 000. México.
7. CETENAL, carta topográfica, 1980 E 14 A 39, Ciudad de México. Escala 1:50 000. México.
8. CLELAND P., Lawande R., Onyemelukwe G. and Whittle H., 1982. "Chronic amebic meningoencephalitis" Arch. Neurol. 39: 56-57.
9. CORDOVILLA P., Valdivia E., Gonzalez-Segura A., Galvez A., Martínez-Bueno M. and Maqueda M., 1993. "Antagonistic action of the bacterium *Bacillus licheniformis* M-4 toward the amoeba *Naegleria fowleri*" J. Euk. Microbiol. 40 (3): 323-328.
10. CULBERTSON C.G., Holmes D.H. and Overton W.N., 1965. "*Hartmannella castellanii* (*Acanthamoeba* sp.) Preliminary report on experimental chemotherapy" Am. J. Clin. Pathol. 43 (4): 361-364.
11. CULBERTSON C.G., Smith J., Cohen H. and Minner J., 1959. "Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*" Am. J. Pathol. 35: 185-197.
12. DAS S.R., Asiri S., El-Soofi A. and Baer H., 1991. "Protective and curative effects of rifampicin in *Acanthamoeba* meningitis of the mouse" J. Infect. Dis. 163: 916-917.

13. Di GREGORIO C., Rivasi F., Mongiardo N, De Rienzo B., Wallace S. and Visvesvara G., 1992. "*Acanthamoeba* Meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome". Arch. Pathol. Lab. Med. 116:1363-1365.
14. DRIEBE W., Stern G., Epstein R., Visvesvara G., Adi M. and Komadina T., 1988. "*Acanthamoeba* keratitis. Potential role for topical clotrimazole in combination therapy" Arch. Ophthalmol. 106: 1196-1201.
15. FERRANTE A., Abell T.J., Robinson B. and Lederer E., 1986. "Effects of sinefungin and difluoromethylornithine on pathogenic free-living amoebae in vitro" FEMS Microbiology Letters 40: 67-70.
16. FICKER L., Seal D, Warhurst D. and Wright P., 1990. "*Acanthamoeba* keratitis-resistance to medical therapy" Eye 4:835-838.
17. FRANKE E. D. and Mackiewicz J.S, 1982. "Isolation of *Acanthamoeba* and *Naegleria* from the intestinal contents of freshwater fishes and their potential pathogenicity" J. Parasitol. 68: 164-166.
18. GARG S. C. and Dengre S.L., 1992. "Composition of the essential oil from the leaves of *Buddleja asiatica*" Lour. Flavour and Fragrance Journal 7 (3): 125 - 127.
19. GONZALEZ P D., 1994 "Estudio biomédico de queratitis producida por *Acanthamoeba* sp." Tesis de licenciatura de Biología. ENEP Iztacala, UNAM. México.
20. GORDON S., Steinberg J., DuPuis M., Kozarsky P., Nickerson J. and Visvesvara G., 1992. "Culture isolation of *Acanthamoeba* species and leptomyxid amebas from patients with amebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS" Clin. Infect. Dis. 15: 1024-30.
21. GUPTA S, Kishore P and Shukla O., 1987. "Polyamine metabolism as a target for grow inhibition of *Acanthamoeba culbertsoni*" Am. Soc. Trop. Med. Hyg. 337 (3): 550-555.
22. HOUGHTON P.J., 1984. "Ethnopharmacology of some *Buddleia* sp." J. Ethnopharmacol. 11: 293-308.
23. HOUGHTON P.J., 1985. "Lignans and neolignans from *Buddleja daviddi* Franch". Phytochem. 24 (4): 819-826.
24. HOUGHTON P.J., 1989. "Phenolic fatty acid esters from *Buddleja globosa* Stembark". Phytochem. 28 (10): 2693-2695.

25. ISHIBASHI Y., Matsumoto Y., Kabata T., Watanabe R., Hommura S., Yasuraoka K. and Ishii K., 1990. "Oral itraconazole and topical miconazole with debridement for *Acanthamoeba keratitis*" Am. J. Ophthalmol. 109 : 121-126.
26. JAWETZ E., Melnick J., Adelberg E., Brooks G., Butel J y Ornston N., 1992. "Microbiología Médica" 14a. Edición Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México. P.: 369-374.
27. JOHN D. T., 1993. "Opportunistically pathogenic free-living amoebae" Parasitic Protozoa. 2^a Edition. Volume 3 Edited by Julius P. Kreier & John R. Baker Academic Press, Inc., San Diego, Cal., USA.
28. JOHN T., Desai D. and Sahn D., 1989. "Adherence of *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites to unworn soft contact lenses" Am. J. Ophthalmol. 108: 658-664.
29. JOHNS K., O'Day D., Head W., Neff R. and Elliott J., 1987. "Herpes simplex masquerade syndrome: *Acanthamoeba keratitis*" Curr. Eye Res. 6: 207-212.
30. JONES D., Visvesvara G. and Robinson N., 1975. "*Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis" Trans. Ophthalmol. Soc. U.K. 95: 221-232.
31. KEY S., Green W., Willaert E., Stevens A. and Key S., 1980. "Keratitis due to *Acanthamoeba castellanii*" Arch. Ophthalmol. 98: 475-479.
32. KILVINGTON S.L., White D.G. and Beeching J.R., 1990. "Laboratory investigation of *Acanthamoeba keratitis*" J. Clin. Microbiol. 18 (2): 2722-2725.
33. KINGSTON N. and Taylor P., 1976 "*Naegleria* sp. an amoeboflagellate from *Physa gyrina* Say in a high mountain lake in Wyoming" Proc. Helminthol. Soc. Wash. 43: 227-229.
34. LALITHA M., Anando V., Srivastava A., Thomas K., Cherian A and Chandi M., 1985. "Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis" J. Clin. Microbiol. 21: 666-667.
35. LEBBADI M, Valdivia E., Gálvez A., Martínez-Bueno M. and Maqueda M., 1995. "Cocultivation of the amoeba *Naegleria fowleri* and the amoebicidin-producing strain *Bacillus licheniformis* M-4" Appl. Environ. Microbiol. 61 (4): 1649-1652.
36. LINDQUIST T.D., Asher N., and Doughman D.J., 1988. "Clinical signs and medical therapy of early *Acanthamoeba keratitis*" Arch. Ophthalmol. 106: 73-77.

37. LOPEZ J., Sierra J., Vegazo M.E. and Cortés M., 1979. "Chemical constituents of *Buddleja globosa* Lam" *Fitoterapia* 50: 195-198.
38. LOPEZ V E., 1988. "Contribución etnobotánica en plantas medicinales utilizadas por dos grupos étnicos de Mecapalapa, Municipio de Pantepec, Puebla" Tesis de licenciatura de Biología. ENEP Iztacala, UNAM. México.
39. LOZOYA X., Aguilar A y Camacho J. "Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana" *Rev. Med. IMSS (México)* 25 (4): 283-291.
40. LUND O., Stefani F. and Dechant W., 1978. "Amoebic keratitis. A clinicopathological case report" *Brit. J. Ophthalmol.* 62: 373-375.
41. MANNIS M., Tamaru R., Roth A., Burns M. and Thirkill C., 1986. "Acanthamoeba sclerokeratitis" *Arch. Ophthalmol* 104: 1313-1317.
42. MARIN G., Gimenez B., Cortés M., Pardo F., Núñez J. y Naranjo J., 1977 "Estudio fitoquímico de *B. globosa* Lam. Buddlejaceae". *Rev. Latinoamer. Quím.* 10: 19-21. Santiago, Chile.
43. MARTINEZ A.J., 1980 "Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection?" *Neurol.* 30: 576-574.
44. MARTINEZ A.J., 1985. "Free-living amebas: Natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease" CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
45. MARTINEZ A.J., 1987. "Clinical manifestations of free-living amebic infections". In: "Amphizoic Amoebae: Human Pathology" (EG Rondanelli, de) pp. 161-177. Piccin. Pauda, Italy.
46. MERCK E.A. and Darmstadt G. "Chromatography". Germany. Sin año de impresión.
47. NAGINGTON J., Watson P.G., Playfair T.J., Mc. Gill J., Jones B. and Steele McG., 1974 "Amoebic infection of the eye". *The Lancet*, December 28.
48. NATHAN P.J., 1974. "Separaciones cromatográficas" Depto. de Química, CINVESTAV, IPN. México.
49. OFORI-KWAKYE S., Sidebottom, D., Herbert J., Fischer E. and Visvesvara G., 1986. "Granulomatous brain tumor caused by *Acanthamoeba*" *J. Neurosurg.* 64: 505-509.
50. ORTIZ Z. E., 1996 "Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleia cordata*". Tesis de licenciatura de Biología. ENEP Iztacala, UNAM. México.

- 51.OSATO M.S., Robinson N.M., Wilhelmus K.R. and Jones D.B., 1991. "In vitro evaluation of antimicrobial compounds for cysticidal activity against *Acanthamoeba*" Rev. Infect. Dis. 13 (Suppl. 5): S431-5.
- 52.PARDO F., Perich F., Villarroel L. and Torres R., 1993. "Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves" J. Ethnopharmacol. 39: 221-222. Santiago, Chile.
- 53.PLACE D.A., Allen S.D. and Culbertson C.G., 1993. "Antimicrobial susceptibility testing of free-living amoebae using a new assay system" Abstracts of the 93 Annual meeting ASMC 193.
- 54.PLACE D.A., Allen S.D. and Culbertson C.G., 1994. "Improved method for in vitro susceptibility testing of free-living amoebae" 47th Annual Meeting of the Society of Protozoologists.
- 55.PRINGLE H.L., Bradley S.G. and Harris L.S., 1979. "Susceptibility of *Naegleria fowleri* to Δ -tetrahydrocannabinol" Antimicrob. Agents Chemother. 16 (5): 674-679.
- 56.ROMBOUTS J.E. and Links J., 1956. "The chemical nature of the antibacterial substance present in *Aucuba japonica*" Thunbg. Experientia XII (2): 78-80.
- 57.RZEDOWSKI J. y Rzedowski C.G., 1985. Flora fanerogámica del Valle de México Vol. II dicotiledoneae (Euphorbiaceae - Compositae). Ed. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas I.P.N. e Instituto de Ecología. México. PP.: 212-215.
- 58.SHARMA S., Srinivasan M. and George C., 1990. "*Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers" Arch. Ophthalmol. 108: 676-678. Madurai, India.
- 59.SCHUSTER F.L. and Jacob L.S. 1992. "Effect of magainins on ameba and cyst stages of *Acanthamoeba polyphaga*". Antimicrob. Agents Chemother. 36 (6): 1263-1271.
- 60.SCHUSTER F.L. and Mandel N., 1984 "Phenothiazine compounds inhibit in vitro growth of pathogenic free-living amoebae" Antimicrob. Agents Chemother. 25: 109-112.
- 61.STEHR-GREEN J, Bailey T. and Visvesvara G., 1989 "The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States" Am. J. Ophthalmol. 107: 331-336.
- 62.STEVENS A., Shulman S., Lansen T., Cichon M., and Willaert E., 1981. "Primary amoebic meningoencephalitis: A report of two cases and antibiotic and immunologic studies" J. Infect. Dis. 143: 193-199.

63. TAYLOR P.W., 1977. "Isolation and experimental infection of free-living amebae in freshwater fishes" J. Parasitol. 63: 232-237.
64. TOMLINSON T., 1992. "Pharmacology of *Acanthamoeba* extended abstracts" Rev. Infect. Dis. 13 (Suppl. 5): S436-7.
65. VARGA J., Wolf T., Jensen H., Parmley V. and Rowsey J., 1993. "Combined treatment of *Acanthamoeba* keratitis with propamidine, neomycin, and polyhexamethylene biguanide" Am. J. Ophthalmol. 115: 446-470.
66. VISVESVARA G.S., Martínez J., Theodore F., Daggett P. and Sawyer T., 1990 "Naegleria and *Acanthamoeba* Infections: Review" Rev. Infect. Dis. 12 (3): 490-513.
67. VISVESVARA G.S., Schuster F.L. and Martínez J., 1993. "*Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. sp. agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals" J. Euk. Microbiol. 40 (4): 504-514.
68. WILHELMUS K., Osato M., Font R., Robinson N. and Jones D., 1986. "Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcofluor white" Arch. Ophthalmol. 104: 1309-1312.
69. WRIGHT P., Warhurst D. and Jones B., 1985. "*Acanthamoeba* keratitis successfully treated medically" Br. J. Ophthalmol. 69: 778-782.
70. YAMAMOTO A., Nitta S., Miyase T. and Ueno A. An Wu L., 1993 "Phenylethanoid and lignan-iridoid complex glucosides from roots of *Buddleja davidii*" Phytochem. 32 (2): 421-425.
71. YEOH R., Warhurst D. and Falcon M., 1987 "*Acanthamoeba* keratitis" Br. J. Ophthalmol. 71: 500-503.
72. YOSHIDA T., Nobuhara J., Uchida M. and Okuda T., 1978 "1-Studies on the constituents of *Buddleja* species. Y structures of buddledin a and b, two new toxic sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch" Chem. Pharmacol. Bull. 26 (8): 2535-2542.
73. YOSHIDA T., Nobuhara J., Fiji N. and Okuda T., 1978 "2-Studies on the constituents of *Buddleja* species. Ii buddledin c, d and e, new sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch" Chem. Pharmacol. Bull. 26 (8): 2543-2549.

APENDICE

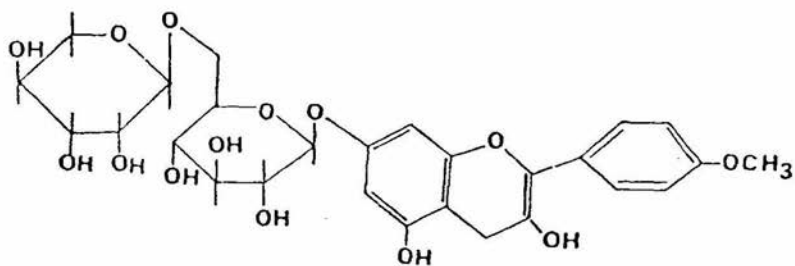


Fig. No.5 Linarina

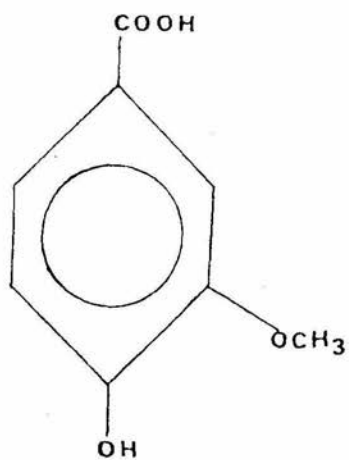


Fig. No. 6 Acido Vainillínico

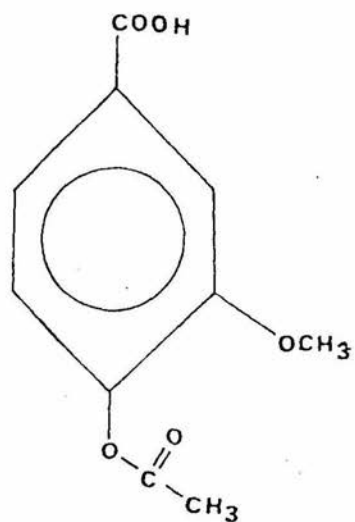


Fig. No. 7 Acido Vainillínico Acetilado

Características de las cepas					Tep H ₂ O		Tep MeOH		Linarina		AVA	
ESPECIE	Clave	Aislamiento	Origen	G. de P.	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q
<i>Acanthamoeba astronixis</i>	30137	Suelo	ATCC	P.O.	X	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30011	C. de Lev.	ATCC	P.O.	X	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30234	C. de Lev.	ATCC	P.O.	A	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30869	Suelo	ATCC	P.O.	A	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30010	Suelo	ATCC	P	A	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30898	Pozo	ATCC	P	A	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba comandoni</i>	32	Aire	AMB.	N.P.	X	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba griffini</i>	30731	Agua	ATCC	P.O.	X	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	30730	Sedimento	ATCC	P	X	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba healyi</i>	30866	Cult. Riñ.Mon	ATCC	P	X	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	30732	Sed. Marino	ATCC	P	A	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	30841	Alberca	ATCC	P	A	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	30	Agua Trat.	AMB.	P	X	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba palestiniensis</i>	30870	Suelo	ATCC	P.O.	A	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	31	Aire	AMB.	N.P.	X	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30461	Cornea	ATCC	P.O.	A	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30486	Suelo	ATCC	P.O.	X	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30173	Cav. Nasal	ATCC	P.O.	A	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30899	Tract. Resp.	ATCC	P	X	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	30973	Suelo	ATCC	P.O.	X	X	X	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba royreba</i>	30844	Cel. Corion.	ATCC	P	X	X	A	X	D	X	A	X
<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	30867	Suelo	ATCC	N.P.	X	X	A	X	D	X	A	X
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	22	Agua Subt.	AMB.	N.P.	A	X	A	X	D	X	A	X
<i>Hartmannella vermiformis</i>	23	Agua Subt.	AMB.	N.P.	A	X	X	X	D	X	A	X
<i>Hartmannella vermiformis</i>	30966	Agua dulce	ATCC	P.O.	A	X	A	X	D	X	A	X
<i>Vahlkampfia avara</i>	30964	Agua dulce	ATCC	N.P.	X	X	A	X	D	X	A	X
<i>Vahlkampfia inornata</i>	30965	Agua dulce	ATCC	P.O.	A	X	A	X	D	X	M	X
<i>Vahlkampfia sp.</i>	13	Agua Subt.	AMB.	N.P.	A	X	A	X	D	X	A	X
<i>Vahlkampfia sp.</i>	14	Agua Subt.	AMB.	N.P.	X	X	X	X	D	X	A	X

Cuadro No. 1. Sensibilidad a los extractos y compuestos puros de *B. cordata* a una concentración de 32mg/ml.

C. de Lev.= Cultivo de levaduras Cult. Riñ.Mon.= Cultivo de células de riñón de mono Sed. Marino=Sedimento marino Aguas Trat.= Aguas tratadas Cav. Nasal= Cavidad nasal Tract. Resp.= Tracto respiratorio Cel. Corion= Células coriocarcinomas Aguas Subt.= Aguas subterráneas ATCC= American Type Culture Collection AMB= Aislamientos ambientales G. de P.= Grado de patogenicidad P= Patógena P.O.= Patógena oportunista N.P.= No patógena Tep H₂O= Extracto acuoso de tepozán Tep MeOH = Extracto metanólico de tepozán AVA= Acido vainillínico acetilado T= Trofozoito Q= Quiste X= Sin efecto A= Amebostático M= Amebicida D= Trofozoito dañado.

Concentraciones de Linarina

ESPECIE	Clave	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
		I	Q	I	Q	I	Q	I	Q	I	Q	I	Q	I	Q	I	Q	I	Q	I	Q	I	Q
<i>Acanthamoeba astrontexis</i>	30137	P	P	P	D	X	P	X	D	X	P	X	P	X	X	X	X	P	X	X	X	P	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30011	D	X	D	X	P	X	D	D	D	*	A	X	A	X	P	*	X	X	X	D	*	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30234	D	P	D	P	D	P	A	*	P	D	P	*	X	X	X	D	X	X	X	D	X	*
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30869	D	D	D	P	P	P	D	D	D	X	D	X	A	X	A	X	*	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30010	D	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30898	D	X	P	X	P	P	P	P	A	P	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba comandoni</i>	32	D	P	D	D	D	D	X	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba griffini</i>	30731	P	X	D	P	X	P	X	D	X	P	X	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	30730	D	P	P	D	D	A	P	P	P	X	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba healyi</i>	30866	D	X	P	X	D	X	P	X	P	X	P	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	30732	D	P	D	X	D	X	D	*	D	X	A	X	A	*	X	X	X	*	X	*	X	*
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	30841	D	P	P	D	P	*	A	D	D	*	X	X	X	*	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	30	D	P	D	D	P	D	D	X	D	X	*	X	X	X	A	X	X	X	X	X	X	
<i>Acanthamoeba palestiniensis</i>	30870	D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	D	X	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	31	D	P	D	P	D	P	D	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30461	D	D	D	D	D	D	D	D	D	*	X	X	X	X	X	A	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30486	D	P	D	P	X	*	X	X	X	*	X	X	X	A	X	*	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30173	P	X	D	X	D	P	P	X	P	D	P	D	P	X	*	D	X	X	*	D	A	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30899	P	P	P	X	P	P	P	P	P	X	A	X	A	X	P	P	A	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	30973	D	X	D	P	D	X	D	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba royreba</i>	30844	D	P	D	D	D	X	X	X	D	X	D	P	D	P	X	P	X	X	X	P	X	P
<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	30867	D	D	P	D	D	P	X	D	A	D	X	X	X	X	X	A	X	A	X	A	X	A
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	22	D	X	D	X	D	X	D	X	D	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Hartmannella vermiformis</i>	23	D	X	D	*	D	*	D	D	D	X	D	X	A	*	A	X	A	*	A	X	X	X
<i>Hartmannella vermiformis</i>	30966	D	P	D	P	D	*	P	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Vahlkampfia avara</i>	30964	D	D	D	X	D	P	D	P	D	X	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Vahlkampfia ornata</i>	30965	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	P	D	P	D	P	D	X	X	*	X	P
<i>Vahlkampfia sp.</i>	13	D	X	D	X	D	*	D	*	D	P	A	D	X	X	A	X	A	X	A	X	X	X
<i>Vahlkampfia sp.</i>	14	D	X	D	P	D	P	D	X	D	X	D	X	X	P	X	X	X	X	X	P	X	*

Cuadro No. 2. Sensibilidad de las AVL a diferentes concentraciones de Linarina.

Concentraciones de linarina (mg/ml):

1= 32 2= 16 3= 8 4= 4 5= 2 6= 1 7= 0.5 8= 0.25 9= 0.125 10= 0.0625 11= 0.03125

X= Sin efecto A= Amebostático D= Trofozoito dañado P= Partículas de linarina *= Sin inóculo

Concentraciones de AVA

ESPECIE	Clave	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11	
		T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q	T	Q
<i>Acanthamoeba astronixis</i>	30137	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30011	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30234	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30869	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30010	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30898	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba comandoni</i>	32	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba griffini</i>	30731	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	30730	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba healyi</i>	30866	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba jacobsi</i>	30732	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	30841	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	30	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba palestiniensis</i>	30870	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	31	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30461	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30486	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30173	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	30899	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	30973	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Acanthamoeba royreba</i>	30844	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Acanthamoeba tubiashi</i>	30867	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	22	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Hartmannella vermiformis</i>	23	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Hartmannella vermiformis</i>	30966	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Vahlkampfsia avara</i>	30964	A	X	A	X	A	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Vahlkampfsia inornata</i>	30965	M	X	A	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Vahlkampfsia sp.</i>	13	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X
<i>Vahlkampfsia sp.</i>	14	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X	A	X

Cuadro No. 3. Sensibilidad de las AVL a diferentes concentraciones de AVA

Concentraciones del AVA (mg/ml):

1= 32 2= 16 3= 8 4= 4 5= 2 6= 1 7= 0.5 8= 0.25 9= 0.125 10= 0.0625 11= 0.03125

X = Sin efecto A = Amebostático M = Amebicida