

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

EFFECTO DE TRES EXTRACTOS DE TRES PLANTAS
DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE DE USO
MEDICINAL EN GUATEMALA CONTRA LA FORMA
EPIMASTIGOTA DE *Trypanosoma cruzi*



NANCY FABIOLA GARCIA MATA

Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

Guatemala, octubre de 1996

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL

06

T(1751)

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

DECANO	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
SECRETARIO	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
VOCAL I	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
VOCAL II	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
VOCAL III	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
VOCAL IV	BR. ANA MARIA RODAS CARDONA
VOCAL V	BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

DEDICO ESTA TESIS

- A: Dios por su verdadero e infinito amor hacia mi, fuente inagotable de luz y vida; de quien proviene toda sabiduría.
- A: Mi patria, Guatemala.
- A: La Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
- A: La Comunidad Católica Juvenil "Hosanna" en especial a: Nancy Mazariegos, Lesbia Rivera y Mirna Mayén.
- A: Mis padres: José Antonio García, Ana María Mata Ovalle de García por darme todo en la vida y quienes con su amor y esfuerzo han sido el ejemplo y la motivación para alcanzar este triunfo.
- A: Mis hermanas: Evelyn del Rosario, Mildred Jeannette y Mónica Esmeralda por su amor y ejemplo de superación.
- A: Mis sobrinos: Juan Antonio, Carlo Paolo, María Soffa, Linda Isabel, Juan Carlos y Diego André quienes con su ternura e inocencia han llenado mi vida de alegría.
- A: Mi abuelita Dominga Ovalle de Mata por sus consejos, cuidados y amor incondicional.
- A: Mis cuñados: Juan Antonio Paz, Juan Carlos Lorenti y Carlos René Gutiérrez con cariño.
- A: John, Suellyn, Rachelle, Michelle & Tisha Stone quienes han llenado mi vida de amor, apoyo y motivación.
- A: Mis compañeros y amigos: Clodette Rousselin, Sonia González, Ligia Reyes, María Paula De León, Karla Elgueta, Claudia Galindo, Mónica Ovalle, Juan Miguel Fuxet y Juan José Del Carmen por su apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

- A: Lic. Armando Cáceres, por su asesoría y consejo brindados durante la elaboración de esta tesis.
- A: Lic. Federico Nave por su valiosa orientación y asesoría.
- A: Licda. Sonia González por su colaboración y ayuda.
- A: María Leonor Ordoñez y Enrique Morales por su apoyo.
- A: La familia Rivas Pereira por su amistad y ayuda brindada.
- A: El Departamento de Citohistología.
- A: El Laboratorio y Droguería de Productos Fitofarmacéuticos (FARMAYA S.A).
- A: La Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA) en especial al Dr. Tetsuo Yanagi por su valiosa ayuda y asesoría en el desarrollo experimental de esta investigación.

INDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	3
III.	ANTECEDENTES	5
	A. Biología del Parásito	5
	B. Detección de la Actividad Tripanocida <i>in vitro</i>	13
	C. Actividad Vegetal Tripanocida	19
	D. Plantas a Utilizar	23
IV.	JUSTIFICACIONES	45
V.	OBJETIVOS	47
VI.	HIPOTESIS	48
VII.	MATERIALES Y METODOS	49
VIII.	RESULTADOS	61
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	64
X.	CONCLUSIONES	70
XI.	RECOMENDACIONES	71
XII.	REFERENCIAS	72
XIII.	ANEXOS	86

I. RESUMEN

Esta investigación evaluó cuantitativamente la actividad tripanocida de tres extractos de tres plantas de uso medicinal en Guatemala de la familia *Euphorbiaceae* contra la forma epimastigota de *T. cruzi* como una alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Las plantas fueron colectadas, lavadas y secadas a la sombra; se prepararon los extractos con tres disolventes (diclorometano, etanol y agua); y fueron concentrados en rotavapor o liofilizados.

Para evaluar la actividad tripanocida, se estandarizó una metodología rápida de tamizaje *in vitro* a tiempo fijo y empleando una sola dosis (1,000 µg/ml), usando cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa caracterizada Tuluahén a una concentración de 5×10^5 p/ml en fase exponencial, en microplacas de poliestireno y lectura microscópica visual. La diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) encontrada entre el control positivo y el control negativo mediante las comparaciones múltiples no paramétricas validaron su estandarización.

Cada ensayo consistió en cinco grupos por planta: extractos diclorometánico, etanólico y acuoso, control positivo (violeta de genciana) y medio sin extracto como control negativo. Se hicieron 6 repeticiones de todo el ensayo. El efecto de las plantas se midió a las 48 h mediante el recuento de parásitos vivos en cámara de Neubauer comparando cada extracto con el control negativo de su ensayo correspondiente.

De las tres plantas estudiadas a dosis de 1,000 µg/ml únicamente el extracto etanólico de *Acalypha guatemalensis* demostró actividad tripanostática *in vitro* ($p < 0.05$); *Croton guatemalensis* y *Jatropha curcas* no mostraron actividad tripanostática ni tripanocida *in vitro* en ninguno de sus extractos.

En el caso del extracto etanólico de *A. guatemalensis* para establecer si su efecto podía atribuirse a que estaba siendo observado a una concentración muy baja para ser tripanocida, se realizó otro ensayo en el cual se evaluó el efecto de dicho extracto a dosis de 4,000, 2,000 y 1,000 µg/ml utilizando la misma metodología; demostrándose de nuevo un efecto tripanostático a dosis de 1,000 µg/ml y obteniéndose únicamente un efecto tripanostático a dosis de 4,000 y 2,000 µg/ml ($p < 0.05$). El mayor efecto tripanostático se observó a la dosis de 4,000 µg/ml aunque no se obtuvo un efecto dosis respuesta marcado.

El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, al existir diferencia significativa entre los tratamientos y el control negativo, se hicieron comparaciones múltiples no paramétricas de los tratamientos contra el control negativo.

II. INTRODUCCION

Entre las parasitosis endémicas que afectan a la población guatemalteca se encuentra la enfermedad de Chagas, la cual es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana afecta principalmente a las personas de clase socioeconómica baja del área rural con viviendas de condiciones deficientes. Se estima que al menos 100 millones de personas que habitan en los países endémicos se consideran a riesgo de la infección y que de 16-18 millones están infectadas en las áreas tropicales y subtropicales del continente americano (1,2). Esta enfermedad se caracteriza por aparecer gradualmente afectando varios órganos como corazón, intestino y esófago, pudiendo variar de perfil y gravedad (3).

En la actualidad no hay un tratamiento ideal para curar la enfermedad, ya que la quimioterapia utilizada sigue siendo inadecuada por su alta toxicidad, sus efectos secundarios y por la dificultad de obtención (4,5). Dicha situación plantea la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento, dentro de las cuales se encuentra el uso de la medicina natural, principalmente la vegetal. Esta parece tener buenas posibilidades de éxito, ya que el uso de extractos vegetales con propiedades antiparasitarias dentro de la población guatemalteca se refiere desde el tiempo de los mayas hasta nuestros días, trayendo consigo ventajas como: menor toxicidad, bajo costo, fácil acceso y aceptación entre la población afectada.

Es necesario investigar las propiedades tripanocidas de plantas utilizadas popularmente para otras parasitosis, ya que por la naturaleza de la enfermedad existe desconocimiento de esta patología desde el punto de vista popular y no se ha reportado dentro de la medicina popular tradicional ninguna planta específica contra ella (6).

En el presente trabajo de investigación se estandarizó una metodología rápida de tamizaje *in vitro* a tiempo fijo y empleando una sola dosis de diferentes extractos, utilizando cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa caracterizada Tuluahuén en microplacas de poliestireno y lectura microscópica visual que permite evaluar cuantitativamente el efecto tripanocida.

Se utilizaron tres extractos de tres plantas nativas de uso medicinal en Guatemala, pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, las cuales se utilizan comúnmente en el tratamiento de otras parasitosis, siendo éstas: *Acalypha guatemalensis* (Hierba del cáncer), *Croton guatemalensis* (Copalchi) y *Jatropha curcas* (Piñón); y se determinó si por lo menos una de las plantas posee efecto tripanocida *in vitro*. Además se estableció el disolvente orgánico que mejor extrae la actividad antiprotozoárica.

III. ANTECEDENTES

A Biología del Parásito:

La enfermedad de Chagas es una zoonosis exclusiva del Nuevo Mundo, siendo su agente causal el *T. cruzi*, protozoo flagelado, el cual cumple un ciclo biológico vital complejo, involucrando el desarrollo de diferentes estadios en dos tipos de hospederos: uno invertebrado que funge como vector (redúvidos de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Eratyrus*) y el segundo vertebrado (hombres o animales) que constituye el reservorio de la enfermedad (7,8).

1. Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozoo hemoflagelado descrito por primera vez por Carlos Chagas en 1909. Según las diferentes fases de su ciclo vital presenta distintas formas.

a. Ciclo de vida en el hospedero invertebrado

Los redúvidos transmisores se infectan al picar al hombre o animales reservorios infectados ingiriendo la forma tripomastigota hemoflagelar de *T. cruzi*, la cual sufre transformación irreversible a todo lo largo del tracto digestivo del vector y a nivel del intestino medio se convierte en **epimastigote**, forma de aproximadamente 20 μm de largo y 2 μm de ancho; que posee una membrana ondulante corta y kinetoplasto. Dentro de la región que comprende el intestino medio y el recto (intestino posterior), los epimastigotes se multiplican y se transforman en **tripomastigotes metacíclicos infectivos**

cuya forma es muy similar a los tripomastigotes sanguíneos pero más cortos, finos, activos y no se reproducen. Estos se localizan a nivel del recto, que es su sitio de acumulación y las formas infectantes son liberadas en las heces fecales del insecto (8-11).

b. Ciclo de vida en el hospedero vertebrado

El vector hematófago pica al hospedero vertebrado para alimentarse, generalmente lo hace por la noche atacando las partes descubiertas de las personas, especialmente el rostro o las extremidades; al terminar gira 180 grados y frecuentemente defeca en ese momento. Es así como los tripomastigotes metacíclicos infectivos penetran al cuerpo de la víctima a través de la herida producida por la picadura de la chinche o de las membranas mucosas de la boca, nariz u ojos; también pueden penetrar el cuerpo a través de cortadas y abrasiones de la piel (8-11).

En el sitio de entrada se da una reacción inflamatoria local en donde los macrófagos y/o tejido local resultan parasitados. Las células parasitadas se rompen 4 ó 5 días después, liberando tripomastigotes que logran acceso a la circulación y se diseminan a través del cuerpo. La mayoría de las células pueden ser parasitadas, pero parece haber tropismo hacia el músculo estriado, liso y elementos neuroectodérmicos. En las células parasitadas, los tripomastigotes se transforman en **amastigotes**, cuya forma es ovalada sin flagelo con kinetoplasto en forma de barra. Poseen aproximadamente 2 μm de diámetro y en esta forma intracelular el parásito se reproduce por fisión binaria en el hospedero vertebrado formando pseudoquistes. A los 4 ó 5 días los amastigotes de las células densamente parasitadas elongan sus cuerpos y se

transforman en **tripomastigotes sanguíneos**, que son liberados del pseudoquiste y recirculan en el torrente sanguíneo (8,9).

Tienen la forma clásica de los tripanosomas con una membrana ondulante y flagelo libre, presentan un kinetoplasto redondo y grande, terminal o subterminal (8). Son de aproximadamente 20 μm de longitud por 2 μm de ancho y en frotis sanguíneos tienen la forma característica de hoz. Existen como formas libres que nadan extracelularmente, las cuales no se multiplican y pueden parasitar otras células o ser ingeridos por el vector para continuar así el ciclo de vida (8,9).

La fase aguda se observa cuando el tripomastigote metacíclico penetra las membranas mucosas y alcanza el torrente sanguíneo, mientras que la fase crónica de la enfermedad está condicionada por los daños tisulares causados por los amastigotes, ya que éstos se reproducen periódicamente destruyendo el tejido invadido (8,9).

Se mencionan la transmisión madre-hijo, las transfusiones sanguíneas, el trasplante de órganos contaminados y los accidentes de laboratorio como otras vías de transmisión de la enfermedad (12).

2. Epidemiología:

La enfermedad de Chagas constituye un gran problema de salud pública en Centro y Sudamérica y es causa de extrema importancia en cuanto a morbilidad y mortalidad en la población rural. Se estima que al menos 100 millones de personas que habitan en los países endémicos se consideran a riesgo de la

infección y que de 16-18 millones están infectadas en las áreas tropicales y subtropicales del continente americano (1,2). El informe de registro epidemiológico de la OMS (1990) estimó la prevalencia de infección humana por *T. cruzi* en las Américas en un 18% de un total de 86,897,000 personas en áreas de riesgo, presentando un desglose aproximado por país con el que se demuestra al Brasil, Argentina, Chile y Venezuela con cifras que superan al millón de personas afectadas en cada caso (13).

En 1991 la WHO estimó que aproximadamente 10 millones de personas se encuentran infectadas con *T. cruzi* en Centro y Sur América, siendo la miocardiopatía crónica una consecuencia de la infección y causa importante de morbimortalidad en áreas endémicas (14).

En Guatemala la Enfermedad de Chagas fue notificada por primera vez en 1932 por el Dr. Eduard Reichnetow y muchos son los estudios que se han llevado a cabo sobre esta enfermedad (15,16). En 1990, la Oficina Sanitaria Panamericana (OPS), estimó que para Guatemala la incidencia de la infección por *T. cruzi* estaría llegando a los 30,000 casos nuevos por año y una prevalencia de 750,000. Esto contrasta con los reportes oficiales de la Dirección General de Servicios de Salud de los años 1980-1989; en los cuales únicamente se notificaron 312 casos (17); y a pesar de que desde el año 1989 en nuestro país la tripanosomiasis americana figura entre las enfermedades de notificación obligatoria, en 1991 fueron reportados únicamente 27 casos con una tasa del 0.28 por 100,000 habitantes al Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (12,18). Esto probablemente se deba a que es subreportada, ya sea porque en algunas regiones el diagnóstico de la enfermedad no es disponible, que no esté incluido entre las pruebas de rutina para Banco de Sangre o bien que dentro de

los exámenes forenses no se investiguen las causas de cardiomegalia. Estudios recientes muestran que las principales zonas endémicas de la enfermedad de Chagas son los departamentos de Santa Rosa, Jutiapa, Jalapa, Chiquimula, El Progreso, Zacapa, Baja Verapaz, San Marcos, Huehuetenango, Escuintla, Suchitepéquez y Guatemala (10).

Su principal vector pertenece a la familia Reduviidae orden Hemiptera, sub familia Triatominae, cuya frecuencia e importancia en nuestro país involucra a: *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma nitida*. Todos los estadios (exceptuando el huevo) y ambos sexos de triatomíneas succionan sangre y por lo tanto pueden infectarse con *T. cruzi* si se alimentan de un hospedero infectado, convirtiéndose en vectores portadores de la enfermedad (10).

Uno de los factores más importantes para su transmisión es el tipo de vivienda. En el área rural de nuestro país ésta suele ser fabricada con paja, palma, adobe o bajareque, careciendo de revestimiento o repello en sus paredes, constituyendo el hábitat óptimo para el vector; estableciéndose de esta manera un ciclo intradomiciliario de transmisión.(11,19).

El hombre es uno de los hospederos de *T. cruzi* (principal reservorio) y junto con él los otros mamíferos que habitan en su domicilio o peridomiciliarmente (perros, gatos, cerdos, roedores), siendo estos los reservorios del llamado ciclo doméstico. En el ciclo silvestre participan como reservorios diversos mamíferos tales como armadillos, mapaches, roedores, monos, murciélagos, etc. El insecto busca a sus víctimas en la obscuridad, prefiriendo la cara y las zonas de transición entre la epidermis y las mucosas. Como la picadura es casi indolora pasa generalmente inadvertida por el

individuo. Después de la succión de sangre, el vector suele expeler una gota de materia fecal que contiene tripanosomas metacíclicos que penetran al organismo a través de las mucosas, escoriaciones dérmicas o por el canal de punción (11).

3. Formas clínicas:

La sintomatología de la enfermedad de Chagas varía según los diferentes países así como el grado de severidad de la infección y se le conocen tres etapas bien definidas:

a. Etapa aguda:

Puede presentarse fiebre, hepatoesplenomegalia, edema generalizado, dolor muscular, vómitos, diarrea, inflamación del tejido linfoide y miocarditis. Es diagnosticada únicamente en el uno al dos por ciento de los pacientes. La enfermedad aguda puede presentarse a cualquier edad, pero en áreas altamente endémicas los mayormente afectados son los niños menores de 10 años. Cuando ocurre en niños menores de 2 años puede ser fatal. En Guatemala no se cuenta con datos de esta etapa (12).

b. Etapa intermedia o silenciosa:

Esta fase inicia a las 8 ó 10 semanas después de la fase aguda, con o sin manifestaciones clínicas. Este estado puede persistir por varios años o permanecer indefinidamente. Está caracterizado por la ausencia de sintomatología clínica, electrocardiograma y rayos-x de tórax normales. Sin embargo, las pruebas serológicas se mantienen positivas. Esta fase constituye un

importante reservorio de la infección y contribuye a mantener el ciclo de vida del parásito. Por ser una etapa asintomática, el clínico rara vez la detecta. En Guatemala existen pocos estudios sobre esta etapa (12).

c. Etapa crónica:

Se ha estimado que más del 30 por ciento de las personas de la fase indeterminada progresa, 5 a 30 años después, hacia la fase crónica, con desarrollo de patología cardíaca, digestiva o neurológica, en tanto que el resto nunca desarrollará alguna manifestación orgánica. Es la etapa mejor conocida en nuestro país y la que ha originado la mayoría de los estudios conocidos (12).

i) Forma cardíaca:

Esta es la forma que más se ha estudiado y la mejor reconocible en el diagnóstico. Es la más frecuente en nuestro país (11,12).

ii) Forma digestiva:

Cualquier porción del tracto digestivo puede ser afectado en la enfermedad chagásica crónica, pero los segmentos más afectados, por causas aún no bien entendidas, son el esófago y el colon. Hay lesiones significativas en los plexos nerviosos intramurales que se asocian con alteraciones en el peristaltismo. La más importante complicación del megacolon es el fecaloma y el vólvulus agudo. Esta forma no ha sido descrita en Guatemala (12).

iii) Forma neurológica:

La enfermedad chagásica crónica puede involucrar el sistema nervioso central, periférico o autónomo. Estos cambios neurológicos son poco conocidos. En ciertas áreas endémicas pueden observarse parestesias, alteraciones cerebelosas, convulsiones y anormalidades psíquicas como consecuencia de lesiones del sistema nervioso central o como secuelas de un ataque meningoencefalítico. En Guatemala no hay ningún estudio que relacione manifestaciones neurológicas y enfermedad de Chagas (12).

4. Tratamiento:

El tratamiento está recomendado en pacientes en etapa aguda de la enfermedad, pero es marginalmente efectivo y las drogas de las que se dispone actualmente (nifurtimox y beznidazole) son altamente tóxicas y poco accesibles. Ambas drogas producen neuropatías, exantema, disturbios psíquicos y gastrointestinales. Muchos pacientes desarrollan anorexia y pérdida de peso con el nifurtimox, y pocas personas son capaces de completar el largo tratamiento quimioterapéutico recomendado para estas drogas. En consecuencia, los esfuerzos recientes se han concentrado casi por entero en el desarrollo de una quimioterapia más efectiva y menos tóxica (4).

Estudios clínicos sugieren que el alopurinol es tan efectivo, menos tóxico y de bajo costo como el nifurtimox o el beznidazole. Si se obtienen resultados favorables, el alopurinol puede emerger como el tratamiento de elección de la fase crónica de la enfermedad de Chagas (4).

Según las investigaciones de McCabe *et al* se sugiere que el ketoconazole puede ser un potente agente contra el *T. cruzi* y debe ser evaluado más extensamente como un agente quimioterapéutico de la enfermedad de Chagas (5). Entre otras moléculas o medicamentos potenciales que están en curso de estudio está el itraconazole, la formicina B, los derivados de la pirazolopirimidina, la swaisonina y la hachimicina (20).

B. Detección de la actividad tripanocida *in vitro*

En el afán por encontrar una alternativa quimioterapéutica eficaz, de baja toxicidad y que reúna las condiciones necesarias de accesibilidad, disponibilidad, etc., se han llevado a cabo estudios *in vitro* con las diferentes fases de *T. cruzi* enfrentándolas a extractos vegetales crudos, moléculas elucidadas, antioxidantes y también a sustancias a las que se les conocen propiedades antiprotozoáricas, como las estudiadas para malaria y leishmaniasis.

Dentro de los ensayos que se han llevado a cabo para la detección de la actividad tripanocida *in vitro* se mencionan los siguientes:

1. Contra la forma amastigota:

En 1983 McCabe *et al* observaron que la adición de ketoconazole a cultivos de macrófagos infectados con *T. cruzi* cepa Y, inhibía marcadamente la multiplicación intracelular de amastigotes (5).

Así mismo se han llevado a cabo estudios *in vitro* que evalúan el efecto antagonista de la rifampicina sobre los amastigotes de *T. cruzi* sugiriendo que dicho antibiótico se une a la glucoproteína del tripanosoma (21).

2. Contra la forma epimastigota:

En 1987, Cavin *et al.* probaron *in vitro* la actividad tripanocida de alcaloides derivados de plantas vegetales contra la forma epimastigota de la cepa costarricense de *T. cruzi* mediante la medición del crecimiento poblacional de los epimastigotes, observándose que 10 de los alcaloides probados redujeron significativamente el crecimiento de la población del parásito a una concentración de 50 µg/ml (22).

Se ha estudiado también el efecto de algunas hidroquinonas en epimastigotes intactos de *T. cruzi*, siguiéndose su crecimiento por nefelometría, observándose que las hidroquinonas evaluadas inhiben el crecimiento del cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones tan bajas como las de 1 mM (23).

Rodriguez R *et al.* evaluaron 19 derivados de naftoquinonas (incluyendo controles) contra los epimastigotes de *T. cruzi* cepa Y en medio Lit a 28°C. Cuatro de 17 fueron altamente activas a diferentes concentraciones, observándose que éstos compuestos inhiben el crecimiento del parásito de igual manera o con mayor efectividad que el Nifurtimox y el Benznidazole (24)

Se reportan también alcaloides naturales activos *in vitro* contra los epimastigotes de *T. cruzi* como: quinina (proviniente de los árboles de

Cinchona), harmina, vinblastina (alcaloide indólico antineoplásico proveniente de *Catharanthus roseus*), ellipticina (constituyente de *Ochrosia elliptica*), olivacina (constituyente de *Aspidosperma nigricans*), terpenos como el taxol (proveniente de *Taxus brevifolia*) y la tingenona (triterpeno), el cual es un pigmento rojo-naranja presente en varias especies de Celastraceae e Hypocrataceae, quinonas como la β -lapachona y allyl- β -lapachona y compuestos polifenólicos como el gossypol (proveniente del aceite de la semilla del algodón) (25).

Otros estudios evalúan la inhibición del crecimiento exponencial de los epimastigotes de *T. cruzi in vitro* para tamizar drogas que puedan ser utilizadas en los Bancos de Sangre en áreas endémicas (26).

De igual manera se han evaluado antioxidantes, la mayoría de ellos aditivos alimenticios, observándose inhibición en la respiración y en el crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* en medio de cultivo (27).

Algunos autores han encontrado actividad tripanocida de extractos crudos y purificados contra la forma epimastigota de *T. cruzi in vitro* como: alcaloides bisbencilisoquinoleínicos: la daphnandrina, la girocarpina y la obaberina (20); el monoterpeno espintanol (28) y el monoterpeno piquerol A (29).

El aislamiento de la sesquiterpen lactona dehydrozaluzanin C a partir del fraccionamiento cromatográfico del extracto eterpetróleo de las hojas de *Munnozia maronii* mostró una significativa actividad inhibitoria *in vitro* sobre los epimastigotes de 15 cepas de *T. cruzi* a concentraciones que van desde los

50 a los 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dicha actividad fue más potente que la observada con las drogas de elección (benznidazole y nifurtimox) (30).

En 1994 Zani CL *et al.* aislaron del extracto hexánico de *Pluchea quitoc* L., cuatro compuestos activos contra la forma epimastigota de *T. cruzi*, observándose una actividad inhibitoria del crecimiento del 61 al 98% en el medio de cultivo a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (31).

Schmeda-Hirschmann *et al.* determinaron la actividad *in vitro* a diferentes concentraciones del principal diterpeno de *Jatropha grossidentata* (jatrogrossidion) y el jatrofano de *Jatropha isabelli* contra los epimastigotes de cuatro cepas de *T. cruzi* (Tulahuén, C8CL1, 1979CL1 y YC12). El jatrogrossidion mostró una fuerte actividad tripanocida, obteniéndose un IC_{100} a concentraciones que van de los 1.5 a los 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (32).

3. Contra la forma tripomastigota:

Un estudio realizado *in vitro* a 4°C, demostró que 8 compuestos puros tienen una alta actividad contra la forma sanguínea de *T. cruzi*, a una concentración de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entre ellos: daphnandrina, limacina, pheantina, daphnolina y cocsulina (33).

Marr JJ *et al.* obtuvieron un 50% de efectividad antitripanocida de la forma hemoflagelar de *T. cruzi* entre las dosis de 1 a 10 μM comparado con el alopurinol al probar *in vitro* la actividad antiprotozoárica de seis análogos inosínicos a los cuales se les modificó sistemáticamente el anillo heterocíclico con

el objeto de determinar que características de la molécula son importantes para la actividad atitripanosoma (34).

Varios estudios se han llevado a cabo con drogas anfifílicas *in vitro* contra la forma tripomastigota de *T. cruzi* a 4°C, ya que se ha visto que éstas pueden ser activas a concentraciones iguales o menores que 1 mM y parecen no tener efecto significativo sobre las células rojas, pudiendo ser utilizadas para prevenir la transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea en áreas donde la enfermedad es endémica. Entre las que han sido probadas se mencionan: litraceno, maprotileno, thioproperazinas y las acridinas: acranil, aminacrina y mepacrina (35).

Hammond *et al.* demostraron que muchas drogas que poseen licencia para ser usadas en el humano son activas a concentraciones menores que 1 mM contra la forma sanguínea de *T. cruzi*, entre las cuales se listan 62 que son estructuralmente relacionadas con drogas anfifílicas catiónicas, 3 polienos y 2 antibióticos antracíclicos (36).

En un estudio el antioxidante BHT (2,6-diterbutyl-1-cresol), aditivo alimenticio, esterilizó *in vitro* a una concentración de $5 \times 10^{-3} M$ sangre humana infectada con 2,000 tripomastigotes/ml a 4°C por 24h (27).

Otros estudios evalúan la actividad de varias naftoquinonas derivadas del lapachol, sobre los tripomastigotes de *T. cruzi* a 4°C por 48 h como una alternativa para prevenir la transmisión de la enfermedad de Chagas por medio de la transfusión sanguínea (37).

Un estudio enfatiza en la lisis de la cepa Tulahuén *in vitro* a 4°C por 17 drogas anfifílicas catiónicas a una concentración de $10^{-3}M$, evaluadas microscópicamente mediante la técnica de Cover y Gutteridge (1982) y que fue sensible a las acridinas: acranil, aminacrina y mepacrina (38).

El cristal violeta, al igual que la violeta de genciana y el alopurinol, es considerado como una de las drogas efectivas contra la forma tripomastigota de *T. cruzi in vitro* a 4°C (39).

Katzin *et al.* probaron que la rifampicina antagoniza el crecimiento e inhiben la penetración de los tripomastigotes de *T. cruzi* en cultivo de tejidos (21,40).

Chiari *et al* han realizado varios estudios utilizando productos naturales de diversos tipos estructurales contra las formas sanguíneas infectivas de *T. cruzi in vitro*. De esta manera han aislado varios flavonoides altamente activos como la (3R)-Claussequinona, (R)-4-methoxydalbergiona, (S)-4,4'-dimethoxydalbergiona (41).

Así mismo Chiari *et al* aislaron el 15-deoxigoyazensolido y una sesquiterpenolactona de *Lychnophora villosissima*, la cual mostró una actividad significativa contra las formas sanguíneas de dos cepas de *T. cruzi* (CL y Y) a una concentración de $2 \times 10^{-3}M$ *in vitro* (42).

Así mismo Zani CL *et al* evaluaron *in vitro* la actividad antitripanocida de los componentes de *Pluchea quitoc* L, aislados por cromatografía (casticina, PQU19B, 19G y 28A). Se obtuvo únicamente una actividad marginal en el

porcentaje de reducción de tripomastigotes (16 a 26%) a dosis de 250 µg/mL (31).

El diterpeno ácido ent-kaur-16-en-19 oico fue identificado como el componente tripanocida del extracto etanólico de *Mikania obtusata* D.C. (Asteraceae) *in vitro*. Presentando un IC₅₀ de 0.5 mg/ml (1.66mM) contra la forma hemoflagelar de *T. cruzi* a 4°C por 24 h (2).

La sesquiterpenolactona Dehidrozaluzanina C, aislada de *Munnozia maronii* (Asteraceae) no mostró actividad alguna sobre la forma tripomastigota de *T. cruzi in vitro* (30).

C. Actividad Vegetal Tripanocida:

Muchos productos de origen vegetal con diversas estructuras químicas han reportado alguna actividad contra varias especies de protozoos. Mientras que muchas plantas han demostrado poseer alguna actividad antiprotozoárica (usualmente *in vitro*), sólo algunas han encontrado un lugar en la terapéutica convencional, en muchos casos debido a efectos tóxicos que no permiten estudios en humanos (25). Vale la pena citar a la emetina que se obtiene de *Cephaelis ipecacuanha* y que ha sido utilizada en amebiasis, la quinina utilizada en el tratamiento de la malaria (cuando hay resistencia a la cloroquina) la cual se deriva de *Cinchona* spp.; la glaucarrubina, un antiamebiano derivado de *Simarouba glauca* y el ascaridiol, un ascaricida derivado de *Chenopodium ambrosioides* (25,43,44). Investigaciones recientes de la hierba *Artemisia annua* han llevado al aislamiento e introducción clínica de un nuevo agente antimalárico, la artemisina, el cual es un sesquiterpeno endoperóxido (44).

En la literatura no existe información sobre plantas medicinales específicas contra la enfermedad de Chagas (6,45) y son pocos los informes que se tienen acerca de los recientes esfuerzos que se han llevado a cabo para descubrir, desarrollar y perfeccionar nuevas alternativas quimioterapéuticas que brinden una mayor efectividad y una menor toxicidad.

1. Contra la forma amastigota:

Se ensayaron los extractos etanólico y dimetilsulfóxido de propolio a varias concentraciones, desde 12.5 hasta 50 $\mu\text{g/ml}$, sobre amastigotes de *T. cruzi* cepa Y, obteniendo una inhibición dosis dependiente en la proliferación de las formas intracelulares en medio de cultivo celular y en medio axénico (resuspendidos en medio de cultivo Eagle suplementado con SBF). Siendo el extracto etanólico más activo que el de dimetilsulfóxido tanto intra como extracelularmente (46).

2. Contra la forma tripomastigota:

Un estudio refiere que de 700 extractos de plantas ensayados *in vitro* a 4°C, dos: *Vernonia* sp. y *Eupatorium* sp., fueron activos contra las formas sanguíneas de *T. cruzi* (47).

Alves T.M *et al* evaluaron *in vitro* 54 especies de la familia *Asteraceae* contra la forma tripomastigota de *T. cruzi* de ellos el extracto etanólico de las partes aéreas de *Mikania obtusata* redujo significativamente (39%) el número de parásitos en sangre infectada a 4 °C durante 24 h *in vitro* (2).

González *et al.* evaluó la actividad de compuestos aislados y extractos crudos de vegetales autóctonos de Chile y observó una marcada actividad tripanocida *in vitro* a 4°C en los extractos de *Baccharis boliviensis*, *Gelidium pusillum* y *Miroglia grandis* (48).

Siguiendo un protocolo para evaluar la actividad de extractos vegetales Belda F.M *et al* obtuvieron resultados satisfactorios con los extractos obtenidos del embrión y del cotiledón de *Cinnamomum glaziovii* sobre la forma hemoflagelar de *T. cruzi* cepa Y a 4°C por 24 h y 48 h *in vitro* (49).

En 1991, Arias *et al.* probaron el efecto en tripomastigotes de *T. cruzi* de 16 extractos vegetales que habían mostrado una alta actividad tripanocida en epimastigotes cultivados *in vitro*. Los extractos crudos de *Aniba canellila*, *Jungia polita* y *Pera benensis* presentaron cerca del 30 por ciento de lisis de los parásitos (33).

El propolio también se ha estudiado contra las formas hemoflagelares de la cepa Y de *T. cruzi in vitro*; las cuales resuspendiadas en medio de cultivo enfrentándolas a extractos etanólicos y de dimetilsulfóxido a dosis que van de 12.5 a 250 µg/ml, han dado como resultado la lisis total de los tripomastigotes después de 24 h; siendo el efecto tripanocida observado dependiente de la temperatura. El extracto etanólico mostró un efecto más potente (100 µg/ml) (46).

3. Contra la forma epimastigota:

En 1992, Fournet *et al* observaron que el extracto clorofórmico de la corteza de *Pera benensis* posee actividad significativa sobre las formas epimastigotas de *T. cruzi* (50).

Un estudio refiere la actividad *in vitro* sobre la forma epimastigota de 3 cepas de *T. cruzi* (C8 CL1, Tehuentepec y Tulahuén) de diferentes extractos (alcaloides, acuosos, clorofórmicos, etanólicos, de etil acetato y petróleo) de plantas representantes de las familias Annonaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Menispermaceae, Piperaceae y Solanaceae a concentraciones que van desde los 100 a los 5 µg/ml. Utilizando como control positivo el nifurtimox y el beznidazole (45).

En otro estudio realizado por Fournet *et al* se observó la inhibición en el crecimiento *in vitro* de los epimastigotes de tres cepas de *T. cruzi* (Tulahuén, C8C11 y 27R27C11) al enfrentarlos al extracto de éter petróleo de las hojas de *Munnozia maronii* a una concentración de 25 µg/ml (30).

Higashi K.O y de Castro S.L. observaron un efecto similar en la inhibición dosis dependiente de los extractos etanólicos y de dimetilsulfóxido de propolio a concentraciones que van de 12.5 a 250 µg/ml sobre la proliferación de epimastigotes *in vitro* (46).

En estudios realizados los extractos de éter petróleo y de etil acetato de la raíz de *Jatropha grossidentata* han demostrado una actividad significativa contra los epimastigotes de *T. cruzi in vitro* a dosis de 10 µg/ml (32).

A pesar de que la forma epimastigota del parásito se encuentra en el intestino del insecto vector, se ha demostrado que la actividad *in vitro* de drogas contra este estadio correlaciona con la actividad *in vivo* contra la forma sanguínea tripomastigota en el hospedero mamífero (25).

D. Plantas a Utilizar:

1. Descripción de la Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae, con unos 300 géneros y unas 7,500 especies, es la familia principal del orden Euphorbiales en la subclase Rosidae. Se les encuentra en todo el mundo, pero abundan más en los trópicos. En el sur de América Central pueden encontrarse géneros compuestos por especies únicas (51,52). En Guatemala se reportan 37 géneros de Euforbiaceas (52).

Son hierbas, arbustos y con más frecuencia árboles en cuya familia se incluyen varias plantas de gran importancia económica; la mayoría de ellas se distinguen por la combinación de una savia lechosa y fruto de tres semillas, aunque hay varias excepciones.

En muchas de las especies la savia es venenosa o al menos altamente irritante y las semillas a menudo poseen propiedades purgantes y en grandes cantidades son venenosas (52). Se sabe que las especies de la familia Euphorbiaceae contienen ésteres forbólicos diterpénicos altamente tóxicos (25).

Encuestas etnobotánicas reportan que de 623 plantas utilizadas con fines medicinales en Guatemala pertenecientes a 114 familias, las Euphorbiaceas se

encuentran entre las familias más utilizadas (5.6%). Treinta y cinco son las Euforbiaceas (pertenecientes a 12 géneros) que se usan en el tratamiento de procesos infecciosos de los sistemas digestivo, respiratorio, genitourinario, dermatomucosas; y contra parásitos (53).

En otro estudio realizado se reportan 15 especies de Euforbiaceas (pertenecientes a 9 géneros) que son utilizados en Mesoamérica para el tratamiento de infecciones parasitarias causados por protozoos como la amebiasis, leishmaniasis, malaria y tricomoniasis; nematelmintos, platelmintos y sarcoptiosis (6).

De estos estudios y extensas revisiones bibliográficas fueron escogidas 3 plantas por su amplio uso popular, disponibilidad en el momento del estudio, información bibliográfica y distribución en el país; las cuales se describen a continuación:

2. *Acalypha guatemalensis* Pax & Hoffman

a. Nombres populares:

Hierba del cáncer (52,54).

b. Descripción botánica:

Hábito: Plantas monoicas herbáceas, usualmente perennes, pero algunas veces anuales; erectas o ascendentes, algunas veces de 1 m de alto, pero usualmente más bajas; simples o ramificadas, principalmente erectas, algunas veces

decumbentes; cuando jóvenes puberulentas o pilulosas, con pelos ascendentes o subcomprimidos (55,56).

Hojas: Con peciolo de 3 cm de largo o usualmente más cortos, redondeadas-ovaladas o rómbico-ovaladas, de 4-7 cm de largo, acuminadas o agudas, obtusas a ampliamente redondeadas en la base; crenadas, membranosas, de 5 inervaciones, finamente pilosas a lo largo de las inervaciones y algunas veces, con pubescencia densa y suave, en la madurez a menudo glabras. Festonadas en los márgenes, generalmente agujereadas por insectos o con protuberancias de color verde rojizo (55,56).

Flores: Las espigas principalmente androgíneas, terminales y axilares, numerosas, las más grandes de 4-5 cm de largo o más, muy densas, con muchas flores, pedunculadas o subsésiles; la porción estaminada de la espiga corta y densa; las brácteas pistiladas en el fruto, de 5 mm de ancho, de 5-7 lóbulos a la mitad, setosas y portando una glándula al final de los pelos, de 1-2 flores, los lóbulos lanceolados, ovario hirteloso; estilos de 6-10 lacíneas, rojo púrpura.

Frutos: Una cápsula tuberculada, de 3 mm de diámetro.

Semillas: Ovoides, lisas, de 2 μ m de largo (53,56).

c. **Ecología:**

Especie nativa de Guatemala y Honduras cuya zona de vida es el bosque seco subtropical. Es común en terrenos removidos, en la región nororiental es

frecuente en matorrales secos o húmedos, se encuentra a veces como maleza en tierras cultivadas y en vegetaciones densas de 750-2,500 msnm (55,56).

En Guatemala se ha descrito en: Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, El Progreso, Guatemala, Huehuetenango, Jalapa, Quetzaltenango, Quiché, Sacatepéquez, Santa Rosa, Sololá y Zacapa (53,54).

d. Usos medicinales populares:

En Guatemala se venden comúnmente ramas con flores secas o frescas y su decocción se toma como tónico y diurético; también es aplicada en inflamaciones, infecciones y heridas de la piel y las mucosas. Se le atribuyen propiedades antisépticas, desinflamantes y diuréticas (54,55).

Principalmente es un remedio para las afecciones cutáneas, tales como llagas, granos, verrugas, callos y heridas. Algunas veces la decocción de las hojas es ingerida en ayunas para curar los cólicos, dolores de cabeza y menstrual (54,56,57). Mitiga los dolores producidos por el cáncer, tomando en cocimiento una ramita para un vaso de agua (58). También es utilizado en el tratamiento de reumatismo, pielonefritis y resfrío (57); picaduras de serpientes y pies cansados (53, 54, 59).

El cocimiento de la raíz, tallo y hojas, se utiliza para lavados de úlceras cutáneas y llagas en general (60). En las afecciones gastrointestinales se usa para el tratamiento de diarrea, disentería, amebiasis, dolor de estómago, estreñimiento y gastritis (55). Esta planta es usada en otros países como Costa Rica para tratar disentería amebiana (56).

Además se ha reportado su uso en casos de alergias, enfermedades venereas y en lavados para vaginitis (57, 61).

e. Otros usos:

Es a menudo plantada en macetas, cercos, jardines o huertos de las casas, principalmente para propósitos medicinales (56,58).

f. Composición química:

Los constituyentes según el análisis de la planta completa son: alcaloides no cuaternarios, taninos, antraquinonas y glicósidos cianogénéticos; ácidos diterpénicos, azúcares desoxigenados y polifenoles (56,62).

g. Estudios farmacológicos y de actividad biológica:

Estudios antibacterianos *in vitro* demuestran que la maceración hidroalcohólica de las hojas de *Acalypha guatemalensis* inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* no así de otros microorganismos causales de infección de la piel y mucosas, como *Candida albicans* y *Escherichia coli*. En un estudio de confirmación se demostró que únicamente el 50 por ciento de las cepas de *S. aureus* es inhibido por el extracto etanólico (55,61).

En un estudio de tamizaje antibacteriano, el espectro de inhibición demostró que 60 por ciento de cepas de *S. typhi*, 50 por ciento de *S. aureus* y 15 por ciento de *P. aeruginosa* son inhibidas por el extracto etanólico de *A.*

guatemalensis. Con lo cual se confirma la actividad de *A. guatemalensis* de inhibir *S. flexneri* y *S. aureus*, no así ECEP, *S. typhi*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. El mejor solvente para mostrar la actividad fue el metanol con CIMD de 10 mg para *S. aureus* (61,64).

Estudios antimicóticos *in vitro* demuestran que la decocción de las hojas tiene actividad contra *Epidermophyton floccosum*, no así contra *C. albicans* y los otros dermatofitos ensayados (65,66).

Estudios realizados en Guatemala demuestran que el extracto acuoso de las hojas producen una elevación del volumen urinario excretado en un modelo experimental farmacológico de tamizaje en ratas, pero no presenta una actividad uricosúrica significativa (55,67).

Las hojas y ramas colectadas en Panamá, no mostraron actividad citotóxica en los cultivos de células humanas CA-Cólon-Co-115 (68).

3. *Croton guatemalensis* Lotsy

a. Sinónimos:

Croton eluteroides Lotsy (tipo de Santa Rosa, Hyde & Lux) (53).

b. Nombres populares:

Chul, Chulche, Copalchí, Copalchillo, Copalchín, Hoja amarga, Quina, Zicché. Algunos le llaman Palo Santo (53,54,60).

c. Descripción botánica:

Hábito: Arbusto o árbol delgado, algunas veces de 8 m de alto, usualmente más bajos, es muy compacto o tupido, con escamas de blanquecinas a cafés (53,54).

Hojas: Son firmes y membranosas, aromáticas, amargas, alternas en tallos delgados, desde ovadas a ampliamente triangular ovadas, con peciolo largos y finos (a veces cortos y glandulares). La mayoría de 7-15 cm de largo, acuminadas a largamente acuminadas; puntiagudas en el ápice con forma de cuña o algunas veces ligeramente indentada en la base. En la base es poco cordada o truncada, la otra base es palmada, nervada, verde en la cara superior y con el tiempo casi glabrada; abajo es espaciada o muy densa, lepidada, blanco-plateada (54,69).

Flores: Racimos axilares muy numerosos, usualmente muy cortos y floreados. Las flores son amarillo pálido, casi sin tallo, pequeñas y escalonadas y a menudo son muy remotas, casi sésiles, densamente lepidadas; sépalos ovados, agudos; pétalos ovadolanceolados ciliados glabrosos; alrededor de 15 estambres; el ovario es denso lepidado, cápsula subglobosa, de 8 mm de longitud, denso, lepidado, algunas veces con tubérculos oscuros (53,69).

d. Ecología:

Se encuentra en bosques o matorrales de húmedos a secos y a veces en bosques mixtos, comúnmente sobre laderas pedregosas. Se da hasta 1,800

msnm y se reporta desde el Sur de México hasta Honduras y probablemente crece un poco más al sur (53,54,69).

Este arbusto o árbol pequeño es bastante común en diversas áreas de Guatemala, pero especialmente en las planicies del Pacífico a menos de 1,800 msnm y al pie de los cerros en donde frecuentemente se forman matorrales de gran extensión (52).

En Guatemala se ha descrito en: Alta Verapaz, Baja Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Petén, Quetzaltenango, Quiché, Retalhuleu, Sacatepéquez, Santa Rosa (tipo de Santa Rosa, Hyde & Lux) y Suchitepéquez (52).

e. Usos medicinales populares:

En Guatemala, las personas dedicadas a la prescripción y venta de hierbas y productos vegetales de forma empírica, son llamados "hierberos"; éstos venden las hojas secas de Copalchi y su decocción es tomada como tónico, en el tratamiento de inflamación y otros padecimientos. También es utilizada en baños para aliviar dolores reumáticos (52).

La corteza es aplicada de varias formas: sirve para curar "empacho", cámaras de sangre, dolor de estómago, gas, toda clase de heridas y llagas, contra la erisipela y la sarna, para la inflamación, para aliviar los dolores reumáticos, como antidiarreico y diurético (54,60,70).

En México y en Guatemala, la decocción de la corteza amarga es tomada como remedio para la fiebre intermitente y la decocción de las hojas es tomada contra la malaria (54,60).

En la evaluación farmacológica y toxicológica *in vitro* de algunas plantas comúnmente empleadas en Guatemala contra la malaria, se demostró que el extracto acuoso de la corteza de *C. guatemalensis* posee acción esquizontocida contra la cepa K 173 de *Plasmodium berghei* (71).

El látex del *Croton draco* Cham & Schlecht, se utiliza contra la leishmaniasis y cicatrización de heridas; y la infusión de la parte aérea se utiliza para aliviar la fiebre (72).

f. Otros usos:

Es a menudo plantada para cercos o como rompevientos en plantaciones de café, que están expuestas al viento (52).

g. Composición química:

En Guatemala se reporta un alcaloide llamado copalchoidina, con propiedades similares a la quinina, que ha sido extraído de la corteza (54,73).

Se dice que contiene resinas y sustancias alcaloideas cuya acción es semejante a la de la teobromina, la cual excita directamente la diuresis en el epitelio renal (74).

En base a ciertos análisis cromatográficos realizados, puede afirmarse que el *C. guatemalensis* posee los siguientes grupos de compuestos: antraglicósidos, a nivel de las hojas, pero no en la corteza; principios amargos, en la corteza y no en las hojas; flavonoides, únicamente en las hojas; aceites esenciales, tanto en las hojas como en la corteza; valepotriatos, tanto en hojas como corteza, pero encontrándose en mayor proporción en las hojas (73).

Por otro lado, la diferenciación de hojas y corteza de *C. guatemalensis* en cuanto a su composición química, es clara únicamente al utilizar el sistema cromatográfico para aceites esenciales, cumarinas, ácidos carboxílicos fenólicos y valepotriatos (73).

h. Estudios farmacológicos y de actividad biológica

La infusión acuosa de la corteza ha mostrado actividad hipoglicemiante cuando es administrada oralmente en ratones (73). La infusión de la corteza de *C. guatemalensis* no posee efectos tóxicos hasta de 15 g/kg peso ratón (69).

4. *Jatropha curcas* L.

a. Nombres populares:

Barbados nut, Curcas bean, Chichuy runak, Jatropa, Physic nut, Piñón, Piñoncillo, Purging nut, Sakilté, Tempacte, Tempachtli, Tempate, Yupur, Zikilté (53,54,75-79).

b. Descripción botánica:

Hábito: Arbusto o árbol pequeño de madera suave, común en la América Tropical, algunas veces de 8 m de alto pero usualmente son más bajos, con tronco irregular y corteza grisácea, pálida y casi lisa (53,54,56).

Hojas: Largamente pecioladas, los peciolo tan largos como los limbos, redondeado-ovados de 7-16 cm de largo y casi igual de ancho, abiertamente cordados en la base o algunas veces, truncados, fuertemente lobulados de 3-5 o angulados, no dentados, palmados, de 5-7 inervaciones en la base, casi glabros, pero más o menos pilosas las nervaduras del envés, casi cerca de la base. Las hojas son deciduas, alternas o en grupos terminales densos, con ramas esparcidas y ramitas gruesas (55,56).

Flores: Las flores son amarillentas, en forma de campana de 6 mm de ancho; las partes masculinas y femeninas están juntas formando racimos en tallos y ramas. Las cimas que forman son pequeñas, densas, largamente pedunculadas, con bastantes flores, las brácteas lanceoladas o lineares. Los sépalos son ovalado-elípticos, de 4 mm de largo, glabros. Los pétalos son blanquecinos, oblongo-ovalados casi libres, densamente pilosos internamente. En las flores estaminadas son del doble de largo, como los sépalos; en las flores pistiladas casi igual a los sépalos. Ocho estambres, los filamentos externos libres, los internos, algunos connados; ovario glabro (52,54,56).

Frutos: Son ovales, lisos con una cápsula de 2.5-4 cm de largo, de 2-3 celdas, elipsoide. Verdes en un principio que se torna amarillo y finalmente negro a medida que la cáscara y la carnaza se deshidratan (54,56).

Semillas: 2-3 semillas, cerca de 2 cm de largo y 1 cm de ancho, pálidas, oblongo-elipsoides con conspicuas líneas negras (56); aceitosas y de sabor dulzón (78).

Todas las partes contienen una savia traslúcida amarillenta pegajosa, que se torna roja después de su exposición (54,55).

c. Ecología:

Nativa de México, Guatemala, Centro y Sur América; naturalizada en Sur América, El Caribe, el Viejo Mundo y en las Indias Occidentales. Crece en matorrales húmedos o secos, en planicies y laderas de colinas, es muy abundante en setos y ampliamente cultivada hasta los 1,500 msnm más comúnmente a bajas elevaciones (54,55,56).

Es una de las plantas más comunes y mejor conocidas de las tierras bajas de América Central y su zona de vida es el bosque seco subtropical, y el monte espinoso subtropical (52,56). El arbusto bota sus hojas durante los meses secos y florece en julio y agosto, en los climas cálidos. Su crecimiento es rápido, propagándose fácilmente a través de semillas y estacas (52,56,78).

En Guatemala se ha descrito en: Alta Verapaz, Chiquimula, El Progreso, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Izabal, Jalapa, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez, Zacapa y probablemente en todos o en la mayoría de los otros departamentos de la República (52,55,56).

d. Usos medicinales populares:

Las hojas, flores, fruto, el látex, la corteza y la raíz de la planta son utilizadas con diferentes propósitos como se enlista a continuación:

Hojas: Son utilizadas como cataplasmas en la erisipela, el eczema y sobre el abdomen para mitigar el dolor del bazo (esplenosis) y frescas se utilizan en las heridas, quemaduras de sol y quemaduras en general. Es utilizada como rubefaciente para las parálisis y el reumatismo (54,55,79). Las hojas maceradas con aceite de ricino se usan para apresurar la supuración. La infusión, se usa para bañarse y como lavativa en el tratamiento de las convulsiones y accesos histéricos (56,78). La decocción es utilizada como antineurálgico y contra la inflamación de ojos, oídos, nariz y garganta; como tónico y contra las hemorroides, dolor abdominal y gases.(55,80,81).

Las hojas calentadas son aplicadas sobre el pecho de las mujeres lactantes para incrementar el flujo de leche (galactogogo). Los barbadianos hierven la mitad o una hoja amarilla semiseca entera y dan la decocción a los niños afectados con marasmo. La dosis es fuerte o débil de acuerdo a la edad del niño (54,79). En Panamá, la decocción de hojas es tomada como remedio para la ictericia y trastornos hepáticos (77). En Cuba, la decocción de la hoja es comúnmente utilizada para baños, especialmente en casos de fiebre y catarros. En Panamá las hojas ebullidas son aplicadas sobre úlceras, para la artritis, aplicable a tumores duros y en enfermedades sistémicas como la linfadenitis en crecimiento (54,79,80). Las hojas son consideradas como antiparasitarias aplicable a la sarcoptiosis y su decocción se toma como tratamiento para las enfermedades venereas como la sífilis y la gonorrea (55,76,79). En las

afecciones gastrointestinales, las hojas se usan para aliviar la acidez (79), para tratar el estreñimiento, diarrea, disentería y parásitos intestinales (55). Asimismo, se ha reportado su uso en el tratamiento de la lepra y el paludismo (76,82).

Látex: Se aplica comúnmente a heridas o inflamaciones para apresurar la curación sobre granos, cortaduras y quemaduras; es aplicado tópicamente en los piquetes de abeja y avispa y como cicatrizante (52,56,75,79). También es utilizado para el asma por vía oral (77). Los dientes flojos son fortalecidos mediante el frotamiento de la savia, es colocada en caries dentales para aliviar el dolor de muelas y es utilizado también para limpiar la dentadura (52,56,76). La savia de la planta es utilizada contra fuegos de la boca, cuando existe en la lengua y garganta, en inflamaciones y úlceras linguales, y para la candidosis bucal (Trush). También es utilizado como purgante, para las hemorroides y úlceras, ventosidades, estreñimiento y cólicos (54,56,79), herpes, llagas, úlceras, verrugas y lepra (81,82,83).

Semillas: Son utilizadas para la gota, parálisis y padecimientos dérmicos, su aceite es aplicado en quemaduras, fracturas, dolor de muelas, y hemorroides. Los mauritanos lo utilizan para dar masaje en la cavidad peritoneal cuando hay acumulación de líquido (54,76,79). La semilla y sobre todo el aceite que proviene de las semillas tiene drásticas propiedades purgantes, eméticas y laxantes. Son ampliamente tomadas como purgante y administradas como vermífugo (antihelmíntico) en Centro América. También son utilizadas para tratar el estreñimiento, la diarrea (decocción de semilla pulverizada), la disentería y los parásitos intestinales (54,55,56,76,79). Es utilizada como

contraceptivo y para el tratamiento de enfermedades venereas, especialmente la sífilis y la gonorrea (54,56,79).

Fruto: Se usa como contraceptivo (79).

Flores: La decocción de las flores al igual que las hojas, se usan externamente para baños en casos de fiebres y catarros; internamente se usa para enfermedades venéreas, quemaduras de sol, eczema, erisipela, gonorrea, neuralgia, paludismo y reumatismo (55).

Raíz: Los indígenas venezolanos toman una decocción de las raíces para detener la diarrea (54). Su decocción es utilizada como enjuagatorio bucal para las encías sangrantes y dolor de muelas, eczema y sarcoptiosis (79). Se emplea contra gonorrea y disentería (80).

Corteza: La decocción es tomada en los "empachos" del estómago y despedida (macerada) en agua, ha sido bebida para despertar el apetito. El polvo seco de las raíces y de la corteza es aplicado a las heridas y es frotado en las encías para aliviar los espasmos causados por el tétanos infantil (56).

Se menciona que en Guatemala, el Piñón ha sido utilizado como remedio en enfermedades epidémicas, aliviando el exantema y la inflamación asociados al sarampión y también para aliviar los padecimientos de la lepra (76). También en estados como la bronquitis, congestión sinusítica, pleuritis, neumonía y hemoptisis. Sus extractos son utilizados entre los remedios folklóricos para el cáncer y es utilizado también como abortífero, antiséptico, diurético, hemostático, narcótico, en la alopecia, anasarca, dispepsia, neuralgia del nervio

ciático y uterosis. Homeopáticamente es usado contra el sudor frío, cólico, colapso, calambres, cianosis y como nefrolitiásico (70,79).

e. Otros usos:

Es plantada abundantemente para cercos y para sombra de algunos animales domésticos. En México por mucho tiempo ha sido utilizada como planta huésped para la producción en escala de un insecto llamado Axi o Axin (*Coccus axin*). La laca que ellos producen es muy bien estimada como barniz para retocar guitarras y otros artículos de madera (55,56).

La savia contiene 10 por ciento de taninos y puede ser utilizada como tinta para escribir. En Guatemala una infusión de las hojas es usada comúnmente por algunos indios para fijar el color del algodón. Las semillas pulverizadas se utilizan para curtir cueros (52,56). El aceite claro que rinden las semillas es utilizado para iluminación y el alumbrado de calles. También puede servir como lubricante y se asemeja al Tungoil (56,78). Es utilizado como combustible, en la elaboración de candelas, jabón, pinturas y en la alimentación (54,55,78,79).

El aceite de semillas es utilizado con las cenizas de la madera y de las hojas para hacer jabón de consistencia dura (56). Ha sido utilizada como homicida, moluscida, piscicida y raticida. Las hojas se utilizan para fumigar casas contra las chinches. En la India, las hojas molidas son aplicadas cerca de los ojos del caballo para repeler las moscas (56,79).

La semilla pelada, tostada y molida se come en el chili o mole. La ceniza de las raíces y ramas, se utilizan como sal de cocina. En la isla de San Vicente, la

decocción de las hojas es tomada como té refrescante. Las hojas tiernas pueden ser comidas al vapor o estofadas y son utilizadas al cocinar carne de cabra (54,56,79,81).

f. Composición química:

Látex: Contiene 10 por ciento de taninos, diterpenos, curcalatirenos (A y B), péptidos cíclicos como la curcaciclina A y B; y la proteasa curcaína(84,85).

Corteza: Contiene 37 por ciento de taninos y probablemente produce un tinte azul oscuro; además contiene una sapogenina esteroideal y es probable que la propiedad galactogoga de la planta se deba a dicho contenido (55,56,76).

Semillas: Contienen hasta 40 por ciento de un aceite purgante que contiene los ésteres de los ácidos palmítico (31-37%), esteárico (10-17%), oleico (45-62%) y linoleico (18-45%), sacarosa, rafinosa, staquínosa, glucosa, fructosa y galactosa; la proteína tóxica curcina, curcasina y taninos; así como el 12-deoxi-16-hidroxi-forbol, el cual ha sido aislado del aceite de la semilla. También contiene ácidos araquídico, mirístico, diterpenos no mutagénicos y ácidos orgánicos (crotonico y tiglinico). La toxoalbúmina cursina es más abundante en el embrión (55,56,82,84,86). Se dice que 100 g de semilla contiene: 6.6 g de agua, 18.2 g de proteína, 38.0 g de grasa, 33.5 g de carbohidratos totales, 15.5 g de fibra y 4.5 g de ceniza (79).

Hojas: Contienen fitosteroles, glucósidos, cianogenéticos, taninos, poliesteroles: α -amarina (un triterpeno), una mezcla de β -sitosterol, stigmasterol y campesterol; 7-ceto- β -sitosterol, stigmasterol-5-eno-3 β , 7 α -diol y

stigmast-5-eno-3 β , 7 α -diol; flavonoides: apigenina, vitexina e isovitexina. También contiene diterpenoides (curcusonas A, B, C y D), terpenoides, saponósidos, polifenoles y jatropina (53,56,84,85,87,88).

La raíz está compuesta por un 7-18% de resina rica en glucósidos, metil esculetina, ácido palmítico, ácido estéarico, goma y azúcares (69,78,87).

g. Toxicidad:

La semilla posee propiedades purgantes muy energéticas y si son ingeridas, los resultados algunas veces son peligrosos o bien fatales, al menos en el caso de niños pequeños. La toxicidad de la semilla se atribuye a la toxoalbúmina curcina y al complejo resino esterólico. Dos semillas son un fuerte purgante, la absorción de 5 semillas alteran la respiración y la circulación sanguínea; por encima de 15-20 semillas, el coma puede preceder a la muerte (52,79,87).

La sintomatología de la intoxicación es: quemadura e inflamación a nivel de la garganta y del esófago, náusea, vómitos violentos, dolores abdominales y diarrea; en los casos graves puede instalarse una enterocolitis sanguinolenta y en los casos severos, espasmos musculares, respiración forzada, dilatación de las pupilas, deshidratación, colapso y algunas veces, ocurre la muerte (56,87).

El único medio de evitar los efectos tóxicos de estas semillas es privándolas del germen (embrión) antes de comerlas o usarlas, ya que ésta es la parte más activa en dicho fruto. Al envenenado puede tratarsele administrándole café negro amargo, zumo de limón, albúmina, tizana de bejuco de alcanfor y llamar a un médico inmediatamente (75).

Las semillas han demostrado una fuerte actividad cocarcinogénica, la savia es irritante para la piel y es tóxica cuando se ingiere; la corteza, el fruto, la hoja, la raíz y la madera contienen HCN (76,79).

h. Estudios farmacológicos y de actividad biológica:

Estudios de la actividad antibacteriana *in vitro* demuestran que la maceración hidroalcohólica de las hojas no tiene actividad contra cinco enterobacterias causales de diarrea. El extracto etanólico de la raíz tiene actividad contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. viridans* pero no contra *S. pneumoniae*, *C. diphtheriae*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *T. cutaneum*, *T. rubrum*, *M. nanum* y *M. mycetomy* (55,89).

El extracto etanólico acuoso (1:1) fue inactivo contra levaduras y el *Aspergillus niger* a una concentración de 250 µg/ml e inactivo contra *Agrobacterium tumefaciens* (84).

Las hojas y las ramas han demostrado actividad contra la leucemia linfocítica P-388. Las hojas muestran actividad antileucémica y 4 componentes antitumorales: incluyendo el jatrofano y el jatrofone, son reportados de otras especies de *Jatropha* (54,79).

Con las partes aéreas se han hecho experimentos farmacológicos, como ejemplo: Los extractos clorofórmicos y etanólicos al 95 por ciento, por vía intraperitoneal en el ratón muestran una actividad antitumoral a las dosis de 12.5 mg/kg y 25 mg/kg respectivamente. El extracto hidroetanólico (1:1), administrado a dosis de 0.25 mg/kg por vía intraperitoneal en el ratón,

potencializa la acción de los barbitúricos y muestra una actividad diurética. La DL₅₀, en las mismas condiciones resultó ser de 0.5 g/kg (77).

El extracto metanólico al 70 por ciento de la raíz por vía intraperitoneal, en el ratón muestra una actividad anticonvulsiva contra las convulsiones inducidas por el metrazole (77).

El fruto por vía oral en la rata muestra un efecto antifertilidad. El extracto acuoso y el etanólico de la raíz es moluscocida *in vitro* contra *Bulinus globosus* mata 100% de los ratones tratados por intubación gástrica a dosis de 10 gr/Kg/día durante tres días (87).

El extracto etanólico de la semilla desgrasado es citotóxico *in vitro* sobre líneas de células cancerosas (LLP388) (54, 87).

El extracto metanólico muestra una actividad ionotrópica y cronotrópica negativa en el corazón del cobayo. El aceite sacado de la semilla administrado por vía subcutánea en ratón es letal a la dosis de 1 ml/animal. El extracto acetónico del aceite de la semilla administrado en el oído del ratón, muestra una neta actividad irritante (87).

Se dice que el contenido de taninos de las semillas y las propiedades contra irritantes de la savia, pudieron haber sido la razón para ayudar a sanar las encías y con ello fortalecer los dientes (76).

Se ha observado efectividad del látex de las hojas y ramas de *J. curcas* en el tratamiento de verrugas vulgares, encontrándose aún más efectivo que el

nitrógeno líquido, utilizado como control (90). Dicha actividad puede atribuirse a las fitotoxinas, las cuales tienen efecto irritante y/o caústico sobre la piel; y a los taninos los cuales precipitan las proteínas celulares y tienen un efecto astringente sobre las mismas (83).

Se ha visto que el extracto etérico de las semillas muestra una estimulación en la inducción antigénica viral *in vitro* en cultivo de tejidos a una concentración de 100 µg/ml (84).

Trabajos en curso mostrarían que el látex presenta una actividad antifúngica sobre las dermatomicosis y una actividad cicatrizante (87). De Cuba se reporta una actividad antibacteriana *in vitro* de la especie (77).

También se ha estudiado su actividad hipoglucemiante, diurética, espasmolítica, hipotérmica, analgésica, antiinflamatoria, antiviral, citotóxica, antipirética y cocarcinogénica (84,91).

i. Otros estudios:

El látex mostró una fuerte inhibición contra el virus del mosaico de la sandía; y se ha concluido en Florida que hay dos clases de esta especie, una con semillas tóxicas y otra con semillas no venenosas las cuales no pueden ser distinguidas a simple vista (79).

Se ha demostrado que las hojas y raíces de *J. curcas* tiene actividad contra fitopatógenos como *Aulacophora foveicollis*, *Lipaphis erysimi*, termitas, mosquitos, *Musca domestica* y caracoles (92).

El SP-303 es un oligómero proantocianidínico aislado del látex de *Croton lechleri*, el cual ha demostrado una amplia actividad antiviral contra una variedad de virus DNA y ARN *in vitro* e *in vivo* como: RSV, FLV-A, PIV, HSV 1 y 2; y Hepatitis A y B. Dicho mecanismo antiviral parece derivarse del ligamiento directo a los componentes de la envoltura viral, resultando en la inhibición de la unión y penetración de la membrana plasmática (91).

IV. JUSTIFICACIONES

Existe una gran necesidad de descubrir nuevas drogas para combatir los estadios tempranos de la infección por *T. cruzi* agente etiológico de la enfermedad de Chagas.

Las drogas de uso clínico no están disponibles para la población en general debido a su alto costo y difícil acceso. Aun en nuestros días, dichas drogas son de uso limitado, ya que presentan una alta toxicidad y producen efectos secundarios. Por lo que se espera encontrar en la medicina vegetal una alternativa de tratamiento que reúna las condiciones farmacológicas, toxicológicas, económicas, de acceso, suministro y disponibilidad adecuada para la población afectada.

El tamizaje de plantas medicinales, aprovechando el conocimiento nativo, reduce los ensayos empíricos al azar y no productivos. Actualmente, existe muy poca literatura sobre las plantas con eficacia antiprotozoárica; de las cuales a ninguna le son atribuidas propiedades tripanocidas. El hallazgo de extractos con actividad tripanocida puede jugar un papel importante en la quimioterapia, ya que pueden constituirse en una alternativa para las drogas sintéticas por su eficacia terapéutica y menores efectos adversos o bien en la elucidación de estructuras potencialmente activas para su síntesis química y modificaciones moleculares más eficaces; además se ha demostrado que la actividad *in vitro* de drogas contra la forma epimastigota del parásito, correlaciona bien con la actividad *in vivo* contra la forma sanguínea (tripomastigota) en el hospedero mamífero (25).

Esto hace necesario el tamizaje de plantas medicinales con propiedades antiparasitarias, para evaluar si poseen o no efecto tripanocida, comparando grupos experimentales y de control, mediante la estandarización de una metodología de tamizaje rápido a tiempo fijo, a una sola dosis, utilizando cultivos de *Trypanosoma cruzi* en microplacas de poliestireno de fondo plano y por medio de lectura microscópica visual que permita evaluar cuantitativamente el efecto tripanocida *in vitro* del enfrentamiento droga-parásito.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

V. OBJETIVOS

A. General:

Estudiar el efecto antitripanosoma *in vitro* de plantas de uso medicinal en Guatemala.

B. Específicos:

1. Establecer una metodología de tamizaje *in vitro* para determinar cuantitativamente la actividad tripanocida vegetal a tiempo fijo, a una sola dosis, en microplacas y por medio de lectura microscópica visual.
2. Demostrar la actividad tripanocida *in vitro* de tres especies de Euforbiaceas (*Acalypha guatemalensis*, *Croton guatemalensis* y *Jatropha curcas*).
3. Establecer el disolvente orgánico que mejor extrae la actividad antiprotozoárica.

VI. HIPOTESIS

- A. Por lo menos una de las tres Euforbiaceas del estudio posee efecto tripanocida *in vitro*.
- B. El disolvente que mejor extrae la actividad antiprotozoárica es el etanol.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo:

El Universo de trabajo estuvo constituido por las Euforbiaceas de uso medicinal en Guatemala y la muestra estuvo constituida por el órgano de tres especies nativas de Guatemala de las cuales se reporta el mayor uso popular en el tratamiento de infecciones parasitarias; siendo estas hojas de *A. guatemalensis* y de *J. curcas* y la corteza de *C. guatemalensis*.

De las 15 especies de la familia Euphorbiaceae de los cuales se ha reportado su utilización en Mesoamérica para el tratamiento de infecciones parasitarias (53,55), las tres plantas fueron escogidas por su amplio uso popular, disponibilidad en el momento del estudio, información bibliográfica y distribución en el país. Tres extractos de cada planta se retaron contra la cepa Tulahuén de *T. cruzi*

B. Medios:

I. Recursos humanos:

- a. Autora del trabajo: Br. Nancy Fabiola García Mata.
- b. Asesor de tesis: Lic. Armando Cáceres.

2. Recursos institucionales:
 - a. Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.
 - b. Laboratorio y Droguería de Productos Fitofarmacéuticos Farmaya, S.A.
 - c. Agencia Japonesa de Cooperación Internacional (JICA).

3. Recursos materiales:

- a. Materiales y Equipo:

Agitador Vortex (Vortex-2 Genie) marca Scientific Industries.

Algodón.

Anillos de metal

Autoclave Miny manual timer Type STMN OMRON Corporation Japan

Balanza analítica Mettler

Baño de María Precision.

Beakers de 250, 500 y 1,000 ml.

Botellas de vidrio pyrex para medios de cultivo con tapón de rosca,
capacidad de 500 y 1,000 ml.

Cajas de Petri pyrex de 15X100 mm

Cámara de Neubauer.

Campana de flujo laminar LABCONCO Corporation Purifier Class II.

Cáñamo.

Centrífuga IECCR-6000

Cinta testigo.

Contador hematológico.

Corteza de *Croton guatemalensis* (100 gr).

Cubreobjetos de 22x22 mm.

Depósitos plásticos de reactivo para micropipetas multicanal, capacidad de 20 ml.

Desecadora con CaCl_2 granulado como desecante.

Embudos.

Erlenmeyers pyrex con tapón de rosca, capacidad de 100, 250 y 500 ml.

Estufa Hot Plate Stirrer Corning.

Flasks para cultivo de tejidos marca Corning de cuello decantado de 25 cm² (capacidad de 50 ml).

Frascos ámbar con tapón de rosca, capacidad de 1 lt.

Filtros Millipore de 0.2 μm .

Gasa.

Gradillas para viales tipo Eppendorf.

Guantes No. 7

Hojas de *Acalypha guatemalensis* (100 g).

Hojas de *Jatropha curcas* (100 g).

Horno convencional para secar material CENCO, Central Scientific Co, Inc.

Horno de calor seco Isuzu Sterilizer Model 2-2095.

Incubadora Precision a 26 °C.

Jeringas de 10 cc.

Liofilizador Freeze Dryer VD-60, Taitec Corporation.

Masking tape.

Microcentrifuga para microtubos (viales tipo eppendorfs), marca Millipore.

Micropipetas de volumen variable (10,20,50,100,200,500 μl), Sumilon.

Micropitepa multicanal de volumen variable (40-200 μl), Sumilon.

Microscopio binocular Reichert.

Microscopio invertido Nikon.

Microplacas de poliestireno de fondo plano, Corning de 96 pozos estériles.

Papel filtro Whatman No. 1.

Papel parafilm.

Papel periódico.

Percoladora mediana, capacidad de 1 lt.

pHímetro Accumet pH meter 15 Fisher-Scientific.

Pipetas Pasteur.

Pipeta Multipette 4780 marca eppendorf (dispensador manual para la dosificación en serie de volumen variable 100-500 μ l).

Pipetas volumétricas de 5, 10 y 25 ml.

Portaobjetos 3x1".

Prensas de madera.

Probeta capacidad de 1,000 ml.

Puntas combitip para la Pipeta Multipette 4780 marca eppendorf.

Rotador de placas eléctrico Shaker RS-2 iuchi.

Rotavapor con presión reducida y con temperatura menor de 65°C.

Soportes de metal.

Tips amarillos y tips azules.

Tubos cónicos con tapón de rosca estériles, capacidad de 15 y 50 ml,
Sumilon.

Varillas de vidrio.

Viales tipo Eppendorf capacidad 2 ml.

Viales de fondo plano con tapón de rosca, capacidad de 4 y 10 ml.

b. Reactivos:

Agua destilada. estéril

Alcohol al 70%.

Caldo de Infusión de Hígado OXOID.

Cloruro de potasio Wako Pure Chemical Industries LTDA.

Cloruro de sodio Wako Pure Chemical Industries LTDA.

Diclorometano 4 lt Merck.

Dimetilsulfóxido (DMSO) Merck.

Etanol al 80%, 4 lt Merck.

Fenol al 5% Merck.

Fosfato ácido disódico pentahidratado Wako Pure Chemical Industries LTDA.

Glucosa monohidratada Wako Pure Chemical Industries LTDA.

Medio LIT (con solución de eritrocitos hemolisados al 5%) carente de SBF.

Medio LIT completo al 10%

Medio LIT completo al 20%

Propilenglicol calidad USP 8.5 lt Sigma, como anticongelante para el
liofilizador.

Solución de eritrocitos hemolizados.

Solución de PBS al 1 X M pH 7.4 estéril.

Suero Bovino Fetal Sigma. Lote 98 F-0200.

Tintura de Violeta de Genciana al 2 por ciento.

Triptosa Wako Pure Chemical Industries LTDA.

4. Recursos de experimentación:

Epimastigotes de *T. cruzi* cepa caracterizada Tulahuén fase exponencial en medio LIT a una concentración de 5×10^5 parásitos por mililitro (28).

5. **Fármaco de referencia:**

Violeta de genciana a una concentración de 250 µg/ml (33).

C. **Procedimiento:**

1. **Material Vegetal:**

-Se recolectaron las especies vegetales: *A. guatemalensis* en Chimaltenango, *C. guatemalensis* en Santa Rosa y *J. curcas* en Suchitepéquez.

-Se herborizaron y clasificaron botánicamente (59).

-La materia vegetal se lavó con agua corriente por 15 minutos, se secó a la sombra en un lugar fresco y aireado (7 días para las hojas y 21 para la corteza) y se removió periódicamente el material vegetal, para evitar su descomposición.

-Ya seco el material vegetal se pulverizó en un micromolino de cuchillas y se almacenó por separado en bolsas de plástico selladas para prolongar su conservación.

2. **Preparación del extracto:**

-Se colocó 100 g del pulverizado de la planta en una percoladora mediana, se le agregó 600 ml de diclorometano y se dejó reposar por 24 h a

temperatura ambiente. Se recolectó el extracto en un frasco ámbar y se utilizó la misma porción vegetal para hacer una segunda extracción de igual volumen por 24 h más. Se juntaron las fracciones de cada extracto.

-Se preparó el extracto etanólico con 500 ml de alcohol al 80% (ver paso anterior).

-Se realizó una única extracción acuosa con 500 ml de agua destilada a 100°C por 24 h a temperatura ambiente y luego se recolectó el extracto.

-Se filtraron los extractos por gravedad a través de papel filtro Whatman No. 1 (93) y se almacenaron en frascos estériles.

-Los extractos etanólicos y diclorometánicos se concentraron en Rotavapor. El eluyente que contenía el extracto con diclorometano se colocó en el balón del rotavapor y se puso a rotar en el baño de agua, el cual no debía tener una temperatura mayor de 40 °C, este procedimiento se realizó hasta que destiló todo el disolvente y quedó únicamente la materia vegetal, la cual se colocó en una caja de petri previamente tarada. Se realizó el mismo procedimiento para el extracto etanólico con la única diferencia que el baño de agua del rotavapor se mantuvo a una temperatura de 45 °C.

-Ambos extractos se colocaron en desecadora para su desecación final (6) y se calcularon los porcentajes de rendimiento (Anexo 1).

3. Preparación de extractos acuosos (liofilizados):

-Los extractos acuosos obtenidos se distribuyeron en alícuotas de 100 ml en erlenmeyers pyrex de 250 ml con tapón de rosca.

-Ya fríos se congelaron por 24 h en la cámara de precongelamiento del liofilizador a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

-Los extractos acuosos congelados se colocaron en la cámara liofilizadora por 48 h a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

-Se calcularon los porcentajes de rendimiento y se almacenaron los liofilizados en viales de fondo plano (Anexo 2 y 3).

4. Disolución de extractos:

-Los extractos obtenidos se disolvieron en un volumen de medio LIT modificado (con solución de eritrocitos hemolisados al 5%) carente de Suero Bovino Fetal (SBF), los cuales fueron filtrados a través de filtros Millipore de $0.2\text{ }\mu\text{m}$; y luego se les añadió un volumen igual de medio LIT modificado completo al 20% de SBF, obteniendo de esta manera una concentración final de 2 mg/ml en medio LIT modificado completo al 10%.

-Se utilizó DMSO para la disolución de los extractos diclorometánicos (45).

5. Tamizaje tripanocida *in vitro*:

-Se preparó medio de cultivo líquido LIT modificado completo al 10% para mantener la cepa Tulahuén de *T. cruzi* (Anexo 4).

a. Preparación del inóculo:

-Se utilizó la fase exponencial de los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa caracterizada Tulahuén a una concentración de 5×10^5 parásitos/ml.

-Dicha concentración se estandarizó por medio del recuento de parásitos en cámara de Neubauer (94,95).

-Se hicieron los cálculos necesarios para poder dispensar en la microplaca de poliestireno la cantidad en μl de medio de cultivo necesarios para el ensayo.

-Se procedió a centrifugar dicho volumen a 3,000 RPM por 10 min a 14°C .

-Se descartó el sobrenadante y se agregó al sedimento un volumen igual de medio LIT completo al 10% para resuspender los parásitos y llevarlos a la concentración adecuada para el ensayo.

b. Inoculación de placas:

-Para facilitar la distribución volumétrica adecuada de la suspensión de epimastigotes (100 μl) en las placas de poliestireno, se colocó el medio de

cultivo en un depósito plástico de reactivos para micropipetas multicanal con capacidad de 20 ml.

-Dicho volumen se distribuyó utilizando una micropipeta multicanal de volumen graduable (40-200 μ l) en las microplacas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos.

-Los diferentes extractos y controles se inocularon (100 μ l) utilizando una pipeta Multipette 4780 marca eppendorf, el cual es un dispensador manual para la dosificación en serie de volúmenes variables (100-500 μ l); lo cual facilita la dosificación reduciendo el tiempo de trabajo.

-Se realizaron recuentos de epimastigotes en medio de cultivo de corrimientos paralelos a los ensayos para asegurar la distribución homogénea del inóculo.

-Los ensayos se realizaron completamente al azar en microplacas de poliestireno de fondo plano estériles de 96 pozos con tapadera hermética y se incubaron por 48 horas a 26°C (28).

Cada ensayo consistió de 5 grupos por planta: extractos y controles positivo y negativo (Anexo 5).

-Se hicieron 6 repeticiones de todo el ensayo.

c. Tiempo de lectura:

-Se hizo una observación a los 10 minutos y a la hora del enfrentamiento droga-parásito para evitar cualquier efecto tóxico, utilizando un microscopio invertido, evitando el manipuleo y contaminación del ensayo.

-También se hizo una observación del ensayo a las 24 h utilizando microscopio invertido.

-Las placas se homogenizaron en un rotador eléctrico por 10 minutos a temperatura ambiente previo a su incubación y a la lectura del ensayo (33).

-La lectura del ensayo se realizó a las 48 h utilizando microscopio binocular.

d. Medición e interpretación del efecto tripanocida:

-Se estandarizó el bioensayo para determinar la actividad tripanocida contra epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuén, usando controles positivo y negativo.

-Se evaluó la actividad tripanocida mediante el recuento de parásitos vivos en cámara de Neubauer (45,94,95).

e. Evaluación del mejor disolvente:

-Utilizar técnica descrita en el tamizaje (p. 54-56).

D. Diseño experimental:

El diseño experimental se realizó totalmente al azar con 5 tratamientos por planta. Los tratamientos fueron: medio de cultivo sin extracto disuelto como control negativo, violeta de genciana disuelta en medio LIT como control positivo, LIT con extracto diclorometánico, LIT con extracto etanólico al 80% y LIT con extracto acuoso.

El número de repeticiones fue de 6 por tratamiento con un α de 0.05 y un β de 0.1 y con un límite de error igual a dos desviaciones estándar.

El análisis estadístico se realizó por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, al existir diferencia significativa entre los tratamientos se hicieron comparaciones múltiples no paramétricas de los diferentes tratamientos contra el control negativo de su ensayo correspondiente.

VIII. RESULTADOS

La diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) encontrada entre el control positivo y el control negativo de cada ensayo mediante las comparaciones múltiples no paramétricas, validaron la estandarización de la metodología rápida de tamizaje *in vitro* la cual permite evaluar el efecto tripanocida (Anexo 6 y 7).

Al realizar la lectura del ensayo a las 48 h se obtuvieron los siguientes resultados (Anexo 8):

A. Actividad de *Acalypha guatemalensis*:

En la tabla del Anexo 8 se puede observar el recuento de parásitos vivos de *T. cruzi* a las 48 h de los diferentes tratamientos y controles. El grupo control negativo muestra una mediana de 560×10^4 p/ml, el positivo (violeta de genciana) una mediana de 0 p/ml, el extracto diclorometánico una mediana de 536×10^4 p/ml, el extracto etanólico una mediana de 265.5×10^4 p/ml y el acuoso de 508×10^4 p/ml.

Al realizar el análisis estadístico de los resultados por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis se comprobó que existía diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Se hicieron comparaciones múltiples no paramétricas de los tratamientos contra el control negativo del ensayo correspondiente, demostrándose que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el control positivo y el control negativo; y entre el tratamiento etanólico y el control negativo.

No se comprobó que existiera alguna diferencia estadísticamente significativa entre el extracto diclorometánico y el control negativo y el extracto acuoso y el control negativo (Anexo 9).

Así mismo se efectuó otro ensayo en el cual se evaluó el efecto del extracto etanólico de *A. guatemalensis* a dosis de 4,000, 2,000 y 1,000 µg/ml. A través del análisis estadístico de los resultados por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis se demostró que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Posteriormente se realizaron comparaciones múltiples no paramétricas de los tratamientos contra el control negativo del ensayo, con las cuales se comprobó que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre el extracto a dosis de 4,000 µg/ml y el control negativo, entre el extracto a dosis de 2,000 µg/ml y el control negativo y entre el extracto a dosis de 1,000 µg/ml y el control negativo (Anexo 10 y 11).

B. Actividad de *Croton guatemalensis*:

En el Anexo 8 se puede observar el recuento de parásitos vivos de *T. cruzi* a las 48 h de los diferentes tratamientos y controles.

El control negativo (medio LIT completo al 10%) muestra una mediana de 488×10^4 p/ml, el control positivo (violeta de genciana) muestra una mediana de 0 p/ml, el extracto diclorometánico 476×10^4 p/ml, el extracto etanólico 444×10^4 p/ml y el acuoso de 396×10^4 p/ml.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, se comprobó que existía diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Al realizar las comparaciones múltiples no paramétricas de los tratamientos contra el control negativo, se demostró que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el control positivo y el control negativo. No se comprobó que existiera alguna diferencia entre el extracto diclorometánico y el control negativo, el extracto etanólico y el control negativo y entre el extracto acuoso y el control negativo (Anexo 12).

C. Actividad de *Jatropha curcas*:

En el Anexo 8 se puede observar el recuento de parásitos vivos de *T. cruzi*, a las 48 h de los controles positivos y negativos y de los diferentes tratamientos. El control negativo muestra una mediana de 380×10^4 p/ml, el control positivo muestra una mediana de 0 p/ml, el extracto diclorometánico una de 412×10^4 p/ml, el etanólico de 520×10^4 p/ml y el acuoso de 464×10^4 p/ml.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados por medio de la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, se comprobó que existía diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Al realizar las comparaciones múltiples no paramétricas de los tratamientos contra el control negativo, se demostró que únicamente existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el control positivo y el negativo. No se comprobó que existiera alguna diferencia entre los extractos diclorometánicos, etanólicos y acuosos y el control negativo respectivamente (Anexo 13).

IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Existe una gran necesidad de descubrir nuevas drogas para combatir los estadios tempranos de la infección por *T. cruzi* puesto que las drogas de uso clínico no están disponibles para la población en general debido a su alto costo y difícil acceso, dudosa efectividad y rechazo al tratamiento prolongado; y ya que el tamizaje de plantas medicinales, aprovechando el conocimiento nativo reduce los ensayos empíricos al azar y no productivos, en la presente investigación se evaluó cuantitativamente el efecto de tres extractos de tres plantas de la familia Euphorbiaceae de uso medicinal en Guatemala (*A. guatemalensis*, *C. guatemalensis* y *J. curcas*) para determinar si al menos una de ellas poseía efecto tripanocida *in vitro*.

Para el efecto se estandarizó una metodología rápida de tamizaje *in vitro* a tiempo fijo y empleando una sola dosis, usando epimastigotes de *T. cruzi* en microplacas de poliestireno y lectura microscópica visual; en donde la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) encontrada entre el control positivo y el control negativo de los ensayos mediante las comparaciones múltiples no paramétricas, validaron su estandarización, permitiendo evaluar el efecto tripanocida (Anexo 6 y 7).

Cada ensayo consistió de 5 grupos por planta: extractos, controles positivo (Violeta de genciana a una concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$) y negativo (sólo medio de cultivo). Se hicieron 6 repeticiones de todo el ensayo. El efecto de las plantas se midió a las 48 h mediante el recuento de parásitos vivos en cámara de Neubauer, comparando cada extracto con el control negativo de su ensayo correspondiente.

Acalypha guatemalensis la decocción de las flores secas o frescas es aplicada en inflamaciones, infecciones y heridas de la piel y las mucosas tales como llagas, granos, verrugas, callos y heridas, también se le atribuyen propiedades antisépticas, desinflamantes y diuréticas (54-56). El cocimiento de la raíz, tallo y hojas es utilizada en las afecciones gastrointestinales para el tratamiento de diarrea, amebiasis, dolor de estómago, gastritis y disentería amebiana (55,56).

Los extractos diclorometánicos y acuosos no mostraron actividad alguna a dosis de 1,000 µg/ml, únicamente el extracto etanólico de esta planta mostró tener efecto tripanostático contra la cepa Tulahuén de *T. cruzi* a una dosis de 1,000 µg/ml, en la cual se observó una disminución significativa del recuento de parásitos vivos ($p < 0.05$).

Para establecer si lo anterior podía atribuirse a que el efecto estaba siendo observado a una concentración muy baja para ser tripanocida, en el caso del extracto etanólico de *A. guatemalensis* (el único extracto que mostró efecto tripanostático), se efectuó otro ensayo en el cual se evaluó el efecto de dicho extracto a dosis de 4,000, 2,000 y 1,000 µg/ml utilizando la misma metodología.

El análisis estadístico de este último ensayo demostró que hubo diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el control positivo y el control negativo lo cual valida el diseño experimental. Sin embargo dado que la respuesta con la Violeta de genciana fue extrema obteniéndose cero en todos los recuentos (Anexo 10) el análisis estadístico se repitió eliminando ese grupo (ya que el control positivo sirve únicamente para validar el ensayo y que la respuesta tan marcada de la Violeta de genciana no permitía visualizar el efecto

de los otros tratamientos) con el fin de establecer si las tres dosis del extracto etanólico eran diferentes al control negativo (Anexo 11).

Al comparar los diferentes tratamientos contra el control negativo de su ensayo correspondiente, se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre ellos, demostrándose de nuevo un efecto tripanostático a dosis de 1,000 $\mu\text{g/ml}$ y obteniéndose únicamente un efecto tripanostático a dosis de 4,000 y 2,000 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.05$). El mayor efecto tripanostático se observó a la dosis de 4,000 $\mu\text{g/ml}$ aunque no se obtuvo un efecto dosis-respuesta marcado.

La corteza de *Croton guatemalensis* es aplicada de varias formas: para curar dolores de estómago, gas, toda clase de heridas y llagas, contra la erisipela y la sarna; como tratamiento de inflamaciones y dolores reumáticos, como antidiarreico y diurético. En México y en Guatemala, la decocción de la corteza amarga es tomada como remedio para la fiebre intermitente y la decocción de las hojas es tomada contra la malaria (54,60,70).

El extracto acuoso de la corteza de *C. guatemalensis* mostró acción esquizontocida en estudios de actividad *in vitro* contra la cepa K 173 de *Plasmodium berghei* (71).

Los resultados obtenidos indican que los diferentes extractos de *C. guatemalensis* no poseen actividad alguna contra la cepa Tulahuén de *T. cruzi* a una dosis de 1,000 $\mu\text{g/ml}$.

Únicamente se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el control positivo y el control negativo, lo cual valida el ensayo.

Las hojas de *Jatropha curcas* son utilizadas como cataplasmas en la erisipela, el eczema y sobre el abdomen para mitigar el dolor del bazo (esplenosis) y frescas se utilizan en las heridas, quemaduras de sol y quemaduras en general. Su decocción es utilizada como antineurálgico contra la inflamación, el reumatismo, como tónico y contra las hemorroides; en casos de fiebre y catarros, sobre úlceras, lepra, para la artritis y aplicable a tumores duros. Las hojas son consideradas como antiparasitarias aplicables a la sarcoptiosis y su decocción se toma como tratamiento para las enfermedades venéreas y la gonorrea. En las afecciones gastrointestinales, las hojas se usan para aliviar la acidez, para tratar el estreñimiento, diarrea, disenteria y parásitos intestinales (54,55,76,79-82).

El látex se utiliza como cicatrizante, para las verrugas vulgares, el asma, dientes flojos, aliviar dolor de muelas y para la candidosis bucal, herpes y lepra; como purgante, para las hemorroides, úlceras, estreñimiento y cólicos. Las semillas son ampliamente tomadas como purgante y administradas como vermífugo (antihelmíntico) en Centro América. Las flores, al igual que las hojas, son utilizadas para enfermedades venéreas (sífilis y gonorrea especialmente) y para el paludismo (52-56,75,76,79,81-83,90).

Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el control positivo y el control negativo validando el ensayo. Los resultados obtenidos de los diferentes extractos de *J. curcas* indican que no existe actividad alguna en ningún extracto de estas plantas contra la cepa Tulahuén de *T. cruzi* a una dosis de 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Lo anterior no significa que *C. guatemalensis* y *J. curcas* no posean actividad contra el *T. cruzi*. Los resultados obtenidos pueden deberse a que la dosis empleada no es la adecuada para evidenciar el efecto

tripanostático o tripanocida; o bien que el principio activo no es extraíble por ninguno de los disolventes utilizados.

De los 3 disolventes utilizados el único que extrajo la actividad antiprotozoárica fue el etanólico de *A. guatemalensis* mostrando actividad tripanostática.

En los ensayos realizados en la presente investigación fue posible estandarizar una metodología de tamizaje *in vitro* para determinar cuantitativamente la actividad tripanocida vegetal a tiempo fijo; sin embargo, bajo las condiciones experimentales empleadas, no se pudo evaluar el efecto tripanocida *in vitro* de por lo menos una de las tres Euforbiaceas del estudio.

Únicamente se demostró el efecto tripanostático de una de ellas; ya que la diferencia estadísticamente significativa estuvo dada por la disminución en el recuento de parásitos vivos (efecto tripanostático) y no por el aumento de parásitos muertos (efecto tripanocida). El recuento de los parásitos muertos observado fue similar al obtenido en el control negativo, sugiriendo que dicha disminución es dada por muerte natural.

Si bien únicamente uno de los extractos de las plantas presentó actividad tripanostática a diferentes dosis, es importante mencionar que las plantas que no tienen actividad podrían tener propiedades farmacológicas relacionadas con otras afecciones protozoáricas, así como también propiedades antiinflamatorias, analgésicas u otros mecanismos que pueden ayudar en el tratamiento sintomático de ésta u otras parasitosis.

Es importante hacer ver que vale la pena proseguir con los estudios mencionados anteriormente ya que se ha demostrado que la actividad *in vitro* de drogas contra la forma epimastigota del parásito correlaciona bien con la actividad *in vivo* contra la forma sanguínea (tripomastigota) en el hospedero mamífero (25). Además el hallazgo de extractos con actividad tripanocida puede jugar un papel importante en la quimioterapia pudiendo ésta constituirse en una alternativa de tratamiento para las drogas sintéticas o bien en la elucidación de estructuras potencialmente activas para su síntesis química y modificaciones moleculares más eficaces. Y de esta manera validar científicamente el uso tradicional de dichas plantas en Guatemala contra la enfermedad de Chagas u otras parasitosis; o bien contra cualquier otro tipo de afección, infección o infestación.

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca

X. CONCLUSIONES

1. La metodología rápida de tamizaje *in vitro* a tiempo fijo, empleando una sola dosis, usando cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén en microplacas de poliestireno y lectura microscópica visual, permite evaluar cuantitativamente el efecto tripanocida de plantas medicinales.
2. El extracto etanólico de *A. guatemalensis* tiene actividad tripanostática *in vitro* a dosis de 4,000, 2,000 y 1,000 µg/ml.
3. Los diferentes extractos de *C. guatemalensis* y *J. curcas* no tienen ningún efecto sobre *T. cruzi* a dosis de 1,000 µg/ml.
4. El único disolvente orgánico que extrajo la actividad tripanostática fue el etanol.

XI. RECOMENDACIONES

1. Establecer la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de *A. guatemalensis*.
2. Realizar estudios experimentales *in vivo* para evaluar la actividad antiprotozoárica del extracto etanólico de *A. guatemalensis*.
3. Determinar la actividad antiprotozoárica *in vitro* e *in vivo* del extracto etanólico de *A. guatemalensis* contra otras cepas de *T. cruzi*.
4. Efectuar estudios de toxicidad *in vitro* e *in vivo* del extracto vegetal que presentó actividad.
5. Estudiar otras acciones farmacológicas que puedan poseer las plantas estudiadas mediante modelos *in vitro* y/o *in vivo* que permitan realizar luego estudios preclínicos y clínicos que validen científicamente su uso popular.
6. Realizar estudios farmacognósticos del extracto que mostró actividad para aislar el principio activo y elucidar la estructura química responsable de la actividad.
7. Continuar con el estudio de estas y otras plantas medicinales de la flora guatemalteca que pueden constituir una alternativa para las drogas sintéticas (eficacia terapéutica y menores efectos adversos) o para la elucidación de estructuras potencialmente activas para su síntesis química y modificaciones moleculares más eficaces.

XII. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Control de la enfermedad de Chagas. Bol Epid OPS 1991; 811:5-9.
2. Alves TMA, *et al*. A Diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med* 1995;61:85-87.
3. Pinto JC. Cardiopatías Chagásicas: mito y desafío. *Arch Inst Cardiol Méx.* 1990; 60:119-120.
4. Werbovets KA, *et al*. Treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr Op Inf Dis* 1992;5:840-848.
5. McCabe RE, Araujo FG, Remington J. Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. *Am J Trop Med Hyg.* 1988;5:960-962.
6. Maki J, Cáceres A. Preliminary studies on the effects of plant-origin drugs against parasites, especially *Trypanosoma cruzi* in Guatemala. Internal Report to JICA. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 1993. 28 p. (p. 8, 20-28).
7. Rodinelli E, *et al*. *Trypanosoma cruzi* An *in vitro* cycle of cell differentiation in axenic culture. *Exp Parasitol* 1988;66:197-204.

8. Memorias del VI Seminario-Taller, Laboratorios Nacionales. VIH/SIDA y Bancos de Sangre. Dirección General de Servicios de Salud. Guatemala. 1993. 18p. (p. 2-5).
9. Tizard I. Immunology and Pathogenesis of Trypanosomiasis. Florida: CRC Press Inc. 1985. 237p. (p. 145-149).
10. Lam R, *et al* Determinación del grado de infestación de *Trypanosoma cruzi* en las heces fecales de treatomas de áreas endémicas de la enfermedad de Chagas. Informe final curso de Investigación II, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 1992. 60p. (p. 3,12,15-18).
11. Aguilar FJ. Parasitología Médica. Guatemala: Litografía delgado, 1987. 366p. (p. 250-261).
12. Reporte de la Segunda Unidad del Trabajo Multidisciplinario sobre la caracterización clínica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, 1993. 8p. (p. 2-6).
13. World Health Organization (W.H.O) Chagas disease, frequency and geographical distribution. Weekly Epidemiological Record, 1990. 470 p. (p 257-261).

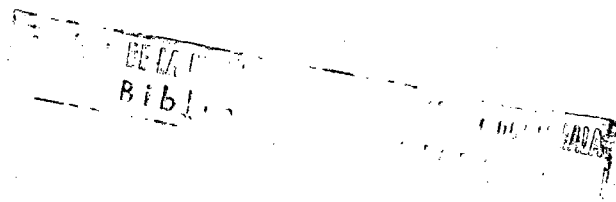
14. Argueta J, *et al*. Asociación de anomalías electrocardiográficas con seropositividad para *T. cruzi* en un área rural endémica de Guatemala. *Enfermedades Tropicales en Guatemala* 95. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Informe Anual No. 4 (GJET-86) del Proyecto de Cooperación Guatemala-Japón para la Investigación de Enfermedades Tropicales, 1995. 215p. (p. 73-76).
15. Peñalver, LM. Estado actual de la enfermedad de Chagas en Guatemala. *Rev Col Med Guatemala* 1953;4:294-308.
16. De León JR. Epidemiología de las tripanosomiasis americanas en Guatemala. *Rev Col Med Guatemala*. 1956;5:52-56.
17. Velásquez E, *et al* Cambios electrocardiográficos en habitantes de un área endémica para la enfermedad de chagas en Guatemala. *Enfermedades Tropicales en Guatemala* 93. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Informe Anual No. 2 (GJET-11) del Proyecto de Cooperación Guatemala-Japón para la Investigación de Enfermedades Tropicales 1993. 150p. (p. 82-89).
18. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Dirección General de Servicios de Salud. División de Vigilancia y Control de Enfermedades. República de Guatemala, C.A. *Bol Epid Nac* Vol No. 8. 1993. 68p. (p. 48-53).

19. Behar AL *et al.* Estado actual de la enfermedad de Chagas en población de area endémica. Estudio epidemiológico y clínico. Guatemala: Asociación Guatemalteca de Parasitología Médica y Tropical. 1991;6:69-79.
20. Fournet A, *et al.* Activité antiparasitaire d'alcaloïdes disbenzylisoquinoléiques. II: activité *in vitro* sur des epimastigotes de trois souches typifiées de *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol.* 1988;24:337-343.
21. Katzin AM, *et al.* Rifampicin activity against *T. cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. Suppl II.* 1989;84:107. QT-14.
22. Cavin JC, Krassner ST, Rodríguez E. Plant-derived alkaloids active against *T. cruzi*. *J Ethnopharmacol* 1987;19:89-94.
23. Aldunate J, *et al.* Effects of hydroquinones on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol.* 1992;0:1-4.
24. Rodriguez R, *et al.* Inhibition of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth in culture by naphthoquinone derivatives. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. Suppl II.* 1989;84:102. QT-3.
25. Wright CW, Phillipson JD. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 1990;4:127-139.
26. Schlemper BR, Chiari E, Brener Z. Growth-inhibition drug test with *Trypanosoma cruzi* culture forms. *J Protozool.* 1977;24:544-547.

27. Letelier ME, *et al* Prevention of Transfusion-induced Chagas' disease by antioxidant phenolic compounds. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro. Suppl II*. 1989; 84:106 QT-11.
28. Hocquemiller R, *et al*. Isolement et synthese de l'espintanol, nouveau monoterpene antiparasitaire. *J Nat Prod*. 1991;54:445-452.
29. Castro C, Jimenez M, Gonzalez M. Inhibitory effect of Piquerol A on the growth of epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med*. 1992;58:281-282.
30. Fournet A, *et al* Antiprotozoal activity of Dehydrozaluzanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae). *Phytother Res* 1993;7:111-115.
31. Zani CL, *et al* Trypanocidal components of *Pluchea quitoc* L. *Phytother Res* 1994;8:375-377.
32. Schmeda-Hirschmann G, *et al* Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabellii*. *Phytother Res* 1996;10:375-378.
33. de Arias AR, *et al*. Trypanocidal activity of natural products against blood trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Am Rep. IICS*. 1991; 0:121-135.

34. Marr JJ, *et al* Biological action of inosine analogs in *Leishmania* and *Trypanosoma* spp. *Antimicrob Ag and Chemother*. 1984;25(2):292-295.
35. Hammond DJ, Hogg J, Gutteridge WE. *Trypanosoma cruzi* possible control of parasite transmission by blood transfusion using amphiphilic cationic drugs. *Exp Parasitol*. 1985;60:32-42.
36. Hammond DJ, Cover B, Gutteridge WE. A novel series of chemical structures active *in vitro* against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg*. 1984;78:91-95.
37. Pinto AV, *et al*. Activity of some naphthoquinones on blood stream forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg*. 1987;81:609-610.
38. Hammond DJ, *et al*. A strategy for the prevention of the transmission of Chagas' disease during blood transfusion. *Act Trop*. 1986;43:367-378.
39. Cover B, Guttridge WE. A primary screen for drugs to prevent transmission of Chagas's disease during blood transfusion. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 1982; 76:633-635.
40. Katzin AM, *et al*. Rifampicin activity against *T. cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Suppl*. 1987;82:178. QT-15.
41. Chiari E, *et al* Trypanocidal effect of 15-deoxygoyazensolide against blood forms of *Trypanosoma cruzi in vitro*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Suppl II*. 1989; 84:106 QT-12.

42. Chiari E, *et al* Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1991;85:372-374.
43. Thyler VE, Brady LR, Robbers JE. Pharmacognosy. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988. 519p. (p. 204).
44. Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitol Today* 1994;10:65-68.
45. Fournet A, Barrios AA, Muñoz V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1994;41:19-37.
46. Higashi KO, de Castro SL. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *J Ethnopharmacol* 1994;43:149-155.
47. Cardoso JE, Ghezzi Z, Lopes JLC. Actividade *in vitro* dos extractos das plantas *Vernonia* sp. e *Eupatorium* sp. contra formas sanguineas da cepa Y Do *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro Suppl* 1987;82:178 QT-16.
48. González J. *et al*. *In vitro* activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Phytother Res* 1990;4:1-4.



49. Belda Neto FM, *et al* Estudio da atividade do extrato do embrião e cotilédones de *Cinnamomum glaziovii* (Mez.) sobre formas sanguícolas do *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Suppl. II.* 1989;84:107. QT-13.
50. Fournet A, *et al*. Biological and chemical studies of *Pera benensis* a bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Ethnopharmacol.* 1992;37:159-164.
51. Cronquist A. Introducción a la Botánica. México: Continental S.A., 1981. 848p. (p. 666-667).
52. Stanley PC, Steyermark JA. Flora of Guatemala. Chicago: *Fieldiana Botany.* Vols 24; 6, 1949. 440p. (p. 25,26,35,72,73,127,128).
53. Cáceres, *et al* Plantas de uso medicinal en Guatemala: I. Detección etnobotánica y bibliográfica. *Rev. USAC* 1991;9:55-77.
54. Morton JF. Atlas of Medical Plants of Middle America: Bahamas to Yucatán. USA: Charles C. Thomas Publisher, 1981. 1420p. (p. 422, 436, 448,449).
55. Cáceres A, Samayoa B. Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Guatemala: Dirección General de Investigación, USAC. Cuaderno de Investigación No.6-89., 1989. 138p. (p. 18,19, 63,64,81,82).

56. Ronquillo FA, *et al.* Colecta y descripción de especies vegetales de uso actual y potencial en alimentación y/o medicina, de las zonas semiáridas del Nororiente de Guatemala. Guatemala: Dirección General de Investigación, USAC., 1986. 249p. (p. 122,123,167-170).
57. Girón LM., *et al* Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the caribs of Guatemala. *J Ethnopharmacol* 1991;34(263):173-187.
58. Dieseldorff EP. Las plantas medicinales del departamento de Alta Verapaz. Guatemala: Tipografía Nacional, 1977. 52p. (p. 39).
59. House P, Lagos-Witte S. Manual popular de 50 plantas medicinales de Honduras. Tegucigalpa, Honduras: Litografía López, S de R.L., 1989. 134p. (p. 23-26).
60. Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. 6ed. México, D.F: Ed. Botas, 1992. 656p. (p.164,165).
61. Cáceres A, *et al* Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory disease. I screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *J Ethnopharmacol* 1991;31(2):193-208.
62. Oliva AM. Recopilación botánica y análisis químico cuantitativo de algunas especies de plantas medicinales de Guatemala. Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1979. 63p.

63. Cáceres A, Samayoa B. Actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de infecciones. Guatemala: Dirección General de Investigación, USAC. Cuaderno de Investigación No. 4-90., 1990. 100p. (p. 47,48).
64. Cáceres A, *et al* Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *J Ethnopharmacol* 1987;20(3):223-237.
65. Cáceres A, *et al* Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. I: Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *J Ethnopharmacol* 1991;31(3):263-276.
66. Cáceres A, *et al* Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. I: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. *J Ethnopharmacol* 1991;33(3):277-283.
67. Cáceres A, *et al* Diuretic activity of plants used for treatment of urinary ailments in Guatemala. *J Ethnopharmacol* 1987;19(3):233-245.
68. Chapius JC, *et al* Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 1988;23(2/3):273-284.
69. Grijalva EB. Contribución al estudio farmacológico y toxicológico de *Croton guatemalensis* (Copalchí) como hipoglucemiante. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1990. 58p. (p. 42,43).

70. Cámbar PJ. Inventario sobre las plantas medicinales de Honduras. Tegucigalpa D.C: Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Dirección de Investigación Científica, 1984. 206p. (p. 87,85,90,100-103,108,123, 127,130).
71. Medinilla B. Evaluación farmacológica y toxicológica *in vitro* de algunas plantas comunmente empleadas en Guatemala contra la malaria. *Rev Cient Fac Ciencias Quím y Farm.* 1993;(1):7-10.
72. Hernández J, Delgado G. Terpenoids from aerial parts of *Croton draco* *Fitoter.* 1992;63(4):377-378.
73. Méndez EJ. Estandarización de métodos por cromatografía en capa fina para la identificación de plantas antimaláricas comunmente usadas en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia), 1992. 46p. (p.7,35,36).
74. Cabrera LG. Plantas curativas de México. Sed. México D.F.: Cicerón, 1958. 384p. (p.58).
75. Cordero AB. Manual de Medicina Doméstica. Plantas Medicinales Dominicanas. 2 ed. Sto. Domingo, Rep. Dominicana: Editora Taller, C. por A., Isabel la Católica, 1977. 490p. (p.160,161).

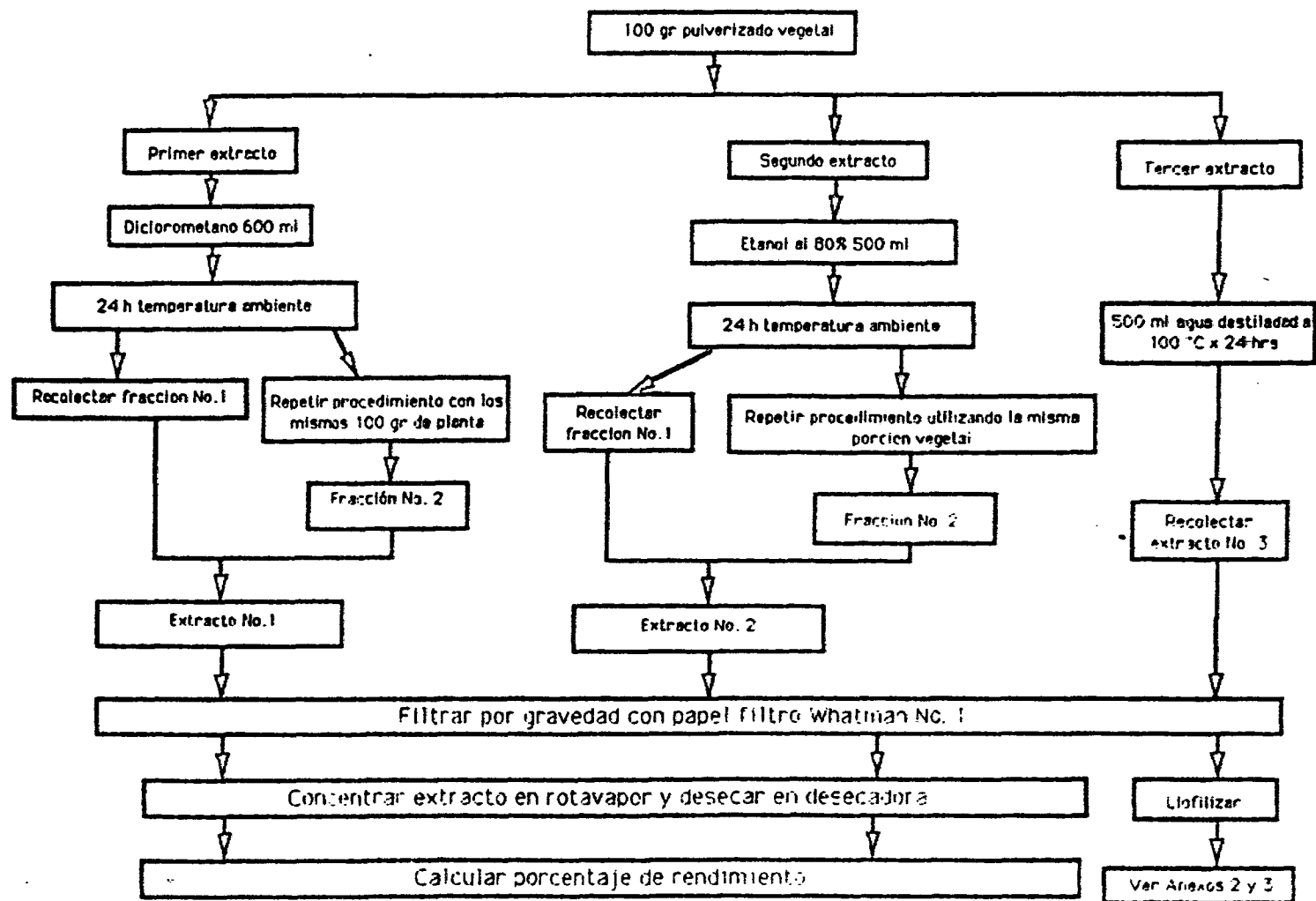
76. Orellana S. Indian Medicine in Highland Guatemala. The Pre-hispanic and colonial periods. Albuquerque: University of New México Press, U.S.A., 1987. 308 p. (p. 213).
77. Weninger B, Robineau L. Elementos para una Farmacopea Caribeña. Investigación científica y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. Seminario Tramil 3. La Habana, Cuba: Ministerio de Salud Pública, 1988. 318p. (p. 149-152).
78. Martínez M. Plantas Útiles de la Flora Mexicana. 5 ed. México D.F.: Botas, 1959. 621p. (p.485,486).
79. Duke J.A. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Ratón: CRC Press., 1985. 389p. (p.253,254).
80. Bonelly IC, Vásquez TM, Tercero D. Aspectos químicos y usos nativos de plantas en la medicina folklórica dominicana. Estudio Bibliográfico. Universidad Autónoma de Sto. Domingo, Facultad de Ciencias. CIBIMA. Sto. Domingo, Rep. Dominicana: CENAPEC, 1985. 64p. (p. 38).
81. Alcorn JB. Huastec-Mayan Ethnobotany. U.S.A: Universidad de Texas Press, 1984. Tomo IX. + 982 p. (p. 531, 681).
82. Duke JA. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Ratón: CRC Press Inc. 1984. 300 p. (p. 253-254).

83. Marroquín AE. Ensayo clínico de *J. curcas* en el tratamiento de verrugas en vulgares en el Centro de Salud del Departamento de Chiquimula. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala (tesis de graduación, Facultad de Medicina), 1991. 63p. (p. 28-30).
84. Samuelsson G, *et al*. Inventory of plants used in traditional medicine in Somalia. II Plants of the families *Combustreae* to *Labiatae*. *J Ethnopharmacol*. 1992;37(p. 59-61).
85. Horsten STAJ. Cyclic peptides in the genus *Jatropha* (*Euphorbiaceae*). Utrecht: Universiteit Utrecht, 1995. 239p. (p. 121-134).
86. Escobar N. Flora tóxica de Panamá. Panamá: Ed. Universitaria, 1972. (p.107-109).
87. Weninger B, Robineau L. Investigaciones científicas y uso popular de plantas medicinales en el Caribe. Sto. Domingo (Seminario) Tramil 2. Sto. Domingo: Universidad Autónoma de Sto. Domingo, Facultad de Ciencias CIBIMA, 1986. 255p. (p.114-117).
88. Glasby JS. Dictionary of plants containing secondary metabolites. London: Taylor & Francis, 1991. (p. 177).
89. Cáceres, *et al*. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. I Screening of 84 plants against enterobacteria. *J Ethnopharmacol* 1990;30(1):55-73.

90. Marroquín E, *et al* Ensayo clínico de *Jatropha curcas* en el tratamiento de verrugas vulgares. Guatemala: I Congreso Nacional del Colegio de Farmacéuticos y Químicos de Guatemala. Libro de Resúmenes, 1994. 231p. (p. 222)
91. Ubillas R, et al. SP-303, an antiviral oligomeric proanthocyanidin from latex of *Croton lechleri* (Sangre de Drago). *Phytomed* 1994;1:77-106.
92. Grainge M, Ahmed S. Handbook of plants with pest-control properties. New York: John Wiley & Sons. 1988 (p.157).
93. Okanla EO, Owoyale JA, Akinyanju JA. Trypanocidal effect of an aqueous extract of *Acalypha hispida* leaves. *J Ethnopharm*. 1990;29:233-237.
94. Owalabi OA, *et al* Trypanocidal potentials of african woody plants: *In vitro* trial of *Khaya grandifoliola* seed extracts against *Trypanosoma brucei brucei*. *J Ethnopharm*. 1990;30:227-231.
95. Cáceres A, *et al* Actividad antiparasitaria de plantas de uso medicinal en Guatemala. Enfermedades Tropicales en Guatemala 93. Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). Informe Anual No. 2 (GJET-22) del Proyecto de Cooperación Guatemala-Japón para la Investigación de Enfermedades Tropicales, 1993. 150p. (p.140-143).

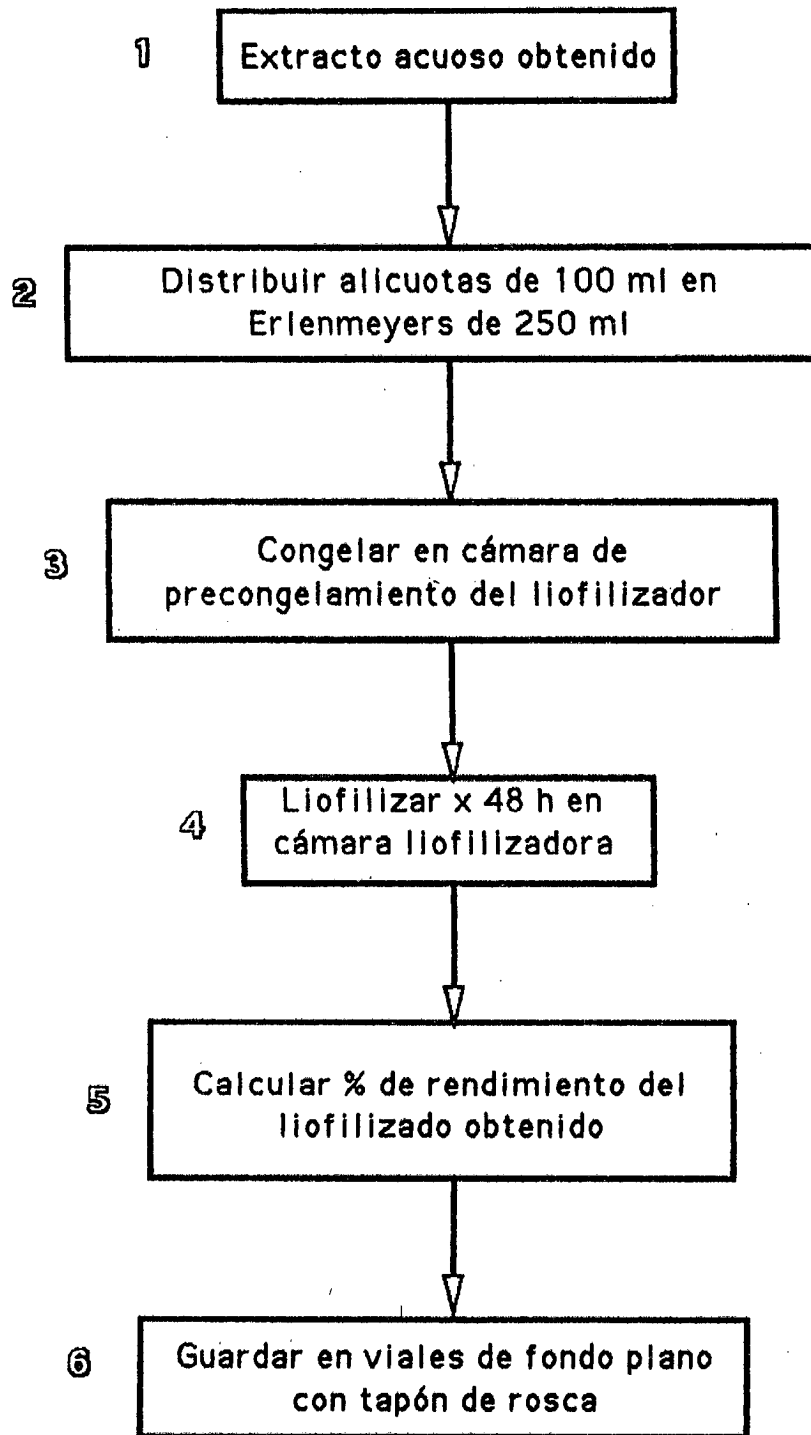
XIII. ANEXOS

ANEXO I
PREPARACION DEL EXTRACTO DE CADA PLANTA



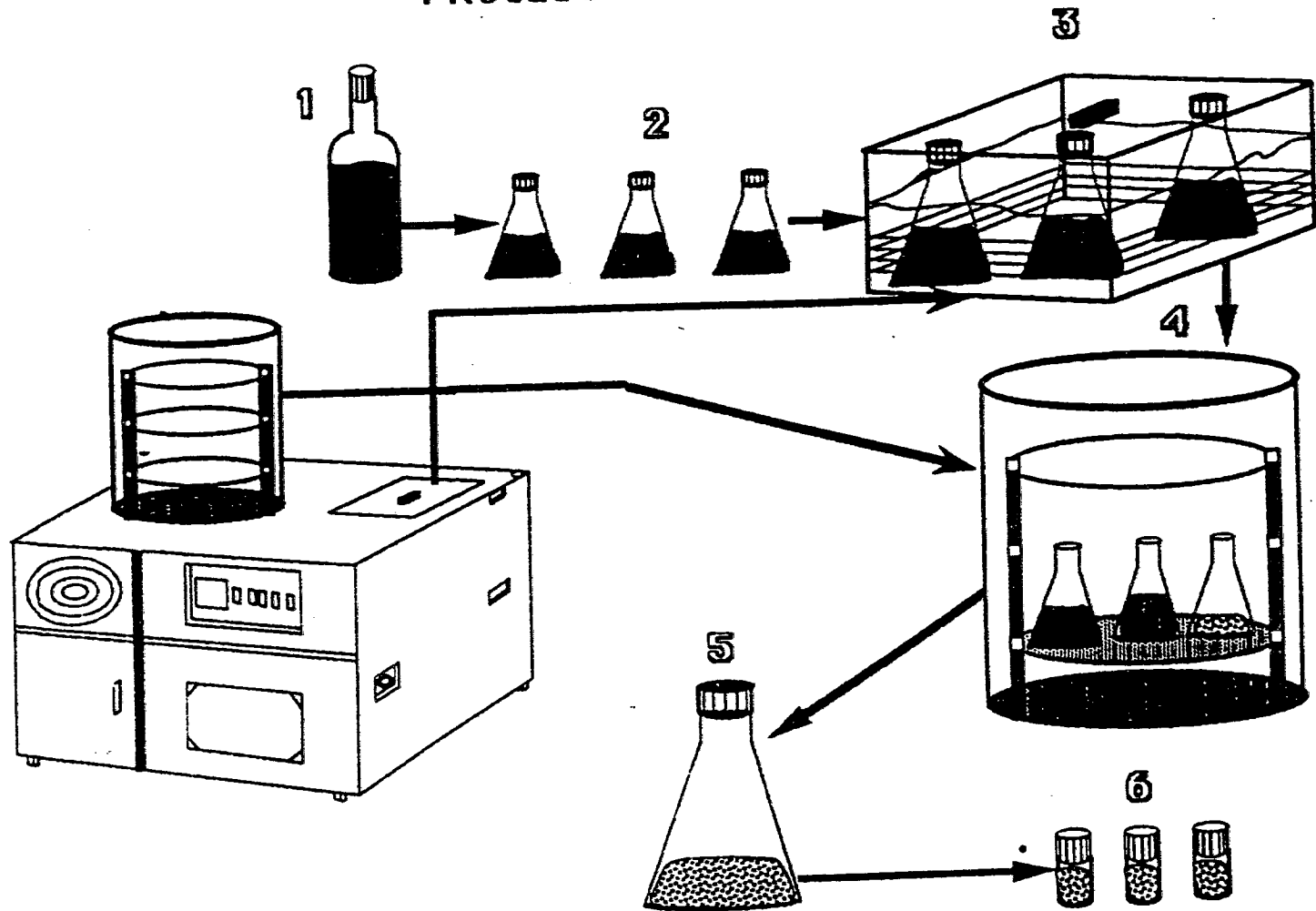
ANEXO 2

PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS (Liofilizados)



ANEXO 3.

PROCESO DE LIOFILIZADO



ANEXO 4

Preparación del medio de cultivo:

- 1 Agregar 4.0 g de cloruro de sodio, 0.4 g de cloruro de potasio, 20.2 g de fosfato ácido disódico pentahidratado, 2.2 g de glucosa monohidratada, 5.0 g de triptosa y 3.0 g de caldo de infusión de hígado a 890 ml de agua destilada.

- 2 Calentar por 30 minutos a 65°C, dispensar la solución en dos recipientes con capacidad de 600ml, esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y efectuar control de esterilidad.

- 3 Completar cada botella con 5.0 ml de solución de eritrocitos hemolisados y 50 ml de Suero Bovino Fetal.

- 4 Filtrar a través de filtros Millipore de 0.2 mm al vacío, luego efectuar control de esterilidad.

- 5 Almacenar en recipientes adecuados y refrigerar el medio entre 4-8 °C (57)

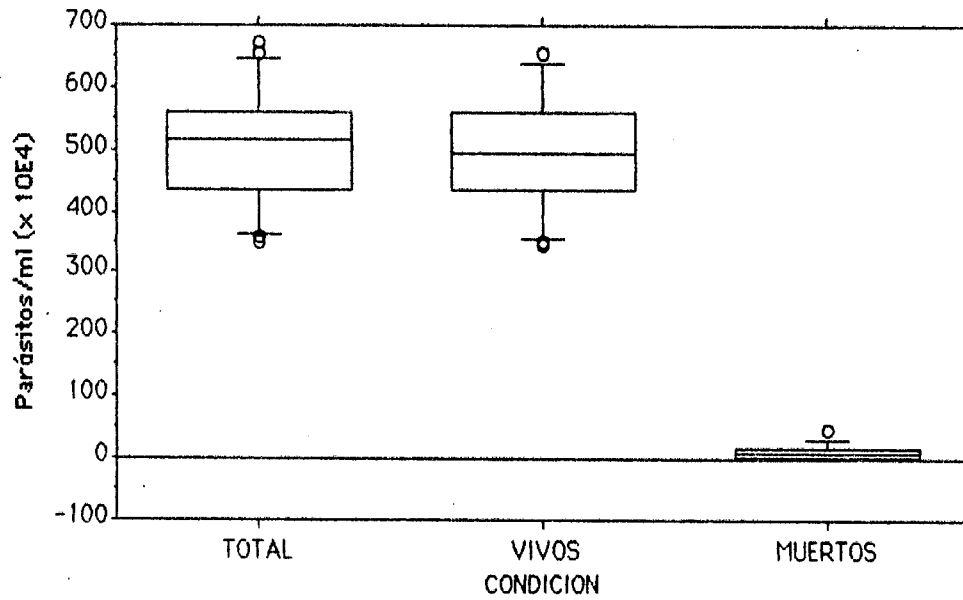
ANEXO 5

Tamizaje tripanocida in vitro: Inoculación de placas

Grupo No. (Pozo)	Cepa: <i>T. cruzi</i> En LIT Modificado	Control Negativo LIT Modificado	Violeta de Genciana Control Positivo	Ext. 1	Ext. 2	Ext. 3
			Disueltos en LIT Modificado			
Concentración	5*10E5 p/ml	Sin extracto	250 µg/ml	1,000 µg/ml		
1	100 µl	100 µl				
2	100 µl		100 µl			
3	100 µl			100 µl		
4	100 µl				100 µl	
5	100 µl					100 µl

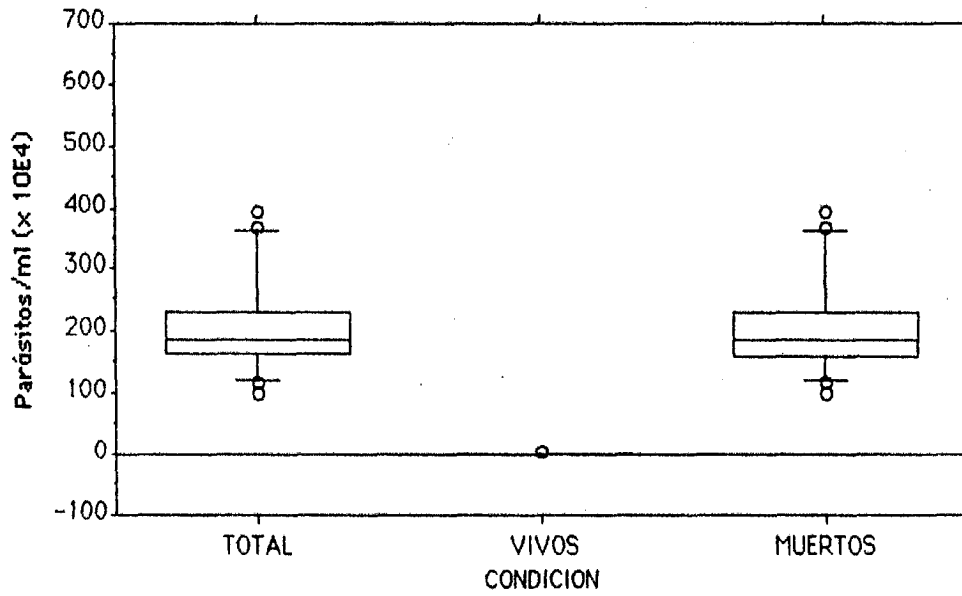
ANEXO 6

CONTROL NEGATIVO RECUENTO A LAS 48 H



ANEXO 7

CONTROL POSITIVO RECuento A LAS 48 H



ANEXO 8

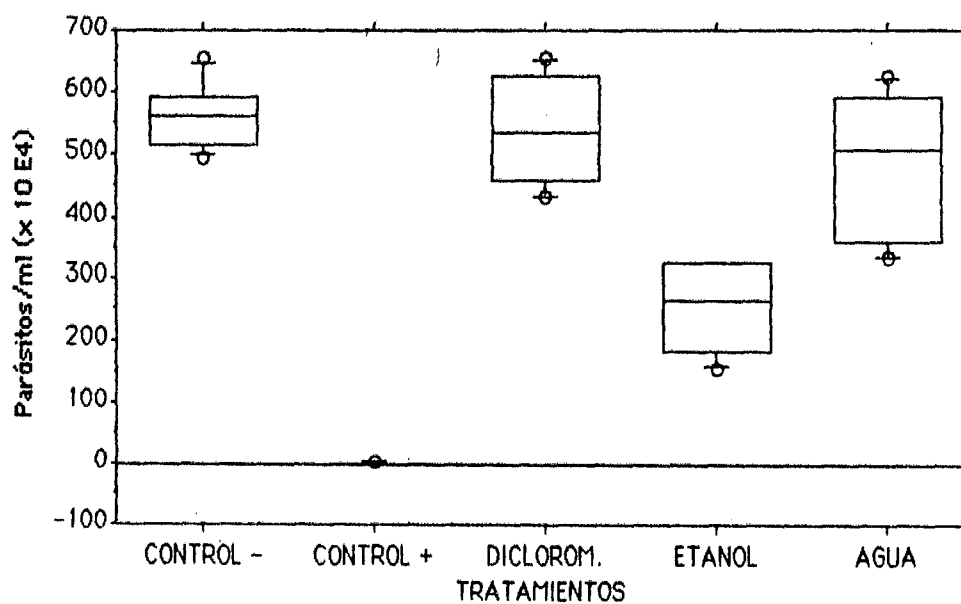
RECUESTO DE PARASITOS VIVOS X10⁴/ml (48 horas)

Tratamiento	PLANTA		
	<i>A. guatemalensis</i> Hoja M (rango)	<i>C. guatemalensis</i> Cortiza M (rango)	<i>J. curcas</i> Hoja M (rango)
Control negativo	560 (496-656)	488 (432-560)	380 (344-656)
Control positivo	0	0	0
Diclorometano	536 (436-656)	476 (464-560)	412 (368-512)
Etolanol	265.5 (158-328)*	444 (352-480)	520 (392-608)
Agua	508 (336-624)	396 (336-544)	464 (328-640)

* $p < 0.05$ (Kruskal Wallis)

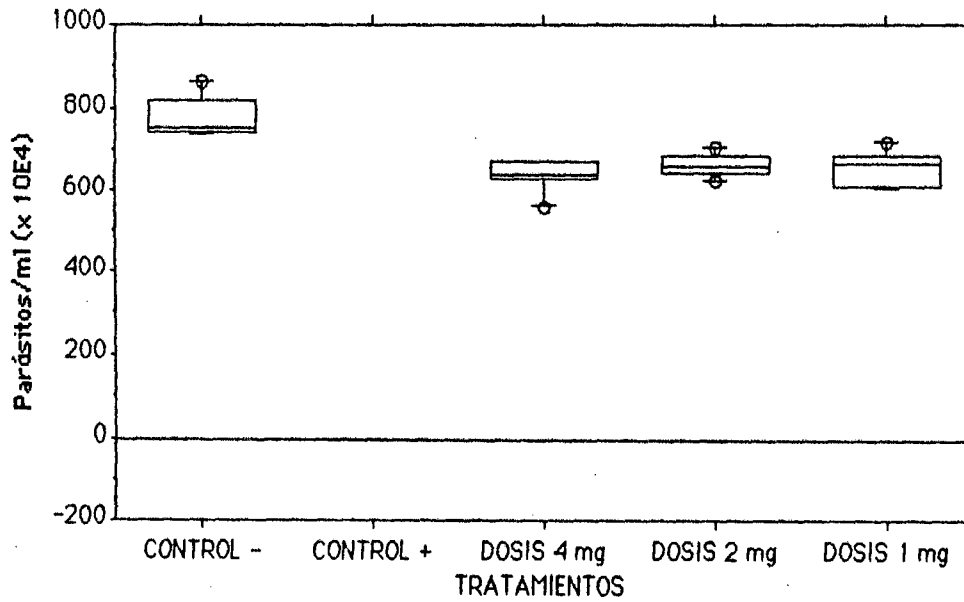
ANEXO 9

EVALUACION DEL EFECTO *IN VITRO* DE HIERBA DEL CANCER SOBRE *Trypanosoma cruzi*



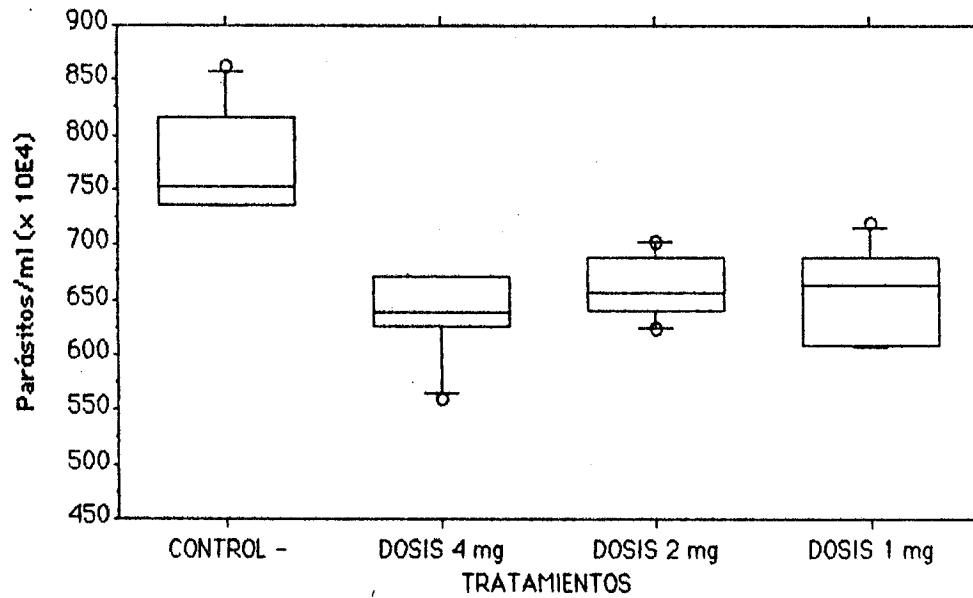
ANEXO 10

EVALUACION DEL EFECTO TRIPANOSTATICO *IN VITRO* DE TRES DOSIS DEL EXTRACTO ETANOLICO DE HIERBA DEL CANCER SOBRE *Trypanosoma cruzi*



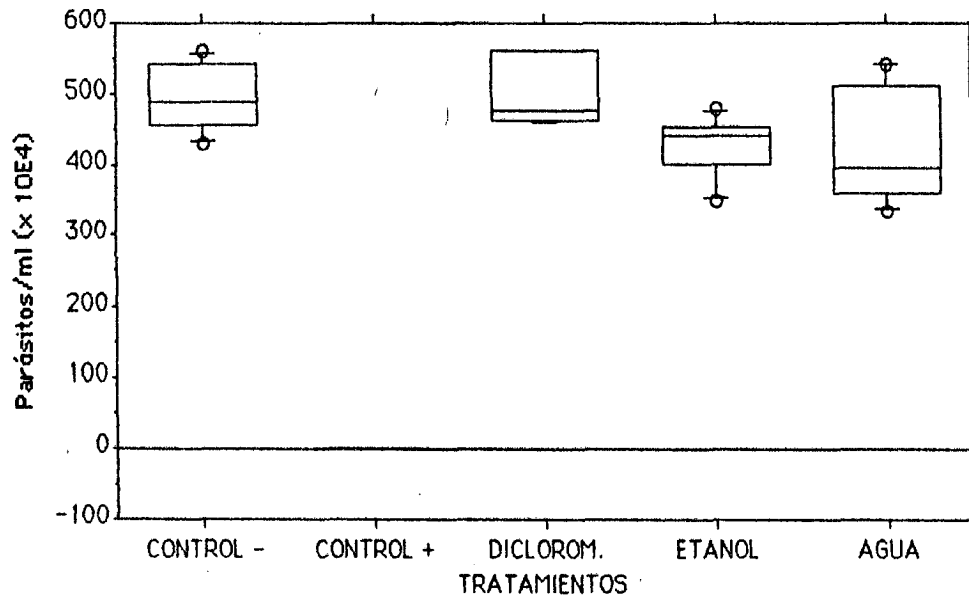
ANEXO 11

EVALUACION DEL EFECTO TRIPANOSTATICO *IN VITRO* DE TRES DOSIS DEL EXTRACTO ETANOLICO DE HIERBA DEL CANCER SOBRE *Trypanosoma cruzi* ELIMINANDO EL CONTROL POSITIVO



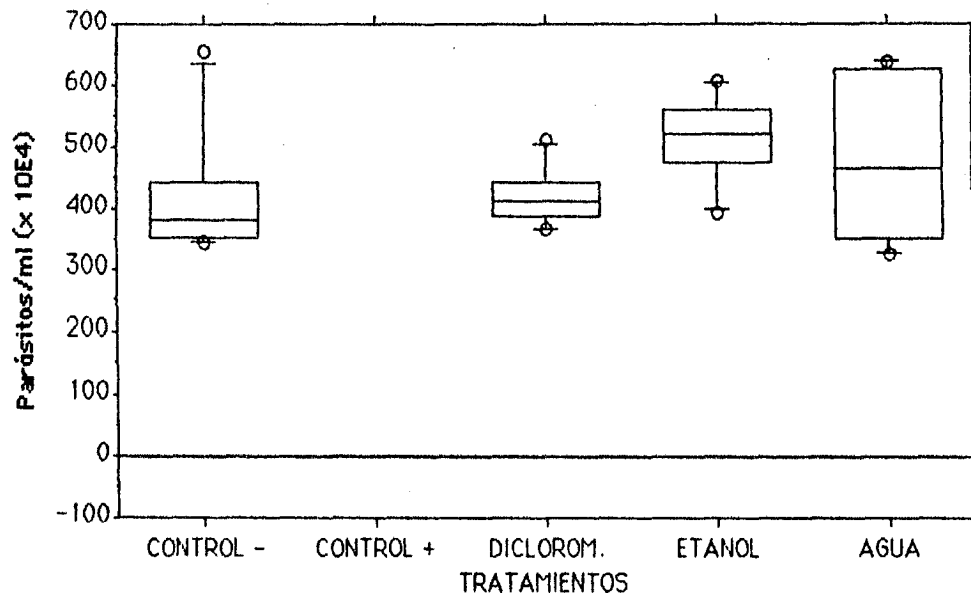
ANEXO 12

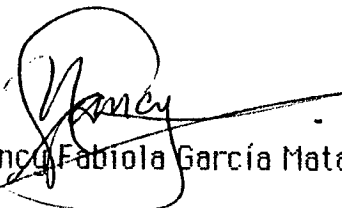
EVALUACION DEL EFECTO *IN VITRO* DE COPALCHI SOBRE *Trypanosoma cruzi*

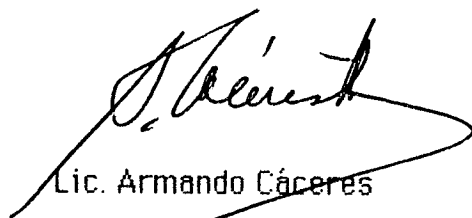


ANEXO 13


EVALUACION DEL EFECTO *IN VITRO* DEL PIÑON SOBRE *Trypanosoma cruzi*

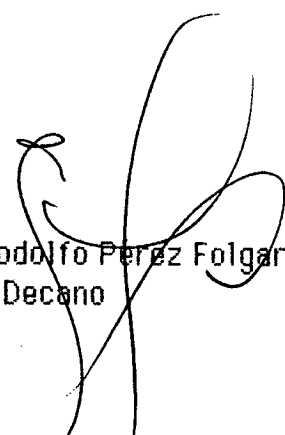



Br. Nancy Fabiola García Mata
Autora


Lic. Armando Cáceres
Asesor

PROPIEDAD DE LA BIBLIOTECA CENTRAL DE SAN CARLOS DE GUATEMALA


VoBo. Lic. Gerardo Arroyo.
Director


Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
Decano

7