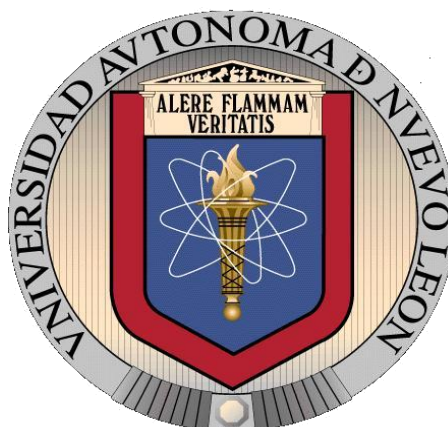


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE ESPECIES
MEXICANAS DE ANÍS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
BIOLÓGICA SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

POR

QBP. YADIRA QUIÑONES GUTIÉRREZ

**TESIS QUE PRESENTA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

NOVIEMBRE DE 2012

**ANÁLISIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE ESPECIES
MEXICANAS DE ANÍS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
BIOLÓGICA SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

Aprobación de la Tesis

Presidente: Dra. María Julia Verde Star

Secretario: Dra. Catalina Rivas Morales

Vocal: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

Vocal: Dr. Abelardo Chávez Montes

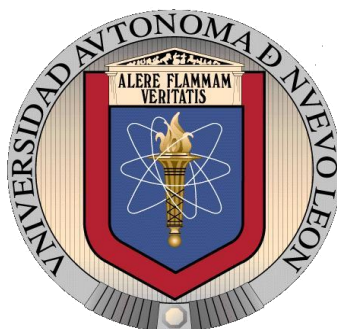
Vocal: Dr. Roberto Mercado Hernández

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

NOVIEMBRE DE 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ANÁLISIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE ESPECIES
MEXICANAS DE ANÍS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD
BIOLÓGICA SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

POR

QBP. YADIRA QUIÑONES GUTIERREZ

Que presenta como requisito parcial

para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** con

Acentuación en **QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de Fitoquímica y Química Analítica del Departamento de Química y en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de:

Dra. María Julia Verde Star
Director

Dra. Ma. Porfiria Barrón González
Asesor

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

NOVIEMBRE DE 2012

DEDICATORIA

Para quienes son mi vida entera:

A mi Madre, porque gracias a ti soy quien soy, por tu ejemplo de fortaleza y humanidad, porque siempre me motivaste en cada proyecto de mi vida y aun con tu ausencia física y desde el cielo sigues dándome vida...te extraño y te amo siempre.

A mis hijos Josafat y Brayan la razón de mi existir, no existe otra palabra si no se las diría ...los amo.

Al compañero de mi vida Cesar por que siempre has estado a mi lado en las buenas y en las malas, hoy te sigo amando con todo mi corazón. Gracias por darme la oportunidad de conocer dos mundos maravillosos a tu lado.

A mi pequeñita Anita, mi yuyu, porque tu y yo tenemos un pacto y amarnos siempre será nuestro gran secreto.

A Luz, Edgar, Enoc porque aunque los kilómetros nos separen, al amor de hermanos siempre nos acercaran.

A mi tia tere, tia tita, fabis por estar al pendiente de mi y de mis hijos.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología becario No. 204368, por la beca que me fue otorgada.

Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Departamento de Química: Laboratorios de Fitoquímica y Química Analítica

Departamento de Biología y Genética: Laboratorio de Biología Celular

Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Laboratorio de Química Analítica

AGRADECIMIENTOS

A la Dra.Ma. Julia Verde Star, por ser ejemplo a seguir de que lo humano y lo profesional si pueden ir de la mano hacia el éxito, gracias Dios por tener tanto espacio en este mundo y darme la oportunidad de coincidir con ella, mil gracias Doctora Julia.

A la Dra.Catalina Rivas Morales, gracias doctora por su disposición de compartir toda su experiencia, por ser un ejemplo con su trayectoria y sobre todo por motivarme siempre a culminar este proyecto.

A la Dra.Azucena Oranday Cardenas, gracias por compartir su conocimientos y por darme los consejos y palabras de apoyo que me llevaban a pensar positivo y darme aliento a seguir adelante.

A la Dra.María Porfiria Barrón González, infinitamente gracias por su incondicional ayuda a la elaborar este trabajo, por enseñarme a retomar ideas y seguir siempre adelante, por esas largas tardes de trabajo, mil gracias.

Al Dr.Abelardo Chávez Montes, por sus acertados consejos y por su disposición para realizar este trabajo

Al Dr Roberto Mercado Hernández, por su disposición para este trabajo siempre con una actitud de profesionalismo y humana.

A Carmen Vázquez por compartir la mesa de trabajo, de comida, de risa y de llantos, muchísimas gracias.

A la Lic.Denis, Ing.Martha, Ing.Luis, Dr.Balde, porque dentro de nuestras loqueras siempre están al pie del cañon, para hacerme sonreír, gracias que haría yo sin esas sonrisas de lunes a viernes.

TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos	v
Tabla de contenido	vii
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiii
Nomenclatura	xiv
Resumen y Abstract	xv

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	5
3. OBJETIVOS	6
3.1 Objetivo general	6
3.2 Objetivos específicos	6
4. ANTECEDENTES	8
4.1 Uso de plantas medicinales	8
4.2 Efectos de los extractos de plantas sobre bacterias	11
4.3 Efectos de los extractos de plantas sobre <i>E.histolytica</i>	12
4.4 Plantas en estudio	14
4.4.1 <i>Illicium anisatum</i>	14
4.4.2 <i>Pimpinella anisum</i>	17
4.4.3 <i>Illicium verum</i>	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1 Colecta e identificación de material vegetal de estudio	25
5.2 Extracción Soxhlet	25
5.2.1 Obtención de los extractos de las plantas en estudio	26
5.3 Pruebas para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos	27
5.3.1 Activación de las bacterias	28

5.3.2 Cultivo de bacterias	28
5.3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana	28
5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos que muestran actividad biológica	29
5.5 Identificación de las fracciones con actividad bacteriana	30
5.5.1 Cromatografía de capa delgada de los extractos con concentración mínima inhibitoria relevante para la separación de fracciones	30
5.5.2 Identificación de fracciones activas	31
5.6 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS, bajo condiciones axénicas <i>in vitro</i>	32
5.6.1 Cinética de Crecimiento	32
5.6.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀)	33
5.6.2.1 <i>Illicium anisatum</i>	33
5.6.2.2 <i>Pimpinella anisum</i>	33
5.6.2.3 <i>Illicium verum</i>	33
5.6.3 Evaluación de la actividad antiamebiana de las fracciones del extracto metanólico de <i>P. anisum</i> .	35
5.7 Identificación parcial de los componentes de los extractos	36
5.7.1 Identificación de grupos funcionales	36
5.8 Análisis Estadísticos	40
5.9 Análisis espectroscópicos	41
5.9.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	42
5.9.2 Espectroscopía de masas	42
6. RESULTADOS	
6.1 Extractos vegetales	43

6.1.1 Obtención de extractos metanólicos y hexánicos de <i>P.anisum</i> . <i>I. anisatum, I.verum</i>	43
6.1.2 Identificación parcial del compuestos de plantas en estudio	44
6.2 Actividad bactericida de los extractos de las plantas en estudio	45
6.3 Actividad amebicida de los extractos metanólicos y hexánicos de <i>P.anisum, I. anisatum e I.verum</i> sobre Entamoeba histolytica	47
6.3.1 Cinética de crecimiento	47
6.3.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀)	48
6.4 Separación de fracciones por cromatografía del extracto metanólico <i>P. anisum</i>	53
6.5 Evaluación de la fracción del extracto metanólico de <i>P.anisum</i>	54
6.5.1 Evaluación de actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico de <i>P. anisum</i>	54
6.5.2 Evaluación de actividad antimibiana de las fracciones del extracto metanólico de <i>P. anisum</i>	55
6.6 Análisis espectroscópicos del compuesto obtenido de una fracción del extracto <i>P. anisum</i>	56
6.6.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	56
6.6.2 Espectroscopia de masas	61
7. DISCUSIÓN	62
8. CONCLUSIONES	68
9. LITERATURA CITADA	70
10. APÉNDICES	83
10.1 Resumen Curricular	84
10.2 Artículo	85

LISTA DE FIGURAS

No.	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	<i>Illicium anisatum</i> (anís estrellado japonés o badiana de Japón)	14
2	Imagen foliar de <i>P. anisum</i> (anís verde) (a) e imagen de la semilla (b).	17
3	<i>Illicium verum</i> (anís estrellado, anís estrellado chino, badiana de China)	20
4	Extractor Soxhlet	25
5	Diagrama de obtención de los extractos	26
6	Determinación de la actividad antimicrobiana	29
7	Cromatografía en capa fina	31
8	Determinación Concentración Inhibitoria Media(CI ₅₀) sobre <i>E. histolytica</i>	34
9	Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	47
10	CI ₅₀ de los extractos metanólico y hexánico de <i>P. anisum</i> , <i>I. verum</i> e <i>I. anisatum</i> sobre el cultivo axénico in vitro de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	49
11	Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto metanólico del fruto de <i>P. anisum</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	50
12	Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto metanólico	50

	del fruto de <i>I. llicium verum</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	
13	Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto metanólico del fruto de <i>I. anisatum</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	51
14	Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto hexánico del fruto de <i>I. anisatum</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	51
15	Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀) del extracto hexánico del fruto de <i>I. verum</i> sobre <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS.	52
16	Determinación de CMI de la fracción del extracto metanólico de <i>P. anisum</i> con actividad sobre <i>E. coli</i>	54
17	Actividad antimibiana de fracciones de extracto metanólico de <i>P. anisum</i>	55
18	Espectro de 1H-RMN (499 MHz) General del Compuesto obtenido de una fracción del extracto de <i>P. anisum</i>	56
19	Espectro de 1H-RMN(499 MHz) General del Compuesto obtenido de una la fracción 7 del extracto de <i>P. anisum</i>	57
20	Ampliación del Espectro de 1H-RMN del Compuesto obtenido de una fracción del extracto de <i>P. anisum</i>	57
21	Espectro COSY del Compuesto obtenido de una fracción del extracto de <i>P. anisum</i>	59
22	Espectro de Masas General del Compuesto obtenido de una fracción del extracto de <i>P. anisum</i>	61
23	Estructura propuesta para el compuesto obtenido de una fracción del extracto de <i>P. anisum</i>	61

LISTA DE TABLAS

No. TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
I	Microorganismos utilizados	27
II	Procedimiento para realizar las pruebas de identificación química	36
III	Rendimiento de los extractos y parte utilizada de las plantas	43
IV	Grupos funcionales de los extractos metanólicos y hexánicos de <i>I. anisatum</i> , <i>P. anisum</i> e <i>I. verum</i> .	44
V	Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre bacterias patógenas.	45
VI	Actividad antibacteriana de los extractos hexánicos sobre bacterias patógenas	46
VII	Comparación del valor CI_{50} de los extractos metanólico y hexánicos de las plantas en estudio	48
VIII	Fracciones obtenidas de el extracto metanólico de <i>P. anisum</i>	53
IX	Datos espectroscópicos de 1H -RMN del compuesto de la fracción siete del extracto metanólico de <i>P. anisum</i>	58
X	Correlación del espectro COSY del compuesto obtenido de la fracción siete del extracto metanólico de <i>P. anisum</i>	60

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abs	Absorbancia
%	Por ciento
°C	Grados centígrados
cel	Células
CCF	Cromatografía en capa fina
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria Media
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COSY	Correlation Spectroscopy
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
¹³ C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
d	Días
δ	Desplazamiento Químico
g	Gramos
G	Tiempo de generación
h	Horas
IR	Infrarrojo
m	Metros
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Mililitros
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
P/E	Penicilina/Estreptomicina
PAHO	Pan American Health Organization
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
µg	Microgramos
µl	Microlitros

RESUMEN

Debido al uso indiscriminado de medicamentos para el control de enfermedades causadas por microorganismos patógenos al hombre, éstos han desarrollado drogo-resistencia, por lo que los productos naturales de plantas representan una alternativa para el control de enfermedades que aquejan al género humano, la Organización Mundial de la Salud registra que un 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para su atención primaria. En este trabajo fueron evaluadas las actividades bactericida y amebicida de extractos metanólicos y hexánicos de diferentes especies mexicanas conocidas como anís (*Illicium anisatum*, *Pimpinella anisum* e *Illicium verum*) e identificada parcialmente la presencia de compuestos químicos en los extractos, los cuales mostraron actividad bactericida contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*; estos extractos también mostraron actividad inhibitoria sobre el crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS. Mediante separación por cromatografía en capa fina del extracto metanólico de *P.anisum* se aisló una fracción que presentó la mayor actividad amebicida con una $CI_{50} = 0.034 \mu\text{g/mL}$. Empleando las técnicas $^1\text{HRMN}$ y $^{13}\text{CRMN}$ se identificó que el metabolito secundario de *P.anisum* con actividad amebicida es el 1-benzopirilio ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2$), el cual está ampliamente distribuido en las plantas, los resultados obtenidos son prometedores para continuar con futuras investigaciones para la obtención de metabolitos para el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos.

ABSTRACT

Due to the indiscriminate use of medications for the control of diseases caused by micro-organisms pathogenic to man, these have developed drug-resistance, by which natural products from plants represent an alternative for the control of diseases that afflict mankind, the World Health Organization (WHO) reports that 80% of the world's population depends on traditional medicine for their primary care. In this work were evaluated the bactericidal and amebicidal activities of methanol and hexan extracts of different Mexican species known as anise (*Illicium anisatum*, *Pimpinella anisum* e *Illicium verum*) and partially identified the presence of chemical compounds in the extracts, which showed activity bactericide against some of the microorganisms tested by disk diffusion technique, *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, these extracts also showed activity against *E.histolytica* HM1-IMSS under axenic conditions in vitro, through separation by thin layer chromatography of *P.anisum* methanol extract ,was isolated a fraction that presented the highest amebicidal activity with an $IC_{50} = 0.034 \mu\text{g/mL}$. Using the $^1\text{HRMN}$ and $^{13}\text{CRMN}$ techniques has been identified that the secondary metabolite of *P.anisum* with amebicidal activity is 1-benzopyrylium ($\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2$), found widely distributed in plants, the results obtained are promising to continue with future research to obtain metabolites for the development of new chemotherapeutic agents

1. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas como una fuente medicinal se ha utilizado desde inmemorables tiempos (50,000 años a.c.) hasta la fecha ya que se han encontrado evidencias que los Vedas, Mesopotamia, Asirios, han utilizado estas fuentes naturales como remedios o medicamentos que han curado sus enfermedades (Yesilada, 2005). En las plantas existen compuestos químicos que sirven como sistemas de protección y para tratamientos de enfermedades, por lo tanto es importante investigar las propiedades curativas de éstas, y conocer las sustancias activas llamadas líderes las que después de ser modificadas químicamente se utilizan en contra de diferentes enfermedades. La posibilidad de encontrar compuestos activos dentro de los productos naturales que nos ofrezcan a los seres humanos tratamientos que no sean más toxicas para los órganos del ser

humano que para el microorganismo a tratar es de vital importancia (Phillipson J.D.,1994).

Nuestro México es considerado como un país tolerante en referencia al uso de la medicina tradicional y otras formas de atención medica no institucionales, sin embargo el que la medicina tradicional mexicana no tenga reconocimiento oficial nos dificulta

determinar el número real de mexicanos que recurren a ella para tratar sus enfermedades.

En las últimas tres décadas ha renacido el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la industria farmacéutica en su búsqueda de nuevos medicamentos más eficientes (Butler, 2004), importante es señalar que cerca del 30% de los fármacos empleados en los países industrializados proceden o se han modelado a partir de productos vegetales (Newman y Cragg, 2007), por lo que debemos valorar a las plantas como una fuente importante para la producción de medicamentos.

Todas las plantas contienen familias de compuestos relacionados, llamados metabolitos secundarios, que interaccionan y dan como resultado efectos biológicos (Heber, 2007; Sarker *et al.*, 2006). El hecho del porque en nuestra actualidad las plantas sean una alternativa importante para la obtención de nuevas e importantes drogas o compuestos semisintéticos, para varias naciones como China, Nigeria, Tailandia, México podría ser tal vez debido a la presencia de drogo-resistencia que

presentan los microorganismos, el uso indiscriminado de drogas, el difícil acceso a tratamientos convencionales farmacológicos por su elevado costo o disponibilidad (Rates, 2000).

Dentro de las afecciones microbianas a las cuales se enfrenta la población, se encuentran las afecciones de origen bacteriano, parasitarias, virales, micóticas, principalmente.

Una de las afecciones parasitarias y considerada dentro del grupo enfermedades olvidadas por parte de la OMS se encuentra la amibiasis, ocasionada por *Entamoeba histolytica*. La amibiasis tiene una distribución cosmopolita y es considerada como una infección endémica con una incidencia mundial del 12% (Petri *et al.*, 2000). En México representa un problema muy importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad (Gutiérrez y Muñoz; 1994). El sistema nacional de vigilancia epidemiológica reportó 25,766 casos de amibiasis intestinal durante 2012 y de los cuales 388 correspondieron al estado de Nuevo León (Epidemiología SS; 2005). *Entamoeba histolytica* presenta resistencia al metronidazol, considerada el fármaco sistémico de elección, es por ello busca alguna fuente alternativa de origen natural que no presente efectos secundarios al ser humano.

En años recientes, la población mundial ha aumentado su interés en usar drogas naturales y terapias alternativas obtenidas de plantas como infusiones herbales, extractos etanólicos, metanólicos, clorofórmicos, tinturas, suplementos

alimenticios, fitofarmacéuticos y productos farmacéuticos (American Medical Association, 1997).

México es un país en donde su población tiene una relación estrecha en el uso de la medicina tradicional, por tal motivo es de gran importancia aportar científicamente evidencias que avalen su empleo, así como con ayuda de la fitoquímica, determinar las estructuras responsables de la actividad biológica y encontrar las posibles aplicaciones. Lo que puede permitir una mayor disponibilidad de agentes quimioterapéuticos que sean más efectivos, menos tóxicos y que ofrezcan un menor costo del tratamiento en regiones endémicas.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana y amebicida de tres especies de anís contra microorganismos de importancia médica, como una alternativa natural y avalar científicamente su uso como tratamiento natural.

2. HIPÓTESIS

Los extractos de las especies mexicanas de Anís: *Illicium anisatum*, *Pimpinella anisum* e *Illicium verum* presentan actividad biológica sobre microorganismos patógenos para el hombre.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Obtener y caracterizar compuestos activos de las especies mexicanas de anís: *Illicium anisatum*, *Pimpinella anisum* e *Illicium verum* y evaluar su actividad biológica sobre microorganismos patógenos para el humano.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Obtener del material vegetal de diferentes especies de anís: *Illicium anisatum*, *Pimpinella anisum* e *Illicium verum* e identificarlas taxonómicamente.
- ✓ Obtener los extractos hexánico y metanólico del material vegetal en estudio.
- ✓ Evaluar la actividad bactericida de los extractos obtenidos de las diferentes especies de anís sobre *Bacillus subtilis*, *Salmonella sp.*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* y *Salmonella typhi*.
- ✓ Evaluar la actividad antiprotozoaria de los extractos obtenidos de las diferentes especies de anís sobre *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.
- ✓ Determinar la CI_{50} de los extractos activos sobre *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS bajo condiciones axénicas *in vitro*.
- ✓ Separar mediante cromatografía en capa delgada los extractos con actividad biológica relevante e identificar las fracciones activas contra microorganismos patógenos.
- ✓ Obtener la concentración mínima inhibitoria de las fracciones activas.
- ✓ Identificar parcialmente los compuestos que presentan actividad biológica relevante sobre los microorganismos estudiados mediante Análisis espectroscópicos.

4. ANTECEDENTES

4.1 Uso de plantas medicinales

Sin duda alguna el reino vegetal nos ofrece una mayor variedad de sustancias potencialmente útiles aplicables a las enfermedades humanas, en la actualidad se contempla como una alternativa, pero el uso de compuestos naturales obtenidos de plantas data de mucho tiempo atrás. Existen pruebas de que los hombres del Neandertal que ocuparon Irak hace 60.000 años usaban plantas con fines medicinales (Stockwell, 1998). Posteriormente contemplamos ejemplos bien documentados como Hipócrates en la medicina griega, Avicena en la árabe y Paracelso en la centroeuropea que han sido documentados como auténticos especialistas en la aplicación de las plantas en medicina (Domingo *et al*, 2003). El empleo empírico y conocimiento de las propiedades farmacéuticas se conoce en América desde antes de la llegada de los españoles (González Ferrara, 1998).

Nadie sabe exactamente donde se originó el uso de las plantas medicinales por primera vez, seguramente la búsqueda de algún remedio fue algo que se dio en todas las culturas a la vez, fruto del deseo de sanar. La mayoría de las veces los descubrimientos fueron simplemente resultado de la búsqueda de nuevos alimentos, los antepasados tenían que comprobar si las nuevas especies eran comestibles lo que les llevaba a descubrir en su propio cuerpo que muchas de ellos eran evidentemente comestibles; otros venenosos y otros producían efectos diferentes. Los conocimientos de las plantas medicinales se escribieron por

primera vez hace unos 4000 años y aparece en una tablilla de arcilla en la cultura de los Sumerios, un antiguo pueblo que vivía al sur de los ríos Éufrates y Tigris, lo que hoy en la actualidad es Iraq. Se conocen más de 700 formulas en las que aparecen estas plantas y el documento impreso más interesante es el Papiro de Ebers, el año 1700 A.C., y trata sobre el uso de las plantas, indicaciones al médico sobre la preparación e indicaciones al paciente sobre su uso (Panoto-S., 2007).

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerle, 1993; Sheldon *et al.*, 1997; Shrestha y Dhillion, 2003; Katewa *et al.*, 2004). De acuerdo a la OMS (1979) una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Estas plantas también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna.

Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden

utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Akerele, 1993).

En México, la historia de la medicina herbolaria se remonta más allá de la época precolombina, actualmente representa una alternativa económica en el cuidado de la salud (FHEUM, 2001).

En los últimos años las infecciones causadas por microorganismos se han incrementado debido diferentes causas como al aumento de pacientes inmunodeprimidos, uso frecuente de procedimientos como la diálisis, a tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro (Mesa Arango, 2004).

La gran producción de la penicilina en la década de los años cuarenta dio inicio al gran auge con los antibióticos este se probó en cerdos en dosis subterapéuticas como promotor de crecimiento. Los antibióticos son sustancias químicas producidos por especies de microorganismos o sintetizados por métodos químicos, cuya función es suprimir el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente destruirlos (Patiño , 2003).

4.2 Efectos de los extractos de plantas sobre bacterias

Se han realizado diversos estudios de los extractos de plantas sobre los efectos inhibitorios del crecimiento de muchas bacterias. En 1995 se estudiaron los extractos metanólicos de *Camellia sinensis* L. y de *Euphorbia hirta* L., donde se observó que estos extractos presentaron efecto contra la disentería causada por *Shigella spp*, además de no ser citotóxicos sobre el hospedero (Vijaya y Nalini, 1995). Posteriormente en 1996 se estudiaron 20 extractos metanólicos de plantas contra *S. aureus*, *E.coli*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*, los resultados mostraron que los extractos de *Eucaliptus globolus*, *Punica granatum*, *Artemisia mexicana* y *Bocconia arborea* poseen actividad contra estas bacterias (Navarro *et al.*, 1996). En 1997, se investigaron 15 extractos de plantas de la familia Chenopodiáceas donde analizaron alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, saponinas, esteroides y/o terpenos y taninos, y se encontró que en la mayoría de los extractos tienen actividad antimicrobiana contra *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis* (Alsaleh y *et al.*, 1997).

4.3 Efecto de los extractos de plantas sobre *E. histolytica*

La amibiasis es definida por WHO (World Health Organization) y PAHO (Pan American Health Organization) como “la condición de portar al parásito *Entamoeba histolytica* con o sin manifestaciones clínicas” (OMS, 1997).

La amibiasis es la segunda causa de muerte por enfermedades parasitarias en el mundo (Stanley, 2003). Ésta es un importante problema en países en vía de desarrollo y es responsable de aproximadamente de 40 000 a 100 000 muertes a nivel mundial (Bharti *et al* ,2002; Long *et al*, 2007).

Este protozooario parásito tiene una distribución cosmopolita con mayor prevalencia en los países en vías de desarrollo en donde imperan condiciones de sanidad deficientes e inadecuadas; la mayoría de las infecciones son asintomáticas y puede aparecer meses o años después de haber sido expuesto (Pritt y Clark, 2008). En México, un estudio gubernamental reportó en el año 2003, 4 556 casos causados por infecciones intestinales (Paniagua *et al*, 2007). Para el tratamiento de la amibiasis la droga de elección es el metronidazol y sus derivados imidazoles, sin embargo; *E. histolytica* ha desarrollado un mecanismo de resistencia a esta droga sistémica (Wassmann *et al*, 1999), Así mismo; se han reportado cepas de *E. histolytica* que presentan multidrogorresistencia (Orozco *et al*, 2002); por otra parte, Samarawickream, *et al.*, 2007, reporta que esta droga es mutagénica, carcinogénica y neurotóxica (en bacterias, hamsters y gatos respectivamente).

Poco se ha estudiado sobre los efectos de los extractos de las plantas contra *E. histolytica*. Las investigaciones serias comienzan desde 1990, con el extracto acuoso de la planta *Punica granatum L* y el efecto de sus alcaloides y taninos.

Estos extractos y compuestos se usaron a concentraciones de 1 a 1,000µg/mL e inhibieron el crecimiento de *E. histolytica* y *E. invadens* (Segura *et al.*, 1990).

Después no fue hasta 1995, cuando se estudió el efecto del extracto etanólico de *Boerhavia difusa*, *Berberis aristata*, *Tinospora cordifolia*, *Terminalia chebula* y *Zingiber officinale* (usadas en la India) contra *E. histolytica* demostrando que solamente los extractos de *T. cordifolia* y *B. aristata* inhibieron el crecimiento de este protozooario *in vitro* (Sohni *et al.*, 1990).

4.4 Plantas en estudio

4.4.1 *Illicium anisatum*

La clasificación taxonómica de *Illicium anisatum*, según Hook, F. es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Austrobaileyales

Familia: Illiciaceae

Género: *Illicium*

Especie: *anisatum*

Nombre binomial: *Illicium anisatum*

Fuente: www.wikipedia.org



Fig.1 *I. anisatum* (Anís estrellado japonés o badiana de Japón)

I. anisatum, comúnmente conocido como el **anís estrellado japonés**, es un árbol pequeño con hojas anchas, miden 7.5 cm de largo, que algunas veces son puntiagudas. Las flores son de color amarillo verdoso; sobre cortos soportes, los pétalos son abundantes, angostos y extendidos, definitivamente no son comestibles han sido reportados como altamente tóxico, sin embargo ha sido utilizada quemándola como incienso en Japón, donde es conocido como Shikimi.

I. anisatum es una planta considerada tóxica la cual se encuentra en la lista de plantas de uso restringido según la orden SCO/190/2004 (MSC, 2004)

I. anisatum es nativo de Japón. Es similar a *Illicium verum*, pero su fruto es más pequeño y más débil en su aroma, por lo que se dice que es más parecido a la [de cardamomo](#) que a [anis](#) .

Además de contener un aceite esencial similar en algunos componentes al presente *I. verum* aunque en menor cantidad, en sus frutos y semillas se ha detectado la presencia de lactonas sesquiterpénicas (anisatina, neoanisatina, pseudoanisatina y sus derivados) con un elevado potencial neurotóxico y una toxicidad digestiva. Morfológicamente los frutos de esta especie tóxica son muy similares a los de “badiana de China” motivo por el cual se hace necesario en ocasiones, recurrir a técnicas sofisticadas para su identificación.

A pesar de que es tóxico y por lo tanto inadecuado para el uso interno, se utiliza para el tratamiento de algunos problemas de la piel en [la medicina tradicional china](#), en inciensos.

Anís estrellado japonés contiene [anisatin](#) , shikimin y sikimitoxin , lo que causa una inflamación severa de los [riñones](#) , [vías urinarias](#) y del aparato digestivo. Otros compuestos presentes en las especies tóxicas de *Illicium* se [safrol](#) y [eugenol](#) , que no están presentes en *I. verum* y se utilizan como una gran herramienta de información para identificar su [adulteración](#) .

Es de gran relevancia las consecuencia cuando se utiliza *I. verum* adulterado con *I. anisatum* ya que el uso elevado de esta especie puede provocar efectos adversos aún más graves ya que estos frutos contienen anisatinas y

neoisatinas, antagonistas no competitivos de los receptores A del ácido gammaaminobutírico (GABA), reconocidas como el veneno más potente de origen vegetal (Kakemoto *et al.*,1999).

4.4.2 *Pimpinella anisum*

La clasificación taxonómica de *Pimpinella anisum*, es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Apiales

Familia: Apiaceae

Género: *Pimpinella*

Especie: *anisum*

Nombre binomial: *Pimpinella anisum*



Fig .2 Imagen foliar de *Pimpinella anisum* (anís verde) (a) e imagen de la semilla (b).

P.anisum es una planta con flores de la familia Apiaceae, nativa de la India y el suroeste de Asia. Se trata de una planta anual que puede alcanzar hasta un metro de altura. Las hojas en la base de la planta son simples, de 2-5 cm de largo y lobuladas superficialmente, mientras que las hojas en los tallos son plumosas pinnadas, divididas en numerosos folíolos. Las flores son blancas de 3 mm diámetro, se produce en umbelas densas. El fruto es un esquizocarpo seco, que mide 3-5 mm de largo, la floración se produce de junio a agosto y las flores emanan un aroma dulce, se recolectan los frutos para extraer las semillas

El anís verde o *P.anisum* junto con otras plantas medicinales carminativas tales como el hinojo, la menta, el comino, resulta muy eficaz para reducir la

hinchazón del vientre, evitar las flatulencias y eliminar las náuseas y el mal aliento.

Originario del mediterráneo oriental, según algunos autores fue introducido en España por los árabes en la Edad Media. Actualmente se cultiva en todos los países de clima templado, siendo nuestro país uno de los principales productores.

P.anisum es una de las más antiguas plantas utilizadas en la industria alimentaria, perfumería y medicina, se ha utilizado como estimulante digestivo, antiparasitaria y antifúngica (Soliman 2002) y antipirético (Afifi *et al.*, 1994). Además, la planta y, especialmente, el aceite esencial de la fruta se han utilizado para el tratamiento de algunas enfermedades como la epilepsia y convulsiones (Avicena 1988, Abdul-Ghani *et al.*, 1987). Además para el estreñimiento (Chicouri 2000) y tiene una actividad como un relajante muscular (Albuquerque *et al.*, 1995). Recientemente, se ha informado de que este aceite se ha utilizado como un sustituto de los antibióticos en pollos (Mehmet *et al.*, 2005). Hay pocos informes sobre los estudios de actividad antibacteriana de *P. anisum* (Singh *et al.*, 2002 y Tabanca *et al.*, 2003).

Recientemente, A. Akhtar *et al.*, en 2008, demostraron la actividad bactericida del extracto de metanol de las semillas de *P.anisum* sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

El principal principio activo que le confiere sus propiedades carminativas es un aceite esencial rico en anetol. También contiene otras sustancias tales como ácidos grasos, flavonoides (de acción antioxidante y antiinflamatoria), hidratos

de carbono o glúcidos, esteroides, proteínas y cumarinas. Por su particular composición, es aperitivo y tiene la propiedad de mejorar las digestiones, reducir la formación de gases y favorecer su expulsión, así como eliminar las náuseas y el mal aliento. Por ello se recomienda principalmente en caso de inapetencia, digestiones difíciles, flatulencia, gases y espasmos intestinales. Así mismo, en infusión, es muy utilizado en problemas digestivos de lactantes.

4.4.3 *Illicium verum*

La clasificación taxonómica de *I. verum*, según Hook, F. es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Austrobaileyales o Illiciales

Familia: Illiciaceae

Género: *Illicium*

Especie: *I. verum*

Nombre binomial: ***Illicium verum***

Fuente: www.wikipedia.org



Fig. 3 *Illicium verum* (Anís estrellado, anís estrellado chino, badiana o badiana de China)

I.verum también conocido como anís estrella, badián de la China o badiana es originario de los bosques tropicales del sudeste asiático (sur de China y norte de Vietnam), se cultiva en China, Filipinas y Jamaica. La vida media del árbol es de 80-100 años. Es un árbol pequeño de 3-5 m de altura y una longitud de 5-10 cm, es perennifolio, con corteza blanca y hojas lanceoladas enteras. Flores amarillo- rosados, pueden tener hasta 30 pétalos. Las flores producen un fruto en forma de estrella. Los frutos son de color oscuro, miden cerca de 2 cm de diámetro y parecen estrella formadas de ocho carpelos careniformes de 1 a 1.5 cm de longitud que al madurar abren. Cada carpelo contiene una semilla suave,

café y brillante. El pericarpio es marrón y está arrugado por debajo florece en primavera, cuando comienzan las primeras lluvias (Barceloux, 2008).

De la recolección con fines medicinales interesan los frutos y los folículos; una vez recogidos, se ponen a secar rápidamente a la sombra o en el secadero a temperaturas no demasiado elevadas. La parte que se utiliza es la semilla. El motivo de su nombre deriva de la característica forma estrella que poseen sus frutos y hojas (Chaves, 2006).

Se usa como condimento para aromatizar salsas curry, en confitería, chicles, caramelos, tabaco, licorería, preparación de farmacéuticos y para la conservación de encurtidos. También en perfumería y jabones. El fruto se mastica para perfumar el aliento y ayuda a la digestión (Minakshi DEL, 2002).

Entre sus principios activos se encuentra el aceite esencial (8-9%), anetol (80-90%), monoterpenos: limoneno (5%), linalol, estragol, fenchona, pineno, felandreno, anisaldehído, monoterpenoles, tetona anísica, flavonoides, rutina, glucósidos de kanferol y ácidos orgánicos: ácidos quínico y siquínico. También contiene taninos catéquicos, lignanos, lactonas sesquiterpénicas (trazas), veranisatinas, sales minerales (4-5%) y resina. El fruto desecado contiene al menos 70 mg/kg de aceite esencial (ki Sung, et. Al, 1998). El aceite esencial de *I verum* es un líquido color amarillo pálido. El estragol y el anetol son los dos principales componentes responsables de su actividad antimicrobiana (DEM, et al, 2001).

Entre los efectos del anís se describe como un eupéptico (anetol), carminativo (aceite esencial), antiespasmódico (aceite esencial), expectorante de acción directa sobre las células secretoras de la mucosa respiratoria (aceite esencial),

estrogénico (aceite esencial), galactagogo (aceite esencial), pediculicida en uso tópico, especialmente activo frente al *Pediculus vestimenta* (anetol), (Verguese, 1998). En un estudio realizado sobre el extracto alcohólico de *I.verum* se encontró que, éste posee la capacidad de inhibir el crecimiento de *E.coli*, *B. subtilis* y *S. cerevisiae* (De M, et al., 2001).

I.verum en infusión es usado frecuentemente para el tratamiento del cólico y como tranquilizante en lactantes. Normalmente se utiliza en infusión al 0.25-1%. Además sirve contra meteorismo, espasmos gastrointestinales, gastritis, enterocolitis, gastralgias y enteralgias, bronquitis, asma, oligomenorreas, síndrome climatérico y pediculosis en uso tópico. Es muy útil también en los casos de digestiones pesadas, fermentación intestinal y flatulencia. Por su acción ligeramente antiespasmódica, alivia los espasmos de las vísceras huecas (estómago, vesícula biliar, intestino y útero). Es recomendado para personas con problemas y dificultades respiratorias, además es uno de los ingredientes básicos en los medicamentos “Tamiflu” para la gripe aviar (Cernuda, 2005).

Las contradicciones se hacen presentes en personas con hipersensibilidad al anetol, en pacientes con gastritis, úlceras gastroduodenales, síndrome del intestino irritable, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedades del hígado, epilepsia, Parkinson u otras enfermedades neurológicas. Las mujeres embarazadas y en período de lactancia deben evitar el uso interno del aceite esencial de anís estrella. También en los síndromes que cursen con hiperestrogenia, y en los tratamientos estrogénicos. No es recomendable su uso en lactantes como tradicionalmente se ha utilizado. Su administración en altas dosis en los lactantes se ha relacionado con la aparición de crisis convulsivas y somnolencia (Cernuda, 2005).

Entre los efectos tóxicos, se menciona que el aceite esencial puede producir efectos tóxicos sobre el sistema nervioso central, a pequeñas dosis ejerce una acción estimulante de los centros nerviosos respiratorios y de la función digestiva, pero a dosis altas actúa como estupefaciente. El anetol, el componente que ingerido a dosis elevadas puede tener efectos tóxicos sobre el sistema nervioso provocando delirios y convulsiones (Hernández, *et al.* 2010).

Existe una importante contradicción acerca de su consumo. Mientras en Europa se convirtió en el llamado “oro asiático”, buscando por miles de personas ante la amenaza de la gripe aviar; utilizado para fabricar el Tamiflu, que es el único medicamento recomendado por la Organización Mundial de la Salud. En México al anís estrella, lleva más de seis años prohibida, en un principio, se creía que el anís estrella era muy beneficioso y se le daba a los niños pequeños e incluso recién nacidos, pero recientes estudios determinan que en grandes cantidades, puede resultar mortal; por eso se retiró del mercado en 2001, sin embargo el anís estrella se continuó vendiendo en herbolarios de manera totalmente legal (Cernuda, 2005).

El motivo de su prohibición en México, fue que se descubrió que la forma en que se administraba la infusión de anís estrella era tóxica en cantidades considerables, llegando a provocar la muerte cuando se administraba por mucho tiempo (Madrigal, *et al.*, 2010).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta e Identificación del material vegetal de estudio

Se adquirieron las tres especies de plantas en el Estado de Nuevo León: *Pimpinella anisum*, *Illicium anisatum* e *Illicium verum* en el Mercado Juárez de la Cd. de Monterrey. Se identificaron en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.2 Extracción Soxhlet

La extracción Soxhlet es un método de extracción líquido-sólido frecuentemente utilizado para llevar a cabo la extracción de metabolitos de plantas. Este consta de un matraz colector, una cámara de extracción y un



condensador (Fig. 4). Su principal ventaja es que se trata de un proceso continuo, dado que el solvente deja continuamente el matraz

con vapor y es condensado en la cámara de extracción para extraer el material vegetal en forma constante, antes de volver el matraz colector mediante el sistema de sifón. El método es práctico sin embargo presenta desventaja ya que requiere calentar el solvente a su punto de ebullición, y puede causar daño a compuestos termolábiles además de formación de artefactos (Seidel, 2006).

5.2.1 Obtención de los extractos de las plantas en estudio

La obtención de los extractos se procedió teniendo el material vegetal seco, se pesaron 60 g de cada planta y posteriormente se realizó la extracción en un Soxhlet con 700 mL de metanol (MeOH) y posteriormente hexano a 60° C durante 7 h. El extracto se filtró y se concentró en vacío a 45°C. Los extractos obtenidos se evaporaron hasta sequedad con presión reducida en un rotavapor (Yamato modelo RE200), los extractos metanólico y hexánico se secaron a temperatura ambiente y se pesaron para calcular el porcentaje de la extracción. El extracto se almacenó a 40°C hasta el momento de ser empleado (Fig. 5).

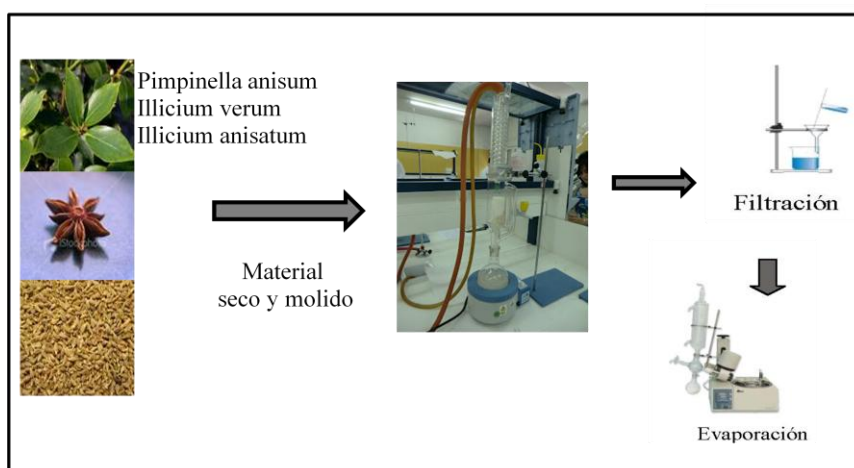


Fig. 5 Diagrama de obtención de los extractos

5.3 Pruebas para determinar la actividad antibacteriana de los extractos

Con los extractos obtenidos se procedió a evaluar la actividad biológica sobre los microorganismos mencionados en la Tabla I. El método empleado para la prueba microbiológica fue por difusión en placa con papel filtro y para evaluar la actividad de los extractos secos se prepararon a una concentración de 40 mg/mL y se esterilizaron por filtración con membranas de 0.22 μm (Koneman *et al.*, 1989).

Tabla I

Microorganismos Utilizados

Bacterias
<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Salmonella sp</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Bacillus cereus</i>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Salmonella typhi</i>

5.3.1 Activación de las bacterias

Se utilizó el medio líquido C. Rivas (Titulo de la Patente No 252592 MPI MX/07/11/2007) 8.5 g en 100 mL de agua destilada, ajustado a pH 7.0. Para la preparación del medio se utilizaron tubos de ensayo de borosilicato de 13x100 mm, conteniendo 5 mL de medio, se esterilizaron a 15 Lb/15 min, posteriormente se inoculó cada cepa transfiriendo una asada a cada tubo previamente identificado, posteriormente se incubaron de 12-18 h a 37°C.

5.3.2 Cultivo de bacterias

Se utilizó el medio sólido C. Rivas; 8.5g de medio en 100 mL de agua destilada, se esterilizó y se adicionó sobre cajas Petri en porciones de 20 mL, que se utilizaron en las pruebas de inhibición *in vitro*.

5.3.3 Determinación de la actividad antimicrobiana

El método de difusión en placa se realizó colocando en un disco de papel filtro Whatman No. 1 previamente impregnado con 10 µL de cada uno de los extractos obtenidos a una concentración de 40 mg/mL, este disco se colocó sobre una placa con medio sólido C. Rivas, previamente inoculada con 100 µL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC (tubo uno de la escala de Mc Farland) o una asada con las diferentes cepas, se depositó también en un disco 10 µL del solvente utilizado para disolver el extracto como control negativo. Se incubó a 37°C por 24 h, después de este período se midieron los halos de inhibición en mm para cada una de la pruebas (Fig. 6).

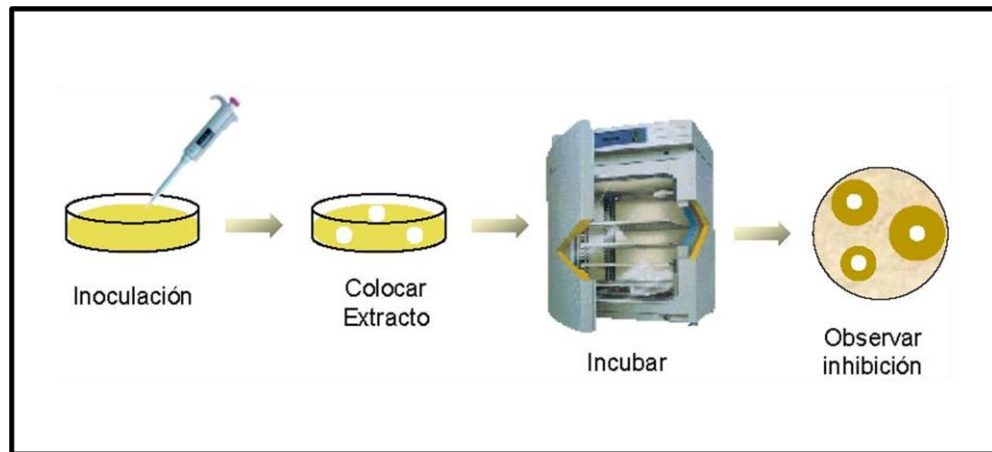


Fig.6 Determinación de la actividad antimicrobiana

5.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos que muestran actividad biológica

Con la ayuda de una microplaca se agregaron 100µl de medio líquido C. Rivas y se añadieron 100µL de cada una de los extractos partiendo de la concentración inicial de 1600 µg/mL y se realizaron microdiluciones seriadas. Una vez efectuadas estas, se adicionaron 100 µL de la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^6 UFC (tubo uno de la escala de Mc Farland). Posteriormente la microplaca se incubó por 24 h a 37°C, y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la fracción aplicando 40µL de una solución de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrasolium bromuro (MTT) a una concentración de 2.5 mg/mL a cada pozo e incubando por 4 h a 37°C, y posteriormente se observó la viabilidad microbiana de color púrpura de las diluciones probadas.

5.5 Identificación de las fracciones con actividad bacteriana

5.5.1 Cromatografía en capa delgada de los extractos con concentración mínima inhibitoria relevante para la separación de fracciones

La cromatografía en capa delgada es una técnica cualitativa que permite constatar la pureza de los componentes del extracto separado mediante la cromatografía en columna. Consiste en una placa de vidrio con una fase estacionaria de sílica-gel, la cual está mezclada con sulfato de calcio como fraguante. La mezcla a separar, esta disuelta en una pequeña cantidad de solvente, se coloca mediante un capilar en uno de los extremos de la cromatoplaca. Ésta se introduce a continuación en una cámara cromatográfica la cual contiene una cierta cantidad de la fase móvil o eluente (Fig. 7). El eluente sube por capilaridad a través de la cromatoplaca lográndose la separación de los componentes de la mezcla en base al equilibrio (Dzido y Tuzimski, 2008) entre la adsorción de los componentes sobre la sílica y la solución de los mismos en el eluente. Ya terminado el proceso de separación, la cromatoplaca se revela mediante una lámpara de luz (254 nm) o utilizando una cámara de yodo, con ambos métodos se observan manchas representando a los diferentes compuestos distribuidos a lo largo de la cromatoplaca. Se utilizaron cromatoplasas “Merck” (Silica gel 60 F₂₅₄, 5x10 cm, 250 µm de grosor de capa) y los extractos y fracciones analizadas se colocaron utilizando un capilar de vidrio.

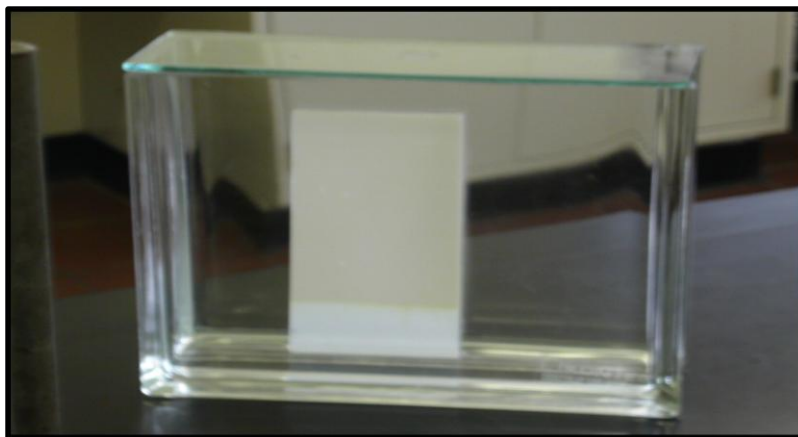


Fig.7 Cromatografía en capa fina

5.5.2 Identificación de fracciones activas

Se utilizó la técnica de Hamburger modificada por Verástegui *et al* en 1998; se seleccionaron las cromatoplasas en las cuales las fracciones mostraron una mayor separación. En una caja Petri se expuso el cromatograma con luz ultravioleta por una hora para esterilizar y sobre él se colocó una tira de medio sólido C.Rivas de 1x6cm x 0.3 mm de espesor. Posteriormente se añadió sobre la tira de agar 150 μ l de la dilución 1×10^6 UFC. Las condiciones de humedad se mantuvieron colocando dentro de una caja Petri un algodón con agua destilada estéril. Se utilizó como control de crecimiento un cuadro de agar inoculado con el mismo microorganismo pero separado del cromatograma. Las cajas se incubaron a 37°C por 24-48 h. La zona de inhibición de los microorganismos en la tira de agar se midió y se correlacionó con el registro previo de las fracciones separadas cromatográficamente.

5.6 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) sobre *E. histolytica* HM1-IMSS, bajo condiciones axénicas *in vitro*

5.6.1 Cinética de crecimiento

Se utilizó medio PT modificado, adicionado con 10 % de suero de bovino adulto y 1 % de antibiótico (mezcla de Penicilina / Estreptomicina). Para la cinética de crecimiento la cepa de *E. histolytica* HM1-IMSS crecida en medio PT se inoculó a 1×10^4 cel/mL en tubos de vidrio con tapón de rosca de 16x125 mm con 5.55 mL de medio PT adicionado. Se incubó a 37°C y cada 24 h se contó el número de células durante nueve días. Para realizar el conteo los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al vidrio, este se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de cel/mL empleando una cámara de Neubauer.

Los bioensayos se realizaron en la fase logarítmica del crecimiento de las células, *E. histolytica* HM1-IMSS fue propagada en cultivo axénico a 37 °C en medio PT modificado suplementado con el 10 % de suero de bovino adulto y 1 % de antibiótico (mezcla de Penicilina / Estreptomicina).

5.6.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)

Se empleó *E. histolytica* cepa HM1-IMSS. Se realizaron resiembras

sucesivas de 1×10^4 cel/mL el medio PT modificado en tubos con tapón de rosca de 16x125 mm, se adicionó 1% antibiótico (mezcla de Penicilina / Estreptomicina) y 10 % de suero de bovino adulto, posteriormente se incubó a 37 °C por 96 h. Los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de cel/mL empleando una cámara de Neubauer.

De las amibas suspendidas en medio PT modificado incubadas por 96 h a 37°C se tomó 1×10^4 cel/mL y se transfirieron a tubos con 5 mL de medio PT modificado, se probaron cinco concentraciones de cada extracto metanólicos y hexánicos respectivamente sobre *I. anisatum*, *P.anisum* e *I.verum* (0.025, 0.050, 0.1, 1.0, 3.0 mg/mL) totalmente independientes y se incubaron por 96 h a 37 °C. A las 96 h los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de cel/mL empleando una cámara de Neubauer. Se realizó el análisis Probit para determinar la IC_{50} de los extractos probados (Fig. 8).

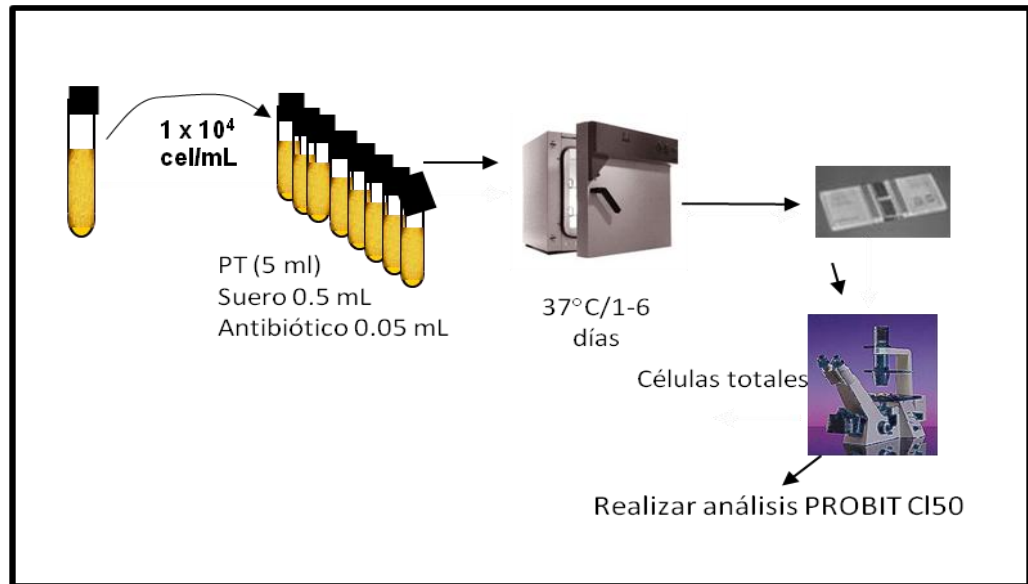


Fig.8. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) sobre *E. histolytica*.

5.6.3 Evaluación de la actividad anti*amibiana* de las fracciones del extracto metanólico de *P. anisum*.

Se realizaron resiembras sucesivas de *E. histolytica* a 1×10^4 cel/mL en el medio PT modificado en tubos con tapón de rosca de 13x100 mm, se adicionó 1% antibiótico (mezcla de Penicilina / Estreptomicina) y 10 % de suero de bovino adulto, posteriormente se incubó a 37 °C por 96 h. Los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de cel/mL empleando una cámara de Neubauer.

A partir de la cepa de *E. histolytica* se tomó 1×10^4 cel/mL y se transfirieron a tubos con 5 mL de medio PT modificado, se colocaron las fracciones 1, 2 y 7 a la dosis de 0.15 mg/mL de la fracción 1, de la fracción 2 se evaluaron 0.1 mg/mL y para la fracción siete se evaluó la concentración de 0.47 mg/mL y se incubaron por 96 h a 37 °C. A las 96 h los tubos se colocaron en agua-hielo por 10 min para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó suavemente por inversión (15 veces) y se procedió a determinar el número de cel/mL empleando una cámara de Neubauer.

5.7 Identificación parcial de los componentes de los extractos

5.7.1 Identificación de grupos funcionales

A cada uno de los extractos se les realizaron las siguientes pruebas con la finalidad de identificar sus componentes químicos, cada una de éstas pruebas fueron realizadas en placas de porcelana con varios pozos, cada pozo fue utilizado para una prueba en específico, los procedimientos se describen en la Tabla II.

Tabla II

Procedimiento para realizar las pruebas de identificación química
(Domínguez, X.A 1973)

Determinación de:	Prueba colorida de:	Procedimiento
Insaturaciones	KMnO_4	Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona o metanol y se agregó gota a gota la solución de KMnO_4 al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de un precipitado café (dióxido de magnesio) en menos de 1 min.
Grupo Carbonilo	2,4-Dinitrofenilhidracina	De 1 a 10 mg de la muestra se disuelven en etanol, se añadirá una solución saturada de 2-4-dinitrofenilhidracina en HCl 6N; la formación de un precipitado color amarillo o naranja indica la presencia del grupo carbonilo.
Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)	FeCl_3	Se disuelven de 1-2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol y después se añaden unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerada positiva.
Esteroles y triterpenos	Liebermann-Burchard	Se mezcla 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, se enfriarán a 0°C y se les añade una gota de ácido sulfúrico. Se añade, gota a gota, este reactivo a la muestra, o su solución clorofórmica. Si observamos formación de colores azul,

		verde, rojo, anaranjado, etc., y estos cambian con el tiempo, la prueba será positiva. El orden y el tiempo de aparición (0, 1, 5, 20, 60 min) tiene cierto valor diagnóstico; así, si se observa una coloración amarilla después de 15 min corresponderá a C-14-metilo y una variación -7 insaturación. La prueba es positiva con esteroides que contienen 2 enlaces dobles conjugados que los pueden formar por una o dos deshidrataciones con isomerización.
	Salkowski	Similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra (1 a 2 mg) en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, se desarrollarán colores amarillos o rojo para esteroides y metilesteroides.
Carbohidratos	Molish	A 1-2 mg de muestra se le agrega gota a gota, el reactivo Molish (alfa-naftol al 1% en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva si se observa la formación de un anillo coloreado en la interfase de color púrpura.
	Cumarinas	Se disolverán 1-2 mg de muestra en NaOH al 10%; si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular se considerará positiva.
	Lactonas	Se disuelven de 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10%. Un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al adicionar unas gotas de HCl indica la presencia de un anillo lactónico.
Sesquiterpenlactonas	Baljet	A 2-3 mg de muestra se le agregan 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se torna un color naranja a rojo oscuro. La solución mezcla 1:1 consiste de una solución A que contiene ácido pícrico al 1% en etanol y una B con NaOH al 10%.
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Una pequeña cantidad de muestra se disolverá en H ₂ SO ₄ y se observa coloración amarilla para flavonoles; naranja-guinda para flavonas; rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura

		para quinonas.
	Leucoantocianinas	Se disuelve una porción del residuo con HCl 2N en propanol-1, durante 15 a 30 min. La aparición lenta de una coloración roja o violeta se considera positiva.
Alcaloides	Dragendorff	Modificación de Munier y Machelobuf. Se realizaron 2 soluciones. Para preparar la solución A se disuelven en 0.85 g de nitrato de bismuto en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. La solución B se preparó disolviendo 8 g de KI (yoduro de potasio) en 20 mL de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año y la prueba es positiva para alcaloides al dar la placa coloración rojo o naranja persistentes por 24 h (Pérez y Cepeda, 2000).
	Agitación	Una porción del residuo se disolverá con agua en un tubo de ensayo y luego se agitará vigorosamente durante 3-5 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja, estable por 30 min, se considera prueba positiva.
Saponinas	Bicarbonato de sodio	La sal se preparo al 10% en agua. Se disuelve de 1-2 mg de la muestra disuelta en agua o en etanol y se le agregan de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agita ligeramente, posteriormente se adicionará de 2-3 gotas de bicarbonato de sodio. Si existe presencia de saponinas aparecerán burbujas y tendrán una permanencia por más de 1 min.
	Salkowski	Se disuelven de 1-2 mg de la muestra en 1 mL de cloroformo luego se añadirá 1 mL de ácido sulfúrico. La prueba será positiva si se observa la aparición de color rojo.
Aromaticidad	Ácido sulfúrico-formaldehído	Se preparo una mezcla de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehido. Se agrega de 1-5 mg de la

		muestra disuelta en disolvente no aromático, se añaden unas gotas de la mezcla anterior y si aparece un color rojo-violeta, la prueba será positiva (Treviño, 2001).
--	--	--

5.8 Análisis Estadísticos

Análisis Probit; Este método se basa en la cuantificación de la vulnerabilidad de los individuos ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables para los distintos niveles o dosis de los estímulos. La respuesta de una población ante un fenómeno físico se distribuye según una ley log-normal. El modelo es aplicable solo para aquellos fenómenos de

los que se dispone de la “ecuación Probit”. El resultado es una curva, grafica del análisis Probit curva dosis respuesta (Mercado, 1998).

El valor de la variable se determina por la expresión:

$$Y=K_1+K_2\text{Ln}V$$

Donde V es la variable física representativa del estímulo y K1 y K2 son unas constantes (Ferrán, 2001).

5.9 Análisis Espectroscópico

5.9.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (ERMN)

La técnica de espectroscopia de RMN se ha desarrollado como la herramienta más importante para la determinación de estructuras de productos naturales aislados de plantas. Básicamente, se trata de otra forma de espectroscopía de absorción, dado que bajo la influencia de un campo magnético un compuesto orgánico puede absorber radiación electromagnética de la región de microondas (60-600 MHz) como frecuencias gobernadas por el entorno químico de los átomos de hidrógeno o de carbono 13 presentes en la molécula (Macomber, 1998; Silverstein *et*

al., 2005; Mitchell y Costisella, 2007). Los espectros de RMN se obtienen normalmente en soluciones del 2 al 30%, en un disolvente aprótico (normalmente cloroformo deuterado, tetracloruro de carbono o sulfóxido de dimetilo) y un pequeño porcentaje del estándar de referencia tetrametilsilano. Se requieren alrededor de 10 mg de muestra para un espectro de alta calidad (Jacobsen, 2007). Para este trabajo de investigación los espectros de RMN fueron obtenidos con un instrumento Bruker DPX (^1H , 300 ó 400 MHz; ^{13}C , 100 ó 125 MHz).

5.9.2 Espectrometría de masas (EM)

El concepto de espectrometría de masas es relativamente simple: el compuesto es ionizado mediante el impacto de electrones de electrones y los iones producidos son separados en base a su relación masa/carga (m/z) (Silverstein *et al.*, 2005; Vogler y Setzer, 2006). Ésta técnica es la segunda más importante en la caracterización de productos naturales después de RMN, debido a su gran sensibilidad y mediante al análisis del espectro puede obtenerse la fórmula molecular del compuesto, sin embargo la interpretación es más compleja si la comparamos con RMN y la información de conectividad solo puede obtenerse indirectamente a través

de revisión cuidadosa de los fragmentos graficados en el espectro (Gross, 2004 y Field *et al.*, 2008).

6. RESULTADOS

6.1 Extractos vegetales

6.1.1 Obtención de extractos metanólicos y hexánicos

En la Tabla III se muestra el rendimiento porcentual de las plantas utilizadas, observando que la de mayor rendimiento fue la de *I.anisatum* de 31.26% correspondiente al extracto metanólico y de 28.3% al extracto hexánico, siendo *P.anisum* el de menor rendimiento con un 12.13% en el extracto metanólico.

Tabla III

Rendimiento de los extractos y parte utilizada de las plantas

		Rendimiento del extracto
--	--	--------------------------

Especie vegetal	Parte utilizada	(%)	
		Hexánico	Metanólico
<i>I. verum</i>	fruto	15.5	14.47
<i>I. anisatum</i>	fruto	28.3	31.26
<i>P. anisum</i>	fruto	14.5	12.13

6.1.2 Identificación parcial del compuesto presentes en los extractos hexánicos y metanólicos de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum*.

En la Tabla IV, se muestran los resultados de las pruebas fitoquímicas para grupos funcionales y metabolitos secundarios de los extractos metanólicos y hexánicos de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum*. Los seis extractos presentan oxídricos fenólicos, flavonoides, alcaloides y aromaticidad en todos los extractos.

Tabla IV

**Grupos funcionales de los extractos metánolicos y hexánicos de *I.anisatum*,
P.anisum e *I.verum***

Determinación de:	Pruebas Fitoquímicas	Extractos de					
		<i>Illicium anisatum</i>		<i>Pimpinella anisum</i>		<i>Illicium verum</i>	
		Metanólico	Hexánico	Metanólico	Hexánico	Metanólico	Hexánico
<u>Insaturaciones</u>	KMnO ₄	-	+	--	-	+	+
<u>Carbonilo</u>	2,4-Dinitrofenilhidracina	+	+	+	-	+	+
<u>Oxidrilos fenólicos</u>	FeCl ₃	+	+	+	+	+	+
<u>Esteroles y Metilesteroles</u>	Salkowski	-	+	+	+	+	+
<u>Cumarinas</u>	NaOH al 10%	-	--	+	-	--	+
<u>Lactonas</u>	Solución alcohólica NaOH[10%]	-	+	+	+	+	+
<u>Sesquiterpenlactonas</u>	Baljet	+	+	+	+	--	+
<u>Flavonoides</u>	H ₂ SO ₄	+	+	+	+	+	+
<u>Leucoantocianinas</u>	HCl 2N en Propanol-1	+	+	+	-	+	+
<u>Alcaloides</u>	Dragendorff	+	+	+	+	+	+
<u>Saponinas</u>	Bicarbonato de Sodio	+	+	+	-	+	+
	Salkowski para	+	+	+	-	+	+
<u>Aromaticidad</u>	H ₂ SO ₄ -Formaldehído	+	+	+	+	+	+

Al hacer el análisis comparativo de los metabolitos presentes en los diversos extractos tanto metanólico como hexánico, se observa que el extracto metanólico de *P. anisum* presentó once de los doce metabolitos secundarios, pero el extracto hexánico de *I. verum* presentó los doce metabolitos secundarios que conforman la gama de las pruebas fitoquímicas. Sin embargo, haciendo una comparativa entre los seis extractos, observamos que sólo estos presentan cumarinas.

6.2 Actividad bactericida de los extractos de las plantas en estudio

En la Tabla V, se muestra los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de *P.anisum*, *I. anisatum* e *I.verum*. Sólo se observó actividad antibacteriana del extracto metanólico de *P. anisum* sobre *Salmonella* sp. y sobre *K. pneumoniae* sólo presentó actividad inhibitoria el extracto metanólico de *I. verum*, sin embargo sobre *Escherichia coli* sí se observó

actividad antibacteriana por parte del extracto metanólico tanto de *P. anisum*, *I. anisatum* e *I. verum*; sobre *S. typhi* tanto *P. anisum* e *I. anisatum* presentaron actividad antibacteriana, siendo más evidente la actividad antibacteriana por parte del extracto metanólico de *I. anisatum*. Sin embargo no se observó actividad biológica sobre *B.subtilis*, *B.cereus* y *S. aureus*.

Tabla V

Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre bacterias patógenas.

Microorganismo	<i>P. anisum</i>	<i>I.anisatum</i>	<i>I.verum</i>	Control (-)
<i>Bacillus cereus</i>	----	----	----	----
<i>Bacillus subtilis</i>	----	----	----	----
<i>Escherichia coli</i>	+++	++	++	----
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	----	----	++	----
<i>Salmonella sp</i>	++	----	----	----
<i>Salmonella typhi</i>	+	++	----	----
<i>Staphylococcus aureus</i>	----	----	----	----

+ inhibición de 0-5 mm, ++ inhibición de 5-10 mm, +++ inhibición de 10-20 mm.

En la Tabla VI se presentan los resultados de la actividad biológica de los extractos hexánicos de *P. anisum*, *I. anisatum* e *I.verum*. Los extractos de *I.anisatum* e *I. verum* presentaron actividad antibacteriana sobre *Salmonella sp.* y *S.typhi*, sobre *K. pneumonia* sólo el extracto de *I.verum* presentó actividad antibacteriana, los extractos de *P.anisum* e *I.verum* presentaron actividad antibacteriana sobre *B. cereus* presentando mayor actividad antibacteriana el extracto de *P. anisum*. *E. coli* sólo fue inhibido su crecimiento por el extracto de *I. anisatum*. Los extractos de *P. anisum*, *I. anisatum* e *I.verum* no presentaron actividad antibacteriana sobre *B. subtilis* y *S. aureus*.

Tabla VI

Actividad antibacteriana de los extractos hexánicos sobre bacterias patógenas.

Microorganismo	<i>P. anisum</i>	<i>I. anisatum</i>	<i>I. verum</i>	Control (-) (hexano)
<i>Bacillus cereus</i>	++	----	+	----
<i>Bacillus subtilis</i>	----	----	----	----
<i>Escherichia coli,</i>	----	++	----	----
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	----	----	++	----
<i>Salmonella sp</i>	----	++	++	----
<i>Salmonella typhi</i>	----	++	+	----
<i>Staphylococcus aureus</i>	----	----	----	----

+ inhibición de 0-5 mm, ++inhibición de 5-10 mm, +++inhibición de 10-20 mm.

6.3 Actividad amebicida de los extractos metanólicos y hexánicos de *P. anisum*, *I. anisatum* e *I.verum* sobre *Entamoeba histolytica*.

6.3.1 Cinética de crecimiento de *E. histolytica*

En la figura 9 se muestra el comportamiento de la cinética de crecimiento de *E.histolytica* HM1-IMSS, durante las primeras 24 h se observa una fase de adaptación, seguida de la fase logarítmica la cual se prolongó por 96 h, obteniendo un rendimiento máximo de aproximadamente 280,000 cel/mL, enseguida se observa una ligera fase de adaptación y seguido de un descenso celular paulatino.

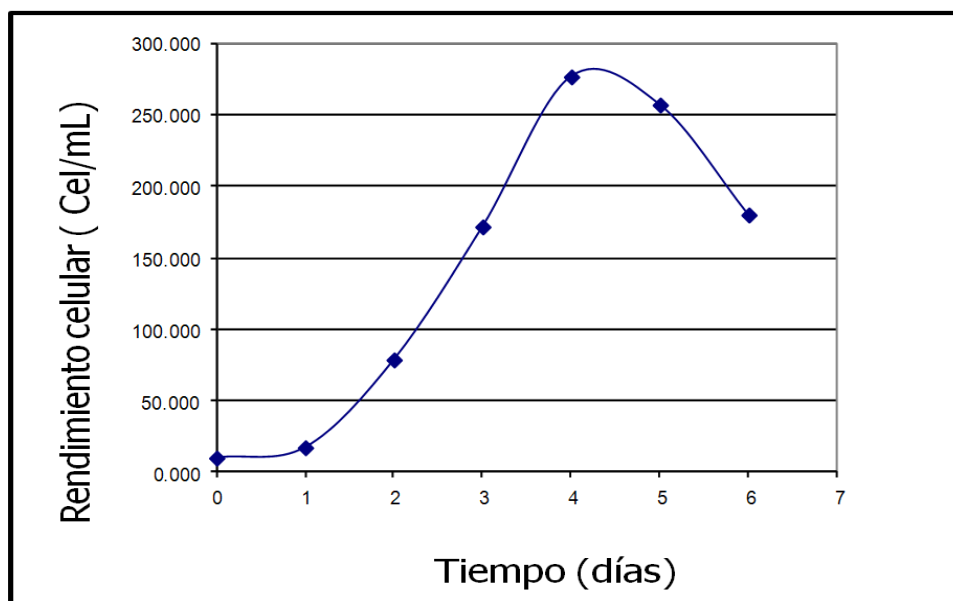


Fig.9 Cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS propagada en condiciones axénicas *in vitro*.

6.3.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)

Los resultados correspondiente al CI₅₀ de los extractos metanólico y hexánico de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS se muestran en la Tabla VI y Fig. 10. En la Tabla VII se observa que el valor CI₅₀ menor lo presentó el extracto metanólico de *P. anisum*, y el valor mayor lo presentó el extracto metanólico de *I. verum*. Sin embargo el valor CI₅₀ del extracto hexánico de *P. anisum* no fue posible determinarlo, debido a la presencia de turbidez en diferentes concentraciones.

Tabla VII

CI₅₀ de los extractos metanólico y hexánicos de las plantas en estudio

Especie	CI ₅₀ (mg/mL)

vegetal	Extracto Metanólico	Extracto Hexánico
<i>P. anisum</i>	0.034	-----
<i>I. verum</i>	0.157	0.082
<i>I. anisatum</i>	0.152	0.112

En la Fig 10, se observa que el valor CI_{50} del extracto metanólico de *P. anisum* presenta diferencia significativa con respecto a los extractos metanólicos y hexánicos tanto de *I. verum* e *I. anisatum*. Los resultados de la CI_{50} tanto del extracto metanólico de *I. verum* como de *I. anisatum* no presentan diferencia significativa entre sí; los resultados de la CI_{50} obtenido de los extractos hexánicos tanto de *I. verum* e *I. anisatum* sí se observa diferencia significativa entre estos.

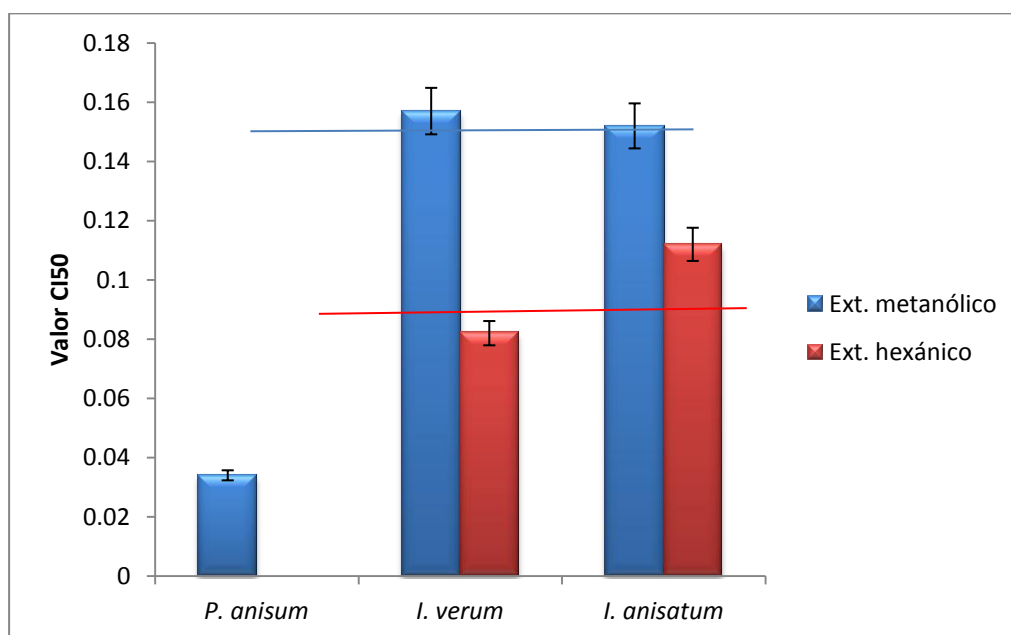


Fig. 10. CI_{50} de los extractos metanólico y hexánico de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum* sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS.

La ecuación del análisis PROBIT para los extractos metanólicos de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum* se muestran en la Figura 11, 12 y 13 respectivamente.

Por otra parte, la ecuación del análisis PROBIT para los extractos hexánicos de *I. verum* e *I. anisatum* se muestran en la Figura 14 y 15 respectivamente.

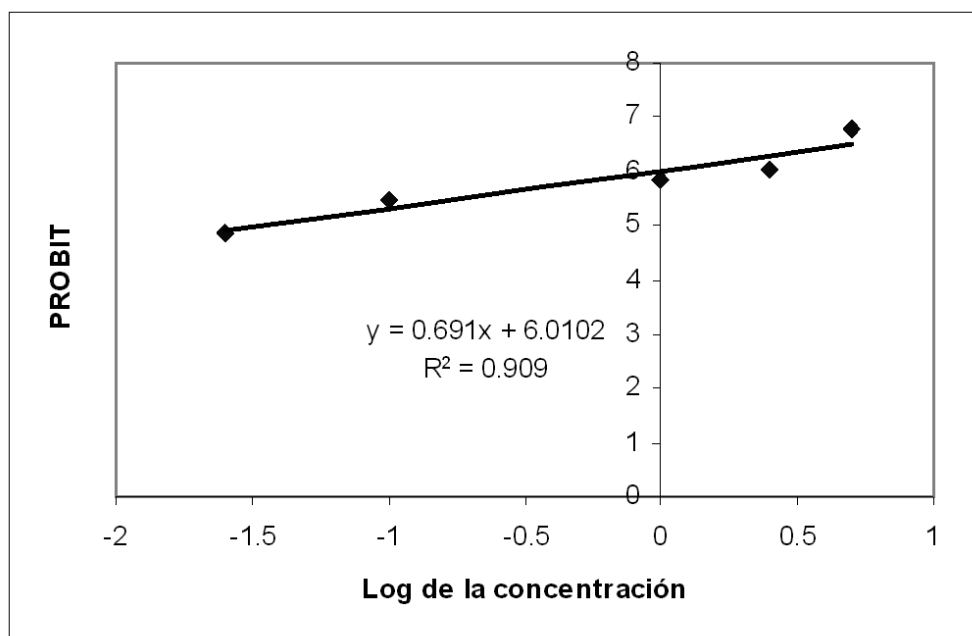


Fig.11 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del extracto metanólico de *P. anisum* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

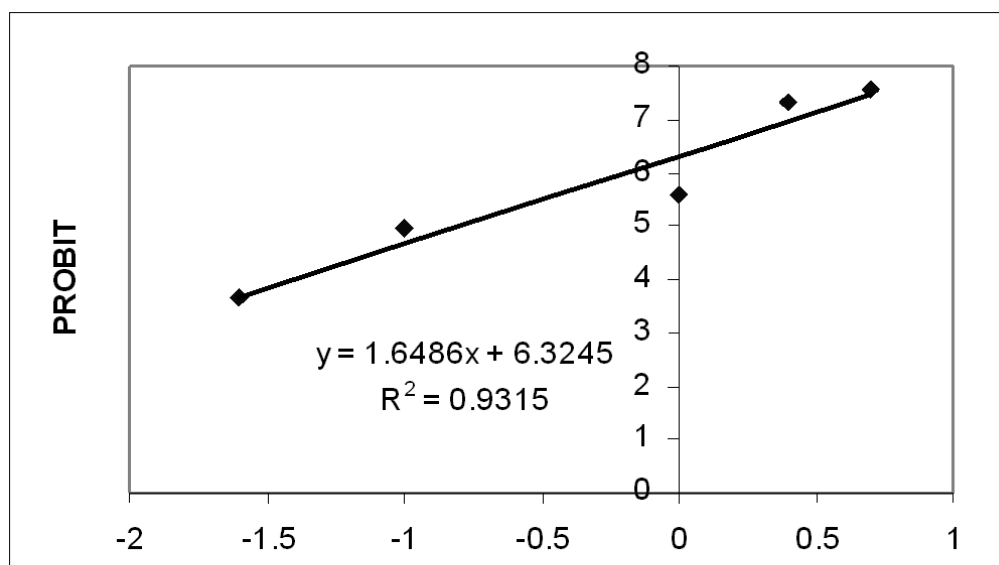


Fig.12 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del extracto metanólico de *I.verum* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

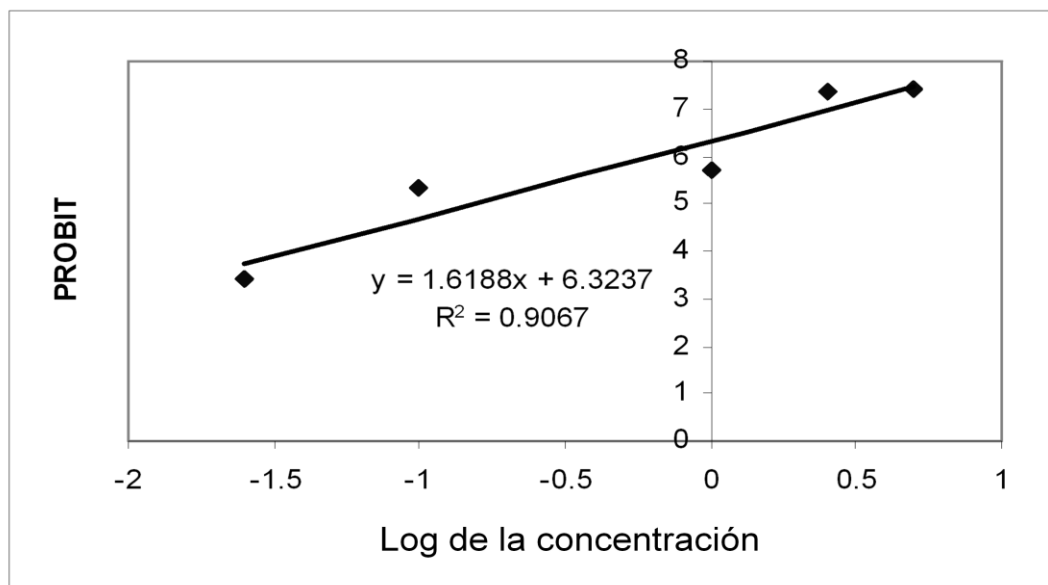


Fig.13 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del extracto metanólico de *I.anisatum* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

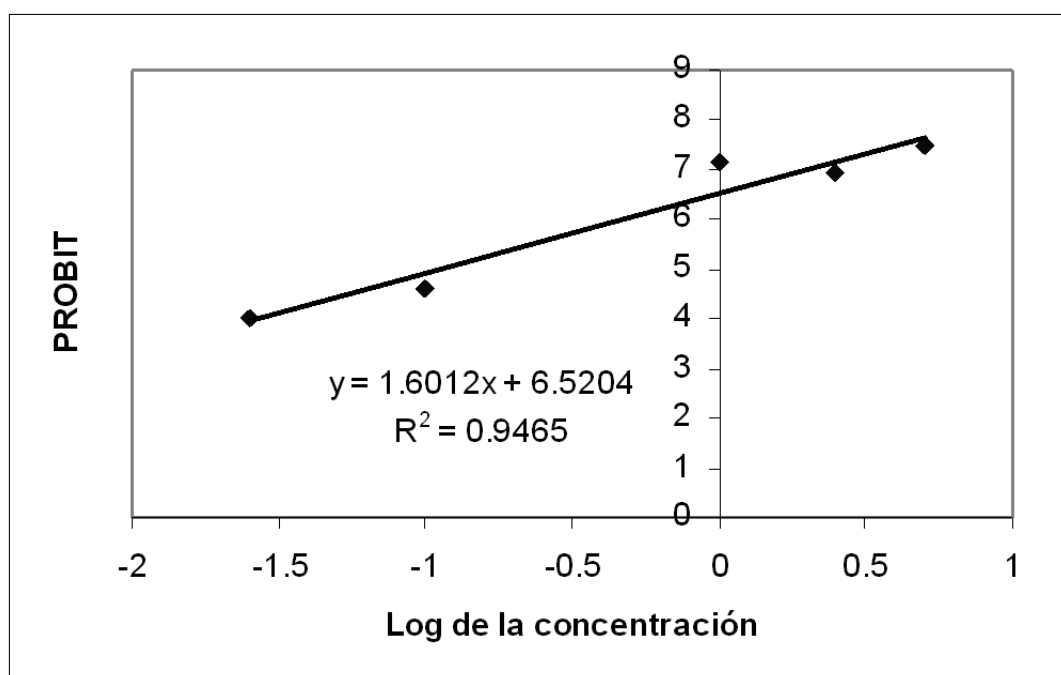


Fig.14 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del extracto hexánico de *I.anisatum* sobre *E. histolytica* HM1-IMSS.

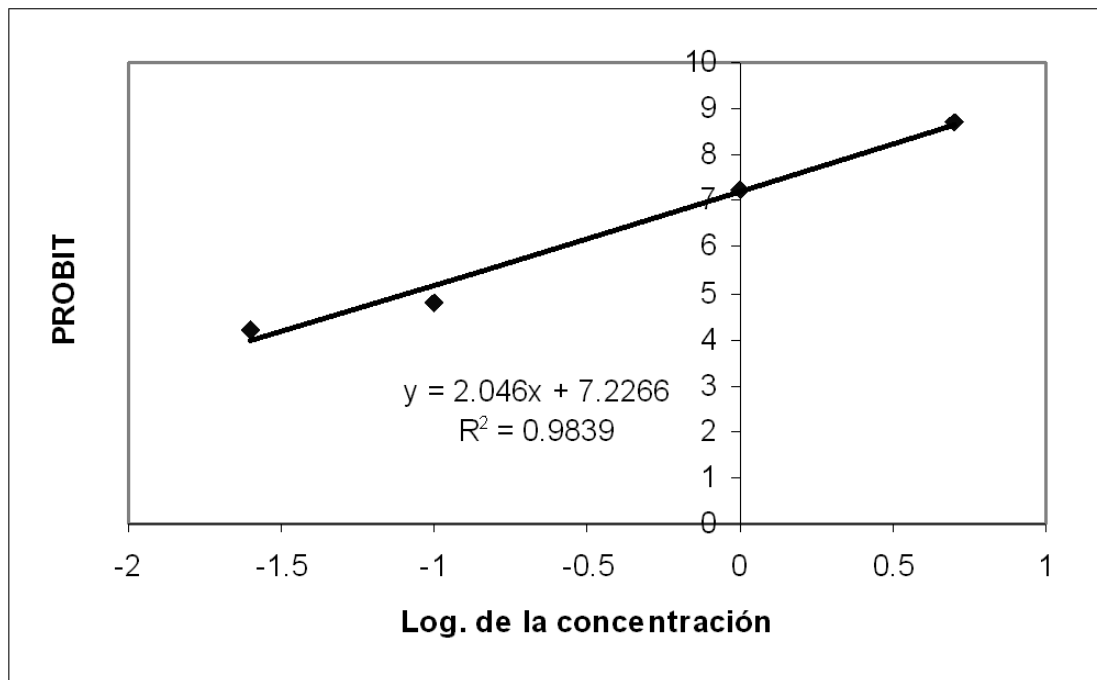


Fig.15 Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) del extracto hexánico de *I. verum* sobre *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

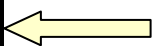
6.4 Separación de fracciones por cromatografía del extracto metanólico de *P. anisum*

Por medio de cromatografía en capa delgada se obtuvieron las fracciones, cuyos Rf, se muestran en la Tabla VIII, en estos extractos se observaron siete fracciones, sin embargo fueron tres las fracciones elegidas (fracción 1, 2 y 7) Rf 0.24, 0.30, 0.93, se obtuvieron para evaluar su actividad antibacteriana y antiamebiana.

Tabla VIII

Fracciones obtenidas de el extracto metanólico de *P. anisum*

Fracción	Rf.
1	0.24
2	0.30
3	0.34
4	0.38
5	0.42
6	0.45
7	0.93



6.5 Evaluación de la fracción del extracto metanólico de *P. anisum*

6.5.1 Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones 1, 2 y 7 del extracto metanólico de *P. anisum*.

Fue evaluada la actividad antibacteriana sobre *Salmonella sp*, *B. cereus*, *E. coli*, de las fracciones 1, 2 y 7 del extracto metanólico de *P. anisum*. Las fracciones 1 y 2 no presentaron actividad antibacteriana sobre las bacterias antes mencionadas, sin embargo la fracción siete sí mostró actividad antibacteriana sobre *E. coli*, obteniendo una CMI de 45.5 mg. (Fig.16).

De acuerdo a estos resultados, la fracción 7 fue seleccionada para realizarle análisis espectroscópicos y proponer su estructura.

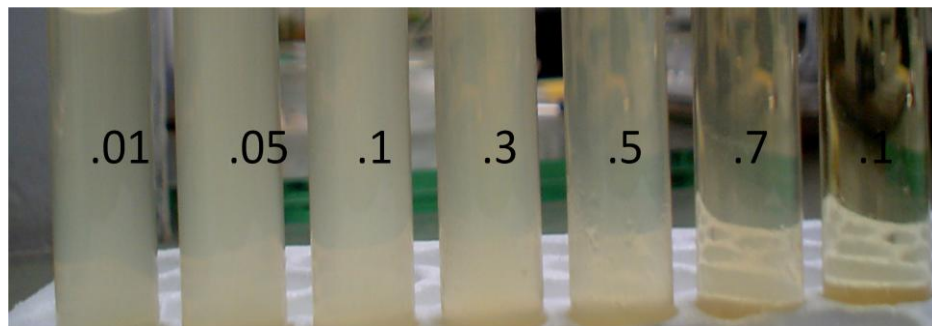


Fig.16 Determinación de CMI de la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum* con actividad sobre *E. coli*

6.5.2 Evaluación de la actividad antimibiana de las fracciones 1,2 y 7 del extracto metanólico de *P.anisum*.

Al graficar los valores correspondientes a la inhibición de los cultivos de *E. histolytica* HM1-IMSS cultivadas en presencia de las fracciones 1, 2 y 7 del extracto metanólico de *P. anisum*, se muestran en la Fig. 17.

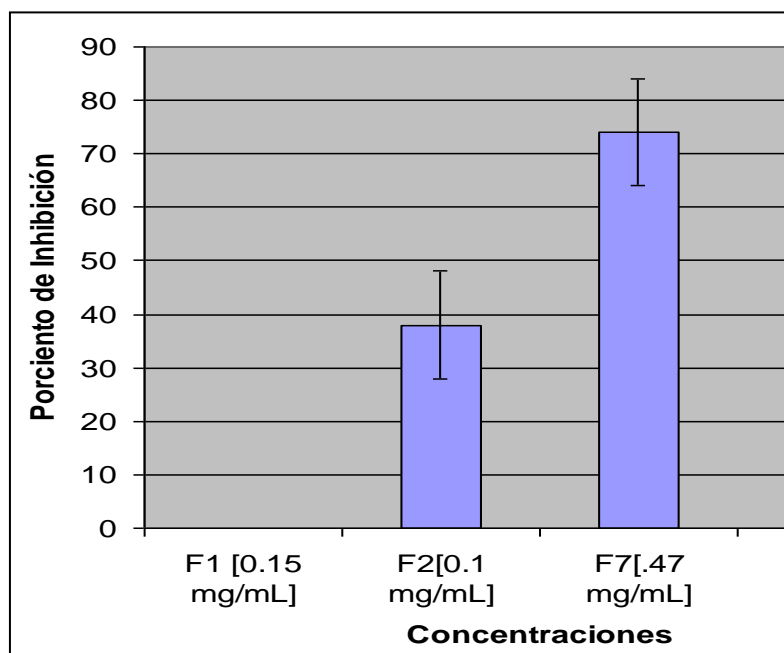


Fig.17 Actividad antimibiana de las fracciones del extracto metanólico de *P.anisum*.

En esta figura se observa, que la fracción 1 no presenta actividad antimibiana, la fracción 2 presentó una inhibición del 38% y la fracción siete presentó una inhibición porcentual del 75%. Entre los valores porcentuales de inhibición de la fracción 2 y 7, sí se observa diferencia significativa.

De acuerdo a estos resultados, la fracción 7 fue seleccionada para realizarle análisis espectroscópicos y proponer su estructura.

6.6 Análisis espectroscópico del compuesto obtenido de la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum*

6.6.1 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (ERM)

En la Fig. 18 se muestra el análisis de la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum*. Se utilizó la técnica de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C .

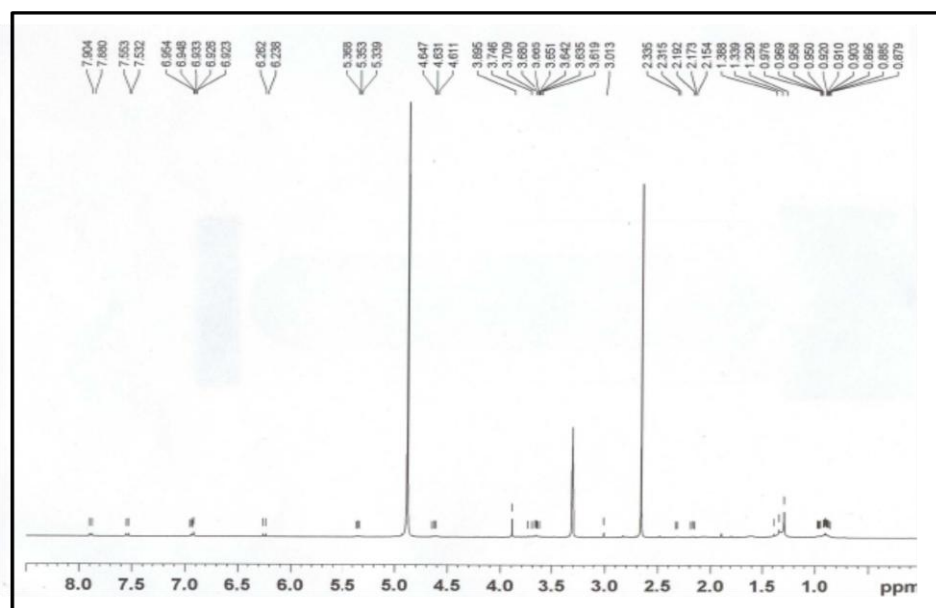


Fig.18 Espectro de ^1H -RMN(499 MHz) General del Compuesto obtenido de la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum*

En la Fig. 19, y tabla IX se observa el análisis de la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum* realizada al espectro de ^1H -RMN primero se descartaron las señales debidas a los restos del solvente (MeOH), se puede observar un grupo de señales entre 0.90 y 1.79 ppm los cuales son identificados en el grupo de alifáticos, observamos también las señales entre 2.0 y 4.8 ppm los cuales pertenecen a dobles enlaces y las señales presentes de 4.8 y 8.0 ppm nos confirman que tenemos un compuesto aromático.

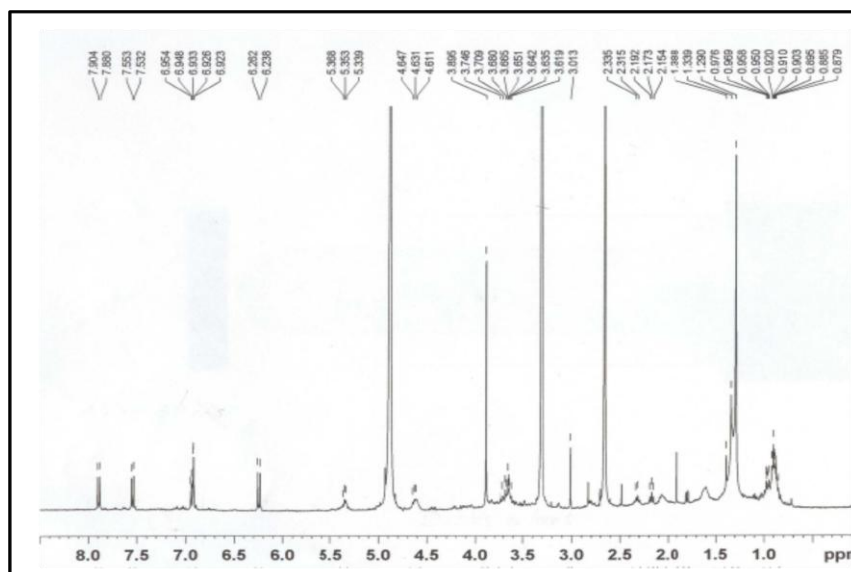


Fig.19 Espectro de ^1H -RMN(499 MHz) General del Compuesto obtenido de fracción (Rf 0.93)del extracto de *P. anisum*.

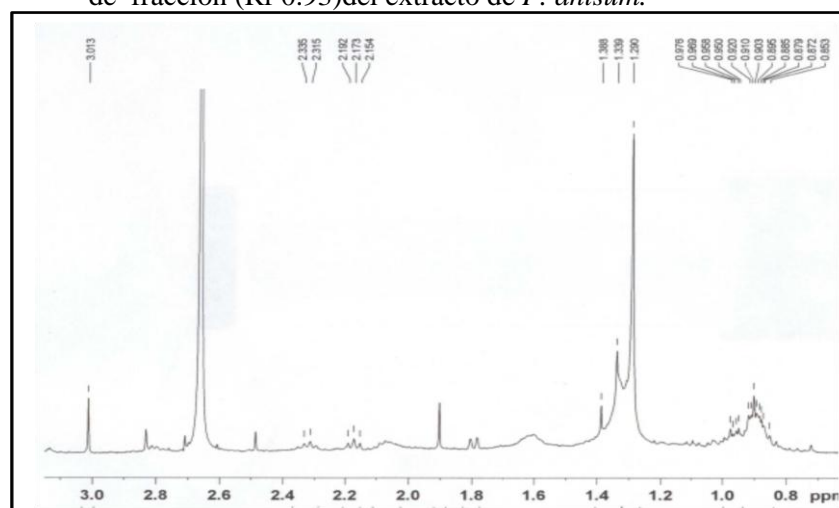


Fig.20 Ampliación del Espectro de ^1H -RMN del compuesto obtenido de la fracción siete del extracto metanmólico de *P. anisum*

Tabla IX
Datos espectroscópicos de ^1H -RMN del compuesto 1-benzopirilio

Señal	δ	Integración	Multiplicidad
A	0.903	6.41	M
B	0.96	2.7	m
C	1.29	12.04	s
D	1.339	7.98	s
E	1.388		s

F	1.61		m
G	1.79	1.08	d
H	1.91	0.95	s
I	2.07	2.05	m
J	2.173	1.08	t
K	2.325	1.39	d
L	2.48		s
M	2.71		s
N	2.82		s
O	3.013	0.71	s
P	3.66	3.83	m
Q	3.895	3.26	s
R	4.631	1.33	m
S	4.93		s
T	5.353	0.79	m
U	6.25	0.9	d
V	6.93	1.97	m
W	6.95		d
X	7.54	1	d
Y	7.89	1.07	d

También se realizaron experimentos de RMN bidimensionales para correlacionar las diferentes señales y de ésta manera revisar las interacciones de los hidrógenos dentro de la estructura. En la Fig. 21 y en la Tabla X se observa el espectro que corresponde al análisis COSY (Correlación Spectroscopy).

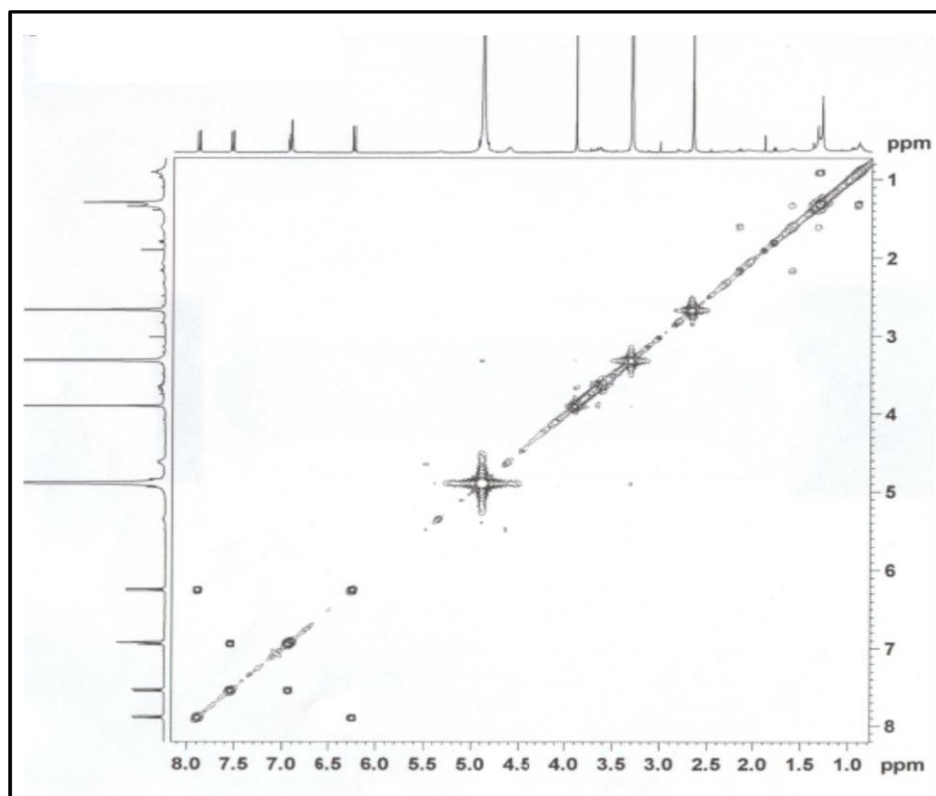


Fig.21 Espectro COSY del Compuesto obtenido de la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum*

Tabla X

Correlación del espectro COSY del compuesto obtenido de la fracción siete del extracto metanólico de *P.anisum*

Señal	Correlación
A	C
B	
C	A
D	F
E	
F	D, J

G	
H	
I	
J	F
K	
L	
M	S
N	
O	
P	Q
Q	P
R	
S	M
T	
U	Y
V	
W	X
X	W
Y	U

6.6.2 Espectroscopía de Masas

En la Fig. 22 se observa la imagen obtenida al espectro de masas general de la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum*.

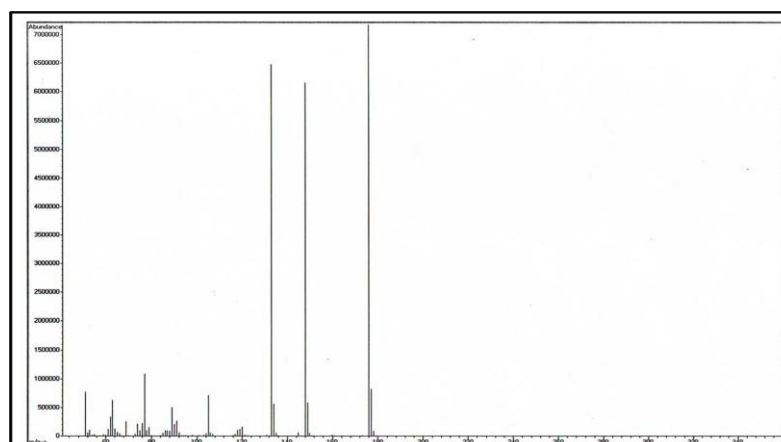


Fig.22 Espectro de Masas General del Compuesto obtenido

de la fracción siete del extracto metanólico de
P. anisum

La estructura propuesta para la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum* es 1- benzopirilio ($C_{11}H_{11}O_2$) y se observa en la Fig. 23, ver anexos.

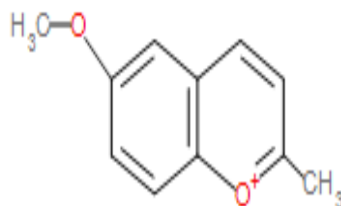


Fig.23 Estructura propuesta para la fracción siete del extracto metanólico de *P. anisum*.

7. DISCUSIÓN

En esta investigación las plantas utilizadas fueron seleccionadas debido a su uso frecuente en la medicina popular, a estudios etnofarmacológicos y a su amplia distribución en nuestro país México. En este trabajo uno de los objetivos fue obtener los extractos metanólicos y hexánicos de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum*, de acuerdo a los resultados obtenidos observamos que el mejor rendimiento se obtuvo en la especie de *I. anisatum* con 28.3% correspondiente al extracto hexánico y 31.26% de rendimiento para el extracto metanólico, siendo estos rendimientos superiores en aproximadamente 50% en comparación a los

rendimientos obtenidos en las especies de *P. anisum* y *I. verum* (Tabla III). Siendo *I. anisatum* la especie que nos permite obtener mayor rendimiento de extractos.

El rendimiento de los extractos metanólicos y hexánicos de los extractos obtenidos observamos un buen rendimiento esto lo podríamos a que el método de extracción Soxhlet es un eficaz método que permite obtener altos rendimientos de los extractos comparado con métodos de extracción como la agitación constante, especialmente para compuestos fenólicos (Lock, 1994; Tsantila *et al.*, 2007).

Con respecto a la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y hexánicos de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisum*, observamos *E. coli* fue susceptible a los extractos metanólicos de las 3 especies estudiadas, pero se observó mayor actividad antibacteriana al emplear el extracto metanólico de *P. anisum*, esta inhibición se determinó al observar mayores halos de inhibición (Tabla IV); con respecto a los extractos hexánicos de las 3 especies vegetales de estudio, observamos que el cultivo de *E. coli* sólo es susceptible al extracto de *I. anisum* (Tabla V). En tanto que los cultivos de *B. subtilis* y *S. aureus* no fueron inhibidos por ninguno de los dos extractos. En el caso de *B. cereus* sólo se observó inhibición con el extracto hexánico de *I. verum* y *P. anisum* siendo más pronunciada la inhibición con este último extracto. De M, *et al*; 2001, mencionan que el extracto alcoholico de *I. verum* mostró una significativa inhibición sobre los cultivos de *E. coli* y *B. subtilis*, nuestros resultados coinciden con este autor en cuanto a la inhibición del cultivo de *E. coli*, sin embargo el autor antes mencionado señala inhibición del cultivo de *B. subtilis*, pero en nuestro estudio no observamos inhibición. La inhibición observada sobre los diversos cultivos bacterianos por parte de los extractos de *I. verum* (*K. pneumoniae*, *E. coli*,

Salmonella sp, *B. cereus* y *S.typhi*) puede ser atribuida al anetol. Lo cual coincide con lo observado por De M, *et al*; 1998.

El autor Akhtar A, *et al*; 2008, reportó que el extracto metanólico de *P. anisum* actividad antibacteriana o inhibitoria sobre *E. coli*, *S. pyogenes*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*, dicha inhibición se observa principalmente en los cultivos de *E. coli*, los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los de dicho autor, ya que en la tabla IV se observa la mayor inhibición sobre *E. coli* se obtuvo con el extracto metanólico de *P. anisum*, sin embargo, en este trabajo no se logró observar la inhibición de *S. aureus* y *K. pneumoniae*; la actividad inhibitoria que exhibe el extracto.

En la literatura se ha indicado que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos vegetales es debida a diferentes metabolitos secundarios presentes en ellos incluyendo: triterpenoides, flavonoides, fenoles, alcaloides, cumarinas, taninos y esteroides (Cottiglia F, 2001; Wanjala C.C., 2002; Takahashi, 2004; Mesa A.C., 2004 y Kiskó 2005), algunos de los cuales están presentes en los extractos metanólicos y hexánicos evaluados y por lo tanto el efecto antibacteriano podría ser atribuible a algún o algunos de los metabolitos presentes en estos extractos (Guiamet P. 2009).

En la Tabla III, se muestran los resultados del análisis fitoquímico de los extractos metanólicos y hexánicos de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum*, todos los extractos analizados fueron positivos para: flavonoides, alcaloides, aromaticidad, oxidrilos fenólicos, sin embargo sólo se logró determinar la presencia de cumarinas en el

extracto metanólico de *P. anisum* y en el extracto hexánico de *I. verum*, cotejando los resultados de la actividad antibacteriana y los resultados del análisis fitoquímico, observamos que justamente los extractos mencionados de *P. anisum* e *I. verum* son quienes presentaron mayor actividad antibacteriana considerando el número de cultivos sobre los cuales actuaron, *P. anisum* inhibió 3 cultivos de *Salmonella sp.*, *E. coli* y *S. typhi*, en tanto que el extracto hexánico de *I. verum* inhibió 4 cultivos de *Salmonella sp.*, *K. pneumoniae*, *B. cereus* y *S. typhi*.

Con respecto a los resultados obtenidos en la evaluación de los extractos metanólicos y hexánicos de *P. anisum*, *I. anisatum* e *I. verum* sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*, se observó que el extracto metanólico de *P. anisum* presentó la CI_{50} más baja (0.034 mg/mL) con respecto a los resultados de CI_{50} obtenidos de los extractos de las especies antes mencionadas (ver Tabla VI y Fig 10). En tanto que el extracto metanólico de *I. verum* presentó la CI_{50} mayor con respecto a los extractos ya mencionados, obteniendo un valor de 0.157 mg/mL, de acuerdo a estos resultados el extracto metanólico de *P. anisum* presenta 4.6 veces mayor potencial amebicida que el extracto metanólico de *I. verum*.

Tanto los valores de CI_{50} sobre los cultivos de *E. histolytica* de los extractos metanólicos de *I. verum* y de *I. anisatum* no presentan diferencia significativa entre sí, sin embargo los extractos hexánicos de ambas especies sí presentan diferencia significativa. Pero el resultado de CI_{50} del extracto metanólico de *P. anisum* presenta diferencia significativa con respecto a todos los extractos antes

mencionados. Sin embargo al extracto hexánico no fue posible determinarle el valor de CI_{50} sobre el cultivo de *E. histolytica* debido a que al colocar el extracto en el cultivo de las amibas, dicho extracto se tornaba espeso.

De acuerdo a los resultados observados, *E. histolytica* es sensible principalmente al extracto metanólico de *P. anisum*, nuevamente esta actividad amebicida podría ser atribuída a la presencia de cumarinas (Nikhil B *et al*; 2012 y Iqbal P.F *et al*; 2009) o bien a la simbiosis de diferentes metabolitos secundarios producidos por *P. anisum*.

Las cumarinas son un grupo muy amplio de compuestos fenólicos que tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopirán-2-ona. Las cumarinas son derivadas del metabolismo de fenilalanina, por ciclización de la cadena lateral del ácido cinámico a o-cumárico (Gonzalez-Ronquillo, *et al.*, 2011).

Los productos naturales son considerados como fuente con un gran potencial para la búsqueda de nuevas drogas para el tratamiento de enfermedades que afectan a los países en vías de desarrollo. En este trabajo, se evaluaron los extractos hexánicos y metanólicos de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum* para evaluar su potencial antiamebiano, y se determinó la CI_{50} , sin embargo en la literatura no se encontró referencia alguna al respecto, por lo cual se podría considerar que este estudio representa el primero en su tipo, al evaluar los extractos metanólicos y hexánicos de las especies antes mencionadas, sin embargo existen múltiples trabajos en los cuales se ha realizado el análisis de extractos de plantas sobre el cultivo de *E. histolytica* (Bharti N, *et al*; 2006, Rani D 2011).

De acuerdo al análisis de la actividad biológica del extracto metanólico de *P. anisum* este extracto se separó y se obtuvieron 3 fracciones (fracción 1, 2 y 7) las cuales fueron analizadas sobre cultivos de bacterias (*E. coli*, *Salmonella sp.* y *Bacillus cereus*) y sobre cultivos de *E. histolytica*. De acuerdo a los resultados obtenidos, sólo la fracción 7 presentó actividad bactericida sobre *E. coli* (Fig. 16), y con respecto a la actividad antiamebiana sobre *E. histolytica* también la fracción 7 a la dosis de 0.47mg/mL presentó aproximadamente 75% de inhibición (Fig. 17). De acuerdo a los resultados obtenidos se decidió someter la fracción 7 a los siguientes análisis: resonancia magnética nuclear ^1H y ^{13}C , análisis de correlación espectroscópica (COSY), y enseguida al análisis de espectroscopía de masas, de acuerdo a estos análisis en la fracción 7 se encuentra una molécula identificada como 1-benzopirilio.

Al hacer el análisis global de los resultados obtenidos de la actividad biológica de los extractos hexánicos y metanólicos de *P. anisum*, *I. verum* e *I. anisatum*, a través de diversas técnicas, se deduce que la molécula responsable de la actividad bactericida y amebicida de la fracción 7 del extracto metanólico de *P. anisum*, corresponde a la presencia de la molécula de 1-benzopirilio, la cual también ha sido reportada por Lu Y, *et al*; 2002 la cual fue identificada en un extracto de la semilla de la grosella negra, este autor también identifica a esta molécula como un pyranodelphinin D, la cual pertenece al grupo de las pyranoanthocyaninas.

Estos resultados estimulan a continuar con el aislamiento de compuestos de estas especies y así conocer la estructura química de dichos compuestos aislados y que permitan conocerlos y así detectar sus mecanismos de acción y su uso adecuado avalado científicamente.

8. CONCLUSIONES

- ✓ De los extractos obtenidos el porcentaje de rendimiento de las plantas en estudio, el mayor rendimiento fue la de *I.anisatum* de 31.26% correspondiente al extracto metanólico y de 28.3% al extracto hexánico, siendo *P.anisum* el de menor rendimiento con un 12.13% en el extracto metanólico.

- ✓ Los extractos tanto metanólicos como hexánicos de las especies de anís *P.anisum*, *I.verum* y *I.anisatum*, aun no siendo compuestos puros presentaron actividad inhibitoria sobre el crecimiento axénico in vitro de *E. histolytica*.

- ✓ El extracto metanólico de *P.anisum* presentó la CI_{50} más baja, la cual fue de 0.034 mlg/ml sobre cultivos axénicos in vitro de *E. histolytica*, seguido por el extracto hexánico de *I.verum* con un CI_{50} de .082 mg/ml

- ✓ El extracto metanólico de fruto *I.verum*, *I.anisatum*, *P.anisum* presentaron capacidad de inhibición sobre *E.coli*

- ✓ El extracto hexánico de fruto *I.verum*, *I.anisatum*, presentaron capacidad de inhibición sobre *S. typhi* y *Salmonella sp.*

- ✓ Se identificó la presencia de oxídricos fenólicos, flavonoides, alcaloides, en todos los extractos de *I. anisum*, *I.verum* y *I. anisatum*

- ✓ De los estudios espectroscópicos de resonancia magnética nuclear y espectroscopía de masas de la fracción 7 del extracto metanólico de *P.anisum*, se propone la estructura 1-benzopirilio ($C_{11}H_{11}O_2$)

9. LITERATURA CONSULTADA

- Abdul-Ghani A.S., S.G. El-Lati, A. I. Sacaan and M.S. Suleiman (1987). *In vitro* Antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic bacteria. International J. Crude Drug Res, **25**:39-43.
- Afifi NA, A. Ramadan, E. A. El-Kashoury and H.A (1994). El-Banna. Some pharmacological activities of essential oils of certain umbelliferous fruits. Vet. Med. J. Giza, 42:85-92.
- A.Akhtar, A.A.Deshmukh, A.V.Bhonsle, P.M. Kshirsagar and M.A.Kolekar.(2008). In vitro Antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic bacteria. Veterinary World Vol.1,No 9,pp 272-274
- Akerele O (1993) Las plantas medicinales; un Tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud 14 :390-395
- Albuquerque A., A.L. Sorenson and J.H. Leal Cardoso (1995). J. Ethnopharmacology, **49**:41-49.
- Al-Saleh,F.S., Gamal El-Din A.Y., Abbas J.A. y Saeed N.A. (1997). Phytochemical and Biological Studies of Medicinal Plants in Bahrain: The Family Chenopodiaceae-Part 2. International J. of Pharmacognosy. 35:38-42.

- Avicenna A (1988). Drugs and decoctions used in epilepsy. In: Sharafkandi, A. (Translator), Ghanoon Dar Teb. Soroosh Press, Tehran, pp: 456-459.
- Barceloux, Donal G.(2008). Medical toxicology of natural substances: foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals. Editorial Wiley. Nueva Jersey. Pp.576
- Bharti N.; Husain K.; González Garza, M. T.; Cruz-Vega, D.E.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B. D.; Naqvi, F. and Azam, A (2002). Synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **12**:3475-3478
- Cernuda, Olalla (2005). El Nuevo “oro asiático” se llama anís estrellado. Madrid (el mundo.es)
- Chaves Herrera, Karla (2006). Intoxicación por anís estrella . *Acta Pediátrica Costarricense*. San José. 21:1
- Chicouri M. and I. Chicouri (2000). Novel pharmaceutical compositions containing senna with laxative effect. *Fr. Demande FR 2791892 A1*, Oct 13, 6.
- Cottiglia, F., Loy, G., Garau, D., Floris, C., Casu, M., Pompei, R., Bonsignore, L. (2001), “Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L.”, *Phytomedicine*. Vol. 8, No. 4, pp. 302-305.
- De M; De AK; Mukhopadhyay R; Miro,R y Anerjee AB.(2001). Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook f. *ArsPharmaceutica*, 42:3-4; 209-220.

- De M, De AK, Sen P, Banerjee Ab.(1998).Isolation of antimicrobial compounds from star anise. Proceedings of National Conferencia on Recent Trends in Spices and Medicinal Plant Research, B-7
- Dolly Rani.(2011).Plant Extracts with Antiamoebic Properties: A Theoretical study with reference to *Entamoeba histolytica*.Internatinal Journal of PharmTech Research.Vol. 3,No.2,pp1113-1117.
- Domínguez X. A (1973). Métodos de investigación fitoquímica. 1ª edición. LIMUSA. México, D.F. 176.
- Dzido TH, Tuzimski T. (2008). Chambers, Sample Application and Chromatogram Development. In:Thin Layer Chromatography in Phytochemistry.Waksmundzka-Hajnos M.Sherma J. and Kowalska T.(eds.). CRC Press: Boca Ratón, Florida, pp. 119-168
- Ferrán, Aranaz M, (2001).SPSS para Windows.Análisi Estadístico. Editorial Mcgraw-Hill Interamericana de España. Impreso en España.255-264
- Field LD,Sternhell S, Kalman JR.(2008). Organic Structures from Spectra. Wiley & Sons Inc.:West Sussex, England, pp.21-32
- Gross, JH. (2004).Mass Spectrometry: A Textbook. Springer-Verlag: Germany, pp.223-243.
- Guiamet, P., Lavin, P., Battistoni, P., Gómez de Saravia, S.G., García, M., Vivar, I., Tiommo, O.Tacoronte, J.E., Borrego, S. (2009), “Fitocomposición de aceites esenciales de plantas y su actividad

- Herber D. (2007). PDR for Herbal Medicines. 3a. ed. Thomson PDR, NJ, USA, pp 120-124.
- Iqbal PF, Bhat AR, Azam A(2009). Antiamoebic coumarins from the root bark of *Adina cordifolia* and their new thiosemicarbazone derivatives. Eur J Maed Chem ; 44:2252-2259.
- Jacobsen NE.(2007). NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology. Wiley & Sons Inc.: New Jersey,pp.74-118
- Ki Sung, Chung;Kimura, Takeatsu;But,Paul P.H y Guo, Ji-Xian.(2008).Internacional Collation of Tradicional and Folk Medicine: Northeast Asia Internacional collation of traditional and folk medicine. 3(3):34 Northeast Asis, UNESCO. Singapur. 3:34
- Kiskó, G., Roller, S. (2005), “Carvacrol and p-cymene inactivate Escherichia coli O157:H7 in apple juice”, BMC Microbiology Vol. 5, pp. 36.
- Koneman W., Allen S.D., Dowell V.R., Sommers M.(1989). Diagnostico Microbiologico. 1a edición. Ed. Médica Panamericana. 380-402.
- Long, K. Z.; Rosado, J. L.; Montoya, Y.; Solano, M. L.; Hertzmark, E.; DuPont, H. L.; Santos, J. I. (2007). Effect of Vitamina A and Zinc Supplementation on Gastrointestinal Parasitic Infections Among Mexican Children. Official Journal of the American Academy of Pediatrics. 120, e846-e855.
- Macomber RS. (1998). A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy.Wiley & Sons Inc.:USA,pp.1-46

- Madrigal Delgado, Ana; Jiménez Chaverri, Ana Laura; Quiroz, Damaris y Acosta Gualandri, Alejandra.(2010).Intoxicación con anís estrella en niños menores de 12 meses, en el Hospital Nacional de Niños: “ Dr. Carlos Sáenz Garza” durante el período 2001-2005.Acta Pediátrica Costarricense.22(1)
- Mehmet Ciftci, Talat Güler, Bestami Dalkiliç and O. Nihat Ertas(2005). International Journal of Poultry Science, ; 4 (11): 851-855.
- Mercado-Hernández, R. y Santoyo-Stephano, M.,(1998). Apuntes de Estadística II. Capítulo III-VI. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas
- Mesa A. A. C., Bueno S. J. G. y Betancur G. L. A. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. Rev. Esp. Quimioterap. Diciembre; Vol. 17 (No4): 325-331
- Minakahi De, Amit Krishna De, ParimalSen, Asun Baran Banerjee(2002). Antimicrobial properties of star anise (*Illicium verum* Hook). 16(1):94-95
- Mitchell TN, Costisella B.(2007). NMR-From Spectra to Structures: An Experimental Approach Second edition.Springer-Verlag: Berlin-Heidelberg,pp. 3-38
- Navarro V,Villarreal M,L, Rojas G. y Lozoya X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. J. of Ethnopharmacology.53(Suppl.3): 143-147
- Neelam Barthi, Shailendra Singh, Fehmida Naqvi, and Amir Azam.(2006).Isolation and in vitro antiamoebic activity of iridoids isolated from *Kigelia pinnata*.Arkivoc.pp 69-76

- Orozco, E.; Lopez, C.; Gomez, C; Perez, D.G.; Marchat, L.; Banuelos, C.; Delgadillo, D.M. (2002). Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Int* 51, 353-359.
- Paniagua, G. L.; Monroy, E.; García-González, O.; Alonso, J.; Negrete, E.; Vaca, S. (2007). *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 6, 17.
- Panoto-s, (2007). Historia de los fitofármacos en la medicina. Editorial Siegfried Rhen. pp 9-20
- Patiño C. Diana. (2003). ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? *UMBral Científico*, ISSN 1692-3375, N°. 3, p.p. 48-56
- Phillipson J.D. Natural products as drugs (1994). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 88, supplement 1, 17-19.
- Pritt, B. S.; Clark, C. G. (2008). Amebiasis. *Mayo Clin Proceedings*. 83, 1154-1160.
- Rivas Morales C, Salinas Carmona M.C., Galán Wong L. y Medrano Roldán H. Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico Titulo de la Patente: No 252592 MPI MX/07/11/2007
- Samarawickream NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P. (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *J. Antimicrob. Chemother.* 40:833-40.

- Segura J.J, Morales-Ramos L.H., Verde Star J, Guerra D.(1990) Inhibición del crecimiento de *Entamoeba histolytica* y *E. invadens* producida por la raíz del granado (*Punica granatum* L). Arch. Inves.Méd. 21 : 235-239
- Seidel V.(2006). Initial and Bulk extracción. In: Methods in Biotechnology, Vol.20, Natural Products Isolation, Second edition; Sarker SD, Latif Z and Gray AI.(eds). Humana Press: Totowa, New Jersey,pp.27-46
- Shrestha y Dhillion, (2003); Medicinal plant diversity and uses in the Sango bay area, Southern Uganda. Journal of Ethnopharmacology . Volume 113, Issue 3, 25 September 2007, Pages 521-540.
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. (2005). Spectrometric Identification of Organic Compounds, Seventh edition. Wiley & Sons Inc.: USA, pp.127-340
- Singh G.I.P. Kappoor, S.K. Pandey, U.K. Singh and R.K. Singh (2002). Studies on essential oils: Part 10; antibacterial activity of volatile oils of some species Phytother Res.**16**: 680-682.
- Soliman K.M. and R.I. Badea (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi .Food chem. Toxicol., **40**:1669-1675.
- Sohni Youvraj R.,Kaimal P, Bhatt R M. (1995).The antiamoebic effect of a crude drug formulation of herbal extracts against *Entamoeba histolytica* *in vitro* and *in vivo*. J . of Ethnopharmacology. 45 : 43-52.
- Stanley SL Jr . (2003). Amoebiasis. Lancet. 361, 1025-34.

- Tabanca N.E. Bedir, N. Kirmer, K.H. Baser, S.I. Khan, M.R. Jacob and I.A. Khan (2003). Antimicrobial compounds from *Pimpinella* species growing in Turkey. *Planta Med.*, **69**:933-938.
- Takahashi T., Kokubo R., Sakaino M. (2004), "Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculate*, *Letters in Applied Microbiology* Vol. 39, No. 1, pp. 60-64.
- Verguese, J. (1998). The world of spices and herbs. *Spice India*.11:15-18
- Vijaya K., Nanthan S. y Nalini R.(1995). Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60(*Camelia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on shigella spp.-a cell culture study. *J.of Ethnopharmacology*. 49 (Supl. 2-1): 115-118
- Vogler B, Setzer WN.(2006). Caracterización of Natural products. In: *Natural Products of Plants*; Cseke L, Kirakosyan A, Kaufman P, Warber S, Duke J and Briemann H.(eds.).Taylor& Francis Group:Boca Ratón, Florida, USA,PP.319-386
- Wanjala C.C., Juma B. F., Bojase G., Gashe B. A., Majinda R. R. (2002), "Erythraline alkaloids and antimicrobial flavonoids from *Erythrina latissima*", *Planta Medica* Jul, Vol. 68, No.7, pp. 640-642.
- Wassmann C, Hellberg A , Tannich E, Bruchhaus I (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem*. **274**: 26051-6.

World Health Organization (1997). Amoebiasis-an expert consultation. Weekly Epidemiological Record No.14. Ginebra.

Yesilada E.(2005).Past and future contributions to tradicional medicine in the health care system of the Middle-East.Journal of Ethnopharmacology.100. 135-137.

Yinrong Lu, L.Yeap foo and Yan Sun.(2002). New pyranoanthocyanins from blackcurrant seeds.Tetrahedron Letters 43:7341-7344.

A N E X O S

Se analizaron los espectros de ^{13}C -RMN de la fracción 7 del extracto de *P. anisum*.
como se muestra a continuación:

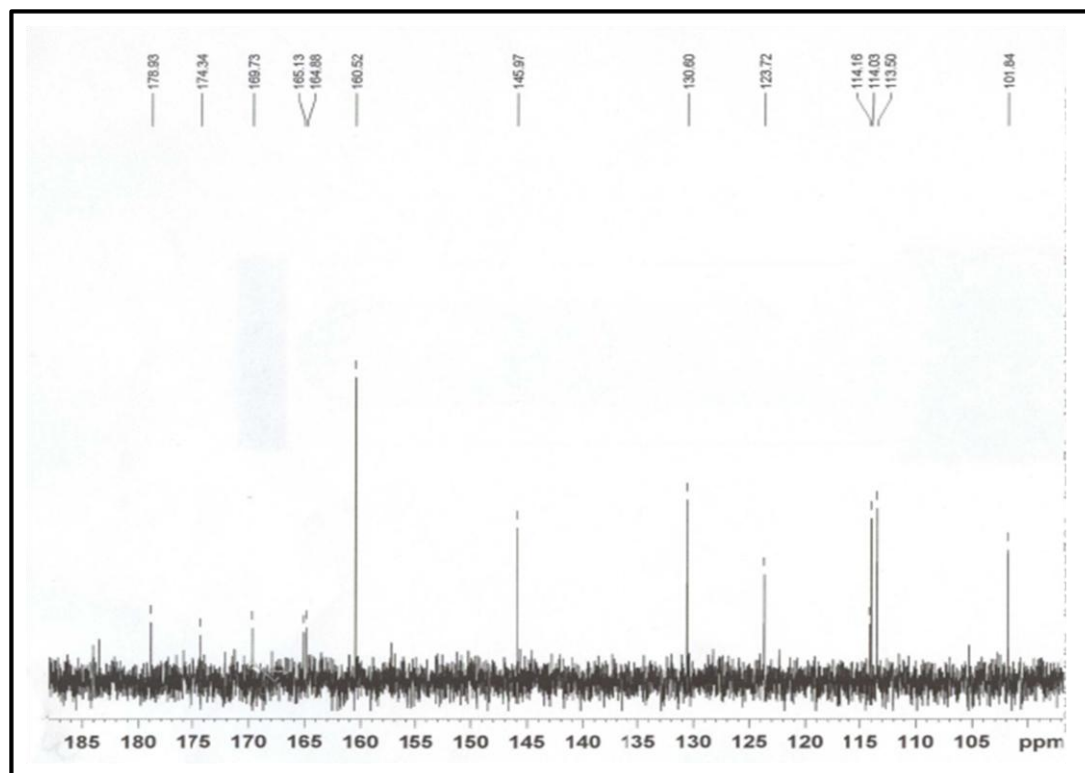


Fig.23 Espectro ¹³CNMR del Compuesto obtenido de la fracción 7 Rf 0.93 del extracto de *P. anisum*

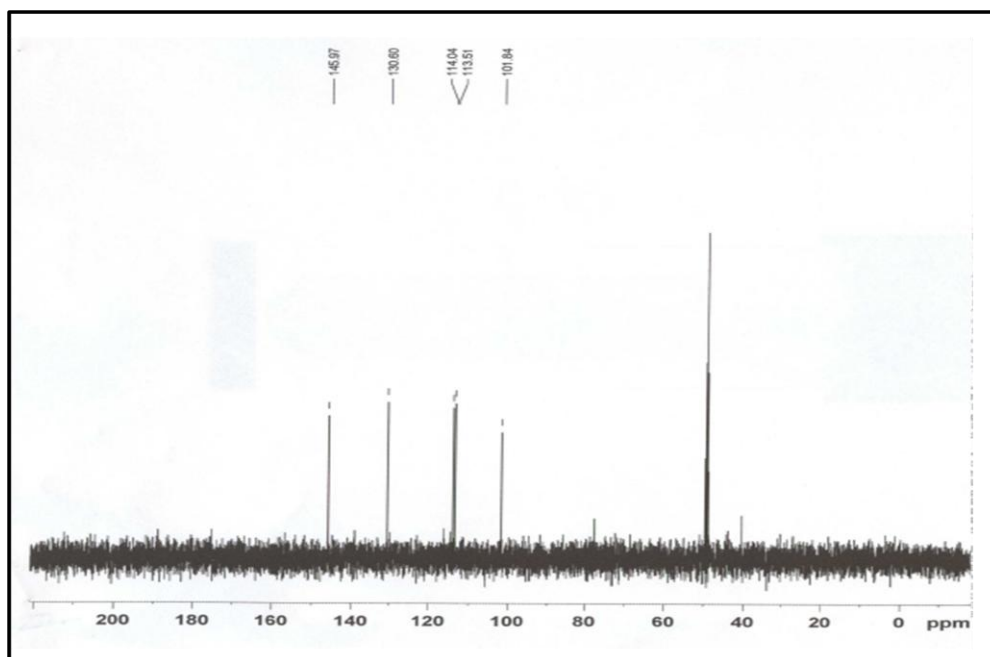


Fig.24 Espectro DEPT90 del Compuesto obtenido de fracción 7 Rf 0.93 del extracto de *P. anisum*

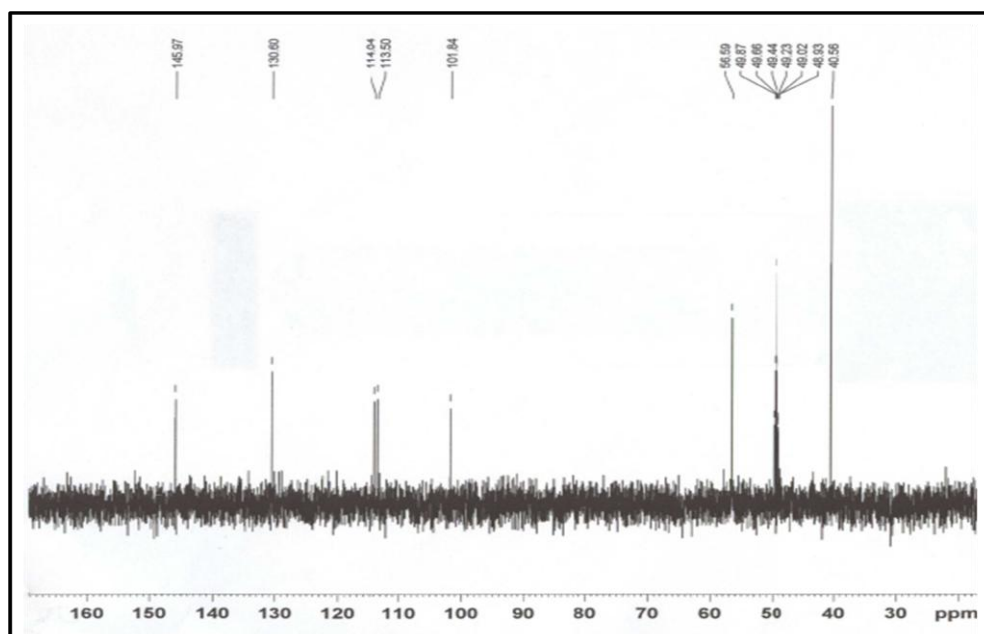


Fig.25 Espectro DEPT135 del Compuesto obtenido de la fracción 7 del extracto de *P. anisum*.

Tabla X. Datos Espectroscópicos ^{13}C -RMN del Compuesto obtenido de la fracción 7 del extracto de *P. anisum*

Señal	δ	DEPT 90	DEPT 135
1	56.58	(0)	(+) CH3
2	101.84	(+) CH	(+) CH
3	113.5	(+) CH	(+) CH
4	114.03	(+) CH	(+) CH
5	114.16	(0)	(0) Cq
6	123.72	(0)	(0) Cq
7	130.6	(+) CH	(+) CH
8	145.97	(+) CH	(+) CH
9	160.52	(0)	(0) Cq
10	164.88	(0)	(0) Cq
11	165.13	(0)	(0) Cq
12	169.73	(0)	(0) Cq
13	174.34	(0)	(0) Cq
14	178.93	(0)	(0) Cq

HMQC

Señal	DEPT 90	DEPT 135	$^1J_{C-H}$
1	(0)	(+) CH3	Q
2	(+) CH	(+) CH	V
3	(+) CH	(+) CH	U
4	(+) CH	(+) CH	W
5	(0)	(0) Cq	
6	(0)	(0) Cq	
7	(+) CH	(+) CH	X
8	(+) CH	(+) CH	Y
9	(0)	(0) Cq	
10	(0)	(0) Cq	
11	(0)	(0) Cq	
12	(0)	(0) Cq	
13	(0)	(0) Cq	
14	(0)	(0) Cq	

10. APÉNDICE

10.1 RESUMEN CURRICULAR

Yadira Quiñones Gutiérrez

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Acentuación en
Química de Productos Naturales

Tesis: ANÁLISIS DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE ESPECIES MEXICANAS DE ANÍS Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS.

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos Personales: Nacida en Poza Rica, Veracruz el día 25 de Noviembre de 1974.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo 2000. Doctorado en Ciencias con Acentuación en Química de

Productos Naturales 2012, becado por CONACyT No. 204368.

Experiencia Profesional: Maestra de Ética, sociedad y profesión, Métodos alternos de Solución de Controversias.(2001-2012)

Número de Publicaciones: 1

10.2 ARTÍCULO

Dear Dr. Quiñones,

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the African Journal of Biotechnology. There are some corrections which we will make before the proof is sent to you. For further enquiries on the publication of your Manuscript, please send a mail to ajbproof.acadjourn@gmail.com.

Best regards,

Dr. N. John Tonukari

Editor, African Journal of Biotechnology

E-mail: ajb@academicjournals.org

<http://www.academicjournals.org/AJB>

ISSN 1684-5315

**IN VITRO STUDY OF ANTIAMOEBCIC ACTIVITY OF METHANOL EXTRACT OF
FRUIT OF *Pimpinella anisum* ON TROPHOZOITES OF *Entamoeba
histolytica* HM1-IMSS**

Quiñones-Gutiérrez Y., Verde-Star, M.J., Rivas-Morales C., Oranday-Cárdenas A,
Mercado-Hernández R., Chávez-Montes A., Barrón- González M.P.

ABSTRACT

The aniseed plant *Pimpinella anisum* (Saunf - Hindi) is one of the most ancient medicinal plants used by the man. Currently, this plant has several uses in food industry as spice, whereas in the pharmacopoeia is used as expectorant in digestive disturbances, as mild diuretic, and as insect repellent in external use. In this paper was evaluated the biological activity of methanolic extract of *Pimpinella anisum* on in vitro growth of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS under axenic conditions. We observed that the growth inhibition of *E. histolytica* was at $CI_{50}=0.034 \mu\text{g/mL}$. Results confirmed the antiamebic activity of the methanolic extract of *P. anisum*.

Key word : *Pimpinella anisum*, *Entamoeba histolytica*, antiamebic activity

Corresponding author: Quiñones Gutiérrez Y.

INTRODUCTION

Among parasitic infections, amoebiasis ranks third worldwide among lethal infection, after malaria and schistosomiasis (Walsh, 1988; Petri and Mann, 1993). Amoebiasis is caused by *Entamoeba histolytica*, a protozoan parasite of humans and the causative agent of intestinal amoebiasis. This disease is a major health problem in developing countries (Stanley, 2003). Amoebiasis is acquired by ingestion of the *E. histolytica* cyst in contaminated food or water (Botero and Restrepo, 2003). Although it is asymptomatic in 90% of cases, about 50 million people are estimated to suffer from symptoms associated to amoebiasis, such as hemorrhagic colitis and amoebic liver abscess (Ravdin, 1995). These infections result in 50 000-100 000 deaths annually. Amoebiasis contributes to the prevalence of gastrointestinal disease and is defined by the World Health Organization and the Pan American Health Organization as the presence of the parasite with or without clinical manifestations (WHO, 1997).

The Dauphin de France was the first known patient with amoebiasis treated by an extract of the root of ipecacuana plant, and little progress was made during the next 200 years (Laserre, 1979). Many drugs have been used for the treatment of amoebiasis, mainly nitroimidazole derivatives of such as emetine, metronidazole, and ornidazole. In 1966, Powell *et al*, reported the success of metronidazole in the treatment of amoebic dysentery and liver abscess. Metronidazole and imidazole derivatives are the drugs of choice for the treatment of amoebiasis; however, *E. histolytica* has developed resistance mechanisms to these drugs (Samarawickram *et al.*, 2007; Wassmann *et al*, 1999; Orozco *et al.*, 2002). In addition, there have been reports that these drugs could induce mutagenic (Legator *et al*, 1975), carcinogenic (Chacko y Bhide 1986) and neurotoxic activity (Olson *et al.* 2005).

In addition to nutrients, vegetables and fruits may contain several phytochemicals that prevent certain diseases. The classic concept of nutrition has been expanded to include functional nutrition or nutraceuticals, which refers to the potential of certain foods to promote and improve health by reducing the risk for disease (Vaclavik *et al*, 2008).

Pimpinella anisum is one of the oldest plants used in food industry, perfumery and medicine. *P. anisum* has been used as digestive stimulant, antiparasitic and antifungal (Soliman 2002) and antipyretic agent (Afifi *et al.*, 1994). In addition, the plant and especially the essential oil of fruit have been used for the treatment of some diseases including epilepsy and seizures (Avicenna, 1988; Abdul-Ghani *et al.*, 1987); as well for constipation (Chicouri, 2000), and has proven activity as a muscle relaxant (Albuquerque *et al.*, 1995).

Recently, it has been reported that this oil has been used as a substitute for antibiotics in chickens (Mehmet *et al.*, 2005). Nevertheless, there are few reports on antibacterial activity studies of *P. anisum* (Singh *et al.*, 2002 and Tabanca *et al.*, 2003).

Recently, Akhtar *et al.* (2008) demonstrated the *P. anisum* bactericidal activity after testing the methanolic extract from seeds against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.

In developing countries, medicinal plants are popular because of their products are safe and widely available at low cost. Some compounds extracted from medicinal plants already play an important role against infectious disease, per e.g. the quinine extracted from *Cinchona* sp., and the artemisinin from *Artemisia annua*. Both compounds are effective against malaria. Considering their therapeutic potential, it is important to obtain information from the exact doses to become effective. Therefore, the aim of this study is to evaluate the antiamebic activity of methanolic extract from *P. anisum* *in vitro* under axenic conditions on *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS and identified antiamebic components present in methanolic extract of *P. anisum*.

Material and Methods

-Vegetal material and preparation of methanol extracts. Fruits collection: The fruits of *Pimpinella anisum* were purchased from the local market. The material was identified as *P. anisum* by the Department of Botany, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

-Extraction: The methanolic extract of *P. anisum* was obtained by taking 100g samples of fruit and individually processed in a Soxhlet unit with methanol (MeOH) at 60°C for 7 h. The extract was then filtered and concentrated in vacuum at 45°C. Methanol extract was dried under room temperature and weighed to calculate the extractability percentage. The extract was stored at 40°C until further use.

-Antiamoebic activity of the *P. anisum* methanolic extract: Trophozoites of *Entamoeba histolytica* strain HM1:IMSS at a density of 1×10^4 trophozoites per mL were added to TYI-S-33 medium (Diamond, L.S., 1978), containing 1% penicillin/streptomycin and 10% heat inactivated bovine serum. *E. histolytica* trophozoites were then incubated in 13X100mm screw-cap tubes (PYREX®) at 37°C for 72 h. Tubes were then placed in iced water for 10 min to detach cells adhering to the base of the tube and were inverted 15 times and then cell density was determined by using a hemocytometer (Neubauer, Hausser Scientific). When the culture of *E. histolytica* was grown logarithmically, trophozoites were harvested and suspended in 50 μ L phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS) at 1×10^4 trophozoites per mL. These suspensions were inoculated separately in 1 mL screw-capped borosilicate vials (Bellco, Vineland, NJ, USA) containing 1 mL of TYI-S-33 medium (Diamond L.S., 1978), vials were added containing 50 μ L of various concentrations of the *P. anisum* methanolic extract (0.1, 1.0, 3.0 y 5.0 mg per mL) and incubated for 6 d at 37°C. The solutions were sterilized by filtration through a 0.22 μ m pore-size membrane (Merck Millipore). A control containing 50 μ L of DMSO was included in each assay. Preliminary test with DMSO were performed to ensure that no trophozoite inhibition occurred at the concentrations used. After that, cell density was determined by using a hemocytometer (Barrón *et al.*, 2008). The positive controls contained metronidazole (0.124 μ g/mL) instead of methanolic extract. Bioassays were done by triplicate. Fifty percent inhibitory concentration was determined by using the Probit test.

The inhibitory effect of the *P. anisum* methanolic extract was estimated as the decreased percentage of trophozoite number with respect to nontreated cultures. Corresponding averages and standard deviations (SD) were plotted. The fifty percent inhibitory concentration (IC₅₀) of the *P. anisum* methanolic extract was expressed as the concentration that produced a 50% decrease of trophozoite concentration in each of the three protozoa species. Each determination was performed three times, in triplicate. The effect of metronidazole was expressed as a diminution percentage with respect to nontreated controls.

-Statistical analysis: SPSS software, version 10.0 (SPSS, Inc.), was used for statistical analysis.

Phytochemical tests: Conventional chemical tests were used to identify functional groups in the methanolic extract (Domínguez, 1973).

RESULTS AND DISCUSSION

The yield of the methanolic extraction process for each 100 g of *P. anisum* fruit was 12.13% wt/wt. Methanolic extract from *P. anisum* showed *E. histolytica* trophozoites growth inhibition when tested by *in vitro* culture under axenic conditions. Results showed a dose-reponse behavior, where inhibition rates were significantly different at extract doses. At a rate of 0.1 mg/mL, the inhibition ranged 68%, 74% at the dose of 1 mg/mL, at the dose of 3 mg/mL was 87% and at 5 mg/mL was 99.18% (Fig. 1).

The inhibition concentration analysis showed that methanolic extract had an IC_{50} of 0.0345 mg/mL on *in vitro* growth of *E. histolytica* trophozoites (Fig. 2), whereas metronidazole had an IC_{50} of 0.1442 μ g/mL. Values were expressed as the mean \pm standard error (n=9). The Probit value was expressed relative to the metronidazole effect.

Analysis of the *P. anisum* methanolic extract using silica gel chromatography showed three fractions. The inhibition rate of each fraction was separately evaluated. Results showed that regardless the fraction tested, all presented the highest inhibition growth at 0.47 mg/mL (74% inhibition). In order to identify the compound (s) present in each fraction the third fraction was analyzed by mass spectrometry, showing a lead compound with a molecular weight of 175, an aromatic ring, double bonds and a methyl group (methoxy), obtaining as the structure of 1-benzopyrylium as responsible for the antiamebic activity. 1-Benzopyrylium is a widely distributed molecule within plants, and it is partially present as anthocyanins flavones.

All together, results provide evidence of *E. histolytica* trophozoites growth inhibition by methanol extract of *P. anisum* fruits. In addition, one out of three fractions obtained from the methanolic extract was positively identified as 1-benzopyrylium. We believe that this supports new evidence of metabolites derived from plants with antiamebic activity. The methanolic extract of *P. anisum* has a great popular worldwide as it is used as food which is an advantage in terms of popular acceptance for use.

Other species, such as *Anisatum illicium* is similar in morphology and chemical composition to *Illicium verum*. In *I. verum* has been identified the veranisatinas A, B and C, which present low-power neurotoxic, while in *I. anisatum* has been detected the presence of anisatin and neoanisatin, the most toxic therapeutic compounds against pathogenic microorganisms to man, with anti-inflammatory and antifungal activities. It has also been reported that the aqueous extract of the fruit of *I. verum* has antibacterial activity against *Bacillus subtilis*, as well as antiviral activity against herpes virus-type 2, influenza virus, smallpox virus and poliovirus II. The essential oil obtained from the fruit is active against *B. subtilis*, *Escherichia coli* and

Pseudomonas aeruginosa, as well has been reported antifungal activity against *Candida albicans* and seed essential oil has activity against *Candida lipolytica* (Argueta 1994).

Methanolic extract of *P. anisum*, as well as three of their fractions, could be evaluated on the process of encystment of *Entamoeba histolytica* and biological activity on other pathogens of man.

CONCLUSION

Methanolic extract of fruit of *Pimpinella anisum* shows growth inhibition activity against *Entamoeba histolytica* trophozoites strain HM1:IMSS under axenic conditions *in vitro*.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was supported by CONACYT no.204368.

REFERENCES

- Abdul-Ghani A.S., S.G. El-Lati, A. I. Sacaan and M.S. Suleiman (1987). *In vitro* Antibacterial activity of *Pimpinella anisum* fruit extracts against some pathogenic bacteria. International J. Crude Drug Res, **25**:39-43.
- Afifi N.A., A. Ramadan, E. A. El-Kashoury and H.A. El-Banna (1994). Some pharmacological activities of essential oils of certain umbelliferous fruits. Vet. Med. J. Giza, **42**:85-92.
- Argueta A (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana I., Instituto Nacional Indigenista, Primera Edición. México, D.F.
- Akhtar Y.; Yeoung, Y. R. & Isman, M.B (2008). Comparative bioactivity of selected extracts from Meliaceae and some commercial botanical insecticides against two noctuid caterpillars, *Trichoplusia ni* and *Pseudaletia unipuncta*. Phytochem. Rev., **7**: 77–88.
- Avicenna A (1988). Drugs and decoctions used in epilepsy. In: Sharafkandi, A. (Translator), Ghanoon Dar Teb. Soroosh Press, Tehran, pp: 456-459.
- Albuquerque A., A.L. Sorenson and J.H. Leal Cardoso (1995). J. Ethnopharmacology, **49**:41-49.

- Barrón-González M. P.; Serrano-Vásquez, G. C.; Villarreal-Treviño, L.; Verduzco-Martínez, J.A.; Morales-Vallarta, M.R.; Mata-Cárdenas, B.D. (2008). Inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica* por acción de probióticos. Revista Ciencia UANL, **11**:285-290.
- Bharti N.; Husain K.; González Garza, M. T.; Cruz-Vega, D.E.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B. D.; Naqvi, F. and Azam, A (2002). Synthesis and *in vitro* antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. Bioorg. Med. Chem. Lett. **12**:3475-3478
- Botero D., Restrepo M., (2003). "Parasitosis Humanas". 4° edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. **14**: 30-60.
- Chaco M., Bhide S.V., (1986). Carcinogenicity, perinatal carcinogenicity and teratogenicity of low dose metronidazole (MNZ) in Swiss mice. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. **112**:135-140.
- Chicouri M. and I. Chicouri (2000). Novel pharmaceutical compositions containing senna with laxative effect. Fr. Demande FR 2791892 A1, Oct 13, 6.
- Diamond, L.S., Harlow, D.R. & Cunnick, C.C. (1978). A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other Entamoeba. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **72**: 431-432.

Domínguez X. A (1973). Métodos de investigación fitoquímica. 1ª edición. LIMUSA. México, D.F. 176.

Laserre R. (1975). Traitement de l'amibiase-La2-Dehydroemetine. Schweiz Med Wschr. 96:678-701.

Legator, M.S., T.H. Connor and M Stoeckel., (1975). Detection of mutagenic activity of metronidazole and niridazole in body fluids of human and mice. Science. **188**:1118-1119.

Mehmet Ciftci, Talat Güler, Bestami Dalkiliç and O. Nihat Ertas (2005): International Journal of Poultry Science **4 (11)**: 851-855.

Olson E.J., Morales S.C., McVey A.S, Hayden D.W., (2005). Putative metronidazole neurotoxicosis in a cat. Veterinary Pathology. **42**:665-669.

Orozco E.; Lopez, C.; Gomez, C; Perez, D.G.; Marchat, L.; Banuelos, C.; Delgadillo, D.M (2002). Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. Parasitol Int. **51**: 353-359.

Paniagua G. L.; Monroy, E.; García-González, O.; Alonso, J.; Negrete, E.; Vaca, S (2007). Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. **6**:17.

Petri Jr. WA, Mann BJ (1993). Molecular mechanisms of invasion of *Entamoeba histolytica*. Sem. Cell. Biol., 4(5): 305-313.

Pritt B. S.; Clark, C. G (2008). Amebiasis. Mayo Clin Proceedings. **83**:1154-1160.

Powell SJ, Wilmot AJ, MacLeod I, Elsdon-Dew R. The effect of a nitro-thiazole derivative, Ciba 32,644-Ba, in amebic dysentery and amebic liver abscess. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 1966; 15(3): 300-2.

Ravdin, J. I. 1995. State of the art clinical article. Clin. Infect. Dis. 20,1453-1466.

Samarawickream NA, Brown DM, Upcroft JA, Thammapalerd N, Upcroft P. 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. J. Antimicrob. Chemother. **40**:833-40.

Singh G.I.P. Kappoor, S.K. Pandey, U.K. Singh and R.K. Singh (2002). Studies on essential oils: Part 10; antibacterial activity of volatile oils of some species phytother Res.**16**: 680-682.

Soliman K.M. and R.I. Badea (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi .Food chem. Toxicol., **40**:1669-1675.

Stanley SL (2003). Amoebiasis. *Lancet*. **361**:1025-34.

Tabanca N.E. Bedir, N. Kirmer, K.H. Baser, S.I. Khan, M.R. Jacob and I.A. Khan (2003). Antimicrobial compounds from *Pimpinella* species growing in Turkey. *Planta Med.*, **69**:933-938.

Vaclavik, Tom (2008) Organic retailing development in Europe. Paper at: BioFach Congress, NürnbergMesse, Nuremburg, Germany, February 21 -24.

Walsh JA (1988). Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: Ravdin JI. ed. Amebiasis. John Wiley and Sons, New York. 93-105.

Wassmann C, Hellberg A, Tannich E, Bruchhaus I (1999). Metronidazole resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* is associated with increased expression of iron-containing superoxide dismutase and peroxiredoxin and decreased expression of ferredoxin 1 and flavin reductase. *J Biol Chem*. **274**: 26051-6.

World Health Organization (1997). Amoebiasis-an expert consultation. Weekly Epidemiological Record No.14. Ginebra.

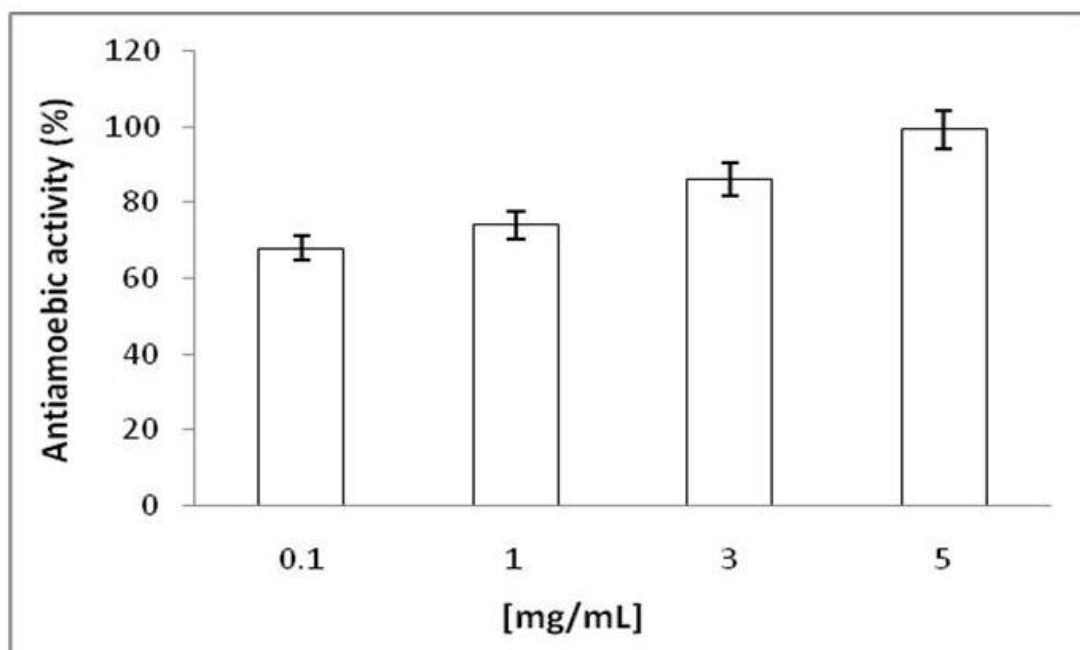


Fig. 1. Inhibition of growth *in vitro* axenic of *E. histolytica* in presence of methanol extract of fruit of *P. anisum*.

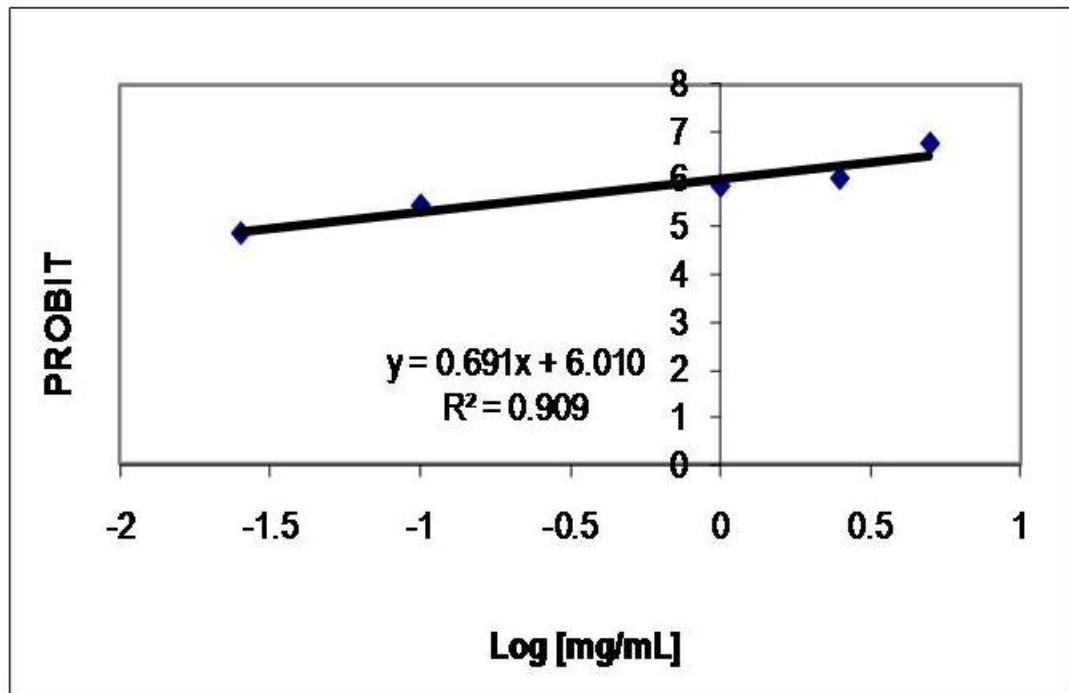


Fig.2. Probit graph of the activity of methanol extract of *Pimpinella anisum* against *E. histolytica* HM1-IMSS (50% inhibitory concentration $[IC_{50}] = 0.0345$ mg/mL).