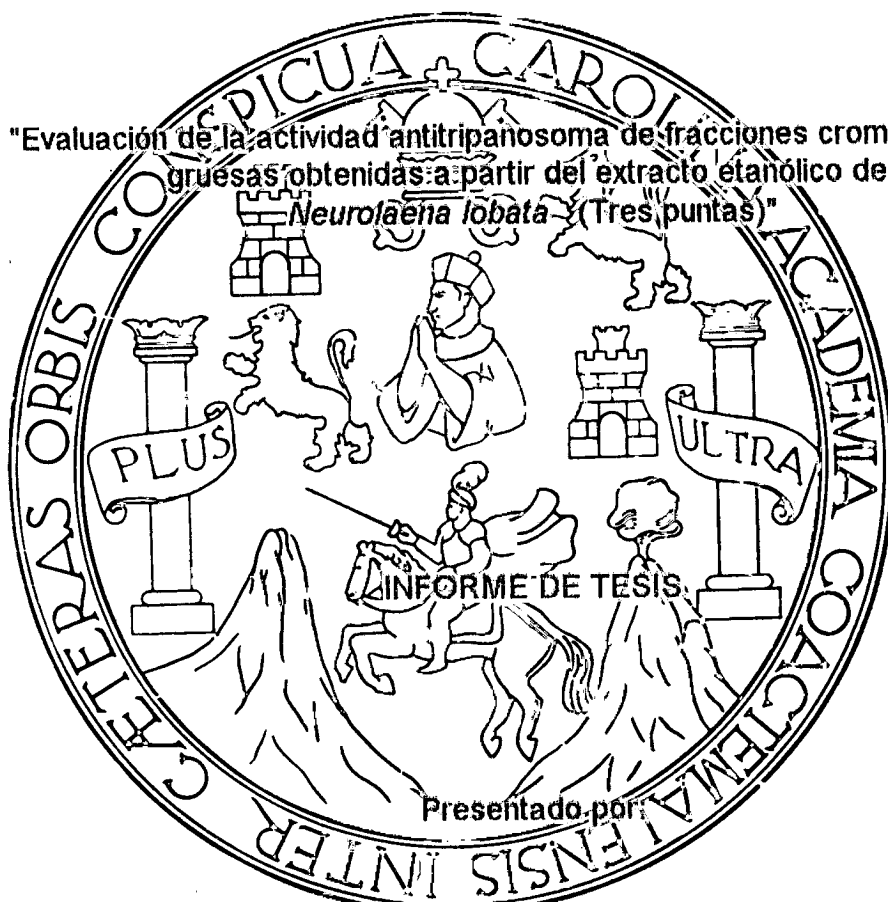


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA



Aña Cecilia Barrientos Paz

Para optar al Título de

Química Bióloga

Guatemala, noviembre de 1996

RECEBIDO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
EL 11 DE NOVIEMBRE DE 1996

DL  
06  
T(1744)

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
SECRETARIO	Lic. Oscar Federico Nave Herrera
VOCAL I	Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
VOCAL II	Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
VOCAL III	Lic. Rodrigo Herrera San José
VOCAL IV	Br. Ana María Rodas Cardona
VOCAL V	Br. Hayro Oswaldo García García

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

**Que por su infinito amor me dió la sabiduría y entendimiento para llegar a este triunfo**

### **A mi madre María Angelica Paz de Barrientos**

**Que por su gran ejemplo, amor y comprensión, más que un triunfo mío es un triunfo de ella.**

### **A mi hermano Alvaro Amilcar Barrientos Paz**

**Por ser como un padre, y por su ejemplo de rectitud, esfuerzo y responsabilidad.**

### **A mis hermanos Heidi y Edgar**

**Con quienes con amor fraternal comparto esta felicidad.**

### **A mis sobrinos**

**Alexander, Estuardo, Daniel, Marina Angélica y Alejandrino, que este triunfo sea un ejemplo de esfuerzo, perseverancia y superación.**

### **A mis cuñados**

**Especialmente a Sandra Morales de Barrientos.**

### **A mi abuelo**

**Maximiliano Orellana**

**Amis tíos en general, y especialmente a Braulio, Casta Luz, Mery, Hector y Elizabeth**

### **A mis primos**

**A la señora Romelia viuda de Hernández  
Por su apoyo y cariño.**

### **A Mynor Hernández**

**Por su cariño, comprensión y apoyo.**

**Al Lic. Luis Hugo Santa Cruz Cruz**

**Por su apoyo y amistad sincera.**

**A mis amigos con mucho cariño.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

A los departamentos de Citohistología y Farmacología y Fisiología.

A los licenciados Armando Cáceres, Ingeborg Berger y Mynor Hernández por la asesoría del presente trabajo de tesis.

A la Dra. Amarillis Saravia, al Lic. Luis Hugo Santa Cruz y a la Licda. Antonieta Rodas por su valiosa colaboración.

## INDICE

	pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
4. JUSTIFICACIONES	12
5. OBJETIVOS	13
6. HIPOTESIS	14
7. MATERIALES Y METODOS	15
8. RESULTADOS	26
9. DISCUSION	37
10. CONCLUSIONES	39
11. RECOMENDACIONES	40
12. REFERENCIAS	41
13. ANEXOS	50

## 1. RESUMEN

El presente trabajo constituyó un estudio fitoquímico-farmacológico integrado, en el cual se evaluó la actividad antitripanosoma tanto *in vitro* como *in vivo* de fracciones cromatográficas gruesas obtenidas a partir del extracto etanólico de hojas de *Neurolaena lobata*.

El fraccionamiento cromatográfico se realizó en una columna de Sephadex LH-20, utilizando metanol como fase móvil y segregando las fracciones obtenidas mediante similitud química evaluada por cromatografía en capa fina.

Para la demostración de la actividad antitripanosoma *in vitro* se utilizó una adaptación de los métodos de Cover y Cutteridge, González *et al*, Hocquemiller *et al* y Fournet *et al*. Para la demostración de la actividad *in vivo* se utilizó el método de Filardi y Brenner estandarizado por Cáceres y cols. Para el ensayo *in vitro* se estimaron las concentraciones letal media e Inhibitoria del 95 % ( $CL_{50}$  y  $CI_{95}$  respectivamente) para el tamizaje preliminar de la actividad antitripanosoma, seleccionándose las tres fracciones mas potentes, las cuales fueron analizadas mediante la prueba de clasificación por rangos de Friedman, comparándose posteriormente las sumas de los rangos obtenidos contra la suma de rangos del control negativo. Para el ensayo *in vivo* se seleccionó la fracción que mejor respuesta mostró en el ensayo *in vitro*, la cual fue evaluada a dosis de 100, 10 y 1 mg/kg de peso mediante un análisis de varianza de una vía y una prueba de Dunnett de comparación de los tratamientos contra el control negativo. La toxicidad aguda de la fracción seleccionada para el ensayo *in vivo* fue evaluada en ratones albinos y la bioactividad de todas las fracciones fue estimada mediante el ensayo con nauplios de *Artemia salina*.

La fracción cromatográfica que dió mejor respuesta antitripanosoma, tanto *in vitro* como *in vivo* fue tamizada fitoquímicamente mediante el uso de pruebas semimicro convencionales y por cromatografía en capa fina.

Los resultados obtenidos demostraron que la fracción No. 2, rica en sesquiterpenlactonas, fue la más activa en el ensayo *in vitro* tanto contra tripomastigotes como contra epimastigotes. En lo que respecta al ensayo *in vivo*, dicha fracción mostró actividad significativa a dosis de 100 y 10 mg/Kg de peso; la fracción, no fue tóxica en ratones albinos a dosis iguales o menores de 200 mg/kg de peso, es decir la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) es mayor de 200 mg/Kg de peso, mostrando además bioactividad en nauplios de *Artemia salina* ( $CL_{50}$ = 656 ppm).

## 2. INTRODUCCION

En Guatemala, la enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi*, es un problema endémico poco estudiado y que por falta de disponibilidad de recursos para su diagnóstico y tratamiento, no se ha descrito epidemiológicamente el estado actual de la enfermedad, lo que impide acciones correctivas o preventivas (1-5). Entre los estudios que se han realizado, algunos han sido orientados a la validación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales de uso popular y dentro de estos, una buena parte se ha fundamentado en la evaluación de aquellas especies vegetales con conocida actividad antiprotozoaria (6-28). Sin embargo, la investigación de plantas medicinales antitripanosoma se encuentra en una etapa temprana, pues únicamente se han evaluado infusiones y extractos de las mismas (Fases I y II, respectivamente de estudios Fitoquímicos-Farmacológicos integrados) por lo que es evidente la importancia de profundizar y complementar los trabajos realizados previamente, es necesaria la evaluación de la actividad antitripanosoma de fracciones cromatográficas (Fase III) de *Neurolaena lobata* (Tres puntas) cuyos extractos e infusiones han sido estudiadas en fases anteriores (I y II) y que demostró tener actividad biológica significativa (24, 25, 27-29).

La importancia del estudio de plantas medicinales con actividad antitripanosoma radica en la necesidad de proporcionar a la población expuesta al contagio de la enfermedad de Chagas medicamentos alternativos a los fármacos sintéticos (nifurtimox y benzoimidazole), debido a que estos últimos resultan ser muchas veces inaccesibles y presentan efectos colaterales indeseables. A mediano y largo plazo, con el desarrollo de medicamentos alternativos derivados de plantas medicinales se contribuirá al control de la infección (25, 30-32).

En el presente trabajo de tesis se planteó la evaluación de la actividad antitripanosoma de fracciones cromatográficas gruesas obtenidas del extracto etanólico de *Neurolaena lobata* (Tres puntas) el cual demostró tener actividad antitripanosoma en estudios *in vitro* e *in vivo* realizados previamente, se procedió además a la determinación de la toxicidad aguda ( $DL_{50}$ ) y a la caracterización fitoquímica preliminar de la fracción o fracciones que demostraron actividad antitripanosoma significativa (24-26).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una patología infecciosa e inflamatoria producida por un protozoo flagelado, con manifestaciones en varios órganos pero con mayor frecuencia e importancia a nivel del corazón en donde se presenta una miocarditis (1, 33).

Diversos estudios realizados en Guatemala han demostrado la existencia de la enfermedad de Chagas y se estima que la prevalencia general es del 8 al 11 %, existiendo áreas, donde ésta llega hasta el 46%, delimitando en consecuencia un área endémica que abarca los departamentos de Chiquimula, Zacapa, Santa Rosa, Escuintla, Jalapa, Jutiapa, El Progreso y Guatemala (32, 34-36).

#### 3.2. Agente Etiológico.

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoo que tiene un ciclo de vida muy complejo, se encuentra en tres formas morfológicamente distintas que están relacionadas con los diferentes medios en que el parásito habita. Estas formas son: amastigote, que es la forma intracelular, presente en los diferentes mamíferos; el epimastigote, presente en el insecto vector; y la forma tripomastigote que se presenta en la sangre de los mamíferos y en la glándula rectal del insecto donde recibe el nombre de tripomastigote metacíclico (37).

El *T. cruzi* crece en casi todas las células del hospedero vertebrado, tales como: los fibroblastos, células adiposas, células de la médula ósea, del músculo estriado, del bazo, de los nódulos linfáticos, hepáticas, renales y células nerviosas (38).

#### 3.3. Vector.

Los vectores de la enfermedad de Chagas son varias especies de chinches triatominas del género *Reduvidae* y familia *Triatomidae*, de hábito exclusivamente nocturno que producen una picadura indolora con predilección especial por la cara y sitios descubiertos, y al succionar sangre del hospedero, defecan eliminando así el parásito (39).



En Guatemala los principales vectores de Chagas son *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, se les encuentra en climas cálidos y habitan en ranchos techados de zacate o paja con paredes de barro no cocido o bajareque (2, 34).

#### 3.4. Modos de transmisión:

Los reduvidos transmisores se infectan al picar a hombres y animales infectados, los tripanosomas ingeridos por el insecto se convierten en epimastigotes, los cuales se multiplican por división binaria y conducen a la formación de tripomastigotes metacíclicos, que salen con las heces del insecto y estos infectan nuevos hospederos al penetrar por las abrasiones de la piel o por las membranas de las mucosas (3, 4, 40).

Otros modos de transmisión son por la transfusión de sangre contaminada, trasplante de órganos infectados, y la transmisión de madre a hijo vía transplacentaria (41, 42).

#### 3.5. Manifestaciones clínicas:

En relación a la enfermedad se conocen varios estadios: un período de incubación, una fase aguda de corta duración, una indeterminada o silenciosa en donde el individuo es clínicamente asintomático y por último una fase crónica de varios años de desarrollo (3).

##### 3.5.1. Período de incubación:

Dura de 6 a 20 días desde la infección por el vector hasta la aparición de los primeros síntomas (43).

##### 3.5.2. Fase aguda:

Esta etapa puede comenzar como una infección general, con fiebre, dolor muscular, vómitos, diarrea, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, taquicardia, miocarditis, y algunas lesiones neurológicas como meningoencefalitis. En esta etapa puede encontrarse el chagoma que se caracteriza por una inflamación local cuyos síntomas y signos varían de acuerdo a su localización. Cuando la infección ocurre en la conjuntiva se denomina signo de Romaña, que se caracteriza por

presentar un eritema doloroso, con celulitis perioftálmica que puede ser unilateral o bilateral que es acompañada por linfadenitis regional. Arriba del 30 por ciento de los casos muestran anomalías electrocardiográficas y radiológicas debido a las miocarditis agudas de diferentes grados (43, 44).

#### 3.5.3. Fase latente o intermedia:

Conocida también como indeterminada o silenciosa, se inicia entre la octava y décima semana después de la fase aguda y puede persistir por varios años o permanecer indefinidamente. Se caracteriza por la ausencia de sintomatología clínica, y por presentar electrocardiograma y rayos X de tórax normales. Se presenta una parasitemia baja, debido a la multiplicación intracelular constante en varios órganos. Sin embargo, estos pacientes son serológicamente positivos como único signo de la enfermedad. En esta fase el paciente constituye un importante reservorio de la infección y contribuye a mantener el ciclo de vida del parásito (45, 46).

#### 3.5.4. Fase crónica:

En esta fase disminuye la parasitemia lo que da lugar a las manifestaciones crónicas de la infección por *T. cruzi* y como consecuencia se ven afectados principalmente el sistema cardíaco y digestivo; puede también involucrar el sistema nervioso central, periférico o autónomo. Estos cambios pueden incluir parestesias, alteraciones cerebelosas, convulsiones y anomalías psiquiátricas. Las manifestaciones cardíacas resultan de una miocarditis crónica, suelen predominar los signos de insuficiencia cardíaca, y en cualquier momento puede ocurrir la muerte súbita del paciente por fibrilación ventricular (45-47).

#### 3.6. Diagnóstico:

Para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas existen dos tipos de procedimientos, los cuales son:

### 3.6.1. Métodos parasitológicos:

Entre estos métodos algunos se basan en la búsqueda directa del parásito entre ellos: gota gruesa, frote sanguíneo, tubo capilar, o bien realizar el cultivo en un medio artificial, en animales de experimentación o el xenodiagnóstico. Estos métodos presentan el problema que su sensibilidad es bastante baja y su utilidad está indicada principalmente en la fase aguda de la infección, cuando habitualmente existe una parasitemia elevada (48, 49).

### 3.6.2. Métodos serológicos:

Estos métodos permiten la detección de anticuerpos específicos para componentes del *T. cruzi*, de tipo IgM, al principio de la infección, y de IgG conforme la enfermedad progresa. Estos anticuerpos, tanto IgG como IgM pueden ser detectados en el suero usualmente después de las primeras manifestaciones clínicas de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*. La fase crónica dura toda la vida, siendo clínicamente aparente o no y los anticuerpos IgG son detectados regularmente en el suero. Sin embargo, al igual que otras enfermedades parasitarias, muchas circunstancias hacen difícil la estandarización del serodiagnóstico, principalmente porque en la actualidad no es posible establecer una prueba de referencia al no existir un método definitivo, dando como resultado desacuerdos entre diferentes grupos de investigadores acerca de la adecuada aplicación e interpretación de las técnicas serológicas para el diagnóstico (5, 50, 51). Las técnicas más usadas se dividen en:

#### 3.6.2.1. Métodos de tamizaje:

Conforme a las técnicas y procedimientos establecidos por el Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR) de la Fac. de CC. QQ. y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se realizan las pruebas de tamizaje siguientes: aglutinación rápida con partículas de Látex, hemaglutinación indirecta y aglutinación de partículas de gelatina (52-54).

### 3.6.2.2. Métodos confirmatorios:

Entre estos métodos se encuentran inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmuno difusión doble (IDD). La ventaja de IFI y ELISA es que pueden diferenciar anticuerpos IgG de IgM incrementando así su especificidad y sensibilidad. La IDD es útil para confirmar el diagnóstico de pacientes chagásicos siempre y cuando se utilice como antígeno tripomastigotes de *T. cruzi* (55, 56).

### 3.7. Terapia:

#### 3.7.1. Quimioterapia:

El tratamiento con fármacos de la enfermedad de Chagas sólo es efectivo en la etapa aguda. Uno de los medicamentos de elección es el nifurtimox que es un derivado del nitrofurano que ha demostrado ser efectivo tanto *in vitro* como *in vivo*. Otro medicamento, el benzonidazol, derivado del tipo nitroimidazol, también ha demostrado ser activo. Estos medicamentos tienen un 50 por ciento de efectividad en el tratamiento de esta afección parasitaria, demostrando buenos resultados en la eliminación de los síntomas y en la negativización de la parasitemia y serología. Tanto el nifurtimox como el benzonidazol pueden producir efectos colaterales indeseables y son muy difíciles de adquirir en el mercado (30, 31).

#### 3.7.2. Drogas vegetales (Fitoterapia):

##### 3.7.2.1. Etnobotánica:

La búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal ha ocupado el interés de farmacognostas y fitoquímicos por mucho tiempo. Exploraciones para recolectar especímenes vegetales, y análisis fitoquímicos, se han enfocado a la búsqueda de sustancias con posible actividad farmacológica sobre trastornos de diversa índole. Los remedios nativos o caseros conocidos en la medicina folklórica, siguen vigentes y han dado origen al estudio científico de las plantas medicinales. Es la naturaleza la que ha proporcionado muchos medicamentos

(quinina, digoxina, colchicina, vinblastina, atropina, etc.) y sigue proporcionando el punto de partida para los futuros medicamentos (57).

#### **3.7.2.2. Plantas medicinales antimicrobianas:**

Entre 1984-89 se realizaron varios trabajos de investigación para tamizar la actividad de las plantas más frecuentemente utilizadas en las afecciones urinarias e infecciones de la piel y mucosas, y en afecciones de los sistemas digestivo y respiratorio. El programa Universitario de Investigación cofinanciado por DIGI apoyó parcialmente el tamizaje y confirmación de las propiedades antibacterianas de plantas usadas en el tratamiento de afecciones digestivas y respiratorias en 1987-89 y el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB) financió durante 1989-92 los estudios con dermatofitos. La ejecución de tesis de pregrado ha contribuido enormemente a la validación de la actividad farmacológica de plantas a las que tradicionalmente se les ha atribuido actividad antimicrobiana en el tratamiento de diversas afecciones, principalmente las de tipo bacteriano, fúngico y parasitario (16-24).

Estudios realizados en Guatemala sobre la actividad antimicrobiana de plantas medicinales de uso popular, demuestran que el 30 % de las mismas son activas contra los microorganismos que más frecuentemente enferman a los guatemaltecos (16-24).

#### **3.7.2.3. Plantas medicinales antiparasitarias:**

De los datos derivados de revisiones de literatura, tanto regional (Mesoamérica) como local (Guatemala), de encuestas etnobotánicas y de estudios de plantas antimicrobianas, se elaboró una lista de especies vegetales con potencial antiparasitario, estudiándose principalmente aquellas con actividad contra las siguientes patologías: parásitos intestinales, amebiasis, leishmaniasis, malaria, tricomoniasis y otras parasitosis y ectoparasitosis (16-24, 58).

#### **3.7.2.4. Plantas medicinales antiprotozoarias:**

A partir del Universo de plantas usadas para el tratamiento de parasitosis, se preparó una lista de las plantas usadas en el tratamiento de protozoariosis. Luego se hizo una selección en base a la mayor frecuencia de uso en

enfermedades atribuibles a protozoarios, y de éstas se escogieron las plantas de mayor uso; estableciéndose que en Guatemala se usan al menos 280 especies de plantas (79 familias) para el tratamiento de infecciones por parásitos, principalmente helmintos (70.4 %). De este grupo, 172 especies de 57 familias se utilizan para el tratamiento de infecciones por protozoarios, particularmente amebiasis (65.1 %) y malaria (46.5 %) (24). A partir de los datos generados se han estudiado recientemente en Centroamérica plantas con actividad contra la malaria y tripanosomiasis tales como: *Croton guatemalensis*, *Croton niveus*, *Neurolaena lobata*, *Sansevieria hyacinthoides* y *Simarouba glauca* han sido evaluadas como antimaláricas, *Annona reticulata*, *Bixa orellana*, *Byrsonima crassifolia*, *Gliciridia sepium*, *Jacaranda mimosifolia*, *Neurolaena lobata*, *Petiveria alliacea*, *Smilax lundellii*, *Solanum americanum*, *Solanum hartwegii*, *Tagetes lucida* y *Tridax procumbens* han sido evaluadas como antitripanosoma (24-28).

#### 3.7.2.5. *Neurolaena lobata* (Tres Puntas):

De las plantas evaluadas como antiprotozoarias, esta especie presenta resultados prometedores, pues ha demostrado actividad no sólo antimalárica, sino que también ha sido efectiva contra la tripanosomiasis tanto *in vitro* como *in vivo* (24-27).

##### 3.7.2.5.1. Clasificación botánica:

Reino:	Plantae.
Subreino II:	Embryobionta.
División XVII:	Magnoliophyta.
Clase I:	Magnoliopsida.
Subclase VI:	Asteridae.
Orden 11:	Asterales.
Familia:	Asteraceae (Compositae)
Género:	<i>Neurolaena</i> .
Especie:	<i>Neurolaena lobata</i> (L.) R. Br. 1817.
Sinonimia:	<i>Conyza lobata</i> L. 1753.
	<i>N. lobata</i> var. <i>indivisa</i> Donn. Sm. 1889.

Nombres comunes: Tres puntas, mano de lagarto, tabaquillo.

### 3.7.2.5.2. Descripción botánica:

Hierba erecta de 1-4 m de altura, usualmente muy poco ramificada; tallos estriados, surcados, densamente pubescentes cuando jóvenes. Hojas cortopeciadas o casi sésiles, casi glabra en el envés; alternas, acuminadas, agudas o cuneadas en la base, las inferiores hasta 30 cm de largo, a menudo contractadas y decurrentes en el pecíolo, los márgenes dentados o aserrados, escabroso-hirsutulosas en el haz, densamente corto-pilosas en el envés y a menudo velutinoso. Inflorescencia corimbosa-paniculada, las cabezuelas numerosas, pediceladas, discoides; involucro de 5-6 mm de tamaño; filarios alrededor de 4 seriados, oblongos, redondeados al ápice, con 1-3 nervaduras, más o menos puberulento, pálidos, obtusos, 4-5 mm de largo; corolas amarillas a anaranjado-amarillas, alrededor de 4 mm de longitud. Aquenios negros, esencialmente glabros, alrededor de 1.5 mm de largo; papus uniseriado, las cerdas 30 o más, alrededor de 4 mm de largo, blanco-amarillentas (55).

Es una planta nativa de Centro América, se distribuye desde el sur de México hasta el norte de Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del caribe. En Guatemala se localiza en matorrales húmedos o algunas veces en bosques de encino, comunmente en crecimiento secundario, a menudo en terrenos cultivados, en terrenos zarzosos, a lo largo de márgenes de ríos o arroyos, en bordes de caminos, como maleza común en plantaciones de banano y en lugares escarpados. Se distribuye desde el nivel del mar hasta 1400 m de altura, en los municipios de Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Izabal, El Petén, El Progreso, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepéquez (29, 59, 60).

### 3.7.2.5.3. Composición Química:

Químicamente *N. lobata* ha sido estudiada por varias compañías farmacéuticas y centros de investigación de productos naturales. Estudios fitoquímicos preliminares han demostrado que hojas y tallos de la *N. lobata* contienen un principio amargo constituido por germacronólidos sesquiterpenoides como lobatina A, lobatina B, neurolanina A y neurolanina B. De las hojas se han aislado derivados del timol y 11 flavonoides. De estos últimos, cinco son derivados de la quercetagenina, cuatro kamferoles y dos luteolinas (61-65).

En los años 1994 y 1995, Medinilla realizó un estudio fitoquímico-farmacológico integrado, en el cual, mediante cromatografía en capa fina se estableció preliminarmente que los componentes predominantes presentes en especímenes colectados en Guatemala son flavonoides y principios amargos (66, 67).

#### 3.7.2.5.4. Usos populares:

En América central, las hojas y tallos de *N. lobata* tienen un amplio uso medicinal, atribuyéndosele propiedades tales como: antibióticas, antiespasmódicas, antihipertensivas, antimaláricas, antipiréticas, aperitivas, carminativas, diuréticas, hipoglicemiantes y tónicas. Hasta la fecha, únicamente se ha comprobado que la planta tiene actividad antimalárica, antiespasmódica y tripanocida (24-28, 68).

En Guatemala, la infusión de las hojas es un medicamento amargo utilizado como tratamiento de diarrea, diabetes, malaria y otros procesos febriles, cólicos, inflamaciones, heridas y úlceras (60).



#### 4. JUSTIFICACION

En los últimos tiempos muchas enfermedades han afectado a la población guatemalteca, entre las que se puede mencionar la enfermedad de Chagas, la cual reviste un especial interés debido a que en su fase crónica el paciente presenta efectos irreversibles, por lo que es imprescindible su tratamiento durante su fase aguda. Por otro lado, dada su incidencia en poblaciones pobres de regiones semiáridas y desérticas, donde las condiciones de vida son inadecuadas, resulta ser un serio problema socioeconómico. Dentro de este contexto, la situación se complica, puesto que el paciente no recibe adecuado tratamiento a tiempo (fase aguda), a causa de la poca disponibilidad de medicamentos, ya que dicha afección resulta ser una enfermedad "huérfana" porque a las compañías farmacéuticas no les es rentable invertir en investigación y desarrollo de nuevos medicamentos efectivos para combatir esta patología, por la falta de capacidad de pago de la población afectada.

La importancia del estudio específico de *Neurolaena lobata* como antitripanosoma radica en que la mayoría de las medicinas utilizadas para el tratamiento de procesos chagásicos son de alto costo, poco asequibles en el mercado y conllevan efectos secundarios indeseables. Por otro lado, los medicamentos derivables de plantas medicinales resultan ser, en la mayoría de los casos, poco tóxicos o inocuos en comparación con los medicamentos sintéticos. Con la ejecución del presente trabajo de tesis se espera que en un plazo razonable de tiempo se pueda proporcionar a la población con limitado poder adquisitivo, medicamentos derivados de plantas (específicamente de *N. lobata*) de bajo costo, accesibles, seguros y efectivos contra la enfermedad de Chagas (en su fase aguda) que en un momento dado pudiesen padecer.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General:

Contribuir al estudio fitoquímico-farmacológico de la especie *Neurolaena lobata* (como antitripanosoma).

### 5.2. Específicos:

- 5.2.1. Preparar los extractos hexánico y etanólico de *Neurolaena lobata*.
- 5.2.2. Fraccionar mediante cromatografía gruesa en columna el extracto que demuestre la mejor respuesta antitripanosoma.
- 5.2.3. Confirmar la actividad antitripanosoma *in vitro* con epimastigotes y tripomastigotes de los extractos y las fracciones obtenidas.
- 5.2.4. Determinar la actividad antitripanosoma *in vivo* contra tripomastigotes de la fracción cromatográfica que demuestre la mejor actividad antitripanosoma *in vitro*.
- 5.2.5. Evaluar la toxicidad aguda ( $CL_{50}$ ) en nauplios de *Artemia salina* de la fracción cromatográfica con la mejor actividad antitripanosoma demostrable tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 5.2.6. Establecer la toxicidad aguda ( $DL_{50}$ ) en ratones, de la fracción cromatográfica con la mejor actividad antitripanosoma demostrable tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 5.2.7. Caracterizar fitoquímicamente la fracción cromatográfica con la mayor actividad antitripanosoma demostrable.

## 6. HIPOTESIS

- 6.1. Al menos uno de los extractos crudos obtenidos a partir de *Neurolaena lobata* (Tres puntas) tiene actividad antitripanosoma demostrable en modelos *in vitro*.
- 6.2. Al menos una de las fracciones cromatográficas obtenidas a partir del extracto etanólico tiene actividad tripanocida demostrable tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*.
- 6.3. La fracción cromatográfica con mayor actividad antitripanosoma demostrable no presenta toxicidad aguda considerable.

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1. Universo:

Extracto etanólico de hojas de *Neurolaena lobata* (Tres puntas) y fracciones cromatográficas gruesas obtenidas a partir del extracto etanólico.

### 7.2. Sujeto de estudio (muestra):

El material trabajado estuvo constituido por muestras mixtas colectadas al azar de especímenes de *Neurolaena lobata* (Tres puntas) provenientes de Coatepeque, en poblaciones cultivadas de dicha especie. Dicho material vegetal fue proporcionado por el Laboratorio Farmaya, donde se encuentra depositada una muestra botánica identificada con el número 160.

### 7.3. Medios:

#### 7.3.1. Recursos humanos:

7.3.1.1. Autora de la investigación: Ana Cecilia Barrientos Paz.

7.3.1.2. Asesor de tesis: Lic. Armando Cáceres E.

7.3.1.3. Coasesor fitoquímico: Lic. Mynor Hernández.

7.3.1.4. Consultora U. de Viena: Licda. Ingeborg Berger.

7.3.1.5. Personal del Herbario del Laboratorio Farmaya.

7.3.1.6. Colaboradores del departamento de Citohistología.

7.3.1.7. Colaboradores del departamento de Farmacología.

#### 7.3.2. Recursos materiales e institucionales:

7.3.2.1. Equipo, cristalería, reactivos y materiales de laboratorio:

7.3.2.1.1. Equipo:

- Chaquetas de calentamiento para balones de 5 litros.
- Equipo Soxhlet con cámara con capacidad para 250-700 g (Balón de 5 litros + cámara de extracción + condensadores del sistema)
- Percoladores o maceradores.
- Balanza semianalítica.
- Evaporador rotatorio (Rotavapor).
- Balanza para animales.
- Microscopio compuesto.

- Campana de flujo laminar.
- Computador compatible SX/386-16 Mhz.

#### 7.3.2.1.2. Cristalería:

- Beakers de 250 ml y 1 litro.
- Balones para rotavapor (1 litro y 500 ml).
- Frascos de vidrio color ambar.
- Cámaras cromatográficas para CCF
- Cámara de Neubauer.
- Columnas cromatográficas de vidrio para CC.
- Cristalería diversa multipropósito.

#### 7.3.2.1.3. Reactivos y fármacos de referencia:

- Hexano.
- Acetato de etilo.
- Etanol al 95 %.
- Metanol.
- Agua destilada o desmineralizada.
- Agentes cromógenos para CCF.
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Polisorbato 80 (Tween 80).
- Alopurinol.
- Violeta de Genciana.

#### 7.3.2.1.4. Materiales de laboratorio y de oficina:

- Mangueras de tygon.
- Sephadex LH-20 para CC.
- Cromatofolios de Silicagel 60 F<sub>254</sub>
- Sondas orogástricas para ratón.
- Carboximetil-Celulosa.
- Medio MEM.
- Medio LIT.
- Placas de microtitulación.
- Sal de mar comercial.
- Materiales de oficina.

#### 7.3.2.1.5. Material biológico:

- Epimastigotes y tripomastigotes de cepa guatemalteca conocida.
- Células L.
- Huevos de *Artemia salina*.

- Ratonés albinos machos de 25-35 g de peso.

#### 7.3.2.2. Recursos Institucionales:

- Fac. de CC. QQ. y Farmacia (USAC):
- Escuela de Química Biológica, Departamento de Citohistología.
- Escuela de Química Farmacéutica, Departamento de Farmacología.
- Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas.
- Agencia de Cooperación Internacional del Japón.
- Laboratorio y Droguería Farmaya.

#### 7.4. Procedimiento y Metodologías.

##### 7.4.1. Recolectado y clasificado de los especímenes vegetales silvestres.

##### 7.4.2. Secado del material vegetal mediante energía solar.

##### 7.4.3. Molienda del material vegetal en molino de granos (67, 69-71).

##### 7.4.4. Metrología:

7.4.4.1. Se pesó el material que fue sometido a la extracción.

7.4.4.2. Se midieron los volúmenes necesarios de los solventes extractores.

7.4.5. Se preparó el extracto hexánico mediante extracción continua y exhaustiva en un aparato Soxhlet con una carga de 364.5 g de hojas secas de *N. lobata* (72).

7.4.6. Se reconcentró el extracto hexánico mediante evaporación a presión reducida (rotavapor) hasta obtener un extracto pilular (71, 72).

7.4.7. Se preparó el extracto etanólico (etanol al 95 %) mediante extracción en macerador, el cual contenía el material vegetal residual de la extracción hexánica (72).

- 7.4.8. Se reconcentró el extracto etanólico mediante evaporación a presión reducida (rotavapor) hasta obtener un extracto pilular (71, 72).
- 7.4.9. Se determinaron los rendimientos extractivos mediante gravimetría, siendo los mismos los siguientes: 42.5 gramos de extracto hexánico, equivalente a un 11.66 % de rendimiento extractivo; y 36.4 g de extracto etanólico, equivalente al 10 % de rendimiento extractivo (70, 71).
- 7.4.10. Se fraccionó el extracto etanólico mediante cromatografía de exclusión de tamaño en una columna de Sephadex LH-20 (120g, 4.4 cm de diámetro 25 cm de alto) utilizando metanol como fase móvil. De este fraccionamiento se obtuvieron 12 fracciones cromatográficas gruesas.
- 7.4.11. Se formularon los extractos y fracciones obtenidos mediante su disolución (cuando fue posible) y suspensión (cuando no fue posible solubilizarlos) en un vehículo adecuado, químicamente inerte y compatible con las sustancias, siendo el dimetilsulfóxido (DMSO), el suspensor para el caso de los ensayos antitripanosoma *in vitro* y bioensayo en *Artemia salina*, y polisorbato 80 al 0.5 % para una de las fracciones ensayadas en el ensayo *in vivo*. Los agentes suspensores empleados fueron inocuos para los epimastigotes, tripomastigotes, nauplios de *Artemia salina*, y ratones albinos (74).
- 7.4.12. Se caracterizó fitoquímicamente la fracción con actividad biológica demostrable mediante pruebas convencionales de tamizaje fitoquímico (semimicro) y mediante cromatografía en capa fina, poniendo énfasis en el seguimiento de flavonoides y sesquiterpenlactonas (70-72).
- 7.4.13. Farmacología experimental.
- 7.4.14.1. Ensayo Antitripanosoma:
- 7.4.14.1.1. Ensayo *in vitro*:
- 7.4.14.1.1.1. Obtención epimastigotes:

Los mismos se obtuvieron por cultivo y pasajes sucesivos en LIT, para lo cual se usaron  $3 \times 10^6$  a  $6 \times 10^6$  epimastigotes/ml en fase de crecimiento exponencial (27, 75-77).

#### 7.4.14.1.1.2. Obtención de tripomastigotes:

Se obtuvieron por inoculación de epimastigotes en tejido fibroblástico (celulas L), y posterior incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante 4 a 6 semanas. Transcurrido ese período, se procedió a una separación de los mismos en una columna de CM-celulosa, determinándose por medio de un hemocitómetro una concentración entre  $6 \times 10^4$  a  $9 \times 10^4$  tripomastigotes/ml (27, 78).

#### 7.4.14.1.1.3. Procedimiento de reto:

Para la demostración de la actividad antitripanosoma *in vitro* se utilizó una adaptación de las técnicas de Cover y Gutteridge (1982), González *et al* (1990), Hocquemiller *et al* (1991) y Fournet *et al* (1994). Dicha metodología consistió en retar cultivos de *T. cruzi* en fase de epimastigote y tripomastigote (en concentraciones de  $3-6 \times 10^6$  parásitos/ml en fase logarítmica) en microplacas de poliestireno. Las sustancias de prueba (extractos, fracciones, fármaco de referencia y control negativo) fueron disueltas o suspendidas en medio LIT, utilizando DMSO como suspensor de aquellas sustancias insolubles en dicho medio. Los niveles de dilución final de las sustancias de prueba para el ensayo *in vitro* fueron los siguientes:

Control negativo: medio LIT con DMSO al 0.5 %.

Fármaco de referencia (control positivo): violeta de genciana en medio LIT a una concentración de  $250 \mu\text{g/ml}$ .

Extractos hexánico y etanólico reconcentrados a grado miel, a concentraciones de 1000, 500, 250, 50, 25 y  $12.5 \mu\text{g/ml}$ .

Fracciones cromatográficas gruesas obtenidas a partir del extracto etanólico, a concentraciones de 200, 100 y  $25 \mu\text{g/ml}$ .

Todos los niveles de dilución para cada sustancia de prueba fueron corridos en triplicado.

El procedimiento general fue de la siguiente manera: se inocularon en triplicado  $100 \mu\text{l}$  de la suspensión (a concentración conocida) del protozoario y las



cantidades necesarias de las soluciones o suspensiones de prueba conforme a los niveles de dilución antes señalados. Las microplacas fueron seguidamente incubadas a 37 °C, durante 24 horas, para el caso de tripomastigotes, y a 26 °C durante 48 horas para el caso de epimastigotes. Transcurridos los tiempos de incubación, se procedió a la cuantificación microscópica del número de parásitos/ml por medio de una cámara de Neubauer transformando los datos obtenidos a valores porcentuales, tomando como referencia del 100 % el número de parásitos/ml del control negativo.

#### 7.4.14.1.2. Ensayo *in vivo*:

Para la demostración de la actividad antitripanosoma *in vivo* se utilizó el método de Filardi y Brenner (1984) estandarizado por Cáceres y cols. Dicha metodología consiste en inocular intraperitonealmente ratones albinos (machos con peso entre 18 a 20g) con  $1 \times 10^6$  tripomastigotes de *T. cruzi* por kg de peso y la subsiguiente administración (por sonda orogástrica) de las soluciones o suspensiones de prueba 24 horas después de ser infectados y cada 48 horas a partir de ese momento durante 21 días a dosis de 100, 10 y 1 mg/Kg de peso. Los tratamientos evaluados fueron 5: un control negativo, al que sólo se le administró el vehículo (solución acuosa de polisorbato 80 al 0.5 %), un control positivo (alopurinol a dosis de 10 mg/Kg) y la fracción cromatográfica con la mejor respuesta tripanocida *in vitro*, a dosis de 100, 10 y 1 mg/Kg. Cada tratamiento contó con 5 repeticiones (5 ratones por solución o suspensión de prueba). La parasitemia, en Número de parásitos/ml, se evaluó cada 7, 14 y 21 días después de ser infectados. La actividad antitripanosoma se observó por medio de la disminución de tripomastigotes circulantes en la sangre y por comparación con el grupo control negativo, el cuál mostró el comportamiento de parasitemia equivalente al 100 %.

#### 7.4.14.1. Ensayo toxicológico:

##### 7.4.14.1.1. Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*

Se utilizó la técnica descrita por McLaughlin y cols. Este ensayo permitió la determinación de la toxicidad ( $CL_{50}$ ) en la larva del crustáceo *Artemia salina*

mediante la evaluación de 3 niveles logarítmicos de diluciones de las fracciones ensayadas. La técnica consistió en la preparación de un medio salino adecuado, la colocación de huevos del crustáceo en dicho medio y la eclosión de los mismos. Posteriormente, se transfirió la mayor cantidad de nauplios vivos a un erlenmeyer con medio salino fresco. Seguidamente, se prepararon 12 lotes de 10-15 nauplios cada uno. A continuación se procedió con la preparación de diluciones de 1000, 500 y 250 ppm de cada extracto y fracción cromatográfica ensayadas. Para cada sustancia de prueba se utilizaron 9 de los 12 lotes preparados. A los restantes 3 lotes, se les agregó DMSO al 0.5 %, como control negativo. Transcurridas 24 horas, se procedió a la medición del número de nauplios sobrevivientes a cada nivel de dilución, del que por diferencia con el valor inicial, se calculó el número de decesos observados (74).

#### 7.4.14.1.2. Toxicidad aguda en ratón:

El método utilizado, correspondió al descrito por el programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), el cuál consistió en el tratamiento de 4 lotes de ratones a los que se les administraron dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg de peso de la fracción que demostró mejor actividad tripanocida, tanto *in vivo* como *in vitro*. Una vez realizada la administración orogástrica de la sustancia de prueba a las dosis correspondientes, se procedió a observar posibles cambios en el comportamiento de los animales de experimentación y posibles decesos, que en caso de haber toxicidad aguda, podrían ser observados. El ensayo tuvo una duración de 7 días (74).

#### 7.4.15. Diseño experimental:

##### 7.4.15.1. Ensayo *in vitro*:

7.4.15.1.1. Para todos los extractos y fracciones: se realizó un ensayo cuantitativo para la estimación de la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) y Concentración Inhibitoria del 95% ( $CI_{95}$ ) de manera que se pudiesen tamizar el extracto y las 3 fracciones cromatográficas más potentes.

7.4.15.1.2. Para las tres fracciones cromatográficas gruesas más activas:

7.4.15.1.2.1. Tamaño de muestra por tratamiento:

Para un valor de  $\alpha = 0.05$  y  $\beta = 0.20$  se tiene un nivel de confianza (NC) igual a:

$$NC = Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta}$$

$$NC = 3.422$$

lo que implica que el número de repeticiones a realizar por tratamiento ( $n_j$ ) debería ser:

$$n_j \geq (2 NC^2 \sigma^2) / (\Delta^2)$$

donde se desconoce  $\sigma^2$  y se asume que el límite de error  $\Delta = 2 \sigma$ , por lo que entonces  $\Delta^2 = 4 \sigma^2$ , por lo tanto:

$$n_j = (2 NC^2 \sigma^2) / (4 \sigma^2)$$

$$n_j = (2 NC^2) / (4)$$

$$n_j = (2)(3.422)^2 / (4)$$

$$n_j = (1)(3.422)^2 / (2)$$

$$n_j = (11.71) / (2)$$

$$n_j = 5.855$$

que aproximado da un valor  $n_j = 6$ , que es el mínimo de repeticiones que deberían realizarse para cada tratamiento. Para el presente diseño experimental se decidió realizar 9 repeticiones por tratamiento (3 niveles de dilución x 3 repeticiones = 9) (79-81).

7.4.15.1.2.2. Integración del diseño:

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, con 5 tratamientos y 9 bloques. Los tratamientos estuvieron constituidos por un control negativo (medio con DMSO al 0.5 %), un control positivo (violeta de genciana a concentración de 250  $\mu\text{g/ml}$ ) y las 3 fracciones cromatográficas con mayor actividad tripanocida conforme a las estimaciones de  $CL_{50}$  y  $Cl_{95}$  (según lo señalado en el inciso 7.4.16.1.1 del presente informe de tesis) (79, 80). Los bloques estuvieron constituidos por cada repetición de cada nivel de dilución de cada fracción (3 diluciones x 3 repeticiones cada una = 9 bloques), para el caso

de los controles negativo y positivo, se realizaron 9 repeticiones, siendo cada repetición un bloque del diseño.

#### 7.4.15.2. Ensayo *in vivo*:

##### 7.4.15.2.1. Tamaño de muestra por tratamiento:

Para un valor de  $\alpha = 0.05$  se tiene un nivel de confianza (NC) igual:

$$NC = Z_{1-\alpha/2}$$

$$NC = 2.49$$

lo que implica que el número de repeticiones a realizar por tratamiento ( $n_j$ ) debería ser:

$$n_j \geq (2 NC^2 \sigma^2) / (\Delta^2)$$

donde se desconoce  $\sigma^2$  y se asume que el límite de error  $\Delta = 2 \sigma$ , por lo que entonces  $\Delta^2 = 4 \sigma^2$ , por lo tanto:

$$n_j = (2 NC^2 \sigma^2) / (4 \sigma^2)$$

$$n_j = (2 NC^2) / (4)$$

$$n_j = (2)(2.49)^2 / (4)$$

$$n_j = (1)(2.49)^2 / (2)$$

$$n_j = (6.20) / (2)$$

$$n_j = 3.1$$

que aproximado da un valor  $n_j = 4$ , que es el mínimo de repeticiones que deberían realizarse para cada tratamiento. Para el presente diseño experimental se decidió realizar 5 repeticiones por tratamiento (5 ratones por grupo) (79-81).

##### 7.4.15.2. Integración del diseño:

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con cinco tratamientos: un control negativo (solución acuosa de polisorbato 80 al 0.5 %), un control positivo o fármaco de referencia (alopurinol a dosis de 10 mg/Kg de peso), y 3 dosis (100, 10 y 1 mg/Kg de peso) de la fracción cromatográfica gruesa con mayor actividad significativa demostrada en el ensayo *in vitro*.

#### 7.4.16. Análisis estadístico:

##### 7.4.16.1. Ensayo *in vitro*:

Se utilizó como variable de respuesta el % de inhibición (% de parásitos muertos) y los resultados fueron analizados de la siguiente forma:

##### 7.4.16.1.1. Cálculo de la $CL_{50}$ y la $CI_{95}$ :

Utilizando el programa Finney para BASIC se realizó una regresión no paramétrica, estimándose por interpolación o extrapolación la  $CL_{50}$  y la  $CI_{95}$  como valores puntuales para la comprobación preliminar de la actividad de los extractos hexánico y etanólico, y para el tamizaje preliminar de la actividad de las 12 fracciones cromatográficas obtenidas. De esta manera se comprobó la actividad del extracto etanólico y se seleccionaron las 3 fracciones cromatográficas más potentes.

##### 7.4.16.1.2. Prueba de Friedman para la clasificación de dos vías:

Una vez seleccionadas las 3 fracciones con las menores  $CL_{50}$  y  $CI_{95}$  se realizó la prueba no paramétrica de clasificación por rangos de Friedman para las 3 fracciones seleccionadas y los controles positivo (violeta de genciana) y negativo (medio LIT + DMSO al 0.5 %). Al observarse diferencia significativa se realizaron comparaciones entre la suma de los rangos de los tratamientos contra la suma de rangos del control negativo. De esta manera se realizó el tamizaje definitivo de la fracción más activa en el ensayo *in vitro* (79, 80).

##### 7.4.16.2. Ensayo *in vivo*:

Con los datos obtenidos se elaboró una curva de parasitemia (Número de parásitos circulantes/ml) versus tiempo y se calculó mediante integración numérica (método trapecial) el área bajo la curva como variable de respuesta. Con las áreas obtenidas para cada tratamiento (fracción cromatográfica a tres dosis, y controles positivo y negativo), se realizó un Análisis de Varianza (ANDEVA) de una vía y al haber diferencia significativa entre los

tratamientos, se realizó la prueba de Dunnett para evaluar el efecto antitripanosoma de la fracción cromatográfica contra el control negativo (79, 80).

#### 7.4.16.3. Toxicidad:

##### 7.4.16.3.1. Nauplios de *Artemia salina*:

Utilizando como variable de respuesta el % de nauplios muertos y mediante el programa Finney para BASIC se realizó una regresión no paramétrica, estimándose por interpolación o extrapolación la  $CL_{50}$  como valores puntuales para la comprobación preliminar de la bioactividad y toxicidad de los extractos hexánico y etanólico, y para el tamizaje preliminar de la bioactividad y toxicidad de las 12 fracciones cromatográficas obtenidas.

##### 7.4.17.3.2. Toxicidad aguda en ratón:

En caso de observarse decesos de los animales de experimentación se debió calcular la  $DL_{50}$  de la misma forma en que se calculó la  $CL_{50}$  para los nauplios de *A. salina*. Como no se observaron decesos, se estimó que la  $DL_{50}$  es mayor que la máxima dosis ensayada.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Ensayo *in vitro*:

#### 8.1.1. Comprobación de la actividad antitripanosoma de extractos de *N. lobata* :

Como primer paso del estudio que se planteó en el presente trabajo de tesis se evaluó la actividad antitripanosoma *in vitro* de los extractos hexánico y etanólico de hojas de *N. lobata*, para garantizar que efectivamente se estaba trabajando con un material vegetal adecuado, es decir, con un material con suficiente cantidad del o los principios activos responsables de la actividad antitripanosoma. En la tabla No. 1 se presentan los resultados de la estimación de la  $CL_{50}$  y la  $Cl_{95}$  obtenidos a partir de los datos experimentales observados:

Tabla No. 1  
 $CL_{50}$  y  $Cl_{95}$  de los extractos Hexánico y Etanólico de hojas de *N. lobata*

EXTRACTO	<i>T. cruzi</i> Tripomastigotes		<i>T. cruzi</i> Epimastigotes	
	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$Cl_{95}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$Cl_{95}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
Hexánico	20	39.5	57.9	236.1
Etanólico	20	30.1	18.7	119.1

#### 8.1.2. Evaluación de la actividad antitripanosoma de fracciones cromatográficas gruesas de *N. lobata* :

Una vez verificada la actividad antitripanosoma *in vitro* de los extractos, se concluyó que aunque ambos poseían actividad antitripanosoma, el más potente de los dos extractos era el etanólico, por lo que este último fué fraccionado en una columna de Sephadex LH-20, colectandose fracciones de alrededor de 8 ml cada una y monitoreandolas mediante cromatografía en capa fina,. Del monitoreo señalado, se decidió la reunión de aquellas fracciones que mostraron mayor similitud química, obteniendose finalmente 12 fracciones cromatográficas gruesas.

Las fracciones cromatográficas gruesas fueron posteriormente ensayadas como antitripanosomas *in vitro*, obteniéndose los resultados que se observan en la tabla No. 2:

Tabla No. 2  
CL<sub>50</sub> y Cl<sub>95</sub> de las 12 Fracciones Cromatográficas Gruesas  
obtenidas a partir del extracto Etanólico de hojas de *N. lobata*

EXTRACTO	<i>T. cruzi</i> Tripomastigotes		<i>T. cruzi</i> Epimastigotes	
	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Cl <sub>95</sub> (µg/ml)	CL <sub>50</sub> (µg/ml)	Cl <sub>95</sub> (µg/ml)
<b>Fracción No. 1</b>	<b>90</b>	<b>308</b>	<b>277</b>	<b>1081</b>
<b>Fracción No. 2</b>	<b>8</b>	<b>36</b>	<b>51</b>	<b>104</b>
Fracción No. 3	138	553	495	4051
Fracción No. 4	148	422	318	1230
Fracción No. 5	112	256	361	2291
<b>Fracción No. 6</b>	<b>85</b>	<b>284</b>	<b>193</b>	<b>1080</b>
Fracción No. 7	198	804	236	926
Fracción No. 8	289	1008	322	1841
Fracción No. 9	295	1387	407	2859
Fracción No. 10	109	449	230	1035
<b>Fracción No. 11</b>	<b>158</b>	<b>357</b>	<b>85</b>	<b>333</b>
<b>Fracción No. 12</b>	<b>195</b>	<b>547</b>	<b>150</b>	<b>706</b>

Conforme a los resultados obtenidos, se procedió entonces a la selección de las tres fracciones que mostraron los menores valores de CL<sub>50</sub> y Cl<sub>95</sub> tanto para tripomastigotes (fracciones 1, 2 y 6) como para epimastigotes (fracciones 2, 11 y 12). Con los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* para cada una de las fracciones, se procedió entonces a realizar un análisis de clasificación por rangos de Friedman y comparaciones pareadas de las sumas de rangos para cada fracción y la suma de rangos del fármaco de referencia con respecto a la suma de rangos del control negativo, tanto para epimastigotes como para tripomastigotes. En las tablas Nos. 3-6 se muestran los resultados obtenidos:



Tabla No. 3  
**TRIPOMASTIGOTES**  
 Clasificación por Rangos de Friedman  
 Control (-), Control (+), Fracciones 1, 2 y 6

BLOQUES		TRATAMIENTOS				
		Control (-) DMSO en LIT	Control (+) Violeta de Genciana (250 µg/ml)	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 6
200	1	1.0	4.5	2.0	4.5	3.0
200	2	1.0	4.5	2.0	4.5	3.0
200	3	1.0	4.5	2.0	4.5	3.0
100	1	1.0	4.5	2.0	4.5	3.0
100	2	1.0	4.5	2.0	4.5	3.0
100	3	1.0	4.5	2.5	4.5	2.5
25	1	2.0	5.0	2.0	4.0	2.0
25	2	2.0	5.0	2.0	4.0	2.0
25	3	2.0	5.0	2.0	4.0	2.0
<b>SUMA DE RANGOS=</b>		<b>12.0</b>	<b>42.0</b>	<b>18.5</b>	<b>39.0</b>	<b>23.5</b>

$$\chi_r^2 = 30.16$$

Para el presente análisis se plantearon la hipótesis estadísticas de prueba siguientes:

**H<sub>0</sub>: Todos los tratamientos son iguales**

**H<sub>a</sub>: Al menos un tratamiento es diferente**

Para  $\alpha = 0.05$  se tiene que "p" para 30.16 es menor que 0.001, por lo que la  $H_0$  se rechaza. Estos resultados dan validez al diseño, ya que como se contó con un control negativo y uno positivo, era de esperarse que hubiese al menos diferencia significativa entre estos dos tratamientos.

Una vez realizado el análisis de Friedman para tripomastigotes, y establecida la validez del diseño, se procedió con la estimación de las diferencias entre la suma de los rangos de los diferentes tratamientos y la suma de rangos del control negativo, para establecer diferencias significativas entre los tratamientos antitripanosomas (fármaco de referencia y fracciones) y el tratamiento control negativo. Para cada comparación pareada se plantearon las hipótesis estadísticas de prueba siguientes:

$H_0$ : El tratamiento  $R_j$  es igual al  $R_{\text{control}(-)}$   
 $H_a$ : El tratamiento  $R_j$  no es igual al  $R_{\text{control}(-)}$

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 4

Tabla No. 4  
 TRIPOMASTIGOTES

Tabla de estimación de la diferencia de rangos entre tratamientos

COMPARACION	$R_j - R_{\text{control}(-)}$		Diferencia crítica	CONCLUSION
Control(-) vs. Control(+)	30.00	>	16.37	Ho se rechaza
Control(-) vs. Fracción 1	6.50	<	16.37	Ho se acepta
Control(-) vs. Fracción 2	27.00	>	16.37	Ho se rechaza
Control(-) vs. Fracción 6	11.50	<	16.37	Ho se acepta

Tabla No. 5  
**EPIMASTIGOTES**  
 Clasificación por Rangos de Friedman  
 Control (-), Control (+), Fracciones 2, 11 y 12

BLOQUES		TRATAMIENTOS				
		Control (-) DMSO en LIT	Control (+) Violeta de Genciana (250 µg/ml)	Fracción 2	Fracción 11	Fracción 12
Dilución (µg/ml)	No. de repetición					
200	1	1.0	4.0	4.0	4.0	2.0
200	2	1.0	4.5	4.5	3.0	2.0
200	3	1.0	4.5	4.5	3.0	2.0
100	1	1.0	5.0	4.0	3.0	2.0
100	2	1.0	4.5	4.5	3.0	2.0
100	3	1.0	5.0	4.0	3.0	2.0
25	1	1.0	5.0	4.0	3.0	2.0
25	2	1.0	5.0	3.0	4.0	2.0
25	3	1.5	5.0	4.0	1.5	3.0
<b>SUMA DE RANGOS=</b>		<b>9.5</b>	<b>42.5</b>	<b>36.5</b>	<b>27.5</b>	<b>19.0</b>

$$\chi_r^2 = 31.16$$

Para el presente análisis se plantearon la hipótesis estadísticas de prueba siguientes:

Ho: Todos los tratamientos son iguales

Ha: Al menos un tratamiento es diferente

Para  $\alpha = 0.05$  se tiene que "p" para 31.16 es menor que 0.001, por lo que la Ho se rechaza. Estos resultados dan validez al diseño, ya que como se contó con un

control negativo y uno positivo, era de esperarse que hubiese al menos diferencia significativa entre estos dos tratamientos.

Una vez realizado el análisis de Friedman para epimastigotes, y establecida la validez del diseño, se procedió con la estimación de las diferencias entre la suma de los rangos de los diferentes tratamientos y la suma de rangos del control negativo, para establecer diferencias significativas entre los tratamientos antitripanosomas (fármaco de referencia y fracciones) y el tratamiento control negativo. Para cada comparación pareada se plantearon las hipótesis estadísticas de prueba siguientes:

$H_0$ : El tratamiento  $R_j$  es igual al  $R_{control(-)}$

$H_a$ : El tratamiento  $R_j$  no es igual al  $R_{control(-)}$

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla No. 6

Tabla No. 6  
EPIMASTIGOTES

Tabla de estimación de la diferencia de rangos entre tratamientos

COMPARACION	$R_j - R_{control(-)}$		Diferencia crítica	CONCLUSION
Control(-) vs. Control(+)	33.00	>	16.37	$H_0$ se rechaza
Control(-) vs. Fracción 2	27.00	>	16.37	$H_0$ se rechaza
Control(-) vs. Fracción 11	18.00	>	16.37	$H_0$ se rechaza
Control(-) vs. Fracción 12	9.50	<	16.37	$H_0$ se acepta

PROPIEDAD DE LA INSTITUCIÓN DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Centro

## 8.2. Ensayo *in vivo*:

De los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro* se estableció que la fracción No. 2 fue la que mejor respuesta antitripanosoma mostró (ver discusión en el inciso 9.1. del presente informe de tesis). Con base en lo anterior, se decidió evaluar la actividad antitripanosoma *in vivo* de dicha fracción cromatográfica gruesa. Los resultados obtenidos de la evaluación *in vivo* se muestran en la tabla No. 7:

Tabla No. 7

Áreas bajo la curva del No. de Tripomastigotes circulantes/ml vrs. tiempo

Ratón No.	TRATAMIENTOS				
	CONTROLES		Fracción No. 2		
	Control(-) Polisorbato 80 al 0.5 %	Control(+) Alopurinol 10 mg/Kg	Dosis 100 mg/Kg	Dosis 10 mg/Kg	Dosis 1 mg/Kg
1	25252500	7008750	8435000	15452500	25252500
2	25243750	7008750	8417500	11243750	21035000
3	16826250	7000000	8417500	18261250	16852500
4	22470000	7008750	5617500	8452500	12661250
5	23843750	14008750	8417500	9843750	12643750
Promedio=	22727250	8407000	7851000	12650750	17689000
Desv.estándar	3125514.6	2800877.0	1121770.4	3655453.8	4895606.1
CV=	13.75	33.31	14.27	28.90	27.68
% de Parasitemia	100	37	35	56	78
% de Inhibición	0	63	65	44	22
% de potencia respecto al Alopurinol		100	104	70	35

Con las áreas bajo la curva como variable de respuesta se procedió seguidamente con la realización de un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía. Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla No. 8:

Tabla No. 8

Tabla de ANDEVA de una vía para los tratamientos evaluados  
(Control negativo, control positivo, fracción 2 a dosis de 100, 10 y 1 mg/Kg)

FUENTE DE VARIACION	gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	RV=Fcalculado	Fcrítico
Tratamientos	4	8.02x10 <sup>14</sup>	2.006x10 <sup>14</sup>	14.28	2.87
Error	20	2.81x10 <sup>14</sup>	1.405x10 <sup>13</sup>		
TOTAL	24	10.83x10 <sup>14</sup>			

Para este análisis se plantearon las siguientes hipótesis estadísticas de prueba:

Ho: Todos los tratamientos son iguales

Ha: Al menos uno de los tratamientos es diferente

Como la RV (Fcalculado) > Fcrítico la Ho se rechaza. Este análisis dió validez al diseño, por lo que se procedió con la realización de comparaciones de los tratamietos antitripanosomas (fármaco de referencia y fracción 2 a dosis de 1, 10 y 100 mg/kg de peso) con respecto al tratamiento control negativo, dicha comparación se realizó mediante la prueba de Dunnett, que se muestra en la tabla No. 9:

Tabla No. 9

### PRUEBA DE DUNNET

Comparación de los tratamientos contra el control negativo

COMPARACIONES	$X_i - X_c$	$ X_i - X_c $	Diferencia crítica	Nivel de Significancia
Control positivo contra control negativo	14320250	14320250	6162263.2	p < 0.05
Fracción 2 a dosis de 100 m/Kg contra el control (-)	14866250	14866250	6162263.2	p < 0.05
Fracción 2 a dosis de 10 m/Kg contra el control (-)	12890500	12890500	6162263.2	p < 0.05
Fracción 2 a dosis de 1 m/Kg contra el control (-)	5038250	5038250	6162263.2	NS

Como sólo para la dosis de 1mg/Kg de peso de la fracción 2, el valor  $X_i - X_c$  es menor que la diferencia crítica, se infiere que sólo este tratamiento no tiene

diferencia significativa con respecto al control negativo, por lo que se infiere que la fracción cromatográfica gruesa No. 2, obtenida a partir del extracto etanólico de de hojas de *Neurolaena lobata* a dosis de 100 y 10 mg/kg de peso tiene actividad antitripanosoma significativa.

### 8.3. Toxicidad:

Para garantizar que se trabajaba con sustancias inocuas a las dosis ensayadas y para establecer un perfil de bioactividad de las fracciones estudiadas, se realizaron los ensayos de bioactividad con nauplios de *Artemia salina* y de toxicidad aguda en ratón. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

#### 8.3.1. Nauplios de *Artemia salina*

Tabla No. 10  
CL<sub>50</sub> de fracciones cromatográficas gruesas

Fracclones	CL <sub>50</sub> (ppm)
Fracción No. 1	>1000
Fracción No. 2	656
Fracción No. 3	>1000
Fracción No. 4	>1000
Fracción No. 5	>1000
Fracción No. 6	>1000
Fracción No. 7	>1000
Fracción No. 8	>1000
Fracción No. 9	>1000
Fracción No. 10	>1000
Fracción No. 11	>1000
Fracción No. 12	>1000

### 8.3.2. Ensayo toxicológico en ratón:

No se observó ningún deceso en los animales de experimentación a dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/Kg de peso.

### 8.4 Tamizaje fitoquímico de las fracciones con actividad antitripanosoma:

Las fracciones que mostraron alta (fracción 2) y leve (fracciones 1, 6, 11 y 12) actividad antitripanosoma *in vitro* fueron caracterizadas fitoquímicamente mediante el uso de ensayos semimicro en tubos y mediante cromatografía en capa fina. Los resultados se muestran a continuación:

#### 8.4.1. Investigación de taninos y polifenoles:

Mediante ensayos semimicro con soluciones de gelatina, NaCl-gelatina y  $\text{FeCl}_3$  se estableció que las fracciones 6, 11 y 12 no contenían taninos, pero sí polifenoles no tánicos. Mediante cromatografía en capa fina, corrida con una fase móvil de Cloroformo:metanol:agua (80:18:2) y revelada con  $\text{FeCl}_3$  al 1 % en etanol, se estableció lo siguiente: Fracción 6, principal componente  $R_f = 0.48$ , positivo para polifenoles. Fracción 11, principal componente  $R_f = 0.72$ , positivo para polifenoles. Fracción 12, principal componente  $R_f = 0.82$ , positivo para polifenoles. La fracción 2 fue siempre negativa para polifenoles.

#### 8.4.2. Investigación de flavonoides:

Mediante el test semimicro de Shibata para la investigación flavonoides, se estableció la presencia preliminar de los mismos en las fracciones 11 y 12. Las fracciones 2 y 6 resultaron negativas para flavonoides.

#### 8.4.3. Investigación de sesquiterpenlactonas:

Mediante cromatografía en capa fina, utilizando como fase móvil cloroformo:metanol:agua (80:18:2), y revelando con una solución de anisaldehído



se demostró la presencia preliminar de sesquiterpenlactonas ( $R_f = 0.51, 0.48$ ) en la fracción 2. Las fracciones 6, 11 y 12 resultaron negativas para la presencia de sesquiterpenlactonas.

#### 8.4.4. Investigación de otros fitoconstituyentes:

Pruebas semimicro y en cromatografía en capa fina no demostraron la presencia de alcaloides, saponinas y antraquinonas.

## 9. DISCUSION

### 9.1. Ensayo *in vitro*:

#### 9.1.1. Extractos:

Conforme a lo que se planteó en la presente investigación, antes de fraccionar el extracto etanólico se debía comprobar su actividad. Dado que ya existía estudios previos donde se evaluaba la actividad de un extracto apolar (diclorometano) y uno medianamente polar (etanólico), la comprobación de la actividad antitripanosoma en el presente trabajo se basaría únicamente en la estimación de la  $CL_{50}$  y  $Cl_{95}$  de los dos extractos preparados (hexánico y etanólico). Los datos de la tabla No. 1 muestran la estimación de dichos parámetros, donde se infiere que el extracto etanólico es más activo que el extracto hexánico, tanto para tripomastigotes como para epimastigotes.

#### 9.1.2. Fracciones cromatográficas gruesas:

Conforme a lo observado en la tabla No. 2, los valores de  $CL_{50}$  y  $Cl_{95}$  demuestran que las fracciones 1, 2 y 6 son las más potentes contra tripomastigotes y las fracciones 2, 11 y 12 son mas potentes contra epimastigotes. El análisis por Rangos de Friedman y la comparación de las diferencias entre las sumas de Rangos, mostradas en las tablas Nos. 3-6, demuestran que sólo la fracción No. 2 tiene actividad antitripanosoma significativa tanto contra tripomastigotes como contra epimastigotes. De las restantes fracciones, sólo la No. 11 tiene actividad significativa contra epimastigotes, pero no contra tripomastigotes. Como consecuencia de lo anterior se decidió que para la fracción 2 debía realizarse la actividad antitripanosoma *in vivo*.

### 9.2. Ensayo *in vivo*:

Conforme a los resultados obtenidos en las tablas Nos. 7-9, se infiere que la fracción No. 2 tiene actividad antitripanosoma *in vivo* significativa a dosis de 100 y 10 mg/Kg de peso. A una dosis de 100 mg/Kg tiene una potencia relativa con respecto al alopurinol de un 4 % más, mientras que a dosis de 10 mg/Kg presenta

una potencia de un 30 % menos que el alopurinol, aunque estadísticamente significativa.

### 9.3. Toxicidad:

#### 9.3.1. *Artemia salina*:

Conforme a lo observado en la tabla No. 10 se infiere que sólo la fracción No. 2 tiene bioactividad significativa ( $CL_{50} < 1000$  ppm).

#### 9.3.2. Toxicidad en ratón:

Debido a que no se observaron decesos a ninguna de las dosis ensayadas, se infiere que la  $DL_{50}$  debe ser mayor que 200 mg/Kg de peso.

### 9.4. Tamizaje fitoquímico:

Los resultados obtenidos demuestran que la fracción 2 es rica en sesquiterpenlactonas, que correlacionándola con la actividad antitripanosoma, tanto *in vitro* como *in vivo* es probable que dichos componentes sean los responsables de la actividad contra *T. cruzi*, siendo coadyuvados posiblemente por los flavonoides, es decir, se da un sinergismo de suma.

## 10. CONCLUSIONES

10.1. La actividad antitripanosoma, tanto *in vivo* como *in vitro* de las hojas de *Neurolaena lobata* posiblemente es atribuible principalmente a las sesquiterpenlactonas presentes en la planta.

10.2. La principal fracción cromatográfica obtenida, rica en sesquiterpenlactonas no tiene toxicidad aguda a 200 mg/Kg de peso.

## 11. RECOMENDACIONES

11.1. Continuar el estudio antitripanosoma aislando las sesquiterpenlactonas presentes en la planta y evaluando su actividad tanto *in vitro* como *in vivo*.

11.2. Evaluar la posible utilización de los flavonoides y sesquiterpenlactonas como sustancias de control profiláctico contra epimastigotes en chinches.

## 12. REFERENCIAS

- 12.1. Carrada-Bravo T. Tripanosomiasis Americana. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 1983; 40:408.
- 12.2. Ochoa A, et al. Investigaciones epidemiológicas del vector de la enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatan, Santa Rosa, Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1993; 110-115.
- 12.3. Peñalver L, Fajardo J, Aguilar FJ. Aportes al conocimiento de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Guate: Rev. Med. 1956; 4: 26-35.
- 12.4. Aguilar J. Parasitología Médica. 2a. ed. Guatemala: 1991. (p. 250-261).
- 12.5. Corredor A et. al. Estudios serológicos sobre la incidencia de donantes chagásicos en Bancos de Sangre del Hospital San Juan de Dios. Rev. Fac. Med. 1965; 35(5): 83-86
- 12.6. Lozoya X, Lozoya M. Flora Medicinal de México; Primera parte: Plantas Indígenas. Méx IMSS 1982. 318 p.
- 12.7. Aguilar JI. Plantas Medicinales; Relación de unos aspectos de la flora útil de Guatemala. Guate. MAGA 1966. 375 p.
- 12.8. Orellana SL. Indian medicine in highland Guatemala. Albuquerque: University of New Mexico, 1987. 308 p.
- 12.9. Ronquillo FA, Melgar MF, Carrillo JE. Especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y medicina de las zonas semiáridas del nororiente de Guatemala. Cuaderno de Investigación, Dirección General de Investigación (DIGI). Guatemala: USAC, 1988. 192 p.
- 12.10. Cáceres A, Saper D. Estudios sobre medicina popular en Guatemala. Guatemala: Med. Trad. 1977. 68 p.

- 12.11. Centro Mesoamericano de Estudios sobre Tecnología Apropriada (CEMAT). Informe del primer taller sobre Botánica Medicinal Guatemalteca. Guatemala: CEMAT-IMEPLAM, 1980. 51 p.
- 12.12. Cáceres A, Girón LM, Juárez ME. Estudios colaborativos y transferencia tecnológica sobre plantas medicinales entre USAC y CEMAT. Guatemala: Perspectiva, 1983. 165 p.
- 12.13. Cáceres A, Girón LM. Sistema para la revalidación, investigación y comercialización de las plantas medicinales en Guatemala. Guatemala: CEFOLK 1984. 316 p.
- 12.14. Girón LM. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by Caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacol. 1991; 34: 173-187.
- 12.15. Cáceres A, et al. Diuretic activity of plants used for the treatment of urinary ailments in Guatemala. J. Ethnopharmacol. 1987; 19: 233-245.
- 12.16. Cáceres A, et al Screening of antimicrobial activity of plants populary used in Guatemala for the treatment of dermatomucos diseases. J. Ethnopharmacol. 1987; 20: 223-237.
- 12.17. Girón L, et al. Anticandidal activity of plants used for treatment of vaginitis in Guatemala and clinical trial of *Solanum nigrescens* preparations. J. Ethnopharmacol. 1988; 22: 307-313.
- 12.18. Cáceres A, Samayoa B. Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas utilizadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Cuaderno de Investigación No. 6. Dirección General de Investigación (DIGI). Guatemala: USAC, 1981. 138 p.
- 12.19. Cáceres A, et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases: Screening of 68 plants against gram positive bacteria. J. Ethnopharmacol. 1991; 31: 193-208.

12.20. Cáceres A. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. J. Ethnopharmacol. 1990; 30: 55-67.

12.21. Cáceres A, et al. Actividad antifúngica de plantas de uso medicinal en Guatemala. Cuaderno de Investigación No. 7, Dirección General de Investigación (DIGI). Guatemala: USAC 1992. 89 p.

12.22. Cáceres A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of Dermatophytic Infection. 1. Screening of antifimycotic activity of 44 Plant Extracts. J. Ethnopharmacol. 1991; 31: 263-276.

12.23. Cáceres A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal Infections. Screening of 38 plant extracts anticandidal activity. J. Ethnopharmacol. 1991; 31: 277-283.

12.24. Cáceres A, Maki J, López B. Actividad antiparasitaria de plantas de uso medicinal en Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1993; 140-143.

12.25. Yapur A, Monroy MC. Efecto de infusiones de *Jacaranda mimosifolia*, *Neurolaena lobata* y *Solanum hartwegii* sobre curvas de parasitemia de *Trypanosoma cruzi* en ratones. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1994; 81-86.

12.26. Medinilla B. *In vivo* Pharmacological and toxicological evaluation of some plants commonly uses in Guatemala against malaria: A Preliminary Report. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1994; 87-91.

12.27. Cáceres A, et al. Actividad antimicrobiana de 10 plantas activas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones por protozoos. Guatemala: USAC (Fac. de CC. QQ. y Farmacia), Doc. Tec. 1995. 8p.

12.28. Cáceres A, Maki J, López B. Actividad tripanocida *in vitro* de plantas de uso medicinal en Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1994; 92-93.

12.29. Saravia A. et al. Informe final del proyecto de actividad antiinflamatoria de plantas de uso medicinal en Guatemala, Fase II. Dirección Gereral de Investigación (DIGI). Guatemala: USAC, Doc. Tec. 1993. 23 p.



- 12.30. Apt W. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. Rev. Med. Chile. 1985; 115:162-166.
- 12.31. Baldy J, Takaoka L, Chieffi P, Mocelin A, y Brandina L. Doença de Chagas por transfusão de sangue em Londrina, parana. Relato de dois casos agudos tratados con nifurtimox. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1979; 4:155-1512.
- 12.32. Kanbara H. What can we do in Guatemala using recent knowledge? Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1994; 4-12.
- 12.33. Macedo V. Chagas' Disease (American Trypanosomiasis) in Wyngaarden J. B. & Smith Lit (EDS) Cecil Textbook of Medicine, Philadelphia: WB Saunders, 1982 (p 1728-1731).
- 12.34. Meza F. et al. Estudio Serológico de la Enfermedad de Chagas en el Laboratorio Microbiológico de Referencia (LAMIR). Guatemala: JICA, Memoria de II Conferencia del "Proyecto para la investigación de enfermedades tropicales", 1994; 7.
- 12.35. Malta V. Enfermedad de Chagas en Guatemala: prevalencia y transmisión. Guatemala: USAC (Fac. CC. QQ. y Farmacia) Rev. Científica, 1993; 9:1: 2-6.
- 12.36. WHO Expert Committee. Control of Chagas' disease World Health Organ Tech. Rep. Ser. 1991; 811:35-37.
- 12.37. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 27. 1973. 342-383.
- 12.38. Andrews N, et al. Stagespecific antigen expressed during theophogenesis of vertebrate form of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 1987; 64:474-9, 484
- 12.39. Zeledon R, Rabinoch J. Chagas Disease: an Ecological Appraisal With Special Emphasis an Insects Vectors. Ann. Rev Entomol 1981;26:101-337.

- 12.40. Brown H. Parasitología. 4a. ed. México: Interamericana, 1977. VII+320p.
- 12.41. Tabor E. Infectious Complication of Blood Transfusion. New York: Academic Press 1982; 174p (p. 132-137).
- 12.42. Howard JE, Rubio M. Congenital Chaga's Disease Clinical and Epidemiological Study of Thirthy Cases. Bol. Chile Parasit. 1982; 23: 107-112.
- 12.43. Organización Panamericana de la Salud. Aspectos Clínicos de la Enfermedad de Chagas. Bol. of Sanit. Panam. 1974; 77: 141-155.
- 12.44. Bloch M, et al. Tripanosomiasis Americana, Fase Aguda. Rev. Med. Trop. El Salvador 1982;
- 12.45. Velásquez E. Cambios Electrocardiográficos en habitantes de un area endémica para la enfermedad de Chagas en Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1993 82-812.
- 12.46. Velásquez E. Perfil , Cardiológico de pacientes con alteraciones electrocardiograficas y/o serología<sup>1</sup> positiva para *T. curzi* en Santa María Ixhuatan Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate, 1993 90-100.
- 12.47. Muiynck A, Lereque A. Factores causales de la miocardiopatía chagásica crónica en enfermedades parasitarias de mayor prevalencia y transmitidas por vectores en centroamérica. Honduras: seminario-Taller, 1992 VIII + 287p. (p77-95).
- 12.48. Berning H. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Castellana de Deutsche Mezinnische Wochenschrift. Medicina Alemana SR.L 1984; Vol XXV, (3): 274-278.
- 12.49. Cedillos R. et. al. El Xenodiagnóstico artificial en la enfermedad de Chagas en las Américas. Bol of Sanit Panam. 1987: 102(5):449-463

- 12.50. Guimarães M.C.S. Chagas Disease Specifications and Evaluation Methods for Immunological Reagents. PAHO PNSP/84-08, Washington D.C. USA. 1984.
- 12.51. Camargo M et. al. Normalización del diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en las Américas; Evaluación de tres años de colaboración. Bol. of Sani Panamá. 1987; 102(5): 449-463.
- 12.52. Matta V, et al. Evaluación y estandarización de los métodos serológicos para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate, 1993; 79-81.
- 12.53. Fuchs A et.al. Serological Diagnosis of Chagas Disease. Comparative Study of Various Technics. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1980; 22: 242-245.
- 12.54. Paz M. et al. Diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatan. Guatemala: JICA, Memoria de II Conferencia del "Proyecto para la investigación de enfermedades tropicales", 1994; 6.
- 12.55. Matta V. Avances en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1994; 40-45.
- 12.56. Juárez S, et al. Método de Inmunodifusión doble en el serodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Guatemala. JICA Enfer. Trop. Guate. , 1995; 22-26.
- 12.57. Albornoz A. Productos Naturales; Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas. Caracas: Universidad Central de Venezuela, 1980. 616 p.
- 12.58. Maki J, Cáceres A. Preliminary study on the effect of plant-origin drugs against parasites, especially *Trypanosoma cruzi* in Guatemala. Guatemala: USAC-JICA 28 p.
- 12.59. Duke A. Isthmian Ethnobotanical Dictionary. Fulton. Maryland 1972; 96p.

- 12.60. Aguilar J. Relación de unos aspectos de la Flora útil de Guatemala. 2ed. Tip. Nac. Guatemala. 1966; 383p.
- 12.61. Ciccio F. et.al. Preliminary Phytochemical Study of Plants of the family Compositae in Costa Rica. I. Sesquiterpene Lactones. Rev. Biol. Trop. 1978; 26(1): 159-165.
- 12.62. Manchand P. Blount F. Stereostructure of Neurolenins A and B Novel Germacronolide Sesquiterpenes From *Neurolaena lobata*. Org. Chem. 1978; 43(22): 4352-4354.
- 12.63. Bohlmann F. Natu A. Kerr K. Thymol Derivate Aus *Neurolaena lobata* Phytochemistry. 1979; 18:489-490.
- 12.64. Kerr M. et. al. 6-Hydroxy and 6-Methoxy Flavonoids from *Nerolaena lobata*. AND *N. macrocephala*. Phytochemistry. 1981; 20(4):791-794.
- 12.65. Borges J. et. al. Panamá Flora. II. New sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. J. Nat. Prod. 1982; 45(6): 762-765.
- 12.66. Medinilla B. Tamizaje fitoquímico y evaluación farmacológica *in vivo* de extractos alcohólicos de plantas comunmente utilizadas en Guatemala contra malaria por métodos de extracción. Guatemala: USAC (Fac. de CC. QQ. y Farmacia), Doc. Tec. 1995. 27 p.
- 12.67. Medinilla B. Fraccionamiento fitoquímico y evaluación farmacológica de algunas plantas comunmente usadas en Guatemala contra la malaria. Guatemala: USAC (Fac. de CC. QQ. y Farmacia), Informe mensual de actividades (DIGI), Febrero. 1995. 3 p.
- 12.68. Tally W, Saravia A. Contribución al estudio farmacológico de las hojas de *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. (Tres Puntas). Guatemala: USAC (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1994. 42 p.
- 12.69. Deutschmann F, et al. Pharmazeutische Biologie: 3-Drogenanalyse I: Morphologie und Anatomie. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1992. 450 p.

- 12.70. Stahl E, Schild W. Pharmazeutische Biologie: 4-Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1982. 462 p.
- 12.71. Stahl E, Schild W. Isolierung und Characterisierung Von Naturostoffen. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1986. 180 p.
- 12.72. Ciulei I. Practical manuals on the industrial utilization of medicinal plants. Methodology for analysis of vegetable drugs. Bucarest: Fac. of Pharmacy, 1982. 72 p.
- 12.73 Pecsok R, Shields LD. Métodos modernos de análisis químico. Pérezamador MC, trad. México: LIMUSA, 1973 (5a. reimpresión, 1990). 487 p.
- 12.74. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. Proyecto X. 1. Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región. 225 p.
- 12.75. González J, et al. In vitro activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Phytother Res* 1990; 4:1-4.
- 12.76. Hoquemiller R, et al. Isolement et synthese de l'espintanol, nouveau monoterpene antiparasitaire. *J Nat Prod* 1991; 54:445-452.
- 12.77. Fournet A, Angelo A, Muñoz V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1994; 41: 19-37.
- 12.78. Filardi LS, Brener Z. A rapid method for testing the susceptibility of different strains of *T. cruzi* to active chemotherapeutic agents. Rio de Janeiro: Mem. Ins. O. C. 1984; 79:221-226.
- 12.79. Montgomery DC. Diseño y Análisis de Experimentos. Delgado J, trad. México: Grupo Editorial Iberoamérica, 1991. 589 p.
- 12.80. Steel RG, Torrie JH. Bioestadística. Principios y procedimientos. 2a. ed. Martínez R, trad. México: McGraw-Hill, 1980. 622 p.

12.81. Matute J. ¿Cuántas repeticiones tengo que hacer en mi ensayo?. Revista Nutrición al Día, Boletín Semestral de la Escuela de Nutrición Fac. CC. QQ. y Farmacia de la USAC de Guatemala. 1990;IV-2:29-50.

13. ANEXOS

## INDICE DE ANEXOS

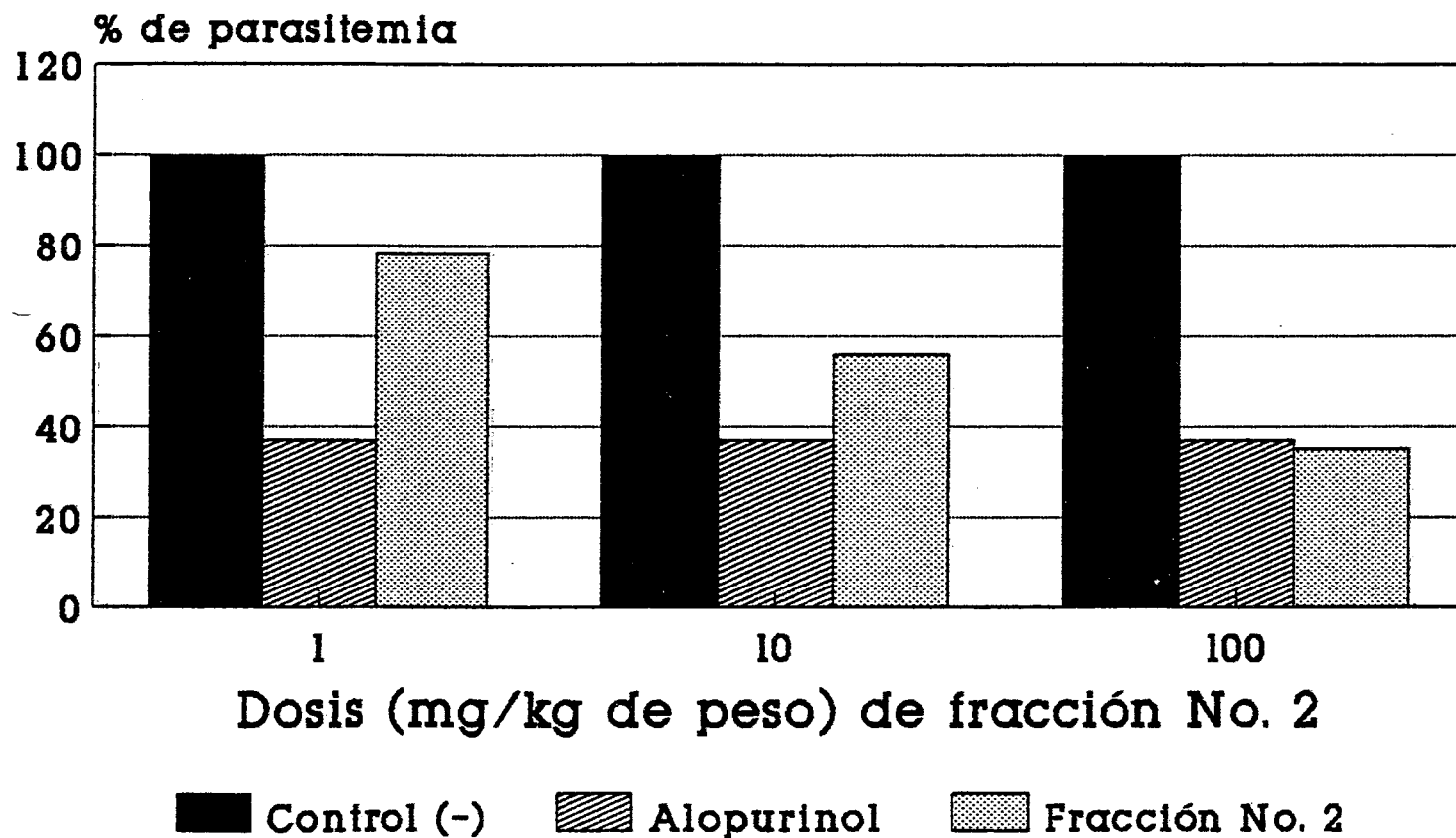
	pág.
13.1. Anexo No. 1: Ensayo <i>in vivo</i> . Graficas de porcentajes de parasitemia, inhibición y potencia de la fracción No. 2 obtenida a partir del extracto etanólico de <i>Neurolaena lobata</i>	52
13.2. Anexo No. 2: Dibujo de la especie <i>Neurolaena lobata</i>	56



**13.1. Anexo No. 1:**  
**Ensayo *in vivo*. Graficas de porcentajes de**  
**parasitemia, inhibición y potencia de la fracción No. 2 obtenida a partir del**  
**extracto etanólico de *Neurolaena lobata***

# Neurolaena lobata

## Actividad antitripanosoma in vivo

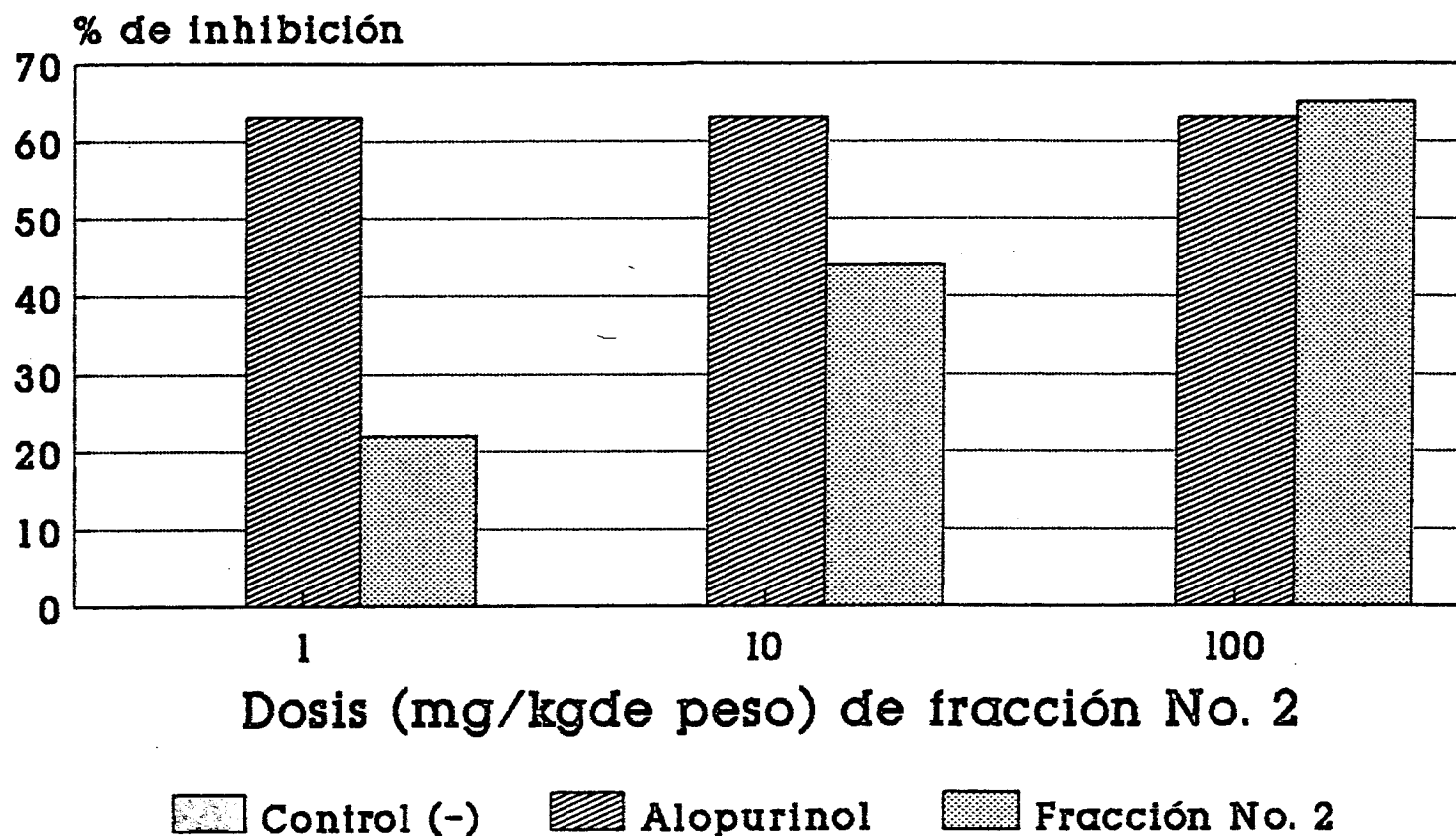


Gráfica A1-1

El control(-) y alopurinol se mantienen a dosis constantes

# Neurolaena lobata

## Actividad antitripanosoma in vivo

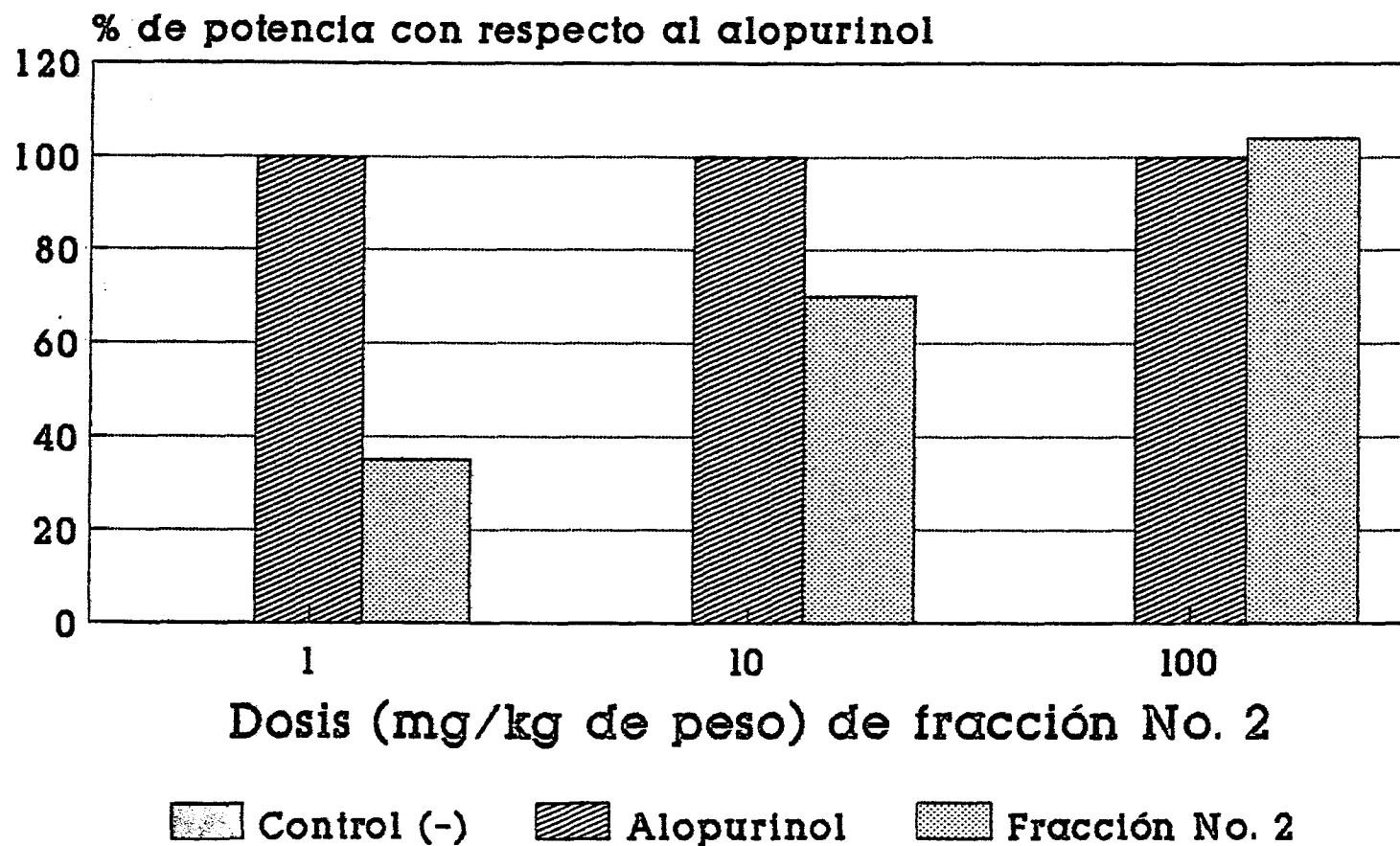


Gráfica A1-2

El control(-) y alopurinol se mantienen a dosis constantes

# Neurolaena lobata

## Actividad antitripanosoma in vivo



Gráfica A1-3

13.2. Anexo No. 2:  
Dibujo de la especie *Neurolaena lobata*

*Neurolaena lobata* (L.) R. Br. 1817

Tres puntas

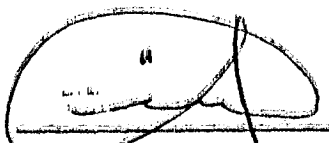




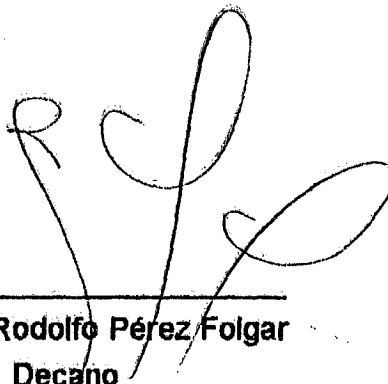
Ana Cecilia Barrientos Paz  
Autora



Lic. Armando Cáceres E.  
Asesor



Lic. Gerardo Arjoyo  
Director de Escuela



Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar  
Decano