



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Actividad antiparasitaria y composición química de extractos de corteza de Nanchi de la costa (*Zizyphus sonorensis*) y Guamúchil (*Pithecellobium dulce*)

TESIS

Que presenta

QFB ALMA LUZ GONZÁLEZ ARÉVALO

Para obtener el Grado de

**MAESTRA EN CIENCIA
Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Directores de Tesis

**DR. FRANCISCO DELGADO VARGAS
DRA. SYLVIA PÁZ DÍAZ CAMACHO**

Culiacán de Rosales, Sinaloa, México

Abril de 2017

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Posgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos y la Unidad de Investigación en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”, ambos de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. La investigación fue dirigida por los doctores Francisco Delgado Vargas y Sylvia Páz Díaz Camacho y asesorada por los doctores Gabriela López Angulo y José Ángel López Valenzuela. Esta investigación contó con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y del Programa de Fomento y Apoyo a Proyectos de Investigación (PROFAPI) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, se agradece la beca otorgada por CONACYT a Alma Luz González Arévalo.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 3 del mes Abril del año 2017, el (la) que suscribe Alma Luz González Arévalo alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 08225117, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Francisco Delgado Vargas y Julio Montes Avila y cede los derechos del trabajo titulado "ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS DE CORTEZA DE NANCHI DE LA COSTA (*Zizyphus sonorensis*) Y GUAMÚCHIL (*Pithecellobium dulce*)", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Alma Luz
Gonzalez A.*
Alma Luz González Arévalo

Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, la Facultad de Ciencias Químico Biológicas y al Posgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos, por permitirme alcanzar mis metas.

Expreso mis más sinceros agradecimientos al Dr. Francisco Delgado Vargas por la oportunidad de trabajar con él, por brindarme su apoyo, amistad, tiempo y paciencia (mucho) durante la dirección de este proyecto. Gracias Dr., por todas sus enseñanzas.

A la Dra. Sylvia Páz Díaz Camacho, por permitirme trabajar con usted, por sus sabios consejos y asesoría brindada durante la realización de este trabajo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Gabriela López Angulo por todo el apoyo, sus consejos, su experiencia y su asesoría en la realización de este trabajo. Sin su ayuda y todos sus conocimientos, no habría sido posible llevarlo a cabo, muchas gracias.

Al Dr. José Ángel López Valenzuela por su valioso apoyo en la revisión y recomendaciones aportadas a este escrito.

Al Dr. Julio Montes por sus consejos y asesoría brindada durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Rito Vega Aviña por su apoyo en la identificación del material vegetal utilizado en la presente investigación.

A personal, investigadores y alumnos de la Unidad de Investigación en Salud Pública “Dra. Kaethe Willms”, por permitir la realización de gran parte de esta investigación en sus instalaciones, por su apoyo y colaboración en la realización de la actividad antiparasitaria.

A mis compañeros y amigos de generación del programa de MCTA; muy en especial a Gisela, Erika, David, Milton y Cristian, gracias por todos los buenos

momentos que compartimos durante esta etapa; sin duda, conocerlos y su amistad es de las mejores cosas que me llevo de esta etapa. Gisela y Erika, muchas gracias por su linda amistad.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Química de Productos Naturales, a los que están y los no están presentes en el laboratorio: Almita, Anayanci Belinda, Gisela, María, Maritza, Perla, Sandra, Sara, Pedro, José Ángel, Oscar, Carlos y Manuel. Por todo el apoyo brindado, desde el comienzo de este proceso.

Gracias a Maritza, por ayudarme siempre que necesite de tu apoyo, definitivamente sin ti, no imagino como lo hubiese realizado.

A María, Perla y Sofía, porque sin ustedes, el Lorke habría sido muy complicado, muchas gracias.

A la MC. Sandra, por tener respuesta a cada una de las dudas que nos surgen día con día en el laboratorio, por su incondicional ayuda; dándose siempre el tiempo. Gracias por tu amistad y confianza, por abrirme las puertas de tu casa. Gracias por permitirnos querer a Natalia.

A las chicas LQPN (Anayanci, Belinda, Gisela, Maestra Gaby, María, Sandra y Perla) por esa hora del café por la mañana, por las pláticas tan variadas e interminables, por todas esas comidas a la 1:00 PM (aproximadamente), por las aventuras y experiencias compartidas en los congresos, por su amistad, las quiero mucho a todas.

A mi roomie favorita, mi pequeña hermanita, mil gracias por todo Carolina, agradezco a Dios que haya cruzado nuestros caminos, te quiero mucho.

A mi familia:

A mi mamá y mi papá, por su amor, cariño, comprensión y apoyo incondicional en cada una de las etapas y metas de mi vida. A mis hermanos, por apoyarme (a su manera; por todos esos raites). A mi cuñada, por traer al mundo

a mi sobrino, el niño más hermoso y listo, quien ha llenado de felicidad nuestras vidas, que llevo en el momento perfecto a mi vida. Los amo mucho, y le doy gracias a Dios por todo lo que nos da cada día.

A quien a pesar de los problemas del día a día, está ahí para apoyarme; gracias por animarme a confiar en mí siempre. Por ser quien me ayuda en momentos en los que no encuentro que hacer; por salvar mi computadora tantas veces; por escucharme; por alegrar mi días; por estar siempre conmigo. Muchas gracias por todo Juan Carlos, te amo.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE CUADROS	XII
I RESUMEN	14
ABSTRACT	16
II INTRODUCCIÓN	18
III REVISIÓN DE LA LITERATURA	21
A PARASITOSIS INTESTINALES	21
1 Giardiosis	22
a Epidemiología	22
b Morfología y ciclo biológico	23
c Datos clínicos	26
d Tratamiento	27
2 Hymenolepiosis	29
a Epidemiología	29
b Morfología y ciclo biológico de <i>H. nana</i>	31
c Datos clínicos	36
d Tratamiento	37
B BIODIVERSIDAD DEL ESTADO DE SINALOA	37
1 Plantas como fuentes de componentes con actividad antiparasitaria	37

a	<i>Pithecellobium dulce</i>	41
b	<i>Zizyphus sonorensis</i> S. Wats	46
IV	JUSTIFICACIÓN	54
V	OBJETIVOS	55
A	OBJETIVO GENERAL	55
B	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	56
A	MATERIALES	56
1	Material vegetal	56
2	Material biológico	56
a	Trofozoítos de <i>Giardia duodenalis</i>	56
b	Adultos de <i>Hymenolepis nana</i>	56
3	Reactivos	57
B	MÉTODOS	57
1	Obtención de los extractos de las cortezas	57
2	Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> contra <i>Giardia duodenalis</i>	59
a	Criopreservación de la cepa de <i>G. duodenalis</i>	59
b	Cultivo de trofozoítos de <i>G. duodenalis</i>	59
c	Evaluación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de los extractos	61

3 Actividad antiparasitaria contra <i>Hymenolepis nana</i>	62
a Obtención de los parásitos adultos	62
b Evaluación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de los extractos contra <i>H. nana</i>	63
c Determinación de la viabilidad de los parásitos	65
4 Caracterización fitoquímica de los extractos con mayor actividad antiparasitaria	65
a Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos	65
b Separación y análisis cromatográfico de extractos de las cortezas de nanchi de la costa y guamúchil	67
c Cromatografía en capa fina	67
5 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de extractos con actividad antiparasitaria	67
a Análisis de los extractos con actividad anti- <i>Giardia</i> mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EMCG-EM)	67
b Cuantificación, purificación y caracterización de los componentes asociados en la actividad antiparasitaria contra <i>H. nana</i>	69
6 Evaluación de la toxicidad de extractos/fracciones de interés	70
a Evaluación de la toxicidad mediante el bioensayo con <i>Artemia salina</i>	70

7	Determinación de toxicidad por Método de Lorke	71
9	Análisis estadístico	72
VII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
A	RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN	73
B	ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA <i>in vitro</i> CONTRA <i>Giardia duodenalis</i>	73
C	ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA CONTRA <i>Hymenolepis nana</i>	84
1	Descripción general del daño al parásito para cada uno de los extractos evaluados	87
D	CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS/FRACCIONES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA	94
1	Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos/fracciones activos	94
E	ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTI- <i>GIARDIA</i> MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)	98
1	Caracterización de los extractos por CG-EM	98
F	CUANTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES ASOCIADOS A LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA CONTRA <i>Hymenolepis nana</i>	111
G	EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD MEDIANTE EL BIOENSAYO CON <i>Artemia salina</i>	122

	H DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL50) POR MÉTODO DE LORKE	126
VIII	CONCLUSIONES	128
	PERSPECTIVAS	130
IX	BIBLIOGRAFÍA	131
	ABREVIATURAS	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Pág.
1	Ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i> .	25
2	Estadios de desarrollo de <i>Giardia duodenalis</i> y sus principales estructuras.	26
3	Imágenes de microscopía de luz de <i>Hymenolepis nana</i> .	34
4	Ciclo de vida de <i>Hymenolepis nana</i> .	35
5	Esquema general de la preparación de los diferentes extractos evaluados.	58
6	Estrategia general para la determinación de la actividad contra <i>Hymenolepis nana</i> .	64
7	Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> contra <i>Giardia duodenalis</i> .	77
8	Crecimiento de trofozoitos de <i>Giardia duodenalis</i> a 24 h de incubación.	78
9	Actividad evaluada a 500 µg/mL de los extractos metanólicos de harina de corteza de nanchi de la costa (N) contra <i>Giardia duodenalis</i> a las 24 h de incubación.	79
10	Actividad evaluada a 500 µg/mL de los extractos hexánicos (EH) de harina de corteza de nanchi de la costa (N) y de guamúchil (G) contra <i>Giardia duodenalis</i> a las 24 h de incubación.	80
11	Fotomicroscopía óptica de <i>Hymenolepis nana</i> tratada con el extracto acuoso (EA) de guamúchil (G) (EA-G) (50 mg/mL).	88
12	Fotomicroscopía óptica de <i>Hymenolepis nana</i> tratada con el extracto acuoso (EA) de harina desgrasada de guamúchil (EA-DG) (50 mg/mL).	89

13	Fotomicroscopía óptica de <i>Hymenolepis nana</i> tratada con la fracción metanólica obtenida del extracto acuoso (EA) de harina de corteza desgrasada de guamúchil (EA-DGm) (50 mg/mL).	92
14	Fotomicroscopía óptica de <i>Hymenolepis nana</i> tratada con 50 mg/mL de la fracción acuosa obtenida del extracto acuoso (EA) de harina de corteza desgrasada de guamúchil (EA-DGa).	93
15	Cromatogramas de gases-masas del extracto hexánico de nanchi (EH-N) sin derivatizar (A) y derivatizado (B).	99
16	Cromatogramas de gases-masas del extracto hexánico de guamúchil (EH-G) sin derivatizar (A) y derivatizado (B).	102
17	Cromatogramas de gases-masas del extracto metanólico de nanchi (EM-N) sin desgrasar (A) y desgrasado (EM-DN) (B), ambos derivatizados.	105
18	Espectro de masas en modo negativo de la fracción EA-DGm.	115
19	Espectro de masas en modo negativo de la subfracción acetónica de EA-DGa.	116
20	Dímeros identificados en el de la subfracción acetónica de EA-DGa.	118
21	MS ² del ión [M-H] ⁻ 833.	121

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Reportes de resistencia de tratamientos contra <i>Giardia duodenalis</i> .	29
2	Características generales de <i>Hymenolepis nana</i> .	33
3	Estudios de plantas utilizadas por su actividad antiparasitaria.	40
4	Clasificación taxonómica del Guamúchil.	42
5	Usos y Actividades de <i>Pithecellobium dulce</i> .	45
6	Clasificación taxonómica de nanchi de la costa.	47
7	Usos tradicionales y actividades biológicas de <i>Ziziphus</i> spp.	49
8	Reactivos utilizados en la preparación del medio TYI-S-33.	60
9	Reacciones para la identificación de metabolitos secundarios, análisis fitoquímico.	66
10	Rendimiento de extractos metanólicos (EM), acuosos (EA), y hexánicos (EH) de harinas de corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G).	74
11	Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de los extractos de corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) contra <i>Giardia duodenalis</i> .	76
12	Inhibición del crecimiento (IC ₅₀) <i>in vitro</i> de los extractos activos de corteza de harina de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) contra <i>Giardia duodenalis</i> .	82
13	Actividad contra <i>Hymenolepis nana</i> de extractos metanólicos (EM) y hexánicos (EH) de harinas de corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G), sin desgrasar (N y G) y desgrasadas (DN y DG).	83

14	Actividad contra <i>Hymenolepis nana</i> de fracciones del extracto acuoso (EA) de la harina desgrasada de guamúchil (DG).	91
15	Familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos (EM), hexánicos (EH) y acuosos (EA) de la corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) que mostraron actividad antiparasitaria.	95
16	Composición química del extracto hexánico de corteza de nanchi de la costa (EH-N) determinada por CG-EMCG-EM.	100
17	Composición química del extracto hexánico (EH) derivatizado de corteza de nanchi de la costa (EH-Nd) determinada por CG-EMCG-EM.	101
18	Composición química del extracto hexánico de corteza de guamúchil (EH-G) determinada por CG-EMCG-EM.	103
19	Composición química del extracto hexánico (EH) derivatizado de corteza de guamúchil (EH-Gd) determinada por CG-EM.	104
20	Composición química del extracto metanólico (EM) derivatizado de corteza de nanchi de la costa (EM-Nd) determinada por CG-EM.	106
21	Composición química del extracto metanólico (EM) derivatizado de corteza desgrasada de nanchi de la costa (EM-DNd) determinada por CG-EM.	107
22	Contenido de taninos condensados del extracto acuoso (EA) de harina de corteza de guamúchil (G), activo contra <i>Hymenolepis nana</i> , y de sus fracciones	113
23	Masas calculadas y observadas por MS-ESI para los taninos obtenidos de la de la subfracción acetónica de EA-DGa.	120
24	Toxicidad (CL ₅₀), en el ensayo de <i>Artemia salina</i>	124

I RESUMEN

Las enfermedades parasitarias constituyen un serio e importante problema de salud pública a nivel mundial. La giardiosis e hymenolepiosis son de las principales parasitosis intestinales en México presentan elevada prevalencia y afectan principalmente a los niños, comprometiendo su desarrollo físico e intelectual. Los antiparasitarios alopáticos disponibles comercialmente contra estas parasitosis son ineficientes y además han aparecido cepas resistentes a los mismos. Debido a esto, es importante el desarrollo de nuevos antiparasitarios y las plantas continúan siendo una de las principales fuentes de compuestos bioactivos. Al respecto, a partir de plantas seleccionadas de la riqueza florística de Sinaloa ($\cong 15\%$ de la flora de México, 3500-3800 especies) es posible obtener extractos o compuestos puros contra las principales parasitosis. El guamúchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth) (G) y nanchi de la costa (*Zizyphus sonorensis* S.Watson) (N) son plantas nativas de Sinaloa y sus cortezas han sido usadas en medicina tradicional como antiparasitarios; sin embargo, esta propiedad no ha sido demostrada científicamente y son plantas escasamente estudiadas. En la presente investigación se evaluó la actividad *in vitro* en contra de *Giardia duodenalis* e *Hymenolepis nana*, de extractos de corteza de guamúchil y nanchi de la costa, determinando además, las principales familias de fitoquímicos presentes en ellos y su toxicidad. Los extractos se obtuvieron a partir de harina entera: acuosos de nanchi de la costa (EA-N) y de guamúchil (EA-G); metanólicos de nanchi de la costa (EM-N) y guamúchil (EM-G) y hexánicos de nanchi de la costa (EH-N) y de guamúchil (EH-G). Los extractos de harina desgrasada fueron: acuosos de nanchi de la costa (EA-DN) y de guamúchil (EA-DG) y metanólicos de nanchi de la costa (EM-DN) y de guamúchil (EM-DG). Solo los extractos de G presentaron actividad contra *H. nana*; el EA-DG fue el mejor y registró tiempos de parálisis (8 min) y muerte (15 min) del parásito menores que

el Praziquantel, 20 y 30 min, respectivamente. En la evaluación contra *Giardia duodenalis*, los EM-N y EH-N presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento (72.04-75.84%) sin registrar diferencia estadística entre ellos y los valores fueron superiores a los que se obtuvieron con el único extracto de guamúchil que mostró esta actividad, EH-G (53.48%). El extracto más eficiente (EH-N) contra *G. duodenalis* presentó un IC₅₀ de 194.6 µg/mL. En los extractos activos contra *G. duodenalis* se identificaron compuestos con relevancia terapéutica como terpenos (*i.e.*, sitosterol, lupeol, lupenona y derivados del ácido ursólico), ácidos grasos, compuestos fenólicos y flavonoides. La espectrometría de masas de las fracciones obtenidas durante la purificación con Sephadex LH-20 del EA-DG (*i.e.*, EA-DGm y EA-DGa) mostró la presencia de proantocianidinas (taninos condensados) y derivados del ácido caféico, lo cual podría sugerir que son los componentes de guamúchil con mayor contribución a la actividad antiparasitaria. La toxicidad de los extractos de las cortezas de G y N, en el ensayo de *Artemia salina*, variaron de altamente tóxico (EA-DG y EM-DN; CL₅₀ 60.4-273.9 µg/mL) a relativamente inocuo (EM-N, EH-N, y EH-G; CL₅₀ 618.8-2192.8 µg/mL). La evaluación de toxicidad de los extractos EH-N y EA-DG, mediante el método de Lorke, sugiere que son inocuos (LD₅₀>1000 y 2900 mg/kg de peso, respectivamente). Estos resultados soportan el uso tradicional de los extractos de cortezas de guamúchil y nachi de la costa como agentes antiparasitarios.

ABSTRACT

Parasitic diseases are a public health problem in the world. In Mexico, giardiasis and hymenolepiosis are among the main intestinal parasitosis and they affect mainly children, compromising their mental and physical development. Commercially available drugs against these parasitosis are inefficient, produce side effects, and can generate resistant strains. Thus, development of new antiparasitics is important and plants are still one of the major sources of bioactive compounds. In this respect, extracts or pure compounds obtained from the floristic richness of Sinaloa (\cong 15% of the floral Mexico, 3500-3800 species) have potential to treat parasitosis. Guamúchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth) (G) and Nanchi de la costa (*Zizyphus sonorensis* S. Watson) (N) are native to Sinaloa and their barks have been used in traditional medicine as antiparasitics; however, this property has not been scientifically proven and the plants have been poorly studied. In the present study, we determined the *in vitro* activity of different extracts of G and N against *Giardia duodenalis* and *Hymenolepis nana*, as well as the main families of phytochemicals in such extracts. The obtained concentrates were extracts of whole flour: aqueous of “nanchi de la costa” (EA-N) and guamúchil (EA-G); methanolic of “nanchi de la costa” (EM-N) and guamúchil (EM-G); and hexane extract of “nanchi de la costa” (EH-N) and guamúchil (EH-G). The defatted flour concentrates were: aqueous of “nanchi de la costa” (EA-DN) and guamúchil (EA-DG); and methanolic of “nanchi de la costa” (EM-DN) and guamúchil (EM-DG). Considering the activity against *H. nana*, only the G extracts were active, EA-DG was the best with times of paralysis (8 min) and death (15

min) lower than those of Praziquantel, 20 and 30 min, respectively. On the other hand, the *in vitro* evaluation against *G. duodenalis* showed that EM-N and EH-N had the highest percentages of growth inhibition (72.04-75.84%) without statistical difference between them; these values were higher than that of the only G extract with activity, EH-G (53.48%). The extract with the highest inhibition against *G. duodenalis* had an IC₅₀ of 194.6 µg/mL. Active extracts against *G. duodenalis* contained compounds with therapeutic relevance, such as terpenes (*i.e.*, sitosterol, lupeol, lupenone and ursolic acid derivatives), fatty acids, phenolic compounds, and flavonoids. Mass spectrometry of fractions obtained during purification of EA-DG with Sephadex LH-20 (*i.e.*, EA-DGm and EA-DGa) showed the presence of proanthocyanidins (condensed tannins) and caffeic acid derivatives, which could be suggested as the G components with the greatest contribution to their antiparasitic activity. The toxicity of the extracts by the *Artemia salina* assay varied from highly toxic (EA-DG and EM-DN; LC₅₀ 60.4-273.9 µg/mL) to relatively innocuous (EM-N, EH-N, and EH-G; LC₅₀ 618.8-2192.8 µg/ml). The toxicity evaluation of the extracts EH-N and EA-DG by the Lorke Method suggested that they were safe (LD₅₀ > 1000 and 2900 mg/kg, respectively). These results support the traditional use of bark extracts of guamúchil and “nanchi de la costa” as antiparasitic agents.

II INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo, representan uno de los más importantes problemas de salud pública y afectan principalmente a países en vías de desarrollo. Registros de la Organización Mundial de la Salud (OMS) muestran que existen 2 billones de personas en el mundo portadores de parásitos intestinales (Bundy y col 2009); mientras que de acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (OPS), 26 millones de niños en América Latina y el Caribe viven afectados por este padecimiento (Tsuji y Rivera 2012). En América Latina, las enfermedades parasitarias tienen una alta prevalencia debido a las condiciones socioeconómicas y culturales asociadas a múltiples factores como inmunológicos, genéticos, fisiológicos y nutricionales (Olalla y Tercero 2011). En México, la prevalencia de parasitosis intestinales se ha registrado en 49.1% de niños y en 53% de la población en general (Luján 2006). *Giardia duodenalis* (*G. intestinalis* o *G. lamblia*) es un protozooario que habita en el intestino delgado y es el agente etiológico de la giardiosis, una enfermedad gastrointestinal con impacto mundial en la salud pública y veterinaria. *G. duodenalis* presenta ocho genotipos (A-H). Los genotipos A y B son los principales responsables de la giardiosis humana pero también se han identificado en otros mamíferos como perros y gatos. La giardiosis afecta principalmente a niños y causa manifestaciones muy variadas que transcurren desde una infección asintomática hasta cuadros graves de diarrea crónica, síndrome de malabsorción, e inadecuado desarrollo físico y cognitivo (Uribarren 2014). El tratamiento médico más utilizado, por costo y

disponibilidad, es el metronidazol, pero se han encontrado casos resistentes a este fármaco.

Hymenolepis nana es el principal cestodo asociado a la hymenolepiosis humana, habita en el intestino delgado y la infección puede presentarse sin síntomas aparentes o leves, pero cuando la carga parasitaria es elevada causa irritación de la mucosa intestinal, dolor abdominal y diarrea que deterioran la calidad de vida de quienes padecen la infección. Aunque el tratamiento de elección para esta parasitosis es el praziquantel, en México y otros países de América Latina se usa el albendazol, principalmente porque es el medicamento que se encuentra disponible en las instituciones públicas de salud.

Es importante resaltar que el metronidazol y albendazol producen efectos colaterales (Bendesky y Menéndez 2001) y se ha demostrado la existencia de cepas resistentes a estos medicamentos. Las causas asociadas al fracaso del tratamiento antiparasitario además de la resistencia, pueden ser varias, entre las que se pueden mencionar baja absorción de la droga, inactivación del medicamento por la flora intestinal, incumplimiento con la terapia indicada o a reinfecciones (Upcroft 1998; Bansal y col 2006; Ali y Nozaki 2007).

Por lo anterior, es importante buscar antiparasitarios que sean más efectivos y estimulen los mecanismos de defensa innata de los hospederos y en este aspecto, los productos naturales representan una opción para desarrollar nuevos fármacos que sean selectivos, efectivos para cepas resistentes y de menor costo (Balick y Cox 1996; Wagner 2006). En nuestro laboratorio se ha generado

información científica sobre actividad biológica y composición química de plantas nativas de la región para contribuir al establecimiento de estrategias de aprovechamiento sustentable. México es megadiverso y Sinaloa comparte esta característica. Un gran número de plantas mexicanas se han usado para tratar enfermedades parasitarias, sin embargo para la mayoría de ellas no existe información científica que sustente dicho uso. Entre los tratamientos tradicionales para tratar enfermedades parasitarias se encuentran el guamúchil y la nanchi de la costa. El guamúchil (*Pithecellobium dulce*) es un árbol ampliamente utilizado por sus propiedades antidiarreicas y antihelmínticas empleándose principalmente infusiones de la corteza del árbol (Rzedowski y Rzedowski 1985a). Tradicionalmente la corteza de nanchi de la costa (*Zizyphus sonorensis*) se utiliza con fines medicinales. El cocimiento de un trozo de corteza se usa para lavar heridas y llagas de personas y animales. La raspadura de la corteza bien pulverizada se aplica en forma de cataplasma para secar y cicatrizar las heridas y/o llagas (González J 2009). En la presente investigación se demuestra la actividad antiparasitaria contra *Giardia duodenalis* e *Hymenolepis nana* de extractos de cortezas de nanchi de la costa (*Zizyphus sonorensis*) y guamúchil (*Pithecellobium dulce*), así como su asociación con compuestos específicos.

III REVISIÓN DE LA LITERATURA

A PARASITOSIS INTESTINALES

Las parasitosis intestinales afectan a un gran número de individuos y les ocasionan serios problemas de salud. Éstas son más frecuentes en países en vías de desarrollo y se ven favorecidas por condiciones climáticas cálidas o templadas y malas condiciones generales de higiene y saneamiento ambiental. Es importante señalar que algunas parasitosis transmitidas por el suelo y por fecalismo (*i.e.*, ascariosis, uncinariasis, trichuriasis, entamoebosis, giardiosis) no sólo se presentan en climas cálidos, sino también en zonas templadas y aún en frías. Los parásitos intestinales son los agentes infecciosos más comunes en los humanos. Éstos se encuentran ampliamente diseminados alrededor del mundo, se estima que 450 de los 3500 millones de habitantes padecen alguna enfermedad parasitaria. La población infantil es la más afectada y estas enfermedades comprometen su desarrollo físico e intelectual (García y col 2004). La giardiosis e hymenolepiosis están entre las principales infecciones parasitarias. La giardiosis afecta a casi el 2% de los adultos y el 8% de los niños de países desarrollados de todo el mundo. Por otro lado, se estima que aproximadamente el 33% de las personas en los países en desarrollo han tenido giardiosis o hymenolepiosis (CDC 2012). En México la frecuencia de estas enfermedades se estima en aproximadamente 146,922 casos de acuerdo a reportes de la Secretaria de Salud (Epidemiología SS 2016). En un estudio en población abierta de algunas zonas rurales de Sinaloa, se encontró que G.

duodenalis e *H. nana* están entre los parásitos más prevalentes, registrándose hymenolepiosis en el 25% de la población infantil estudiada (Quihui-Cota y col 2004).

1 Giardiosis

La giardiosis se adquiere por ingestión de agua o alimentos contaminados con quistes de *Giardia duodenalis*. En el mundo, esta parasitosis es una de las causas más importantes de enfermedad diarreica aguda, especialmente en niños y turistas. *G. duodenalis*, también conocido como *G. intestinalis* o *G. lamblia*, fue el primer protozoo humano registrado, al ser observado en 1681 por el holandés Antonie Van Leeuwenhoek en sus propias heces diarreicas (Cox 2002).

a Epidemiología

La giardiosis se presenta en todo el mundo, pero principalmente en países de climas cálidos y secos ubicados en Asia, África y América Latina, lugares que presentan aproximadamente 280 millones de personas con síntomas y donde se registran cada año cerca de 500,000 nuevos casos (WHO 2013).

En Sinaloa, la Secretaria de Salud registró una morbilidad de 1394 casos de giardiosis (SSA 2013). También estudios epidemiológicos llevados a cabo en comunidades rurales de Sinaloa evidenciaron que *G. duodenalis* e *H. nana* fueron los parásitos con mayor prevalencia (ambos 25%) (Quihui-Cota y col 2004).

b Morfología y ciclo biológico

Giardia duodenalis es un protozoo generalmente no invasivo, microaerófilo, reside en la superficie de las primeras porciones del intestino delgado, donde existe un pH ligeramente alcalino que favorece su desarrollo, y se multiplica por división binaria. Sin embargo, es pertinente mencionar que existe evidencia genética y epidemiológica que muestra su capacidad de recombinación sexual (Monis y col 2009).

El ciclo de vida de *G. duodenalis* tiene dos estadios: el trofozoíto que es la forma trófica o vegetativa que produce las manifestaciones clínicas y el quiste que es la estructura de resistencia en el ambiente y de transmisión (**Figura 1**). Los **trofozoítos**, miden 10-12 μm de longitud, son piriformes, con superficie dorsal convexa y ventral cóncava (**Figura 2**). La estructura interna del trofozoíto muestra dos núcleos con endosoma, cuerpos medianos en número variable, disco adhesivo ventral con estructura cóncava, rígida, en espiral, de $\sim 9 \mu\text{m}$ de diámetro, compuesto por microtúbulos y proteínas asociadas, y ubicado en la mitad anterior ventral, además muestra capacidad contráctil. Los trofozoítos presentan un paquete de axonemas con cuerpos basales en posición anterior con respecto a los núcleos, del cual derivan 4 pares de flagelos (par anterior, dos pares laterales y par posterior) con el típico arreglo de microtúbulos 9+2. El trofozoíto carece de mitocondrias y peroxisomas, presenta mitosomas minúsculos ($< 2 \mu\text{m}$) y nucléolos. El retículo endoplásmico rugoso y Golgi son aparentes durante la secreción de componentes requeridos para el enquistamiento de *G. duodenalis* (Uribarren 2014).

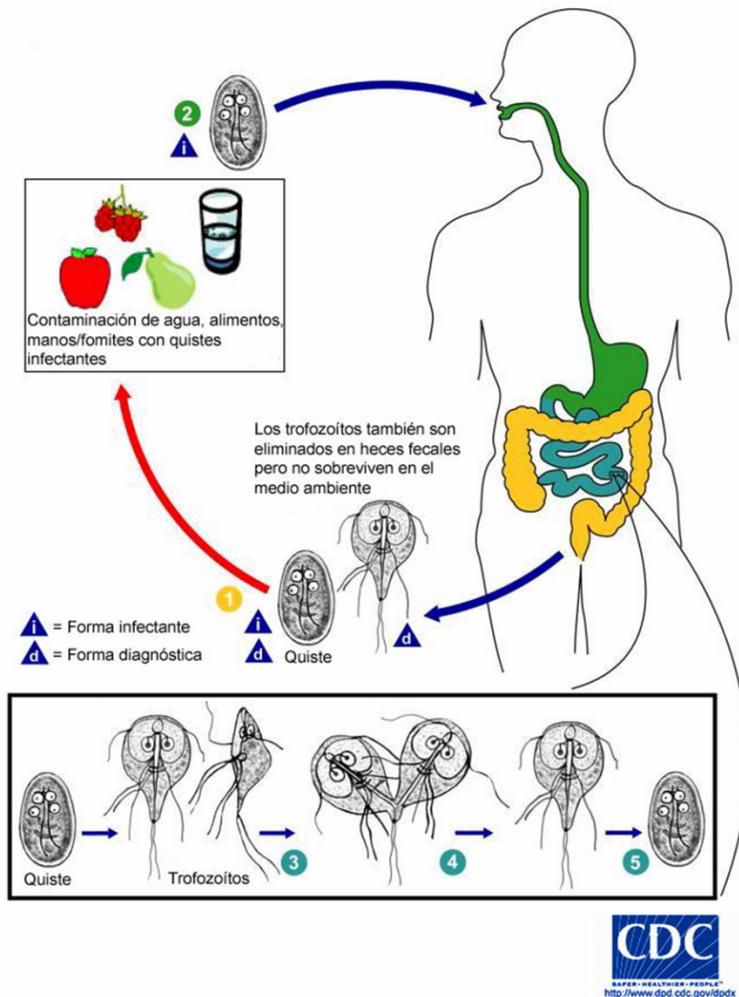


Figura 1. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis*.

1. Los quistes son resistentes y pueden sobrevivir varios meses en agua fría. La infección se produce por la ingestión de quistes en el agua contaminada, los alimentos, o por la vía fecal-oral.
2. En el intestino delgado, la activación del quiste libera trofozoítos (dos trofozoítos/ quiste)
3. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria longitudinal, permaneciendo en la luz del intestino delgado proximal donde pueden estar libres o unidos a la mucosa por un disco de succión ventral.
4. La excitación se produce cuando los parásitos transitan hacia el colon. El quiste es la etapa que se encuentra más comúnmente en las heces no diarreicas.
5. Debido a que los quistes son infecciosos cuando se desechan por las heces o aún un poco después, es posible la transmisión de persona a persona.

*Fuente: CDC

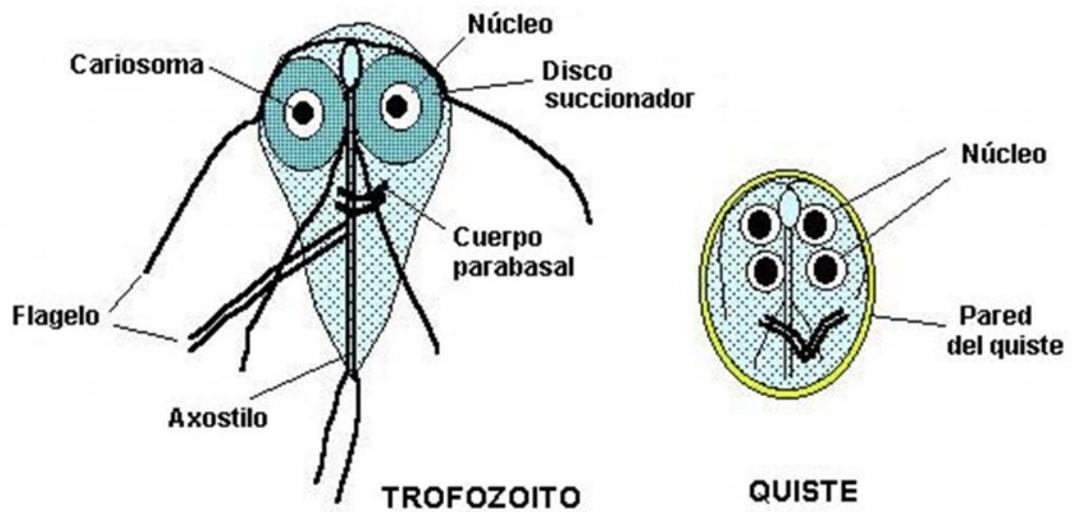


Figura 2. Estadios de desarrollo de *Giardia duodenalis* y sus principales estructuras.

*Fuente: ASM Digital Image Collection del Castillo.

Los **quistes**, formas de resistencia e **infectantes**, son ovoides, miden entre 11-14 μm de longitud y contienen 4 núcleos y estructuras residuales de la forma vegetativa (axonemas, restos de disco adhesivo y cuerpos medianos) (**Figura 2**). La resistente pared quística está formada por una capa filamentosa externa y una capa membranosa interna, su grosor es de 0.3 a 0.5 μm . Los quistes son eliminados con las heces fecales y transmitidos directamente a otro hospedero o a través de vehículos como agua y alimentos. Se estima que de 10 a 100 quistes son suficientes como dosis infectante. Después de la ingestión, la exposición al ácido gástrico induce la activación del quiste en reposo. En respuesta al pH alcalino, las proteasas del intestino y señalizaciones propias del parásito, emerge una célula que se divide 2 veces sin replicación del DNA, produciendo eventualmente cuatro trofozoítos (Uribarren 2014).

c Datos clínicos

La sintomatología clínica de pacientes con giardiosis muestra una gran variabilidad y depende fundamentalmente de la respuesta inmunitaria del individuo infectado, más que de otros factores como la virulencia de la cepa, la dosis infectante o la duración de la parasitosis. La giardiosis tiene un período de incubación de 1 a 2 semanas. Con frecuencia la infección cursa asintomática, con mala absorción intestinal imperceptible. Sin embargo, la giardiosis aguda presenta manifestaciones que incluyen diarrea acuosa o pastosa, esteatorrea (evacuaciones grasosas, generalmente explosivas y fétidas), dolor epigástrico postprandial, anorexia, distensión abdominal, y flatulencia; y ocasionalmente, cefalea, febrícula, manifestaciones alérgicas (artralgias, mialgias, urticaria). La

enfermedad aguda puede resolverse en unas semanas, aún sin tratamiento, pero un porcentaje importante de pacientes desarrolla una parasitosis crónica, con diarrea recurrente, esteatorrea, evidencia bioquímica de mala absorción de grasas, lactosa y otros disacáridos, vitamina A y vitamina B12, disminución de peso y deficiencias en el crecimiento y desarrollo infantil (Uribarren 2014).

d Tratamiento

Un gran número de medicamentos se han usado contra la giardiosis (*i.e.*, Tinidazol, Quinacrina, Furazolidona, Albendazol); sin embargo, uno de los más utilizados es el Metronidazol que provoca un gran número de efectos secundarios, tales como náuseas o vómitos, diarrea, acidez estomacal, calambres en el abdomen (área del estómago), resequedad, sensación de sabor metálico en la boca, dolor de cabeza, pérdida de apetito, y estreñimiento (Peraza-Sánchez y col 2008). Recientemente se ha registrado la resistencia de *G. duodenalis* a antiparasitarios (**Cuadro 1**) (Ansell y col 2015).

Ante el fenómeno de resistencia, diversos grupos de investigación buscan dar soporte científico al uso tradicional de plantas contra trastornos gastrointestinales, tomando como base que aproximadamente el 80% de la población mundial sustenta sus cuidados primarios de salud en el uso de plantas (WHO 2013).

Además, resulta importante mencionar que en la NOM-064-ZOO-2000 se establece que queda prohibido el empleo de metronidazol y otros fármacos en animales destinados a consumo humano.

Cuadro 1. Reportes de resistencia de tratamientos contra *Giardia duodenalis*

Tratamiento	Evidencia de fracaso del tratamiento	Referencia
	<ul style="list-style-type: none">• Falla del tratamiento en el 16% de 21 pacientes	Baqai y col (2001)
Metronidazol	<ul style="list-style-type: none">• 6% de 170 pacientes presentaron infección persistente	Lopez-Velez y col (2010)
	<ul style="list-style-type: none">• Un paciente tratado sin éxito durante 3 años con varios cursos de metronidazol y otras drogas	Wright y col (2003)

2 Hymenolepiosis

La hymenolepiosis constituye la infección por cestodos más frecuente en el ámbito mundial, particularmente en niños. El cestodo *Hymenolepis* spp. pertenece al orden de los ciclofilídeos, fue descubierto por Bilharz en 1851, y descrito inicialmente como *Taenia nana* por Von Siebold (1852). En 1906, Stiles identificó un parásito similar en roedores y lo denominó *Hymenolepis nana* var. *fraterna*. El género *Hymenolepis* incluye unas 400 especies, pero 3 de ellas han sido objeto de mayor atención: *H. nana*, *H. diminuta*, y *H. microstoma*. Los agentes etiológicos de importancia médica son *H. nana* y *H. diminuta*, pero la mayor proporción de infecciones humanas se asocian a *H. nana*. *H. nana* es el único cestodo parásito del humano que presenta un ciclo biológico que **no** requiere de hospederos intermediarios. Por lo tanto, es común que la hymenolepiosis se transmita por un mecanismo oral-fecal, la infección adquirida a través de la ingestión de artrópodos es menos común (Uribarren 2016).

a Epidemiología

Las parasitosis gastrointestinales, endémicas de los países en desarrollo, son un buen indicador de las condiciones sanitarias y ecológicas de los hospederos. A pesar de que *H. nana* es parásito cosmopolita, las infecciones se concentran en zonas de climas cálido o templado, y seco, en particular en zonas rurales y marginadas, con condiciones sanitarias deficientes (ambientales, de infraestructura y educación) (Uribarren 2016). La hymenolepiosis, con frecuencia asociada a otras parasitosis (poliparasitismo), se presenta principalmente en niños de edad preescolar y escolar, la prevalencia disminuye en personas

mayores de 15 años. De manera general, la infección en adultos es poco usual (Quihui y col 2006). También se ha mencionado que la infección suele identificarse en instituciones con medidas sanitarias deficientes, tales como guarderías. La prevalencia global de hymenolepiosis ocasionada por *H. nana* oscila entre 0.1% - 58%. Las diferencias entre los resultados de los diferentes reportes se atribuyen a variaciones en las condiciones climáticas, disparidad de factores socioeconómicos entre países desarrollados y aquéllos en desarrollo, así como a la posible falta de resultados epidemiológicos adecuados en ciertas localidades desprotegidas, lo que se traduce como la invisibilidad de ciertas parasitosis y otros problemas de salud (Mohammad y Hegazi 2007; Borjas y col 2009; Abdel-aziz y col 2010; Gamboa y col 2010).

El conocimiento que se tiene de la hymenolepiosis en México deriva en gran medida de estudios coproparasitológicos realizados en municipios seleccionados (localidades centinela), donde se evalúa el impacto de los programas de tratamiento antiparasitario masivo y de algunos estudios regionales para determinar prevalencias de parasitosis intestinales en zonas marginadas. De manera general, los trabajos sobre *Hymenolepis* spp. son escasos. Las frecuencias de infección en preescolares y escolares varía de acuerdo al área de estudio, entre ellos: 4.9% y 9% en comunidades de San Luis Potosí (Sánchez y Miramontes 2011), 22.7% en niños de Ixtlahuaca, Estado de México (Martínez-Barbabosa y col 2010), 10% en niños de Coacalco, Estado de México (Díaz y col 2003), 15.4 % y 9.6% en comunidades de indígenas y mestizos en la sierra de Nayarit (Guevara y col 2003), 5.3% en zonas urbanas de Colima (Dávila-

Gutiérrez y col 2001), 1.5% en la región fronteriza de Chiapas (Morales-Espinoza y col 2003), 25% y 23% en niños de 12 comunidades de Sinaloa y Oaxaca, respectivamente (Quihui y col 2006). Estos estudios ponen en evidencia las deficiencias en las condiciones sanitarias y de educación como factores de riesgo en la adquisición de hymenolepiosis, así como su coexistencia frecuente con otros patógenos y comensales cuyo mecanismo principal de transmisión es el oral-fecal, entre ellos *G. duodenalis*, *Entamoeba histolytica*/ *E. dispar*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, y *Ascaris lumbricoides*.

b Morfología y ciclo biológico de *H. nana*

Hymenolepis nana mide de 2 a 4 cm y sus partes principales son escólex, cuello, y estróbilo (**Figura 3**) (**Cuadro 2**). El escólex cuenta con 4 ventosas y un rostelo retráctil armado de una hilera de 20 a 30 ganchos. El número de proglótidos del estróbilo varía entre 150 y 200. Los proglótidos grávidos se localizan al final del estróbilo y están repletos de huevos (**Figura 4**); éstos habitualmente se desprenden y desintegran en la luz del intestino delgado, de manera que los huevos se eliminan con la materia fecal y también pueden ser causa de autoinfección interna. Los huevos miden 35-45 µm, son ovales, y cuentan una membrana externa y un embrióforo delgado en contacto con la oncosfera (embrión hexacanto); esta membrana interna presenta dos engrosamientos polares de los que se desprenden de 4 a 8 filamentos polares. El embrión hexacanto tiene 6 ganchos. El huevo es infectante al momento de su liberación (Schantz y col 1996).

Cuadro 2. Características generales de *Hymenolepis nana*.

Especie	<i>Hymenolepis nana</i>
Tamaño adulto	2 - 4 cm de longitud
Escólex	0.3 mm de longitud Rostelo armado con 20 – 30 ganchos
Número de proglótidos	100 – 200
Huevos	Oval 30 – 47 μ m Embrión hexacanto Embrióforo con protuberancias polares 4 – 8 filamentos polares 100 – 200

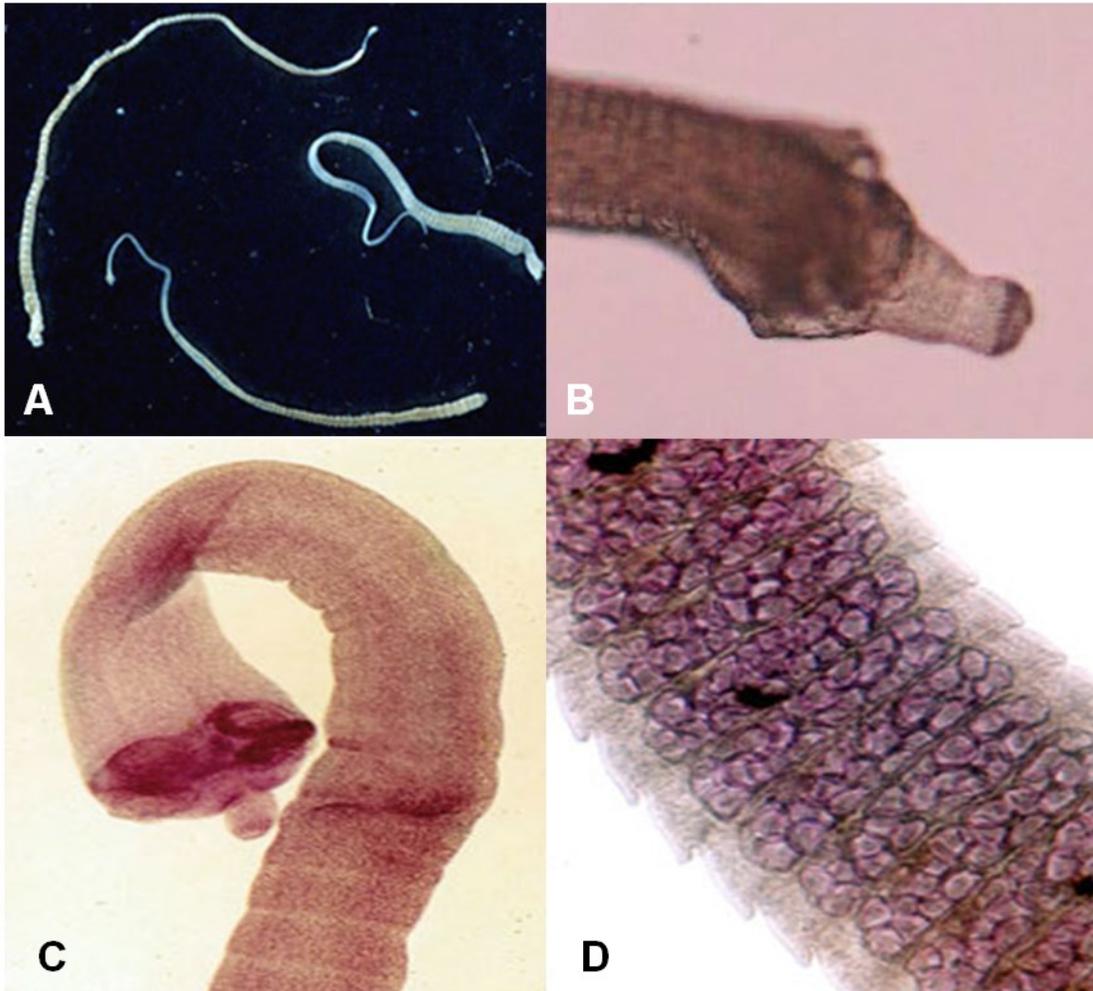


Figura 3. Imágenes de microscopía de luz de *Hymenolepis nana*: (A) Parásitos adultos; (B) escólex con rostelo apical; (C) escólex y segmento anterior del estróbilo, se aprecian ventosas y el rostelo; y (D) proglótidos grávidos del escólex.

Fuente: Dr. Jorge Tay Z., Fac. de Medicina, UNAM.

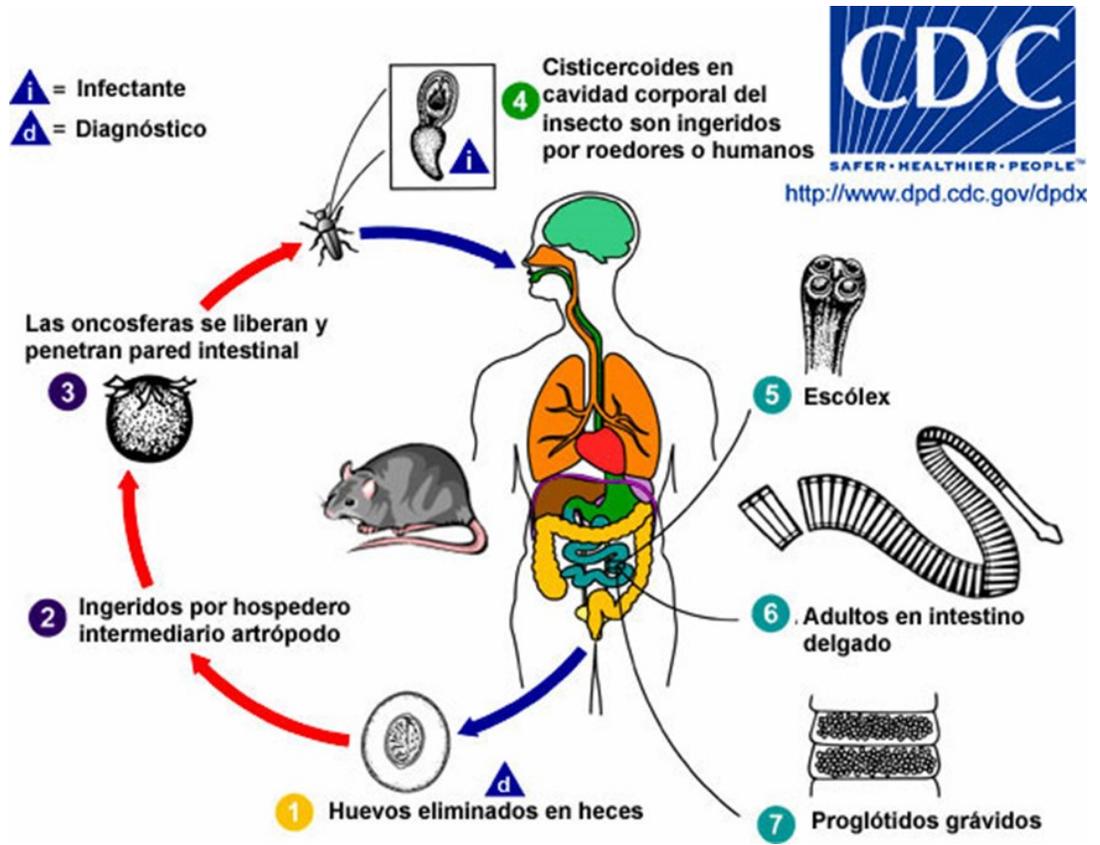


Figura 4. Ciclo de vida de *Hymenolepis nana*.

Hymenolepis nana es un parásito monoxeno, es decir que para completar su ciclo de vida sólo es indispensable un hospedero. Su hábitat abarca desde el duodeno hasta el segmento ileal del intestino delgado y puede llevar a cabo un ciclo de vida directo o indirecto. En el ciclo de vida directo, el más frecuente, el humano adquiere la infección al ingerir huevos del cestodo en alimentos o bebidas contaminadas con materia fecal. Las oncosferas se liberan de los huevos y penetran la lámina propia de las vellosidades intestinales, donde se desarrollan las larvas cisticercoides, las cuales regresan a la luz intestinal transcurridos de 5 a 6 días y se fijan a la mucosa mediante el escólex. El cestodo alcanza la fase de adulto en 3 semanas, con una vida promedio de 4 a 6 semanas. Los proglótidos grávidos se desintegran en el intestino y liberan huevos infectantes, lo que puede dar lugar a lo que se denomina autoinfección interna, con desarrollo de cisticercoides y nuevos parásitos adultos, y a infecciones que persisten durante años en sujetos susceptibles (Schantz y col 1996).

Los huevos eliminados en la materia fecal sobreviven hasta 10 días en el medio ambiente. Ocasionalmente, el humano adquiere la infección de manera indirecta (ciclo indirecto) a través de la ingesta de artrópodos tales como pulgas (*Xenopsylla cheopis*, *Ctenocephalides canis*, *Pulex irritans*) y escarabajos, también llamados “gorgojos” (*Tenebrio* spp. y *Tribolium* spp.), que adquieren la infección y desarrollan cisticercoides en el hemocele al deambular en materia fecal contaminada con huevos del parásito. Los artrópodos pueden encontrarse en granos, cereales, harinas, especias, chocolates, frutas secas, comidas de mascotas - semillas para pájaros, comida para peces, perros y gatos, que se

convierten en fuente de infección para el humano. Los roedores también pueden infectarse de esta manera (Rossomando y col 2008).

c Datos clínicos

La hymenolepiosis es fundamentalmente un problema pediátrico y se presenta principalmente en edades de los tres a los nueve años. Diversos autores han registrado que la aparición de síntomas exige una carga parasitaria considerable o masiva, lo cual se correlaciona con datos de laboratorio mediante estudios coproparasitoscópicos cuantitativos que muestren aproximadamente 15,000 huevos por gramo de heces (Uribarren 2016).

Los signos y síntomas dependen de la intensidad y duración de la infección y no son específicos; en los casos de poliparasitismo es posible que los síntomas se deban a otros patógenos. La sintomatología más frecuente de la hymenolepiosis incluye dolor abdominal, meteorismo y flatulencia, diarrea periódica, prurito anal, hiporexia y cefalea. También se refiere prurito nasal, bruxismo e irritabilidad; y de manera esporádica, urticaria y artromialgias. Niños con cargas parasitarias elevadas e infecciones crónicas presentan bajo peso y retraso en el crecimiento pondoestatural; en casos excepcionales se han registrado convulsiones y enteritis severa, pero es necesario considerar otras patologías concomitantes (Schantz y col 1996; Di Lernia y col 2004; Chero y col 2007; Rossomando y col 2008).

d Tratamiento

El fármaco de elección es praziquantel, que afecta parásitos adultos y cisticercoides, y se administra en dosis única de 25 mg/kg. Los efectos secundarios más frecuentes son cefalea, somnolencia, mareo, náusea, vómito, dolor abdominal, heces blandas, prurito, urticaria, artralgia, mialgia, febrícula, (Ortiz y col 2002; Van Den Enden 2009; Kappagoda y col 2011). En México, las instituciones públicas de salud recetan albendazol, el cual resulta inefectivo.

B BIODIVERSIDAD DEL ESTADO DE SINALOA

En Sinaloa, los trabajos para caracterizar su riqueza vegetal han sido insuficientes, algunos de los más relevantes incluyen los de Riley (1923, 1924), González O. (1927, 1929), Quintanar (1938), Gentry (1940, 1946, 1948) y Sánchez (1961). En fechas más recientes se han realizado trabajos sistemáticos encaminados a inventariar la diversidad vegetal del estado de Sinaloa. Entre los que se pueden mencionar el recuento de la flora de Sinaloa (Vega y col 1989), la flora de la isla Venados (Flores y col 1996), y el endemismo regional presente en la flora del municipio de Culiacán (Vega Aviña y col 2000). El recuento más reciente de la flora de México indica la presencia en Sinaloa de 3736 especies de plantas vasculares, distribuidas en 1118 géneros y 200 familias (Villaseñor 2016).

1 Plantas como fuentes de componentes con actividad antiparasitaria

Las plantas producen metabolitos secundarios, compuestos del metabolismo no esenciales para su sobrevivencia. Sin embargo, estos metabolitos les

proporcionan a las plantas ventajas competitivas sobre otras especies, proporcionan mecanismos defensivos, y facilitan los procesos reproductivos.

Otros organismos que producen metabolitos secundarios son bacterias, hongos, y organismos marinos (*i.e.*, esponjas, tunicados, corales y caracoles) (Vaishnav y Demain 2011). Históricamente, 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 que han demostrado tener actividad como agentes antibacterianos o antifúngicos, fármacos contra el cáncer, agentes para reducir el colesterol, inmunosupresores, herbicidas y agentes antiparasitarios; los cuales pueden actuar por mecanismos de acción diferentes a los de los fármacos tradicionales (Chin y col 2006; Ghorbani y col 2006).

En México, la Secretaría de Salud ha mostrado que aproximadamente el 90% de la población usa plantas para atender sus problemas de salud; de este 90%, la mitad usa exclusivamente a plantas medicinales, mientras que el otro 50% lo combina con medicina alópata (Muñetón 2009). El conocimiento de la medicina tradicional constituye una valiosa fuente de información para realizar estudios fitoquímicos y farmacológicos. El estudio y la práctica de la medicina tradicional contribuyen a la 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. Algunos trabajos en los cuales se demuestran y caracterizan los compuestos asociados a su actividad antiparasitaria se resumen en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Estudios de plantas utilizadas por su actividad antiparasitaria

Planta	Parte usada	Uso tradicional	Actividad biológica	Compuestos asociados	Referencia
Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	Raíz	Saborizante, antiemético, mejorar digestión	Propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, antidiarreicas, antibacterianas, antivirales y antifúngicas	Alcaloides, saponinas, taninos, glucósidos y flavonoides	Dyab y col (2016)
Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>)	Raíz	Saborizante, mejorar digestión	Propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales y antimicrobianas.	Curcumina	Dyab y col (2016)
Goma arábica (<i>Acacia nilotica</i>)	Corteza	Decocción de la corteza utilizada como ducha, astringente en gonorrea, cistitis, vaginitis, leucorrea, prolapso del útero y pilas.	Hemorragias, resfriado, diarrea, tuberculosis, lepra, resfriados, bronquitis, diarrea, hemorragias y leucoderma	Esteroides, alcaloides, taninos, azúcares reductores, terpenoides, saponinas, glicosidos, ácido gálico, Ácido pirocatecol, (+) -catequina, (-) 5-epigallocatequina ,7-digalato	Kabbashi y col (2016)
Canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	Corteza	Decocción como antiparasitario natural, y para mejorar digestión.	Actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antiinflamatorias	Terpenoides, flavonoides y compuestos polifenólicos	Mahmoud (2014)
Sauquillo (<i>Sambucus ebulus</i>)	Hojas, frutas y rizomas	Casos inflamatorios como picaduras de abejas, hormigas y artritis	Antiprotozoario, antibacteriano, repelente de insectos, anti-hemorroides	-	Rahimi-Esboei y col (2013)
Menta piperita (<i>Mentha x piperita</i> Lin.)	Hojas	Náuseas, flatulencia, vómitos, indigestión, calambres estomacales, menstruación calambres y parasitosis	Actividades carminativas, estimulantes, antiespasmódicas, antisépticas, antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas	1,8-cineol, limoneno, linalol y mentol	Vidal y col (2007)
Calabaza (<i>Cucurbita maxima</i> D y <i>Cucurbita pepo</i> L)	Semillas	Parásitos intestinales	Tratamiento de los signos clínicos asociados a giardiasis	Metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas, taninos y Cucurbitacinas	Elhadi y col (2013)
<i>Adhatoda vasica</i> (Malabar, originaria de Asia)	Hojas	Infecciones de gusanos intestinales	Actividad hepatoprotectora	Alcaloides: vasicina y vasicinona	Yadav y Tangpu (2008)
Árbol de las pasas (<i>Hovenia dulcis</i> Thunb)	Hojas	Problemas intestinales y como un diurético	Acción hepatoprotectora	Flavonoides	Gadelha y col (2005)
Cilantro (<i>Coriandrum sativum</i>)	Semillas	Enfermedad parasitaria, indigestión, diabetes, reumatismo y dolor en las articulaciones	Antidiabética, antihiperlipidémica, antioxidante e hipotensora	Quercetín-3-glucurónido, linalol, alcanfor, acetato de geraniol, geraniol y cumarinas	Hosseinzadeh y col (2016)
Mazorquilla (<i>Cassia alata</i>)	Hojas	Laxante	Antiinflamatorias, enfermedades cutáneas y respiratorias	Antraquinonas y polifenoles	Kundu y col (2012)

a *Pithecellobium dulce*

Pithecellobium dulce (Roxb.) Benth, comúnmente conocido como guamúchil, es una planta utilizada como fuente de alimento y medicamento, entre otros usos. El guamúchil es un árbol nativo de México y de amplia distribución en las zonas tropicales del país, se desarrolla en altitudes de 0 a 1500 m.s.n.m. Algunas regiones donde es posible encontrarlo son Tamaulipas, San Luis Potosí, Hidalgo, Querétaro, norte de Veracruz, y en la parte más seca de la península de Yucatán; en el Pacífico, desde Baja California y Sonora hasta Chiapas, incluyendo la cuenca del río Balsas (CONABIO 2009).

1) Descripción botánica

La clasificación taxonómica de *P. dulce* se muestra en el **Cuadro 4**, el árbol tiene una altura de hasta 20 m y un diámetro a la altura del pecho de 80 cm hasta 1 m, sus ramas están provistas de espinas. Tiene una copa piramidal o alargada, ancha y extendida, muy frondosa, Las hojas se presentan en espiral, aglomeradas, bipinnadas de 2 a 7 cm de largo, con un par de folíolos secundarios sésiles y con un haz de color verde pálido mate. El fruto es una legumbre péndula de hasta 16 cm de largo de color verde rojizo a rosado enroscada, contraída entre las semillas, las cuales son dehiscentes y con numerosas semillas de color negro envueltas por un arilo carnoso (Martínez 1994; CONABIO 2009).

Cuadro 4. Clasificación taxonómica del Guamúchil

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Mimosoideae
Género	<i>Pithecellobium</i>
Especie	<i>Pithecellobium dulce</i>

Fuente: CONABIO 2009

2) Usos etnobotánicos de *Pithecellobium dulce*

El guamúchil es un árbol ampliamente utilizado por sus propiedades antidiarreicas y antihelmínticas, principalmente infusiones de la corteza del árbol. Es común usar el guamúchil en combinación con otras plantas para potenciar su efecto, por ejemplo, con las cortezas de guayaba (*Psidium guajava*), guaje (*Leucaena esculenta*), la raíz de granado (*Punica granatum*) o manrubbio (*Waltheria americana*), y se toma la infusión por tres días. La corteza de guamúchil también suele mezclarse con el hueso de aguacate (*Persea americana*), la corteza de cuayotomate (*Vitex mollis*), y el pericarpio de granada (*Punica granatum*) para preparar un té, al cual se le agrega una pizca de ceniza para tomarse como agua de uso hasta que desaparezca el malestar. Para la disentería común y la que presenta moco se combinan las cortezas de guamúchil, nanche (*Byrsonima crassifolia*) y guayaba (*Psidium guajava*) y se ingieren en forma de té. Para combatir las lombrices y amibas es suficiente comer el fruto de guamúchil en ayunas por siete días o más si es necesario (Rzedowski y Rzedowski 1985a).

3) Estudios científicos sobre *Pithecellobium dulce*.

Diferentes actividades biológicas se han asociado a *Pithecellobium dulce*: actividad antiinflamatoria asociada a las saponinas triterpénicas aisladas de semillas y a extractos etanólicos de partes aéreas, así como actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (Osuna Torres y col 2005).

De la corteza del guamúchil se han aislado y caracterizado algunos flavonoides oligoméricos (Nigam y col 1997) y en la semilla se han encontrado esteroides, ácidos

grasos y glicolípidos. Los lípidos más representativos son el β -sitosterol, ácidos palmítico, oleico y linoléico; y el azúcar predominante en los glicolípidos es la galactosa. Por otro lado, a partir de extractos metanólicos de semillas desgrasadas se han caracterizado varias saponinas entre ellas la dulcina y otras conocidas genéricamente como pithedulósidos (Kulkarni y col 1991; Sahu y Mahato 1994). De distintas partes del árbol se han aislado los esteroides 22-estigmas-tadien-3-ol- β -D-glucopitanósido, campesterol, estigmasterol, sitosterol, daucosterol; saponinas; así como alcaloides y taninos. En las semillas se encuentran saponinas o monodesmósidos, 7 pithedulósidos A-G. En el aceite esencial de las semillas se ha encontrado la β -amirina (triterpeno) y el β -sitosterol (esterol). En el duramen, los flavonoides campferol, quercetina y sus derivados glucosídicos; y el esteroide espinasterol. En hojas se han identificado los flavonoides afzelina, ramnósido de campferol, quercitrina, campferol, quercetina; y el esteroide espinasterol; y en la raíz, los esteroides campesterol, estigmasterol, sitosterol, y daucosterol (Rzedowski y Rzedowski 1985b; Argüeta 1994; Sahu y Mahato 1994; Osuna Torres y col 2005). En adición, el **Cuadro 5** muestra otros estudios que han demostrado diversas actividades biológicas de las distintas partes de *Pithecellobium dulce* y han caracterizado algunos de los compuestos asociados.

Cuadro 5. Usos y Actividades de *Pithecellobium dulce*

Parte usada	Uso tradicional	Actividad biológica	Metabolitos o compuesto relacionado	Referencia
Hojas	Astringentes, emolientes, abortificantes, antidiabéticas, dolor y úlceras venéreas	Antioxidantes	Compuestos fenólicos	Sugumaran y col (2008)
Semillas	Polvo de semillas se da por vía oral en ayunas para curar la diabetes	Antifúngica Antiulcerosa	Lisozima Esteroides, saponinas, lípidos, fosfolípidos, glucósidos, glicolípidos y polisacáridos	Manikandan y col (2006) Nagmoti y Juvekar (2013)
Fruto	Suplemento dietético por su alto valor nutritivo y medicinal	Antidiabético, antihelmíntico	Fenólicos y flavonoides: quercitrina, rutina, kaempferol, naringina y diadzeína	Megala y Geetha (2012)
Corteza y raíces	Astringente en disentería, febrífugo y también es útil en dermatitis e inflamación ocular	Estrogénica antidiabético y antiinflamatorio	Catecol, cumarinas y triterpenoides.	Katekhaye y Laddha (2015)

a *Zizyphus sonorensis* S. Wats

Zizyphus sonorensis S. Wats, su clasificación taxonómica se muestra en el **Cuadro 6**, es un árbol que puede alcanzar hasta 12 m de altura, se conoce como nanchi de la costa en la región del noroeste de México; y en otras regiones como amolillo, jabón, limoncillo (Michoacán); amolli (náhuatl); corongoro (purépecha) (Michoacán y Guerrero).

En la literatura, esta planta ha sido identificada como *Rhamnus amole* Sess & Moc. (*Zizyphus amole*), *Zizyphus sonorensis* S. Watson, *Zizyphus seleri* Loes, y *Zizyphus endlichii* Loes (González J 2009). El nanchi de la costa se ha utilizado como forraje y por tradición, la infusión de la corteza del tallo se ha utilizado como un agente antiparasitario (Shreve & Wiggins 1964; Martínez 1994). Tradicionalmente la corteza del *Zizyphus sonorensis* se utiliza con fines medicinales. El cocimiento de un trozo de corteza se usa para lavar heridas y llagas externas de personas y animales. La raspadura de la corteza bien pulverizada se aplica en forma de cataplasma para secar y cicatrizar las heridas y/o llagas externas (González J 2009). Por otra parte, el cocimiento de la corteza de este árbol, junto con la del cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) se emplea para aliviar las úlceras gástricas (Ruiz-Terán y col 2008). La infusión de la corteza y ramas se utiliza para tratar la diabetes. El cocimiento de la corteza junto con otras plantas (no mencionadas) se aplica en forma de baños con el objeto de mejorar la circulación y la digestión (González J. 2009). El fruto de nanchi de la costa, de consumirse, es una buena fuente de fibra total dietaria

Cuadro 6. Clasificación taxonómica de nanchi de la costa

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rhamnales
Familia	Rhamnaceae
Género	<i>Zizyphus</i>
Especie	<i>Zizyphus sonorensis</i>

Fuente: González J. 2009

(18.55 g /100 g b.h.) y minerales como calcio (215 mg/100 g b.s.), cobalto (1.7 mg/100 g b.s.), cobre (0.53 mg/100 g b.s.), cromo (0.9 mg/100 g b.s.), hierro (10 mg/100 g b.s.), potasio (870 mg/100 g b.s.), sodio (400 mg/100 g b.s.), níquel (8.6 mg/100 g b.s.) y zinc (4.2 mg/100 g b.s.). La inclusión de *Z. sonorensis* en la dieta podría contribuir a la nutrición y salud (Montiel-Herrera y col 2005).

Los conocimientos científicos sobre *Z. sonorensis* son escasos, durante la revisión de literatura realizada para esta investigación no se encontraron estudios que demuestren que metabolitos secundarios se asocian y validan las actividades biológicas relacionadas con sus usos tradicionales.

1) Usos etnobotánicos y estudios científicos de *Zizyphus* spp.

Algunas especies del género *Zizyphus* (Rhamnaceae) (**Cuadro 7**) se utilizan en la medicina popular para el tratamiento de trastornos digestivos, debilidad, problemas del hígado, obesidad, problemas urinarios, diabetes, infecciones de la piel, fiebre, diarrea e insomnio. De las diferentes especies del género *Zizyphus* se han aislado e identificado glucósidos de péptidos y ciclopéptido alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos, ácido betulínico, y saponinas triterpenoidales (Adzu y col 2001).

a) *Zizyphus mauritiana*

Tradicionalmente, las frutas de *Zizyphus mauritiana* se han utilizado para tratar pequeñas heridas, fiebre, úlceras, purificación de la sangre, náuseas, vómitos, indigestión, disentería, trastorno de estómago y dolencias pulmonares (Adzu y col 2001). En diferentes localidades de Bangladesh, la corteza se utiliza

Cuadro 7. Usos tradicionales y actividades biológicas de *Ziziphus* spp.

Planta	Parte usada	Uso tradicional	Actividad biológica	Referencia
<i>Z. mauritiana</i>	Fruto	Pequeñas heridas, fiebre, úlceras, purificación de la sangre, náuseas, vómitos, indigestión, disentería, trastorno de estómago y dolencias pulmonares	Actividad antioxidante, funciona como analgésico, presenta también actividad citotóxica y antidiarreica	Adzu y col (2001).
<i>Z. jujuba</i>	Semilla y corteza	Sedante	Actividad antiglicémica	Cheng y col (2000).
<i>Z. nummularia</i>	Corteza	Dolor de estómago	Actividad antibacteriana y analgésica	Shah y col (1990) Bachaya y col (2009)
<i>Z. lotus</i>	Raíz, corteza, hoja y fruto	Irritaciones de garganta, broncopulmonares y por sus propiedades antidiabéticas.	Actividad anti-inflamatoria y analgésica	Chouaibi y col (2012).
<i>Z. spina-christi</i>	Corteza	Dolor de estómago	Efectos antidiarreicos	Adzu y col (2003).

tradicionalmente para diferentes dolencias, por ejemplo, como astringente y remedio para la diarrea, heridas y úlceras (Gani 2003; Yusuf y col 1994). El extracto etanólico de corteza de *Z. mauritiana* se ha encontrado que posee actividad antioxidante, funciona como analgésico, presenta también actividad citotóxica y antidiarreica; un estudio fitoquímico mostró la presencia de alcaloides, taninos, azúcares reductores, esteroides, flavonoides y gomas que se asocian a las actividades biológicas (Rahman 2011).

b) *Zizyphus jujuba*

Zizyphus jujuba es un árbol o arbusto mediterráneo utilizado como un antidiabético. En la corteza de la raíz se han identificado alcaloides ciclopéptidos, flavonoides y saponinas; en particular, saponinas acetiladas han sido reportadas como agentes antiglicémicos muy activos (Maciuk y col 2004).

Las semillas de *Zizyphus jujuba* de Mill var. *Spinosa* (Bunge) se utilizan como un medicamento sedante en China. En el extracto de EtOH acuoso al 95% de las semillas se caracterizaron ocho flavonoides: puerarina, 6'''-feruloilespinosina, apigenina-6-C-β-D-glucopiranosido (5,7,4'-trihidroxi-flavona-6-C-β-D-glucopiranosido), espinosina, 6'''-feruloilisoepinosina, isoepinosina, isovitexin-2''-O-β-D-glucopiranosido (5, 7, 4'-trihidroxi-flavona-6-C-β-D-glucopiranosil-(1-2)-C-β-D -glucopiranosido) (Cheng y col 2000).

c) *Zizyphus nummularia*

Zizyphus nummularia es muy importante en el sistema etnomedicinal de algunos países del medio oriente, su corteza tiene actividad antibacteriana y analgésica (Shah y col 1990).

Diferentes extractos de plantas han demostrado anteriormente que pueden afectar a la biología de los huevos de parásitos. Al contrastar la actividad del extracto de corteza de *Z. nummularia* y de Levamisol, antihelmíntico sintético, se registró que los taninos condensados de *Z. nummularia* alteran los procesos vitales (*i.e.*, alimentación y la reproducción) o pueden unirse y perturbar la integridad de la cutícula de los parásitos. Los efectos antihelmínticos de taninos pueden atribuirse a su capacidad para unir la proteína libre disponible en los tubos para la nutrición de las larvas, y por lo tanto la disponibilidad reducida de nutrientes podría llevar a la inanición de larvas o a la disminución directa del metabolismo gastrointestinal, debido a la inhibición de la fosforilación oxidativa, causando la muerte larval (Bachaya y col 2009).

d) *Zizyphus lotus*

Zizyphus lotus, conocido como “Sedra” en Túnez, se utiliza como un emoliente pectoral para tratar irritaciones de garganta, broncopulmonares y por sus propiedades antidiabéticas. La corteza de la raíz de *Z. lotus* tiene actividades anti-inflamatorias y analgésicas, sus extractos acuosos y orgánicos se caracterizan por la presencia de flavonoides y taninos.

Extractos obtenidos de raíces, cortezas, hojas y frutos de *Z. lotus* presentan actividad anti-ulcerosa. Asimismo se ha demostrado que esta planta ejerce actividad anti-inflamatoria y constituye una fuente potencial de fármacos analgésicos (Chouaibi y col 2012).

e) *Zizyphus spina-christi*

Zizyphus spina-christi es un árbol con ramas espinosas y se utiliza como cobertura para formar cercos defensivos para el ganado. La fruta tiene una pulpa comestible dulce, las hojas se aplican localmente en llagas, y las raíces se utilizan para curar y prevenir enfermedades de la piel. La infusión de corteza de la raíz de la planta se utiliza tradicionalmente en el norte de Nigeria como un remedio contra el dolor de estómago y otras dolencias del tracto gastrointestinal (Adzu y col 2001).

Algunos estudios farmacológicos indican que el extracto acuoso de corteza de raíz de *Z. spina-christi* tiene una actividad antinociceptiva en ratones y ratas (Adzu y col 2001) y un efecto depresor central en ratones (Adzu y col 2002). Por otro lado, el extracto metanólico de la corteza de la raíz *Z. spina-christi* mostró efectos antidiarreicos en rata (Adzu y col 2003).

El extracto metanólico del fruto de *Z. spina-christi* presenta un gran número de flavonoides de gran diversidad estructural. Un estudio mostró la presencia de O- y C-glicósidos de flavonoides. Quercetina y kaempferol se encontraron como agliconas. También se registraron dos derivados de dihidrochalcona. Los flavonoides glicosilados contenían uno, dos, o tres restos de azúcar, entre ellos,

quercetín 3-O-robinobiósido, quercetín 3-O-rutinósido, kaempferol 3-O-rutinósido, y quercetín 3-O- β -D-xilosil (1 \rightarrow 2) - α -L-ramnósido (Pawlowska y col 2009).

Preparados de hojas de *Z. spina-christi* disminuyen el nivel de glucosa; este efecto está mediado por la liberación de insulina; el cual puede ser debido al bloqueo de los canales KATP⁺ en las membranas de las células beta pancreáticas. Además, sugieren que el uso de la preparación de hojas de *Z. spina-christi* como antidiabético es seguro (Abdel-Zaher y col 2005).

IV JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades parasitarias están ampliamente distribuidas en el mundo y son un problema de salud pública que afecta primordialmente a los países en desarrollo. Los medicamentos disponibles en el mercado para el tratamiento de estas parasitosis presentan baja efectividad, efectos secundarios, y ya se ha identificado el fenómeno de resistencia de los parásitos. Por ello, existe la necesidad de nuevos compuestos bioactivos y las plantas, usadas tradicionalmente para estos fines, representan una buena opción. La gran diversidad de plantas de México debe mantenerse mediante estrategias de aprovechamiento sustentable y revertir la acelerada pérdida que actualmente se registra. El guamúchil (*Pithecellobium dulce*) y nanchi de la costa (*Zizyphus sonorensis*) se han utilizado para diferentes fines medicinales y la corteza comúnmente como antiparasitario. Sin embargo, esta actividad biológica no se ha demostrado científicamente y los estudios químicos de estas plantas aún son muy escasos. Por lo anterior, en el presente trabajo se avanzará en la caracterización química de los componentes de los extractos de las cortezas de *Zizyphus sonorensis* y *Pithecellobium dulce* y de su posible asociación con la actividad antiparasitaria contra *Hymenolepis nana* y *Giardia duodenalis*.

V OBJETIVOS

A OBJETIVO GENERAL

Demostrar la actividad *in vitro* contra *Hymenolepis nana* y *Giardia duodenalis* de extractos de cortezas de nanchi de la costa (*Zizyphus sonorensis*) y guamúchil (*Pithecellobium dulce*) y su asociación con componentes químicos específicos

B OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* de extractos de la corteza nanchi de la costa y guamúchil sobre *H. nana* y *G. duodenalis*.

Identificar las fracciones de los extractos de cada planta, que presenten mayor actividad antiparasitaria.

Establecer la composición fitoquímica global de los extractos y fracciones cromatográficas con mayor actividad antiparasitaria.

Determinar la estructura de compuestos puros con actividad antiparasitaria.

Evaluar la toxicidad de extractos/fracciones con actividad antiparasitaria obtenidos de la corteza de guamúchil o nanchi de la costa.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

1 Material vegetal

Se colectaron cortezas de tallos de árboles de nanchi de la costa (*Zizyphus sonorensis* S. Watson) y guamúchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth) del valle de Sinaloa y se transportaron al Laboratorio de Química de Productos Naturales de la MCTA. Las plantas fueron identificadas y cotejadas con especímenes del herbario de la Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, por el Dr. Rito Vega Aviña.

2 Material biológico

a Trofozoítos de *Giardia duodenalis*

La cepa de *Giardia duodenalis* WB fue donada por el Departamento de Patología Experimental, del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

b Adultos de *Hymenolepis nana*

Los parásitos adultos de *H. nana* se obtuvieron a partir de ratones Balb/C de 4-6 semanas de edad, infectados experimentalmente a partir de una cepa obtenida de humano.

3 Reactivos

Se emplearon los medios de cultivo: peptona y extracto de levadura (BD Bioxon). Los siguientes reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU): N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% cloruro de trimetilsilano (TMSCI). Los disolventes fueron destilados previamente a su uso.

B MÉTODOS

1 Obtención de los extractos de las cortezas

Las cortezas de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) se secaron a temperatura ambiente, se molieron y tamizaron por una malla # 40 para obtener las harinas correspondientes. A partir de las harinas se prepararon extractos acuosos (1:50 p/v), metanólicos (1/15 p/v), y hexánicos (1/15 p/v). Una porción de harina fue desgrasada con hexano y fue utilizada para obtener extractos con agua (1:50 p/v) y metanol (1/15 p/v) (**Figura 5**). Los extractos hexánicos y metanólicos se concentraron en un rotavapor a 40 °C (BÜCHI R-125 Brinkamm Instruments, EE.UU), mientras que los acuosos fueron liofilizados (The Virtis Company, New York, EE.UU.). Los concentrados obtenidos fueron extractos de harina entera: acuosos de nanchi de la costa (EA-N) y de guamúchil (EA-G); metanólicos de nanchi de la costa (EM-N) y guamúchil (EM-G); y hexánicos de nanchi de la costa (EH-N) y de guamúchil (EH-G). Los concentrados de harina desgrasada fueron: acuosos de nanchi de la costa (EA-DN) y de guamúchil (EA-DG); y metanólicos de nanchi de la costa (EM-DN) y de guamúchil (EM-DG).

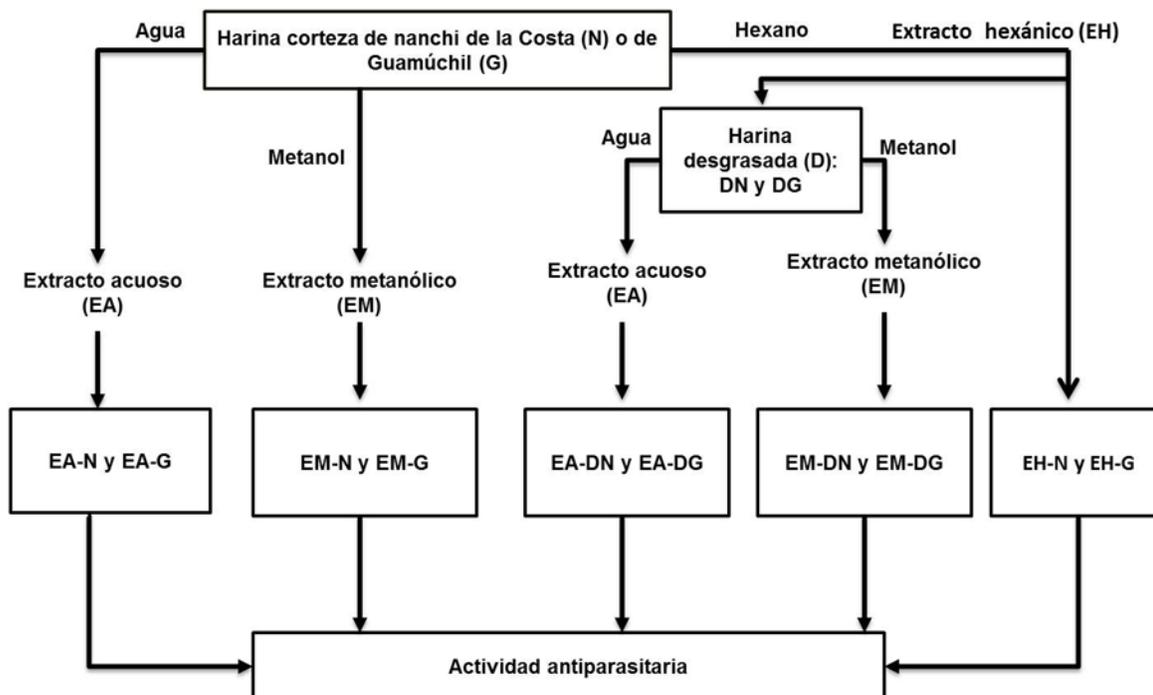


Figura 5. Esquema general de la preparación de los diferentes extractos usados en la evaluación de la actividad antiparasitaria.

2 Actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Giardia duodenalis*

Para el cultivo de trofozoítos de *Giardia duodenalis* se utilizó medio TYI-S-33 adicionado con antibiótico (0.5 % v/v) y suero fetal bovino inactivado (SFB). Los reactivos utilizados para preparar el medio (**Cuadro 8**) se disolvieron en agua tridestilada estéril, ajustando a pH 7 con NaOH 1 N y posteriormente se esterilizó el medio por filtración (Keister 1983).

a Criopreservación de la cepa de *G. duodenalis*

La cepa de *G. duodenalis* se preservó en medio TYI-S-33 suplementado con SFB al 20% (v/v) y DMSO (dimetil sulfóxido) al 10 % (v/v). Se preparó un concentrado de trofozoítos de *G. duodenalis* a partir de un cultivo de 48 h de incubación; para tal fin, los tubos con el cultivo fueron introducidos en hielo durante 40 min para desprender los parásitos de las paredes, se centrifugaron a 2500 rpm/5 min (BECKMAN, GS-6, EE.UU.), el sobrenadante fue decantado y el concentrado se resuspendió en 1 mL de medio con las características descritas anteriormente. Las muestras se colocaron en crioviales, se congelaron de inmediato con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

b Cultivo de trofozoítos de *G. duodenalis*

La cepa de *G. duodenalis*, almacenada a -80 °C, fue descongelada a 37 °C en una campana de flujo laminar. La suspensión (1 mL con *G. duodenalis* y DMSO) fue transferida del criovial a un tubo de vidrio de 15 mL con tapa de rosca, se le añadieron 9 mL de medio TYI-S-33 suplementado con SFB (15% v/v), la mezcla se agitó y centrifugó a 2500 rpm por 5 min

Cuadro 8. Reactivos utilizados en la preparación del medio TYI-S-33

Reactivo	Cantidad
NaCl	200 mg
K ₂ HPO ₄	100 mg
KH ₂ PO ₄	60 mg
Peptona tripticasa (BD BIOXON 230500)	2 g
Extracto levadura (BD DIFCO 212750)	1 g
D-(+)- Glucosa (SIGMA G5767)	1 g
Cisteína (SIGMA C7352)	200 mg
Ác. ascórbico (SIGMA A7506)	20 mg
Citrato férrico (SIGMA F5879)	2.28 mg
Bilis (SIGMA B3883)	50 mg
Antibiótico (SIGMA A5955)	500 µL
Suero fetal bovino (SIGMA S01520)	10 mL
Agua tridestilada	cbp 100 mL

(BECKMAN, GS-6, EE.UU.) para eliminar los restos de DMSO presentes. El sobrenadante se decantó, la pastilla se resuspendió en 13 mL de medio TYI-S-33 suplementado con SFB (15% v/v) y la mezcla se incubó por 24 h a 37 °C (Fischer scientific, EE. UU.). Transcurrido el tiempo, se le realizó cambio de medio, suplementado con SFB al 15% y se incubó. Después de 24 h, se tomaron 10 mL y se dividieron en dos tubos. A cada tubo se le adicionó medio nuevo suplementado con SFB (10%) para tener un volumen final de 13 mL. Los tubos fueron incubados por 48 h a 37 °C y se prosiguió a la evaluación de actividad antiparasitaria de los diferentes extractos. Se necesitaron un máximo de cuatro tubos con cultivo para cada ensayo.

c Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos

La determinación de la viabilidad de los trofozoítos de *G. duodenalis* se realizó usando el colorante azul de tripano al 4%. Una alícuota de 100 µL del cultivo perfectamente homogenizado se mezcló con 10 µL de la disolución del colorante; la mezcla se homogenizó y se colocaron 10 µL en una cámara de Neubauer para realizar la observación microscópica y los recuentos. Los criterios de viabilidad a evaluar fueron la movilidad, los cambios morfológicos y la retención del colorante por los trofozoítos. La concentración de células utilizadas fue de 1×10^6 células/mL. Una vez preparado el cultivo se procedió a la evaluación de las muestras. Los extractos fueron evaluados a 500 µg/mL, en base al criterio de clasificación de la actividad giardicida *in vitro* establecido por Amaral y col (2006), donde extractos de plantas con valores de IC_{50} mayores o iguales a 500 µg/mL son inactivos. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96

pozos donde se colocaron 200 μL de la muestra de *Giardia* (1×10^6 células) y 100 μL de los extractos (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 0.5% de DMSO) en medio TYI-S-33. Como control negativo se utilizó solvente DMSO al 0.5% en medio TYI-S-33 (sin extracto) y para el control positivo se añadió metronidazol (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h (5 % de CO_2), se centrifugaron (2500 rpm/ 5 min) (Sorvall ST8 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific, China), se le realizaron lavados con PBS 10 mM (pH 7.4) para eliminar los restos de medio TYI-S-33, los trofozoítos se resuspendieron en 200 μL de PBS, se adicionaron con 20 μL de MTT (5 mg/mL), y se incubaron nuevamente durante 4 h. Pasado este tiempo, las placas fueron centrifugadas (4200 rpm/ 15 min), se removieron 200 μL del sobrenadante y las sales de formazan formadas por las células vivas se disolvieron añadiendo 200 μL de DMSO, se agitaron y posteriormente se determinó su absorbancia a 560 nm (Multiskan Bichromatic, Fisher Scientific, EE. UU.). El porcentaje de inhibición de crecimiento se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{Abs_c - Abs_m}{Abs_c} \right) * 100$$

Donde Abs_c = Absorbancia del control y Abs_m = Absorbancia de la muestra.

3 Actividad antiparasitaria contra *Hymenolepis nana*

a Obtención de los parásitos adultos

A partir de ratones Balb/C infectados experimentalmente, se obtuvieron parásitos adultos de *H. nana* con proglótidos grávidos. De éstos se liberaron los huevos para infectar nuevamente ratones Balb/C de 4-6 semanas de edad y

contar con un número suficiente de parásitos adultos para realizar los estudios de actividad antiparasitaria de los extractos.

La infección en los ratones se verificó mediante análisis coproparasitológicos por el método de Faust (Botero y col 2003). Los ratones fueron sacrificados a los 17 días post-infección. Posteriormente, fueron disecados para recuperar el intestino delgado, del cual se recuperaron los parásitos adultos que se mantuvieron en medio Hank's (pH 7.6, 37 °C) hasta el momento del ensayo. En los ensayos de actividad antiparasitaria se evaluó la viabilidad, movilidad e integridad física de los parásitos adultos a través de microscopía de luz. En estudios previos realizados en nuestro grupo de trabajo se demostró que los adultos de *H. nana* se mantienen viables por más de 72 h en el medio de Hank's bajo las condiciones anteriormente descritas (datos no publicados). Los ensayos de actividad se realizaron dentro de la hora posterior a la obtención de los parásitos adultos.

b Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos contra *H. nana*

La actividad antiparasitaria de los extractos (50 mg/mL) contra *H. nana* se determinó como se indica en la **Figura 6**. El antiparasitario comercial utilizado como control positivo fue Praziquantel (PZQ), a 25 mg/mL y como control negativo se utilizó medio de Hank's.

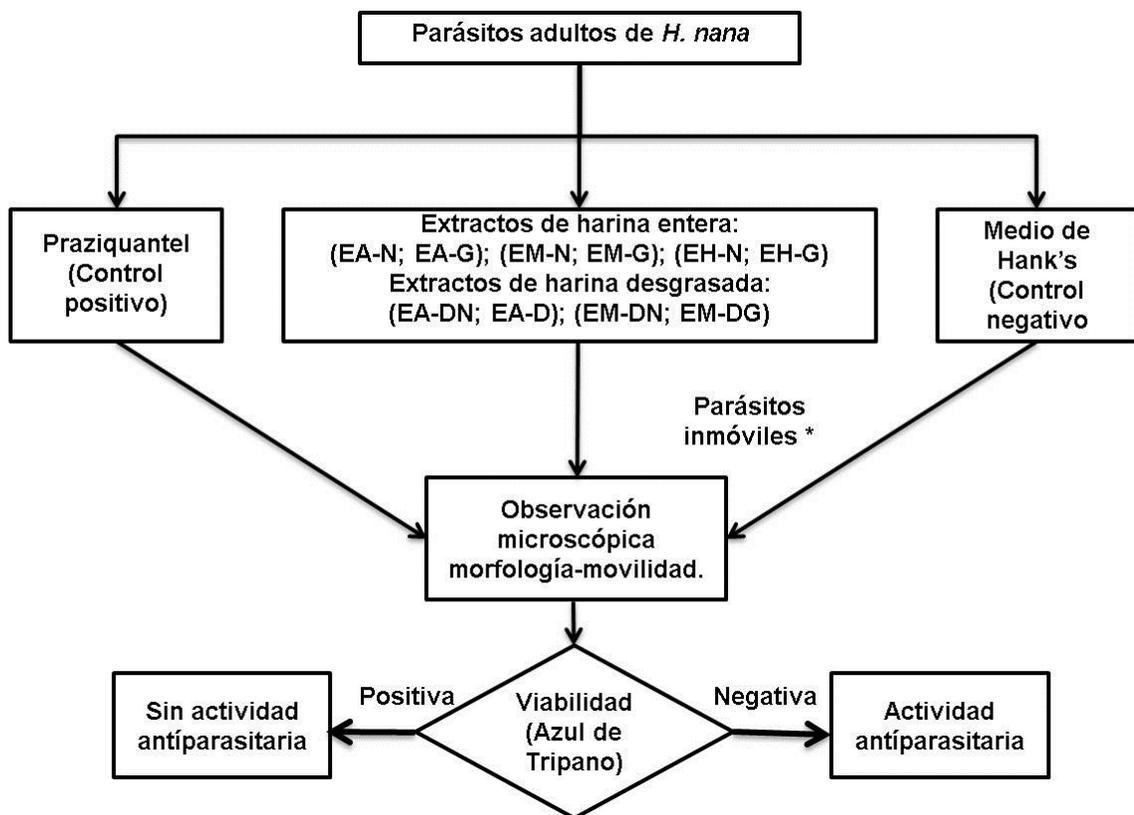


Figura 6. Estrategia general para la determinación de la actividad contra *Hymenolepis nana* de los extractos de nanchi de la costa (N) y de guamúchil (G). Los extractos con diferentes solventes fueron preparados a partir de harina entera (acuosos, EA-N y EA-G; metanólicos, EM-N y EM-G; y hexánicos, EH-N y EH-G) y desgrasada (acuosos, EA-DN y EA-DN; metanólicos, EM-DN y EM-DG).

* Ensayo de reversibilidad. Los parásitos inmóviles se transfirieron a solución salina isotónica (SSI) para determinar si recuperaron la movilidad

c Determinación de la viabilidad de los parásitos

La determinación de la viabilidad se llevó a cabo mediante el uso del colorante de exclusión azul de Evan's (Orihel y Ash 2010). En cada uno de los tratamientos a los parásitos inmovilizados se les evaluó la viabilidad, los parásitos se colocaron en una cápsula de vidrio, se le agregaron de 3 a 5 gotas de colorante, y se dejaron en reposo por 5 min para permitir la fijación. Posteriormente, los parásitos se lavaron con solución salina (NaCl 0.85%) para retirar el exceso de colorante y se observaron al estéreo-microscopio para apreciar las zonas de fijación. Una tinción positiva indica que el parásito está muerto.

4 Caracterización fitoquímica de los extractos con mayor actividad antiparasitaria

a Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos

La identificación cualitativa de los metabolitos secundarios en los extractos/fracciones de interés se realizó con pruebas en tubo de ensaye y su confirmación por cromatografía en capa fina, mediante reactivos y reveladores específicos para cada familia de compuestos, *i.e.*, alcaloides, azúcares reductores, cardiotónicos, cumarinas volátiles, derivados antracénicos libres, flavonoides, saponinas, taninos y triterpenos o esteroides (Sthal 1973; Harborne 1984; Lock 1994) (**Cuadro 9**).

Cuadro 9. Reacciones para la identificación de metabolitos secundarios.

Familia	Reactivo	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff; Mayer; Wagner	Coloración: Rojo-naranja; Blanco-crema; Marrón
Azúcares reductores	Reactivo de Tollens: NaOH, AgNO ₃ y amoníaco	Espejo color plata en las paredes del tubo
Cardiotónicos	Baljet; Kedde; Raymond-Marthoud; Keller-Killiani	Coloración: Roja, naranja-rojiza o violeta; Rosa o azul-violeta; Roja, naranja-rojiza o violeta Coloraciones intensas
Cumarinas volátiles	Baño maría de la muestra tapada con papel filtro impregnado con NaOH	En luz UV, presencia de fluorescencia amarilla
Derivados antracénicos libres	Bornträger	Coloración rojiza en la fase acuosa
Flavonoides	Fragmentos de Mg y HCl	Diversas coloraciones que varían para las diversas estructuras
Saponinas	Baño maría, enfriar y agitar vigorosamente	Formación de espumas
Taninos	Cloruro férrico	Coloración: azul, taninos hidrolizables; verde, taninos condensados
Triterpenos o esteroides	Libermann-Burchard	Coloración verde

Fuente: Lock (1994); Harborne (1984); Stahl (1973).

b Separación y análisis cromatográfico de extractos de las cortezas de nanchi de la costa y guamúchil

La separación y análisis cromatográfico fue biodirigido en relación con la actividad antiparasitaria *in vitro*. La composición de los extractos más activos se analizó hasta asociarla a compuestos químicos.

c Cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de gel sílice, en donde se colocó cada muestra con un capilar, aplicándola aproximadamente a 0.5 cm de la parte inferior. La muestra se concentró sobre la placa, repitiendo la aplicación de varias gotas sobre el origen, dejando secar entre aplicaciones. Se dejó secar la muestra, para posteriormente colocar la placa dentro de una cámara cromatográfica, la cual contenía la fase móvil para la resolución cromatográfica. Las manchas cromatográficas se detectaron por observación bajo luz visible, luz UV (onda corta y larga) y después por revelado químico (Harborne 1984). Para cada mancha se determinó el factor de retención (Rf).

5 Caracterización espectroscópica y espectrométrica de extractos con actividad antiparasitaria

a Análisis de los extractos con actividad anti-*Giardia* mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM)

1) Preparación de las muestras

Los extractos metanólicos de nanchi de la costa (EM-N y EM-DN) y hexánicos de nanchi de la costa (EH-N) y guamúchil (EH-G) se disolvieron en su respectivo

disolvente (5 mg/mL). Las muestras diluidas se filtraron a través de un filtro de jeringa (17 mm x 0.45 µm, PVDF, Titán) antes de su análisis por CG-EM.

2) Derivatización de las muestras

La derivatización se realizó de acuerdo a lo reportado por Wang y Zuo (2011). A 1 mL de los extractos disueltos (5 mg/mL) se les evaporó el solvente mediante una corriente de N₂, el residuo se resuspendió en 50 µL de piridina y 50 µL de BSTFA + 1 % TMCS, y las mezclas se calentaron a 70 °C durante 4 h en una atmósfera de nitrógeno, posteriormente las muestras se llevaron a sequedad y se resuspendieron en 1 mL de hexano para su análisis por CG-EM

3) Condiciones del análisis por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM)

El análisis se realizó a muestras sin derivatizar y derivatizadas utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (HP 6890 GC Instruments, 5973 Network, Agilent Technologies, Wilmington, EE. UU.). La separación se realizó en una columna capilar QUADREX 007 CARBOWAX 20M (30 m x 0.25 mm i.d., espesor de película 0.25 µm) usando helio como gas de arrastre a un flujo de 0.9 mL/min. Las condiciones de temperatura fueron: puerto de inyección a 250 °C; horno 60 °C por 1 min, gradiente de 5 °C/min hasta 200 °C y posteriormente de 10 °C/min hasta 275 °C, permaneciendo a 275 °C por el resto del análisis; fuente de iones 245 °C; y cuadrupolo 150 °C. Un volumen de 1 µL fue inyectado sin división de flujo. Los espectros fueron colectados en un rango de 50 a 800 u a 2 barridos/s. El espectrómetro de masas (EM) operó en modo de ionización por impacto electrónico (IE) a 70 V. La identificación de los

componentes se realizó por comparación de sus espectros de masas con los de la biblioteca NIST (NIST08.LIB); asimismo, se determinó el porcentaje relativo de área de cada componente por comparación del área del pico con las áreas totales.

b Cuantificación, purificación y caracterización de los componentes asociados en la actividad antiparasitaria contra *H. nana*

En base a los resultados obtenidos mediante la caracterización fitoquímica, sugieren que la actividad antiparasitaria *in vitro* contra *H. nana* podría estar asociada a compuestos de tipo taninos, por lo que se procedió a la cuantificación de estos mediante el método de vainillina (Price y col 1978); además de la purificación y caracterización de los mismos siguiendo la metodología utilizada por López-Angulo (2016).

El EA-DG fue seleccionado por su mayor actividad antiparasitaria. Este extracto fue sometido a un proceso de purificación en columna con Sephadex LH-20 (6 g, 10 x 2 cm I.D.) se colocó la muestra disuelta en MeOH al 50% (0.400 g/mL), se eluyó con 100 mL MeOH al 50% y 50 mL de acetona al 70%, obteniéndose las fracciones EA-DGm y EA-DGa, respectivamente. El análisis de estas fracciones se realizó en un espectrómetro de masas (Thermo Scientific, LQT XL, EE.UU.) con interfase de ionización por electroasperjado (ESI) operando en modo negativo en un rango de m/z 70 a 2000.

6 Evaluación de la toxicidad de extractos/fracciones de interés

a Evaluación de la toxicidad mediante el bioensayo con *Artemia salina*

La evaluación de toxicidad en *Artemia salina* se realizó de acuerdo a lo reportado en la literatura (Sánchez y Neira 2006). Huevos de *A. salina* fueron puestos a eclosionar en un recipiente con agua de mar artificial (sal comercial en agua destilada, 38 g/L), a temperatura ambiente (25-30°C), durante 48 h, y bajo régimen continuo de luz. Después de la incubación, los nauplios fototrópicos fueron separados de los huevos sin eclosionar y se transfirieron a medio nuevo (solución salina). Se colectaron 10 nauplios y se colocaron en tubos de ensayo utilizando una pipeta Pasteur de vidrio. Los extractos con actividad antiparasitaria se disolvieron en DMSO al 10% (40 mg/1400 µL de solución salina al 10% de DMSO). A cada tubo con nauplios se le agregaron 14 µL de la disolución del extracto a diferentes concentraciones y se aforó a un volumen final de 2 mL con solución salina para obtener concentraciones finales de 2000, 1000, 500, 250, 62.5 y 10 ppm/tubo. En el control negativo se usaron solamente 14 µL de DMSO (10% v/v). Los tubos se dejaron en incubación durante 24 h a temperatura ambiente (25 °C) y bajo luz continúa. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar el conteo de nauplios muertos. Los resultados se reportaron como porcentaje de mortalidad obtenidos mediante la siguiente fórmula:

$$\%M = (r/s)100$$

Donde %M= porcentaje de mortalidad; r = larvas muertas en el extracto y s= larvas vivas en el blanco.

7 Determinación de toxicidad por Método de Lorke

Se utilizaron ratones machos Balb/C. La determinación se dividió en dos fases (Lorke 1983). En la primera, se administró por vía oral el extracto en un intervalo de dosis de 10 a 1000 mg de extracto por kg de peso corporal (mg/kg pc). Se observaron los efectos durante 48 h y se registró el número de animales muertos. En la fase II las dosis, determinadas por el método de Lorke (1983), variaron dependiendo de la fase I y se registró el número de animales muertos a las 48 h. El valor de la dosis letal media para los extractos, se obtuvo calculando la media geométrica entre la dosis máxima administrada en la que se presentó sobrevivencia del ratón (X_1) y la dosis en la que se presentó la muerte del animal (X_2).

$$\bar{X} = \sqrt{(X_1)(X_2)}$$

8 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS plus versión 5.1 (Statiscal Graphics Corporation, EE.UU.) para analizar los datos por: estadística descriptiva; análisis de varianza de un factor (tipo de extracto) y para el contraste de medias mediante la prueba de Fisher con un nivel de significancia del 0.05. Los análisis se realizaron por triplicado. El rendimiento de extracción se registró como la media y la desviación estándar (DE). En los bioensayos contra *H. nana* se colocaron 5 parásitos por pozo y se registraron los tiempos de parálisis, de muerte y las características morfológicas. En cada bioensayo los registros se realizaron cuando todos los parásitos presentaron la característica considerada. En los bioensayos contra *Giardia duodenalis* se registró el porcentaje de inhibición de crecimiento. En la determinación del IC₅₀ utilizó el software GraphPad Prism versión 6.1 (GraphPad Prism[®] software, Inc., EE.UU.); mientras que los datos de toxicidad en *A. salina* se procesaron por un análisis Probit para obtener la CL₅₀.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A RENDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

Los rendimientos de extracción para la corteza de nanchi de la costa estuvieron en el rango de 0.5 a 17.3% y el valor más alto se obtuvo para el extracto acuoso de harina desgrasada (EA-DN) (**Cuadro 10**). Los resultados se encontraron en el rango reportado por diferentes autores en otras especies de *Zizyphus* (1.34 a 17.8 %) (Adzu y col 2001; Adzu y col 2002; Adzu y col 2003; Al-Reza y col 2009; Rahman 2011). Los rendimientos obtenidos con la corteza de guamúchil fueron de 0.7 a 27.7 % y se obtuvieron valores similares entre los extractos metanólicos (EM-G y EM-DG) y el extracto acuoso de harina desgrasada (EA-DG) (**Cuadro 10**). Para otras especies de *Pithecellobium* se han obtenido rendimientos de extracción en base seca de 1.9 a 3.45%, correspondiendo el último valor a un extracto metanólico (Khan 1997).

B ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *in vitro* CONTRA *Giardia duodenalis*

Giardia duodenalis es una importante causa de enfermedades gastrointestinales agudas y crónicas en todo el mundo; su éxito como patógeno radica en su ubicuidad y en la facilidad con que contamina el agua, de hecho, es común que se presenten brotes de enfermedades diarreicas asociados al consumo de agua contaminada (Baldursson y Karanis 2011). En la actualidad, la giardiosis se trata con fármacos convencionales de eficacia

Cuadro 10. Rendimiento de extractos metanólicos (EM), acuosos (EA), y hexánicos (EH) de harinas de corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) ¹

Planta	Extracto		% Rendimiento (b.s.) ²
Nanchi de la costa	Metanólico	EM-N	6.8 ±1.20 ^b
		EM-DN	5.6 ±1.09 ^b
	Acuoso	EA-N	6.5 ± 0.63 ^b
		EA-DN	17.3 ±1.83 ^c
	Hexánico	EH-N	0.5 ±0.16 ^a
	Guamúchil	Metanólico	EM-G
EM-DG			27.7 ±2.80 ^d
Acuoso		EA-G	25.3±1.18 ^d
		EA-DG	17.9 ±1.26 ^c
Hexánico		EH-G	0.7 ±0.10 ^a

¹ Las harinas se utilizaron sin desgrasar (N y G) y desgrasadas (DN y DG).

² Los valores son la media ± la desviación estándar de tres extracciones. Letras diferentes indican diferencia significativa (LSD = 3.047, α = 0.05). Los rendimientos son en base seca (b.s.).

limitada (quinacrina, nitroimidazoles y nitrofuranos) y que inducen efectos secundarios. Sin embargo, las grandes compañías no tienen el incentivo económico para desarrollar nuevos antiparasitarios, las parasitosis son padecimientos de la población de menores ingresos y por lo tanto de bajo poder de compra. Por lo tanto, la población afectada recurre a medicina alternativa para el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como la diarrea y la disentería, y en particular al uso de plantas (Amaral y col 2006). En este sentido, en la presente investigación hemos demostrado la actividad antiparasitaria contra *G. duodenalis* de extractos de cortezas de nanchi de la costa (*Z. sonorensis*) y guamúchil (*P. dulce*), tradicionalmente usados contra parasitosis. En la literatura existen reportes de la actividad anti-giardial de una gran variedad de productos vegetales entre ellos: jengibre (*Zingiber officinale*) y cúrcuma (*Curcuma longa*); goma arábiga (*Acacia nilotica*); canela (*Cinnamomum verum*); sauquillo (*Sambucus ebulus*); menta (*Mentha x piperita*); especies de calabaza (*Cucurbita maxima* D y *Cucurbita pepo* L) y guaje o bule (*Lagenaria siceraria*) (Dyab y col 2016; Kabbashi y col 2015; Mahmoud 2014; Rahimi-Esboei y col 2013; Elhadi y col 2013; Vidal y col 2007). Estos trabajos sustentan el efecto de diferentes extractos vegetales, fracciones o compuestos purificados, sobre la multiplicación, adhesión y, en algunos casos, sobre la morfología de los trofozoítos de *G. duodenalis*. Los ensayos de actividad anti-giardíasis de los extractos de corteza (500 µg/mL) mostraron altos valores de inhibición del crecimiento para los extractos metanólicos y hexánicos de nanchi de la costa (EM-N, EM-DN, y EH-N) (72.04-75.84%) y hexánico de guamúchil (EH-G) (53.48%) (**Cuadro 11**) (**Figura 7-10**).

Cuadro 11. Actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos de corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) contra *Giardia duodenalis*¹

Planta	Extracto (500 $\mu\text{g/mL}$)		% Inhibición de crecimiento
Nanchi de la costa	Metanólico	EM-N	72.04 \pm 2.19
		EM-DN	75.84 \pm 1.90
	Acuoso	EA-N	0
		EA-DN	0
	Hexánico	EH-N	72.16 \pm 3.78
		Metanólico	EM-G
Guamúchil	Metanólico	EM-DG	10.53 \pm 10.49
		Acuoso	EA-G
	Acuoso	EA-DG	7.11 \pm 15.88
		Hexánico	EH-G

¹ Los extractos metanólicos (EM), hexánico (EH), y acuosos (EA) se prepararon a partir de harinas de cortezas sin desgrasar (N y G) y desgrasadas (DN y DG).

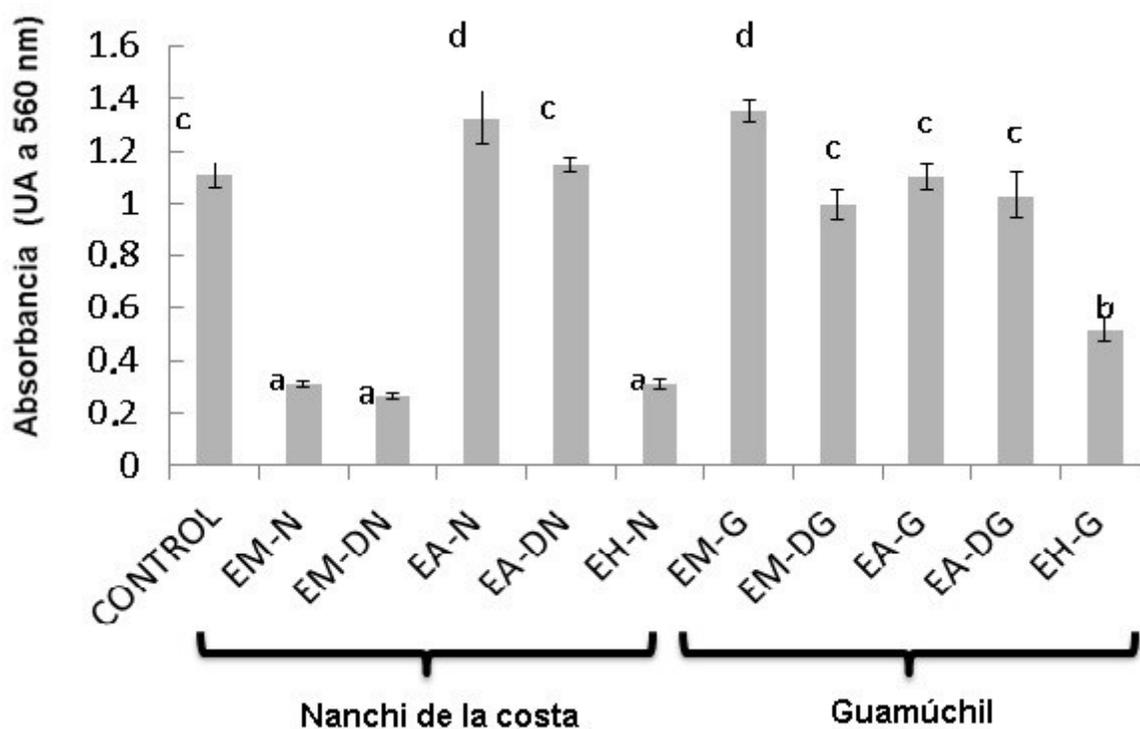


Figura 7. Actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Giardia duodenalis*.

Se midió la inhibición del crecimiento inducida por los extractos metanólicos (EM), hexánicos (EH), y acuosos (EA) de las harinas de corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) (500 µg/mL). Los extractos se obtuvieron de harinas sin desgrasar (N y G) y desgrasadas (DN y DG).

UA: Unidades de absorción.

*Letras diferentes indican diferencia significativa. Barras indican desviación estándar (DE).

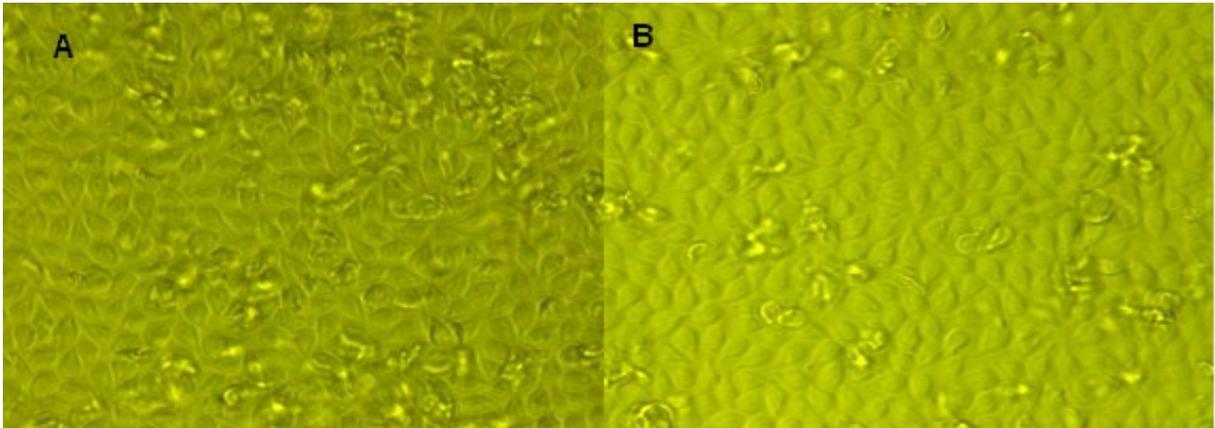


Figura 8. Crecimiento de trofozoítos de *Giardia duodenalis* a 24 h de incubación

(A) Con medio TYI-S-33 (20 X, Nikon, ECLIPSE, TS100, Japan).

(B) Control vehículo, DMSO al 0.5% en medio TYI-S-33 (20 X, Nikon, ECLIPSE, TS100, Japan).

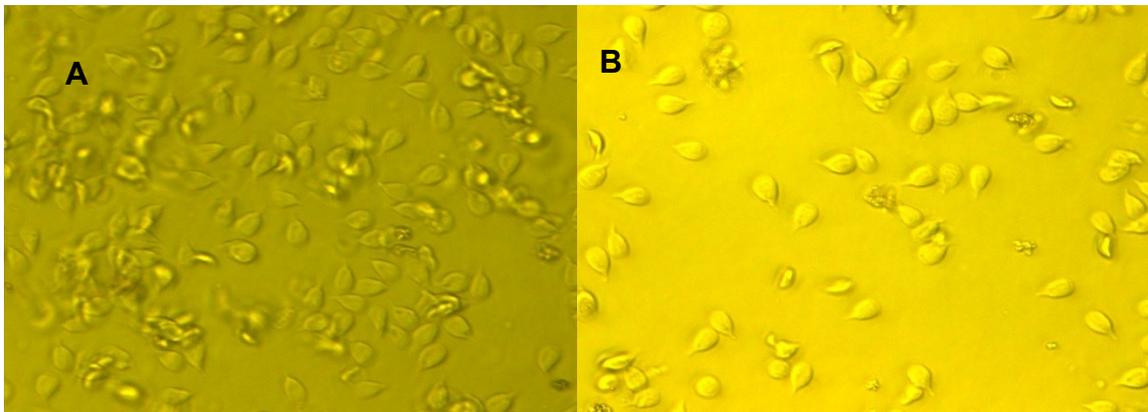


Figura 9. Actividad de los extractos metanólicos (500 µg/mL) de harina de corteza de nanchi de la costa (N) contra *Giardia duodenalis* después de 24 h de incubación. Los extractos son de harina sin desgrasar (N) y desgrasada (DN).

(A) EM-N en medio TYI-S-33 (20 X, Nikon, ECLIPSE, TS100, Japan).

(B) EM-DN en medio TYI-S-33 (20 X, Nikon, ECLIPSE, TS100, Japan).

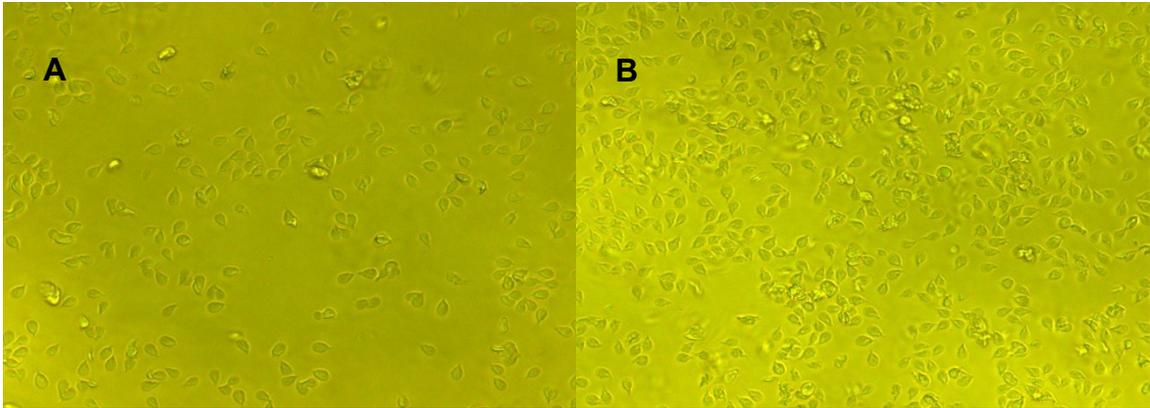


Figura 10. Actividad de los extractos hexánicos (500 µg/mL) (EH) de harina de corteza de nanchi de la costa (N) y de guamúchil (G) contra *Giardia duodenalis* después de 24 h de incubación.

(A) EH-N en medio TYI-S-33 (10 X, Nikon, ECLIPSE, TS100, Japan).

(B) EH-G en medio TYI-S-33 (10 X, Nikon, ECLIPSE, TS100, Japan).

Los estudios de actividad anti-giardial de extractos de cortezas de árboles son escasos. Entre estos, Kabbashi y col (2016) registraron 100% de mortalidad empleando 500 µg/mL del extracto etanólico de corteza de *Acacia nilotica* (goma arábica). También se demostró que 500 µg/mL del extracto etanólico de hojas de goma arábica inhibió en 100% el crecimiento de trofozoítos de *G. duodenalis* (Kabbashi y col 2015). Los valores registrados en estos estudios fueron mejores a los nuestros, lo cual podría deberse a que el tiempo de incubación usado por estos autores (96 h) fue mayor. Nuestros valores de actividad anti-giardial son similares al presentado por el extracto metanólico del fruto de *Sambucus ebulus* (sauquillo) a concentraciones de 50 y 100 mg/mL, durante 60 min, con un porcentaje de inhibición de crecimiento de quistes de *G. duodenalis* de 64% y 78%, respectivamente (Rahimi-Esboei y col 2013). Por otro lado, los porcentajes de inhibición de crecimiento de trofozoítos de *Giardia duodenalis* para los extractos metanólicos y hexánico de nanchi de la presente investigación fueron mejores que el presentado por el extracto metanólico de hojas de *Hovenia dulcis* (conocido como “árbol de las pasas”) evaluado a 100 µg/mL (64% de inhibición de crecimiento); sin embargo, fueron menores al presentado por la fracción en diclorometano obtenida del fraccionamiento biodirigido, cuya evaluación a 50 y 100 µg/mL inhibió más del 80% de crecimiento celular (Gadelha y col 2005).

Contrastando los valores de IC₅₀, la mayor actividad se obtuvo con el extracto hexánico de nanchi (EH-N) (194.6 µg/mL), seguido de los metanólicos de nanchi (EM-DN > EM-N), y el hexánico de guamúchil (EH-G) (**Cuadro 12**). Rayan y col (2015), registraron un IC₅₀ de 143 µg/mL para el extracto acuoso del fruto de

Cuadro 12. Actividad inhibitoria del crecimiento (IC_{50}) *in vitro* de los extractos activos de corteza de harina de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) contra *Giardia duodenalis*¹

Planta	Extracto		IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ²
Nanchi de la costa	Metanólico	EM-N	380.6 \pm 4.10
		EM-DN	246.9 \pm 44.97
	Hexánico	EH-N	194.6 \pm 21.64
Guamúchil	Hexánico	EH-G	536.3 \pm 19.23

¹ Extractos metanólicos (EM) y hexánicos (EH) de harina de corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G). Los extractos se prepararon a partir de harina sin desgrasar (N y G) y desgrasada (DN).

² Se presenta la media de dos ensayos independientes, por triplicado, con su desviación estándar.

Terminalia ferdinandiana, valor menor a los encontrados para las cortezas de nanchi y guamúchil. El IC₅₀ del extracto metanólico de hojas de *Hovenia dulcis* (23 µg/mL) fue mucho mejor que la de nuestros extractos (Gadelha y col 2005). Otro estudio evaluó la actividad anti-giardial de especies de calabaza (*Cucurbita maxima* D y *Cucurbita pepo* L) y guaje o bule (*Lagenaria siceraria*), registrando un IC₅₀ de 548.80 µg/mL para el extracto con éter de petróleo de semillas de *Cucurbita máxima*, y de 95.65 µg/mL para el mismo extracto de semillas de *Lagenaria siceraria* (Elhadi y col (2013). El presente estudio es el primero en evaluar la actividad anti-giardial de los extractos de corteza de nanchi de la costa y guamúchil. En este sentido, se demostró la eficacia anti-giardial *in vitro* del extracto hexánico de nanchi (EH-N), los metanólicos de nanchi (EM-DN > EM-N) y hexánico de guamúchil (EH-G). Dentro de la literatura revisada se encontraron diversos estudios de extractos de plantas de origen mexicano con actividad anti-giardial; por ejemplo, Camacho-Corona y col (2015) demostraron actividad contra *G. duodenalis* de extractos orgánicos de hojas de *Crateagus mexicana*, *Hyptis albida*, *Ocimum basilicum* y *Larrea tridentata*; la actividad registrada del extracto metanólico de hojas fue moderada para las plantas *C. mexicana* (IC₅₀=153 µg/mL), *O. basilicum* (IC₅₀=100 µg/mL) y *L. tridentata* (IC₅₀= 116 µg/mL). Estos resultados fueron similares a los registrados en esta investigación para el extracto hexánico de nanchi (EH-N) (IC₅₀= 194 µg/mL), que mostró la mejor actividad anti-giardíasis. Las investigaciones mencionadas coinciden en que los extractos de mayor actividad se obtuvieron de disolventes orgánicos de

polaridad baja a media; e.g, fracción en diclorometano del extracto metanólico de *Hovenia dulcis* presentó un IC₅₀ de 12 µg/mL (Gadelha y col 2005).

El ciclo de vida de *G.duodenalis* consiste de dos etapas que corresponden a los estadios de trofozoíto y quiste. El trofozoíto es la causa de giardiasis en pacientes y portadores asintomáticos. Este protozooario se divide asexualmente y es importante que los tratamientos eliminen a la población por completo; un tratamiento insuficientemente efectivo dejaría parásitos vivos que al multiplicarse exponencialmente en poco tiempo incrementarían la población, con los consecuentes efectos negativos (Rodriguez-Chavez y col 2015). Sin embargo, el mecanismo de acción implicado en la lisis y muerte de las células de *Giardia* aún se desconoce, por lo tanto, son necesarios estudios complementarios para aclarar el mecanismo de acción de los componentes químicos con actividad.

C ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA CONTRA *Hymenolepis nana*

Hymenolepis nana es una de las causas más comunes de infecciones por cestodos. En humanos, la mayor prevalencia y carga parasitaria se presenta en niños (Al-Megrin 2016). En relación a los tratamientos alopáticos, su disponibilidad y eficiencia son limitadas. Los parásitos tratados con los extractos metanólicos de nanchi de la costa y guamúchil (EM-N, EM-DN, EM-G y EM-DG), presentaron tiempos de parálisis de 60 a 90 min y de muerte de 90 a 150 min (**Cuadro 13**). En la literatura, se han encontrado un gran número de investigaciones, tanto *in vitro* como *in vivo*, que se enfocan en la búsqueda de compuestos naturales efectivos contra infecciones por céstodos.

Cuadro 13. Actividad contra *Hymenolepis nana* de extractos metanólicos (EM) y hexánicos (EH) de harinas de corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G), sin desgrasar (N y G) y desgrasadas (DN y DG).

Planta	Extracto(50 mg/mL)	Tiempos (min)		
		Parálisis	Muerte	
Nanchi de la costa	Metanólico	EM-N	90	150
		EM-DN	90	120
	Acuoso	EA-N	30	90
		EA-DN	20	90
	Hexánico	EH-N	>4320	>4320
Guamúchil	Metanólico	EM-G	90	120
		EM-DG	60	90
	Acuoso	EA-G	20	40
		EA-DG	8	15
	Hexánico	EH-G	>4320	>4320
Controles	Praziquantel(25 mg/mL)	20	30	
	Medio de Hank's	>4320	>4320	

En este sentido, diversos extractos de plantas han mostrado efectividad contra diferentes especies de *Hymenolepis*. Tal, es el caso del extracto metanólico de hojas de *Adhatoda vasica* (malabar, originaria de Asia), se evaluó *in vivo* en ratas infectadas de *Hymenolepis diminuta*; al suministrarle dos dosis de 800 mg/kg, el número de huevos por gramo de heces se redujo en 79.57% y el porcentaje de recuperación de gusanos adultos a 16.60% (Yadav y Tangpu 2012). Kundu y col (2012) encontraron que el extracto etanólico de hojas de *Cassia alata* (Mazorquilla), evaluado *in vitro* a 40 mg/mL, afectó negativamente a *H. diminuta*, registrándose tiempos de parálisis y muerte de 1.68 h y 9.39 h, respectivamente. Las diferencias en los tiempos de muerte podrían deberse a que el parásito utilizado fue de diferente especie, así como también a la diferente concentración del extracto (50 mg/mL) y a la naturaleza del disolvente utilizado en la extracción. En otra investigación, extractos metanólicos de *Artemisia abrotanum* y *Salvia officinalis* presentaron una gran actividad *in vivo* en ratones infectados con *H. nana* (150 mg/kg de peso/ 5 días, sacrificio al día 7), registrando que el número de huevos en heces disminuía conforme avanzaron los días del estudio (Amirmohammadi y col 2014). Resulta importante recalcar que nuestros resultados de actividad antiparasitaria *in vitro* son bastante prometedores; sin embargo, el potencial de los materiales en estudio debe corroborarse mediante estudios *in vivo*.

1 Descripción general del daño al parásito para cada uno de los extractos evaluados

Los extractos acuosos (50 mg/mL) de las cortezas de nanchi y guamúchil presentaron actividad contra *H. nana*. La mejor actividad se registró para los extractos acuosos de ambas cortezas, siendo mejor para el de guamúchil (EA-DG > EA-G); los resultados obtenidos con el EA-DG fueron mejores que los obtenidos con Praziquantel (control positivo), tanto en tiempos de parálisis como de muerte. *Hymenolepis nana* no fue susceptible a los componentes de menor polaridad de ambas cortezas (EH-N y EH-G) hasta por 12 h de exposición. Cabe mencionar que los extractos sin actividad antiparasitaria relevante presentaron solubilidad parcial en el medio Hank's y los activos fueron solubles (**Cuadro 13**). Los adultos de *H. nana* tratados con EA-DG mostraron estructuras rígidas. La tinción con azul de Evans de los parásitos inmóviles evidenció la muerte de los mismos, se tiñen de azul, a los 15 min (**Figura 11**). En el tratamiento con EA-G, los parásitos presentaron parálisis reversible hasta los 20 min de tratamiento. Los parásitos tratados mostraron proglótidos dañados, descamaciones, desprendimiento de partes del tegumento, y aumento del tamaño del escólex (**Figura 12**). Estudios *in vitro* han demostrado que extractos metanólicos de la corteza de *Oroxylum indicum* afectan a parásitos adultos de *H. diminuta*, los tiempos de parálisis y muerte a una dosis de 30 mg/mL fueron de 34.8 y 71.4 min, respectivamente (Deori y Yadav 2016).

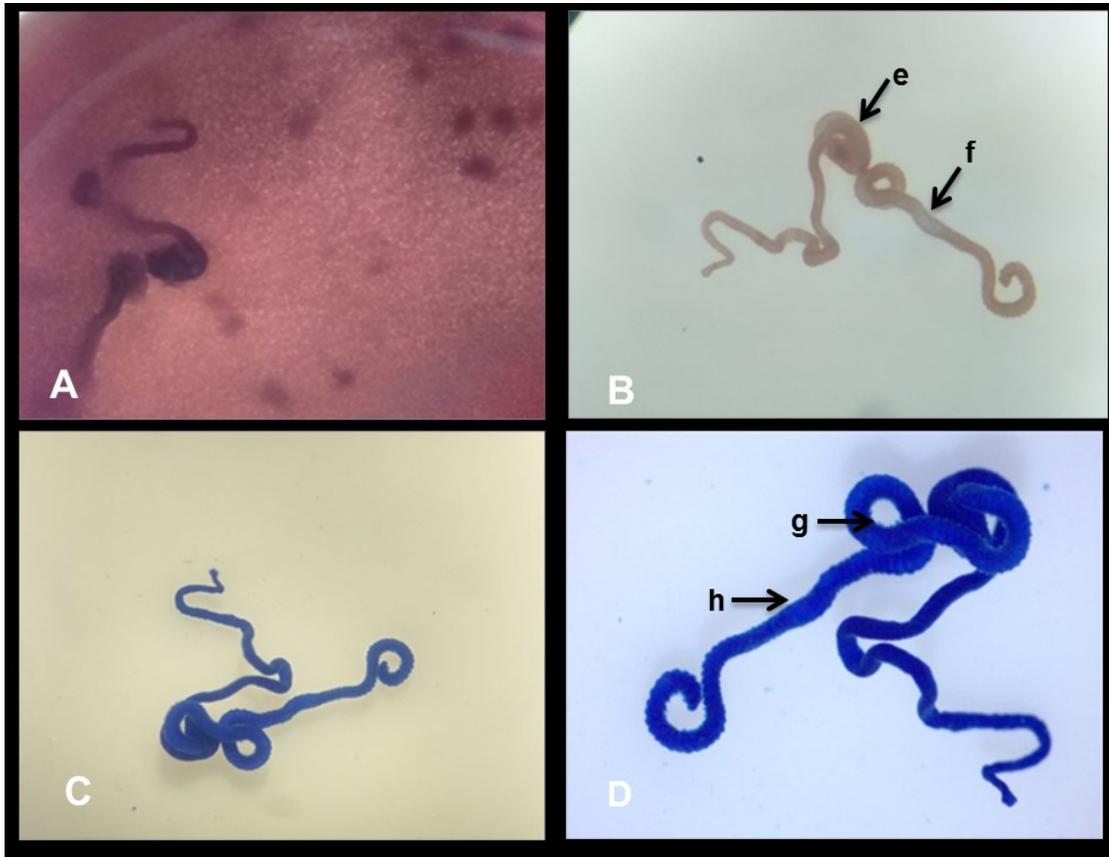


Figura 11. Fotomicroscopía óptica de *Hymenolepis nana* tratada con el extracto acuoso (EA) de guamúchil (G) (EA-G) (50 mg/mL).

(A) y (B) incubación por 20 min (2.0 x), parásitos viables, mostrando enrollamiento (e) y daño en proglótidos (f); (C) y (D) incubación por 40 min (2.0 x) que muestra parásitos muertos en los que se aprecia desprendimiento del tegumento (g) y daño en proglótidos (h) (CARL ZEISS/ZEN, Germany).

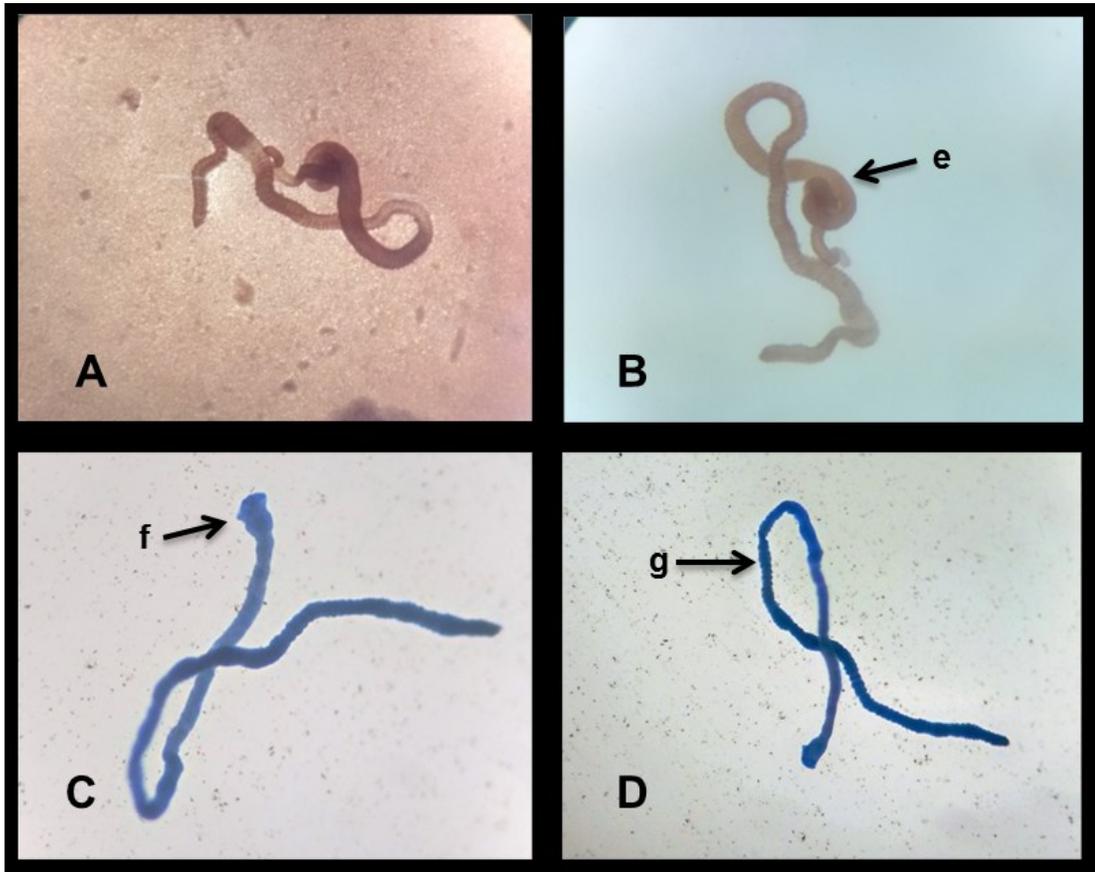


Figura 12. Fotomicroscopía óptica de *Hymenolepis nana* tratada con el extracto acuoso (EA) de harina desgrasada de guamúchil (EA-DG) (50 mg/mL).

(A) y (B) incubación por 8 min (2.0 x), parásitos viables, mostrando enrollamiento (e). (C) y (D) Incubación por 15 min (2.0 x) que muestra parásitos muertos en los que se aprecia engrosamiento del escólex (f) y daño en proglótidos (g) (CARL ZEISS/ZEN, Germany).

Los trabajos donde se registren tiempos de parálisis y muerte de *H. nana*, por efecto del tratamiento con productos naturales, son escasos. En este modelo, extractos de semillas de *Coriandrum sativum* evaluados a 500 y 1000 µg/mL provocaron la muerte de los parásitos adultos a los 65 y 25 min, respectivamente (Hosseinzadeh y col 2016); estos tiempos de muerte son similares a los obtenidos en el presente trabajo. Otra investigación demostró que algunos componentes químicos del jengibre (*Zingiber officinale*), tales como [10]-shogaol y [10]-gingerol, afectaron *H. nana* en ensayos *in vitro*; éstos indujeron una letalidad del 100%. Para estos componentes la actividad cestocida se alcanzó de 24 a 72 h de una manera dependiente del tiempo y de la dosis (Lin y col 2014).

Nuestros resultados muestran que el extracto acuoso desgrasado de guamúchil (EA-DG) fue el más activo contra *H. nana* y se procedió a su caracterización fitoquímica, así como a purificar componentes del mismo. De este extracto se obtuvieron las fracciones metanólicas (EA-DGm) y acetónicas (EA-DGa). La mejor actividad la presentó la fracción EA-DGm, induciendo menores tiempos de parálisis (8 min) y muerte (10 min) que Praziquantel. Asimismo, la observación microscópica mostró liberación de huevos, daño en proglótidos y escólex (**Cuadro 14** y **Figura 13**). Por otro lado, EA-DGa tuvo un efecto similar que el Praziquantel, considerando los tiempos de parálisis y muerte (**Cuadro 14** y **Figura 14**); sin embargo, los parásitos tratados

Cuadro 14. Actividad contra *Hymenolepis nana* de fracciones del extracto acuoso (EA) de la harina desgrasada de guamúchil (DG)

Fracción	Tiempos (min)	
	Parálisis	Muerte
Guamúchil	EA-DGm ¹	8
	EA-DGa ²	20

¹ Fracción metanólica del extracto acuoso de harina desgrasada de guamúchil (EA-DGm).

² Fracción acetónica del extracto acuoso de harina desgrasada de guamúchil (EA-DGa).

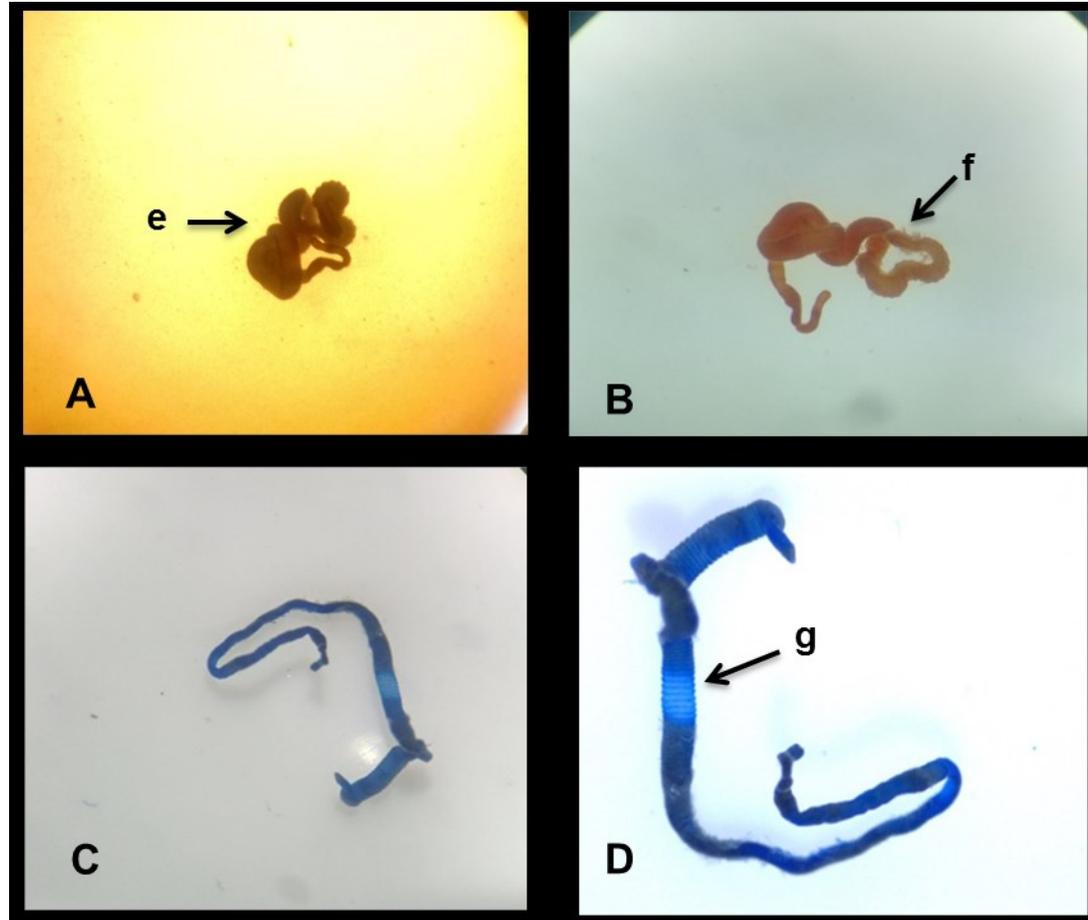


Figura 13. Fotomicroscopía óptica de *Hymenolepis nana* tratada con la fracción metanólica obtenida del extracto acuoso (EA) de harina de corteza desgrasada de guamúchil (EA-DGm) (50 mg/mL).

(A) y (B) incubación por 8 min (2.0 x) viables, mostrando enrollamiento (e) y desprendimiento del tegumento (f). (C) y (D) incubación por 10 min (2.0 x) que muestra parásitos muertos en los que se aprecia daño severo en proglótidos (g) (CARL ZEISS/ZEN, Germany).

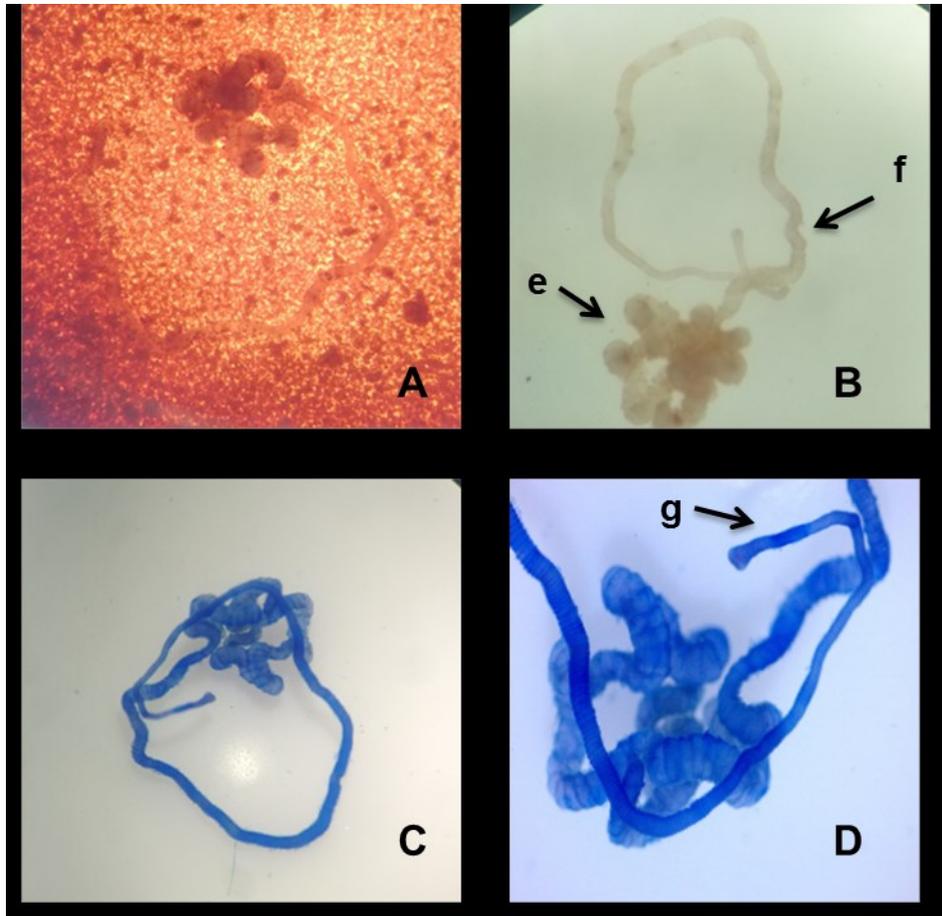


Figura 14. Fotomicroscopía óptica de *Hymenolepis nana* tratada con 50 mg/mL de la fracción acetónica obtenida del extracto acuoso (EA) de harina de corteza desgrasada de guamúchil (EA-DGa).

(A) y (B) incubación por 20 min (2.0 x) viables, mostrando enrollamiento (e) y reducción en el ancho de proglótidos (f). (C) y (D) incubación por 25 min (2.0 x) que muestra parásitos muertos en los que se aprecia daño en proglótidos (g) (CARL ZEISS/ZEN, Germany).

mostraron enrollamiento, descamación del tegumento, así como ligero adelgazamiento y daño de los proglótidos maduros. Estos resultados de daño, podrían compararse con los registrados por Lin y col (2014), donde los gusanos adultos de *H. nana* fueron destruidos por los constituyentes extraídos de raíces de jengibre (*Zingiber officinale*) ([10]-shogaol y [10]-gingerol, 100 μ M); los parásitos tratados mostraron daños severos, incluyendo ulceraciones, especialmente en la porción de margen del segmento de arco o triángulo proglotídico. Sin embargo, resulta importante agregar que en el estudio mencionado evaluaron compuestos purificados; mientras que en la presente investigación se evaluaron extractos.

D CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA

1 Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos/fracciones activos

El análisis fitoquímico cualitativo de los extractos/fracciones con actividad antiparasitaria (EM-N, EM-DN, EH-N, EH-G; EA-DG, EA-DGm y EA-DGa), mostró la presencia de cumarinas volátiles, flavonoides, saponinas, taninos, y triterpenos o esteroides (**Cuadro 15**). Los resultados negativos para las otras familias de metabolitos secundarios en el análisis fitoquímico indican que estos compuestos no están presentes o bien se encuentran en bajas concentraciones en las muestras analizadas. Los extractos de nanchi de la costa (*Z. sonorensis*) con actividad contra los parásitos modelo (EM-N, EM-DN y EH-N) coinciden en que

Cuadro 15. Familias de metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos (EM), hexánicos (EH) y acuosos (EA) de la corteza de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) que mostraron actividad antiparasitaria¹

Compuestos	Contenido ²				
	EM-N	EM-DN	EH-N	EH-G	EA-DG
Alcaloides	-	-	-	-	-
Cardiotónicos	-	-	-	-	-
Cumarinas volátiles	++	++	++	++	++
Derivados antracénicos libres	-	-	-	-	-
Flavonoides	++	++	+	+	-
Saponinas	++	++	-	-	++
Taninos	++	++	-	-	+++
Triterpenos o esteroides	-	-	+	+	-

¹ Los extractos se prepararon a partir de harina sin desgrasar (N y G) y desgrasada (DN y DG).

² El contenido fue estimado como: abundante (+++), moderado (++), poco (+) y ausente (-).

presentaron cumarinas volátiles y flavonoides. Por su parte, los extractos EM-N y EM-DN mostraron además saponinas y taninos; mientras que el EH-N fue positivo también para triterpenos o esteroides. En la literatura se han encontrado reportes donde demuestran la actividad antiparasitaria que poseen algunos de los metabolitos secundarios aislados de plantas (e.g., flavonoides, alcaloides, esteroides y triterpenos). Lumpu y col (2013) evaluaron extractos y fracciones de la corteza de *Alstonia congensis* (Alstonia), la fracción activa contra *Plasmodium falciparum* mostró un mayor contenido de compuestos fenólicos.

Ferreira y col (2010), evaluaron la actividad antileishmanial de las cumarinas (+)-3-(1'-dimetilalil)-decursinol y (-)-helietina obtenidas de la corteza del tallo de *Helietta apiculata* (canela del venado, endémica de Argentina y Paraguay); obteniendo valores de IC₅₀ en el intervalo entre 17 y 450 mg / ml, este trabajo describe el primer ejemplo experimental de actividad antiparasitaria de las cumarinas.

En un análisis fitoquímico realizado a un extracto metanólico de corteza de *Zizyphus spina-christi* se encontró la presencia de glucósidos cardiotónicos, resinas, saponinas y taninos (Adzu y col 2003); en contraste, en nuestros extractos EM-N y EM-DN solo se encontraron saponinas y taninos. En otro estudio realizado por Rahman (2011), el extracto de corteza de *Zizyphus mauritiana* presentó alcaloides, taninos, azúcares reductores, esteroides, flavonoides y gomas; en contraste con nuestros resultados de *Z. sonorensis*, la corteza de *Z. mauritiana* contiene alcaloides.

Por otro lado, la composición cualitativa de los extractos con actividad de corteza de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) (EH-G y EA-DG) coincidió sólo en la presencia de cumarinas volátiles. La marcha fitoquímica mostró flavonoides y triterpenos/esteroides para EH-G; mientras que en EA-DG se presentaron también saponinas y taninos. Existen diversos estudios que reportan la presencia de las mismas familias de compuestos químicos encontradas en el presente estudio. Kane y col (2009) mostraron la presencia de terpenoides, flavonoides, esteroides, taninos y resinas en extractos acuosos de *Euphorbia thymifolia* Linn (Golondrina), además comprobaron su actividad antiparasitaria y sugieren que podría asociarse a su contenido de taninos. Domínguez-Carmona y col (2010) aislaron ácido betulínico (triterpeno) del extracto crudo de hojas de *Pentalinon andrieuxii* (Contrayerba) y comprobaron su actividad contra *Trypanosoma cruzi*.

Estudios fitoquímicos realizados a diferentes porciones de *Pithecellobium dulce* han revelado la presencia de una gran cantidad de compuestos y algunos de ellos coinciden con los encontrados en este trabajo (**Cuadro 15**); las diferencias podrían estar asociadas a la porción en estudio y al solvente de extracción. Vanitha y Manikandan (2016) encontraron alcaloides, antraquinonas, flavonoides, esteroides, glucósidos cardiotónicos, proteínas, taninos, terpenoides, y azúcares en extractos etanólicos de hojas; sin embargo, no se encontraron presentes saponinas. Kumar y Nehra (2014) demostraron la presencia de alcaloides, antraquinonas, terpenoides y esteroides, y no registraron flavonoides y saponinas en diferentes extractos de corteza. Asimismo, Venkatachalam y col (2012) mostraron la presencia de triterpenoides, glucósidos cardiotónicos,

saponinas, y flavonoides en la exploración fitoquímica preliminar de semillas de *P. dulce*.

E ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS CON ACTIVIDAD ANTI-GIARDIA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS (CG-EM)

Los resultados de la evaluación de la actividad antiparasitaria contra *G. duodenalis* indican que las cortezas de nanchi de la costa y guamúchil son fuente potencial de compuestos activos de importancia para el ser humano. Al respecto, destacaron por su actividad los extractos de la corteza de nanchi de la costa (*i.e.*, EH-N, EM-N y EM-DN) y el hexánico de guamúchil (EH-G). Estos extractos, se caracterizaron por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM), analizando muestras de los extractos derivatizados y sin derivatizar.

1 Caracterización de los extractos por CG-EM

La CG-EM de los extractos activos mostró un gran número de compuestos con diferentes estructuras químicas (*e.g.* ácidos carboxílicos, ácidos grasos, compuestos fenólicos, fitoesteroles, flavonoides, terpenos). El EH-G fue más complejo que el EH-N; en los extractos derivatizados se encontraron un mayor número de componentes químicos que en los extractos sin derivatizar) (**Cuadros 16-21**) (**Figura 15-17**).

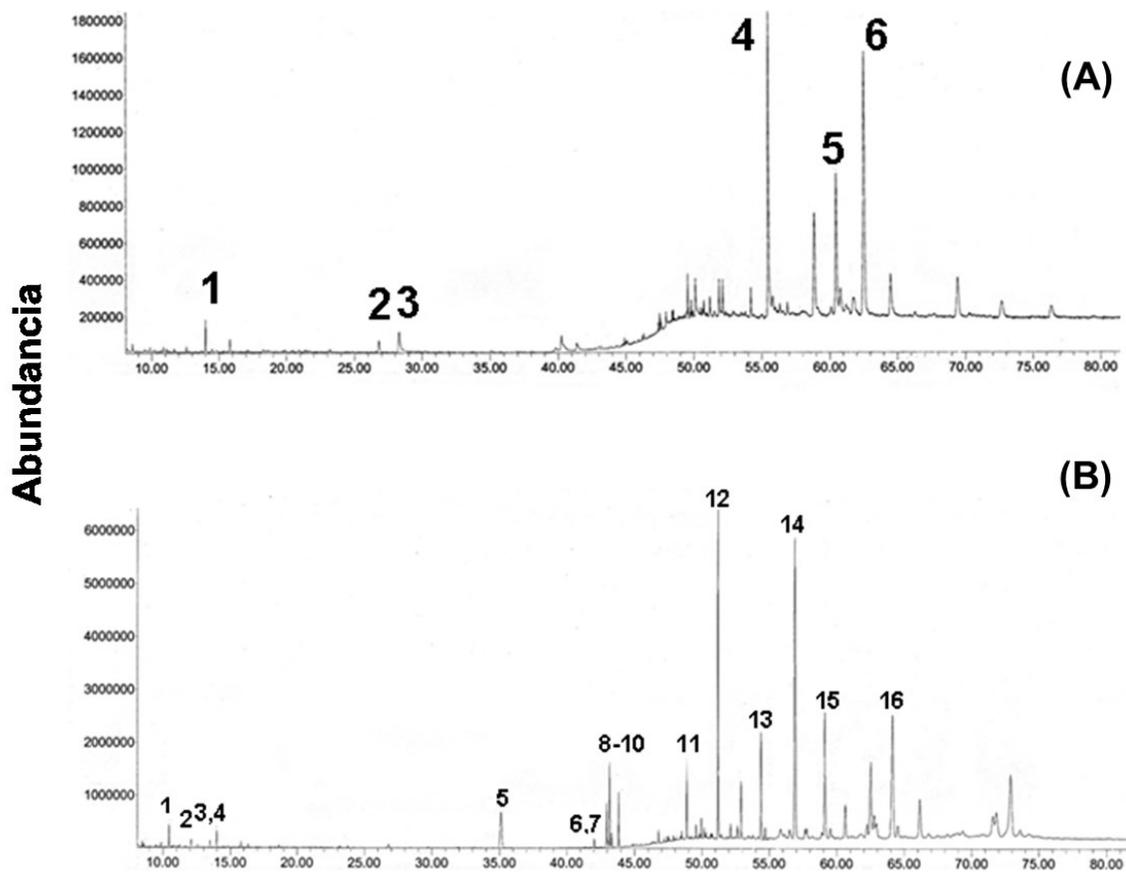


Figura 15. Cromatogramas de gases-masas del extracto hexánico de nanchi (EH-N) sin derivatizar **(A)** y derivatizado **(B)**.

Los nombres de los compuestos de los picos principales (con numeración) se indican en los **Cuadros 16** (EH-N) y **17** (EH-Nd).

Cuadro 16. Composición química del extracto hexánico de corteza de nanchi de la costa (EH-N) determinada por CG-EM ¹

No.	Nombre del compuesto químico	TR (min)	PM ²	Coincidencia	Área %	LRI ³
1	Tetrahydro-2-furanmetanol	14.0	144	621	1.7	219.0
2	Ftalato de dibutilo	26.8	278	954	1.3	929.5
3	Ácido palmítico	28.3	256	897	3.7	1011.7
4	Dotriacontanol	55.5	466	891	20.4	2519.9
5	Sitosterol	60.4	414	905	41.7	2795.5
6	Lupeol	62.5	426	917	31.8	2911.3

¹Negritas indican compuestos mayoritarios (área > 4%). Familias de compuestos detectadas (%) para EH-N: ácidos carboxílicos 3.7%, alcoholes grasos 20.4% y triterpenos 73.5 %.

²PM: Peso molecular.

³ LRI: Índice de retención de Kovats.

Cuadro 17. Composición química del extracto hexánico (EH) derivatizado de corteza de nanchi de la costa (EH-Nd) determinada por CG-EM ¹

No.	Nombre del compuesto químico	TR (min)	PM ²	Coincidencia	Área %	LRI ³
1	sec-Butil(TMS)succinato	10.4	246	819	0.9	22.4
2	5-(TMS)oxi-5-metilhexanoato de etilo	12.0	246	555	0.3	113.4
3	(+)-2,3-O-Etoximetilen- <i>d</i> -ribonolactona	13.5	204	641	0.3	190.8
4	Acetato de tetrahidro-2-furanmetanol	14.0	144	633	0.7	218.8
5	Hexadecanoato de TMS	35.0	328	915	5.2	1388.2
6	1-Trimetilsililooctadecano	42.0	342	877	0.5	1774.2
7	(9 <i>E</i> ,12 <i>E</i>)-9,12-octadecadienoato de TMS	43.0	352	908	2.1	1824.4
8	(11 <i>E</i>)-octadecaenato de TMS	43.2	354	907	3.9	1836.9
9	OÁcido octadecanoato de TMS	43.9	356	910	2.2	1874.2
10	Docosanoato de TMS	48.8	412	898	3.8	2152.4
11	Tetracosanoato de TMS	51.2	440	759	14.2	2281.8
12	2-[(TMS)oxi]-tetracosanoato de metilo	54.4	468	550	7.0	2459.8
13	Octacosiloxitrimetilsilano	56.9	482	800	25.9	2598.9
14	Ácido 3',6'-colest-2-eno[2,3- <i>d</i>]quinolizidina 2',3,5'-Dihidrodimetil éster	59.1	540	554	12.5	2721.1
15	Acetato de lupeol	64.1	468	695	19.4	2999.6

¹Negritas indican compuestos mayoritarios (área > 4%). Familias de compuestos detectadas (%) para EH-Nd: ácidos grasos 36.9%, alcoholes grasos 25.9%, quinolizidina 12.5% y triterpenos 19.4%.

²PM: Peso molecular.

³LRI: Índice de retención de Kovats.

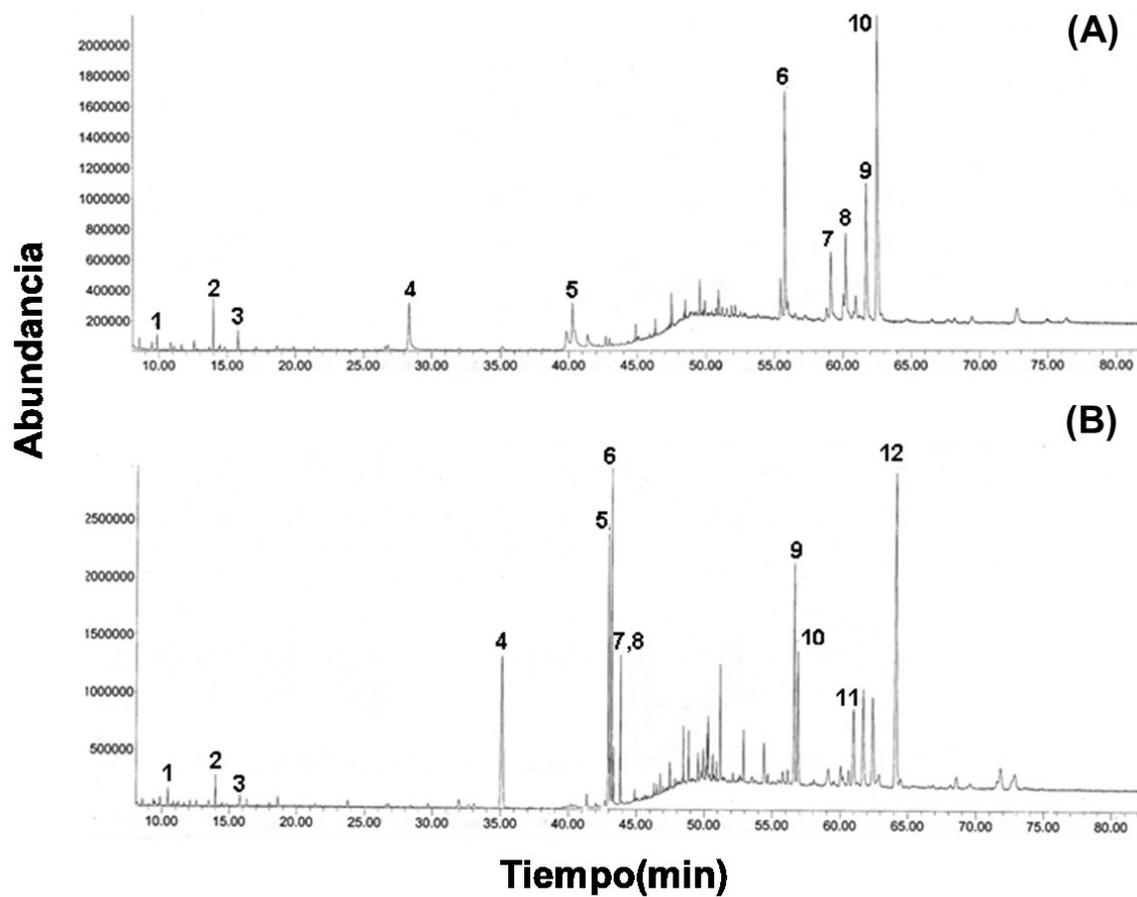


Figura 16. Cromatogramas de gases-masas del extracto hexánico de guamúchil (EH-G) sin derivatizar **(A)** y derivatizado **(B)**.

Los nombres de los compuestos de los picos principales (con numeración) se indican en los **Cuadros 18** (EH-G) y **19** (EH-Gd).

Cuadro 18. Composición química del extracto hexánico de corteza de guamúchil (EH-G) determinada por CG-EM ¹

No.	Nombre del compuesto químico	TR (min)	PM ²	Coincidencia	Área %	LRI ³
1	2-Metiltetrahidro-2-furanol	9.9	102	831	0.7	-9.3
2	Acetato de Tetrahidrofurfurano	14.0	144	629	2.0	219.0
3	Isobutirato de metilo	15.8	102	592	0.9	319.5
4	Ácido palmítico	28.4	256	908	5.9	1017.1
5	(9E)-Ácido octadecanóico	40.2	282	898	8.1	1676.4
6	Vitamina E	55.8	430	925	16.1	2538.4
7	(3à,5à,22E)- Ergost-22-en-3-ol	59.1	400	683	8.3	2723.3
8	Condriasterol	60.1	412	848	9.8	2777.1
9	Lupenona	61.7	424	737	14.3	2867.4
10	Lupeol	62.5	426	922	33.9	2912.1

¹Negritas indican compuestos mayoritarios (área > 4%). Familias de compuestos detectadas (%) para EH-G: alcoholes 2.7 %, ácidos grasos 14.0%, vitamina E 16.1%, fitoesteroles 18.1 % y triterpenos 48.2%

² PM: Peso molecular.

³ LRI: Índice de retención de Kovats.

Cuadro 19. Composición química del extracto hexánico (EH) derivatizado de corteza de guamúchil (EH-Gd) determinada por CG-EM ¹

No.	Nombre del compuesto químico	TR (min)	PM ²	Coincidencia	Área%	LRI ³
1	sec-Butil(TMS)succinato	10.4	246	807	0.4	22.0
2	Tetrahidro-2-furanmetanol	14.0	144	639	0.9	218.4
3	4,4-(Etilendioxi)pentanal	15.8	144	596	0.4	318.8
4	Hexadecanoato de TMS	35.1	328	918	15.3	1388.7
5	(9E,12E)-9,12-octadecadienoato de TMS	42.9	352	902	9.2	1825.0
6	Oleonato de TMS	43.2	354	865	17.2	1836.9
7	Ácido <i>Bis</i> -(TMS)- Δ -9-tetrahydrocannabinol b	56.6	502	564	12.3	2582.6
8	Octacosanol	56.9	482	809	7.7	2597.0
9	Lupenona	61.7	424	857	8.1	2864.8
10	Lupeol acetato	64.1	468	687	28.4	3000.9

¹Negritas indican compuestos mayoritarios (área > 4%). Familias de compuestos detectadas (%) para EH-Gd: alcoholes 8.6 %, ácidos grasos 41.7%, ácidos carboxílicos 0.4% y triterpenos 36.5%

²PM: Peso molecular.

³ LRI: Índice de retención de Kovats.

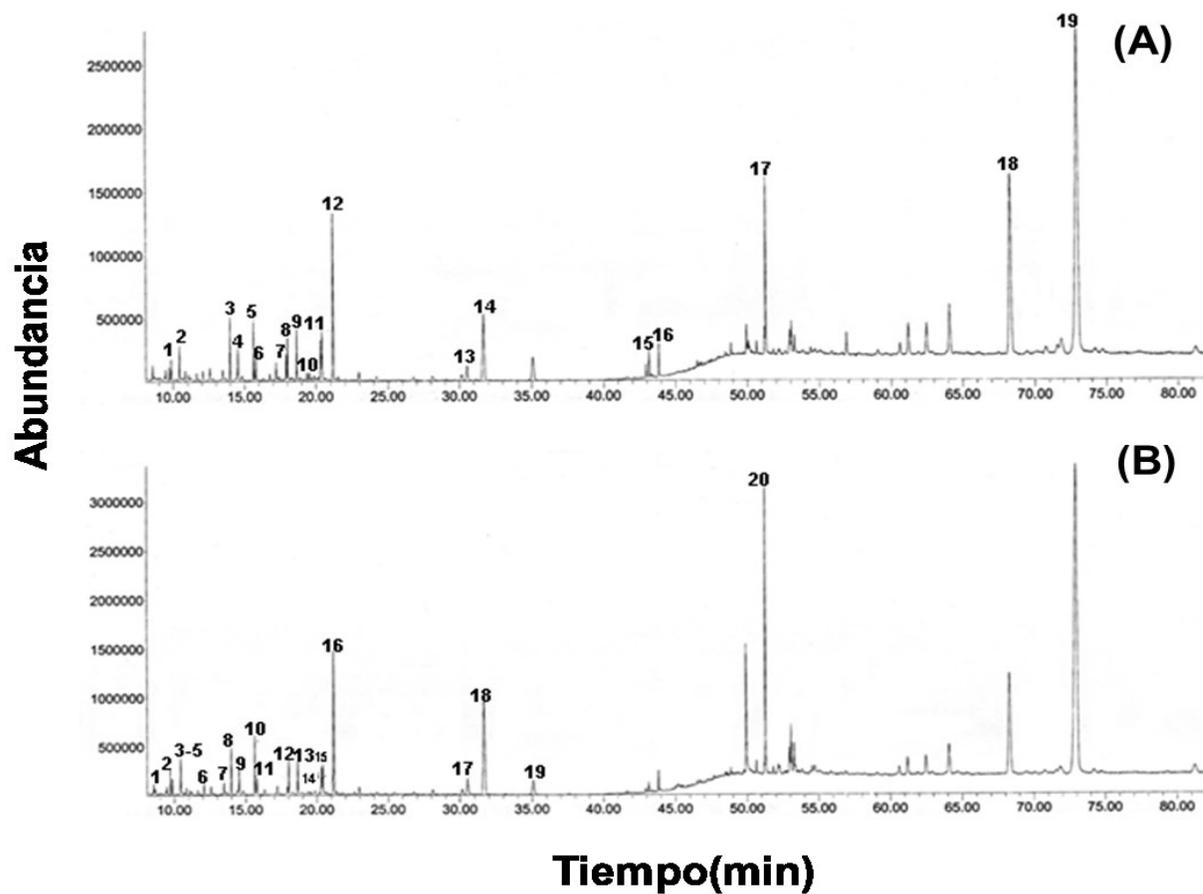


Figura 17. Cromatogramas de gases-masas del extracto metanólico de nanchi (EM-N) sin desgrasar **(A)** y desgrasado (EM-DN) **(B)**, ambos derivatizados. Los nombres de los compuestos de los picos principales (con numeración) se indican en los **Cuadros 20** (EM-Nd) y **21** (EM-DN d).

Cuadro 20. Composición química del extracto metanólico (EM) derivatizado de corteza de nanchi de la costa (EM-Nd) determinada por CG-EM ¹

No.	Nombre del compuesto químico	TR (min)	PM ²	Coincidencia	Área %	LRI ³
1	Anhídrido isobutírico	9.9	158	850	0.6	-10.0
2	sec-Butil(TMS)succinato	10.4	246	792	1.1	21.9
3	Tetrahidro-2-furanmetanol	14.0	144	631	1.7	218.2
4	1,2,3,4-Tetrakis-O-(TMS)-butano	14.5	410	830	1.2	249.1
5	1,2,3,4-Tetrakis-O-(TMS)-butano	15.6	410	926	1.5	309.4
6	Isobutirato de metilo	15.8	102	584	0.7	318.7
7	1,2,3,5-Tetrakis-O-(TMS)- α -D-arabinofuranosa	17.9	438	889	0.7	436.1
8	1,2,3,5-Tetrakis-O-(TMS)- α -D-arabinofuranosa	18.0	438	921	1.2	441.9
9	1,2,3,5-Tetrakis-O-(TMS)- α -D-arabinofuranosa	18.6	438	954	1.5	477.3
10	1,2,3,4-Tetrakis-O-(TMS)-butano	20.3	410	822	1.3	569.5
11	1,2,3,4-tetrakis-O-(TMS)-D-Treitol	204	410	806	1.9	574.7
12	1,2,3,4,5-pentakis-O-(TMS)-xilitol	21.2	512	931	6.2	616.6
13	1,2,3,4,5-pentakis-O-(TMS)-ribitol	30.5	512	775	1.2	1135.3
14	L-Sorbitol-TMS	31.6	614	927	5.5	1198.1
15	Oleonato de TMS	43.1	354	906	0.9	1836.3
16	Estearoxitrimetilsilano	43.8	356	896	1.1	1873.8
17	1,3,4,6-Tetrakis-O-(TMS)- α -D-fructofuranosil de 2,3,4,6-tetrakis- α -D-glucopiranosido	51.3	918	843	6.5	2286.4
18	Tetrahidroaraucarolona	68.3	338	534	19.9	3231.4
19	3 β -Acetoxiurs-12-en-28-al	73.0	482	583	45.4	3490.4

¹Negritas indican compuestos mayoritarios (área > 4%). Familias de compuestos detectadas (%) para EM-Nd: ácidos grasos 3.4%, azúcares 26%, alcoholes 3.3%, terpenos 19.9 % y ursólicos 45.4%.

²PM: Peso molecular. ³ LRI: Índice de retención de Kovats.

Cuadro 21. Composición química del extracto metanólico (EM) derivatizado de corteza desgrasada de nanchi de la costa (EM-DNd) determinada por CG-EM ¹

No.	Nombre del compuesto químico	TR (min)	PM ²	Coincidencia	Área%	LRI ³
1	2-metil-1,3-dioxano	8.6	102	769	0.7	-82.0
2	TMS éter de glicerol	9.7	308	927	1.7	-17.6
3	Anhídrido isobutírico	9.9	158	835	1.1	-10.0
4	sec-Butil(TMS)succinato	10.4	246	816	2.9	22.0
5	Dipropilsuccinato	10.8	202	939	0.5	44.7
6	4-Etil(dimetil)sililoxioctano	12.1	216	535	0.9	113.0
7	(+)-2,3-O-Etoxietilen-d-ribonolactona	13.5	204	624	1.1	190.6
8	Tetrahidro-2-furanmetanol	14.0	144	627	3.4	218.3
9	3,8-Dioxa-2,9-disiladecano, 2,2,9,9-tetrametil-5,6-bis[(TMS)]	14.6	410	824	2.8	252.5
10	1,2,3,4-Tetrakis[(TMS)-oxi]butano	15.6	410	928	4.1	309.5
11	Isobutirato de metilo	15.8	102	592	1.4	318.9
12	2,3,4,5-Tetrakis-O-(TMS)-D-Ribosa	18.0	438	921	5.8	441.9
13	D-Treitol-1,2,3,4-tetrakis-O-(TMS)	20.4	410	808	2.4	574.7
14	D-Treitol-1,2,3,4-tetrakis-O-(TMS)	20.4	410	808	2.9	575.0
15	1,2,3,4,5-pentakis-O-(TMS)-xilitol	21.2	512	874	17.2	617.1
16	L-Sorbitol-TMS	31.7	614	923	20.3	1199.4
17	Ácido palmítico TMS	35.0	328	751	3.9	1386.9
18	1,3,4,6-Tetrakis-O-(TMS)- α -D-fructofuranosil de 2,3,4,6-tetrakis- α -D-glucopiranósido	51.3	918	852	27.0	2286.7

¹Negritas indican compuestos mayoritarios (área > 4%). Familias de compuestos detectadas (%) para EM-DNd: ácidos grasos 3.9%, ácidos carboxílicos 8.2%, azúcares 77.4%, alcoholes 2.9% y alcoholes grasos 3.4%

²PM: Peso molecular. ³LRI: Índice de retención de Kovats.

El extracto hexánico de la harina de corteza no desgrasada de nanchi (EH-N), sin derivatizar, mostró un mayor contenido de triterpenos (73.5%), predominando sitosterol y lupeol (**Cuadro 16**); mientras que en el extracto hexánico derivatizado (EH-Nd) predominaron los ácidos grasos (36.9%), alcoholes grasos (25.9%), y otros componentes principales derivados de octacosanol, ácido tetracosánico, quinolizidina y lupeol (**Cuadro 17**). Por su parte, el extracto hexánico de la harina de corteza no desgrasada, sin derivatizar, de guamúchil (EH-G) mostró como componentes mayoritarios a la vitamina E (16.1%), lupenona (14.3%), y lupeol (33.9%) (**Cuadro 18**); mientras que en el EH-G derivatizado predominaron ácidos grasos (41.7%) y triterpenos (36.5%), los principales compuestos fueron lupeol acetato y ácido hexadecanóico (**Cuadro 19**).

El análisis de los extractos metanólicos sin derivatizar de nanchi de la costa (EM-N y EM-DN) no presentaron ninguna señal, esto podría ser por la naturaleza polar de los extractos; mientras que en los extractos derivatizados (**Cuadros 20 y 21**) predominaron azúcares (EM-Nd 26% y EM-DNd 77.4%) y compuestos derivados del ácido ursólico (EM-Nd 45.4%).

Las plantas son fuentes naturales de estructuras novedosas y de compuestos con actividades farmacológicas (Osorio y col 2008). El análisis por CG-EM de los extractos activos mostró un gran número de compuestos con diferentes estructuras químicas (*e.g.* ácidos carboxílicos, ácidos grasos, compuestos fenólicos, fitoesteroles, flavonoides, terpenos). En la caracterización fitoquímica de estos extractos se identificaron cumarinas volátiles, flavonoides, saponinas, taninos, y triterpenos o esteroides; taninos, esteroides, y flavonoides ya habían

sido reportados en un extracto de corteza de *Zizyphus mauritiana* (Rahman 2011). Resulta importante recordar que el EH-N mostró la mayor actividad anti-giardial; el extracto sin derivatizar presentó un alto contenido de triterpenos, predominando β -sitosterol y lupeol (73.5%); de los cuales ya se han reportado distintas actividades biológicas como anticancerígenas, antimaláricas, y hepatoprotectora (Shailajan y Joshi 2011).

Por otro lado, Villaseñor y col (2002) demostraron que el β -sitosterol aislado de un extracto de hojas de *Mentha cordifolia* posee propiedades antihelmínticas contra *Ascaris suum* (25 mg/mL de extracto). Además, en otro reporte ya se ha demostrado la actividad larvicida de cinco plantas con usos medicinales; donde, el componente principal del extracto más activo fue identificado como β -sitosterol (Rahuman y col 2008). Mientras que en el caso de lupeol, se le han demostrado un gran número de actividades biológicas tales como antiprotozoaria, antiinflamatoria, antitumoral, nutracéutica, quimiopreventiva, y antimicrobiana (Wal y col 2011). Caniato y Puricelli (2003) revelaron que el lupeol extraído de hojas de *Vernonia brasiliensis* (25 μ g/mL) modera la inhibición *in vitro* del crecimiento de *Plasmodium falciparum*. La actividad del extracto EH-N podría deberse a la presencia de los triterpenos β -sitosterol y lupeol. En el caso del extracto hexánico de nanchi derivatizado (EH-Nd) predominaron los ácidos grasos (36.9%) y alcoholes grasos (25.9%), así como también se observaron derivados de quinolizidina (12.5%) y de lupeol (19.4%). Existen estudios en los que derivados de quinolizidina (peletierina), extraída de *Punica granatum* con fines antihelmínticos, son usados en medicina veterinaria (Farook y col 2009). No

se encontraron reportes que relacionen algún compuesto derivado de quinolizidina contra *G. duodenalis*.

En cuanto a la actividad biológica de los componentes mayoritarios en el EH-G (*i.e.*, vitamina E, lupenona, lupeol y ácidos grasos), ya ha sido ampliamente reportada. Katekhaye y col (2016) demostraron el potencial inhibitorio de la enzima α -glucosidasa y α -amilasa el extracto en éter de petróleo de la corteza de *P. dulce* (guamúchil) (0.5, 1, 2 y 4 mg/mL), y sugieren que dicho extracto tiene potencial como tratamiento eficaz para la diabetes mellitus. En dicho estudio se aislaron y caracterizaron dos triterpenoides, lup 20(29)-en y lupeol, junto con dos compuestos de hidrocarburos de cadena larga, ácido láurico (ácido dodecanoico) y metiltetracosanoato; a los cuales se les podría atribuir dicha actividad. El lupeol aislado y caracterizado en el estudio referido coincide con el identificado en el presente trabajo de investigación. El lupeol y compuestos relacionados poseen una diversa gama de otras actividades biológicas; por ejemplo, antiprotozoarios, antiinflamatoria, antitumoral y quimiopreventiva (Wal y col 2011); sin embargo, aún no se ha demostrado su actividad contra *G. duodenalis*.

En los extractos metanólicos de nanchi derivatizados (**Cuadros 20 y 21**) predominaron azúcares (EM-Nd 26% y EM-DNd 77.4%) y compuestos derivados del ácido ursólico (EM-Nd 45.4%). Entre las categorías de productos naturales, los triterpenoides representan una gran familia de compuestos y comprenden más de 20000 triterpenoides identificados, incluyendo al ácido ursólico. En décadas recientes se ha realizado una extensa investigación para demostrar el potencial farmacológico mediado por ácido ursólico y sus derivados (Kashyap y

col 2016). El potencial antiparasitario que presentaron los extractos EM-N y EM-Nd podría atribuirse a la presencia del derivado de ácido ursólico (**Cuadros 20 y 21**), considerando los reportes previos que demuestran su actividad antiparasitaria (e.g., antihelmíntica y antiprotozoal). Pandey y col (2016) aislaron ácido ursólico del extracto etanólico de hojas de albahaca morada (*Ocimum sanctum*) y demostraron su actividad antihelmíntica contra gusanos adultos de *Pheretima postuma* (evaluado a 25 mg/mL), los resultados indicaron que el ácido ursólico tiene un alto poder para paralizar (20 min) y matar al parásito (30 min). También se ha evaluado la actividad antiprotozoal *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Miconia langsdorffii* contra *L. amazonensis*. El compuesto aislado, ácido ursólico, presentó actividad moderada en comparación con los fármacos antileishmanianos actualmente empleados. De manera interesante, estos compuestos presentaron baja toxicidad, lo que permite sugerir que el ácido ursólico y sus derivados resulten particularmente interesantes para el desarrollo de nuevos agentes antiprotozoarios (Cargnin y Gnoatto 2017).

F CUANTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES ASOCIADOS A LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA CONTRA *Hymenolepis nana*

Los taninos son compuestos fenólicos con un peso molecular usualmente comprendido entre 500 y 3000 Da. Se clasifican estructuralmente en taninos condensados (proantocianidinas) y taninos hidrolizables (derivados de ácido gálico y elágico) (Ricco 2006; Dhakal y col 2015).

El análisis fitoquímico de los extractos con actividad antiparasitaria contra *H. nana* (i.e., EA-G y EA-DG) mostró la presencia de taninos condensados, por lo que se realizó la cuantificación de los mismos mediante el método de vainillina (Price y col 1978).

El extracto con mayor actividad, EA-DG, presentó mayor cantidad de taninos, en comparación con el EA-G (16.65 y 6.15 mg EC /100 mg b.s., respectivamente) (**Cuadro 22**). La purificación por Sephadex LH-20 del EA-DG derivó en una fracción metanólica (EA-DGm) y una acetónica (EA-DGa), el mayor contenido de taninos lo presentó la fracción EA-DGa (19.56 mg EC /100 mg b.s.). La actividad antiparasitaria de taninos ya ha sido reportada, Hossain y col (2015) asociaron la actividad antihelmíntica contra *Tubifex tubifex* y el contenido de taninos de diferentes extractos de hojas de *Hopea odorata*, reportando que el extracto con mayor contenido de taninos (96.99 mg EC/gramo de extracto), presentó la mejor actividad antihelmíntica con tiempos de parálisis y muerte de 4 y 7.5 min, respectivamente.

Algunos fármacos actúan dañando la cutícula del parásito, lo que lleva a una digestión o rechazo parcial del parásito mediante mecanismos inmunitarios. Sin embargo, la deficiente comprensión de sus mecanismos de acción retrasa los esfuerzos en la elaboración de fármacos capaces de combatir el problema de resistencia que actualmente se presenta (Doenhoff y col 2008).

Cuadro 22. Contenido de taninos condensados del extracto acuoso (EA) de harina de corteza de guamúchil (G), activo contra *Hymenolepis nana*, y de sus fracciones ¹

Planta	Extracto/Fracción	mg EC /100 mg b.s. ²
Guamúchil	EA-G	6.15 ± 1.74
	EA-DG	16.65 ± 3.29
	EA-DGm	4.60 ± 2.02
	EA-DGa	19.56 ± 4.56

¹ El extracto se preparó a partir de harina de corteza sin desgrasar (G) y desgrasada (DG).

² Los valores son la media ± la desviación estándar de dos ensayos independientes por triplicado. Miligramos equivalentes de catequina/100 miligramos en base seca (mg EC/100 g b.s.)

En cuanto a los posibles mecanismos de acción de polifenoles naturales presentes en productos alimenticios, bebidas y plantas medicinales, existen evidencias de que pueden actuar como antioxidantes y/o formando complejos con iones metálicos o con macromoléculas (*i.e.*, péptidos, proteínas y polisacáridos) (Ferreira 2002).

El mecanismo de acción de los taninos condensados contra *H. nana* se desconoce; sin embargo, se ha sugerido que los taninos condensados interfieren con la generación de energía del parásito, desacoplando la fosforilación oxidativa, o uniéndose a la proteína libre en el tracto gastrointestinal del hospedero, o bien, a la glicoproteína en la cutícula del parásito, provocando su muerte (Hossain y col 2015).

Las fracciones obtenidas de la purificación por Sephadex (*i.e.*, EA-DGm y EA-DGa) se analizaron por espectrometría de masas mediante inserción directa modo negativo, en un rango de masas de 70 a 2000 Da. Los espectros de masas fueron claramente diferentes (**Figuras 18 y 19**). En la fracción metanólica EA-DGm se observó un ión principal de $m/z = 377$ u, y señales de menor intensidad correspondiente a proantocianidinas (**Figura 18-a**). La fragmentación del ión principal (MS^2) generó un ión de $m/z = 341$ u ($377 - 36$) asociado a la pérdida de un átomo de cloro (**Figura 18-b**), por lo que el ión de $m/z = 377$ podría corresponder a un aducto con cloro $[(M - H) + Cl]^-$. La posterior fragmentación (MS^3) de ión 341 $[M - H]^-$ generó un ión principal de $m/z = 179$ $[M - H -$

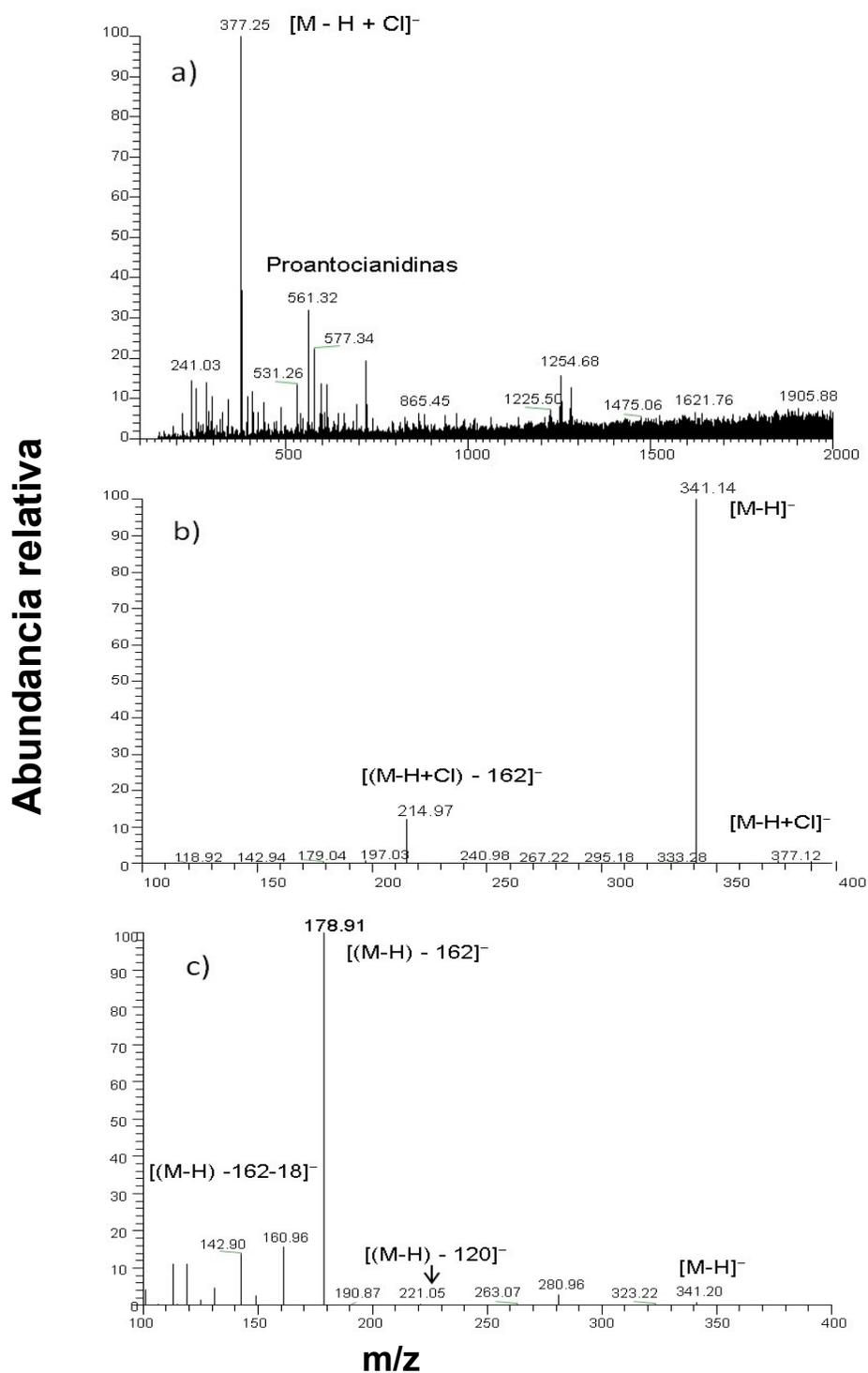


Figura 18. Espectro de masas mediante inserción directa en modo negativo de la subfracción metanólica del extracto acuoso de harina desgrasada de guarúchil (EA-DGm): se observa un ión principal de $m/z = 377$ u (**a**); fragmentación del ión principal (MS^2) generó un ión de $m/z = 341$ u ($377 - 36$), asociado a la pérdida de un átomo de cloro (**b**); fragmentación (MS^3) de ión 341 $[M-H]^-$ generó un ión principal de $m/z = 179$ $[M - H - 162]^-$ (100%), atribuido a la presencia de un residuo de ácido caféico (**c**).

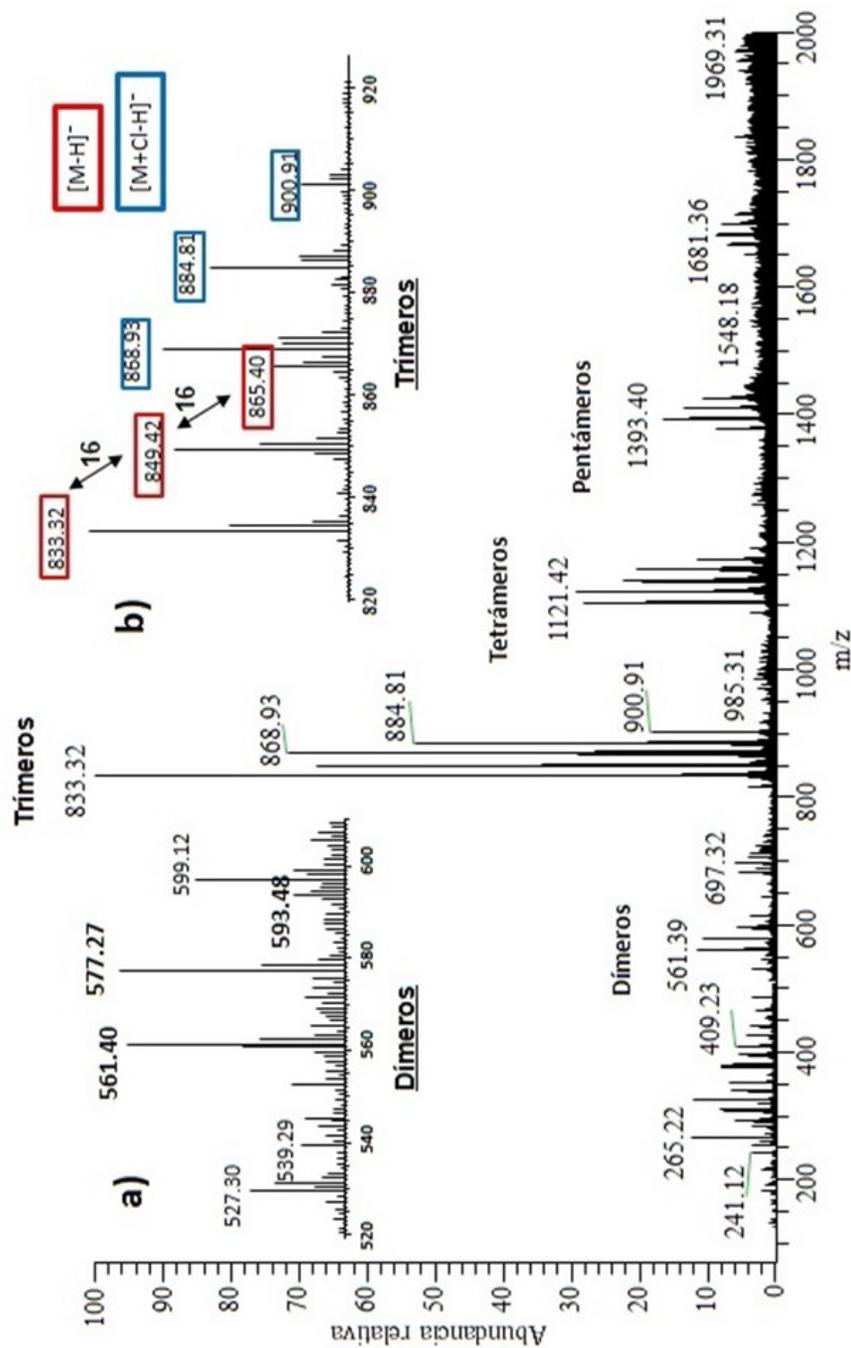


Figura 19. Espectro de masas mediante inserción directa en modo negativo de la subfracción acetónica del extracto acuoso de harina desgrasada de guamúchil EA-DGa. Se observan paquetes de señales para dímeros hasta pentámeros. En la ampliación de la región de dímeros se observan masas para tres combinaciones de unidades de (epi)afzelequina, (epi)catequina y/o (epi)galocatequina. En la ampliación de la región de trímeros se observan dos paquetes de señales correspondientes a los iones negativos $[M-H]^-$ y a los mismos formados aductos con cloro $[M+Cl-H]^-$.

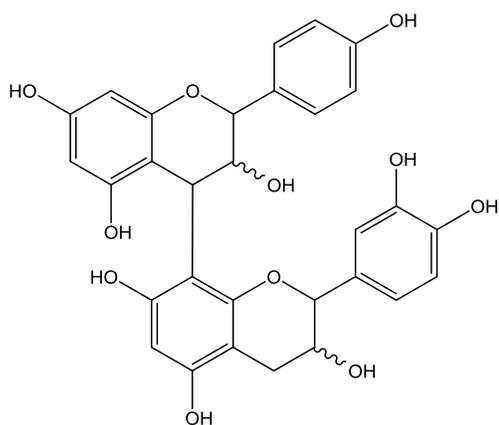
162]⁻ (100%), atribuido a la presencia de un residuo de ácido cafeico, resultado de la pérdida de una hexosa, y otros de menor intensidad de $m/z = 221 [M - H - 120]^-$, 161 $[M - H - 162 - 18]^-$, 143 $[M - H - 162 - 2(18)]^-$, 118 y 113 u (**Figura 18-c**). Dicho patrón de fragmentación ha sido reportado para el ácido cafeico-O-hexósido (Parejo y col 2004; Gouveia y Castilho 2011).

En cuanto al análisis de la fracción EA-DGa, el espectro de masas de primer orden en modo negativo, registra paquetes de señales para dímeros hasta pentámeros (**Figura 19**). En cada paquete de señales se observó diferencia de 16 Da entre cada pico, atribuido a la diferencia en el número de grupos hidroxilo presentes en el anillo B del monómero. Se observaron diferencias en las unidades de masa en las series de 272, 288 y 305 Da, correspondientes a unidades de (epi)afzelequina (A), (epi)catequina (B) y (epi)galocatequina (C) (**Figura 20**). En la región de los dímeros se observaron masas para las tres combinaciones de dichas unidades monoméricas (**Figura 19-a**). En la ampliación de la región de los trímeros (**Figura 19-b**) se observan dos series, con diferencia de 35 Da entre ellas, una correspondiente a los iones negativos $[M - H]^-$ y otra para los mismos formando aductos con cloro $[M - H + Cl]^-$.

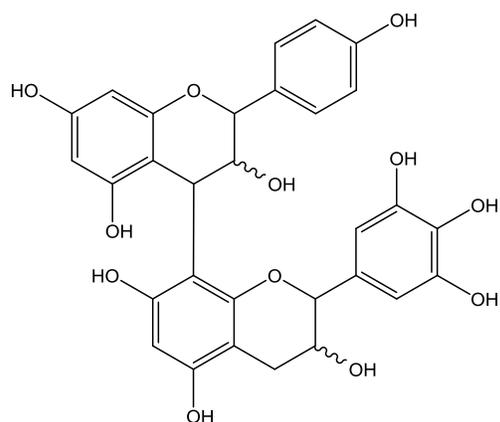
Las combinaciones de las masas de las unidades monoméricas (A, B y C) se utilizaron para calcular las masas esperadas y compararlas con las observadas en el espectro de masas de acuerdo a la expresión:

$$[M - H]^- = 2(2 \text{ H de unidades terminales}) + 272A + 288B + 304C - 1$$

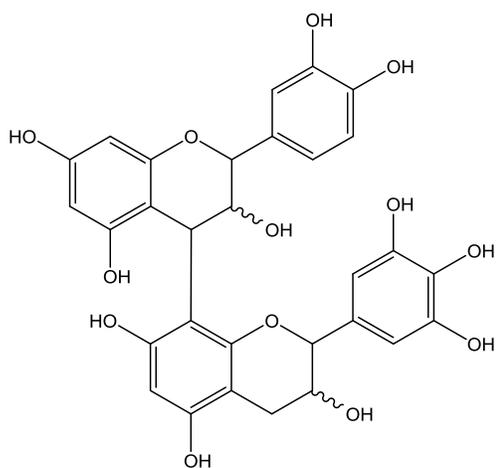
O en el caso de los aductos con cloro:



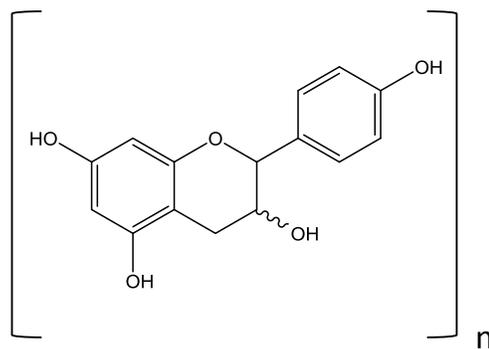
(epi)afzelequina - (epi)catequina



(epi)afzelequina - (epi)galocatequina



(epi)catequina - (epi)galocatequina



(epi)afzelequina

Unida extensora

Figura 20. Dímeros identificados en el subfracción acetónica del extracto acuoso de la harina desgrasada de guamúchil (EA-DGa).

Formados por unidades de (epi)afzelequina (274.46 g/mol), (epi)catequina (290.26 g/mol) y/o (epi)galocatequina (306.26 g/mol). En polímeros (dímeros hasta pentámeros) la unidad extensora es (epi)afzelequina.

$$[M - H + Cl]^- = 35(Cl) + 2(2 \text{ H de unidades terminales}) + 272A + 288B + 304C - 1$$

En el **Cuadro 23** se indican solo las combinaciones que coinciden con las masas presentes en el espectro, identificando desde dímeros hasta pentámeros. Se observaron diferentes combinaciones de las unidades monoméricas A, B y C, para los grados de polimerización identificados.

En el espectro MS² del ion [M - H]⁻ de *m/z* 833 (**Figura 21**) se observan iones principales a *m/z* = 561 [(M - H) - 272]⁻ y 529 [(M - H) - 272 - 2(16)]⁻, correspondientes a la pérdida de (epi)afzelequina y de grupos OH⁻. Adicionalmente, se observaron iones a *m/z* = 681 [(M - H) - 152]⁻, y 409 [(M - H) - 272 - 152]⁻, asignados a una ruptura retro-Diels-Alder del anillo B de la unidad de (epi)catequina, en el trímero y dímero respectivamente. La presencia de (epi)catequina se confirmó con el ión a *m/z* = 289 [Cat - H]⁻.

Las proantocianidinas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y a menudo son compuestos activos de plantas medicinales. Estudios diversos demuestran actividades biológicas atribuidas a proantocianidinas (*i.e.*, propiedades antivirales, antibacterianas, moluscidas, inhibidoras de enzima y antioxidantes) (Ferreira 2002). Foo y col (2000), establecieron que las catequinas, un tipo de proantocianidinas o taninos condensados, son compuestos con actividad inhibidora de la adherencia de bacterias como *E. coli* a las células epiteliales; éstos fueron oligómeros y polímeros del flavan-3-ol, que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Las unidades de flavan-

Cuadro 23. Masas calculadas y observadas por MS-ESI para los taninos obtenidos de la subfracción acetónica de EA-DG_a

Grado de polimerización	Unidad monomérica ¹			[M-H] ⁻		[M+Cl-H]	
	A	B	C	Calculado ²	Observado	Calculado ³	Observado
Dímeros	1	1	0	561	561.4	NP	NP
	1	0	1	577	577.27	NP	NP
	0	1	1	593	593.48	NP	NP
Trímeros	2	1	0	833	833.32	868	868.93
	2	0	1	849	849.42	884	884.81
	1	2	0	849	849.42	884	884.81
	1	1	1	865	865.4	900	900.91
Tetrámeros	2	1	1	1137	1137*	1172	1172*
	3	1	0	1105	1105*	1140	1140*
	3	0	1	1121	1121.42	1156	1156*
Pentámeros	4	1	0	1377	1377*	NP	NP
	4	0	1	1393	1393.4	NP	NP
	3	1	1	1409	1409*	NP	NP

¹ **A:** afzelequina/epiafzelequina (272 Da), **B:** galato de catequina/ epicatequina (288 Da), **C:** galato de galocatequina/ epigalocatequina (304 Da).

² $[M-H]^- = 2(2 \text{ H de unidades terminales}) + 272A + 288B + 304C - 1$.

³ $[M+Cl-H]^- : 35 (Cl^-) 2(2 \text{ H de unidades terminales}) + 272A + 288B + 304C - 1$.

NP: No presentaron aductos con cloro $[M+Cl-H]^-$.

*No se observa valor exacto de la señal presente en el espectro.

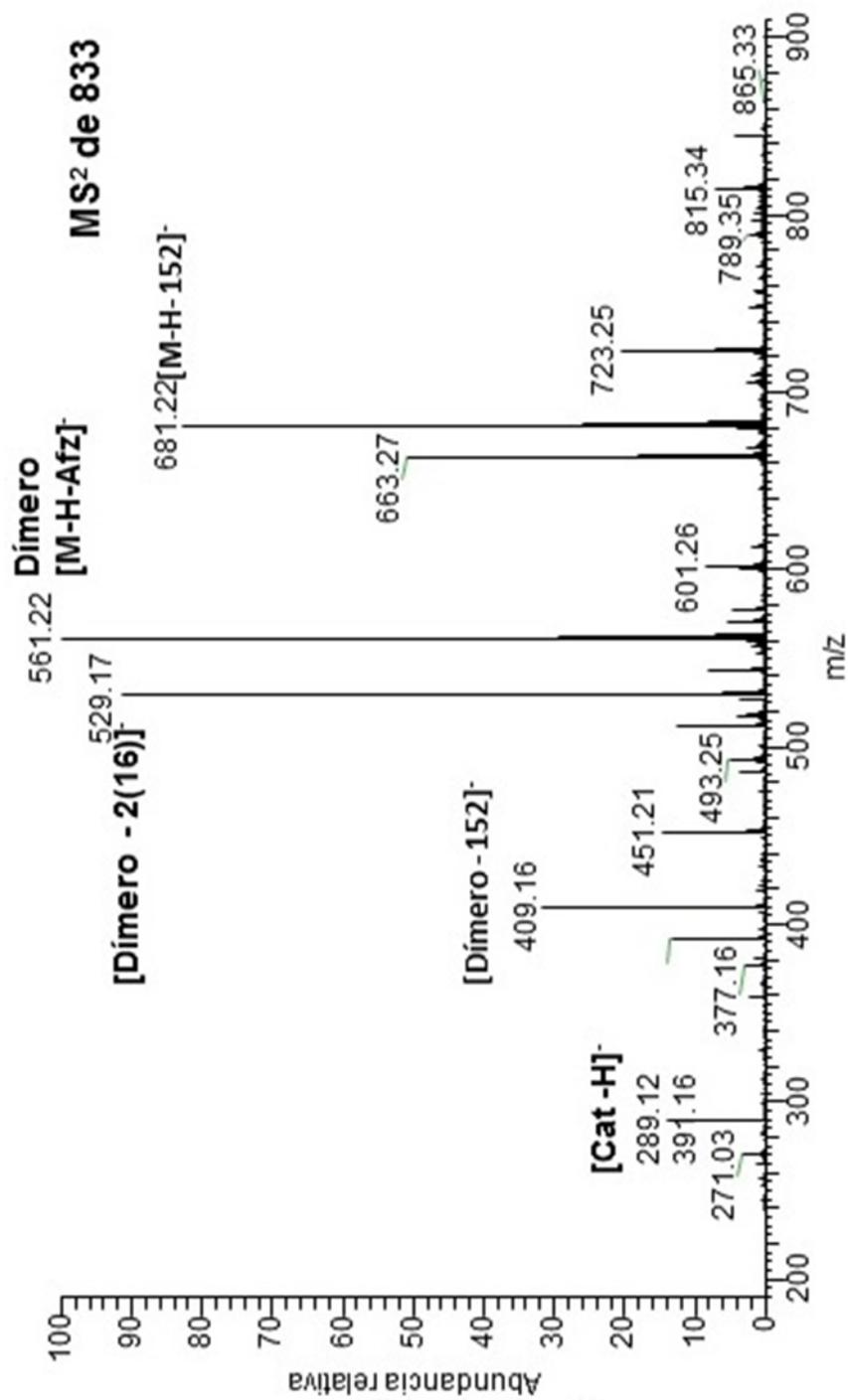


Figura 21. MS² del ión [M-H]⁻ 833. Entre las señales principales se indica la pérdida de afelequina (Afz), pérdidas de agua, y el ión correspondiente a la unidad de (epi) catequina (Cat).

3-ol más abundantes en la naturaleza son: (+)-afzelequina, (+)-catequina, (+)-galocatequina y sus diastereoisómeros. Resultados similares a los encontrados en la presente investigación, fueron reportados para la corteza de *Maytenus buxifolia* por Méndez Rodríguez (2016), identificando los monómeros (epi)afzelequina, (epi)catequina, (epi)galocatequina y 4'-metil- (epi)catequina, así como siete dímeros, ocho trímeros y cinco tetrámeros formados por la combinación de dichas unidades monoméricas. Sternberg (1997), demostró la presencia natural de las primeras profisetinidinas oligoméricas en corteza de *Pithecellobium dulce* (Guamúchil), las cuales son de gran importancia económica en la industria de los taninos comerciales.

En la actualidad, el uso de compuestos vegetales, tales como taninos condensados (proantocianidinas) como agentes antiparasitarios ha recibido un renovado interés debido a la resistencia de parásitos a los tratamientos disponibles actualmente, así como a las preocupaciones sobre los residuos de fármacos derivados del uso profiláctico de drogas sintéticas en sistemas de producción de alimentos de origen animal destinados al consumo humano (Williams y col 2014).

G EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD MEDIANTE EL BIOENSAYO CON *Artemia salina*

Debido a que los principios activos provenientes de plantas pueden ser tóxicos a altas concentraciones, la toxicidad es uno de los principales parámetros a evaluar. Extractos con actividad antiparasitaria podrían utilizarse en el

tratamiento de enfermedades parasitarias, por eso, resulta necesario confirmar su inocuidad. De los extractos evaluados contra *H. nana* y *G. duodenalis*, EM-N, EM-DN, EH-N, EH-G, y EA-DG fueron los que presentaron mayor actividad antiparasitaria. Considerando los valores de CL_{50} de estos extractos contra *A. salina*, los extractos de nanchi fueron de prácticamente no tóxico (EH-N) a moderadamente tóxico (EM-DN); mientras que para los de guamúchil, el EH-G fue relativamente inocuo y el EA-DG fue altamente tóxico (**Cuadro 24**).

El ensayo de toxicidad con *Artemia salina* se utiliza ampliamente como estudio preliminar para establecer la toxicidad de productos de origen natural; es un método económico, seguro, eficaz y práctico; también se ha usado para la búsqueda de compuestos bioactivos. Los extractos fueron evaluados hasta 2 mg/mL, de acuerdo a la escala propuesta por Meyer (1982) y Sanabria-Galindo (1997) para extractos de plantas, aquellos extractos que presentan una dosis letal media arriba de 2 mg/mL ($CL_{50} > 2000$ ppm) se consideran no tóxicos. Además, los nauplios de *Artemia salina* son sensibles a una gran variedad de sustancias químicas, por ello se considera un ensayo útil en la evaluación preliminar de toxicidad en extractos de plantas (Solis y col 1993).

Cuadro 24. Toxicidad (CL₅₀), en el ensayo de *Artemia salina*, de los extractos metanólicos (EM), hexánicos (EH), y acuosos (EA) de harinas de cortezas de nanchi de la costa (N) y guamúchil (G) que mostraron actividad antiparasitaria ¹

Planta	Extracto		CL₅₀(µg/mL)²	Clasificación³
Nanchi de la costa	Metanólico	EM-N	618.8	Ligeramente tóxico
		EM-DN	273.9	Moderadamente tóxico
	Hexánico	EH-N	1261.3	Prácticamente no tóxico
Guaew3múchil	Acuoso	EA-DG	60.4	Altamente tóxico
	Hexánico	EH-G	2192.8	Relativamente inocuo

¹ Los extractos se obtuvieron a partir de harina sin desgrasar (N y G) y desgrasada (DN y DG)

² CL₅₀: concentración letal media. Se presenta la media de dos ensayos independientes, por triplicado

³ Clasificación toxicidad según el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED)

La letalidad en este ensayo podría ser un parámetro que sugiere distintas actividades biológicas (Klare y col 2003), mientras que el estudio de toxicidad se considera esencial durante la identificación y aislamiento de nuevos compuestos a partir de extractos crudos (Sasidharan y col 2008).

En estudios previos, Olajuyigbe y Afolayan (2012) demostraron actividad citotóxica contra *A. salina* (CL₅₀ 90.27 µg/mL) del extracto acetónico de la corteza de *Zizyphus mucronata*, presentando mayor toxicidad que los extractos de nanchi (*Z. sonorensis*) (**Cuadro 24**). La citotoxicidad del extracto EA-DG (CL₅₀ 60.4 µg/mL) fue menor a la registrada por Biswas y col (2015) para un extracto etanólico de hoja de guamúchil (CL₅₀ 20 µg/mL). Estos cambios podrían deberse al tiempo y ubicación de la recolección, el órgano o tejido de la planta y el disolvente utilizado para la extracción.

El estudio fitoquímico de EA-DG fue positivo para taninos, a los cuales se les podría asociar la toxicidad mostrada durante el ensayo de *A. salina*.

Los resultados de CL₅₀ que proporciona este ensayo no establecen alguna actividad fisiológica o biológica en específico; sólo indican toxicidad a nivel celular, que pueden orientar para investigaciones más específicas (Sánchez y Neira 2006). Por lo que son necesarios estudios de toxicidad en un organismo más complejo. Uno de los métodos más utilizados es el establecido por Lorke (1983) en un modelo de ratón.

H DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LD₅₀) POR MÉTODO DE LORKE

En la evaluación de la toxicidad por el método de Lorke del extracto con mayor actividad contra *H. nana* (*i.e.*, EA-DG), en la primera etapa (dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg de peso) no se registró mortalidad en las 24 h posteriores a administrar la dosis. Por lo que se procedió a la segunda etapa (dosis de 1600, 2900 y 5000 mg/kg de peso), la dosis más alta fue letal a los 60 min; pero a 2900 mg/kg, los ratones permanecieron vivos durante las 24 h del ensayo; sin embargo, durante las primeras 2 h se observaron algunos signos negativos, los ratones mostraron pérdida de apetito, debilidad, dificultad para moverse, y respirar; posteriormente los ratones recuperaron su comportamiento normal. El valor LD₅₀ determinado para EA-DG fue de 3807.89 mg/kg de peso.

En lo que respecta a la toxicidad del extracto más activo contra *G. duodenalis* (*i.e.*, EH-N), por problemas de solubilidad sólo fue posible evaluarse a una dosis de 1000 mg/kg de peso; a esta dosis, los ratones permanecieron vivos durante las 24 h posteriores a la administración y sin signos de toxicidad (*i.e.*, pérdida de apetito, debilidad, dificultad para moverse y respirar).

En la literatura se encuentran reportes donde evalúan la toxicidad de extractos por diferentes métodos. Rahman (2011), evaluó la toxicidad aguda del extracto etanólico de corteza de *Zizyphus mauritiana*, los animales mostraron sólo una disminución de la movilidad sin mortalidad, incluso en la mayor dosis evaluada (4000 mg/kg). Otro trabajo de investigación evaluó la toxicidad aguda

del extracto metanólico de hojas de *Adhatoda vasica* y no se registraron signos adversos (*i.e.*, pérdida de apetito, debilidad, alteración en la temperatura corporal) aún a la mayor dosis evaluada (3200 mg/kg) (Yadav y Tangpu 2008). Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación para los extractos EH-N y EA-DG, evaluados a 1000 y 2900 mg/kg de peso, respectivamente. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que los extractos evaluados en este ensayo son inocuos y que su consumo es seguro (Lorke 1983). Además, la ausencia de mortalidad en los 21 días posteriores a la aplicación del tratamiento soporta la inocuidad de los extractos.

VIII CONCLUSIONES

Los resultados soportan el uso etnofarmacológico de extractos de la corteza de nanchi de la costa contra *Giardia duodenalis* y de la corteza de guamúchil contra *Hymenolepis nana*.

En relación a la actividad contra *Giardia duodenalis*, los compuestos responsables de la actividad son de polaridad baja a media, y el extracto hexánico de nanchi (EH-N) tiene mayor potencial para tratar la giardiosis que otros extractos de nanchi o de guamúchil.

Los componentes polares de la corteza de guamúchil tienen un mayor potencial para tratar la hymenolepiosis por *Hymenolepis nana*, el extracto acuoso de harina desgrasada de corteza de guamúchil (EA-DG) mostró mayor actividad *in vitro* que el antiparasitario de elección Praziquantel.

El análisis fitoquímico sugiere que la actividad contra *Giardia duodenalis* del extracto hexánico de guamúchil se debe a la presencia de triterpenos o esteroides; mientras que la actividad contra *Hymenolepis nana* puede deberse a su contenido de saponinas y taninos.

Los extractos con actividad anti-*Giardia* presentaron compuestos con relevancia terapéutica, como terpenos (e.g., sitosterol, lupeol, lupenona y derivados del ácido ursólico), ácidos grasos, compuestos fenólicos y flavonoides.

El análisis por espectrometría de masas de las subfracciones de guamúchil con mayor actividad antiparasitaria (i.e., EA-DGm y EA-DGa) sugiere que los

compuestos responsables de esta actividad son proantocianidinas (taninos condensados), formadas por mezclas desde dímeros hasta pentámeros de unidades monoméricas de (epi)afzelequina, (epi)catequina y/o (epi)galocatequina; así como derivados del ácido caféico.

En el ensayo de toxicidad con *Artemia salina*, los extractos de nanchi de la costa con actividad anti-*Giardia* resultaron inocuos mientras que el extracto acuoso de guamúchil con actividad contra *H. nana* fue tóxico.

La evaluación de toxicidad, mediante el método de Lorke, sugiere la inocuidad de los extractos hexánico de nanchi de la costa (EH-N) y acuoso de la harina desgrasada de guamúchil (EA-DG).

PERSPECTIVAS

Demostrar la actividad antiparasitaria de componentes específicos en los extractos con mayor actividad contra *Hymenolepis nana* y *Giardia duodenalis*.

Demostrar la actividad antiparasitaria de los extractos activos en modelos *in vivo*.

Determinar otras actividades biológicas (*i.e.*, antibacterianas, antimutagénicas e inhibitoria de α -glucosidasa) para los extractos que presentaron actividad antiparasitaria (EM-N, EM-DN, EH-N, EH-G y EA-DG).

IX BIBLIOGRAFIA

- Abdel-aziz MA, Afifi AA, Malik EM. 2010. Intestinal protozoa and intestinal helminthic infections among schoolchildren in Central Sudan. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3(4):292-293.
- Abdel-Zaher AO, Salim SY, Assaf MH, Abdel-Hady RH. 2005. Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina-christi* leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 101(1-3):129-138.
- Adzu B, Amos S, Amizan M, Gamaniel K. 2003. Evaluation of the antidiarrhoeal effects of *Zizyphus spina-christi* stem bark in rats. *Acta Tropica* 87(2):245-250.
- Adzu B, Amos S, Dzarma S, Wambebe C, Gamaniel K. 2002. Effect of *Zizyphus spina-christi* Willd aqueous extract on the central nervous system in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 79(1):13-16.
- Adzu B, Amos S, Wambebe C, Gamaniel K. 2001. Antinociceptive activity of *Zizyphus spina-christi* root bark extract. *Fitoterapia* 72(4):344-350.
- Al-Megrin W. 2016. Efficacy of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract against *Hymenolepis nana* in infections mice. *Biosciences, Biotechnology Research Asia* 13(1):103-108.
- Ali V, Nozaki T. 2007. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by "amitochondriate" protozoan parasites. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1):164-187.
- Ansell BR, McConville MJ, Ma'ayeh SY, Dagley MJ, Gasser RB, Svård SG, Jex AR. 2015. Drug resistance in *Giardia duodenalis*. *Biotechnol Adv* 33(6):888-901.

- Argüeta V, Cano A., y Rodarte Me. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo I, II y III. Instituto Nacional Indigenist. México. 680 p.
- Bachaya HA, Iqbal Z, Khan MN, Sindhu ZU, Jabbar A. 2009. Anthelmintic activity of *Ziziphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against *Trichostrongylid* nematodes of sheep. *Journal of Ethnopharmacology* 123(2):325-329.
- Baldursson S, Karanis P. 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research* 45(20):6603-6614.
- Balick MJ, Cox PA. 1996. Plants, people, and culture: the science of ethnobotany. Scientific American Library.
- Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan R. 2006. Multidrug resistance in amoebiasis patients. *The Indian Journal of Medical Research* 124(2):189-194.
- Baqai R, Zuberi S, Qureshi H, Ahmed W, Hafiz S. 2001. Efficacy of albendazole in giardiasis.
- Bendesky A, Menéndez D. 2001. Metronidazol: una visión integral. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 44(6):255-259.
- Biswas S, Rashid MHU, Huque A, Bhuiyan JR. 2015. Phytochemical screening and analgesic, anti-bacterial and cytotoxic activity evaluation of ethanol extract of *Pithecellobium dulce* (roxb.) benth leaf. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8(2):451-457.
- Borjas P, Arenas F, Angulo Y. 2009. Enteroparasitismo en niños y su relación con la pobreza y estado nutricional. *Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana* 14(1):49-54.

- Botero D, Parra R, Restrepo GJ, McGarry J, Georgi JRG. 2003. Parasitosis humanas. Organización Mundial de la Salud.
- Bundy DA, Kremer M, Bleakley H, Jukes MC, Miguel E. 2009. Deworming and development: asking the right questions, asking the questions right. PLoS Neglected Tropical Diseases 3(1):e362.
- Camacho-Corona MR, Garcia A, Mata-Cardenas BD, Garza-Gonzalez E, Ibarra-Alvarado C, Rojas-Molina A, Rojas-Molina I, Bah M, Sanchez MAZ, Gutierrez SP. 2015. Screening for antibacterial and antiprotozoal activities of crude extracts derived from Mexican medicinal plants. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 12(3):104.
- Caniato R, Puricelli L. 2003. Review: Natural Antimalarial Agents (1995-2001). Critical Reviews in Plant Sciences 22(1):79-105.
- Cargnin ST, Gnoatto SB. 2017. Ursolic acid from apple pomace and traditional plants: A valuable triterpenoid with functional properties. Food Chemistry 220:477-489.
- CDC. 2012. Hymenolepiasis. Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en <http://www.cdc.gov/parasites/hymenolepis/>.
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. En: Capital Nat. México. CONABIO, MC, editor.
- Cox FEG. 2002. History of Human Parasitology. Clinical Microbiology Reviews 15(4):595-612.
- Cheng G, Bai Y, Zhao Y, Tao J, Liu Y, Tu G, Ma L, Liao N, Xu X. 2000. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*. Tetrahedron 56(45):8915-8920.

- Chero JC, Saito M, Bustos JA, Blanco EM, Gonzalvez G, Garcia HH. 2007. *Hymenolepis nana* infection: symptoms and response to nitazoxanide in field conditions. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 101(2):203-205.
- Chin Y-W, Balunas MJ, Chai HB, Kinghorn AD. 2006. Drug discovery from natural sources. The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal 8(2):E239-E253.
- Chouaibi M, Mahfoudhi N, Rezig L, Donsi F, Ferrari G, Hamdi S. 2012. Nutritional composition of *Zizyphus lotus* L. seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture 92(6):1171-1177.
- Dávila-Gutiérrez C, Trujillo-Hernández B, Vásquez C, Huerta M. 2001. Prevalencia de parasitosis intestinales en niños de zonas urbanas del estado de Colima, México. Boletín Médico del Hospital Infantil de México 58(4):234-239.
- Deori K, Yadav AK. 2016. Anthelmintic effects of *Oroxylum indicum* stem bark extract on juvenile and adult stages of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda), an *in vitro* and *in vivo* study. Parasitology Research 115(3):1275-1285.
- Dhakal S, Meyling NV, Williams AR, Mueller-Harvey I, Fryganas C, Kapel CM, Fredensborg BL. 2015. Efficacy of condensed tannins against larval *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) *In vitro* and in the intermediate host *Tenebrio molitor* (Coleoptera) *In vivo*. Veterinary parasitology 207(1):49-55.
- Di Lernia V, Ricci C, Albertini G. 2004. Skin eruption associated with *Hymenolepis nana* infection. International Journal of Dermatology. 43(5):357-359.

- Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current opinion in Infectious Diseases* 21(6):659-667.
- Domínguez-Carmona DB, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Ruiz-Pinell G, Gutierrez-Yapu D, Chan-Bacab MJ, Giménez-Turba A, Peña-Rodríguez LM. 2010. Antiprotozoal activity of Betulinic Acid derivatives. *Phytomedicine* 17(5):379-382.
- Dyab AK, Yones DA, Ibraheim ZZ, Hassan TM. 2016. Anti-giardial therapeutic potential of dichloromethane extracts of *Zingiber officinale* and *Curcuma longa* *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology Research* 115(7):2637-2645.
- Elhadi IM, Koko WS, Dahab MM, El Imam YM, El Mageed MAEA. 2013. Antigiardial activity of some *Cucurbita* species and *Lagenaria siceraria*. *Laboratory Animals* 3:8.
- Farook JM, Lewis B, Gaddis JG, Littleton JM, Barron S. 2009. Lobeline, a nicotinic partial agonist attenuates alcohol consumption and preference in male C57BL/6J mice. *Physiology & Behavior* 97(3):503-506.
- Ferreira D, Slade, D. 2002. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. *Natural Product Reports* 19(5):517-541.
- Ferreira ME, de Arias AR, Yaluff G, de Bilbao NV, Nakayama H, Torres S, Schinini A, Guy I, Heinzen H, Fournet A. 2010. Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. *Phytomedicine* 17(5):375-378.
- Flores LM, Vega Aviña R, Benítez Pardo D, Hernández Álvarez F. 1996. Flora de Isla Venados, bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Anales del Instituto de Biología serie Botánica* 67(002):238-301.

- Foo LY, Lu Y, Howell AB, Vorsa N. 2000. A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-Fimbriated *Escherichia coli*. *Journal of Natural Products* 63(9):1225-1228.
- Gadelha AP, Vidal F, Castro TM, Lopes CS, Albarello N, Coelho MG, Figueiredo SF, Monteiro-Leal LH. 2005. Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts. *Parasitology Research* 97(5):399-407.
- Gamboa MI, Zonta L, Navone GT. 2010. Parásitos intestinales y pobreza: la vulnerabilidad de los más carenciados en la Argentina de un mundo globalizado. *Journal of the Selva Andina Research Society* 1(1):23-37.
- García LE, Hernández J, Olivares KV, Cantú JH. 2004. Prevalencia de parasitosis intestinales en niños en edad preescolar de Escobedo, NL. *Bioquímica* 29(99):99.
- Ghorbani A, Naghibi F, Mosaddegh M. 2006. Ethnobotany, ethnopharmacology and drug discovery. *Iran Journal Pharmaceutical Science* 2:109-118.
- González J SJ, Contreras J L, Crutchfield J, Gregory D P, Tenorio P Velarde J L. 2009. Corongoro *Ziziphus amole* (Ssssé & Moc.) C. Johnston. . Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Disponible en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=733>.
- Gouveia S, Castilho PC. 2011. Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of *Helichrysum obconicum* by a RP-HPLC–DAD–(–)–ESI–MSn method. *Food Chemistry* 129(2):333-344.

- Guevara Y, De Haro I, Cabrera M, García de la Torre G, Salazar-schettino PM. 2003. Enteroparasitosis en poblaciones indígenas y mestizas de la Sierra de Nayarit, México. *Parasitología Latinoamericana* 58(1-2):30-34.
- Harborne JB. 1984. *Methods of Plant Analysis*. Springer.
- Hossain MM, Kabir MSH, Chowdhury TA, Hasanat A, Chakrabarty N. 2015. Anthelmintic effects of different extracts of *Hopea odorata* leaves on *Tubifex tubifex* worm using *in vitro* method and their condensed tannin content. *British Journal of Pharmaceutical Research* 8(3):1-7.
- Hosseinzadeh S, Ghalesefidi MJ, Azami M, Mohaghegh MA, Hejazi SH, Ghomashlooyan M. 2016. *In vitro* and *In vivo* anthelmintic activity of seed extract of *Coriandrum sativum* compared to Niclosamid against *Hymenolepis nana* infection. *Journal of Parasitic Diseases :official organ of the Indian Society for Parasitology* 40(4):1307-1310.
- Kabbashi AS, Almagboul AZ, Garbi MI, Osman E-bE, Koko WS, Hassan AM, Dahab MM, Abuzeid N. 2016. Antigiardial activity and cytotoxicity of ethanolic bark extract of *Acacia nilotica* (L.). *Mediterranean Journal of Biosciences* 1(4):138-146.
- Kabbashi AS, Garbi MI, Osman EE. 2015. Antigiardial, antioxidant activities and cytotoxicity of ethanolic extract of leaves of *Acacia nilotica* (L.). *Advances Medical Plant Research* 3:33-38.
- Kane SR, Mohite SK, Shete JS. 2009. Antihelmintic activity of aqueous and methanolic extracts of *Euphorbia thymifolia* linn. *International Journal PharmTech Research* 1:666-669.

- Kappagoda S, Singh U, Blackburn BG. 2011. Antiparasitic therapy. Elsevier. 561-583 p.
- Kashyap D, Tuli HS, Sharma AK. 2016. Ursolic Acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sciences* 146:201-213.
- Katekhaye SD, Laddha KS. 2015. Coumarins and a Triterpenoid from *Pithecellobium dulce*. *Chemistry of Natural Compounds* 51(5):956-958.
- Katekhaye SD, Paul A, Laddha KS. 2016. Lupane analogue from bark of *Pithecellobium dulce* and *in vitro* α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibition assay of extract for potential antidiabetic activity. *Chemistry of Natural Compounds* 52(2):359-362.
- Keister D. 1983. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 77:487-488.
- Khan. 1997. Antifungal Activity of a New Triterpenoid Glycoside from *Pithecellobium racemosum* (M.).
- Klare I, Konstabel C, Badstubner D, Werner G, Witte W. 2003. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia lanigera*. *International Journal of Food Microbiology* 88(2-3):269-290.
- Kulkarni A, Khotpal R, Bhakara H. 1991. Studies on glycolipids of kenaf, english walnut, myrobalan and manila tamarind seeds of the Vidarbha region (India). *Journal of the American Oil Chemists Society* 68(11):891-893.
- Kumar M, Nehra K. 2014. Antimicrobial activity of crude extracts of *Pithecellobium dulce* bark against various human pathogenic microbes. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3(5):1244-1260.

- Kundu S, Roy S, Lyndem LM. 2012. *Cassia alata* L: potential role as anthelmintic agent against *Hymenolepis diminuta*. Parasitology Research 111(3):1187-1192.
- Lin RJ, Chen CY, Lu CM, Ma YH, Chung LY, Wang JJ, Lee JD, Yen CM. 2014. Anthelmintic constituents from ginger (*Zingiber officinale*) against *Hymenolepis nana*. Acta Tropica 140:50-60.
- Lock. 1994. Invetigacion Fitoquimica, Metodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edicion. Fondo Editorial de la Pontifiicia Universidad Católica del Perú. 41-64 p.
- Lopez-Velez R, Batlle C, Jiménez C, Navarro M, Norman F, Perez-Molina J. 2010. Short course combination therapy for giardiasis after nitroimidazole failure. The American journal of tropical medicine and hygiene 83(1):171-173.
- Lorke D. 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. Archives of Toxicology 54(4):275-287.
- Luján HD. 2006. Giardia y giardiasis. Medicina (Buenos Aires) 66(1):70-74.
- Lumpu S, Kikueta C, Tshodi M, Mbenza A, Kambu O, Mbamu B, Cos P, Maes L, Apers S, Pieters L. 2013. Antiprotozoal screening and cytotoxicity of extracts and fractions from the leaves, stem bark and root bark of *Alstonia congensis*. Journal of Ethnopharmacology 148(2):724-727.
- Maciuk A, Lavaud C, Thépenier P, Jacquier M-J, Ghédira K, Zèches-Hanrot M. 2004. Four new dammarane saponins from *Zizyphus lotus*. Journal of Natural Products 67(10):1639-1643.
- Mahmoud A. 2014. Ginger and Cinnamon: Can this household remedy treat giardiasis? . Parasitological and Histopathological Studies.

- Manikandan PA, Jayendran M, Rajasekaran CS. 2006. Study of plants used as anti diabetic agents by the nilgiri aborigines. *Ancient Science of Life* 25(3-4):101.
- Martínez-Barbabosa I, Gutiérrez-Cárdenas EM, Gaona E, Shea M. 2010. The prevalence of *Hymenolepis nana* in schoolchildren in a bicultural community. *Revista Biomedica* 21:21-27.
- Megala J, Geetha A. 2012. Acute and sub-acute toxicity study of hydroalcoholic fruit extract of *Pithecellobium dulce*. *Natural Product Research* 26(12):1167-1171.
- Meyer BFN, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medicinal Plant Research* 45((5)):31-34.
- Mohammad M, Hegazi M. 2007. Intestinal permeability in *Hymenolepis nana* as reflected by non invasive lactulose/mannitol dual permeability test and its impact on nutritional parameters of patients. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 37(3):877-891.
- Monis PT, Caccio SM, Thompson RA. 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology* 25(2):93-100.
- Montiel-Herrera M, Campista-Leon S, Camacho-Hernandez IL, Rios-Morgan A, Delgado-Vargas F. 2005. Physicochemical and nutritional characteristics of the fruit of *Zizyphus sonorensis* S. Wats (Rhamnaceae). *International Journal of Food Science and Nutrition* 56(8):587-596.
- Morales-Espinoza EM, Sánchez-Pérez HJ, García-Gil MdM, Vargas-Morales G, Méndez-Sánchez JD, Pérez-Ramírez M. 2003. Intestinal parasites in children, in highly deprived areas in the border region of Chiapas, Mexico. *Salud Pública de México* 45(5):379-388.

- Muñetón P. 2009. Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Revista Digital Universitaria* [serie en línea]. 10(9). Disponible en <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>
- Nagmoti DM, Juvekar AR. 2013. In vitro inhibitory effects of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. seeds on intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase. *Journal of Biochemical Technology* 4(3):616-621.
- Nigam S, Gopal M, Uddin R, Yoshikawa K, Kawamoto M, Arihara S. 1997. Pithedulosides AG, oleanane glycosides from *Pithecellobium dulce*. *Phytochemistry* 44(7):1329-1334.
- Olajuyigbe O, Afolayan A. 2012. *In vitro* ethnotherapeutic potential of the acetone extract of the bark of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd.: Antimicrobial and toxicity evaluations. *African Journal of Biotechnology* 11(103):16783.
- Olalla R, Tercero MJ. 2011. Parasitosis comunes. Externas e internas. *Offarm Elsevier* 30(4):33-39.
- Orihel TC, Ash LR. 2010. *Atlas de Parasitología Humana*. Editorial Médica Panamericana.
- Ortiz JJ, Chegne NL, Gargala G, Favennec L. 2002. Comparative clinical studies of nitazoxanide, albendazole and praziquantel in the treatment of ascariasis, trichuriasis and hymenolepiasis in children from Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96(2):193-196.
- Osorio EJ, Robledo SM, Bastida J. 2008. Chapter 2 Alkaloids with Antiprotozoal Activity. 66:113-190.

- Osuna Torres L, Pérez MET, Contreras AA. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Edicions Universitat Barcelona.
- Pandey P, Garg A, Singh V, Shukla A. 2016. Evaluation of anthelmintic and antimicrobial activity of ursolic acid obtained from Tulsi *Ocimum sanctum*. Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology 2(3):67-71.
- Parejo I, Jauregui O, Viladomat F, Bastida J, Codina C. 2004. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 18(23):2801-2810.
- Pawlowska AM, Camangi F, Bader A, Braca A. 2009. Flavonoids of *Zizyphus jujuba* L. and *Zizyphus spina-christi* (L.) Willd (Rhamnaceae) fruits. Food Chemistry 112(4):858-862.
- Peraza-Sánchez SR, Poot-Kantún S, Toores-Tapia LW, May-Pat F, Simá-Polanco P, Cedillo-Rivera R. 2008. Screening of native plants from yucatan for anti-*Giardia lamblia* activity. Pharmaceutical Biology 43(7):594-598.
- Price ML, Van Scoyoc S, Butler LG. 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry 26(5):1214-1218.
- Quihui-Cota L, Valencia ME, Crompton DW, Phillips S, Hagan P, Diaz-Camacho SP, Triana Tejas A. 2004. Prevalence and intensity of intestinal parasitic infections in relation to nutritional status in mexican schoolchildren. Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene 98(11):653-659.

- Quihui L, Valencia ME, Crompton DW, Phillips S, Hagan P, Morales G, Díaz-Camacho SP. 2006. Role of the employment status and education of mothers in the prevalence of intestinal parasitic infections in Mexican rural schoolchildren. *BMC Public Health* 6(1):225.
- Rahimi-Esboei B, Ebrahimzadeh M, Gholami S, Falah-Omrani V. 2013. Anti-giardial activity of *Sambucus ebulus*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17(15):2047-2050.
- Rahman S. 2011. Antioxidant, analgesic, cytotoxic and antidiarrheal activities of ethanolic *Zizyphus mauritiana* bark extract. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine* 12(1):67-73.
- Rahuman AA, Gopalakrishnan G, Venkatesan P, Geetha K. 2008. Isolation and identification of mosquito larvicidal compound from *Abutilon indicum* (Linn.) Sweet. *Parasitology Research* 102(5):981-988.
- Rayan P, Matthews B, McDonnell PA, Cock IE. 2015. *Terminalia ferdinandiana* extracts as inhibitors of *Giardia duodenalis* proliferation: a new treatment for giardiasis. *Parasitology Research* 114(7):2611-2620.
- Ricco RA. 2006. Taninos condensados de *Ephedra frustillata* Miers (Ephedraceae). *Acta Farmacéutica Bonaerense* 25(2): 192.
- Rodriguez-Chavez JL, Rufino-Gonzalez Y, Ponce-Macotela M, Delgado G. 2015. *In vitro* activity of 'Mexican Arnica' *Heterotheca inuloides* Cass natural products and some derivatives against *Giardia intestinalis*. *Parasitology* 142(4):576-584.
- Rossomando MJ, Márquez W, Prado J, Chacón N. 2008. Epidemiología de himenolepiosis y otras parasitosis intestinales en una comunidad suburbana

- de Escuque, Trujillo-Venezuela. Revista Facultad Medicina (Caracas) 31(2):101-110.
- Ruiz-Terán F, Medrano-Martínez A, Navarro-Ocaña A. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of plant extracts used in traditional medicine in Mexico. African Journal of Biotechnology 7(12).
- Rzedowski J, Rzedowski G. 1985a. Flora fanerogámica del Valle de México. . Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional e Instituto de Ecología 2.
- Rzedowski J, Rzedowski G. 1985b. Flora fanerogámica del Valle de México. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional e Instituto de Ecología, México, D.F. 2.
- Sahu NP, Mahato SB. 1994. Anti-inflammatory triterpene saponins of *Pithecellobium dulce*: characterization of an echinocystic acid bisdesmoside. Phytochemistry 37(5):1425-1427.
- Sanabria-Galindo A, López SI, Gualdrón R. . 1997. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas 26:15-19.
- Sánchez L, Neira A. 2006. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L y *Psidium guineense* S. Cultura Científica (3):40-45.
- Sánchez MA, Miramontes M. 2011. Parasitosis intestinales en 14 comunidades rurales del altiplano de México. Revista Mexicana de Patología Clínica 58(1):16-25.

- Sasidharan S, Darah I, Jain K. 2008. *In vivo* and *In vitro* toxicity study of *Gracilaria changii*. *Pharmaceutical Biology* 46(6):413-417.
- Schantz PM, Del Brutto OH, Wadia NH, Dumas M, Cruz M, Tsang VC. 1996. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. *Journal of the Neurological Sciences* 142(1):1-6.
- Shah A, Tariq M, Al-Yahya M. 1990. Studies on the alkaloidal fraction from the stem bark of *Zizyphus nummularia*. *Fitoterapia* 61(5).
- Shailajan S, Joshi H. 2011. Optimized separation and quantification of Pharmacologically active markers Quercetin, Kaempferol, β -sitosterol and Lupeol from *Cuscuta reflexa* Roxb. *Journal of Pharmaceutical Research* 4:1851-1853.
- Solis PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica* 59(03):250-252.
- Sternberg PJ. 1997. Structure and synthesis of the first profisetinidins with epifisetinidol constituent units. *Tetrahedron* 1:1943-1950.
- Sthal E. 1973. *Thin Layer Chromatography*. Academic Press Inc. New York.
- Sugumaran M, Vetrichelvan T, Quine SD. 2008. Free radical scavenging activity of folklore: *Pithecellobium dulce* Benth. leaves. *Ethnobotanical Leaflets* 2008(1):54.
- Tsuji ÓV, Rivera TC. 2012. Parasitosis intestinales como determinantes del desarrollo nacional. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 25:90.
- Upcroft P. 1998. Drug resistance in *Giardia*: clinical versus laboratory isolates. *Drug Resistance Updates* 1(3):166-168.

- Uribarren T. 2014. Giardiasis o Giardiosis. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html>.
- Uribarren T. 2016. Himenolepiosis o Hymenolepiasis. Disponible en <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/hymenolepiosis.html>.
- Vaishnav P, Demain AL. 2011. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 29(2):223-229.
- Van Den Enden E. 2009. Pharmacotherapy of helminth infection. *Expert Opinion Pharmacotherapy* 10(3):435-541.
- Vanitha V, Manikandan K. 2016. Bio-activity guided determination of active compounds in the leaves of *Pithecellobium dulce*. *Rasyan Journal of Chemistry* 9(3):471-477.
- Vega A, Hernández G, Bojórquez B. 1989. Flora de Sinaloa. Secretaría de Educación Pública. Universidad Autónoma de Sinaloa. . p. 49.
- Vega Aviña R, Hernández Vizcarra JA, Vega López IF, Villaseñor JL, Gutiérrez García JA, Aguiar H. 2000. Endemismo regional presente en la flora del municipio de Culiacán, Sinaloa, México. *Acta Botanica Mexicana* 53:1-15.
- Venkatachalam RN, Singh K, Marar T. 2012. Phytochemical screening *in vitro* antioxidant activity of *Psidium guajava*. *Free Radicals and Antioxidants* 2(1):31-36.
- Vidal F, Vidal JC, Gadelha AP, Lopes CS, Coelho MG, Monteiro-Leal LH. 2007. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Experimental Parasitology* 115(1):25-31.

- Villaseñor IM, Angelada J, Canlas AP, Echegoyen D. 2002. Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside. *Phytotherapy Research* 16(5):417-421.
- Villaseñor JL. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87(3):559-902.
- Wagner H. 2006. Futuro en la investigación en fitoterapia: tendencias y retos. *Revista de Fitoterapia* 6(2):101-117.
- Wal P, Wal A, Sharma G, Rai A. 2011. Biological activities of lupeol. *Systematic Reviews in Pharmacy* 2(2):96.
- Wang C, Zuo Y. 2011. Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography–mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chemistry* 128(2):562-568.
- WHO. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases: summary.
- Williams AR, Fryganas C, Ramsay A, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM. 2014. Direct anthelmintic effects of condensed tannins from diverse plant sources against *Ascaris suum*. *PLoS One* 9(5):e97053.
- Wright JM, Dunn LA, Upcroft P, Upcroft JA. 2003. Efficacy of Antigiardial Drugs. *Expert opinion on drug safety* 2(6):529-541.
- Yadav AK, Tangpu V. 2008. Anticestodal activity of *Adhatoda vasica* extract against *Hymenolepis diminuta* infections in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 119(2):322-324.

ABREVIATURAS

%	Por ciento
µm	Micrómetro
b.h.	Base húmeda
b.s.	Base seca
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CG	Cromatografía de gases
cm	Centímetro
col	Colaboradores
DMSO	Dimetil sulfóxido
ESI	Ionización por electroasperjado, por sus siglas en inglés
g	Gramo
IC ₅₀	Concentración necesaria para inhibir el 50%
IE	impacto electrónico
LRI	Índice de retención de Kovats
m	Metro
mg EC	Miligramos equivalentes de catequina
min	Minuto
mm	Milímetro
PM	Peso molecular
MS	Espectrometría de masas
MTT	3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio
ppm	Partes por millón
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundo
SFB	Suero fetal bovino
TMCS	Trimetilclorosilano