

### III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

#### TAMIZAJE QUÍMICO Y DETERMINAR LA ACTIVIDAD AMEBICIDA, ANTIOXIDANTE Y TÓXICA DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Jatropha dioica* Y *Eucalyptus camaldulensis*

Barrón-González MP\*, Corrujedo-Morales N, Garza-Padrón R, Morales-Rubio M, Neávez-Treviño F, Morales-Vallarta M, Rodríguez-Garza R.

Departamento de Biología Celular y Genética, Cuerpo Académico de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

\*Tel.: 0181(8329-4110) [porfi\\_bagzz@yahoo.com.mx](mailto:porfi_bagzz@yahoo.com.mx) - [maria.barrongn@uanl.edu.mx](mailto:maria.barrongn@uanl.edu.mx)

#### RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud ha estimado que aproximadamente el 80 % de los habitantes a nivel mundial han utilizado la medicina tradicional para el cuidado de su salud. Entre las cuales se encuentran *Jatropha dioica* y *Eucalyptus camaldulensis*.

**Objetivo:** realizar el tamizaje químico de *Jatropha dioica* y *Eucalyptus camaldulensis*, y determinar la actividad amebicida, antioxidante y tóxica de los extractos metanólicos de *J. dioica* y *E. camaldulensis*.

**Métodos:** Se colectó el material vegetal de ambas especies, se obtuvieron los extractos y se realizó: a) tamizaje química, b) determinación de la actividad antioxidante, c) bioensayo de letalidad en *Artemia salina* y d) determinación de la actividad amebicida de los extractos metanólicos sobre *Entamoeba histolytica*.

**Resultados:** Se determinaron los compuestos químicos presentes en los extractos de *E. camaldulensis* y *J. dioica*, los extractos de *E. camaldulensis* presentan mayor actividad antioxidante. El extracto etanólico de hoja de *E. camaldulensis* presenta menor toxicidad para *A. salina*, y el extracto metanólico de tallo de ambas especies presentaron el mayor potencial amebicida.

**Conclusiones:** Los extractos con actividad amebicida podrían ser empleados en futuros trabajos de investigación encaminados a inhibir tanto el crecimiento como el enquistamiento de *Entamoeba histolytica* y de otros parásitos patógenos al humano.

#### 1. INTRODUCCIÓN

##### 2.1. *Entamoeba histolytica*

Se estima que el 10% de la población mundial esta infectada por *Entamoeba histolytica* protozooario causante de la amibiasis, ocupando el tercer lugar como causante de muerte provocada por protozoarios parásitos, lo que resulta en aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 100,000 muertes por año. Tasas elevadas de infección amibiana se reportan principalmente en la India, África y Centroamérica; en México constituye un problema muy importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad (WHO; 1997).

*Entamoeba histolytica* es uno de los eucariotes mas primitivos, pertenece a la familia Entamoebidae del orden Amoebida, subfilo Sarcodina, superclase Rhizopoda de protozoos formadores de pseudópodos, de la clase Lobosea. *E. histolytica* existe en dos formas evolutivas: el trofozoito y el quiste; los trofozoitos, presentan un tamaño de 20-40 micras de diámetro, son muy dinámicos, de locomoción rápida, presenta pseudópodos y durante su movimiento se diferencia muy bien el ecto y endoplasma. En el citoplasma presenta un núcleo y una gran cantidad de vacuolas ricas en glucógeno. El núcleo es esférico, mide de 4-7 micras de diámetro el cual consiste de una membrana nuclear acromática la cual es doble y está interrumpida por numerosos poros nucleares de 65nm de diámetro. La división nuclear ocurre por mitosis cerrada, ya que la membrana nuclear no se fragmenta y no esta sincronizada con la citocinesis (Diamond and Clarck, 1993).

Los quistes de *E. histolytica* son esféricos u ovoides y algunas veces aparecen irregulares (Dobell, 1928; y Proctor and Gregory, 1973), en promedio miden de 10 a 20 micras, poseen una pared de aproximadamente 0.5 micras (Avron *et al.*, 1986) ó 0.125 a 0.150 micras de grosor (Chávez *et al.*, 1978). Contienen normalmente cuatro núcleos y raramente presenta ocho núcleos. El núcleo es morfológicamente similar al de los trofozoitos (Diamond and Carck, 1993).

Durante el ciclo vital de *E. histolytica* en el humano ocurren dos eventos muy importantes para este parásito: el desenquistamiento y el enquistamiento. Una vez que el humano ingiere el quiste maduro e infectivo a través de agua, alimentos o fómites y este resiste los jugos gástricos, al llegar a la región del íleon terminal ocurre el proceso de desenquistamiento, el cual inicia cuando del quiste emerge una amiba tetranucleada que multiplica sus núcleos para formar una amiba de ocho núcleos. Posteriormente ésta se fragmenta en ocho pequeñas amibas, llamadas amibas metaquísticas, éstas se transforman en los trofozoitos que finalmente se establecen en el colon, donde se alimentan de bacterias y restos celulares. Enseguida los trofozoitos pueden enquistarse, este es un proceso aparentemente estimulado por condiciones luminales no

ideales para los trofozoítos y dentro del quiste continúa el metabolismo y la división nuclear hasta formar los cuatro núcleos. Después de que los quistes son eliminados junto con las heces los quistes pueden permanecer viables por semanas o meses, dependiendo de las condiciones ambientales (Clark y Diamond, 2002; Garcia y Burckner, 1997 y Katz, *et al*; 1989).

#### 1.2. Medicina Tradicional

La herbolaria se ha utilizado desde los inicios de la humanidad. El conocimiento de las plantas medicinales forma parte de la cultura de cada etnia y religión, sin embargo los remedios de origen vegetal fueron cayendo en el desuso por la medicina alopática por varias razones, entre estas podemos señalar principalmente a que la identificación de las plantas no siempre era cuidadosa y en ocasiones se recolectaban especies sin propiedades terapéuticas, los preparados difícilmente se podrían estandarizar por lo que había grandes variaciones en sus contenidos y efectos terapéuticos y además no se contaba con estudios controlados que avalaran su seguridad y eficacia (Huxtable 1992).

En años recientes se ha originado un regreso a la fitoterapia, ante la necesidad de nuevos enfoques médicos para trastornos o enfermedades en los que estos productos ofrecen eficacia, con efectos secundarios prácticamente nulos.

Estos nuevos desarrollos de fitoterapia se han centrado en resolver los puntos débiles de las terapias herbales tradicionales, seleccionando las especies y subespecies de las plantas con propiedades terapéuticas y se les ha cultivado en condiciones controladas, se han desarrollado avanzados métodos de extracción, procesamiento y estandarización que permite contar con lotes equivalentes del producto con efectos terapéuticos constantes y reproducibles.

La búsqueda de principios activos aislados de productos naturales que actúen directamente sobre los protozoarios contribuirá tanto en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la amibiasis así como en la producción de nuevas estrategias con la finalidad de controlar la diseminación de este parásito.

#### 2.3 Especies vegetales

***Jatropha dioica*** pertenece a la familia Euforbiáceas se le conoce comúnmente como sangre de drago, drago, sangre de grado. Es un arbusto de tallos carnosos con látex incoloro y ramas suculentas rojizas; hojas comúnmente agrupadas en los nudos, espatuladas con bordes enteros; flores fasciculadas, pequeñas en grupos y corolas blancas; frutos globosos con una semilla. Florece de julio a octubre y fructifica de septiembre a octubre. De origen nativa, crece en matorral espinoso, subtropical y xerófilo de San Luis Potosí, Hidalgo, Nuevo León, Zacatecas, Chihuahua, Coahuila y Oaxaca en México.

***Eucalyptus camaldulensis*** es un importante árbol de la familia *Myrtaceae*. Es una especie plantada en muchas partes del mundo. Es nativa de Australia donde está ampliamente expandida. Sus nombres comunes son Red River Gum en América central así como eucalipto. *E. camaldulensis* es una especie siempre verde de 24 a 40m de altura, corteza lisa, blanca, ligeramente grisácea, desprendible que exponen capas internas de corteza blanquecina, ramillas terminales y posteriormente alternadas. Las hojas adultas son lanceoladas, pecioladas, delgadas y pendientes, recurvadas de borde liso, de color verde opaco en el haz, con envés ocasionalmente gris. Las flores blancas en cabezuelas, con botones florales de forma aovada, de base redonda y cubierta larga, cónica, punteada o rostrada, frutos o capsulas seminales generalmente en ramilletes al final de pecíolos delgados, de color ligeramente marrón (Ugalde, 1997).

La especie soporta temperaturas altas en verano (29° a 30°C) y temperaturas bajas (3° a 5°C) en invierno y hasta 50 heladas anuales. Se adapta a una amplia gama de suelos, desde muy pobres en fertilidad hasta periódicamente inundados (Ugalde 1997). Es una especie heliofita que requiere plena exposición al sol para un crecimiento satisfactorio.

#### 2.4 Actividad antioxidante

Hoy en día se ha registrado un marcado interés por los radicales libres y la función que desempeñan en los sistemas biológicos. Un radical libre se puede definir como una especie química que en su conformación involucra electrones desapareados en los orbitales que participan en las uniones químicas. Los radicales libres pueden ser formados tanto por la pérdida como por la ganancia de un electrón (Molina, S., 2001).

La incapacidad de nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente nos obliga a recurrir a componentes con la propiedad de neutralizarlos. Estos compuestos actúan liberando electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres convirtiéndose así en moléculas estables.

Los fitonutrientes son componentes de las plantas que contribuyen en la estabilización de los radicales libres en el cuerpo, es por ello que es de gran importancia la investigación de las plantas y de sus propieda-

des para de esta manera obtener nuevos fitonutrientes, que ayudan a neutralizar los radicales libres de nuestro cuerpo.

#### 2.5 *Artemia salina*

La *Artemia salina* es una especie de crustáceo branquiópodo del orden Anostraca propia de aguas salobres continentales, de distribución cosmopolita. Los huevos pueden permanecer metabólicamente inactivos durante largos períodos (incluso de 10 años) en condiciones de total ausencia de agua y oxígeno, y a temperaturas por debajo del punto de congelación. Esta característica inusual es llamada criptobiosis o diapausa; una vez que el entorno es adecuado, la eclosión puede comenzar transcurridas las primeras ocho horas, emergiendo los nauplios. El adulto de *A. salina* alcanza un centímetro de largo en promedio, y su vida media es de un año. Este rápido desarrollo y la habilidad de sus huevos para soportar largos períodos en condiciones desfavorables, la han hecho un modelo invaluable en investigaciones biológicas algunas incluso desarrolladas en el espacio exterior. *Artemia salina* solo había sido utilizada en varios bioensayos, como: análisis de pesticidas, micotóxicas, contaminantes de corrientes, anestésicos, tóxicas de dinoflagelados, compuestos parecidos a la morfina, toxicidad de aceites dispersantes, etc. El bioensayo con larvas de *Artemia salina* consiste en la determinación de la DL<sub>50</sub> menor a 1000µg/mL. es muy probable que contenga uno o varios compuestos activos, por lo que es necesario fraccionarlos para realizar el ensayo a concentraciones menores, una vez que se hayan obtenido la o las fracciones activas, se aísla el o los productos para determinar su DL<sub>50</sub> e investigar su actividad biológica específica (Meyer, *et al.*, 1982).

Por otra parte, y debido a que la amibiasis es una de las afecciones ocasionadas por protozoarios parásitos que por su característica de ser cosmopolita afecta aproximadamente a 500 millones de personas en el mundo; México es considerado como el país con mayor cantidad de individuos infestados a nivel mundial, por lo cual en este trabajo consideramos importante la validación con el método científico de la evaluación de los extractos crudos obtenidos por cernimiento a partir de *Jatropha dioica* (sangre de drago) y *Eucalyptus camaldulensis* (eucalipto). Estas dos plantas han sido empleadas tradicionalmente en la herbolaria mexicana para tratar afecciones intestinales, y uno de los múltiples agentes biológicos causantes de estas alteraciones intestinales en el hombre es el protozoario parásito *Entamoeba histolytica*. Siendo este trabajo el primero en su tipo en el cual se evalúa bajo condiciones axénicas *in vitro* los extractos crudos de *Jatropha dioica* y *Eucalyptus camaldulensis* sobre *Entamoeba histolytica*. Los resultados que se obtengan en esta investigación, servirán en un futuro para la elucidación y caracterización de las moléculas o compuestos que presenten actividad contra *Entamoeba histolytica* a partir de los extractos de ambas especies vegetales. Ayudando al tratamiento de esta enfermedad con drogas con mayor espectro de acción y menores efectos secundarios para las personas, que las drogas de elección en la actualidad: el metronidazol y los derivados imidazólicos.

## 2. HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos de las plantas *Jatropha dioica* y *Eucalyptus camaldulensis* presentarán actividad amebicida sobre el cultivo axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.

## 3. OBJETIVOS

Realizar el tamizaje químico de *Jatropha dioica* y *Eucalyptus camaldulensis*, y determinar la actividad amebicida de sus extractos metanólicos sobre el cultivo axénico *in vitro* de *Entamoeba histolytica*.

## 4. METODOLOGÍA

### 5.1 Material vegetativo

**Procesamiento del material vegetativo:** El material vegetativo de *Jatropha dioica* y *Eucalyptus camaldulensis*, se procesó en el Laboratorio de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Una vez recolectado el material vegetativo se procesó siguiendo los siguientes pasos:

- 1) Lavado: Se enjuagó el material vegetal al chorro de agua corriente, hasta eliminar cualquier residuo ajeno al material vegetativo.
- 2) Secado: se extendió el material vegetal y se dejó secar a temperatura ambiente,
- 3) Trituración: Se trituró el material seco empleando un molino de mano y una licuadora.
- 4) Extracción: la obtención de extractos a partir de *Jatropha dioica* y *Eucalyptus camaldulensis* se realizó como se describe a continuación:
  - 4a. Extractos hexánicos. Se colocaron en matraces Erlenmeyer 300mL de hexano y 37.5g de la muestra seca y triturada de las plantas *Jatropha dioica* y *Eucalyptus camaldulensis*. Se mantuvieron los matraces en un agitador shaker por 7 días a temperatura ambiente. Después de este tiempo se

### III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

filtró cada extracto en filtros Whatman No. 1. El filtrado se dejó evaporar hasta sequedad a temperatura ambiente. Se obtuvo el extracto mediante un raspado de los residuos y se almacenó en frascos de vidrio oscuro.

4b. Extractos acetónicos. Al residuo vegetal hexánico de cada planta se agregaron 300 mL de acetona. Se mantuvieron los matraces en un agitador shaker por 7 días a temperatura ambiente. Después de este tiempo se filtró cada extracto en filtros Whatman No. 1. El filtrado se dejó evaporar hasta sequedad a temperatura ambiente. Se obtuvo el extracto mediante un raspado de los residuos y se almacenó en frascos de vidrio oscuro.

4c. Extractos metanólicos. A los residuos vegetales acetónicos de cada planta se les agregó 300 mL de metanol. Se mantuvieron los matraces en un agitador shaker por 7 días a temperatura ambiente. Después de este tiempo se filtró cada extracto en filtros Whatman No. 1. El filtrado se dejó evaporar hasta sequedad a temperatura ambiente. Se obtuvo el extracto mediante un raspado de los residuos y se almacenaron en frascos de vidrio oscuro.

4d. Extractos etanólicos. A los residuos vegetales metanólicos de cada planta se les agregó 300 mL de etanol. Se mantuvieron los matraces en un agitador shaker por 7 días a temperatura ambiente. Después de este tiempo se filtró cada extracto en filtros Whatman No.1. El filtrado se dejó evaporar hasta sequedad a temperatura ambiente. Se obtuvo el extracto mediante un raspado de los residuos y se almacenó en frascos de vidrio oscuro.

#### 5.2 Bioensayos

- **Tamizaje químico parcial:** A cada extracto se le realizaron las pruebas de identificación química propuestas por Domínguez (1973). El extracto obtenido en cada planta se sometió a las siguientes pruebas "Pruebas coloridas" o pruebas de identificación química:
- **Actividad antioxidante: Prueba del DPPH:** Cada extracto se puso en contacto en una placa de sílica gel con el reactivo DPPH (difenilpicrilhidrazil), para determinar la presencia de actividad antirradiación de los extractos.
- **Actividad tóxica *in vitro* de extractos de *J. dioica* y *E. camaldulensis* sobre *Artemia salina*:** El bioensayo con larvas de *Artemia salina* consiste en la determinación de la DL<sub>50</sub> de los extractos de las plantas. Aquellos que presentan una DL<sub>50</sub> menor de 1000 µg/mL, es muy probable que contengan uno o varios compuestos tóxicamente activos. Para la incubación de los huevecillos de *A. salina* se preparó agua de mar artificial de la siguiente manera: Se pesaron 40g de sal de mar (Instant Ocean, Acuarium System) 0.006g de levadura de cerveza, se aforaron en un litro de agua bidestilada, el procedimiento se realizó incubando 0.1g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) en el agua de mar artificial, colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantuvo iluminado con una lámpara de 20 watts ya que al eclosionar los nauplios son atraídos a la luz. En una microplaca de 96 pozos fueron adicionados alrededor de 10 nauplios por pozo más 100 microlitros de las diluciones a probar las cuales son las siguientes 1000, 500, 200 y 40 ppm. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio 400 ppm y agua de mar como control negativo. A las 24 horas de aplicados los extractos y con la ayuda de un microscopio estereoscopio, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis y se determinó la DL<sub>50</sub> con un análisis estadístico de regresión Probit, con el paquete SPSS ver.17. (Morales, 2006).
- **Actividad amebicida del extracto metanólico de *J. dioica* y *E. camaldulensis*.** En 10 tubos de 13 x 100 mm conteniendo 5 mL del medio de cultivo PT, suplementado cada uno con 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y 0.5 mL de suero bovino, se les adicionó las distintas concentraciones que se ensayaron de los extractos de cada especie a evaluar, cada tubo se inoculó con 1x10<sup>4</sup> trofozoítos/mL, posteriormente se incubaron a 37°C y se determinó en tres eventos independientes por triplicado el número de trofozoítos/mL a los 4 días de incubación.
- **Determinación de la dosis letal media (DL<sub>50</sub>).** La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) corresponde a la concentración requerida para reducir a un 50% el crecimiento de la población a la dosis analizada. La DL<sub>50</sub> de cada extracto representó la media de las DL<sub>50</sub> de dos experimentos realizados por triplicado. Se determinó la DL<sub>50</sub> empleando el método PROBIT para cada réplica mediante el análisis estadístico de regresión lineal empleando el programa Microsoft Excel 2007.
- **Análisis estadístico.** Para determinar la actividad biológica del extracto metanólico de *J. dioica* y *E. camaldulensis* sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*, los datos que se obtuvieron de los tres eventos independientes por triplicado se promediaron y se compararon contra cultivos control

mediante el análisis de varianza con una  $P < 0.05$  empleando la Prueba de Dunnet T (2-side) con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 2007.

## 6. RESULTADOS

### Identificación de grupos funcionales a través de pruebas coloridas

Los resultados de las pruebas químicas para identificar grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos de *J. dioica* y *E. camaldulensis* se presentan en la Tabla 1 y 2.

Determinación de	Pueba colorida de	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz	Tallo	Raíz
		Extracto acetónico		Extracto metanólico		Extracto etanólico	
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	+	+	+	+	+	+
<b>Aromaticidad</b>	Ácido sulfúrico-formaldehído	-	-	+	+	+	+
<b>Carbohidratos</b>	Molish	+	+	+	+	+	+
	Cumarinas	+	+	+	+	+	+
	Lactonas	+	+	+	+	+	+
<b>Esteroles y triterpenos</b>	Liebermann-Burchard	+	+	+	+	+	+
	Salkowski	+	+	+	+	+	+
<b>Flavonoides</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	+	+	+	+	+	+
<b>Grupo Carbonilo</b>	2,4-Dinitrofenilhidracina	+	+	+	+	+	+
<b>Insaturaciones</b>	KMnO <sub>4</sub>	+	+	+	+	+	+
<b>Saponinas</b>	Bicarbonato de sodio	+	+	+	+	+	+
	Salkowski	+	+	+	+	+	+
<b>Sesquiterpenlactonas</b>	Baljet	+	+	-	-	-	-
<b>Oxidrilos fenólicos</b>	FeCl <sub>3</sub>	+	+	-	-	-	-

Tabla 1

III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

Pruebas coloridas para los extractos de *J. dioica*

Determinación de	Pueba colorida de	Hoja	Tallo	Cor-teza	Hoja	Tallo	Cor-teza	Hoja	Tallo	Cor-teza
		Extracto acetónico			Extracto metanólico			Extracto etanólico		
<b>Alcaloides</b>	Dragendorff	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Aromaticidad</b>	Ácido sulfúrico-formaldehído	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Carbohidratos</b>	Molish	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	Cumarinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Lactonas	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Esteroles y triterpenos</b>	Liebermann-Burchard	*	*	*	-	-	-	*	*	*
	Salkowski	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Flavonoides</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Grupo Carbonilo</b>	2,4-Dinitrofenilhidracina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Insaturaciones</b>	KMnO <sub>4</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Saponinas</b>	Bicarbonato de sodio	*	*	*	+	+	+	+	+	+
	Salkowski	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Sesquiterpenlac tonas</b>	Baljet	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxidrilos fenólicos</b>	FeCl <sub>3</sub>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 2

Pruebas coloridas de los extractos acetónicos, metanólicos y etanólicos de *Eucalyptus camaldulensis*.

**Actividad antioxidante de los extractos de *J. dioica* y *E. camaldulensis*.**

Los resultados obtenidos en la prueba del DPPH para la detección de la actividad antioxidante (antirradical) de los extractos de *J. dioica* y *E. camaldulensis* se encuentran en la Tabla 3, como control positivo se uso vitamina C, en la reacción positiva se observa la presencia de manchas de color amarillo sobre un fondo morado.

Espécimen	Muestra	Extracto	Actividad antioxidante	
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Hojas	Hexano	No Antioxidante	
	Tallo		No Antioxidante	
	Corteza			Antioxidante
	Hojas	Acetona		Antioxidante
	Tallo			Antioxidante
	Corteza			Antioxidante
	Hojas	Metanol		Antioxidante
	Tallo			Antioxidante
	Corteza			Antioxidante
	Hojas	Etanol		Antioxidante
	Tallo			Antioxidante
	Corteza			Antioxidante
<i>Jatropha dioica</i>	Tallo	Acetona		Antioxidante
	Raíz		No antioxidante	
	Tallo	Metanol		Antioxidante
	Raíz			Antioxidante
	Tallo	Etanol	No antioxidante	
	Raíz		No antioxidante	
<b>Control</b>	Vitamina C			Antioxidante

**Tabla 3**

Actividad antioxidante de los extractos de *E. camaldulensis* y *J. dioica*.

**Toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina***

La actividad tóxica de los extractos hexánicos, acetónico, metanólico y etanólico de tallo, corteza y hoja de *E. camaldulensis*, y acetónico y metanólico de tallo y raíz de *J. dioica* fue evaluada sobre los nauplios de *Artemia salina*. Con los resultados obtenidos se calculó la DL<sub>50</sub> (Dosis Letal Media) de cada uno de los extractos se diseñó el experimento en base al análisis Probit, mediante el programa SPSS versión 17. Para evaluar la actividad toxica se adicionaron 100 µL de las concentraciones de los extractos a probar, las cuales estuvieron en un rango de 40 a 1000 µg/mL. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio 400 ppm y agua de mar como control negativo. A las 24 h de aplicados los extractos, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de letalidad sobre *Artemia salina* para cada uno de los extractos, se observó una marcada actividad tóxica sobre *A. salina*, ya que los extractos presentaron dosis menores de 1000 µg/mL.

Espécimen	Muestra	Extracto	DL <sub>50</sub> [µg/mL]
<i>J. dioica</i>	Tallo	Acetónico	5.39
	Raíz		4.65
	Tallo	Metanólico	7.22
<i>E. camaldulensis</i>	Tallo	Hexánico	5.56
	Corteza		7.13
	Hoja		<b>4.23</b>
	Tallo	Acetónico	15.63
	Corteza	Metanólico	6.79
	Tallo		8.31
	Hoja		<b>29.30</b>
	Tallo		Etanólico

**Tabla 4**

Actividad toxica de los extractos sobre nauplios de *Artemia salina*

**Actividad amebicida del extracto metanólico de *E. camaldulensis* y *J. dioica*.** Al evaluar la actividad amebicida de los extractos metanólicos de *J. dioica* y *E. camaldulensis*, observamos una marcada inhibición del rendimiento celular de *E. histolytica* en presencia del extracto metanólico de tallo y raíz de *J. dioica* al emplear 250 mg/mL con 98.62% y 91.4% de inhibición respectivamente; el extracto metanólico de tallo y de hoja de *E. camaldulensis* a 250 mg/mL presentó 98.3% y 97.6% de inhibición respectivamente, estos resultados indican la capacidad amebicida de los extractos metanólicos del tallo y raíz de *J. dioica* y de tallo y hojas de *E. camaldulensis*. Estos extractos no presentan diferencia significativa entre si en cuanto a su actividad amebicida (Tabla 5 y Figura 3).

	Extracto Metanólico de:	Concentración (mg/mL)	Rendimiento (cel/mL)	Sobrevivencia (%)	Inhibición (%)
Control	-	-	135,714	-	-
Testigo (DMSO)	-	-	60,500	-	-
<i>J. dioica</i>	Tallo	250	833	1.38	<b>98.62</b>
	Raíz	250	5,208	8.6	<b>91.4</b>
		41	15,781	26.08	73.92
<i>E. camaldulensis</i>	Hojas	250	1458	2.41	<b>97.6</b>
	Tallo	250	1042	1.72	<b>98.3</b>
		40	48,214	79.69	20.30
	Corteza	40	33,542	55.44	44.55
		20	50,000	82.64	17.35

**Tabla 5**

Comparación del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos de *J. dioica* y *E. camaldulensis* sobre los cultivos de *Entamoeba histolytica*



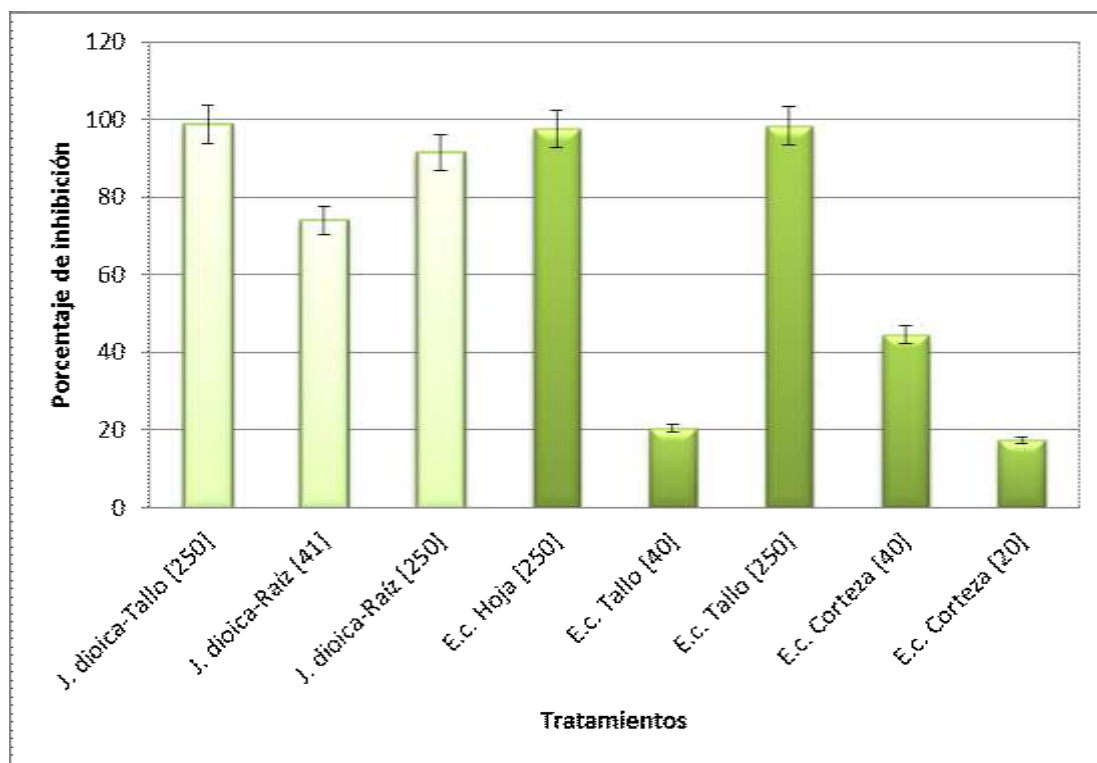


Fig. 3. Gráfica comparativa de la actividad amebicida de los extractos de *J. dioica* y *E. camaldulensis* sobre los cultivos de *E. histolytica*.

## 7. DISCUSIONES

Tanto *E. camaldulensis* como *J. dioica* son plantas ampliamente distribuidas en México y en la región noreste, sin embargo son plantas de uso milenario en la medicina popular mexicana; por lo cual en este trabajo se determinó por tamizaje fitoquímico los compuestos químicos presentes en cada una de ellas, así mismo su actividad tóxica sobre el modelo biológico ya estandarizado en *Artemia salina* y su actividad antiamebiana sobre los cultivos axénicos *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS. Los resultados encontrados nos indican que estos extractos tienen potencial para seguir investigando acerca de los metabolitos secundarios y validar su actividad biológica para sustentar también los conocimientos empíricos de uso médico que se le da a estas plantas de forma popular hasta nuestros días.

El tratamiento convencional para la amebiasis, es la droga sistémica conocida como metronidazol, y sus derivados imidazólicos; sin embargo estas drogas presentan múltiples efectos secundarios indeseables, por ejemplo en hámster se ha reportado actividad carcinógena (IARC, 1987), en bacterias se reporta actividad mutagénica, en gatos se reporta daño neurotóxico (Olson, E. J., *et al.*, 2005), y en el humano se ha reportado daño renal, sabor cobrizo, náuseas, vómito, entre otros (Samarawickram, *et al.*, 1997). También se ha reportado resistencia por parte de *Entamoeba histolytica* al metronidazol, por lo cual es imperante la búsqueda de nuevas drogas con actividad antiamebiana.

México es un país con una de las principales riquezas en materia etnobotánica, como lo demuestran los documentos de Juan Badiano, en donde se describen los remedios y pocimas que empleaban los indígenas para tratar diversos malestares en la época prehispánica.

Al evaluar la actividad tóxica de los extractos hexánico, acetónico, metanólico y etanólico de tallo, corteza y hoja de *E. camaldulensis*, y acetónico, metanólico y etanólico de tallo y raíz de *J. dioica* sobre los nauplios de *Artemia salina*, observamos que el extracto etanólico de hoja de *E. camaldulensis* presenta una  $DL_{50}$  29.30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sobre *A. salina*, lo cual nos indica una baja actividad tóxica en comparación con el resto de los extractos (Tabla 4), el extracto acetónico de hoja presentó la menor  $DL_{50}$  con 4.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , lo cual nos indica que presenta una mayor actividad tóxica contra *A. salina*, es de resaltar que el mínimo valor así como el máximo valor para la  $DL_{50}$  corresponde a extractos de hoja de *E. camaldulensis* sin embargo la variante es el solvente empleado para realizar la extracción, lo cual nos indica que cada solvente arrastra diferentes compuestos.

En cuanto a la actividad amebicida, los resultados indican que el extracto metanólico de tallo de *J. dioica* y *E. camaldulensis* a la concentración de 250 mg/mL, inhiben el cultivo de *E. histolytica* en un 98.62% y 98.3% respectivamente, presentando mayor inhibición el extracto de *J. dioica* (Tabla 5), también el extracto metanólico de hoja de *E. camaldulensis* y el extracto metanólico de raíz de *J. dioica*, a la concentración de 250mg/mL inhibieron el crecimiento celular de *E. histolytica* en un 97.6% y 91.4% respectivamente; estos cuatro resultados no presentan diferencia significativa. El extracto que presentó menor actividad antiamebiana fue el extracto metanólico de tallo de *E. camaldulensis* a la concentración de 40 mg/mL inhibió solo un 20.30%. Este dato nos permite dilucidar que el extracto metanólico de tallo *E. camaldulensis* es eficiente pero en concentraciones altas; comparando estos resultados con la actividad tóxica de este extracto sobre *A. salina* y sabiendo que la  $DL_{50}$  del dicromato de potasio para *A. salina* es de 400ppm y el extracto metanólico de tallo presentó una  $DL_{50}$  para este mismo organismo de 8,310 ppm, lo cual nos indica que este extracto es 20 veces menos tóxico que el dicromato de potasio. Los extractos con actividad amebicida podrían ser empleados en futuros trabajos de investigación encaminados a inhibir tanto el crecimiento como el enquistamiento de *Entamoeba histolytica* y de otros parásitos patógenos al humano.

## 8. CONCLUSIONES

- Las pruebas de Tamizaje fitoquímico revelaron la presencia de compuestos químicos en *Jatropha dioica* y en *Eucalyptus camaldulensis*.
- La presencia de oxidrilos fenólicos y flavonoides nos permiten suponer una posible actividad antioxidante de estos extractos, mientras que la presencia de alcaloides y saponinas, permite suponer que los extractos poseen actividad biológica.
- En base a los resultados obtenidos el extracto metanólico de tallo de *E. camaldulensis* se considera con mayor potencial amebicida, seguido del extracto metanólico de tallo de *J. dioica*.
- El extracto que presentó mayor toxicidad para *A. salina* fue el extracto acetónico de hoja de *E. camaldulensis*. y el menos tóxico fue el extracto etanólico de hoja de *E. camaldulensis*.

## 9. LITERATURA CITADA

- Avron B, Stolarsky T., Chaayen A, Mirelman D., (1986). Encystation of *E. invadens* IP-1 is induced by lowering the osmotic pressure and depletion of nutrients from the medium. *Journal of Protozoology*, **33** (4): 522.
- Chávez-Munguía B., Martínez Palomo A., De la Torre M., (1978). Estructura ultramicroscópica de la pared de quistes de *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* y *E.coli*. *Investigación Médica (Méx.)*. **9**: 113-116
- Clark, C.G, and Diamond. (2002). Methods for cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*- like amoeba. *Journal of Parasitology* **54**: 1047-1056.
- Diamond, L.S. y Clark, C.G., (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *Journal of Eukariotic Microbiology*, **40**:340-344
- Dobell C., (1928). Researches on the intestinal protozoa of monkeys and man. I. General Introduction. II. Description of the whole life-history of *Entamoeba histolytica* in culture. *Parasitology*, **20**: 357-412.
- García, L.S., and D.A. Bruckner. 1997. *Diagnostic medical parasitology*, 3rd ed. ASM Press.
- Huxtable RJ (1992). The pharmacology of extinction. *Journal of Ethnopharmacology* **37**:1.
- IARC (International Agency for Research of Cancer), (1987). *Metronidazole: Summaries and Evaluation*, Supplement 7.
- Meyer, BN., N.R. Ferrigni., J.E. Putnam.L.B. Jacobson., D.E. Nichols and J.L. McLaughlin, (1982). "Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents". *Planta Médica* **45**: pp. 31-34.

### III CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE CAMBIO CLIMATICO Y DESARROLLO SUSTENTABLE

- Molina-Salinas, G.M., (2001). Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y hexánicos del clavo (*Eugenia caryophyllara*). UANL. Facultad de Medicina, Escuela de Graduados. Pp. 22-24.
- Morales, R.M.E., (2006). Extractos de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose y *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson y Horak con actividad antibacteriana y aneoplásica sobre líneas celulares humanas. Tesis Doctoral. UANL
- Olson, E. J., Morales S.C., McVey A.S. and Hayden D.W., (2005). Putative metronidazole neurotoxicosis in a cat. *Veterinary Pathology*. **42**:665
- Proctor E.M. and Gregory M.A., (1973). Ultrastructure of cysts of *E. histolytica*. *International Journal of Parasitology* **3**:455-456.
- Samarawickrem N.A., Brown D.M., Upcroft J.A., Thammapalerd N., Upcroft P., (1997). Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in mechanism of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **40**:833-840.
- Ugalde A.L., (1997). Resultados de 10 años de investigación silvicultural del proyecto MADELEÑA en Guatemala. Serie Técnica, Informe Técnico no. 287. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 300 p.
- World Health Organization.(1997). Amoebiasis-an expert consultation. *Weekly epidemiological rec.* Apr.4; 72(14):97-99.