

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



“Efecto de los extractos de *Syzygium aromaticum* sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*”

Por:

M. en C. Magda Elizabeth Hernández García

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Acentuación en Química de Productos Naturales

Junio, 2014

“Efecto de los extractos de *Syzygium aromaticum* sobre el crecimiento de  
*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*”

**Comité de tesis**

**Dra. Azucena Oranday Cárdenas**  
Director interno

---

**Dr. Benito David Mata Cárdenas**  
Director externo

---

**Dra. María Julia Verde Star**  
Vocal

---

**Dra. Catalina Rivas Morales**  
Vocal

---

**Dr. Javier Vargas Villarreal**  
Vocal

---

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



Efecto de los extractos de *Syzygium aromaticum* sobre el crecimiento de  
*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

Por:

M. en C. Magda Elizabeth Hernández García

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS**  
con Acentuación en Química de Productos Naturales

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y en el Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS, bajo la dirección de:

---

Dra. Azucena Oranday Cárdenas  
Director Interno

---

Dr. Benito D. Mata Cárdenas  
Director Externo

## DEDICATORIA

*A mi padre José Luis Hernández Martínez, quien es un gran ejemplo de arduo trabajo y tenacidad. Gracias por enseñarme a ser responsable y por impulsarme a seguir adelante.*

*A mi madre Martha Eugenia García de Jesús, que siempre me ha levantado los ánimos, apoyándome incondicionalmente, gracias por confiar en mí y ayudarme a cumplir mis sueños.*

*A mi hermana Mariely Eunice Hernández García, por todo el apoyo moral que me ha brindado, por siempre estar dispuesta a escucharme y ayudarme en cualquier momento.*

*A mi esposo Aldo Fabio Bazaldúa Rodríguez, de quien he recibido apoyo constante para culminar este proyecto, gracias por todo el amor, la paciencia y comprensión.*

*¡Gracias por todo su amor!*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial al Dr. Benito D. Mata Cárdenas por creer en mí y apoyarme en todo momento para realizar esta tesis doctoral.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas por aceptarme en el área de Química de Productos Naturales, así como el apoyo y la orientación en esta área.

A la Dra. Catalina Rivas Morales y Dra. Julia Verde Star por sus comentarios en todo el proceso de desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal por la confianza que ha depositado en mí y el apoyo brindado durante este tiempo al integrarme a su gran equipo de investigación.

Al Dr. Francisco González Salazar y al M.C. Jesús Norberto Garza González, compañeros del Laboratorio de Biología Celular por la paciencia, consejos y ánimo que me siguen brindando.

A las nuevas amistades que me dejó el área de Química de Productos Naturales: Graciela, Aldo, Ángeles, Rolando e Isvar, les agradezco el apoyo y los consejos que me brindaron durante el desarrollo de esta tesis, así como su compañía y los buenos momentos que pasamos juntos.

A todas aquellas personas que colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi agradecimiento.

A mis amigos que siempre han sido mis confidentes y me brindan una palabra de aliento en momentos difíciles. Sé que a pesar del tiempo y las circunstancias, siempre estaremos juntos.

Y especialmente a mi familia, por su apoyo incondicional que me han dado en todo momento.

*¡Muchas gracias a todos!*

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado (N° de beca 207667) para la realización de mis estudios.

Al Dr. Antonio Guzmán Velasco, director de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por facilidades brindadas para la realización de esta tesis.

Al Dr. Javier Vargas Villarreal, director del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del IMSS por todo el apoyo brindado durante este trabajo.

Al Dr. Adolfo Caballero Quintero, coordinador del Laboratorio de Química de la Procuraduría General de Justicia del Estado de Nuevo León, por permitirme realizar el análisis espectroscópico de las muestras.

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
NOMENCLATURA	XIV
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	4
3.1 Objetivo general	4
3.2 Objetivos particulares	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	7
4.2 <i>Giardia lamblia</i>	9
4.3 <i>Trichomonas vaginalis</i>	11
4.4 Metronidazol	13
4.4.1 Efectos secundarios	14
4.4.2 Resistencia al metronidazol	14
4.5 Plantas medicinales	15
4.5.1 Plantas con actividad antiparasitaria	16
4.5.2 Plantas con actividad amebicida	17
4.5.3 Plantas con actividad giardicida	18
4.5.4 Plantas con actividad tricomonocida	19

4.6 <i>Syzygium aromaticum</i>	20
4.6.1 Clasificación taxonómica	22
4.6.2 Composición química	22
4.6.3 Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos de <i>S. aromaticum</i>	23
5. MÉTODOS	26
5.1 Material biológico	26
5.1.1 Material vegetal	26
5.1.2 Cepas	26
5.1.2.1 <i>Entamoeba histolytica</i>	26
5.1.2.2 <i>Giardia lamblia</i>	26
5.1.2.3 <i>Trichomonas vaginalis</i>	27
5.2 Preparación del medio PEHPS	27
5.2.1 Preparación del extracto hígado-páncreas	28
5.3 Preparación del medio basal TYI	28
5.4 Preparación del suero bovino	29
5.5 Preparación de la bilis bovina	30
5.6 Cinéticas de crecimiento	30
5.7 Mantenimiento de las cepas	31
5.8 Extracción del material vegetal	31
5.9 Rendimiento de los extractos	32
5.10 Identificación parcial de grupos funcionales	32
5.10.1 Prueba de Liebermann-Burchard	33
5.10.2 Prueba de Salkowski	33
5.10.3 Prueba de Dragendorff	33
5.10.4 Prueba de Baljet	33
5.10.5 Prueba de NaOH	34
5.10.6 Prueba de cloruro férrico	34
5.10.7 Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina	34
5.10.8 Prueba para cumarinas	35
5.10.9 Prueba del KMnO <sub>4</sub>	35
5.11 Fraccionamiento por métodos cromatográficos	35
5.11.1 Cromatografía en capa fina	35
5.11.2 Cromatografía en columna con sílica gel	36
5.11.3 Cromatografía preparativa	38
5.12 Preparación de las diluciones de los extractos y fracciones	38
5.13 Ensayo biológico	38
5.14 Análisis espectroscópicos	39
5.14.1 Espectroscopía de infrarrojo	39
5.14.2 Cromatografía de gases	40
6. RESULTADOS	41
6.1 Identificación del material vegetal	41
6.2 Obtención de los extractos de <i>S. aromaticum</i>	41

6.3 Identificación de los grupos funcionales	42
6.4 Cinéticas de crecimiento	42
6.5 Evaluación de la actividad de los extractos de <i>S. aromaticum</i>	44
6.6 Partición del extracto acetónico	46
6.7 Fraccionamiento de la parte soluble del extracto acetónico	48
6.8 Espectro infrarrojo de la fracción colectiva	51
6.9 Fraccionamiento de la fracción colectiva	52
6.10 Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) de los extractos y fracciones con mayor actividad antiparasitaria	54
6.11 Análisis espectroscópico de la fracción secundaria 2	55
7. DISCUSIÓN	57
8. CONCLUSIÓN	64
LITERATURA CITADA	66
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	82

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
I. Composición del medio PEHPS	27
II. Composición del medio TYI	29
III. Porcentaje de rendimiento de los extractos de <i>S. aromaticum</i>	41
IV. Identificación química de grupos funcionales	42
V. $CI_{50}$ del extracto y fracciones con mayor actividad antiparasitaria	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Ciclo biológico de <i>E. histolytica</i>	8
2. Ciclo biológico de <i>G. lamblia</i>	10
3. Ciclo biológico de <i>T. vaginalis</i>	12
4. Árbol de <i>S. aromaticum</i>	21
5. Fruto de <i>S. aromaticum</i>	21
6. Cromatografía en capa fina	36
7. Cromatografía en columna	37
8. Espectrofotómetro de infrarrojo	41
9. Cromatógrafo de gases	42
10. Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i>	43
11. Cinética de crecimiento de <i>G. lamblia</i>	43
12. Cinética de crecimiento de <i>T. vaginalis</i>	44
13. Actividad de los extractos de <i>S. aromaticum</i> sobre <i>E. histolytica</i>	45
14. Actividad de los extractos de <i>S. aromaticum</i> sobre <i>G. lamblia</i>	45
15. Actividad de los extractos de <i>S. aromaticum</i> sobre <i>T. vaginalis</i>	46
16. Actividad de las particiones del extracto acetónico sobre <i>E. histolytica</i>	47
17. Actividad de las particiones del extracto acetónico sobre <i>G. lamblia</i>	47
18. Actividad de las particiones del extracto acetónico sobre <i>T. vaginalis</i>	48
19. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna	49

20. Actividad de las fracciones colectivas sobre <i>E. histolytica</i>	49
21. Actividad de las fracciones colectivas sobre <i>G. lamblia</i>	50
22. Actividad de las fracciones colectivas sobre <i>T. vaginalis</i>	50
23. Espectro de infrarrojo de la fracción colectiva 1	51
24. Cromatografía preparativa de la fracción colectiva 1	52
25. Actividad de las fracciones secundarias sobre <i>E. histolytica</i>	53
26. Actividad de las fracciones secundarias sobre <i>G. lamblia</i>	53
27. Actividad de las fracciones secundarias sobre <i>T. vaginalis</i>	54
28. Cromatograma de la fracción secundaria 2	55
29. Estructuras de los compuestos con mejor calidad	56

## NOMENCLATURA

°C	grados centígrados
µl	microlitro
µm	micrómetro
µmol	micromoles
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	dimetilsulfoxido
<i>et al.</i>	y colaboradores
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	gramos
h	horas
H <sub>2</sub> O	agua
HCl	ácido clorhídrico
lb	libra
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de potasio dibásico
kg	kilogramo
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de potasio monobásico
KMnO <sub>4</sub>	permanganato de potasio
log	logaritmo
mg	miligramo
mg/ml	miligramo por mililitro
min	minutos
ml	mililitro
mm	milímetro
N	normal
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud

PBS	Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos
PEHPS	Peptona Extracto de Hígado-Páncreas Suero
pH	potencial de hidrógeno
Rf	frente de retención
rpm	revoluciones por minuto
TYI-S-33	Tripticasa Extracto de Levadura Hierro Suero
UV	ultravioleta
v/v	volumen sobre volumen

## RESUMEN

El uso de plantas medicinales ha ganado popularidad mundial, debido a que la medicina convencional cada vez es más ineficiente, ya que la mayoría de los microorganismos han desarrollado fármaco-resistencia y el uso indiscriminado e incorrecto de medicamentos han dado como resultado efectos colaterales a los pacientes y no siempre se tiene acceso a diversos medicamentos por su elevado costo o disponibilidad.

Se ha observado el resurgimiento de enfermedades como son: la amibiasis, giardiasis y tricomoniasis; ya que los fármacos son menos eficaces por la aparición de cepas fármaco-resistentes. El fármaco útil en el tratamiento de estas parasitosis, incluyen al metronidazol el cual es el medicamento de elección por su elevada eficacia y baja toxicidad.

Sin embargo, tiene la desventaja de producir efectos secundarios, de acuerdo con la dosis utilizada o la susceptibilidad personal. Por estos motivos, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra estas parasitosis, como son los productos naturales, que desde el siglo pasado han desempeñado un papel importante en la quimioterapia de las enfermedades parasitarias. Es por eso, que nos propusimos evaluar el efecto antiparasitario de la planta *Syzygium aromaticum*.

## ABSTRACT

The use of medicinal plants has gained worldwide popularity because conventional medicine is increasingly inefficient, as most microorganisms have developed drug resistance and the indiscriminate and inappropriate use of drugs have side effects resulted in the and patients do not always have access to various drugs for their high cost or availability.

There has been a resurgence of diseases such as: amebiasis, giardiasis and trichomoniasis; since drugs are less effective for the emergence of drug - resistant strains. The drug useful in the treatment of these parasites, which include metronidazole, is the drug of choice because of its high efficacy and low toxicity.

However, it has the disadvantage of producing side effects, according to the dose used or personal susceptibility. For these reasons, it is necessary to search for new therapies against these parasites, such as natural products, since the last century has played an important role in the chemotherapy of parasitic diseases. Therefore, we set out to evaluate the antiparasitic effect of *Syzygium aromaticum* plant.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias están ampliamente distribuidas en todo el mundo y constituyen uno de los principales problemas de salud pública que afecta a los países en desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que las parasitosis son la principal causa de morbilidad, afectando a gran parte de la población. En América Latina, las enfermedades parasitarias tienen una alta prevalencia debido a múltiples factores como inmunológicos, genéticos, fisiológicos y nutricionales que de acuerdo a las condiciones socioeconómicas y culturales; favorecen la presencia de estas enfermedades (Olalla and Tercero, 2011).

Las parasitosis intestinales representan un gran problema de salud debido a la frecuencia con que se presentan, además de que provocan anemia, desnutrición y algunas complicaciones quirúrgicas. Existen diversos protozoarios que pueden infestar el intestino humano, entre ellos se encuentran *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. En México, la prevalencia de parasitosis intestinales se ha descrito en 49.1% de niños y en 53% de la población en general (Epidemiología, 2003; Lujan, 2006; González *et al.*, 2012).

Otro parásito de importancia clínica es *Trichomonas vaginalis*, ya que ocasiona una de las enfermedades de transmisión sexual más común en todo el mundo. Afecta principalmente a mujeres ocasionando infecciones vulvovaginales; sin embargo en el hombre puede causar irritación y secreción, hasta originar uretroprostatitis. Se ha reportado que las lesiones genitales incrementan la susceptibilidad a contraer una infección por el virus de inmunodeficiencia humana (Schwebke, 2006; Nanda *et al.*, 2006).

El tratamiento utilizado contra estos parásitos es el metronidazol entre otros nitroimidazoles. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que estos fármacos producen efectos colaterales (Bendesky and Menéndez, 2001). Además se ha demostrado la existencia de cepas resistentes a estos medicamentos y las causas de que fracase el tratamiento pueden ser varias

como la baja absorción de la droga, inactivación del metronidazol por la flora y al incumplimiento con la terapia indicada o a reinfecciones (Bansal *et al.*, 2006; Mahdi *et al.*, 2006; Upcroft *et al.*, 2006; Ali and Nozaki, 2007).

Por ello, es importante buscar fármacos que sean más efectivos y estimulen los mecanismos de defensa innata de los hospederos; por lo tanto los productos naturales representan una opción para buscar y desarrollar nuevos fármacos que sean selectivos, efectivos para cepas resistentes y de menor costo (Balick and Cox, 1996, Fabricant and Norman, 2001; Wagner, 2006). Debido a esto, surge el interés de buscar en *Syzygium aromaticum* compuestos con actividad sobre los protozoarios: *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

## **2. HIPOTESIS**

Los extractos de *Syzygium aromaticum* contienen compuestos que poseen actividad sobre el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad de los extractos de *Syzygium aromaticum* sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

### 3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los extractos: acetónico, etanólico y metanólico de la planta *Syzygium aromaticum* mediante agitación constante.
2. Evaluar los parámetros de crecimiento de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.
3. Determinar la  $CI_{50}$  de los extractos: acetónico, etanólico y metanólico obtenidos de *Syzygium aromaticum* sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.
4. Fraccionar los extractos que presenten menor  $CI_{50}$  sobre los protozoarios evaluados mediante cromatografía e identificar las fracciones activas.
5. Determinar la  $CI_{50}$  de las fracciones activas, sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*.

#### 4. ANTEDECENTES

Las enfermedades parasitarias son una causa constante y creciente de enfermedad en todo el mundo, pese a los adelantos que en materia de sanidad se han conseguido en los países desarrollados. Muchas de estas enfermedades están ligadas a las características geográficas y otras al medio ambiente en donde se desarrollan. En las regiones tropicales, las relaciones entre la patología y el medio ambiente son estrechas y es donde las enfermedades parasitarias han sido una causa frecuente de morbilidad y mortalidad. Pero estas enfermedades no están limitadas a regiones tropicales, sino que también pueden observarse en regiones subtropicales y templadas, en donde las características geográficas, sanitarias y socioeconómicas favorecen su transmisión.

Las parasitosis intestinales son un importante problema de salud pública y además han ocasionado grandes pérdidas económicas. La OMS considera estas parasitosis como principales causas de morbilidad, estrechamente ligadas a la pobreza y la inadecuada higiene personal, ingesta de alimentos crudos, falta de servicios sanitarios, falta de provisión de agua potable y contaminación fecal del ambiente. En los países en vías de desarrollo con escasos recursos económicos y deficientes condiciones higiénico-sanitarias, es donde las parasitosis se presentan con mayor frecuencia; sin embargo, se está detectando este tipo de enfermedades en otros lugares, debido al turismo a zonas endémicas y a la inmigración de estas zonas (Olalla y Tercero, 2011).

La frecuencia mundial de las distintas parasitosis intestinales es alta, en especial en zonas geográficas donde las condiciones ecológicas favorecen la persistencia de los parásitos, además de las características socioeconómicas de la población, son factores que lamentablemente comparten los países de América Latina.

En México, las enfermedades parasitarias más comunes son las afectan al aparato digestivo. Sin embargo, existe diversos parásitos que pueden infestar el intestino humano, entre los que se han aislado con más frecuencia se encuentran *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Estos parásitos causan molestias como dolor de estómago, diarreas y sangrados, así como debilidad, anemia y desnutrición. En adultos, se confunde con gastritis, colitis, intolerancia a algunos alimentos, estreñimiento, colon irritable, etc. Ambos protozoarios, se encuentran generalmente en la materia fecal humana que al contaminar el agua, suelo y otros objetos que entran en contacto con alimentos, provoca que se reinicie otro ciclo de contagio entre personas (Sánchez *et al.*, 2000).

Por otro lado, la tricomoniasis ocasionada por *Trichomonas vaginalis*, es una de las enfermedades de transmisión sexual de mayor importancia ya que afecta a millones de

personas en todo México, sin embargo la mayor incidencia se presenta en mujeres provocando prurito, leucorrea y vaginitis. La infección generalmente no causa síntomas en los hombres y desaparece espontáneamente en pocas semanas; sin embargo, pueden presentar ardor, prurito o secreción y en casos severos prostatitis y epididimitis (Petrin *et al.*, 1998).

Estos parásitos demuestran varias características bioquímicas y biológicas comunes, tales como metabolismo de carbohidratos anaeróbico y la carencia de una típica mitocondria (Muller, 1988), además de la falta de un aparato de Golgi bien desarrollado y otros organelos típicos de los eucariotes (Bansal *et al.*, 2006); por lo que se puede decir que *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*, son parásitos de la mucosa (Das *et al.*, 2005); sin embargo los trofozoítos de *E. histolytica* y *G. lamblia* colonizan el intestino delgado y *T. vaginalis* habita el tracto genitourinario de humanos y animales.

#### **4.1 *Entamoeba histolytica***

La amibiasis es una infección parasitaria que afecta principalmente a países en vías de desarrollo, sin embargo, las zonas con mayor número de casos reportados son las regiones tropicales y subtropicales, además de implicar factores sociodemográficos y de accesibilidad a los servicios sanitarios en la comunidad (Petri *et al.*, 2000). Se considera que un 10% de la población en general está infectada y el 90% no presentan síntomas. En México constituye un problema muy importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad (Gutiérrez and Muñoz, 1994). Se ha reportado que la frecuencia en México de la amibiasis es de 372,501 casos (Epidemiología SS, 2013).

*E. histolytica* presenta dos fases principales en su ciclo de vida: el quiste y el trofozoíto. El quiste es la forma infectiva de esta enfermedad, son tetra-nucleados y rodeados por una pared celular (que los protege de medios desfavorables). Cuando los quistes son ingeridos por el hospedero, eclosionan en el intestino delgado y se liberan los trofozoítos (forma móvil, infectiva) en donde invaden la mucosa y pared intestinal; en ocasiones se disemina a otros órganos (Zerpa *et al.*, 2007). Las personas se infectan por consumir alimentos, agua o fomites contaminados con quistes (Figura 1).

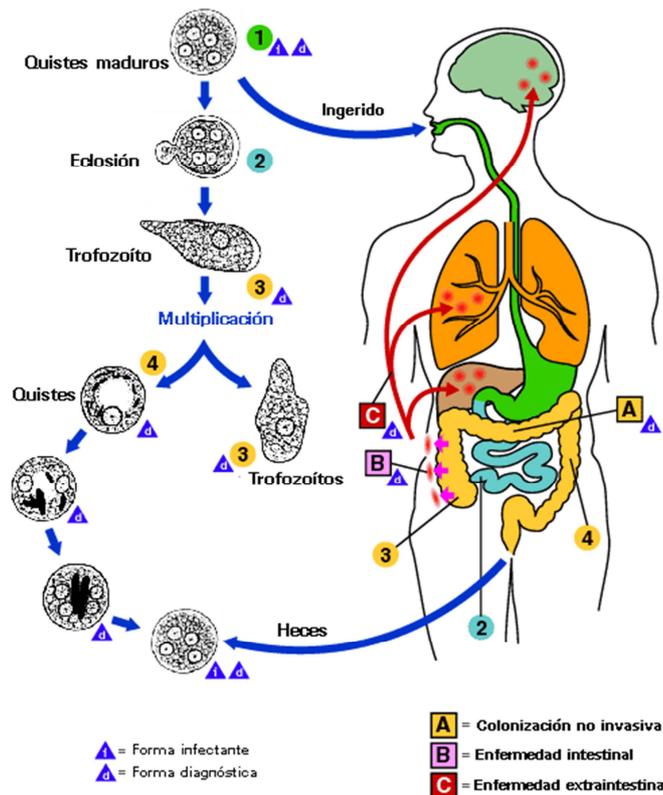


Figura 1. Ciclo biológico de *E. histolytica*

La sintomatología se presenta con: pérdida de peso, dolor abdominal, disentería, heces sanguinolentas y fiebre. Si no hay atención médica los trofozoítos pueden invadir además del intestino grueso, otros órganos como el hígado, cerebro, pulmones y en casos severos puede causar la muerte del hospedero (Guerrant, 1986).

El tratamiento de la amibiasis varía de acuerdo a la zona afectada, si la infección es extra-intestinal se receta cloruro de emetina, dehidroemetina y fosfato de cloroquina; si es en la luz del intestino se trata con las quinoleínas y la infección incluye ambas zonas, el fármaco usado es el metronidazol y sus derivados (Liu and Weller, 1996; Simjee *et al.*, 1985; Ali and Nozaki, 2007).

#### 4.2 *Giardia lamblia*

*G. lamblia* es un protozoario binucleado y flagelado que habita el intestino delgado de humanos y otros mamíferos y es el agente responsable de la giardiasis, una patología que es común en todo el mundo (Vázquez and Campos, 2009). La frecuencia en México de esta enfermedad es de 16,618 casos reportados (Epidemiología SS, 2013).

La infección con *G. lamblia* se inicia con la ingestión de quistes del parásito, los cuales se desenquistan durante su pasaje por el contenido ácido del estómago, liberando los trofozoítos (Figura 2) (Lujan, 2006). Estos colonizan el intestino delgado superior y se adhieren a la superficie del epitelio intestinal mediante su disco ventral o de adhesión (Adam, 2001).

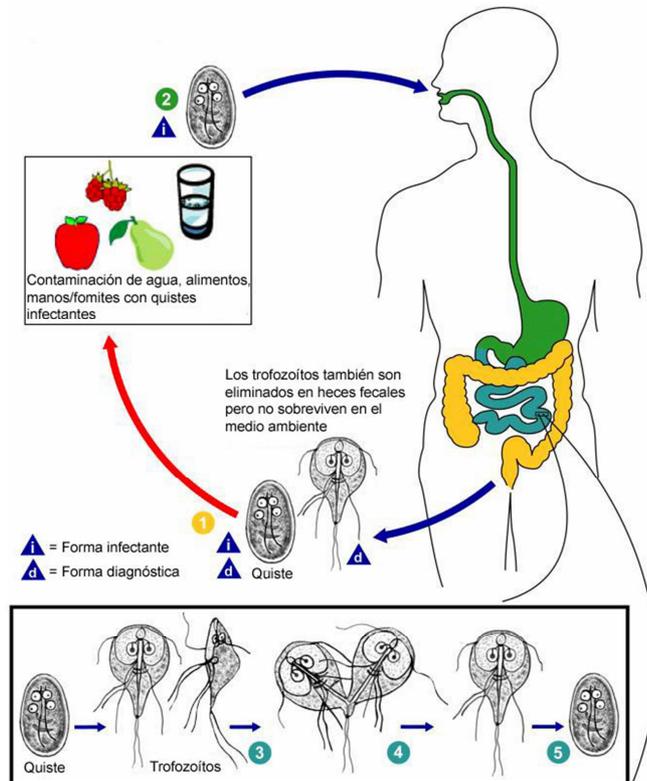


Figura 2. Ciclo biológico de *G. lamblia*

Las manifestaciones clínicas varían desde la infección asintomática a la enfermedad aguda, apareciendo de 1 a 2 semanas de la infección y los síntomas son: pérdida de peso, deshidratación, diarrea, calambres y en casos crónicos existe una mala absorción de nutrientes (Rivera *et al.*, 2002; Hawrelak, 2003). Los medicamentos más comunes en contra de la giardiasis han sido el metronidazol, tinidazol, furazolidona, quinacrina, albendazol y paromomicina (Gardner and Hill, 2001; Ali and Nozaki, 2007).

### 4.3 *Trichomonas vaginalis*

*T. vaginalis* es el agente causal de la tricomoniasis, una causa común de vaginitis, también es considerada una enfermedad de transmisión sexual que se presenta a nivel mundial.

La incidencia anual de las infecciones por *T. vaginalis* en los Estados Unidos ha sido estimada en cerca de cinco millones de casos (Scwebke, 2007). Mientras que la frecuencia en México de esta enfermedad fue de 109,976 casos reportados (Epidemiología SS, 2013).

Este protozooario es de forma ovoide o piriforme que mide de 7-30  $\mu\text{m}$  de longitud y de 5-15 de ancho. El trofozoíto se caracteriza por presentar cuatro flagelos dispuestos de dos en dos en la parte anterior y un flagelo recurrente que forma la membrana ondulante, que no llega a la parte posterior del cuerpo (Figura 3) (Petrin *et al.*, 1998; Costamagna and Figueroa, 2001; Alderete *et al.*, 2002). Su forma de reproducción es por fisión binaria longitudinal y no se reporta la presencia de quistes en su ciclo biológico, sin embargo aunque carece de formas de resistencia, la quitina asociada a estructuras de superficie le permiten sobrevivir en condiciones ácidas (pH 4.0-4.5). De esta manera *T. vaginalis* vive en el moco vaginal, sin embargo también afecta la uretra, próstata y epidídimo (Alderete *et al.*, 2002).

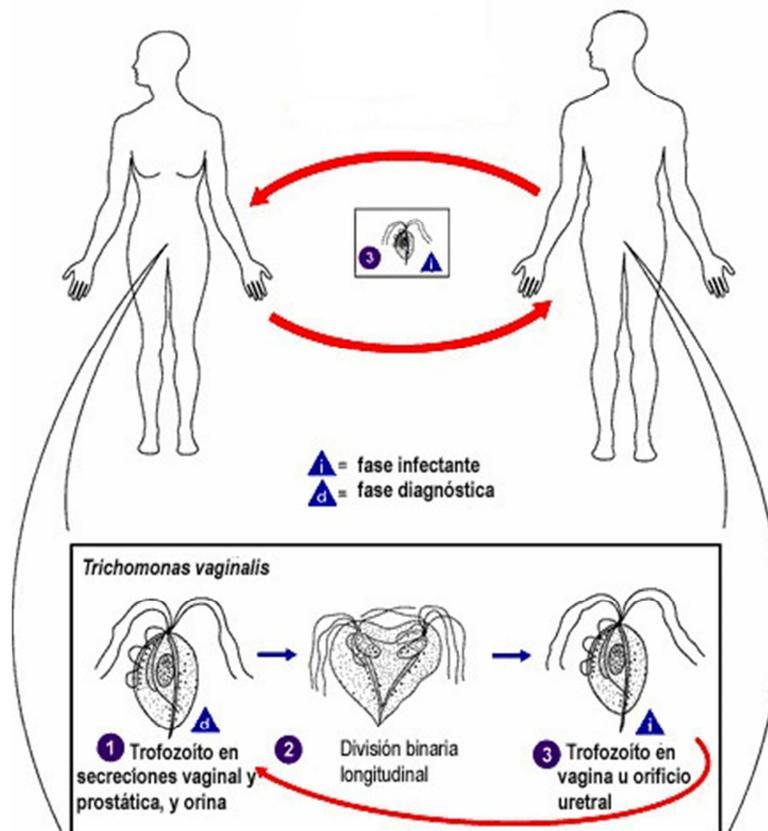


Figura 3. Ciclo biológico de *T. vaginalis*

Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en el sexo femenino, pero también afecta los hombres, ocasionando síntomas leves. Los síntomas se desarrollan de 4 a 30 días

después de la infección y se plantea que la infección es mayor cuando el número de parásitos es elevado y cuanto más alcalino sea el pH vaginal, de esta manera la infección se puede presentar en tres formas: vaginitis asintomática, vulvo vaginitis aguda o crónica y uretritis. En el hombre puede causar uretritis, prostatitis, cistitis, epididimitis, esterilidad y es responsable de una irritación persistente (Cadena, 2006). La tricomoniasis puede actuar como vector para otras enfermedades venéreas, como el virus de inmunodeficiencia humana (McClelland *et al.*, 2007; Nweze and Mouneke, 2011; Kissinger and Adamski, 2013). Por otro lado, si la durante la gestación se está infectada con *T. vaginalis*, puede incrementar la rotura de membranas y bajo peso al nacer (Cancelo *et al.*, 2005).

Los fármacos que han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la tricomoniasis, son los 5-nitroimidazoles, entre estos se incluye al metronidazol, ornidazol y tinidazol. La mayoría de las cepas de *T. vaginalis* son altamente susceptibles al metronidazol, pero se han aislado cepas resistentes (Vázquez *et al.*, 2001). Debido a que es una enfermedad de transmisión sexual, es de vital importancia someterse a tratamiento, para prevenir el contagio a la pareja sexual.

#### **4.4 Metronidazol**

El medicamento que se utiliza comúnmente en el tratamiento de estos tres parásitos es el metronidazol, este es un agente sintético antibacteriano y antiparasitario que pertenece a los nitroimidazoles; se desarrolló a finales de los años 50 con el propósito de combatir infecciones por *Trichomonas vaginalis* (Cosar and Julou, 1959). Poco después su uso se amplió para combatir infecciones provocadas por otros protozoarios como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, también es considerado uno de los medicamentos más eficaces contra infecciones por bacterias anaerobias tanto Gram-negativas como positivas.

El mecanismo de acción del metronidazol es a través de la eliminación del potencial reductor de microorganismos anaerobios y microaerofílicos (Müller, 1983). Esto se da mediante la acción de proteínas transportadoras de electrones llamadas hidrogenosomas, localizadas en el interior del microorganismo susceptible, las cuales reducen el grupo nitro del metronidazol (Samuelson, 1999).

##### **4.4.1 Efectos secundarios**

Es importante señalar que el metronidazol es un medicamento que ocasiona algunos efectos secundarios que son desagradables para los pacientes, tales como: dolor de cabeza, sequedad en la boca, sabor metálico, urticaria, prurito y orina de color oscuro. Se han observado algunos efectos neurotóxicos, presentando mareo, vértigo y raramente, encefalopatía, convulsiones, falta de coordinación y ataxia (Bendesky and Menéndez, 2001). Además, se han reportado efectos teratógenos dada la facilidad que tiene el metronidazol de atravesar la barrera placentaria, es por ello que no se recomienda su uso durante el primer

trimestre del embarazo (Parrado, 2002). El metronidazol es un mutágeno que tiene la capacidad de inducir daño al ADN en linfocitos humanos, por lo que se considera carcinogénico (Björnsson *et al.*, 2002).

Estos efectos tóxicos y mutagénicos son las principales razones por lo que es esencial descubrir y desarrollar agentes antiprotozoarios con alta actividad, baja toxicidad y alta eficacia.

#### **4.4.2 Resistencia al metronidazol**

Se ha reportado varios casos de resistencia al metronidazol y a otros nitroimidazoles de *E. histolytica* (Orozco *et al.*, 2002, 2009 ; Bansal *et al.*, 2006a,b), *G. lamblia* (Upcroft *et al.*, 1990; Upcroft, 1998; Vega *et al.*, 2008) y *T. vaginalis* (Kulda *et al.*, 1982; Kulda, 1999; Snipes *et al.*, 2000; Rasoloson *et al.*, 2002; Dunne *et al.*, 2003), en donde el fracaso al tratamiento ha sido atribuido a varias causas, como la baja absorción de la droga, inactivación de la droga por la flora, el uso indiscriminado de este fármaco desde edades muy tempranas, al empleo de tratamientos previos como las monodosis usadas en tratamientos para la amibiasis, tricomoniasis y giardiasis, que son dosis insuficientes y contribuyen a la resistencia de estos parásitos (Upcroft and Upcroft, 2001; Orozco *et.*, 2009).

#### **4.5 Plantas medicinales**

Durante años, los productos naturales han desempeñado un papel importante en todo el mundo en el tratamiento y la prevención enfermedades, ya que ofrecen una amplia diversidad de componentes, los cuales pueden servir como fármacos, además de revelar nuevos mecanismos de acción para el control de dichas enfermedades (Chin *et al.*, 2006; Ghorbani *et al.*, 2006).

En las últimas décadas, ha aumentado considerablemente el uso de productos naturales como agentes terapéuticos; esto debido al interés de regresar a lo natural ya que es la mejor manera de llevar una vida más saludable.

Se ha retomado el interés en los productos de origen natural debido a que se ha comprobado que los fitomedicamentos representan menor riesgo en la automedicación, además menos efectos colaterales. Por lo tanto, es importante tener un mayor conocimiento químico y farmacológico de productos naturales, para garantizar un mejor control de calidad en el desarrollo, preparación y administración de nuevos fitomedicamentos (Pamplona, 1999). De manera alterna el conocimiento de la medicina tradicional y el uso de las plantas medicinales por culturas indígenas, ayudan a la conservación de las tradiciones culturales.

La Organización Mundial de la Salud estima que el 75% de la población mundial continúa utilizando la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades y alrededor del 50% de

los productos farmacéuticos utilizados hoy en día, provienen de productos naturales. En México, el uso de plantas medicinales ha estado presente desde la época prehispánica como lo muestra el Códice Badiano, donde se puede encontrar una descripción del uso medicinal de más de 150 plantas mexicanas utilizadas en esa época (Nigenda *et al.*, 2001).

#### **4.5.1 Plantas con actividad antiparasitaria**

El conocimiento de la medicina tradicional constituye una valiosa fuente de información para realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos. Es por eso que se ha emprendido la práctica de esta disciplina, que además constituye un medio de recuperación del acervo cultural que está en peligro de desaparecer ante el avance de la "medicina moderna". Las plantas medicinales con acción antiparasitaria han sido empleadas por la población desde tiempos inmemorables para cualquier afección de esta índole.

La infección por parásitos es una de las mayores causas de enfermedad y de incapacidad en diversas partes del mundo, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales. Las enfermedades gastrointestinales más frecuentes ocasionadas por parásitos son la amibiasis y giardiasis, las cuales persisten en áreas mal saneadas y con déficit de higiene (Adam, 2001; Ford, 2005; Pinilla *et al.*, 2008). Por otro lado, la principal enfermedad de transmisión sexual ocasionada por un parásito es la tricomoniasis (Neira *et al.*, 2005; Cadena *et al.*, 2006).

En el tratamiento de estas tres parasitosis es usado el metronidazol y sus derivados imidazoles; sin embargo, estos parásitos han desarrollado un mecanismo de resistencia a esta droga (Upcroft, 1998; Dunne *et al.*, 2003; Bansal *et al.*, 2006); además se ha reportado que es mutagénico, carcinogénico y neurotóxico (Edwards, 1980; Bendesky and Menéndez, 2001).

Así mismo, la ausencia de vacunas para combatir estas enfermedades y el hecho de que el tratamiento farmacológico este empezando a ser ineficiente por la resistencia que muestran los parásitos, demuestra la importancia de la búsqueda de nuevos tratamientos contra estas y otras enfermedades; actualmente existen estudios de plantas y compuestos bioactivos que tienen propiedades antiparasitarias, son eficientes y de baja toxicidad.

#### **4.5.2 Plantas con actividad amebicida**

Estudios fitoquímicos han reportado actividad amebicida de los alcaloides obtenidos de los extractos de hojas de *Cinchona ledgeriana* y *Brucea javanica* (Keene *et al.*, 1986, 1987); de los extractos etanólicos de *Piper schmidtri* se logró aislar los compuestos friedelin, 1-triacontanol, ácido octacosanoico,  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -*O*-glucósido (Joshi *et al.*, 1990); se aislaron alcaloides de *Strychnos usambarensis* (Wright *et al.*, 1991); también los flavonoides (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y kaempferol con un rango de  $CI_{50}$  que va de 1.92 a 7.93  $\mu$ g/ml (Calzada *et al.*, 1999) y la norcoridina (Wright *et al.*, 2000).

Los compuestos geraninos A, B (Calzada *et al.*, 1999), C y D aislados de *Geranium niveum* (Calzada *et al.*, 2001) así como los compuestos flavan-3-ol,(-)-epicatequina, (+)-catequina, tiramina y  $\beta$ -sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido aislados de *Geranium mexicanum* presentaron actividad amebicida (Calzada *et al.*, 2005); también se ha reportado que las plantas que son usadas por pacientes con SIDA en el sur de Tailandia, los extractos clorofórmicos de *Alpinia galanga*, *Barleria lupulina*, *Boesenbergia pandurata*, *Piper betle*, *Piper chava* y el extracto metanólico de *B. pandurata* con concentraciones menores a 100  $\mu$ g/ml mostraron buena actividad amebicida, sin embargo *Murraya paniculata* y *Zingiber zerumbet* fueron activas a concentraciones mayores a 100  $\mu$ g/ml (Sawangjaroen *et al.*, 2006); de las hojas de *Kigelia pinnata* se obtuvieron los compuestos iridioides especiosido, verminosido y minecosido (Bharti *et al.*, 2006). Los extractos metanólicos de *Chiranthodendron pentadactylon*, *Annona cherimola* y *Punica granatum* mostraron actividad contra *E. histolytica* con una  $CI_{50}$  menor a 30  $\mu$ g/ml (Calzada *et al.*, 2006); los compuestos como el timol, carvacrol, borneol y linalol presentes en el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. poseen actividad amebicida (Behnia *et al.*, 2008a), los extractos hexánicos de *Allium sativum* mostraron buena actividad contra *E. histolytica* con 3 mg/ml y los aceites esenciales a 0.3 mg/ml (Behnia *et al.*, 2008b); se ha identificado el flavan-3-ol(-)-epicatequina como compuesto antiamebiano presente en *Rubus coriifolius* y *Geranium mexicanum*, por lo que se probó la epicatequina a concentración de 1.9  $\mu$ g/ml, la cual provocó alteraciones morfológicas (Soto *et al.*, 2010).

Por otro lado, se encontró que los extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* muestra una  $CI_{50}$  menor de 100  $\mu$ g/ml (Garza *et al.*, 2010) y del callo de *Lophocereus schottii* presenta una  $CI_{50}$  de 19.5  $\mu$ g/ml para inhibir el crecimiento de *E. histolytica* (Morales *et al.*, 2010). Estudios *in vitro* mostraron que el jugo de *Citrus* tiene actividad contra trofozoítos de *E. histolytica* usando concentraciones mayores a 0.05 ml (Shrivastava *et al.*, 2011),

#### 4.5.3 Plantas con actividad giardicida

De igual manera, se ha reportado actividad giardicida en plantas usadas en el tratamiento de diarrea e infecciones parasitarias, como lo son *Castela tortuosa*, *Haematoxylon campechianum*, *Mangifera indira*, *Cupressus sempervirens*, *Punica granatum*, *Psidium guajava*, *Plantago major*, *Justicia spicigera* y *Lippia spp*, las cuales demostraron inhibir el 50% del crecimiento de *G. lamblia* (Ponce-Macotela *et al.*, 1994). El extracto de *Allium sativum* mostró actividad giardicida, por lo que se aislaron los compuestos alil alcohol y alil mercaptano, obteniendo  $CI_{50}$  de 7 y 37  $\mu$ g/ml respectivamente (Harris *et al.*, 2000); además se reportó que los compuestos presentes en los extractos etanólicos de *Justicia spicigera* afectaron las membranas de *G. lamblia* (Ponce-Macotela *et al.*, 2001).

Entre las plantas usadas en la medicina tradicional mexicana en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales se encuentran *Altheranthera repens*, *Boerhavia coccinea*, *Flavenia trinerva*, *Leucaena esculenta*, *Tradescantia zebrina*, *Tournefortia densiflora*, *Vitex mollis* y *Waltheria americana*, las cuales demostraron tener actividad giardicida con concentraciones menores o igual a 100  $\mu$ g/ml, sin embargo, la que presentó mejor actividad

fue *T. densiflora* (Tapia *et al.*, 2003). El extracto etanólico de propóleo presenta actividad contra *G. lamblia*, con concentraciones que van de 250-500 µg/ml inhibiendo el 60% de la población (Freitas *et al.*, 2004). Extractos clorofórmicos de los rizomas de *Alpinia galanga*, *Boesenbergia pandurata* y *Zingiber zerumbet*, la fruta de *Piper chaba*, las hojas de *Piper betle*, *Edipta prostrata* y los extractos metanólicos de *B. pandurata* y *E. prostrata* mostraron efecto giardicida a concentraciones menores a 100 µg/ml (Sawangjaroen *et al.*, 2005). Los extractos metanólicos de *Helianthemum glomeratum* y *Rubus coriifolius* presentaron actividad inhibitoria a 0.125 y 0.506 mg/kg (Barbosa *et al.*, 2006) y los obtenidos de *Dorstenia contrajerva*, *Senna villosa* y *Ruta chalepensis* con una CI<sub>50</sub> menor a 38 µg/ml (Calzada *et al.*, 2006); posteriormente se aislaron los flavonoides kaempferol, tilirosido y (-)-epicatequina, de *Geranium mexicanum*, *Cuphea pinetorum*, *H. glomeratum* y *R. coriifolius*, resultando más activa la (-)-epicatequina con 0.072 µmol/kg (Barbosa *et al.*, 2007).

#### 4.5.4 Plantas con actividad tricomonocida

El potencial de los productos naturales en el tratamiento de enfermedades es evidente en la medicina tradicional. Los tratamientos con plantas medicinales se han desarrollado durante miles de años, por lo que se busca plantas de uso tradicional para aislar y caracterizar compuestos químicos que puedan combatir la tricomoniasis (Gehring and Efferth, 2009); ya que se estima que al menos el 5% de los casos clínicos de tricomoniasis son causadas por cepas de *T. vaginalis* con resistencia baja o moderada al metronidazol (Cudmore *et al.*, 2004).

Existen reportes de la actividad tricomonocida del extracto metanólico de *Castela texana* inhibe el 93% del crecimiento a una concentración de 100 µg/ml y el compuesto chaparrina inhibió el 100% a la misma concentración (Calzada *et al.*, 1998); *Platycodon grandiflorum* y *Gleditsia sinensis* mostraron buena actividad contra *T. vaginalis* siendo *G. sinensis* la más efectiva (Park *et al.*, 2004).

Los extractos hidroalcohólico y diclorometano de *Allium hirtifolium* presentaron una CMI de 10 y 5 µg/ml respectivamente (Taran *et al.*, 2006); sin embargo, los extractos acuosos de *Viola odorata* y *Ruta graveolens* hacen un sinergismo que actúa contra *T. vaginalis* a la concentración de 20 mg/ml (Al-heali and Rahemo, 2006). Un estudio de 22 plantas mexicanas, de las cuales se realizaron extracciones metanólicas en donde *Carica papaya* y *Cocos nucifera* mostraron una IC<sub>50</sub> de 5.6 y 5.8 µg/ml respectivamente, *Bocconia frutescens*, *Geranium mexicanum* y *Lygodium venustum* presentaron una IC<sub>50</sub> entre 30.9-60.9 µg/ml (Calzada *et al.*, 2007); también las saponinas diosgenina y yucagenina aisladas de *Agave brittoniana* muestran actividad tricomonocida (Guerra *et al.*, 2008); así como el extracto hidroalcohólico de *Freula assafoetida* eliminó el 90% de la población de este parásito con una concentración de 2 mg/ml (Sarkari *et al.*, 2009).

También se ha encontrado que el extracto de acetato de etilo de *Arbutus unedo* presenta actividad inhibitoria con una CI<sub>50</sub> de 62.5 µg/ml (Ertabaklar *et al.*, 2009); la aglutinina del germen de trigo y el extracto acuosa de *Nigella sativa* muestran esta actividad, siendo más efectiva la aglutinina (Tonkal, 2009) y de los extractos acuosos de *Allium sativum* y *Allium*

*cepa*, encontraron que el más efectivo contra *T. vaginalis* es *A. sativum* (Ahmed, 2010). Estudios más recientes sobre 18 extractos de la familia *Amaryllidaceae* mostraron que *Hippeastrum breviflorum* inhibió el 60% del crecimiento (Vieira *et al.*, 2011); la raíz de *Palygata decumbens* (Piccoli *et al.*, 2012); algunas saponinas aisladas de *Passiflora alata* y *Quillaja saponaria* (Dahmer *et al.*, 2012); el extracto de *Eucalyptus camaldulensis* y la fracción de acetato de etilo del eucalipto (Hassani *et al.*, 2012); además algunos compuestos HP1, HP2, HP3 y floroglucinol aislados de *Hypericum polyanthemum*, reportan ser buenos candidatos tricomonocidas (Cargnin *et al.*, 2013).

#### 4.6 *Syzygium aromaticum*

Sinónimos: *Caryophyllus aromaticus*, *Eugenia caryophyllata*.

*Syzygium aromaticum* conocido comúnmente como clavo, es un árbol perenne de la familia *Myrtaceae*, de hasta 20 metros de altura. Se caracteriza por su tallo recto y de corteza gris, destacan sus hojas puntiagudas, lanceoladas y de color verde intenso (Figura 4), sus flores regulares de cinco pétalos y numerosos estambres; y debajo de la flor se encuentra el fruto que es pequeño y alargado de color rojo oscuro (Figura 5). Florece desde mediados de junio hasta primeros de agosto. De la recolección interesan los botones florales, que se recogen justo antes de la floración.



Figura 4. Árbol de *Syzygium aromaticum*



Figura 5. Fruto de *Syzygium aromaticum*

Originariamente se trata de un árbol procedente de las Islas Molucas en Indonesia. De acuerdo con la FAO, el 70% de la producción mundial de la semilla de clavo tiene lugar en Indonesia, aunque en la actualidad el cultivo también se ha extendido a Madagascar, Zanzíbar, India y Sri Lanka. Sin embargo, se ha cultivado en valles y laderas de todo el litoral mediterráneo, con mayor abundancia en tierras húmedas y ricas en elementos. Al ser una planta bastante utilizada en artes culinarias no es difícil encontrarlo en cualquier parte, ya envasado y preparado para su uso. En México se cultiva en el valle de Chalco estado de México (Ghedira, 2010).

#### 4.6.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Clase: Magnoliosida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Género: *Syzygium*

Especie: *aromaticum*

#### 4.6.2 Composición química

*S. aromaticum* contiene una gran variedad de compuestos y su composición varía dependiendo de su procedencia. Entre sus componentes destaca eugenol (49-98%) como compuesto mayoritario,  $\beta$ -cariofileno (7.2-21%) y eugenil acetato (2.1-6%). Además también se pueden encontrar pequeñas cantidades de  $\alpha$ -humuleno (0.8-1.9%) y trazas (< 1%) de otros 25 a 35 constituyentes (Ho *et al.*, 1994; Srivastava *et al.*, 2005; Alma *et al.*, 2007; Chaieb *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009; Hema *et al.*, 2010; Bhuiyan, 2012).

### 4.6.3 Usos etnobotánicos y estudios farmacológicos de *S. aromaticum*

Los siguientes usos están basados en la tradición o teorías científicas. A menudo no se han probado completamente en humanos y no siempre se han demostrado su seguridad y eficacia.

En la medicina alternativa, *S. aromaticum* se usa contra el dolor de muelas o encías, dolor abdominal, pie de atleta, mal aliento, contra la caries, la irritación, hipertensión, inflamación, cólico, tos, diabetes, diarrea, náuseas o vómito, en el tratamiento de alergias y del asma, también es usado como anestésico, afrodisíaco y el aceite de clavo de olor es relajante muscular (Bhowmik *et al.*, 2012).

Sin embargo, se han validado científicamente algunos de estos usos medicinales y se ha encontrado que el extracto hexánico de *S. aromaticum* elimina el 90% de la población del gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Ho *et al.*, 1994); así como los compuestos aislados kaempferol y myricetina inhiben el crecimiento de las bacterias Gram negativas *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* (Cai and Wu, 1996), *S. aromaticum* inhibe la hipersensibilidad inmediata debido a que bloquea la liberación de histamina de los mastocitos (Kim *et al.*, 1998), además actúa contra los hongos *Alternaria alternata*, *Fusarium chlamydosporum*, *Helminthosporium oryzae* y *Rhizoctonia bataticola* (Zafar and Ahmad, 2002).

Se ha reportado que los fenilpropanoides dihidrodieugenol y aldehído trans-coniferil aislados de *S. aromaticum* presentan actividad antimutagénica, debido a que suprimen la expresión del gen *umu* en *Salmonella typhimurium* (Miyazawa and Hisama, 2003); los compuestos metileugenol e isoeugenol tienen actividad acaricida, combatiendo a *Tyrophagus putrescentiae* (Kim *et al.*, 2003); se estudió el efecto del aceite esencial del clavo frente a un grupo de bacterias y el aceite extraído de la semilla mostró mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus*, mientras que el aceite procedente de las hojas inhibe con mayor intensidad el crecimiento de *Bacillus cereus* (Ogunwande *et al.*, 2005); así mismo da protección contra la aflatoxicosis, causada por *Aspergillus flavus* (Abdel *et al.*, 2005); también funciona como agente quimiopreventivo en cáncer pulmonar, ya que regula la expresión de las proteínas pro-apoptóticas (Banerjee *et al.*, 2006); y se ha reportado el uso de fomentos o tinturas de *S. aromaticum* contra lesiones ocasionadas por *Leishmania braziliensis* (Rojas *et al.*, 2006).

La presencia de aceites esenciales en *S. aromaticum* ha sido motivo de análisis y se ha encontrado que son altamente citotóxicos a concentraciones bajas 0.03% (v/v), esto se atribuye al eugenol, sin embargo no todos los compuestos como el  $\beta$ -cariofileno presentan actividad citotóxica (Prashar *et al.*, 2006).

Es importante señalar que existen reportes sobre aceites esenciales que respaldan su propiedad antioxidante, ya que funcionan como inhibidor de los radicales hidroxilo y actúa como agente quelante del hierro (Jirovetz, 2006; Nassar *et al.*, 2007); también poseen actividad tripanocida, afectando a los núcleos de los epimastigotes con una  $CI_{50}$  de 99.5  $\mu\text{g/ml}$  y 57.5  $\mu\text{g/ml}$  a los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Santoro *et al.*, 2007); y también muestran actividad antifúngica afectando a *Alternaria alternata*, *Aurebasidium pullulans*,

*Cladosporium cladosporioides*, *Mucor mucedo*, *Phomopsis helianthi* y *Phoma macdonaldii* (Dzamic *et al.*, 2009).

Los extractos metanólico y de acetato de etilo de *S. aromaticum* presentan actividad contra el parásito *Plasmodium falciparum*, reportando  $CI_{50}$  de 6.25 y 13  $\mu\text{g/ml}$  (Bagavan *et al.*, 2011). Se encontró que el ácido betulínico aislado de las hojas del clavo tiene potencial anticancerígeno frente a la línea celular MCF-7 con una  $CI_{50}$  de  $33\pm 16 \mu\text{g/ml}$  (Aisha *et al.*, 2011); además se evaluaron extractos y aceites esenciales de esta planta contra células HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, DU-145 y TE-13, siendo los aceites esenciales los de mayor actividad antiproliferativa (Dwivedi *et al.*, 2011).

La actividad antibacteriana del clavo, queda respaldada al reportar que el extracto metanólico es efectivo contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con CMI de 2.31 mg/ml, 0.385 mg/ml y 0.01 mg/ml respectivamente (Pandey and Singh, 2011).

Estudios recientes confirman la actividad antioxidante de *S. aromaticum*, así como la inhibición de la peroxidación de lípidos en páncreas de ratas (Adeniyi and Oboh, 2012); y se ha validado que el té de *S. aromaticum* mejora los parámetros de glucosa, colesterol, triglicéridos y proteínas totales (Mani *et al.*, 2012).

Por todos los antecedentes que existen sobre plantas medicinales, es necesario rescatar el uso de estas mismas y validar científicamente los reportes de la medicina tradicional acerca de la actividad biológica de *S. aromaticum* y evaluar su actividad antiparasitaria.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

#### 5.1.1 Material vegetal

*Syzygium aromaticum* fue adquirido comercialmente en el Mercado de Abastos Estrella ubicado en la Ciudad de San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

#### 5.1.2 Cepas

##### 5.1.2.1 *Entamoeba histolytica*

Cepa HM1:IMSS de *Entamoeba histolytica*, cultivada en condiciones axénicas *in vitro* en el medio de cultivo PEHPS.

##### 5.1.2.2 *Giardia lamblia*

Cepa IMSS:0989 de *Giardia lamblia*, cultivada en condiciones axénicas *in vitro* en el medio de cultivo TYI-S-33.

##### 5.1.2.3 *Trichomonas vaginalis*

Cepa GT15 IMSS:0989 de *Trichomonas vaginalis*, cultivada en condiciones axénicas *in vitro* en el medio de cultivo PEHPS.

## 5.2 Preparación del medio PEHPS.

La composición del medio PEHPS (Saíd-Fernández *et al.*, 1988) se encuentra en la Tabla I. Se mezclaron los componentes, se disolvieron en 750 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1000 ml con agua desionizada. Se colocaron 5 ml del medio en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca (borosilicato, Corning Co., Alemania). El medio se esterilizó por autoclave a 15 min a 121 °C, 15 lb de presión. Almacenamos a temperatura ambiente hasta su uso.

Tabla I. Composición del medio PEHPS

Componentes	Cantidad
Extracto de hígado-páncreas	250 ml
Peptona de caseína	20 g
Ácido ascórbico	1 g
Cisteína	1 g
Glucosa	6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g

### 5.2.1 Preparación del extracto hígado-páncreas

Se utilizaron 4.0 kg de hígado bovino, el cuál fue lavado y recortado; 1.4 kg de páncreas bovino y 1.4 kg de páncreas de cerdo, ambos libres de tejido conectivo y grasa. Se cortó en trozos todo el material biológico y se molieron en un molino eléctrico, repitiendo este paso, para que la mezcla sea homogénea y libre de grandes trozos. Se licuó dicha mezcla con PBS, aproximadamente 1.3 volúmenes de PBS por volumen de tejido. Se ajustó el pH a 8.0 con NaOH 10 N.

La mezcla obtenida se incubó por 4 horas a 37° C, posteriormente se calentó hasta el primer hervor, agitando de forma constante para evitar que la espuma fuera derramada y se

esterilizó a 121° C por 15 min, después de este tiempo, se dejó enfriar y guardó en refrigeración durante toda la noche.

Por la mañana se extrajo el sobrenadante y se esterilizó a 121° C por 15 min, se filtró el homogenizado en un sándwich de tierras de diatomeas, primero se formó una capa con tierra rosa y posteriormente se mezcló el extracto caliente con la tierra blanca para formar la siguiente capa y filtramos usando vacío. El extracto obtenido se guardó a -20° C y se etiquetó hasta su uso.

### 5.3 Preparación del medio basal TYI

La composición del medio TYI (Keister, 1983) se encuentra en la Tabla II. Se mezclaron los componentes, se disolvieron en 850 ml de agua desionizada. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 10 N y se aforó a 1000 ml con agua desionizada. Se colocaron 5 ml del medio en tubos de 13 x 100 mm con tapón de rosca (borosilicato, Corning Co., Alemania). El medio se esterilizó por autoclave a 15 min a 121 °C, 15 lb de presión. Almacenamos a -20 °C hasta su uso.

Tabla II. Composición del TYI

Componentes	Cantidad (g)
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20
Ácido ascórbico	1
Cisteína	1
Cloruro de sodio	3.3
Glucosa	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6
Citrato férrico amónico	0.028

#### **5.4 Preparación del suero bovino**

La sangre se colectó en el rastro de la ciudad y se dejó coagular, el suero fue separado por sedimentación a 3,500 rpm por 15 min. Después el suero se prefiltra con papel Whatman N° 1 y fue filtrado por una serie de filtros HAWP Millipore (Beford, MA, USA) de 5 a 0.22  $\mu$ m.

Finalmente fue esterilizado por filtración utilizando sistemas de filtración al vacío de un litro con filtros de 0.22  $\mu$ m. El suero estéril se descomplementa por calentamiento a 56° C por 30 min, se deja enfriar a temperatura ambiente y se le añade 25 ml de mezcla de vitaminas (JRH Biosciences, Lenexa, KS) por cada litro de suero.

El suero se distribuye en alícuotas de 100 ml, en botellas ámbar, estériles, de vidrio con tapón de rosca y se almacena a -20° C.

#### **5.5 Preparación de la bilis bovina**

Se pesaron 0.3 g de bilis bovina comercial (Sigma Aldrich, USA) y se disolvieron en 10 ml de PBS, posteriormente se esterilizó mediante filtros HAWP Millipore (Beford, MA, USA) de 0.22  $\mu$ m y se almacenó a 4° C.

#### **5.6 Cinéticas de crecimiento**

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo por 120 h, inoculando 200,000 trofozoítos de *E. histolytica* y 10,000 trofozoítos de *T. vaginalis* en 5 mL de medio basal PEHP adicionado con 10 % de suero bovino y 20,000 trofozoítos de *G. lamblia* en 5 ml medio basal TYI-S-33 adicionado con 10 % de suero bovino y 0.5 mg/ml de bilis bovina, en tubos de tapón de rosca de 13 x 100 mm.

Se incubaron a 36.5° C durante 120 h y cada 24 h se determinó el número de trofozoítos y evaluamos sus parámetros de crecimiento en el medio. Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado.

Se determinó el tiempo de generación mediante la siguiente ecuación:

$$G = \frac{t}{3.3} \log \frac{b}{B}$$

G = tiempo de generación.

t = intervalo de tiempo de la fase exponencial,

B = número de organismos al comienzo del intervalo de tiempo,

b = número de organismos al final del intervalo de tiempo.

Para determinar el tiempo de duplicación se utilizó la siguiente ecuación:

$$Td = 0.693 G$$

### **5.7 Mantenimiento de las cepas**

Cada cepa se mantuvo en cultivo en tubos de 13 x 100 mm de tapón de rosca con 5.5 ml de medio (PEHPS o TYI, según el parásito), inoculando 20,000 trofozoítos/ml de *E. histolytica*, 200,000 trofozoítos/ml de *G. lamblia* y 100,000 trofozoítos/ml de *T. vaginalis*. Cada cultivo fue incubado a 36.5° C, *E. histolytica* por 72 h y *G. lamblia* y *T. vaginalis* durante 48 h.

Antes de casa resiembra, cada cultivo se observó en un microscopio invertido, para comprobar el buen estado de las cepas. El cultivo se colocó en agua-hielo durante 20 min para despegar las células adheridas, posteriormente se homogeneizaron, el número de amibas se determinó tomando una alícuota del cultivo contando en un hemacitómetro, para *G. lamblia* y *T. vaginalis* se realizó una dilución con formalina, con esto fijamos las células y luego contarlas en el hemacitómetro.

Cada cepa fue inoculada en su respectivo medio de cultivo, bajo el tiempo calculado de acuerdo a su cinética de crecimiento.

## 5.8 Extracción del material vegetal

Los principios activos de *S. aromaticum* se obtuvieron mediante la extracción por maceración continua con solventes de diferente polaridad. Se procedió a deshidratar secándolo en una estufa a una temperatura de 40° C, posteriormente se trituró hasta pulverizarlo.

Se tomaron 50 g de *S. aromaticum* y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml y se le adicionaron 300 ml de acetona, se selló herméticamente para evitar evaporación del solvente durante la extracción, se dejó en agitación constante por 72 h en un Agitador Dual Action Shaker Lab-line.

Una vez transcurrido el tiempo de extracción, separamos el solvente del resto del material vegetal mediante filtración con papel Whatman N° 1. Posteriormente el mismo material vegetal se extrajo 2 veces más con etanol y metanol.

Los extractos acetónico, etanólico y metanólico se concentraron en un rotavapor tipo Büchi a una temperatura menor a 60° C, se llevaron a sequedad total a temperatura ambiente y se almacenaron en viales color ámbar a 4° C, hasta su uso.

## 5.9 Rendimiento de los extractos

Se obtuvo el rendimiento de los extractos de la siguiente forma:

$$(\%) \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso obtenido}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

dónde: peso obtenido se refiere al peso obtenido en la extracción y el peso inicial es el peso del material vegetal a extraer.

## 5.10 Identificación parcial de grupos funcionales

Los extractos crudos de *S. aromaticum* fueron sometidos a diversas pruebas químicas para identificar grupos funcionales de cada familia (Domínguez, 1973).

#### **5.10.1 Prueba de Liebermann-Burchard**

Para triterpenos y compuestos esteroidales. En una placa de porcelana se añadió 1 gota del extracto, 1 gota de cloroformo y 3 gotas del reactivo de Liebermann-Burchard (20 µl de ácido sulfúrico más 1 ml de ácido acético anhidro y 1 ml de cloroformo), un viraje de color hacia azul, verde, rojo o anaranjado es una prueba positiva para estos compuestos.

#### **5.10.2 Prueba de Salkowski**

Para esteroides y metilesteroides. A 1 gota del extracto, se le añadió 1 ml de cloroformo y 1 ml de ácido sulfúrico, al contacto se observa un viraje de color hacia el amarillo o rojo en la presencia de estos compuestos.

#### **5.10.3 Prueba de Dragendorff**

Para alcaloides. Se preparan dos soluciones, la solución A con 0.85 g de nitrato de bismuto, se mezclaron con 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua y Solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 ml de agua. El reactivo se prepara mezclando 5 ml de A, 4 ml de B y 100 ml de agua. Se disuelven de 1 - 2 mg de la muestra en etanol y se colocan unas gotas en una placa de porcelana, luego se añaden unas gotas del reactivo, la prueba es positiva si se presentan coloraciones rojo o naranja, persistentes por 24 h.

#### **5.10.4 Prueba de Baljet**

Para sesquiterpenlactonas. Se utilizaron 2 soluciones mezcladas en volúmenes iguales antes de usarse, reactivo 1: solución A: se disolvió 1.0 g de ácido pícrico en 100 ml de etanol; y la solución B: 10.0 g de hidróxido de sodio en 100 ml de agua bidestilada. A 3 gotas del extracto, se agregaron 4 gotas del reactivo 1, la coloración naranja a roja oscura representa una prueba positiva.

#### **5.10.5 Prueba de NaOH.**

Para determinar lactonas. Se disolvieron 1-2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10%. La presencia de color naranja que desaparece al agregar HCl indica la presencia de un anillo lactónico.

#### **5.10.6 Prueba de cloruro férrico.**

Para oxhidrilos fenólicos. En un tubo de ensaye se colocan 20 gotas del extracto y 10 gotas del reactivo de cloruro férrico. Prueba positiva, la formación de color rojo, azul, violeta o verde.

#### **5.10.7 Prueba de 2,4-dinitrofenilhidracina**

Para grupo carbonilo. En un tubo de ensaye se disuelven 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 ml de metanol caliente. Se agregan 50 mg del compuesto carbonílico y se calentó a baño María por 10 a 15 min; se deja en reposo y se enfrío en baño de hielo, la aparición de un precipitado naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

#### **5.10.8 Prueba para cumarinas**

Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en una solución de NaOH al 10 %, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular, la prueba es positiva.

#### **5.10.9 Prueba del $\text{KMnO}_4$**

Para dobles enlaces. Se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 ml de agua, acetona o metanol, posteriormente se añadió gota a gota una solución de  $\text{KMnO}_4$  al 2% en agua; la prueba es positiva si se observa formación de un precipitado café, resultado de la formación de bióxido de manganeso.

## 5.11 Fraccionamiento por métodos cromatográficos

El extracto con mayor actividad antiparasitaria fue sometido a fraccionamiento con el propósito de separar e identificar los compuestos que presentan dicha actividad.

### 5.11.1 Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de Sílica gel 60, en donde colocamos cada muestra con un capilar, aplicándola aproximadamente a 1 cm de la parte inferior. La muestra se puede concentrar sobre la placa, repitiendo la aplicación varias gotas sobre el origen, dejando secar entre aplicaciones. Dejamos secar la muestra, colocamos las placas dentro de unas cubas cromatográficas, las cuales contenían los siguientes sistemas cromatográficos: benceno-acetona (9:1, 8:2 y 7:3) para su corrimiento, esto para encontrar el mejor eluyente para la separación de las fracciones de cada extracto.

Se observó la cromatoplaqa a luz visible y luz UV y fue revelada con cloruro de cobalto, usando un aspersor y calculamos el Rf midiendo la distancia del punto de aplicación de la muestra a la mitad de la mancha detectada y se dividió el valor obtenido sobre la distancia del punto de aplicación de la muestra y la distancia recorrida por el eluyente.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

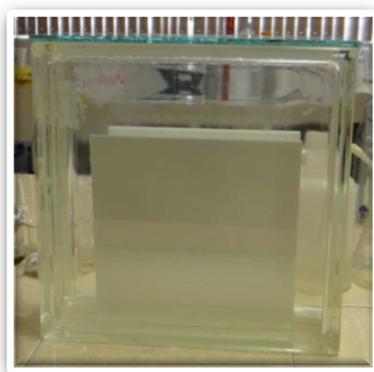


Figura 6. Cromatografía en capa fina

### 5.11.2 Cromatografía en columna con sílica gel

Se utilizó una columna cilíndrica, de vidrio (Pyrex) de 40 cm de largo y 4 cm de diámetro, con llave de paso de teflón en la parte inferior. Montamos la columna en posición vertical, sujetándola con dos pinzas para soporte, colocamos un tapón de fibra de vidrio en el fondo de la columna lo más ajustado posible. Agregamos 20 ml de hexano para cerciorarnos de que el solvente pudiera pasar a través del tapón de fibra de vidrio; así mismo, revisamos que no hubiera fuga del solvente por la llave. Eluimos el solvente para asegurar que el embudo de la llave estuviera libre de impurezas, cerramos la llave antes de que se vacíe todo el solvente.

Agregamos una capa de arena de aproximadamente 1cm de espesor, ayudándonos en el proceso con unos mililitros de hexano para bajar los granos de arena que quedan adheridos a la pared del tubo. Pesamos 25 g de sílica gel de 60-200 mallas (Baker) y se preparó una emulsión con 50 ml de hexano, vertimos la emulsión poco a poco dentro de la columna, se esperó a que se asentara ayudándonos con golpecitos dados estratégicamente a la columna, procurando no formar burbujas de aire. Se adicionó un poco de hexano por la pared de la columna para bajar la sílica que quedó adherida a la pared. Agregamos 1 g de muestra sobre la columna de sílica haciendo uso de una pipeta Pasteur, procurando no dañar la parte superior de la columna y de no crear un punto de aplicación muy grande. Finalmente depositamos una capa de arena de mar de 1 cm de espesor aproximadamente (Figura 7).

La elución utilizada para correr la columna fue de hexano, hexano/cloroformo y cloroformo, en diferentes proporciones y se modificó conforme avanzaba la separación. Agregamos el eluyente a usarse para la separación y colectamos fracciones de aproximadamente 10 ml hasta que fue terminada cada elución.



Figura 7. Columna cromatográfica de sílica gel

### 5.11.3 Cromatografía preparativa

La cromatografía preparativa se llevó a cabo en placas de gel de sílice de 0.5 mm de espesor, con indicador de UV 254 nm (Analtech, Inc.). En dicha placa fueron trazadas tres líneas, una de cada lado y en la parte inferior aplicamos la muestra con la ayuda de un capilar. Introducimos la placa en la cuba, usando como eluyente benceno/hexano en la proporción de 9:1 y esperamos a que se separaran los compuestos presentes. Una vez separada la muestra, se marcó con una espátula el contorno de las manchas y se desprendieron del soporte de vidrio. Separamos el gel de sílice de las muestras obtenidas usando un solvente en el cuál fue soluble el producto, filtramos la sílica gel y una vez eliminado el disolvente, obtuvimos la muestra libre de sílica gel.

### 5.12 Preparación de las diluciones de los extractos y fracciones

Para determinar la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) pesamos 15 mg de cada extracto o fracción y se disolvió en 250 µl de dimetilsulfoxido (DMSO) al 100% en tubo eppendorf, se dejó mínimo 4 h para su esterilización y se almacenó a 4° C. Se tomaron 50 µl de la solución anterior y diluimos con 950 µl de agua estéril para tener una concentración de 150 µg de la muestra y una concentración de 1% de DMSO, tomamos 500 µl de la solución anterior y añadimos 500 µl de la solución testigo para una concentración de 75 µg y así sucesivamente hasta tener las siguientes concentraciones 37.5 µg, 18.75 µg y 9.375 µg. La solución testigo se preparó con 400 µl de DMSO y 7600 µl de agua estéril, la solución fue almacenada a 4° C.

### 5.13 Ensayo biológico

Se colocaron 50 µl de cada solución (extractos y fracciones) en viales cilíndricos de 1 mililitro de capacidad (Bellco Glass Inc., USA). Cada vial fue llenado con 950 µl de una suspensión de *E. histolytica* y *T. vaginalis* a una concentración de  $2 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  trofozoítos/ml respectivamente en medio PEHP más 10 % de suero bovino y para *G. lamblia* se utilizó una concentración de  $2 \times 10^5$  trofozoítos/ml en TYI más 10 % de suero bovino y 0.5 g/L de bilis bovina.

Todos los viales fueron incubados a 36° C. *E. histolytica* se incubó por 72 h, *G. lamblia* y *T. vaginalis* por 24 h. Pasado el tiempo de incubación los viales fueron enfriados en agua hielo por 20 min y el número de trofozoítos por mililitro en cada tubo fue determinado usando un hemacitómetro (Mata *et al.*, 2008). Tomamos como blanco, el medio (PEHPS o TYI-S-33) con el inóculo y el control fue el medio inoculado más el DMSO, ya que este fue usado para disolver los extractos y fracciones.

El porcentaje de inhibición fue calculado con respecto al blanco y la  $CI_{50}$  de cada extracto se obtuvo por análisis Probit (SPSS versión 17). Cada ensayo se realizó por triplicado en tres experimentos independientes, calculando la media y el límite de confianza del 95 %.

## **5.14 Análisis Espectroscópicos**

### **5.14.1 Espectroscopía de Infrarrojo**

En esta técnica se identifican compuestos orgánicos por medio de radiación electromagnética en el rango de Infrarrojo. En esta región la energía es utilizada por las moléculas orgánicas para deformar ya sea los ángulos de enlace o la longitud de sus enlaces (Silverstein *et al.*, 2005). La identificación de los grupos funcionales presentes en los compuestos en la fracción colectiva 1, se realizó mediante espectrofotómetro Perkin Elmer, Paragon 2,000 FTIR.

### **5.14.2 Cromatografía de gases**

Se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de gases 6890N con inyector split/splitless y detector selectivo de masas 5973 (Agilent Technologies, Alemania) con fuente de ionización de impacto electrónico y analizador cuadrupolar. La separación se realizó con una columna HP 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m; Agilent Technologies, Alemania).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificación del material vegetal

*Syzygium aromaticum* fue adquirido comercialmente en el Mercado de Abastos Estrella ubicado en la Ciudad de San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Se identificó en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, asignándosele el número 023493.

### 6.2 Obtención de los extractos de *S. aromaticum*

Se obtuvieron por maceración los extractos acetónico, etanólico y metanólico de *S. aromaticum* y calculamos el porcentaje de rendimiento mostrado en la Tabla III.

Tabla III. Porcentaje de rendimiento de los extractos de *S. aromaticum*.

Extracto	Rendimiento (%)
Acetónico	24.50
Etanólico	3.33
Metanólico	6.21

### 6.3 Identificación de los grupos funcionales

Se realizaron pruebas químicas para la identificación de los grupos funcionales presentes en los extractos de *S. aromaticum*, observando algunas diferencias entre ellos; sin embargo, se encontró la presencia de sesquiterpenlactonas, lactonas, oxhidrilos fenólicos y dobles enlaces en todos los extractos, como se muestra en la Tabla IV.

Tabla IV. Identificación química de grupos funcionales.

Pruebas	Extractos		
	Acetónico	Etanólico	Metanólico
<b>Esteroles y triterpenos</b>	+	+	+
<b>Esteroles y metilesteroles</b>	-	+	+
<b>Alcaloides</b>	-	+	+
<b>Sesquiterpenlactonas</b>	+	+	+
<b>Lactonas</b>	+	+	+
<b>Oxhidrilos fenólicos</b>	+	+	+
<b>Grupo carbonilo</b>	+	-	+
<b>Coumarinas</b>	-	+	+
<b>Doble enlace</b>	+	+	+

#### 6.4 Cinéticas de crecimiento

Se realizaron las cinéticas de crecimiento de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*; para determinar la fase logarítmica, es decir el punto óptimo de crecimiento que indica que hay mayor número de trofozoítos. Observamos que *E. histolytica* presentó un tiempo de generación de 6.29 h y tiempo de duplicación de 4.34 h, por lo que a las 72 h se encuentra en su fase exponencial (Figura 10). Sin embargo, *G. lamblia* y *T. vaginalis* tienen un tiempo de generación más corto 7.00 y 5.82 h respectivamente y los tiempos de duplicación 4.83 y 4.01 h, por lo que su fase exponencial se reduce a 48 h (Figuras 11 y 12).

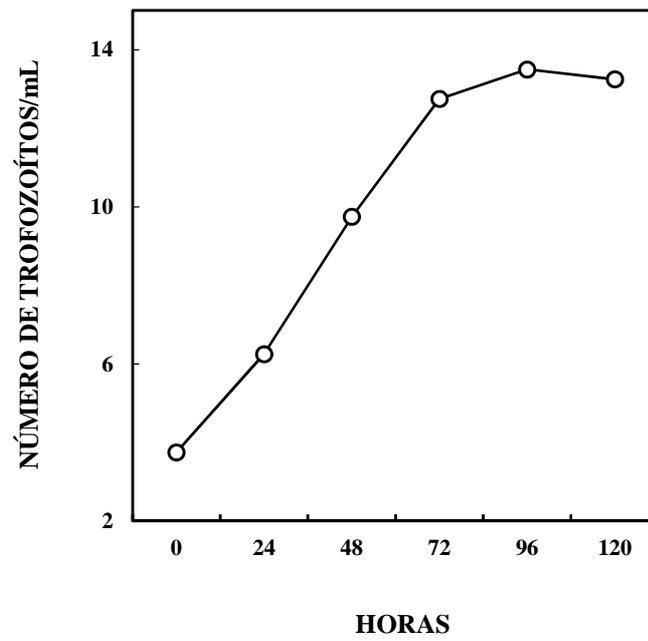


Figura 10. Cinética de crecimiento de *E. histolytica*

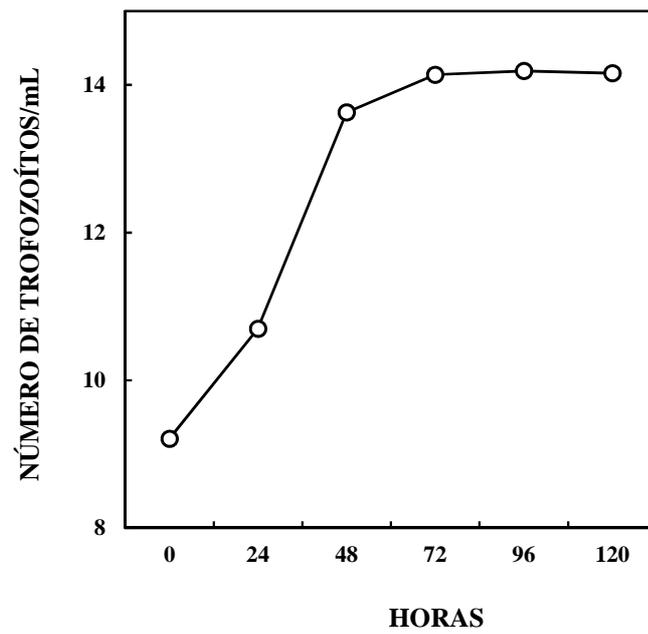


Figura 11. Cinética de crecimiento de *G. lamblia*

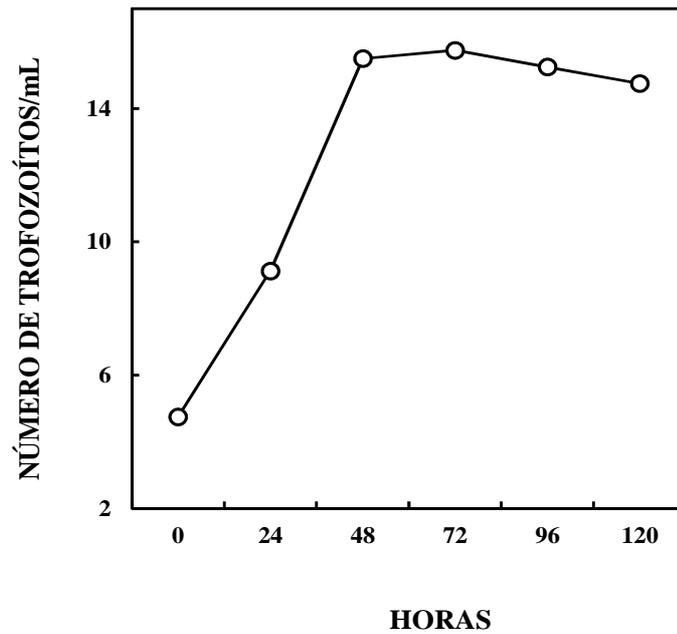


Figura 12. Cinética de crecimiento de *T. vaginalis*

### 6.5 Evaluación de la actividad de los extractos de *S. aromaticum*

Se evaluaron los extractos acetónico, etanólico y metanólico de *S. aromaticum* a una concentración de 150 µg/ml sobre los cultivos de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*. Determinamos que el extracto acetónico presenta mayor actividad inhibitoria contra los tres parásitos (Figuras 13, 14 y 15).

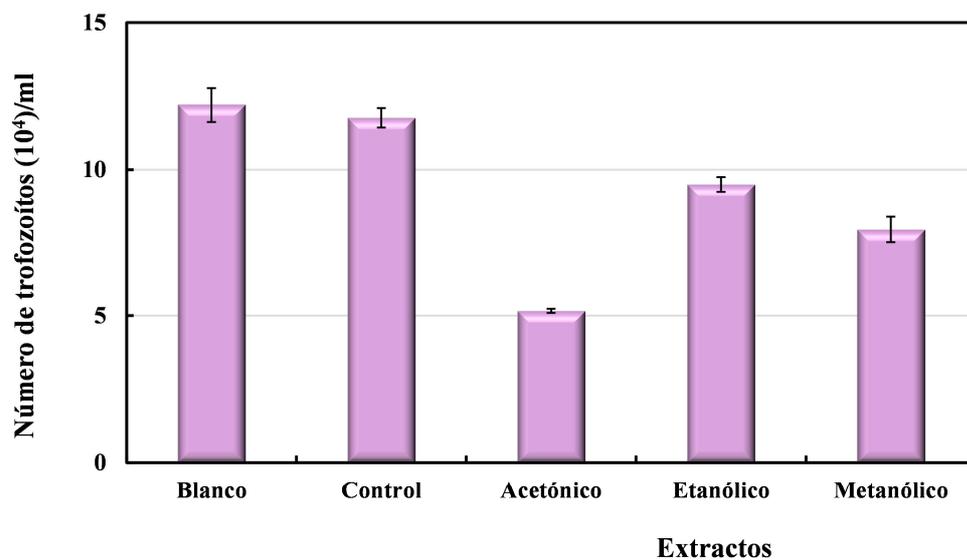


Figura 13. Actividad de los extractos de *S. aromaticum* sobre *E. histolytica*.

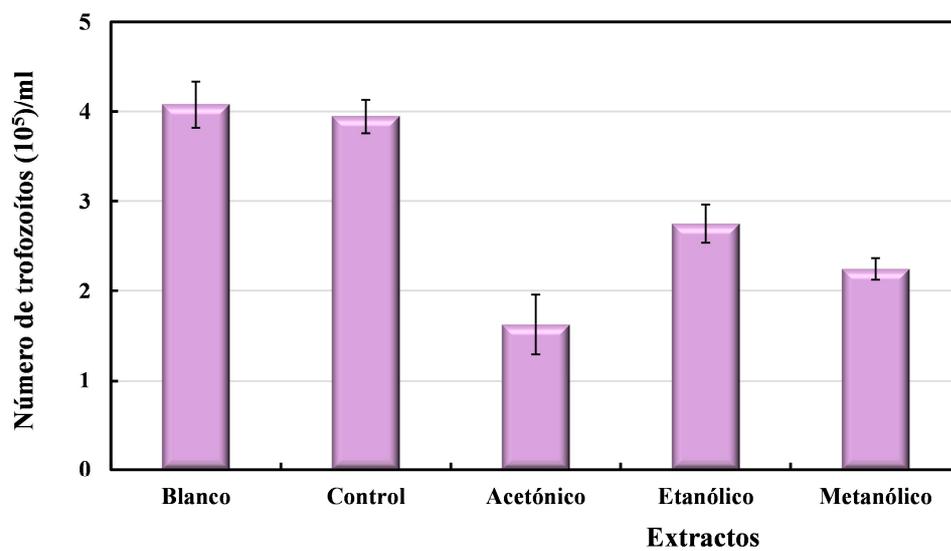


Figura 14. Actividad de los extractos de *S. aromaticum* sobre *G. lamblia*.

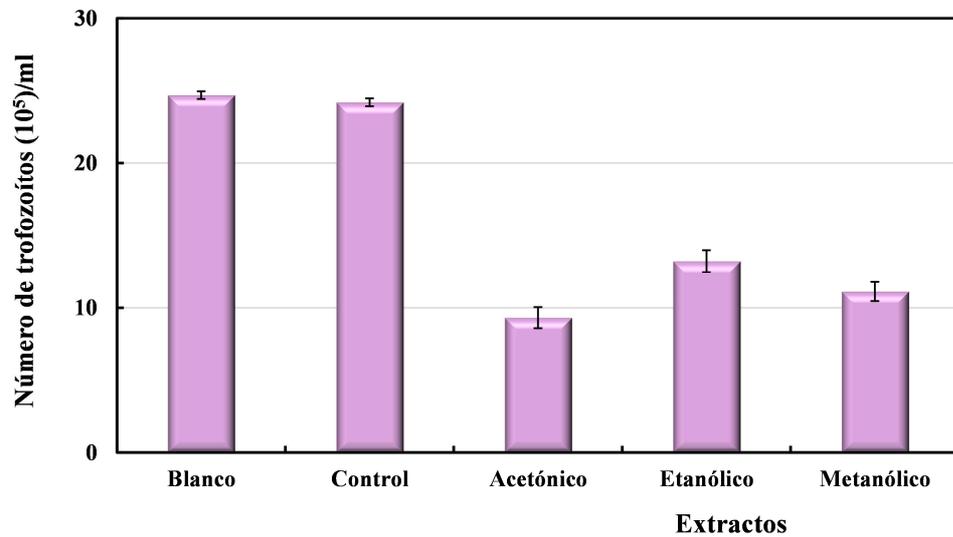


Figura 15. Actividad de los extractos de *S. aromaticum* sobre *T. vaginalis*

### 6.6 Partición del extracto acetónico

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió trabajar con el extracto acetónico ya que mostró mayor actividad biológica, el cual fue particionado con hexano y obtuvimos dos fracciones: soluble e insoluble en hexano. Evaluamos la actividad antiprotozoaria de ambas partes a una concentración de 150 µg/ml y observamos que la fracción soluble en hexano presentó mayor actividad contra *E. histolytica* (Figura 16) y *G. lamblia* (Figura 17) y ambas fracciones mostraron actividad tricomocida (Figura 18).

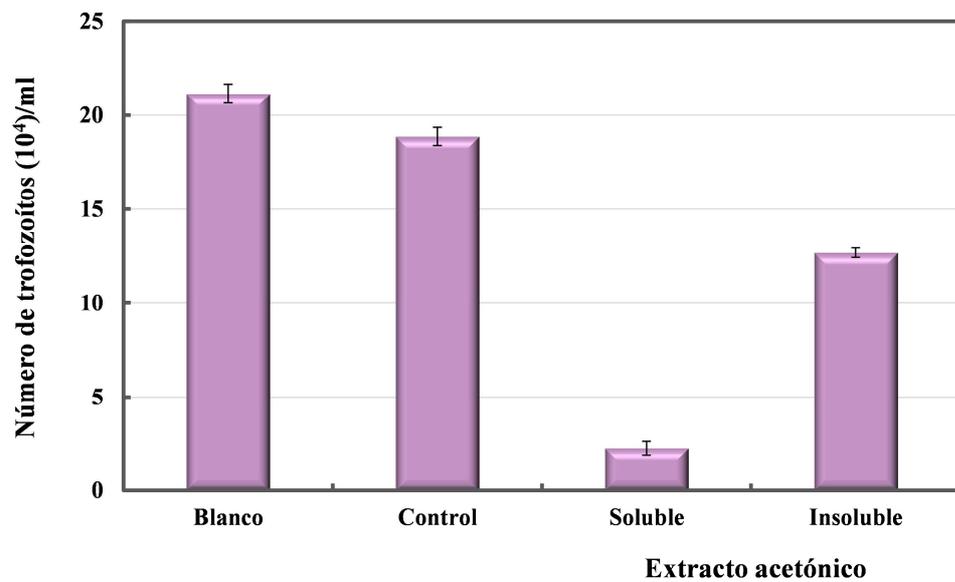


Figura 16. Actividad de las particiones del extracto acetónico sobre *E. histolytica*

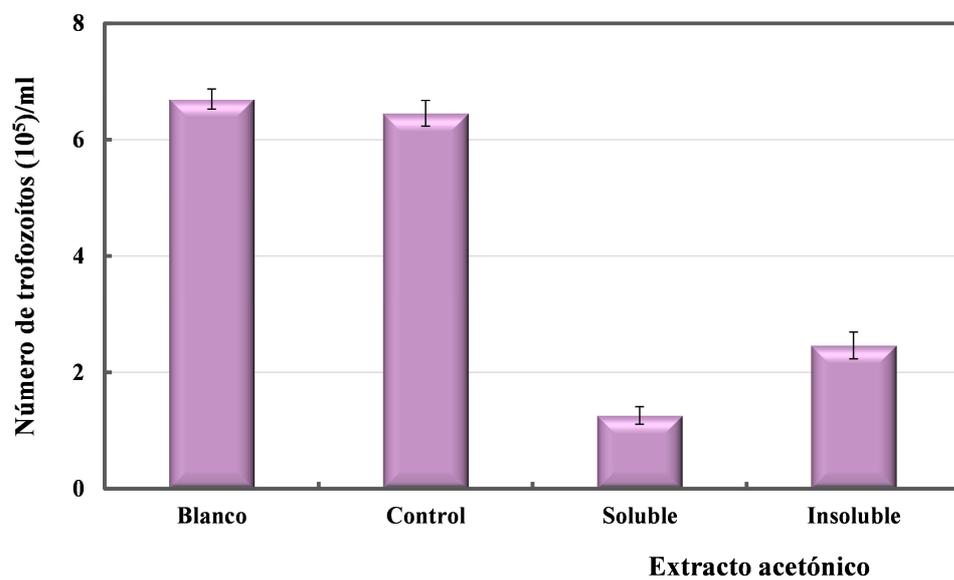


Figura 17. Actividad de las particiones del extracto acetónico sobre *G. lamblia*

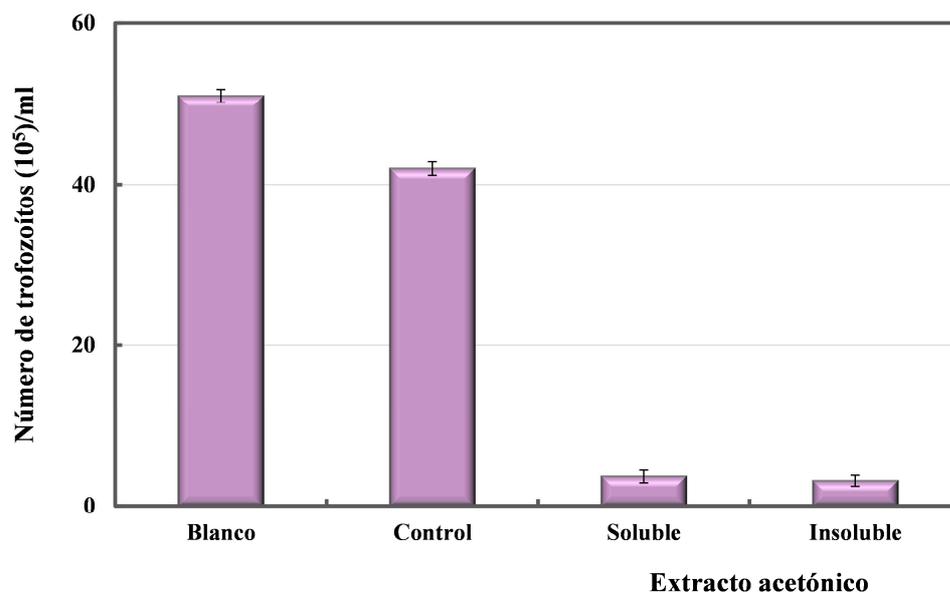


Figura 18. Actividad de las particiones del extracto acetónico sobre *T. vaginalis*

### 6.7 Fraccionamiento de la parte soluble del extracto acetónico

Según los resultados obtenidos, la parte soluble que proviene del extracto acetónico de *S. aromaticum* es la fracción que presenta actividad contra los tres parásitos, por lo que se fraccionó mediante cromatografía en columna obteniendo 150 fracciones, las cuales fueron agrupadas en 9 fracciones colectivas (Figura 19). Se evaluó cada fracción a la concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$  contra los tres parásitos, observando que la mayor actividad la presenta la fracción colectiva 1 (Figuras 20, 21 y 22).

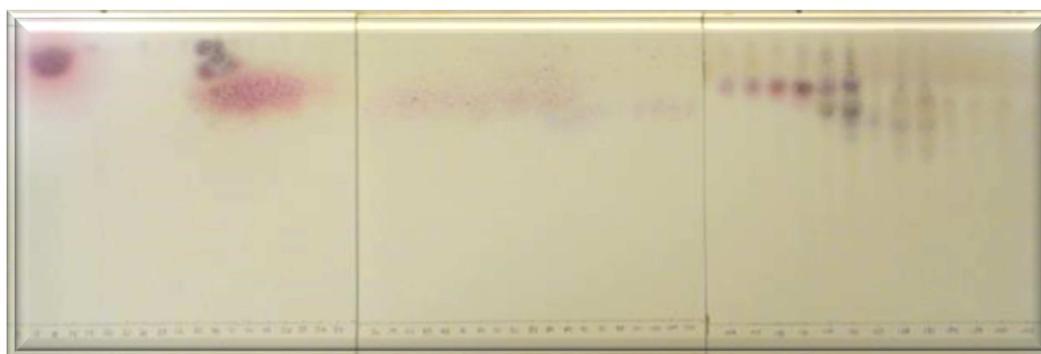


Figura 19. Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de extracto acetónico de *S. aromaticum*.

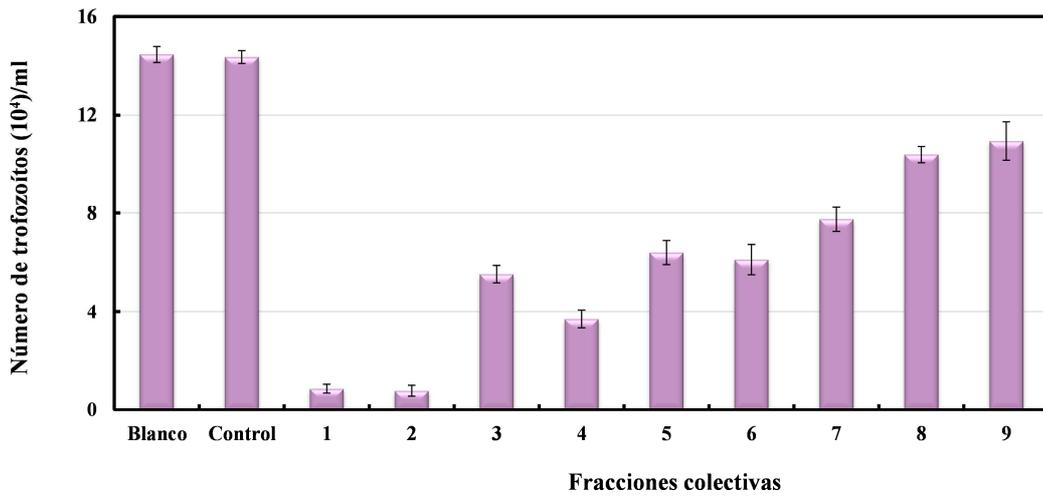


Figura 20. Actividad de las fracciones colectivas del extracto acetónico de *S. aromaticum* sobre *E. histolytica*.

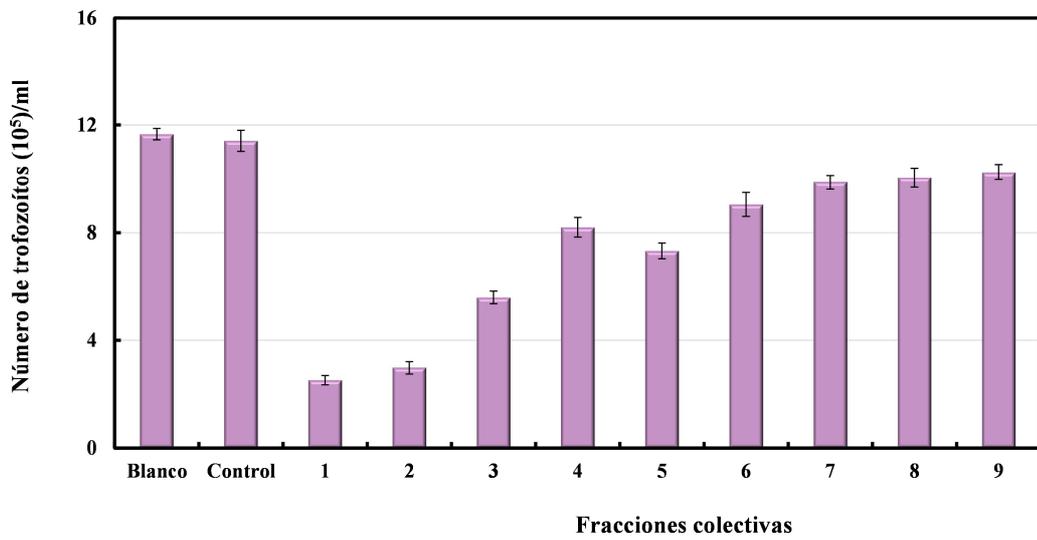


Figura 21. Actividad de las fracciones colectivas del extracto acetónico de *S. aromaticum* sobre *G. lamblia*.

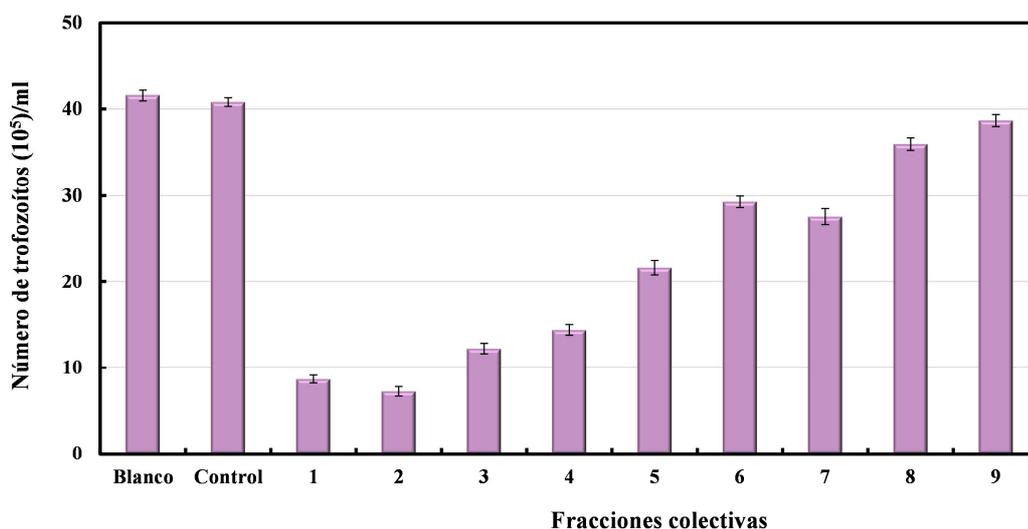


Figura 22. Actividad de las fracciones colectivas del extracto acetónico de *S. aromaticum* sobre *T. vaginalis*

### 6.8 Espectro Infrarrojo de la fracción colectiva

El espectro IR de la fracción colectiva 1 (Figura 23), presenta señales características del grupo hidroxilo (-OH) el cual se muestra con una banda ancha y de baja intensidad en  $3415.82\text{ cm}^{-1}$ , de grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) mostrando una señal en  $2956.24\text{ cm}^{-1}$  y confirmada por la señal a  $1456.03\text{ cm}^{-1}$ , de grupo metileno (-CH<sub>2</sub>) con la señal a  $2925.73\text{ cm}^{-1}$  siendo confirmada con las señales a  $1381.04$  y  $1357.49\text{ cm}^{-1}$ , del grupo carbonilo (C=O) con una banda de baja intensidad a  $1717.05\text{ cm}^{-1}$ , la señal a  $1632.07\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la tensión de C=C, el estiramiento de -CO se muestra con la señal a  $1035.49\text{ cm}^{-1}$  y la señal a  $887.08\text{ cm}^{-1}$  es la flexión de -CH.

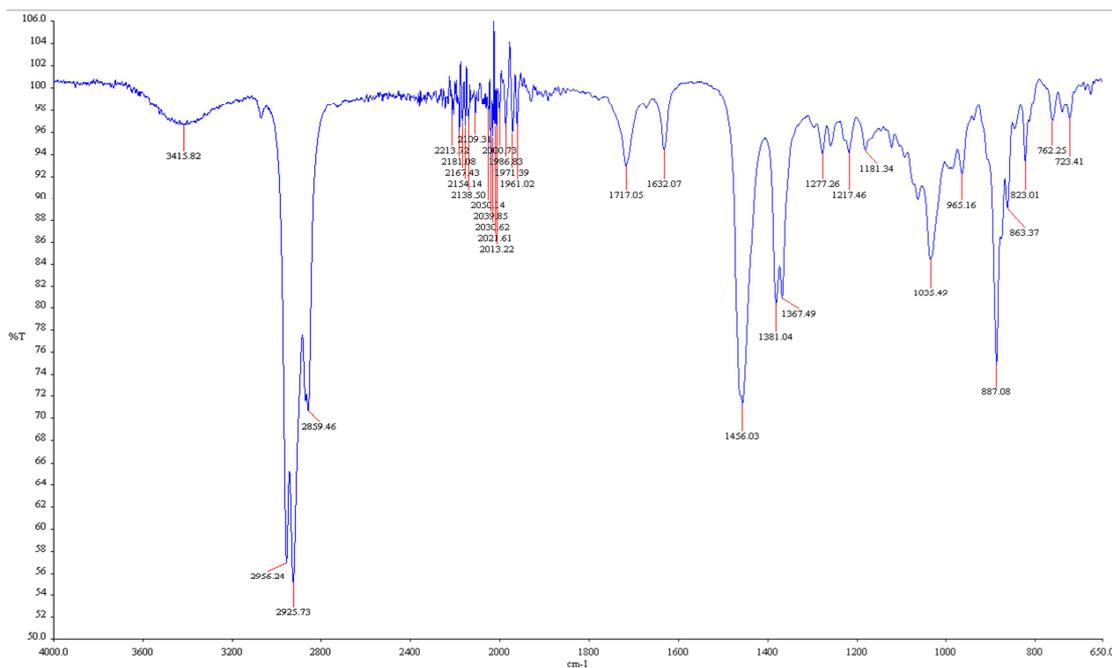


Figura 23. Espectro IR de la fracción colectiva 1 del extracto acetónico de *S. aromaticum*

## 6.9 Separación de la fracción colectiva

Se observó que la mayor actividad la presentó la fracción colectiva 1, proveniente del extracto acetónico de *S. aromaticum*, por lo tanto se decidió fraccionarla mediante cromatografía preparativa y obtuvimos 4 fracciones (Figura 24), a las cuales denominamos fracciones secundarias.



Figura 24. Cromatografía preparativa de la fracción colectiva 1 del extracto acetónico de *S. aromaticum*

Cada fracción secundaria fue evaluada a una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ , contra los tres parásitos y se encontró que la fracción colectiva 2 muestra mayor actividad antiparasitaria (Figuras 25, 26 y 27).

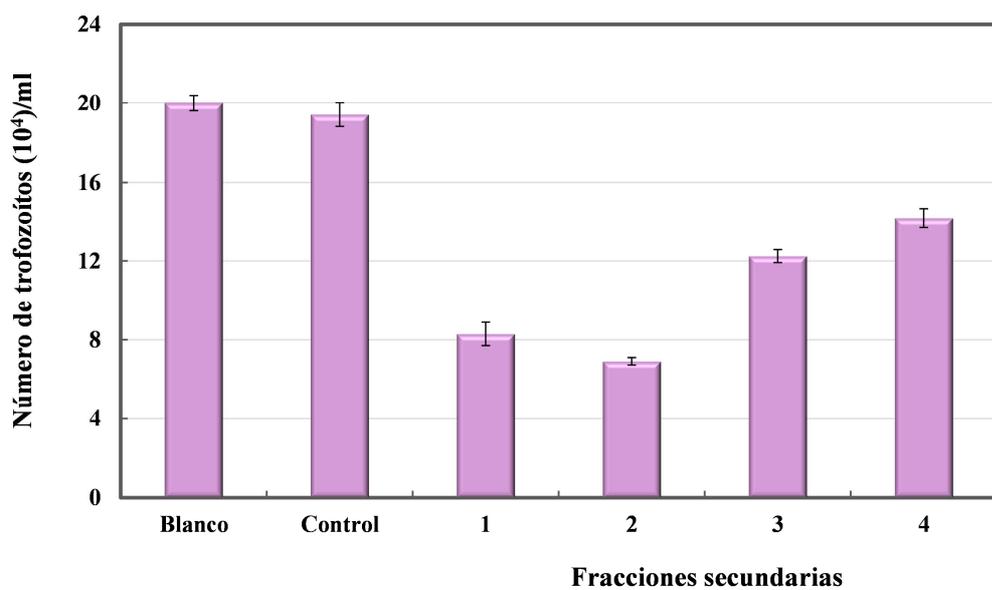


Figura 25. Actividad de las fracciones secundarias del extracto acetónico de *S. aromaticum* sobre *E. histolytica*

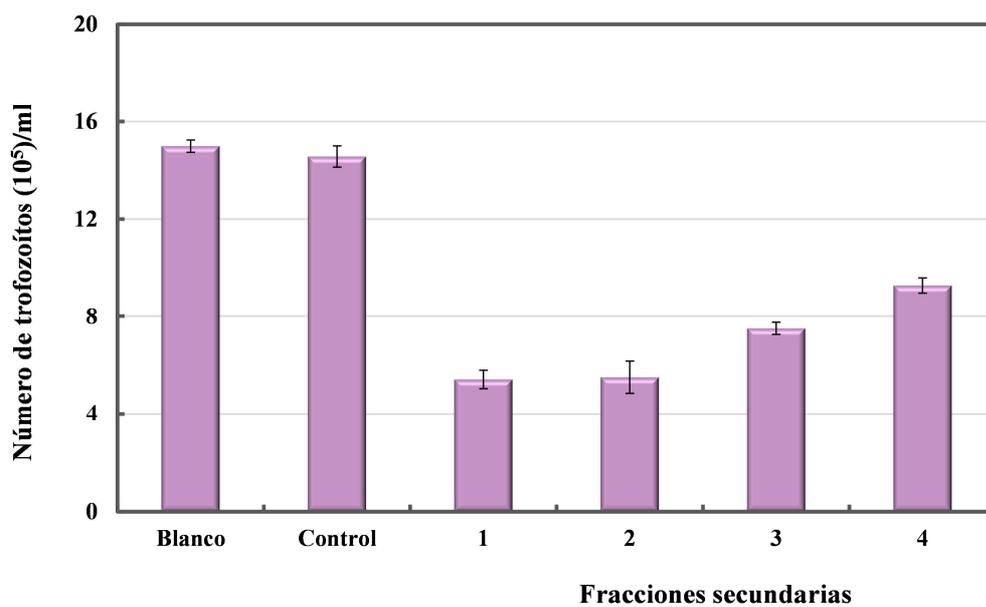


Figura 26. Actividad de las fracciones secundarias del extracto acetónico de *S. aromaticum* sobre *G. lamblia*

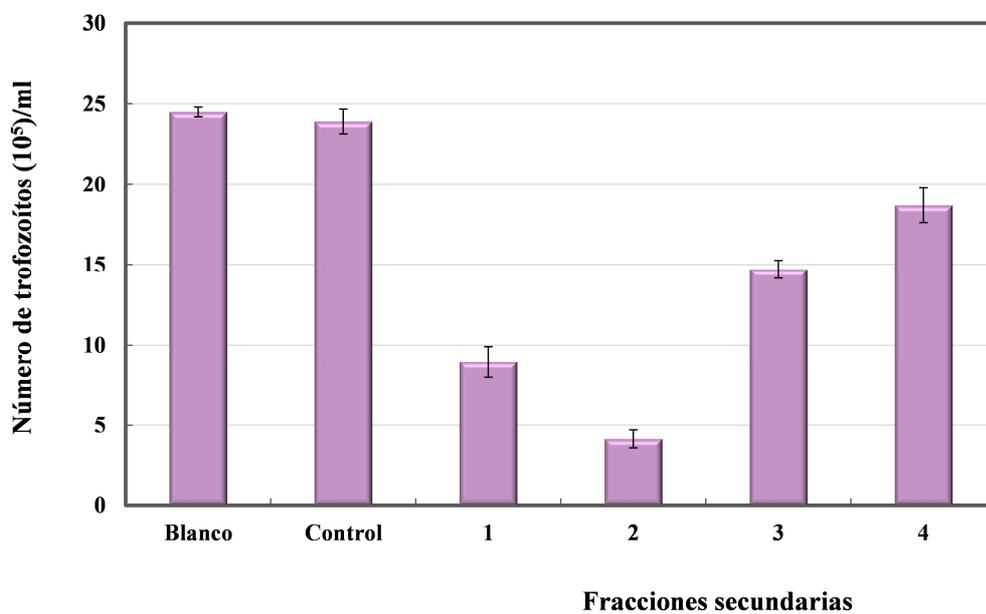


Figura 27. Actividad de las fracciones secundarias del extracto acetónico de *S. aromaticum* sobre *T. vaginalis*

### 6.10 Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) de los extractos y fracciones con mayor actividad antiparasitaria

Se determinó la CI<sub>50</sub> del extracto acetónico de *S. aromaticum*, partición 1, fracción colectiva 1 y la fracción secundaria 2, ya que estos mostraron mayor actividad contra los tres parásitos y los resultados se muestran en la Tabla V.

Tabla V. CI<sub>50</sub> del extracto y fracción con mayor actividad sobre los tres parásitos.

Parte evaluada	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>
Ex. acetónico	148.15 µg/ml	153.56 µg/ml	153.70 µg/ml
FS2	32.67 µg/ml	85.20 µg/ml	51.92 µg/ml
Metronidazol	0.13 µg/ml	0.22 µg/ml	0.06 µg/ml

### 6.10 Análisis espectroscópico de la fracción secundaria 2

El perfil cromatográfico de la fracción secundaria 2 proveniente del extracto acetónico de *S. aromaticum*, muestra la presencia de los compuestos: 4,4,8-trimetiltriciclo[6.3.1.0(1,5)]dodecano-2,9-diol, ácido hexadecanoico y óxido de cariofileno (Figura 28).

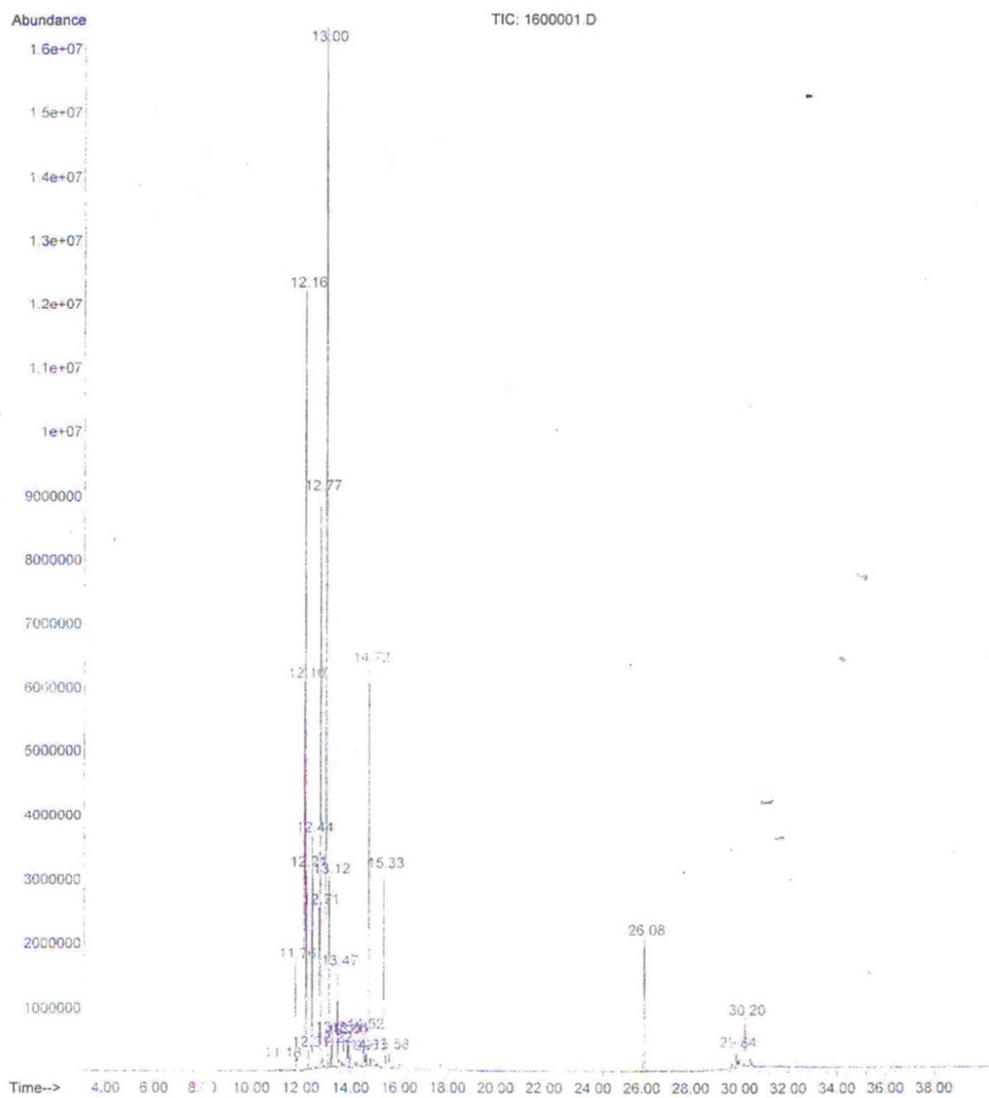
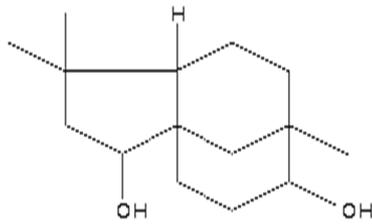
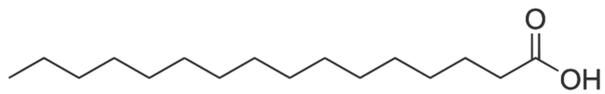


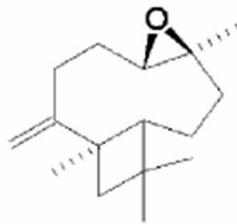
Figura 28. Cromatograma de la fracción secundaria 2 del extracto acetónico de *S. aromaticum*.



4,4,8-trimetil triciclo[6.3.1.0(1,5)]dodecano-2,9-diol



Ácido hexadecanoico



Óxido de cariofileno

Figura 29. Estructuras de los compuestos presentes en la fracción secundaria 2 obtenida del extracto acetónico de *S. aromaticum*.

## 7. DISCUSIÓN

Las enfermedades parasitarias representan un importante problema de salud, debido a los altos índices de morbo-mortalidad mundial, ya que provocan devastadores efectos indirectos sobre la población afectada. Las parasitosis más comunes son amibiasis y giardiasis, las cuales afectan al aparato digestivo, además de la tricomoniasis que es segunda enfermedad de transmisión sexual más frecuente en México (Epidemiología SS, 2004).

El fármaco de primera línea para tratar estas enfermedades es el metronidazol; sin embargo, se ha reportado que presenta un alto índice de toxicidad en el individuo y conlleva a malas interacciones con esteroides y antipiréticos (Gujral *et al.*, 1982) y se han observado casos de resistencia de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y el *Trichomonas vaginalis* frente a este medicamento (Upcroft, 1990; Orozco 2002; Dunne, 2003). Se ha encontrado que algunos parásitos segregan una proteína que puede funcionar como un mecanismo de defensa del parásito a la acción de algunos medicamentos. En *E. histolytica* se han descrito varios genes de multiresistencia a drogas que codifican para glicoproteínas presentes en la membrana del parásito y que son los encargados de bombear la droga del citoplasma al exterior (Gómez *et al.*, 1999).

Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos tratamientos altamente eficaces y de baja toxicidad, debido a este problema la OMS considera a la fitoterapia dentro de sus programas de salud y sugiere la aplicación procedimientos básicos para la validación de fármacos a partir de plantas (OMS, 1991).

Actualmente en América Latina, la medicina tradicional representa una opción importante de respuesta ante las necesidades en el área de salud (Nigenda *et al.*, 2001). Sin embargo, el conocimiento de las propiedades farmacéuticas y uso de las plantas en el tratamiento de diversas enfermedades está registrado desde antes de la llegada de los españoles.

Existen evidencias del uso de plantas medicinales que tienen propiedades antiparasitarias y no representan riesgos tóxicos para el usuario. De la misma manera, se han aislado

compuestos bioactivos de éstas plantas con las mismas características de seguridad y eficiencia. En este proyecto se eligió trabajar con el botón seco denominado clavo de la planta *Syzygium aromaticum* debido a los antecedentes científicos que respaldan su actividad contra otros parásitos, además de contribuir a los estudios etnobotánicos de esta planta.

Los extractos acetónico, etanólico y metanólico de *S. aromaticum* fueron obtenidos mediante agitación constante a temperatura ambiente, de esta manera nos aseguramos extraer los compuestos sin alterarlos o descomponerlos por efectos de la temperatura. Existen reportes de otras técnicas para extraer aceites esenciales y compuestos que se encuentran presentes en *S. aromaticum* como hidrodestilación y arrastre de vapor, sin embargo presentan algunas desventajas ya que al realizarse en presencia de agua y a altas temperaturas, puede provocar reacciones que favorecen la formación de otros compuestos (Guenther, 1942). El mayor rendimiento obtenido fue 24.50% del extracto acetónico, 3.33% del extracto etanólico y 6.21% del extracto metanólico.

Se realizaron algunas pruebas químicas para la identificación de grupos funcionales que estaban presentes en cada uno de los extractos de *S. aromaticum*, encontrando pocas diferencias entre cada uno de ellos, esto se debe a la similitud de polaridades de los solventes utilizados en la extracción. Sin embargo, observamos en los extractos etanólico y metanólico la presencia de esteroides, alcaloides, lactonas, oxhidrilos fenólicos y cumarinas, mientras que en el extracto acetónico notamos la presencia de esteroides, lactonas, oxhidrilos fenólicos y la ausencia de alcaloides y cumarinas. Estudios previos han reportado la composición química de *S. aromaticum*, la cual consta principalmente de aceites esenciales y en menor cantidad sesquiterpenos, flavonoides, esteroides, triterpenos, alcaloides (Sristava *et al.*, 2005, Bhuiyan *et al.*, 2012). Sin embargo se debe tomar en cuenta que la composición química de la planta puede diferir de acuerdo a las partes usadas de la planta, así como la temporada de cosecha y zona geográfica.

Las cinéticas de crecimiento de cada parásito se realizaron para conocer las condiciones del inóculo, así como el tiempo necesario para obtener trofozoítos en fase logarítmica, de esta manera se determinó un tiempo de duplicación de 14.34 h para *E. histolytica*, 4.83 h para *G. lamblia* y 4.01 h para *T. vaginalis*, un tiempo de generación de 6.29 h, 7 h y 5.82 h para *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* respectivamente. Por otro lado, se definió tanto el inóculo como las horas de incubación necesarias para obtener cada cultivo en la fase exponencial y por lo tanto, en las mejores condiciones fisiológicas para desarrollar las pruebas biológicas. Los resultados obtenidos de tiempo de generación y duplicación, son similares a

los que ya se han reportado de cada parásito (Keister, 1983; Saíd *et al.* 1988; Castro *et.*, 1996).

Una vez conocido el inóculo y el tiempo de incubación que requiere cada parásito para su óptimo crecimiento, se evaluó la actividad de los extractos acetónico, etanólico y metanólico del clavo contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*; en donde observamos diferencias entre los extractos y la actividad antiparasitaria mostrada frente a cada protozooario. Es importante señalar que todos los extractos obtenidos de *S. aromaticum* presentaron actividad contra los tres parásitos, sin embargo el extracto acetónico fue el más eficaz y con  $CI_{50}$  de 148.15  $\mu\text{g/ml}$  para *E. histolytica*, 153.56  $\mu\text{g/ml}$  para *G. lamblia* y 153.70  $\mu\text{g/ml}$  para *T. vaginalis*.

Los resultados obtenidos en este trabajo, se correlacionan con estudios anteriores realizados con otras especies pertenecientes a la familia *Myrtaceae*, las cuales han mostrado actividad contra estos tres parásitos, como el aceite de *Melaleuca alternifolia* que presento efecto tricomonocida (Pena, 1962), el extracto de *Psidium guajava* que actúa contra *E. histolytica* con una  $CI_{50}$  de 62.5  $\mu\text{g/ml}$  (Tona *et al.*, 1998).

El extracto metanólico del tallo de *Eucalyptus camaldulensis* inhibe el 98.3% de *E. histolytica* con 250  $\text{mg/ml}$  (Barrón *et al.*, 2009), el extracto acuoso de esta planta con una concentración de 2000  $\text{mg/ml}$  elimina el 100% del cultivo de *G. lamblia* (Al-kaissi, 2010) y *Myrtus communis* con  $CI_{50}$  de 60  $\mu\text{g/ml}$  contra *G. lamblia* y una  $CI_{50}$  mayor a 300  $\mu\text{g/ml}$  para inhibir el crecimiento de *E. histolytica* (Bader and Mosleh, 2008). De esta manera observamos que las  $CI_{50}$  que obtuvimos del extracto acetónico de *S. aromaticum*, se encuentran dentro de un rango aceptable a lo que ya se ha reportado con respecto a otras plantas pertenecientes a la familia *Myrtaceae*.

Además se ha reportado que los extractos acuosos de las hojas de *M. communis* y *E. camaldulensis* (Mahdi *et al.*, 2006), el extracto metanólico (Abdollahy *et al.*, 2004), el extracto etanólico de esta última planta presentan actividad contra *T. vaginalis* (Youse *et al.*, 2012). Existe el reporte que con 12.5  $\text{mg/ml}$  del extracto de acetato de etilo obtenido de *E. camaldulensis* se logró inhibir el 100% del crecimiento de los trofozoítos de *T. vaginalis* (Hassani *et al.*, 2012).

Se decidió fraccionar el extracto acetónico debido a que presento mayor actividad antiparasitaria y menor  $CI_{50}$  con respecto a los otros extractos, por lo que realizamos lavados con hexano y encontramos que la actividad se mantenía en la parte soluble. Posteriormente se

realizó un fraccionamiento usando cromatografía en columna y se monitoreo mediante cromatografía en capa fina, de esta manera agrupamos las fracciones obtenidas las cuales denominamos fracciones colectivas. Cada fracción colectiva se probó contra los tres parásitos y la fracción colectiva 1 mostró mayor actividad sobre *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*, en comparación con las demás fracciones.

Dicha fracción colectiva se sometió a un análisis de espectrometría infrarroja para conocer los grupos funcionales presentes en la fracción, las señales obtenidas corresponden al grupo hidroxilo (-OH) a  $3415.82\text{ cm}^{-1}$ , grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a  $2956.24\text{ cm}^{-1}$  y confirmada por la señal a  $1456.03\text{ cm}^{-1}$ , grupo metileno (-CH<sub>2</sub>) a  $2925.73\text{ cm}^{-1}$  confirmándose con las señales a  $1381.04$  y  $1357.49\text{ cm}^{-1}$ , la señal a  $1632.07\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la tensión de C=C, el estiramiento de -CO se muestra con la señal a  $1035.49\text{ cm}^{-1}$  y la señal a  $887.08\text{ cm}^{-1}$  es la flexión de -CH.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de actividad biológica, se procedió a fraccionar la fracción colectiva 1 mediante cromatografía preparativa, en donde se obtuvieron 4 fracciones a las que denominamos secundarias, cada fracción se probó contra los tres parásitos y observamos que la fracción secundaria 2 presentó mayor actividad contra *E. histolytica* y *T. vaginalis* con una CI<sub>50</sub> de 32.67 y 51.92 µg/ml respectivamente, sin embargo para *G. lamblia* se obtuvo una CI<sub>50</sub> de 85.20 µg/ml.

Una vez que se detectó la fracción activa, se realizó un análisis espectroscópico de la fracción secundaria 2. El análisis fue hecho en un cromatógrafo de gases, obteniendo la identificación de los compuestos presentes en la fracción secundaria 2 y observamos que los compuestos de mejor calidad son: **4,4,8-trimetil triciclo[6.3.1.0(1,5)]dodecano-2,9-diol, el ácido hexadecanoico y óxido de cariofileno.**

Estudios previos sobre *S. aromaticum* indican que está constituido químicamente por los aceites esenciales: limoneno, eucaliptol, 2-heptanol acetato, metil salicilato, cavicol, benzil acetato, cariofileno, capaeno, aloaromadendreno, germacreno D, α-guaieno, 3-(1-metiletil) ácido benzoico, δ-cadineno, 1-etil-3-nitrobenceno, **óxido de cariofileno**, elixeno, (E)(Z)megastigma-4,6,8-trieno, α-farneseno, 1,2,2,4,4a,7-hexahidro-1,6-dimetil-4(1-metiletil)naftaleno, 1,2-dimetil-3,5-bis(1-metiletenil)ciclohexano, 9β-acetoxi-3,5,8α-trimetiltriciclo[6.3.1.0(1,5)]dodec-3-eno, 4-metileno-1-metil-2-(2-metil-1-propen-1-il)-1-vinilcicloheptano, α-amorfeno, 12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-dieno,1,5,5,8-tetrametil, (+)-cicloisositivon, tetraciclo[6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol,4,4-dimetil, 2',3',4

trimetoxiacetofenona, benzil benzoato, escualeno (Bhuiyan *et al.*, 2010; Bhuiyan, 2012). También se han reportado 2-heptanol, *cis*- $\beta$ -ocimeno, 2-nonanona, gualteriaol, 2-acetoxidodecano, 2-undecanona, acetuegenol,  $\alpha$ -cubebeno, 2-etnil-1,1-dimetil-3-metilciclohexano los cuales fueron extraídos por hidrodestilación (Roudha *et al.*, 2012).

Otro estudio de *S. aromaticum* reporta la presencia de 1,1-dietoxipentano, ácido hexanoico etil ester, 1,1,3-trietoxipropano, ácido ciclohexanocarboxílico 2-hidroxi etil ester, 6-acetil- $\alpha$ -D-manosa, 4-(2-propenil)-fenol, *p*-alil-anisol, (S)-ácido butanedioico hidroxil, 2-metoxi-3-(2-propenil)-eugenol fenol, copaeno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-(1S-cis)-naftaleno, 2',3'4' trimetoxiacetofenona, 2,5-ácido octadecadinoico metil ester, (E)(E)2,6,10-dodecatrieno-1-ol,3,7,11-trimetil-acetato, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-4a,8-dimetil-2-(2-propenil)-1-naftalenol, 1,2-ácido bencenodicarboxílico butil octil ester, **4,4,8-trimetiltriciclo[6.3.1.0(1,5)]dodecano-2,9-diol**, *n*-ácido hexadecanoico, (Z,Z)-9,12-ácido octadecadienoico, ácido octadecanoico, isoetil alocolate, ácido tetradecanoico hexadecil ester, pregn-5-en-20-ono, 3-(acetiloxi)-16,17-epoxi-6-metil(3 $\alpha$ ,16 $\alpha$ ), ácido 1,2-bencenodicarboxílico diisooctil ester, ácido hexadecanoico octadecil ester, (Z)-9-ácido octadecenoico, ácido hexadecanoico hexadecil ester dentro del extracto etanólico (Hema *et al.*, 2010).

Por lo tanto, observamos que los compuestos que están presentes en la fracción secundaria 2, ya se encuentran reportados en otros estudios. Es importante señalar que los compuestos presentes en dicha fracción que mostró mayor actividad antiparasitaria fueron obtenidos a partir del extracto acetónico, como el triciclosesquiterpeno 4,4,8-trimetiltriciclo[6.3.1.0(1,5)]dodecano-2,9-diol del cual existe el antecedente de que se obtuvo de un extracto etanólico de *S. aromaticum* (Hema *et al.*, 2010), de igual manera se ha encontrado en otras plantas como *Rhytidium rugosum* (Ling-he and Jin-zhong, 2008), *Artemisia annua* L. (Brown, 2010). Por otro lado, además de este compuesto se han aislado el ácido hexadecanoico y óxido de cariofileno de *Cassia uniflora* y *Synedrella sp.* a los cuales se les atribuye propiedades aleloquímicas (Ghayal and Dhumal, 2011).

Cabe resaltar que no existen reportes de actividad contra *E. histolytica*, *G. lamblia lamblia* y *T. vaginalis* de los compuestos 4,4,8-trimetiltriciclo[6.3.1.0(1,5)]dodecano-2,9-diol y ácido hexadecanoico, pero si se ha reportado la actividad giardicida del óxido de cariofileno (Machado *et al.*, 2010). Existen antecedentes que los principales componentes de los aceites esenciales con actividad antiprotozoaria son monoterpenos (linalol, terpinen-4-ol, timol, carvacrol, citral, limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -felandreno y *p*-cimeno), sesquiterpeno

( $\beta$ -cariofileno, nerolidol,  $\alpha$ -copaeno, cipereno y germacreno D) y fenilpropanoides (eugenol, metil cavicol y cinamaldehído); de manera general, esta actividad se debe al carácter lipofílico de su esqueleto de hidrocarburos y al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales (Monzote *et al.*, 2012).

Por lo tanto, se sugiere que los aceites esenciales pueden actuar contra *G. lamblia* provocando cambios en la viabilidad y adherencia de los trofozoítos, además de alteraciones en el citoesqueleto, ruptura de la membrana plasmática debido a la baja osmorregulación, así como deformaciones en la parte dorsal y ventral de los trofozoítos, internalización de los flagelos y existe la presencia de precipitados en el citoplasma y en el núcleo (Machado *et al.*, 2011; Monzote *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2012).

## 8. CONCLUSIÓN

- De los extractos obtenidos de *S. aromaticum*, el que presentó mayor rendimiento fue el extracto acetónico 24.50%, de los extractos etanólico y metanólico solo se obtuvo 3.33% y 6.21% respectivamente.
- En la identificación de grupos funcionales, los compuestos encontrados fueron esteroides, alcaloides, lactonas, oxhidrilos fenólicos y cumarinas en los extractos etanólico y metanólico, mientras que en el extracto acetónico encontramos esteroides, lactonas, oxhidrilos fenólicos, a diferencia de los otros extractos observamos la ausencia de alcaloides y cumarinas.
- Obtuvimos los parámetros de crecimiento como es el tiempo de duplicación y generación de *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*, observando que son semejantes a lo reportado en la literatura, con esto aseguramos que los cultivos estuvieran en óptimas condiciones.
- Los extractos acetónico, etanólico y metanólico de *S. aromaticum* mostraron actividad contra *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis*. Sin embargo, el extracto acetónico demostró ser más efectivo contra los tres parásitos con respecto a los extractos etanólico y metanólico, obteniendo un  $CI_{50}$  de 148.15  $\mu\text{g/ml}$  para *E. histolytica*, 153.56  $\mu\text{g/ml}$  para *G. lamblia* y 153.70  $\mu\text{g/ml}$  para *T. vaginalis*.
- El fraccionamiento del extracto acetónico obtenido de *S. aromaticum* fue biodirigido de acuerdo a la actividad que mostró frente a cada parásito. Por lo que se realizó una partición con hexano, obteniendo 2 fracciones siendo la más efectiva la partición 1 que es la parte soluble en hexano.

- Al fraccionar la partición 1, se obtuvieron 9 fracciones colectivas y de estas, la fracción colectiva 1 mostró buena actividad contra los tres parásitos, por lo cual se fracciono y se obtuvieron 4 fracciones secundarias.
- La fracción secundaria 2 resultó ser la más activa contra los tres parásitos, sin embargo, se encontró que para *E. histolytica* la concentración inhibitoria media es menor con respecto a las obtenidas contra los otros dos parásitos. La  $CI_{50}$  es de 32.67  $\mu\text{g/ml}$  para *E. histolytica*, 85.20  $\mu\text{g/ml}$  para *G. lamblia* y 51.92  $\mu\text{g/ml}$  para *T. vaginalis*.
- En el análisis espectroscópico de la fracción más activa (secundaria 2) se encontraron los compuestos: ácido hexadecanoico y óxido de cariofileno, los cuales ya han sido reportados en *S. aromaticum*, además el compuesto 4,4,8-trimetiltriciclo[6,3,1,0(1,5)]dodecano-2,9-diol, del cual solo se cuenta con un reporte en fechas recientes.
- La actividad amebicida y tricomonicida de estos compuestos no se encuentra reportada, excepto la actividad giardicida del óxido de cariofileno.

## LITERATURA CITADA

Abdel-Wahhan MA, Aly SE. 2005. Antioxidant property *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. *Journal Applied Toxicology* 25(3): 218-223.

Abdollahy F, Ziaei H, Shabankhani B, Azadbakht M. 2004. Effect of essential oil and methanolic extract of *Myrtus communis* on *Trichomonas vaginalis*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2(35):

Adam RD. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 447-475.

Adeniyi SA and Oboh. 2012. *In vitro* inhibition activity of polyphenol-rich extracts from *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (clove) buds against carbohydrate hydrolyzing enzymes linked to type 2 diabetes and Fe<sup>2+</sup> -induced lipid peroxidation in rat pancreas. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(10): 774-781.

Ahmed SA. 2010. *In vitro* effects of aqueous extracts of garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*) on *Trichomonas vaginalis*. *Parasitologists United Journal* 3: 45-54.

Aisha AFA, Abu-Salah KM, Alrokayan SA, Siddiqui MJ, Ismail Z, Abdul MAS. 2011. *Syzygium aromaticum* extracts as good source of betulinic acid and potential anti-breast cancer. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(2): 335-343.

Alderete JF, Benchimolb M, Lehkera MW, Croucha ML, 2002. Mini review. The complex fibronectin–*Trichomonas vaginalis* interactions and Trichomoniasis. *Parasitology International* 51: 285-292.

Al-heali FMG and Rahemo ZIF. 2006. The combined effect of two aqueous extracts on the growth of *Trichomonas vaginalis*. *Turkish Society for Parasitology* 30: 272-274.

Ali SA and Hill DR. 2003. *Giardia intestinalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16: 453-460.

Ali V and Nozaki T. 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing -amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondrial” protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 164-187.

Al-kaissi IN. 2010. The effect of aqueous some plants extract on *Giardia lamblia* in vitro. *Journal of Veterinary Science* 3(2): 48-58.

Alma MH, Ertas M, Nitz S, Kollmannsberger H. 2007. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *BioResources* 2(2): 265-269.

Bagavan A, Rahuman AA, Kumar KN, Sahal D. 2011. In vitro antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Research* 108: 15-22.

Balick, MJ and Cox PA. 1996. *Plants, people and culture: The science of ethnobotany*. New York: Scientific American Library 3-13, 21-23.

Banerjee S, Panda CK, Das S. 2006. Clove (*Syzygium aromaticum* L.) a potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis* 27(8): 1645-1654.

Bansal D, Malla N and Mahajan RC. 2006. Drug resistance in amoebiasis. *Indian Journal of Medical Research* 123: 115-118.

Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N and Mahajan RC. 2006. Multidrug resistance in amoebiasis patients. *Indian Journal of Medical Research* 124: 189-194.

Barbosa E, Calzada F, Campos R. 2006. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* lag and *Rubus coriifolius* focke in suckling mice CD-1. *Journal of Ethnopharmacology* 108: 395-397.

Barbosa E, Calzada F, Campos R. 2007. *In vivo* antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 552-554.

Bautista E, Calzada F, Ortega A, Yépez ML. 2011. Antiprotozoal activity of flavonoids isolated from *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae). *Journal Mexican Chemistry Society* 55(4): 251-253.

Behnia M, Haghighi A, Komeilizadeh A, Seyyed Tabaei SJ and Abadi A. 2008. In vitro antiamebic activity of Iranian *Allium sativum* in comparison with metronidazole against *Entamoeba histolytica*. Iranian Journal of Parasitology 3(4): 32-38.

Behnia M, Haghighi A, Komeylizadeh H, Tabaei Sj, Abadi A. 2008. Inhibitory effects of *Thymus vulgaris* extracts on in vitro growth of *Entamoeba histolytica*. Korean Journal of Parasitology 46(3): 153-156.

Bendesky A and Menéndez D. 2001. Metronidazol: una visión integral. Revista de la Facultad de Medicina UNAM 44(6): 255-259.

Bharti N, Singh S, Naqvi F and Azam A. 2006. Isolation and in vitro antiamebic activity of iridoids isolated from *Kigelia pinnata*. ARKIVOC 69-76.

Bhowmik D, Sampath KKP, Yadav A, Srivastava S, Paswan S, Dutta AS. 2012. Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 1(1): 6-17.

Bhuiyan MNI, 2012. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston). African Journal of Pharmacy and Pharmacology 6(16): 1260-1263.

Björnsson E, Nordlinder H, Olsson R. 2002. Metronidazol as a probable cause of severe liver injury. Hepatogastroenterology 49(43): 252-254.

Brown DG. 2010. The biosynthesis of artemisinin (qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (qinghao). Molecules 15: 7603-7698.

Cadena VD, Miranda N, Calderón N. 2006 Tricomoniasis urogenital. Revista Paceyña de Medicina Familiar 3(4): 84-89.

Cai L, Wu CD. 1996. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. Journal Natural Products 59(10): 987-990.

Calzada F, Cedillo-Rivera R, Bye R, Mata R. 2001. Geranins C y D, additional new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. Planta Medica 67: 677-680.

Calzada F, Cerda-García-Rojas CM, Meckes M, Cedillo-Rivera R, Bye R and Mata R. 1999. Geranins A and B, new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. Journal of Natural Products 62: 705-709.

Calzada F, Cervantes MJA, Yépez ML. 2005. In vitro antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. Journal of Ethnopharmacology 98: 191-193.

Calzada F, Meckes M and Cedillo-Rivera R. 1998. Antiamoebic and anti giardial activity of plant flavonoids. Planta Medica 65: 78-80.

Calzada F, Yépez-Mulia L and Aguilar A. 2006. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology 108: 367-370.

Calzada F, Yépez-Mulia L and Tapia-Contreras A. 2007. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. Journal of Ethnopharmacology 113: 248-251.

Calzada FC, Guajardo TEM, Carranza RMP, Segura LJJ. 1998. In vitro anti-trichomonic of *Castela texana*. Proceedings of the Western Pharmacology Society 41: 173-174.

Cancelo HMJ, Cancelo HC, Chavida GF. 2005. Vaginitis por *Trichomonas*. SEMERGEN 31(3): 121-124.

Cargnin ST, Vieira PD, Cibulski S, Cassel E, Vargas R, Montanha J, Roehe P, Tasca T, von Poser GL. 2013. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of *Hypericum polyanthemum* extract obtained by supercritical fluid extraction and isolated compounds. Parasitology International 62(2): 112-117.

Castro GJ, Anaya VF, Saíd FS, González GMT. 1996. Comparable growth of a *Trichomonas vaginalis* strain in PEHPS and TYI-S-33 media. Archives of Medical Research 27(4): 567-569.

Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Ben Kahla-Nakbi A, Rouabhia M, Mahdouani K and Bakhrouf A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research 21: 6 501-506.

Chin YW, Balunas MJ, Chai HB and Kinghorn AD. 2006. Drug discovery from natural sources. AAPS Journal 8: E239-E253.

Cosar C, Julou L. 1959. Activité de 1'(hydroxyl-2-ethyl)-1-methyl-2-nitro-5-imidazole vis-a-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. Annales de l'Institut Pasteur 96: 238-241.

Costamagna SR, Figueroa MP, 2001. On the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*: cytoskeleton, endocytosis and hydrogenosomes. Parasitología al Día 25: 100-108.

Dahmer RT, de Brum VP, Baggio GSC and Tasca T. 2012. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora* and *Ilex* species. Parasitology Research 110: 2551-2556.

Das S, Stevens T, Castillo C, Villasenõr A, Arredondo H, ReddyInt K. 2002. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. Journal of Parasitology 32: 655-75.

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

Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ and Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell Research 13(4): 239-249.

Dwivedi V, Shrivastava R, Hussain S, Ganguly C, Bharadwaj M. 2011. Comparative anticancer potential of clove (*Syzygium aromaticum*) -an Indian spice- against cancer cell lines of various anatomical origin. Asian Pacific Journal Cancer Preventive 12: 1989-1993.

Dzamic A, Sokovic M, Ristic MS, Grijic-Jovanovic S, Vukojevic J, Marin PD. 2009. Chemical composition and antifungal activity of *Illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. Chemistry of Natural Compounds 45(2): 259-261.

Edwards DI. 1980. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. The British Journal Venereal Diseases 56: 285-290.

Ertabaklar H, Kivçak B, Mert T, Özensoy Töz. 2009. *In vitro* activity of *Arbutus unedo* leaf extracts against *Trichomonas vaginalis* trophozoites. Türkiye Parazitoloji Dergisi 33(4): 263-265.

Fabricant DS and Norman FR. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. Environmental Health Perspectives 109: 69-75.

Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM and Guimarães. 2004. *In vitro* effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine* 13: 170-175.

Gardner TB and Hill DR. 2001. Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 114-128.

Garza PRA, Verde-Star MJ, Morales-Rubio ME, Oranday-Cárdenas A, Rivas-Morales C, Núñez-González MA, Barrón-González MP. 2010. Actividad amebicida, antioxidante y perfil fitoquímico de extractos metanólicos de *Astrophytum myriostigma* obtenidos de cultivo de callo y del cactus silvestre. *Polibotánica* 30: 111-121.

Gehring S and Efferth. 2009. Development of drug resistance in *Trichomonas vaginalis* and its overcoming with natural products. *The Open Bioactive Compounds Journal* 2: 21-28.

Ghayal N and Dhumal K. 2011. Morphophysiological investigations in some dominant alien invasive weeds. *Plants and environment* 15-48.

Ghedira K, Goetz P, Le Jeune R. 2010. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie* 8: 37-43.

Ghorbani A, Naghibi F and Mosaddegh M. 2006. Ethnobotany, Ethnopharmacology and Drug Discovery. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2(2): 109-118.

Gómez GC, Pérez DG, Orozco E. 1999. Physiology and molecular genetics of multidrug-resistance in *Entamoeba histolytica*. *Drug Resistance Updates* 2: 188-197.

Guenther E. 1948. *The essential oils*. Editorial New York.

Guerra OJ, Meneses A, Simonet AM, Macias FA, Nogueiras C, Gomez A and Escario JA. 2008. Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomonas vaginalis*. *Revista de Biología Tropical* 56: 1645-1652.

Guerrant RL. 1986. The global problema of amebiasis: current status, research needs, and opportunities for progress. *Reviews of Infectious Diseases* 8:218-227.

Gujral S, Patel N, Chaudhuri SK, Seth P. 1982. Altered lipid profile in liver amoebiasis and its emendation with metronidazole treatment. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 26: 240-245.

Gutiérrez G, Muñoz O. 1994. Epidemiología de la amibiiasis. Editor. Kretschmer R. En Amibiiasis, Infección y Enfermedad por *Entamoeba histolytica*. Ed. Trillas México. Págs. 207-226.

Harris JC, Plummer S, Turner MP and Lloyd. 2000. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti-giardial. Microbiology 146: 3119-3127.

Hassani S, Asghari G, Yousefi H and Yousofi DH. 2012. The effects of different extracts of *Eucalyptus camaldulensis* on *Trichomonas vaginalis* parasite in culture medium. Research in Pharmaceutical Sciences 7(5): 807.

Hawrelak J. 2003. Giardiasis: pathophysiology and management. Alternative Medicine Review 8:129-142.

Hema R, Kumaravel S, Sivasubramanian C. 2010. GC-MS study on the potentials of *Syzygium aromaticum*. Researcher 2(12): 1-4.

Ho SH, Cheng LPL, Sim KY, Tan HTW. 1994. Potential of cloves (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry) as a grain protectant against *Tribolium castaneum* (herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. Postharvest Biology and Technology 4: 179-183.

Ho SK, Youl KS, Pyo KH, Wook CH, Sik KS. 1998. Constituents from *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry. Natural Product Sciences 4(4): 263-267.

Jirovetz L, Buchbauer G, Stoilova I, Stoyanova A, Krastanov A and Schmidt E. 2006. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential oil. Journal Agricultural and Food Chemistry 54: 6303-6307.

Joshi N, Garg HS and Bhakuni DS. 1990. Chemical constituents of *Piper schmidtii*: structure of a new neolignan schmiditin. Journal of Natural Products 53: 479-482.

Keene AT, Harris A, Phillipson JD and Warhurst DC. 1986. *In vitro* amoebicidal testing of natural products; Part 1. Methodology. Planta Medica 278-285.

Keene AT, Phillipson JD, Warhurst DC, Koch and Seguin E. 1987. *In vitro* amoebicidal testing of natural products; Part 2. Alkaloids related to emetine. Planta Medica 201-206.

Keister DB. 1983. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene 77(4): 487-488.

Kim HM, Lee EH, Song HJ, Shin MK, Kim SH, Shin TY. 1998. Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. Journal of Ethnopharmacology 60(2): 125-131.

Kissinger P, Adamski A. 2013. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. Sexually Transmitted Infections 20: 23-33.

Kulda J, Vojtechovská M, Tachezy J, Demes P, Kunzová E. 1982. Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* as a cause of treatment failure in trichomoniasis. The British Journal of Venereal Diseases 58: 394-399.

Kulda J. 1999. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. International Journal for Parasitology 29: 199-212.

Ling-he L and Jin-zhong W. 2008. Chemical composition of the essential oil and ether extract from *Rhytidium rugosum*. Chemistry of Natural Compounds 44(6): 797-799.

Liu LX, Weller PF, 1996. Antiparasitic drugs. The New England Journal of Medicine 334:1178-1184.

López-Revilla R and Rodríguez-Báez J. 1981. Manual para el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México pp 36 y 56.

Lujan HD. 2006. Giardia y Giardiasis. Medicina. Buenos Aires 66: 70-74.

Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Cavaleiro C, Custódio JBA, Sousa MC. 2010. Anti-*Giardia* activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence and ultrastructure. Parasitology Research 106(5): 1205-1215.

Machado M, Sousa MC, Salgueiro L and Cavaleiro C. 2011. Effects of essential oils on the growth of *Giardia lamblia* trophozoites. Natural Product Communications 5: 137-141.

Mahdi NK, Gany ZH and Sharief M. 2006. Alternative drugs against *Trichomonas vaginalis*. Eastern Mediterranean Health Journal 12: 679-684.

Mani F, Pereira BC, Barbosa NEL, Sforcin JM. 2012. Influence of clove tea (*Syzygium aromaticum*) on body weight and biochemical parameters of rats subjected to ethanol consumption and abstinence. *Medicinal Chemistry* 2(4): 81-84.

Mata CBD, Vargas-Villarreal J, González-Salazar F, Palacios-Corona R and Saíd-Fernández S. 2008. A new vial microassay to screen antiprotozoal drugs. *Pharmacology* 1: 529-537.

McClelland RS, Sangaré L, Hassan WM, Lavreys L, Mandaliya K, Kiarie J, Ndinya-Achola J, Jaoko W, Baeten JM. 2007. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *Journal of Infectious Diseases* 195: 698-702.

Miyazawa M, Hisama M. 2003. Antimutagenic activity of phenylpropanoids from clove (*Syzygium aromaticum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(22): 6413-6422.

Monzote L, Alarcón O, Setzer WN. 2012. Antiprotozoal activity of essential oils. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 77(4): 167-175.

Morales RME, Morales VMR, Treviño NJF, Garza PRA, Rodríguez GRG, Mar AF, Reséndez PD, Verduzco MJA, Cavazos GR, Elizondo HA, Barrón GMP. 2010. Actividad amebicida de extractos de tejidos *in vivo* e *in vitro* de cuatro especies de cactáceas sobre *Entamoeba histolytica*. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica* 1(2): 1-12.

Muller M, 1988. Energy metabolism of protozoa without mitochondria. *Annual Review of Microbiology* 42: 465-488.

Müller M. 1983. Mode of action of metronidazole on aerobic bacteria and protozoa. *Surgery* 93: 165-171.

Nanda N, Michel RG, Kurgelashvili G, Wendel KA. 2006. Trichomoniasis and its treatment. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 4(1): 125-35.

Nassar MI, Gaara AH, El-Ghorab AH, Farrag ARH, Shen H, Huq E, Mabry TJ. 2007. Chemical constituents of clove (*Syzygium aromaticum*, fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity. *Revista Latinoamericana de Química* 35(3):47-57.

Neira OP, Correa LA, Muñoz SN, Tardío OMT and Carabelli FM. 2005. Frecuencia de infección por *Trichomonas vaginalis* en atención primaria de salud. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología* 70(3): 147-151.

Nigenda G, Mora-Flores G, Aldama-López S and Orozco-Núñez E. 2001. La práctica de la medicina tradicional en América Latina y el Caribe: el dilema entre regulación y tolerancia. *Salud Pública de México* 43: 41-51.

Nweze EI, Mouneke GN. 2011. *Trichomonas vaginalis* in HIV/AIDS subjects in Nigeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 1(4): 282-286.

Olalla HR y Tercero GMJ. 2011. Parasitosis comunes. Externas e internas. *Amb Farm* 30(4): 33-39.

Orozco E, López C, Gómez C, Pérez DG, Marchat L, Bañuelos C, Delgadillo DM. 2002. Multidrug resistance in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Parasitology International* 51: 353-359.

Orozco E, Marchant LA, Gómez C, López CC, Pérez DG. 2009. Drug resistance mechanisms in *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, and opportunistic anaerobic protozoa. *Infectious Disease* 549-559.

Pamplona RJ. 1999. Enciclopedia de las plantas medicinales. España. Editorial SAFELIZ, S.L.

Pandey A, Singh P. 2011. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research* 1(2): 69-80.

Park WS, Cho YJ, Chu JP. Growth inhibitory effects of various herbal extracts on metronidazole resistant strain of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 36(2): 97-104.

Pena EF. 1962. *Melaleuca alternifolia* oil. Its use for trichomonal vaginitis and other vaginal infections. *Obstetrics & Gynecology* 19: 793-795.

Pérez GS, Ramos-López MA, Sánchez-Miranda E, Fresán-Orozco MC and Pérez-Ramos J. 2012. Antiprotozoa activity of some essential oils. *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 2901-2908.

Petri WA., Haque R, Lyerly D, Vines RR, 2000. Estimating the impact of amebiasis on health. *Parasitol Today* 16:320-321.

Petrin D, Delgaty K, Bhatt R, Garber G. 1998. Clinical and microbiology aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews* 11(2): 300-317.

Piccoli FA, dos Santos O, Duarte M, da Silva Trentin D, Brandt GR, Gomes SA, Vanusa SM, Tasca T, Macedo AJ. 2012. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga. *Parasitology Research* 110(6): 2581-2587.

Pinilla AE, López MC and Viasus DF. 2008. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. *Revista Médica de Chile* 136: 118-124.

Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, de la Mora-de la Mora JI, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Martínez-Gordillo MN. 2001. Mortality and morphological changes in *Giardia duodenalis* induced by exposure to ethanolic extracts of *Justicia spicigera*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 44: 151-152.

Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, González-Maciél A, Reynoso-Robles R, Martínez-Gordillo MN. 2006. Oregano (*Lippia spp.*) kills *Giardia intestinalis* trophozoites in vitro: anti-giardiasis activity and ultrastructural damage. *Parasitology Research* 98:557-560.

Prashar A, Locke IC, Evans CS. 2006. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Proliferation* 39(4): 241-248.

Procop GW. 2001. Gastrointestinal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America* 15:1073-1108.

Rivera M, de la Parte MA, Hurtado P, Magaldi L, Collazo M, 2002. Giardiasis intestinal. Mini-revisión. *Invest Clin* 43:119.128.

Rojas E, Morales C, Juárez E, Pineda N. 2006. Tratamiento de la leishmaniasis cutánea con plantas medicinales en Trujillo, Venezuela. *Academia* 19-25.

Roudha AA, Hossain MA, Weli Am, Al-Riyami, Nasser AJ. 2012. Constituents of the essential oil from different brands of *Syzygium caryophyllatum* L by gas chromatography-mass spectrometry. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S1446-S1449.

Saíd FS, Vargas VJ, Castro GJ, Mata CBD, Navarro ML, Lozano GG and Martínez RH. 1988. PEHPS Medium: an alternative for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 249 - 253.

Samuelson J. 1999. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 43: 1533-1541.

Sánchez VJT, Tay ZJ, Robert GL, Romero CR, Ruíz SD, Rivas GC. 2000. Frecuencia de parasitosis intestinales en asentamientos humanos irregulares. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 43(3): 80-83.

Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LG, Mendonca LZ, Soares MJ. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology* 116(3): 283-290.

Santos AL, Chierice GO, Alexander KS, Riga A and Matthews E. 2009. Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 96: 821-825.

Sarkari B, Tadayon H, Askarian S, Farnia E, Askarian M. 2009. In vitro anti-trichomonas activity of *Freula assafoetida* and garlic extracts. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* 11(3): 13-17.

Sawangjaroen N, Phongpaichit S, Subhadhirasakul S, Visutthi M, Srisuwan N and Thammapalerd N. 2006. The anti-amoebic activity of some medicinal plants used by AIDS patients in southern Thailand. *Parasitology Research* 98: 588-592.

Sawangjaroen N, Subhadhirasakul S, Phongpaichit S, Siripanth C, Jamjaroen K and Sawangjaroen. 2005. The in vitro anti-giardial activity of extracts from plants that are used for self-medication by AIDS patients in southern Thailand. *Parasitology Research* 95:17-21.

Schwebke JR and Barrientes FJ. 2006. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50:12 4209-4210.

Shrivastava B, Shrivastava V, Shrivastava A. 2011. *In vitro* study of *Entamoeba histolytica* causative agent of amoebiasis with lemon juice at different concentration showed antiamoebic properties. *International Research Journal of Pharmacy* 2 (9): 88-90.

Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th edition. Wiley & Sons Inc. USA, pp. 127-340.

Singh S, Bharti N, Chugh M, Nagvi F, Azam A. 2010. Activity of extracts and procesterol from *Calotropis gigantean* against *Entamoeba histolytica*. *Natural Products Community* 5 (6): 867-868.

Simjee AE, Gathiram V, Jackson TF, Khan BF, 1985. A comparative trial of metronidazole and tinidazole in the treatment of amoebic liver abscess. South African Medical Journal 68:923-924.

SINAVE. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2013. [Internet]. Disponible en el sitio de red: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/> [Revisado el 27 de abril de 2013].

Snipes LJ, Gamard PM, Narcisi EM, Beard CB, Lehmann T, Secor WE. 2000. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. Journal Clinical Microbiology 38(8): 3004-3009.

Son KH, Kwon SY, Kim HP, Chang HW and Kang SS. 1998. Constituents from *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry. Natural Products Sciences 4(4): 263-267.

Srivastava AK, Srivastava SK, Syamsundar KV. 2005. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. Flavour and Fragrance Journal 20: 51-53.

Taran M, Rezaeian M, Izaddoost M. 2006. In vitro antitrichomonas activity of *Allium hirtifolium* (Persian shallot) in comparison with metronidazole. Iranian Journal Publ Health 35(1): 92-94.

Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Cimanga K, Vlietinck AJ. 1998. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 61: 57-65.

Tonkal AMD. 2009. In vitro antitrichomonal effect of *Nigella sativa* aqueous extract and wheat germ agglutinin. Medicine & Science 16: 17-34.

Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P and Vanelle P. 2006. 5-nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 50:1 344-347.

Upcroft P, Upcroft JA. 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. Clinical Microbiology Reviews 14(1): 150-164.

Upcroft P. 1998. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. Drug Resistance Updates 1(3): 166-168.

Vázquez F, García MJ, Pérez F and Palacio V. 2001. *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 19: 114-124.

Vázquez TO and Campos RT. 2009. Giardiasis. La parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación* 8: 75-90.

Vega GML, Alfaro GM, Triguez GM, Calvo RC. 2008. Giardiasis resistente a metronidazol: a propósito de un caso. *Revista Pediatría Atención Primaria* 10(26): 261-266.

Vieira P. 2011. Screening and bioguided fractionation of Amaryllidaceae species with anti-*Trichomonas vaginalis* activity. *Planta Medica* 77(10): 1054-1059.

Wagner H. 2006. Futuro en la investigación en fitoterapia: tendencias y retos. *Revista de Fitoterapia* 6(2) 101-117.

Wright CW, Bray DH, O'Neill MJ, Warhurst DC, Phillipson JD, Quetin-Leclercq J and Angenot L. 1991. Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Strychnos usambarensis*. *Planta Medica* 57: 337-340.

Wright CW, Marshall SJ, Russell PF, Anderson MM, Phillipson JD, Kirby GC, Warhurst DC and Schiff PL. 2000. In vitro antiplasmodial, antiamoebic and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products* 63: 1638-1640.

Ximénez C, Morán P, Ramos F, Ramiro M. 2007. Amibiasis intestinal: estado actual del conocimiento. *Medicina Interna de México* 23: 398-407.

Youse HA, Kazemian A, Serehti M, Rahmanikhoh E, Ahmadiania E, Maghsoodi R, Darani HY. 2012. Effect of *Echinophora platyloba*, *Stachys lavandulifolia* and *Eucalyptus camaldulensis* plants on *Trichomonas vaginalis* growth *in vitro*. *Advanced Biomedical Research* 1(79):

Zafar BA, Ahmad I. 2002. *In vitro* fungitoxicity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 313-315.

## RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Magda Elizabeth Hernández García

Candidata para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: “Efecto de los extractos de *Syzygium aromaticum* sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*”

Campo de estudio: Química de Productos Naturales.

Datos personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León, el 1 de Diciembre de 1982, hija de José Luis Hernández Martínez y la Profra. Martha Eugenia García de Jesús.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 2006.

Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Maestro en Ciencias con Especialidad en Microbiología en 2009.