



Evaluación de la susceptibilidad *in vitro* sobre trofozoitos de *Giardia lamblia* frente a extractos de plantas de la Medicina Tradicional Tacana

CONDO MONTERO, CLAUDIA¹
SALAMANCA CAPUSIRI, EFRAÍN¹
TICONA, JUAN CARLOS¹
MONZÓN, JOSÉ LUIS¹
FLORES, NINOSKA¹

UDAETA, ENRIQUE¹
SERRATO, ALCIDES²
MARUPA, NATALIO²
GIMÉNEZ TURBA, ALBERTO¹

CORRESPONDENCIA: AGIMENEZ@MEGALINK.COM • Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra # 2224, Miraflores. La Paz, Bolivia.

1. Unidad de Evaluaciones biológicas, Área de Química Farmacéutica, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.
2. Comunidad Buena Vista CIPTA

FECHA DE RECEPCIÓN: 26/02/2015

FECHA DE ACEPTACIÓN: 10/05/2016

Resumen

Giardia lamblia, es el protozooario entérico encontrado con mayor frecuencia en exámenes coproparasitológicos, siendo la principal causa de enfermedades diarreicas no virales en los humanos en quienes provoca deficiencias nutricionales y deterioro cognitivo. Teniendo en cuenta el impacto sobre la salud y dado que esta enfermedad está asociada a la pobreza, la OMS la incluyó dentro de las Enfermedades Desatendidas. Si bien es cierto que existe tratamiento para estas parasitosis, estos no son siempre accesibles en áreas rurales donde la medicina tradicional, científicamente evaluada, puede apoyar en el uso racional haciendo de la medicina tradicional una alternativa en el control de la *Giardiasis*. Por lo que el presente trabajo realizó la evaluación de la actividad antiparasi-

Abstract

Giardia lamblia, an enteric protozoan is found most often in coproparasitological tests, being the leading cause of parasitic diarrheal diseases in humans in those causes nutritional deficiencies and cognitive impairment. Given the impact on health and since this disease is associated with poverty, WHO included within Neglected Diseases. While it is true that there is treatment for these parasites, these are not always accessible in rural areas where traditional medicine, scientifically evaluated, can support the rational use of traditional medicine making an alternative in the control of *Giardiasis*. So this study conducted an evaluation of the antiparasitic activity of 27 ethanolic extracts of plant species of traditional Tacana medicine used in cases of diarrhea, these were

taria de 27 extractos etanólicos de especies vegetales de la medicina tradicional Tacana utilizados en casos de diarrea, estos fueron enfrentados *in vitro* sobre trofozoitos de *Giardia lamblia*, la medición de la IC_{50} se realizó utilizando el método fluorométrico de resazurina (2mM), trabajando a una longitud de excitación y emisión de 540 – 590nm respectivamente, con una población parasitaria de $7,5 \times 10^5$ trofozoitos/mL, incubados a $37^\circ C$ por 48 hrs. De los 27 extractos de la farmacopea Tacana un total de 14 extractos (52%) presentaron IC_{50} mayor a 200 $\mu g/ml$, 11 extractos (40,7%) presentaron valores de IC_{50} entre 100 y 200 $\mu g/ml$ y 2 extractos (7%) con valores entre 100 y 50 $\mu g/ml$. Teniendo de esta manera al *Picantillo jengibre* (IC_{50} de $64,8 \pm 11$) y *Chuchuhuasi* (IC_{50} de 68 ± 21) como potenciales plantas antiparasitarias ya que presentan IC_{50} similares al del extracto de *Galipea longiflora* (Evanta, $IC_{50} = 54 \pm 9$) especie vegetal utilizada para el tratamiento de parásitos. Estos resultados permitirán a la comunidad Tacana discriminar entre familias de plantas con actividad antiparasitaria *in vitro* de aquellas que no presentan dicha propiedad frente a posibles parásitos causantes de diarrea.

PALABRAS CLAVE

Giardia lamblia, Susceptibilidad, Concentración Inhibitoria media (IC_{50}), medicina tradicional Tacana

evaluated *in vitro* on trophozoites of *Giardia lamblia*, the measurement of IC_{50} was performed using fluorometric method (resazurin 2mM), working at a wavelength excitation and emission 540 and 590nm, respectively, with a parasitic trophozoites population of $7,5 \times 10^5/mL$, incubated at $37^\circ C$ for 48hrs. from the 27 extracts of the pharmacopeia Tacana extracts, a total of 14 (52%) had IC_{50} greater than 200 $\mu g/mL$, 11 extracts (40.7%) had IC_{50} values between 100 and 200 $\mu g/ml$ and 2 extracts (7%) with values between 100 and 50 $\mu g/ml$. Thus having Picantillo ginger ($IC_{50} = 64.8 \pm 11$) and Chuchuhuasi (IC_{50} of 68 ± 21) as potential antiparasitic plants since they have similar IC_{50} to extract *Galipea longiflora* ($IC_{50} = 54 \pm 9$) plant species used for the treatment of parasites. These results allow the Tacana community discriminate between families of plants with antiparasitic activity *in vitro* of those who do not have such property against possible parasites that cause diarrhea.

KEY WORDS

Giardia lamblia Susceptibility, half Inhibitory Concentration (IC_{50}), Tacana traditional medicine.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias son uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial especialmente en países en vías de desarrollo debido a la pobreza, causando diarrea, llevando a una deshidratación que puede causar la muerte si no se administra tratamiento a tiempo (Almeida y col., 2007).

Giardia lamblia, es el protozooario entérico encontrado con mayor frecuencia en exámenes coproparasitológicos (Thompson, 2008) afecta al intestino delgado, causando la *Giardiasis*, existiendo disminución en la retención de grasas, dificultando la absorción de algunas vitaminas, ácido fólico, carbohidratos y proteínas (Díaz de la Guardia, 2006; Bussati y col., 2007). A nivel mundial, *G. lamblia* se ha estimado una frecuencia de 280 millones de individuos infectados, con 500 mil casos nuevos por año (Barrón, 2012). En Bolivia diferentes trabajos

muestran una elevada frecuencia de enteroparásitos (helmintos y protozoarios); Condori y col., 2008, Giménez y col., 2009-2014, Calamani. 2006, constituyéndose la población infantil, como el sector poblacional más vulnerable.

Para el tratamiento el metronidazol y tinidazol son las drogas de elección, sin embargo, los efectos adversos incluyen problemas gastrointestinales, náuseas, dolor de cabeza, leucopenia (Tracy y col., 1991). La búsqueda de nuevos tratamientos eficaces con baja toxicidad es muy importante para erradicar el problema, por lo que los estudios de compuestos con propiedades antiparasitarias a partir de plantas (semillas, hojas o tallos) ha aumentado tales son los estudios hechos a *Curcubita pepo* (Barrón, 2012), *Achyrocline satureioides*, *Eugenia uniflora*, *Feoniculum vulgare*, *Psidium guajava* (Costa y col., 2009), *Lippia spp.* (Ponce - Macotela y col., 2006), *Hovenia dulcis* (Gadelha y col., 2005) por lo que la medicina tradicional constituye una alternativa expectante sin embargo, pocas especies han sido estudiadas en forma científica y validadas en el laboratorio en nuestro medio.

La comunidad indígena Tacana, pueblo originario de la Amazonia emplea la medicina tradicional para curar males y enfermedades, existen diversos tipos de plantas utilizadas como tratamientos medicinales algunos ejemplos son las plantas del género *Euterpe* utilizadas para la anemia, en casos de fiebre utilizan plantas como *Costus*, *Brugmansia*, *Mansoa*, *Jessenia* entre otras, mientras que especies vegetales del género *Achyrocline*, *Zingiber*, *Carica*, *Anacardium*, *Musatia* son utilizadas cuando existen molestias estomacales e intestinales.

En el presente trabajo se realizó la evaluación de la actividad antiparasitaria de extractos obtenidos de especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional Tacana en casos de diarrea sobre trofozoitos de *Giardia lamblia*, utilizando el método fluorométrico de resazurina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medio de Cultivo TYIS-33

El medio de cultivo utilizado en el estudio fue TYIS-33 modificado (pH 7.2), el cual se utilizó para tener poblaciones elevadas de parásitos *in vitro*, tomando en cuenta que se trata de parásitos anaerobios facultativos se enrasó el medio de cultivo hasta el tope del criotuvo que contenía los trofozoitos de *Giardia* y se incubaron de 37°C. Cada 100 ml. de medio de cultivo contiene: 0.1g K₂HPO₄, 0.06g de KH₂PO₄, 0.1 g NaCl, 3g Extracto de levadura, 0.05g Bili bovina deshidratada, 1g de glucosa, 0.2g L-cisteina HCl, 0.02g ácido ascórbico, 2.2mg citrato férrico amónico, suplementado con 15 % de suero bovino fetal (SBF) y 3% de solución de vitaminas (Sigma - Aldrich).

Giardia lamblia y procedimiento de cultivo celular

Los trofozoitos de *G. lamblia* se obtuvieron por donación de la doctora María Auxiliadora Dea Ayuela, profesora en Farmacia de la Universidad Com-

plutense de Madrid, España (2009). Estos ser mantuvieron en cultivos *in vitro* a 37 °C, con cambios de medio cada 48-72 horas.

Recolección y preparación de extractos crudos de especies vegetales

Las especies vegetales fueron recolectadas alrededor de la comunidad Tacanade Buena Vista ubicada a 14°22' 11.65" S y 67°34'01.12" O. a una altura de 214 m.s.n.m. durante los meses de septiembre y octubre del año 2014, provincia Abel Iturralde del departamento de La Paz .

Recolectado el material vegetal, se identifico y posteriormente se dejo secar protegiendo de la luz solar en un ambiente cerrado y seco. Se molió el material y se realizo la maceración en etanol 96% por 48 hrs. A temperatura ambiente. El extracto fue filtrado, rotaevaporado y llevado a sequedad, obteniéndose de esta manera un total de 27 extractos crudos para la evaluación biológica.

Los extractos se disolvieron en DMSO al 96%, teniendo una concentración madre de 10,000 µg/mL a partir de la cual se prepararon diluciones de 200, 100, 50 y 25 µg/mL. Utilizando como controles CAT (Alcaloides Totales de *Galipea longiflora*) a concentraciones arriba indicadas, metronidazol (500mg) y tinidazol (1000mg).

Los nombres genéricos y utilidad de las plantas se resumen en la Tabla 1.

Ensayo para la determinación de la Concentración Inhibitoria Media de extractos crudos de las especies vegetales

Se tomó trofozoitos de un cultivo en crecimiento de 48 hrs., llevándolos a una concentración parasitaria de 7.5×10^5 trofozoitos/mL, se alicuotó 100 µl en cada pocito de la placa de 96 pozos (Cellstar), a continuación se procedió a añadir 100 µl de las distintas concentraciones de los extractos, vegetales (200-100-50-25µg/mL) y los controles, medio TIYS-33 modificado como blanco, se incubaron a 37°C por 48 hrs. el CandleJarr con 5% de CO₂, pasado ese tiempo, se añadió 10 µl de resazurina 2mM en cada pocito y se incubaron a 37°C por 4 hrs. Finalmente se leyó la placa en el lector de fluorescencia(Synergyht BioTek) para determinar la IC₅₀ el cual fue calculado por el programa Gen5.

RESULTADOS

Concentración Inhibitoria Media de extractos de las especies vegetales

Los 27 extractos evaluados corresponden a 15 especies vegetales diferentes, el 67% (10) de las especies, están asociadas a sintomatología relacionada a enfermedades parasitarias y el 33% han sido seleccionadas con usos tradicionales no asociadas a sintomatología parasitaria (infección urinaria, reumatismo, acné).

Un total de 14 extractos (52%) mostraron valores de IC₅₀ mayor a 200 µg/ml considerados dentro de nuestro laboratorio como inactivos, 11 extractos (40,7%) presentaron valores de IC₅₀ entre 100 y 200 µg/ml siendo considerados como activos, y 2 extractos (7%) son considerados como muy activos ya que presentan IC₅₀ menor a 100 µg/mL. La escala de valores de IC₅₀ utilizada en la clasificación de las especies antiparasitarias es congruente con la opinión de otros autores en la selección de plantas antiparasitarias (Amaral y col. 206; Neiva y col. 2014) Los resultados se observan en la tabla 1

Tabla 1. Lista de Plantas, órganos, usos tradicionales, valores de IC₅₀ de los extractos vegetales evaluados

N	NOMBRE GENÉRICO DE LA PLANTA	ÓRGANO	FECHA DE COLECTA	USAS MEDICINALES TACANA	IC50 µg*mL
1	Ambaibillo	Hojas	Septiembre 2014	Infección urinaria	>200
2	Ambaibillo	Tallo y ramas	Septiembre 2014	Infección urinaria	18035 ±5.14
3	Cawasha	Hojas	Octubre 2014	Infecciones fuertes	>200
4	CanzalE	Raíz	Octubre 2014	Infecciones fuertes	>200
5	Cedro	Corteza	Octubre 2014	Antiparasitario	>200
6	Cepa Caballo	Raíz	Septiembre 2014	Diarrea con sangre	>200
7	Chiori de otro tipo	Hojas y tallo	Octubre 2014	Anti leishmania	175.3
8	Chiori de otro tipo	Raíz	Octubre 2014	Anti leishmania	164.05
9	Chiwama	Raíz	Septiembre 2014	Verrugas	1443 ±15.2
10	Chuchuhuasi	Corteza	Septiembre 2014	Reumatismo	182.73 ±14.95
11	Chuchuhuasi	Raíz	Septiembre 2014	Reumatismo	67.77 ±21.09
12	Corazón de Jesús (liana)	Hola	Octubre 2014	Diarrea con sangre	>200
13	Corazón de Jesús (liana)	Tallo y raíz	Octubre 2014	Diarrea con sangre	>200
14	Manzano silvestre	Corteza	Octubre 2014	Diarrea y Tetanos	>200
15	Patujusillo tallo	Tallo	Octubre 2014	Diarreas	150.83 ±4.47
16	Patujusillo	Raíz	Octubre 2014	Diarreas	174.6 ±9.89
17	Picantillo jengibre	Raíz	Septiembre 2014	Diarrea y antiparasitario	64.89 ±11.45
18	Ribaribay	Planta entera	Octubre 2014	Diarrea con sangre	>200
19	Toronjil	Hojas	Octubre 2014	Dolos estomacal	>200
20	Toronjil	Tallo	Octubre 2014	Dolor estomacal	>200
21	Toronjil	Inflorescencia	Octubre 2014	Dolor estomacal	>200
22	Toronjil	Raíz	Octubre 2014	Dolor estomacal	175.4 ±3.11
23	Vira vira	Tallo	Octubre 2014	Diarreas y hongos	>200
24	Vira vira	Raíz	Octubre 2014	Diarreas y hongos	>200
25	Yondilla	Hojas	Septiembre 2014	Acné	144.05 ±12.43
26	Yondilla	Tallo	Septiembre 2014	Acné	18.53 ±12.72
27	Yondilla	Raíz	Septiembre 2014	Acné	188.9 ±9.61
28	Metronidazol*				0.302 ± 0.072
29	Tinidazol*				0.190 ±0.018
30	CAT**				53.62 ±9.55

*Antiparasitario convencional utilizado como control positivo

**Control antiparasitario natural (CAT= Alcaloides Totales de Corteza de *Evanta-Galipea longiflora*)

DISCUSIÓN

De las plantas con usos antiparasitarios el 35% de los extractos (6) fueron clasificados como: activos (5) y muy activos (1) demostrando la importancia de trabajar asociados al conocimiento tradicional; al mismo tiempo el extracto más activo corresponde a la especie *Zingiber officinale* con IC_{50} de $64,89 \pm 11,4$ $\mu\text{g/mL}$ utilizada tradicionalmente para tratar la diarrea, de las otras 5 especies 3 son utilizadas para el tratamiento de diarreas, 1 para el dolor estomacal y 1 en el tratamiento de parásitos protozoarios de *Leishmania*.

Estos resultados indican de la importancia de la evaluación científica de plantas medicinales asociadas a usos tradicionales ya que el 65% de los extractos de especies utilizadas como antiparasitarias, particularmente en el tratamiento de la diarrea con sangre, en la medicina tradicional Tacana han sido clasificadas como inactivas dentro de nuestro modelo biológico.

De igual manera nuestras evaluaciones en el laboratorio demuestran la pertinencia de llevar adelante evaluaciones biológicas aleatorias de la biodiversidad de especies vegetales no asociadas a tratamientos de parásitos ya que la especie Chuchuhuasi (*Maytenus laevis*) con IC_{50} $67,77 \pm 21$ $\mu\text{g/mL}$ utilizada tradicionalmente para el reumatismo ha sido catalogada como muy activa frente al modelo de *Giardia lamblia*.

La selección de la especie Picantillo dentro de las especies muy activas esta en concordancia con otros estudios realizados sobre la especie *Z. officinale* por Mahmoud y col. 2014, quien confirma el efecto antiparasitario de extractos de dicha planta a dosis de 10 y 20mg/kg/día por 7 días, evaluando los quistes presentes en las heces, donde el recuento intestinal de trofozoitos, revisando la histopatología y haciendo exámenes microscópicos de la mucosa intestinal, se encontró una disminución en las lesiones e infección parasitaria. *Z. officinale* (Jengibre) es una planta medicinal utilizada ampliamente en diferentes culturas alrededor del mundo, las principales acciones farmacológicas del jengibre y sus compuestos aislados incluyen acciones de inmunomodulación, antiinflamatorias, anti apoptóticas, antihiperglicemiantes, antilipidémicas y antieméticas. También es conocido por ser un buen antioxidante pudiendo mitigar o prevenir la generación de radicales libres (Bradeldin y col., 2007).

Por otra parte, *Maytenus laevis* conocida en los pueblos Tacana como Chuchuhuasi, pertenece a la familia *Celastraceae*, estudios relacionados a los géneros de esta familia presentan varias aplicaciones biológicas, entre ellas actividad antioxidante, algunas especies sirven para tratar infecciones e inflamaciones, otras muestran actividad analgésica y antiulcerosa, al mismo tiempo que reportan actividad antiplasmódica (Fonseca y col., 2009; Estevam y col., 2009), el género *Maytenus* presenta actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Candida albicans* (Rodrigues y col., 2012). Alvares y col. el 2014 demuestra que el género *Maytenus imbricata* posee actividad contra *Trichomonas vaginalis* con una IC_{50} mayor a 34 $\mu\text{g/mL}$ y menor a 68 $\mu\text{g/mL}$, tomando

en cuenta que *T. vaginalis* es un protozoario al igual que *G. lamblia*, y dado los estudios realizados a esta especie vegetal contaríamos con un especie vegetal prometedora e interesante para futuros estudios.

Este es un primer reporte que demuestra la eficacia de Chuchuhuasi (*Maytenus laevis*) y Jengibre (*Zingiber officinale*) contra este protozoario patógeno anaerobio facultativo, por lo que sería recomendable realizar un estudio biodirigido de estas dos especies así como las otras 5 especies vegetales que presentaron actividad antiparasitaria y así poder identificar el compuesto responsable de esta actividad, ofreciendo finalmente una opción alternativa de origen natural para el tratamiento de la *Giardiasis*.

Finalmente este tipo de trabajos permite que la comunidad Tacana discrimine entre familias de plantas con actividad antiparasitaria *in vitro* de aquellas que no presentan dicha propiedad frente a posibles parásitos causantes de diarrea.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo se realizó gracias a los proyectos: “Validación de la Farmacopea Tacana frente a trofozoitos de *Giardia* spp” y “Biomoléculas (antiparasitarios)” financiado por el programa de la cooperación Sueca en Bolivia UMSA-ASDI, realizado en los laboratorios de la Unidad de Evaluaciones Biológicas del área de Química Farmacéutica del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Al CIPTA su colaboración y permisos para la documentación de usos tradicionales y colecta de especies vegetales de uso tradicional Tacana.

BIBLIOGRAFÍA

- Amaral, F., Ribeiro, M., Barbosa-Filho, J., Reis, A., Nascimento, F., Macedo, R. (2006). Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 696-720.
- Almeida, I., Alviano, D., Vieira, D., Alves, P., Blank, A., Lopes, A., Alviano, C., Rosa, C. (2007). Anti*Giardial* activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol Res*, 101, 443-452.
- Álvares, C., Fonseca, T., Rodrigues, V., Sousa G., Chacon M, Vieira S, Duarte L. y Gomes M. (2014). Trichomonocidal activity of *Maytenus imbricata* (Celastraceae) African Journal of Pharmacy and Pharmacology Full Length Research Paper 8(19), 502-506
- Barrón González M., (2012). Inhibición del crecimiento de *Giardia lamblia* por acción del extracto acuoso y metanólico de semillas de *Curcubita pepo*. *Rev. Iberoamericana para la investigación del Desarrollo Educativo*. (9). 1-17.
- Bradreldin H. Ali, G., Blunden, Musbah T., Abderrahim N. (2007). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research *in vitro* anti-*Giardial* activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitol Res*, 104, 1345-1349
- Busatti H., Vieira A., Viana J., Silva H., Souza-Fagundes E., Martins O., Alves R. y Gomes M. (2007). Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures, *Parasitol Res*. 102, 145-149.
- Calamani, C. (2006). Frecuencia de parásitos intestinales en escolares comprendidos entre los 5 a 12 años de edad de la unidad educativa 16 de Noviembre de la ciudad de El Alto mayo- Agosto 2006. Tesis de Licenciatura
- Condori S. (2008). Frecuencia de *Giardia lamblia* en niños de 0 – 15 años de edad que acuden al Hospital La Paz durante los meses de junio- agosto 2007. 1.

- Costa Brandelli C., Brandt R., Attilio G., Tascia T. (2009). Indigenous traditional medicine: *In vitro* anti-*Giardial* activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitol Res* 2009 (104), 1345-1349.
- Díaz De la Guardia, R. (2006). Aislamiento y caracterización de proteínas capaces de ligar ácidos grasos en *Giardia lamblia*: Tesis Doctoral Universidad de la Granada, España. 14-17.
- Estevam C.S., Cavalcanti A.M., Cambui E.V.F., Araújo Neto V., Leopoldo P.T.G., Fernandes R.P.M., Araujo B.S., Porfírio Z., Sant'Ana A.E.G. (2009). Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). *Rev Bras Farmacogn* 19: 299-303
- Fonseca A.M., Bizerra A.M.C., Souza J.S.N., Monte F.J.Q., Oliveira M.C.F., Mattos M.C., Cordel G.A., Braz-Filho R., Lemos T.L.G. (2009). Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). *Rev Bras Farmacogn* 19: 193-198.
- Gadelha A.P.R., Vidal F., Castro T., Lopes C.S., Albarello N., Coelho MGP. Y Ceu Figueiredo S.F.L. (2005). Susceptibility of *Giardia lamblia* to *Hovenia dulcis* extracts, *Parasitol Res* (97), 399-407.
- Giménez T. A. Responsable. Proyecto IDH-2009-2014, Desparasitación de niños de Escuelas Rurales I-II, La Paz, Bolivia.
- Mahmoud A. 2014 Ginger and Cinnamon: Can This Household Remedy Treat *Giardiasis*? *Parasitological and Histopathological Studies*.
- Neiva, V., Ribeiro, M., Nascimento, F., Caratêgenes, M., Coutinho-Moraes, D., Amaral, F. (2014). Plant species used in *Giardiasis* treatment: ethnopharmacology and *in vitro* evaluation of anti-*Giardia* activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 24, 215-224.
- Ponce-Macotela, M., Peralta-Abarca, G., Martínez-Gordillo, M. (2006). *Giardia intestinalis* and other zoonotic parasites: prevalence in adults dogs from the southern part of Mexico City. *Vet. Parasitol.*, 131:1-4.
- Rodrigues V.G., Duarte L.P., Silva G.D.F., Silva F.C., Góes J.V., Takahashi J.A., Pimenta L.P.S. (2012). Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*. *Quim. Nova* 35(7):1375-1380
- Thompson, A. (2008) *Giardiasis*: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. *Annales Nestlé*, 63, 26-29.
- Tracy, J.W., Catto, B.A., Webster, Jr., L.T. (1991). Formation of N-(5-nitro-2-thiazolyl)-N'-carboxymethylurea from 5-hydroxyniridazole: Role of aldehyde dehydrogenase in the oxidative metabolism of niridazole. *Drug Metab. Dispos.* 19: 508-515.