

Evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos de 4 especies vegetales “chagasin” sobre *trypanosoma cruzi* procedentes de (*triatomas infestans*)” y su acción fitoterápica en cobayos chagásicos

Antiparasitary activity assessment from 4 vegetable species extracts “chagasin” in *trypanosoma cruzi* (*triatomas infestans*) and its phytotherapy action in chagasic guinea pigs

AVILÉS – María¹, FLORES – Raymundo²

^{1, 2} Investigadores del Sur Bolivia Sin Fronteras IDSBOSIF, calle Topáter S/N teléfono 591-464-26825, celular 74303053, Sucre- Bolivia; HIDROHERBALES LAFARFICON.

Recibido Junio 11, 2017; Aceptado Diciembre 04, 2017

Resumen

El presente estudio en esta etapa, tuvo como objetivo: Evaluar la actividad antiparasitaria de 4 extractos vegetales sobre *Trypanosoma cruzi*, aislados de *Triatoma infestans* y su acción fitoterápica en cobayos chagásicos. En la primera fase fue desarrollado el estudio de acuerdo a los objetivos específicos trazados, la metodología empleada estuvo basada en: 1. Obtención de los extractos vegetales por percolación, previo tratamiento de selección y desinfección de las especies en estudio; Jamillo, Carqueja, Canchalagua, los cuales previas obtenciones del extracto a diferentes concentraciones fueron sometidas sobre *trypanosomas* conservados en solución fisiológica isotónica a 28 ± 4 °C. los resultados para Jamillo demostraron mayor efecto antiparasitario en relación a las otras especies vegetales los parásitos vistas al microscopio tuvieron una inmovilidad pos mortuoria del 50% a las horas 8 horas y del 90% a las 16, y 99% a las 12 horas; las variables en estudio fueron concentración de los extractos y Tiempo de exposición del tripomastigote en las diferentes diluciones preliminares de los extractos semisólidos preparados al 0,4, 0,8, y 1,6 %. Los datos obtenidos fueron expresados como media ± desviación estándar y las comparaciones entre los grupos experimentales fueron realizadas por ANOVA de una vía seguido, por una prueba *post-hoc* de Scheffé. Las medias fueron consideradas significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Se utilizó el software SPSS 11,5. De acuerdo al análisis de datos se han obtenido los siguientes resultados, sometidos a ANOVA, para todos los casos, existe un efecto significativo como se puede ver: probabilidad inferior a 0.05, por lo que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Concluyéndose que los extractos de las especies utilizadas *Schkuhria pinnata* (Canchalagua) y *Baccharis articulata* (Carqueja), *Miroxylum periferium* (Quina colorada) y *Viscum album L.* (Jamillo), demostraron actividad tripanocida en menor y mayor grado de acuerdo a las diferentes concentraciones utilizadas en el ensayo, asimismo en el ensayo biológico de cobayos chagásicos, desparasitados con CHAGASIN 1 (extracto de Jamillo estabilizado con extracto de carqueja) se demostró mayor actividad antiparasitaria que CHAGASIN 2 (extracto de Jamillo estabilizado con canchalagua)

Palabras Clave

Trypanosoma cruzi, *Triatoma infestans*, Chagasin, carqueja, canchalagua, quina, cobayo

Abstract

The aim of the present study on its first stage was to assess the anti-parasitic activity of four plant extracts on *Trypanosomacruzi* and isolated from *Triatomainfestans* and its phytotherapeutic action in chagasic guinea pigs. In the first phase the study was developed according to the specific objectives set. The methodology used was based on: 1. Obtaining plant extracts by percolation after a treatment of selection and disinfection of the species under study: Jamillo, Carqueja, Canchagua, which previous obtained of the extract at different concentration were put on preserved trypanosomes in a physiological isotonic solution at 28 ± 4°C. The results for Jamillo showed greater antiparasitic effects in relation to the other plant species. The parasites seen under microscope had a post-mortuary immobility of 50 % at 8 hours, 90 % at 16 and 99 % at 12. The variables under study were concentration of the extracts and time of exposure of the trypanomastigote in the different preliminary dilutions of the semisolid extracts prepared at 0.4, 0.8 and 1.6 %. The data obtained was expressed as a mean ± standard deviation and the comparisons between the experimental groups were performed by one-way ANOVA followed by a post hoc Scheffé test using the SPSS 11.5 software. The means were considered significantly different when $p < 0.05$. The following results were obtained according to the data analysis and treatment submitted to ANOVA. For all cases, there is a significant effect: probability less than 0.05, so there are significant differences among the treatments applied. Therefore, it can be concluded that the extracts of the species used: *Schkuhria pinnata* (Canchalagua), *Baccharis articulata* (Carqueja), *Miroxylum periferium* (Quina Colorada) and *Viscum album L.* (Jamillo), showed trypanocidal activity in minor and greater degree according to the different concentrations used in the lab experiments. The same was observed in the biological test of chagasic guinea pigs, wormed whit CHAGASIN 1 (extract of Jamillo stabilized with extract of carqueja). It showed greater antiparasitic activity than CHAGASIN 2 (extract of Jamillo stabilized with canchagua).

Keywords

Trypanosoma cruzi, *triatoma infestans*, Chagasin, Carqueja, Canchalagua, quina, guinea pig

Citación: Avilés M. & Flores R. Evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos de 4 especies vegetales “chagasin” sobre *trypanosoma cruzi* procedentes de (*triatomas infestans*)” y su acción fitoterápica en cobayos chagásicos. Revista Ciencia, Tecnología e Innovación 2017, 15-16: 949-960

Introducción

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una infección parasitaria causada por *Trypanosoma cruzi*; es transmitida por insectos hematófagos de la familia Reduviidae, conocidos comúnmente en Bolivia como vinchucas (1). Esta enfermedad afecta principalmente a la población rural y periurbana en el continente americano donde las viviendas son construidas de adobe o carrizo y el hacinamiento favorece la presencia y proliferación del vector. El Chagas es la tercera enfermedad tropical más importante a nivel mundial en cuanto a morbilidad y mortalidad 2,3. Según la OMS, y gracias a las iniciativas multi gubernamentales de las dos últimas décadas, la mortalidad anual por esta enfermedad se ha reducido a 21.000 personas al año y el número de nuevos casos anuales aumenta. Se estima que 18 millones de personas están infectadas y 100 millones más con riesgo de infectarse.

En 2002, la OMS cita textualmente: “Según el Informe sobre el Desarrollo Humano del PNUD, la media anual per cápita estimada del producto interior bruto para Latinoamérica es de 2.966 dólares (de EE.UU., –USD–). La pérdida económica para el continente debido a la mortalidad precoz y morbilidad por esta enfermedad, entre la población joven en años productivos, es de 8.156 millones de USD, lo que equivale al 2,5% de la deuda externa del continente en 1995. el objetivo de la presente investigación fue el de “Evaluar la actividad antiparasitaria de 4 extractos vegetales sobre *Trypanosoma cruzi*, aislados de *Triatoma infestans* y su acción fitoterápica en cobayos chagásicos.

En la primera fase fue desarrollado el estudio de acuerdo a los objetivos específicos trazados, la metodología empleada estuvo basada en :

1. Obtención de los extractos vegetales por percolación, previo tratamiento de selección y desinfección de las especies en estudio; Jamillo, Carqueja, Canchalagua, los cuales previas obtenciones del extracto a diferentes concentraciones fueron aplicadas, sobre tripanosomas conservados en solución fisiológica isotónica a 28 +- 4 °C. los resultados para Jamillo demostraron mayor efecto antiparasitario en relación a las otras especies vegetales, los parásitos vistas al microscopio tuvieron una inmovilidad pos mortuoria del 50% a las horas 8 horas y del 90% a las 16, y 99% a las 12 horas. Demostrando los resultados mayor efectividad antiparasitaria con Extracto de Jamillo estabilizado con extracto de carqueja denominado Chagasin 1, de acuerdo al análisis realizado, tomando en cuenta los días de parasitosis inducida, y actividad de los extractos CHAGASIN 1 Jamillo más carqueja con un 94% de efectividad antiparasitaria y CHAGASIN 2 efectividad antiparasitaria de 83,5%. (ver tabla 9 y gráfico 1)

Antecedentes

En 1909, el Dr. Chagas comunicó al mundo científico la existencia de una nueva enfermedad infecciosa. Un año antes, ya había descrito al parásito que la provoca y el vector que la transmite. Su triple descubrimiento se considera único en la historia de la medicina. La falta de tratamientos innovadores y el que existe en la mayoría de ocasiones no está disponible para los enfermos. Cien años después, muchas de las personas infectadas con Chagas siguen ignorando que están enfermas, mueren sin saber de qué y en silencio. Su voz no llega hasta los Gobiernos que deberían responder a este problema de salud pública, ni hasta las Compañías farmacéuticas que podrían investigar y desarrollar nuevos medicamentos.

Durante 100 años, el Chagas ha sido una enfermedad silenciosa. Es el momento de romper ese silencio, los síntomas: un asesino silencioso. La infección por Chagas evoluciona en varias fases.

Durante la primera fase, el estadio agudo de la enfermedad después de contraer la infección, a menudo es asintomática. Los niños puede que presenten algunos síntomas como fiebre, glándulas linfáticas hinchadas, hígado y bazo distendidos o inflamación de la picadura. Estos síntomas a menudo pueden confundirse con los de otras enfermedades de la infancia, y a los pocos días desaparecen.

La fase intermedia empieza entre las ocho y las diez semanas después de haber contraído la infección y puede que dure muchos años. En esta fase los afectados son asintomáticos y pueden ser portadores del parásito durante años sin saberlo. Cerca de entre el 20 y el 30% de las personas infectadas desarrollaran la fase crónica de la enfermedad entre diez y veinte años de haberla contraído. Para entonces, los pacientes habrán desarrollado lesiones irreversibles en el corazón, el esófago y el colon. El fallo cardiaco es la causa de muerte más frecuente entre los jóvenes adultos, las personas que deberían estar en la fase más productiva de su vida.

Los gobiernos de países endémicos tendrán que reconocer su responsabilidad respecto a la salud pública y comprometerse a ocuparse de su población de alto riesgo. Aunque en Latinoamérica los programas nacionales de lucha contra la enfermedad de Chagas han adquirido ímpetu, se necesita financiación por parte de la comunidad internacional que apoye la batalla contra esta enfermedad. Las autoridades de salud nacionales, los países financiadores, la OPS y la OMS deben definir estrategias para abordar esta enfermedad, organizaciones diferentes exhortan a que: se asegure la producción y la disponibilidad de los dos medicamentos existentes en la actualidad, el nifurtimox y el benznidazol desarrollándose versiones pediátricas de los medicamentos existentes e incrementándose la I+D a fin de mejorar las pruebas de laboratorio para diagnosticar todas las fases de la enfermedad.

Así también se incrementan los esfuerzos en I+D de tratamientos más eficaces, asequibles, simples y menos tóxicos para todas las formas de Chagas, tanto para adultos como para los niños. (MSF| 902 30 65 | www.msf.es).

Previo al estudio, se realizó un sondeo a informantes claves (médicos naturistas tradicionales) en diferentes comunidades del Departamento de Chuquisaca, Limabanba, Iti, Alcalá, donde el 94% indicaron que para protegerse de la picadura de vinchucas, ellos tomaban preparados en base a Jamillo carqueja, además de la corteza de la quina y otras plantas que se presentan de acuerdo a la época, ya que no contaban con medicina de farmacias, y que solo los doctores sabían echar insecticidas a sus casitas produciéndoles dolores de cabeza y de estómagos, por lo que no querían ya que rociarán con estos productos que les hace daño.

De ahí la necesidad e importancia de contar con productos naturales de especies vegetales con propiedades antichagásicas que les permita combatir esta enfermedad y facilitar su consumo lo que resulta por demás sencillo una vez verificada dichas propiedades, mediante la “Evaluación de la actividad antiparasitaria de 4 extractos de especies vegetales sobre *Trypanosoma cruzi* procedentes de (*Triatomas infestans*) in- vitro. Y su acción fitoterápica en cobayos chagásicos”.

Métodos y material

Métodos

Las muestras biológicas correspondientes a los tripanosomas fueron extraídos de los *Triatomos* infestados, mismos que fueron colectados en el Municipio de Yotala de viviendas precarias.

Las plantas: de Jamillo, Carqueja y Canchalagua, para el preparado de los extractos fueron colectadas del Municipio de Yotala y la corteza de quina colectada en la Comunidad de Iti Departamento de Chuquisaca, los cuales fueron sometidos a selección, desinfección, secado, pulverizado y percolación en etanol. (goteo continuo hasta agotamiento)

Materiales

Los materiales necesarios para la presente investigación fueron los siguientes:

Insumos vegetales, estufa temperatura variable 0° a 250 C° molino pequeño pulverizador Prensa, Incubadora, Material de vidrio, cajas Petri, medios de cultivos. reactivos químicos, envases de plástico, bolsas de polietileno, jeringas, pipetas estériles, hisopo, Guantes de lavado y de trabajo de laboratorio, material de limpieza, bolsas de papel, Material escritorio, alcohol 95^a Medios de cultivo, vaselina líquida, material de vidrio de laboratorio, estufa temperatura graduable normal 30 y 37 °C, microscopio de luz, balanza sensibilidad en mg, porta vidrios, celdas de vidrios, cámara hemocito métrica de Neubauer.

Procedimiento 1

Para la realización de los ensayos experimentales en el estudio se desarrollaron las actividades de acuerdo a lo propuesto en el documento.

1. La extracción de los extractos naturales de las especies vegetales estudiadas se realizó por el método de percolación (extracto entero – mezcla de principios activos) para el cual se utilizó material vegetal en seco, especies antes de tratamiento de secado fueron sometidas a proceso de selección y desinfección flores frescas de Jamillo, Corteza de Quina, Carqueja y Canchalagua (planta entera), antes de la extracción etanólica, para una mejor superficie de contacto el material biológico fue pulverizado, posteriormente la misma fue concentrada por deshidratación.

2. Una vez obtenidos los extractos semisólidos fueron guardados en un frasco de vidrio color ámbar a temperatura ambiente, hasta su uso. Como parásito se utilizó tripomastigotes que se encuentran en las heces de la vinchuca (*Triatoma infestans*) parasitado. Las muestras fueron concentradas previo lavado de las heces (muestra de heces fecales de *Triatominae* con solución fisiológica isotónica acondicionadas a temperatura de 32 grados + - 4 °C con la que no sufrieron alteración alguna. La preparación de las diluciones de los extractos para el ensayo sobre las muestras se preparó de la siguiente manera: (ver tabla 1)

Tabla 1. Dilución de los extractos con solución fisiológica

Diluciones de los extractos con sol.fis	Jamillo	Quina	Carqueja	Canchalagua
1	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%
2	0,8 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %
3	1,6 %	1,6 %	1,6 %	1,6 %

3. Antes de desarrollar los ensayos in-vitro, las muestras contenidas en solución fisiológica fueron contados en una cámara hemocito métrica de Neubauer; a continuación 100 µl de una suspensión de 4X212 parásitos/ ml fueron adicionados en tubos de hemólisis para las diferentes concentraciones y con 4 repeticiones, haciendo un total de 16 tubos, todas en condiciones de igual temperatura y pH, luego los extractos diluidos en solución fisiológica isotónica fueron adicionados en un volumen de 100 ul. Relación 1 a 2.

4. Se incubó durante 24 horas a 32°C. +- 4 con lectura control a los 60, 120, 180 y 240 minutos de la motilidad de los tripanosomas mediante observación directa al microscopio, cargándose en la cámara hemocito métrica dilución 1/20 de muestra tratada en solución fisiológica isotónica, posteriormente se procedió

al conteo de tripanosomas inmóviles sometidos a los extractos para cada uno de las concentraciones verificando el mismo a los 60.120.180 y hasta los 240 min. para verificar la posible recuperación de la motilidad como indicador de la no mortalidad de los parásitos.

Tabla: 2. Inviabilidad de Tripanosomas cruzi a diferentes concentraciones y tiempos

Concentración de extractos	Tiempo de acción	de	Tiempo en minutos de la Inviabilidad de Tripanosomas a diferentes (indicadores Tp. c. móviles)			
			T. act. Tp 60 min.	T. act. Tp 120 min.	T. act. Tp 180 min.	T. act. Tp 240 min.
1	0,4%	Jamilo	55	60	70	85
		Quina	20	40	53	72
		Carqueja	45	50	69	84
		Canchalagua	48	59	72	89
2	0,8%	Jamilo	56	66	80	92
		Quina	30	52	63	72
		Carqueja	40	63	70	90
		Canchalagua	42	57	70	92
3	1,6 %	Jamilo	66	73	90	100
		Quina	55	70	75	88
		Carqueja	63	74	86	100
		Canchalagua	65	89	92	100

Procedimiento 2. Determinación del efecto antichagásico

1. Una vez obtenido los extractos fueron preparados tomando en cuenta las concentraciones optimas del ensayo preliminar, concentración 1,6% para extracto de Jamillo estabilizado con extracto de carqueja y concentración de 1,6% extracto de Jamillo estabilizado con extracto de canchalagua, para determinar el efecto antiparasitario en cobayos experimentación.

Tabal 3. Concentraciones de las diluciones de CHAGASIN 1 Y CHAGASIN 2

Extracto	CHAGASIN 1		CHAGASIN 2	
	Concentración %	Carqueja %	Jamilo	Canchalagua %
Jamilo	1,6	1,6	1,6,	1,6
Envase en goteros de 50 ml				

2. Previo al tratamiento para determinar el efecto antichagásico en cobayos de experimentación, estos fueron inoculados con una dilución en solución fisiológica 1/20 de tripomastigotes. (ver tabla 4)

3. El ensayo se utilizaron 6 cobayos de raza andina de color blanco y sanos, los cuales tenían un peso desde los 712g. hasta los 836g. sometidos a las mismas condiciones de tratamiento y divididos en 3 grupos, cada grupo constituidos por dos cobayos. G1, G2 y G3, siendo G3 grupo control sin inoculación de tripomastigotes.

4. Post inoculación con tripomastigotes, los cobayos fueron sometidos a observados hasta los 5 días sin tratamiento alguno, al sexto día se les realizo un examen microscópico directo en sangre para verificar la parasitemia, sin resultados positivos, y con una actividad aparentemente normal, sin embargo a los 7 días se encontraron parásitos en sangre en los cobayos 1 y 3 y a los 10 días en los cobayos 2 y 4 el Grupo 3 sin efecto alguno normal.

5. Administración en gotas de las concentraciones de extractos obtenidos preparados como Chagasin 1 y Chagasin 2 en los cobayos de experimentación.

Tabla 4. Inoculación de la dilución de tripomastigotes en cobayos de experimentación

INOCULACION DE TRIPOMASTIGOTES EN DILUCIÓN 1/20* COBAYOS DE EXPERIMENTACIÓN	Grupo 1 COBAYOS 1 Y 2		Grupo 2 COBAYOS 3 Y 4		Grupo 3 COBAYOS 5 Y 6 sin tratamiento	
	1	2	3	4	5	6
	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	0 ml	0 ml
OBSERVACIÓN DE LA REACCIÓN A LOS 5 DÍAS	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo Normal	Negativo Normal
EXAMEN DIRECTO EN SANGRE A LOS 7 DÍAS	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
EXAMEN DIRECTO EN SANGRE A LOS 10 DÍAS	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	negativo	negativo

+: Presencia de parásitos circulantes en sangre.

Tabla 5. (6 Cobayos) Ensayo preliminar en cobayos tratados con extracto: Chagasin 1 y 2

Evaluación Toxicológica Y Dosificación

	GRUPO		DOSIS mg/kg peso corporal	eso de cobayos en kg
I	CHAGASIN I	1	3,10	0,712
		2	3,30	0,758
II	CHAGASIN 2	3	3,3	0,763
		4	3,47	0,802
III	SIN CHAGASIN	5	0,00	0,823
		6	0,00	0,836

Tabla 6. Dosificación de Chagasin 1 y 2: extracto de jamillo estabilizado con carqueja y jamillo estabilizado con canchalagua

Extracto Chagasin 1y2 en mg en gotero para 20 ml de disolución		DOSIFICACIÓN EN PORCENTAJE G%
Chagasin 1	320	1,6
Chagasin 2	320	1,6

Tabla 7. Dosificación de CHAGASIN 1 Y CHAGASIN 2, presentación gotero de 20 ml.

Extracto Chagasin 1 y 2 , 320 mg en gotero para disolución con 20 ml de agua destilada	DOSIFICACIÓN MÁXIMA/Día de frasco gotero de 20 ml Medición en Gotas/Día para un homotipo de 74 kg. Calculo realizado tomando en cuenta el uso tradicional por médicos naturistas	
30 mg/día	Mínima	15
Hasta 60 mg/día	Máxima	30

RESULTADOS ENSAYO PRELIMINAR PRIMERA PARTE: DETERMINACION ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN-VITRO DE LAS CUATRO ESPECIES VEGETALES DE EXTRACTOS DE JAMILLO, CARQUEJA, CACHANLAGUA Y QUINA POR SEPARADO.

Los datos obtenidos fueron expresados como media \pm desviación estándar y las comparaciones entre los grupos experimentales fueron realizadas por ANOVA de una vía seguido, por una prueba *post-hoc* de Scheffe. Las medias fueron consideradas significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Se utilizó el software SPSS 11,5. De acuerdo al análisis de datos se han obtenido los siguientes resultados, sometidos a ANOVA, para todos los casos, existe un efecto significativo como se puede ver: $F = (32,9)$; $p = 0,046$, $F = (2,9)$; $p = 0,006$, $F = (2,9)$; $p = 0,015$ probabilidades inferior a 0,05, existiendo en la última un efecto no significativo $F = (2,9)$; $p = 0,069$ por lo que existen diferencias significativas entre las cuatro especies vegetales.

Tabla 8: ANOVA de una vía seguido, por una prueba *post-hoc* de Scheffé

Comparaciones múltiples

Scheffé

Variable de	(I) T.ACC	(J) T.ACC	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
A.ANTP.J	a los 60 min.	a los 120 min.	-15,7500*	2,45374	,000	-23,6900	-7,8100
		a los 180 min.	-30,0000*	2,45374	,000	-37,9400	-22,0600
		a los 240 min.	-43,2500*	2,45374	,000	-51,1900	-35,3100
	a los 120 min.	a los 60 min.	15,7500*	2,45374	,000	7,8100	23,6900
		a los 180 min.	14,2500*	2,45374	,001	-22,1900	-6,3100
		a los 240 min.	-27,5000*	2,45374	,000	-35,4400	-19,5600
	a los 180 min.	a los 60 min.	30,0000*	2,45374	,000	22,0600	37,9400
		a los 120 min.	14,2500*	2,45374	,001	6,3100	22,1900
		a los 240 min.	-13,2500*	2,45374	,002	-21,1900	-5,3100
	a los 240 min.	a los 60 min.	43,2500*	2,45374	,000	35,3100	51,1900
		a los 120 min.	27,5000*	2,45374	,000	19,5600	35,4400
		a los 180 min.	13,2500*	2,45374	,002	5,3100	21,1900
A.ATP.Q	a los 60 min.	a los 120 min.	-17,0000*	2,12967	,000	-23,8881	-10,1119
		a los 180 min.	-50,0000*	2,12967	,000	-56,8881	-43,1119
		a los 240 min.	-60,2500*	2,12967	,000	-67,1381	-53,3619
	a los 120 min.	a los 60 min.	17,0000*	2,12967	,000	10,1119	23,8881
		a los 180 min.	-33,0000*	2,12967	,000	-39,8881	-26,1119
		a los 240 min.	-43,2500*	2,12967	,000	-50,1381	-36,3619
	a los 180 min.	a los 60 min.	50,0000*	2,12967	,000	43,1119	56,8881
		a los 120 min.	33,0000*	2,12967	,000	26,1119	39,8881
		a los 240 min.	-10,2500*	2,12967	,004	-17,1381	-3,3619
	a los 240 min.	a los 60 min.	60,2500*	2,12967	,000	53,3619	67,1381
		a los 120 min.	43,2500*	2,12967	,000	36,3619	50,1381
		a los 180 min.	10,2500*	2,12967	,004	3,3619	17,1381
A.ATP.CR	a los 60 min.	a los 120 min.	-19,7500*	3,65434	,002	-31,5750	-7,9250
		a los 180 min.	-57,5000*	3,65434	,000	-69,3250	-45,6750
		a los 240 min.	-62,7500*	3,65434	,000	-74,5750	-50,9250
	a los 120 min.	a los 60 min.	19,7500*	3,65434	,002	7,9250	31,5750
		a los 180 min.	-37,7500*	3,65434	,000	-49,5750	-25,9250
		a los 240 min.	-43,0000*	3,65434	,000	-54,8250	-31,1750
	a los 180 min.	a los 60 min.	57,5000*	3,65434	,000	45,6750	69,3250
		a los 120 min.	37,7500*	3,65434	,000	25,9250	49,5750
		a los 240 min.	-5,2500*	3,65434	,577	-17,0750	6,5750
	a los 240 min.	a los 60 min.	62,7500*	3,65434	,000	50,9250	74,5750
		a los 120 min.	43,0000*	3,65434	,000	31,1750	54,8250
		a los 180 min.	5,2500*	3,65434	,577	-6,5750	17,0750
A.ATP.CN	a los 60 min.	a los 120 min.	-31,0000*	5,44289	,001	-48,6125	-13,3875
		a los 180 min.	-53,5000*	5,44289	,000	-71,1125	-35,8875
		a los 240 min.	-68,0000*	5,44289	,000	-83,6125	-48,3875
	a los 120 min.	a los 60 min.	31,0000*	5,44289	,001	13,3875	48,6125
		a los 180 min.	-22,5000*	5,44289	,012	-40,1125	-4,8875
		a los 240 min.	-35,0000*	5,44289	,000	-52,6125	-17,3875
	a los 180 min.	a los 60 min.	53,5000*	5,44289	,000	35,8875	71,1125
		a los 120 min.	22,5000*	5,44289	,012	4,8875	40,1125
		a los 240 min.	-12,5000*	5,44289	,209	-30,1125	5,1125
	a los 240 min.	a los 60 min.	68,0000*	5,44289	,000	48,3875	83,6125
		a los 120 min.	35,0000*	5,44289	,000	17,3875	52,6125
		a los 180 min.	12,5000*	5,44289	,209	-5,1125	30,1125

*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

La diferencia de las medias es altamente significativa al nivel de 0,05% por lo que existen diferencias entre tratamientos.

Tabla 9. Resultados de ensayo en cobayos de experimentación 2º parte

GRUPOS	GHAGASIN	COBAYOS	EXAMEN MICROSCÓPICO DIRECTO (SANGRE)							
			CONTROL A LOS 15 DÍAS DE	CONTROL A LOS 20 DÍAS	CONTROL A LOS 25 DÍAS	CONTROL DE A LOS 30 DÍAS	CONTROL DE A LOS 45 DÍAS	CONTROL DE A LOS 60 DÍAS	CONTROL DE A LOS 90 DÍAS	CONTROL DE A LOS 120 DÍAS
I	I	1	++	+	+	+	-	-	-	-
		2	++	++	+	-	-	-	-	-
II	2	3	++	++	+	+	-	-	-	-
		4	++	++	++	+	+	-	-	-
III	0	5	-	-	-	-	-	-	-	-
		6	-	-	-	-	-	-	-	-

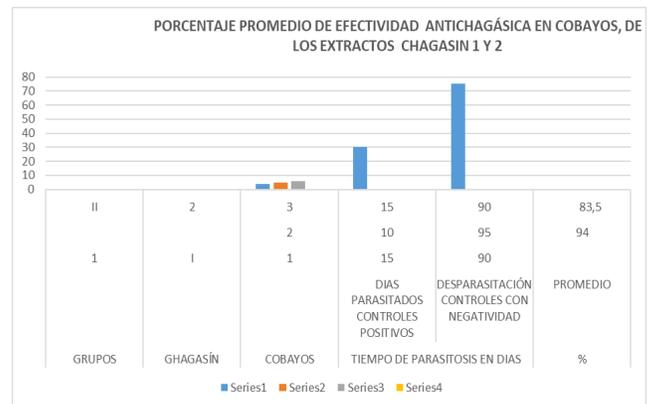
Los resultados demuestran mayor efectividad antiparasitaria con Extracto de Jamillo estabilizado con extracto de carqueja denominado Chagasin 1.

De acuerdo al análisis realizado, tomando en cuenta los días de parasitosis inducida y actividad de los extractos CHAGASIN 1 Jamillo más carqueja con un 94% de efectividad antiparasitaria y CHAGASIN 2 efectividad antiparasitaria de 83,5%. (ver tabla 9 y gráfico 1)

Tabla 10. Desparasitación de cobayos con CHAGASIN 1 y CHAGASIN 2, previa parasitosis inducida

GRUPOS	GHAGASIN	COBAYOS	TIEMPO DE PARASITOSIS EN DIAS		%
			DIAS PARASITADOS CONTROLES POSITIVOS	DESPARASITACIÓN CONTROLES CON NEGATIVIDAD	
I	I	1	15	90	94
		2	10	95	
II	2	3	15	90	83,5
		4	30	75	
III	-	5	0	0	0
		6	0	0	0

Gráfico 1. Relación de la efectividad antichagásica entre CHAGASIN 1 y CHAGASIN 2



Discusión

En la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, los productos vegetales han demostrado poseer importante actividad contra parásitos hemoflagelados. Se ha reportado estudios que el extracto de la hoja de *B. dracunculifolia*, a una concentración de 3 mg/mL, produjo 100% de lisis de formas tripomastigotes de *T. cruzi* (13); los extractos y fracciones de *A. amazonicus* mostraron lisis de las formas tripomastigotes de *T. cruzi* in vitro (14); otros investigadores también han demostrado el efecto tripanocida de diversos extractos vegetales (10,15,16), así como de diversas estructuras terpénicas contra uno o todos los estadios de *T. cruzi*.

También han mostrado efecto tripanosomida algunos alcaloides flavonoides, lignanos y artemisininas.

En la presente investigación, los extractos vegetales utilizados en el ensayo in-vitro para determinar la actividad antiparasitaria sobre los tripomastigotes, fueron los extractos de: 1. Carqueja (*Baccharis articulata*), 2. Canchalagua (*Schkuhria pinnata*), los que fueron aplicados a los tripomastigotes obtenidos de Triatomíneos (vinchucas). Concentraciones al 0,4 %, 0,8 5 y 1,6 % en todos los casos se observaron diferentes grados de mortalidad de tripomastigotes de acuerdo al tiempo de exposición a las que fueron sometidos. 60. 120, 180 y 240 minutos, sin embargo, se obtuvo mejor respuesta con el tratamiento al 1,6 % a los 240 minutos con una mortalidad del 100% de actividad tripanocida de Jamillo, Carqueja y Canchalagua. (ver tablas y gráficos en anexos.) También se demostró de alguna manera actividad tripanocida al 88% con extracto de Quina al 1,6%.

En la segunda parte del estudio, se procedió a la evaluación antichagásica en cobayos de experimentación para determinar la dosis efectiva antichagásica de los extractos y relacionar la misma con las dosis empíricas utilizados por médicos naturistas tradicionales, y así obtener la dosis correcta de los extractos mencionados, toda vez que su validación también está dada por usos y costumbres conocimiento ancestral, obteniéndose la dosis antichagásica de los extractos en relación a las dosis empíricas utilizada en la Medicina Natural Tradicional.

Conclusiones y recomendaciones

- Se concluye que las 3 especies (Jamillo, Canchalagua y Carqueja) demostraron de acuerdo al ensayo mejor actividad tripanocida a los 240 minutos en concentraciones al 1,6%, no excluyéndose la actividad tripanocida de la Quina que también demostró actividad tripanocida con su mejor actividad antiparasitaria (88% de mortalidad de tripanosomas a los 240 minutos en concentraciones del extracto al 1,6%.)
- Asimismo, se concluye que CHAGASIN 1 (extracto de Jamillo estabilizado con carqueja) presentó mayor efectividad antiparasitaria en los cobayos chagásicos de experimentación que CHAGASIN 2 (extracto de Jamillo estabilizado con extracto de canchalagua). Aunque no se desmerece la actividad que también presentó CHAGASIN 2.
- Los resultados obtenidos, demuestran la similitud de acción tripanocida de las especies con las que cuenta el departamento de Chuquisaca, respecto a estudios realizados por otros investigadores.
- Finalmente podemos concluir que todas las especies utilizada presentaron actividad tripanocida, en las concentraciones usadas contra *Trypanosoma cruzi*.

- Se recomienda, continuar con estudios, que permitan validar otras especies, sea para la etapa aguda o crónica de la enfermedad, debido en el estudio se realizaron los ensayos en la etapa aguda de la enfermedad como una alternativa más de lucha para este mal, denominado “Enfermedad de los pobres”.

Bibliografía

1. La transmisión vectorial de la enfermedad de Chagasen Chile. Rev Med Chil. 2001;129(3):264-269
2. World Health Organization. Chagas. The disease [En línea] WHO, [Consulta 2002 jun]. Disponible en www.who.int/ctd/chagas/disease.htm
3. Schenone Fernández H. (1998) Infección humana por *Trypanosoma cruzi* en Chile: algunas estimaciones epidemiológicas y de los costos de la atención y tratamiento del paciente chagásico. Bol Chil Parasitol.;76(1-2):23-26.
4. Storino R, Milei J. (1994) Enfermedad de Chagas. Buenos Aires: Doyma Argentina.
5. Pinto Días J, Rodríguez Coura J. (1997) Clínica é terapéutica da doença de Chagas. Río de Janeiro: Fiocruz.
6. Ferreira MS, Nishioka Sde A, Silvestre MT, (1997) et al. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. Clin Infect Dis. ;25:1397-1400.
7. Pacheco R, Ferreira M, Machado MI, (1998) et al. Chagas' disease and HIV co-infection: Genotypic Characterization of the *Trypanosoma cruzi* strain. Mem Inst Oswaldo Cruz.;93(2): 165-169.
8. Rodríguez Coura J, de Castro S. A (2002) critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz.;97(1):3-24.
9. Zhang L, Tarleton R. (1999) Parasite Persistence Correlates with Disease Severity and Localization in Chronic Chagas' disease. J Infect Dis.; 180(2):480-486.
10. Correa-Oliveira R, Gomes J, Lemos EM, (1999) et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas Disease. Mem Inst Oswaldo Cruz.;94(Suppl I):253-255.
11. Viotti R, Vigiliano C, Armenti H, (1994) Segura E. Treatment of chronic Chagas disease with Benznidazole, clinical and serologic evolution of patients with long term follow up. Am Heart J.;127:151-162.
12. Cançado J. (2002) Long term evaluation of etiologial treatment of chagas disease with benznidazole. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 44(1):29-37.
13. Gallerano R, Sosa R. (2000) Interventional study in the evolution of Chagas disease. Evaluation of specific antiparasitic treatment. Retrospectiveprospective study of antiparasitic therapy. Rev Fac Cien Med Univ Nac Córdoba;57(2): 135-162.
14. Carpintero D. (1993) Quimioterapia antiparasitaria en la tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas): relato de 15 años de experiencia. CM Publicación Médica.;6(3):117-131. Villa Villanueva L, y cols. Resultados del tratamiento de la enfermedad de Chagas en menores de 15 años
15. Revista Pediatría de Atención Primaria Vol. VII, Suplemento 1, 200n *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2003;98(3):413-8.H, De Amorim Gualda N, Salerno Carvalho C, Bachiega D, (2005) et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. Phytomedicine.;12:382-90.

17. R, Carauta J, Bandeira Falcao C, Kaplan M, Rossi-Bergmann. (2004) Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*.11:114-20. spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. 2001;5(1):62-71.
18. S, Bastos J. (2004) In vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *J Pharm Pharmacol*.;56:1195-9.
19. França S, Nomizo A, (2007) et al. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Braz J Med Biol Res*.40:663-70.
20. Ogura T, (2005) et al. Trypanocidal constituents in plants. 5. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. *Biol pharm Bull*. ;28(7):1314-7.
21. Sarragiotto M, Souza M. (2005) Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. *Braz J Med Biol Res*.;38:1873-8. *An Fac med*. 2010;71(3):161-5 Evaluación in vitro de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales 17.Leite J, Oliveira A, Lombardi J, Filho J, Chiari
22. E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(11):2307-9.
23. Sanchez A, Jimenez V, Sartor T, Tonn C, García E, Nieto M. (2006) A novel icetexane diterpene, 5-epiicetexone from *Salvia gilliessi* is active against *trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*.98(2):118- 24.19.Cunha W, Crevelin E, Arantes G, Crotti A, Andrade
24. M, Furtado M, (2006) et al. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. *Phyther Res*. 20(6):474-8.
25. Jimenez V, Brengio S, Giordano O, Tonn C, Sanchez M, Burgos M, (2005) et al. The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. *J Parasitol*. ;91(1):170-4.
26. González P, Marín C, Rodríguez-González I, Illana A, Mateo E, Longoni S, (2006) et al. Diterpenoid alkaloid derivatives as potential chemotherapeutic agents in American Trypanosomiasis. *Pharmacology*. ;76:123-8.
27. Ferreira M, Nakayama H, De Arias A, Schinini A, De Bilbao A, Serna N, (2007) et al. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Ethnopharmacol*.;109(2):258-63.
28. Fournet A, Inchausti A, Yaluff G, Rojas de Arias A, Guinaudeau H, Bruneton J. (1998) Trypanocidal bisbenzylisoquinoline alkaloids are inhibitors of trypanothione reductase. *J Enzyme Inhib*. ;13(1):1-9.
29. Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt T, Tosun F, Rüedi P. (2006) Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.;50(4):1352-64

ANEXOS

1. Subconjuntos homogéneos (concentración de los extractos de 4 especies vegetales)

T1AC.TP

CNC.EX.V	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	
Conc. a 0,4% de extracto vegetal	4	42.0000	
Conc. al 0,8 % de extracto vegetal	4	42.0000	
Conc. al 1,6 % de extracto vegetal	4	62.2500	
Sig.			.084

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

T2AC.TP

CNC.EX.V	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Conc. a 0,4% de extracto vegetal	4	52.2500	
Conc. al 0,8 % de extracto vegetal	4	59.5000	
Conc. al 1,6 % de extracto vegetal	4		76.5000
Sig.		.481	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

2.

T3AC.TP

CNC.EX.V	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
Conc. a 0,4% de extracto vegetal	4	66.0000	
Conc. al 0,8 % de extracto vegetal	4	70.7500	70.7500
Conc. al 1,6 % de extracto vegetal	4		85.7500
Sig.		.701	.068

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

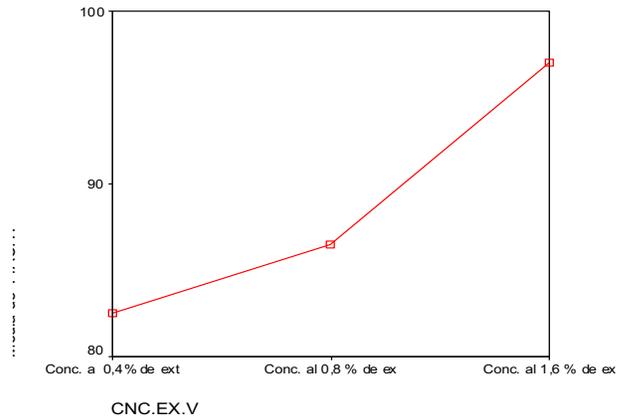
3. **T4AC.TP**

CNC.EX.V	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	
Conc. a 0,4% de extracto vegetal	4	82.5000	
Conc. al 0,8 % de extracto vegetal	4	86.5000	
Conc. al 1,6 % de extracto vegetal	4	97.0000	
Sig.			.078

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 4.000.

5. Gráfico de las medias
 Media de la actividad antiparasitaria sometida a diferentes concentraciones de la droga vegetal



5. Anova de una de una vía

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
T1AC.TP	Inter-grupos	1093.500	2	546.750	4.406	.046
	Intra-grupos	1116.750	9	124.083		
	Total	2210.250	11			
T2AC.TP	Inter-grupos	1239.500	2	619.750	9.378	.006
	Intra-grupos	594.750	9	66.083		
	Total	1834.250	11			
T3AC.TP	Inter-grupos	850.167	2	425.083	6.962	.015
	Intra-grupos	549.500	9	61.056		
	Total	1399.667	11			
T4AC.TP	Inter-grupos	448.667	2	224.333	3.658	.069
	Intra-grupos	552.000	9	61.333		
	Total	1000.667	11			

Memoria fotográfica

Evaluación de la actividad antiparasitaria de 4 extractos de especies vegetales sobre *trypanosoma cruzi* procedentes de (triatomas infestans) y su acción fitoterápica en cobayos chagásicos”

Especies vegetales

Quina, jamiento, carqueja y canchalagua



Especies vegetales en polvo (molienda)

Jamiento, quina, carqueja y canchalagua



Suspensión de tripomastigote

Diluciones con extractos vegetales en studio



Incubación a temperatura constante 34°C +- 2

Cargado y recuento de tripomastigote en cámara hemocito métrica nw.



Control de la mortalidad (inmovilidad) tripomastigotes sometidos a las diferentes diluciones de extractos vegetales