



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación comparativa de la actividad  
antimalárica de un remedio tradicional frente a  
un extracto primario; profundización del estudio  
de su actividad farmacológica.

**Zully Johana Rodríguez Parra**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia  
2015

**Evaluación comparativa de la actividad antimalárica de un remedio tradicional frente a un extracto primario; profundización del estudio de su actividad farmacológica.**

**Zully Johana Rodríguez Parra**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias Farmacéuticas**

Director:

Ph.D., Giovanni Garavito Cárdenas

Línea de Investigación: Farmacología de las terapias antiparasitarias empleadas en medicina tradicional y popular

Grupo de Investigación:

FaMeTra “Farmacología de medicina tradicional y popular”

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia

2015

*A mi padre Dios, alfarero adiestrado y poderoso, a quien le debo la forma que me ha dado con el transcurrir de estos años... a su espíritu santo que iluminó mis noches y días.*

*A mi familia, tesoro invaluable, fuerte, compasivo... silente testigo y cómplice de esta travesía.*

*A ti ... ICOG.*

*A mi hijo tácito.*

# Agradecimientos

A Dios mi guía, mi fortaleza y mi roca.

A mi hermosa familia, pues en todo momento me demuestran su amor, comprensión y apoyo. A mis padres José y Carmen por su ejemplo, a mis hermanas Diana y Mayita por su compañía y enseñanzas, a mi hermano Leo por ser el vivo testimonio de que vale la pena luchar por lo que se quiere.

A mi viejita linda, abuelita Anita por cubrirme día a día con sus oraciones.

A mi director Giovanni Garavito Cárdenas por sus enseñanzas, y por su ayuda en muchos momentos de mi vida en la universidad, por su confianza en mi trabajo.

Al abuelo José Octavio García y a Jesús García hijo, por compartimos su sabiduría y por ser colaboradores y eje fundamental de este proyecto.

A Lady mi vecina, compañera y amiga inseparable por recorrer los mismos caminos y por permitirme aprender que a pesar de las dificultades saldremos adelante.

A Vanessa Otero Jiménez por sus múltiples enseñanzas académicas, por sus consejos y por su amistad sincera.

A Victoria Rodríguez por el trabajo realizado, por su compañía y amistad.

A Jorge Hernández por su asesoría y orientación en el área de la fitoquímica, y por ser un buen amigo y compañero de trabajo.

A Helena por su sinceridad, por las tardes de conversación, por su apoyo y amistad.

A Magda y Ela por ser buenas compañeras y ayudarme de manera incondicional.

A mis compañeritas de oficina, Diana, Stellita y Angélica, por su compañía, cariño y sabios consejos.

A la profesora Adriana Pabón de la Universidad de Antioquia, por su colaboración con la donación de la cepa trabajada y por supuesto por estar siempre dispuesta a colaborar.

A Yannick Estevez que me brindó asesoría a pesar de la distancia.

Al profesor Luis Fernando Ospina por su orientación y colaboración en el trabajo del bioterio.

A la profe Maritza Rojas por su comprensión, apoyo y buenos consejos.

Al profesor Javier Rincón por su disposición en todo momento para resolver dudas y por darme ánimo.

A mis grandes y verdaderos amigos Juank, Carlos Rodríguez, Alexa, Dieguito, César Castillo, Edwin Corredor, por todo el apoyo, por su paciencia y porque a pesar de no compartir este espacio académico siempre han estado dispuestos a ayudarme de una y mil maneras.

Al grupo de Investigación FaMeTra Farmacología de Medicina Tradicional y Popular, por el apoyo con recursos físicos y financieros para la realización de los ensayos de actividad biológica.

A los profesores del departamento de farmacia por sus enseñanzas y acompañamiento.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron parte de la realización de este proyecto.

Al programa Joven Investigador de Colciencias por su apoyo a través de la convocatoria 617 de 2013.

A la Universidad Nacional de Colombia, por la formación académica durante mi maestría y a la Universidad Distrital Francisco José de Caldas donde inicié mi formación profesional.



## Resumen

El presente estudio buscó contribuir a la validación del uso de una preparación tradicional a base de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, empleada como antimalárico por la comunidad Ciudad Hitoma del Amazonas Colombiano. Para lo cual se evaluó comparativamente la actividad farmacológica y el perfil fitoquímico preliminar del remedio tradicional con respecto a extractos primarios obtenidos en laboratorio por técnicas de extracción reflujo y percolación.

Para la evaluación de la actividad antimalárica, se emplearon los modelos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* actualmente optimizados por el grupo de investigación FaMeTra; a través del ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo del parásito empleando la cepa FCR-3 de *Plasmodium falciparum* y del modelo de malaria murina “Test de Peters” cepa *P. berghei* ANKA respectivamente.

Las pruebas sugieren que tanto el remedio original de la comunidad como los extractos presentan nivel de actividad *in vitro* e *in vivo* buena a moderada según los criterios de la red RITAM, validando la actividad del remedio en estos modelos.

Se determinó a través de cromatografía en capa delgada CCD; la presencia de una mezcla de compuestos tipo esteroide y alcaloide que presentan alta similitud en las tres preparaciones, y a los cuales puede atribuirse la actividad farmacológica. Por lo tanto se logra obtener una preparación de laboratorio que mantiene las características fitoquímicas globales de la preparación tradicional y la actividad biológica, evidenciando que el tipo de extracción no afecta la actividad de las preparaciones frente a las cepas empleadas.

La especie vegetal puede considerarse de interés farmacológico no solo para la validación de su uso tradicional sino además para el uso sostenible de recursos naturales accesibles para el tratamiento de la enfermedad en zona endémica.

**Palabras clave:** Malaria, plantas medicinales, medicina tradicional, etnofarmacología, antimaláricos, *Plasmodium*.

## Abstract

The aim of the present paper was to contribute to the validation of the use of a *Curarea toxicofera* (wedd) based traditional preparation utilised as antimalarial by the community of Colombian Amazon "Ciudad Hitoma". For this, comparative evaluation of remedy's pharmacological activity and its preliminary phytochemical profile was performed regarding its primary extracts obtained in the laboratory throughout reflux and percolation extraction techniques.

To evaluate the antimalarial activity, *in vitro* and *in vivo* pharmacological models, adapted and optimised by FaMeTra Research Group, were carried out, through the inhibition test of parasite's invasion and development using FCR-3 *Plasmodium falciparum* strain; and the murine malaria "Peter's Test" using *P. berghei* ANKA strain.

The results suggested that both the original remedy and its extracts show good to moderate *in vitro* and *in vivo* activity, according to RITAM's criteria, thus validating remedy's activity in this models.

Through Thin-Layer Chromatography TLC, it was found a mixture of steroid and alkaloid type compounds qualitatively similar in all three preparations which may be connected with its pharmacological activity. As a result, it was possible to obtain a lab preparation that maintains the phytochemical features and biological activity of the traditional preparation, showing that the type of extraction does not affect the activity of the preparations face to the parasite strains used.

The plant may be considered of pharmacological interest, not only to validate its traditional use but also for the sustainable use of accessible natural resources for treating the disease in endemic area.

**Keywords:** Malarial, medicinal plants, tradicional medicine, ethnopharmacology, antimalarials, *Plasmodium*.

# Contenido

	Pág.
Resumen .....	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas .....	XII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIII
Introducción .....	1
Objetivos.....	4
Objetivo General .....	4
Objetivos Específicos .....	4
<b>1. 1. Marco Teórico.....</b>	<b>5</b>
1.1 Generalidades de la Malaria .....	5
1.1.1 Malaria en la actualidad .....	6
1.2 El parásito.....	7
1.2.1 Ciclo de vida del parásito .....	8
1.3 El vector .....	9
1.4 Terapéutica y resistencia a fármacos.....	9
1.5 Medicina tradicional.....	11
1.5.1. Comunidades indígenas en Colombia .....	13
1.6. <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff.....	14
1.7 Alcaloides .....	16
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>18</b>
2.1 Aproximación a la comunidad indígena .....	18
2.1.1 Preparación de remedio tradicional .....	18
2.2 Preparación de extractos .....	19
2.3 Análisis fitoquímico preliminar.....	20
2.4 Evaluación de la actividad antiplasmodial.....	21
2.4.1 Determinación de la densidad parasitaria método visual por tinción de Giemsa (microscopía) .....	22
2.4.2 Determinación de la densidad parasitaria por el método fluorométrico.....	23
2.5 Evaluación de la actividad antimalárica .....	23
2.6 Actividad hemolítica.....	26
2.7 Análisis estadístico de los datos .....	27

<b>3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>28</b>
3.1	Acercamiento a la Comunidad.....	28
3.2	Recolección de material y preparación de remedio tradicional .....	31
3.2.1	Extractos primarios LR y PA .....	35
3.3	Caracterización fitoquímica preliminar .....	36
3.3.1	Identificación de Alcaloides.....	37
3.3.2	Identificación de Flavonoides.....	38
3.3.3	Identificación de esteroides y triterpenos .....	39
3.4	Evaluación de la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> .....	40
3.5	Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vivo</i> .....	41
3.6	Actividad Hemolítica .....	44
<b>4.</b>	<b>Discusión de resultados.....</b>	<b>45</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y perspectivas.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
5.1	Conclusiones.....	51
5.2	Recomendaciones y perspectivas .....	52
<b>A.</b>	<b>Anexo 1. Reactivos Reveladores. ....</b>	<b>53</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo 2. Protocolo de actividad antimalárica <i>in vitro</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo 3. Protocolo de manejo y mantenimiento de cultivo de <i>Plasmodium</i> ..</b>	<b>58</b>
<b>D.</b>	<b>Anexo 4. POE para evaluación de actividad hemolítica.....</b>	<b>65</b>
<b>E.</b>	<b>Anexo 5. Plegable socialización de resultados previos con la comunidad.....</b>	<b>68</b>
		<b>70</b>
<b>F.</b>	<b>Anexo 6. Consentimiento previo .....</b>	<b>71</b>
<b>G.</b>	<b>Anexo 7. Clasificación taxonómica .....</b>	<b>72</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>73</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1-1.</b> Morfología de cuatro especies de <i>Plasmodium</i> causantes de malaria en humanos..	7
<b>Figura 1-2.</b> Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i> .....	8
<b>Figura 1-3</b> Estructura química de fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria. ..	10
<b>Figura 1-4.</b> Diversidad estructural de alcaloides bencilsioquinolínicos. ....	16
<b>Figura 2-1.</b> Infección vía intraperitoneal. ....	24
<b>Figura 3-1.</b> Algunas comunidades ubicadas dentro del resguardo Indígena Ticuna-Huitoto.....	29
<b>Figura 3-2.</b> Colecta de <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff .....	32
<b>Figura 3-3.</b> Ejemplar de herbario <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff. ....	32
<b>Figura 3-4.</b> Preparación del remedio tradicional (COM) por parte del abuelo Hitoma.....	34
<b>Figura 3-5.</b> Montajes de extracción.....	35
<b>Figura 3-6.</b> Identificación Fitoquímica de Alcaloides. ....	37
<b>Figura 3-7.</b> Identificación fitoquímica de flavonoides.....	38
<b>Figura 3-8.</b> Identificación Fitoquímica de Esteroides y triterpenos. ....	39
<b>Figura 3-9.</b> Gráficas concentración- respuesta. Lectura por microscopia.....	40
<b>Figura 3-10.</b> Porcentajes de inhibición de la parasitemia por tratamiento, ensayo <i>in vivo</i> .....	42
<b>Figura 3-11.</b> Seguimiento de supervivencia de los animales.....	43

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1.</b> Fármacos antimaláricos, y algunos reportes de resistencia. ....	11
<b>Tabla 1-2.</b> Relación de las plantas medicinales estudiadas y su utilización en la medicina tradicional cubana. ....	12
<b>Tabla 1-3.</b> Clasificación taxonómica <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd.) Barneby & Krukoff. ....	15
<b>Tabla 1-4.</b> Sinónimos de <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd.) Barneby & Krukoff. ....	15
<b>Tabla 1-5.</b> Alcaloides bencilisoquinolínicos de interés farmacológico .....	17
<b>Tabla 2-1.</b> Condiciones para caracterización fitoquímica preliminar por CCD. ....	20
<b>Tabla 2-2.</b> Criterios de clasificación en nivel de actividad en el modelo <i>in vitro</i> . ....	22
<b>Tabla 2-3.</b> Criterios de clasificación en nivel de actividad en el modelo <i>in vivo</i> . ....	25
<b>Tabla 3-1.</b> Porcentaje de rendimiento extractos obtenidos .....	36
<b>Tabla 3-2.</b> Resultados caracterización fitoquímica preliminar de las diferentes formas de preparación de los extractos. ....	36
<b>Tabla 3-3.</b> $CI_{50}$ de las preparaciones evaluadas en el ensayo de Inhibición de la invasión y el desarrollo de <i>P. falciparum</i> cepa FCR-3. ....	41
<b>Tabla 3-4.</b> Porcentajes de parasitemia ensayo <i>in vivo</i> . ....	42
<b>Tabla 3-5.</b> Niveles de actividad para cada tratamiento evaluado. ....	43
<b>Tabla 3-6.</b> Resultados ensayo de hemólisis. ....	44

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

Abreviatura	Término
ABI	Alcaloide bencilisoquinolínico
ABS	Absorbancia
ACT	Terapia combinada con artemisinina
COM	Preparación de <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff, proveniente de la comunidad Indígena
°C	Grado Celsius
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CH <sub>50</sub>	Concentración Hemolítica 50
COL	Numero de colección en Herbario Nacional Colombiano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CQ	Cloroquina
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetil sulfoxido
FaMeTra	Farmacología de la medicina tradicional y popular
FCR-3	Cepa de <i>P. Falciparum</i> (Gambia)
G	Gravedades
GRP	Glóbulos Rojos Parasitados
GRS	Glóbulos Rojos Sanos
GPS	Global Position System
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
ICR	<i>Institute of Cancer Research</i>

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
ABI	Alcaloide bencilisoquinolínico
INCORA	Instituto Colombiano de la Reforma Agraria
INS	Instituto Nacional de Salud
IP	Intraperitoneal
Kg	Kilogramos
Log	Logaritmo
LR	Preparación de <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff, realizada en el laboratorio bajo condiciones de reflujo
Min	Minuto
MI	Mililitros
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
Nm	Nanometros
NP/PEG	Reactivo Natural products (Difenilboriloxietilenamina)/Polietilenglicol4000
OMS	Organización mundial de la Salud
ONIC	Organización Nacional de Indígenas de Colombia
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PA	Preparación de <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff realizada en el laboratorio bajo condiciones de percolación
PBS	Solución tampon de fosfatos
PFT	Productos fitoterapeuticos tradicionales
Rend.	Rendimiento
RITAM	<i>Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods</i> (Iniciativa de Investigación sobre Métodos antipalúdicos tradicionales)
Rpm	Revoluciones por minute
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SGI	SYBR Green I
SIVIGILA	Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública
µl	Microlitros

# Introducción

Colombia es un país con características geográficas, ambientales y epidemiológicas propicias para la transmisión de la malaria. Cerca del 85% del territorio rural colombiano está situado por debajo de los 1.500 metros sobre el nivel del mar, teniendo como consecuencia de manera aproximada que el 60% de la población se encuentre en riesgo de enfermar por esta causa. Según el boletín epidemiológico semanal de la Dirección de Vigilancia y Análisis del riesgo en Salud Pública del INS, hasta la semana epidemiológica 36 de 2015 (06 a 12 de septiembre de 2015), se notificaron al SIVIGILA 30.876 casos de malaria no complicada y 577 casos de malaria complicada, además de nueve casos de muertes en estudio por malaria. Según las últimas estimaciones, a nivel mundial se produjeron 214 millones de casos de paludismo en 2015 que ocasionaron la muerte de unas 438.000 personas (INS, 2015).

Adicionalmente dicha patología representa un problema social y económico de gran importancia, se afirma que existe una relación directa entre pobreza y malaria (Sachs & Malaney, P., 2002) así, la falta de una vacuna eficaz, la creciente expansión de parásitos resistentes a antimaláricos comunes y los altos costos del tratamiento, dificultan el control de la enfermedad.

Teniendo en cuenta lo anterior, se hace imperativa la búsqueda de opciones que permitan una mejor intervención en el desarrollo de la enfermedad para lo cual la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la implementación de combinaciones terapéuticas como estrategia en contra del desarrollo de parásitos resistentes y el aprovechamiento del conocimiento de la medicina tradicional acumulado en los habitantes de regiones

donde la malaria es endémica. De esta manera podemos pensar en nuevas alternativas enfocadas al buen uso de los recursos propios del país y a la riqueza en comunidades que desarrollan tratamientos médicos ancestrales, pues como es sabido en Colombia el arraigo tradicional y la relación estrecha entre las poblaciones y la naturaleza en muchos casos es marcada.

El acercamiento a la comunidad indígena Ciudad Hitoma se ha venido adelantando por parte del grupo de investigación FaMeTra desde hace más de 12 años; por lo tanto se han consolidado relaciones de confianza con dicha población, generando oportunidades de investigación. En consecuencia, trabajos precedentes adelantados por el grupo de investigación, son un importante punto de partida.

Teniendo en cuenta resultados previos del grupo de investigación (Cárdenas, P., 2011) y basados en la cultura, creencias, rituales y demás elementos que giran alrededor de las prácticas recurrentes de la comunidad indígena, se tuvo acceso a un remedio preparado por el médico tradicional. Por lo tanto se registra el uso de un bejuco conocido en la región el cual es empleado en decocción para lograr remisión en los pacientes con malaria, especie vegetal *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff.

En consecuencia se obtiene la preparación tradicional y se proponen estrategias metodológicas para su reproducción a nivel de laboratorio (extracto primario), realizando la caracterización de éstas, mediante algunas técnicas fitoquímicas y protocolos de evaluación de actividad antimalárica como son: actividad antiplasmodial *in vitro* empleando el modelo de cultivo de *P. falciparum* y evaluación la actividad antimalárica *in vivo*, mediante el modelo de malaria murina donde el indicativo de eficacia es el porcentaje de inhibición de la parasitemia.

Con el presente trabajo además de contribuir a la validación del uso de esta preparación por parte de la comunidad, se buscó documentar su uso dado el panorama de la pérdida de interés de las presentes generaciones hacia la medicina tradicional; generando aportes relevantes en el campo de la etnofarmacología como disciplina emergente en nuestro país. Así mismo se aporta y motiva la investigación de otras preparaciones

tradicionales de diversas comunidades reconociendo el potencial de la sabiduría ancestral y procurando el cuidado y conservación de este conocimiento y de la población que lo posee.

El trabajo con la comunidad permite evidenciar problemas epidemiológicos y sociales de importancia en el territorio nacional, con lo cual la iniciativa de investigar patologías como la malaria en zonas endémicas sensibiliza a los investigadores a realizar aportes para mejorar la calidad de vida de las personas en estas comunidades, convirtiéndose en una meta personal que trasciende al alcance de los objetivos de este proyecto.

Finalmente, se retornaron resultados a la comunidad bajo los lineamientos del Protocolo de Nagoya, promoviendo una política de investigación transparente que pretende dejar espacios abiertos para futuras oportunidades.

# Objetivos

## Objetivo General

Evaluar comparativamente la actividad antimalárica y el perfil fitoquímico preliminar de un remedio antimalárico tradicional con respecto a un extracto primario; documentando su preparación y contribuyendo en la validación de su uso.

## Objetivos Específicos

- Profundizar el acceso a una comunidad indígena y estudiar su conocimiento tradicional relacionado con terapias frente a malaria.
- Generar a partir de material vegetal seleccionado según las indicaciones del médico tradicional, colectado e identificado, un extracto primario que reproduzca las condiciones del remedio tradicional.
- Evaluar *in vitro* la actividad antiplasmodial del remedio tradicional y del extracto primario.
- Evaluar *in vivo* la actividad antimalárica del remedio tradicional y del extracto primario.
- Determinar perfiles cromatográficos preliminares del remedio tradicional y el extracto primario.

# 1.1. Marco Teórico

## 1.1 Generalidades de la Malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria que se produce en las regiones ecuatoriales del mundo, es potencialmente mortal; alrededor de 3.200 millones de personas están expuestas. En 2015 hubo unos 214 millones de casos de la enfermedad, que según las estimaciones, costaron la vida a 438 000 personas (OMS, 2015).

Los más afectados son los niños menores de 5 años y las mujeres embarazadas, todos los días mueren en el mundo 3.000 niños a causa de esta enfermedad (Nguta, J., *et al.*, 2010); al año mueren 200.000 lactantes como consecuencia de la adquisición de la enfermedad durante el embarazo y las tasas de mortalidad materna se calculan entre 10 y 50% (OMS, 2013).

A pesar de la variación epidemiológica de la malaria, la carga de la enfermedad se está reduciendo notablemente en muchos lugares; un diagnóstico oportuno y un tratamiento adecuado pueden evitar la muerte contribuyendo en la reducción de su transmisión, ejemplo de ello es la disminución en la mortalidad de los infantes en al menos un 65%. (OMS, 2015), para lo cual el aumento de las medidas de control y prevención adquieren gran importancia. Así, muchas de las regiones afectadas deben dar prioridad a la reducción de la mortalidad y la morbilidad antes de aspirar a la eliminación, lo que quiere decir cero incidencias de casos locales (Chilengi, R & Gitaka, J., 2010).

La enfermedad es transmitida al ser humano por la picadura del mosquito hembra de *Anopheles*, que previamente ha tenido contacto sanguíneo con un hospedero humano ya infectado; es producida por parásitos del genero *Plasmodium*. La transmisión se ve favorecida por las épocas de lluvia, en condiciones de temperatura y humedad adecuadas para la reproducción del vector. Entre los principales síntomas se encuentran la fiebre aguda, dolor de cabeza, escalofríos y vómitos; síntomas que pueden aparecer entre los 7 y 10 días después de la picadura del vector de transmisión (Flores, A., *et al.*, 2001). Un diagnóstico realizado a tiempo puede evitar casos graves que pueden desencadenar incluso en la muerte.

### 1.1.1 Malaria en la actualidad

Se tienen cifras estimadas de transmisión de malaria, para el año 2014, 97 países y territorios tenían transmisión en curso (OMS, 2015); el mayor porcentaje de muertes se presenta en el África siendo cerca del 90% (UNICEF, 2013). No obstante, el continente asiático, América Latina, en menor medida el Medio Oriente y partes de Europa también se ven afectados. Existen estimaciones que indican una tendencia a la disminución de casos entre el 2000 y el 2013 en un 30% y un porcentaje cercano a 50% en cuanto mortalidad. Manteniéndose el ritmo anual de disminución de los últimos 13 años, para el 2015 la incidencia de malaria se redujo en un 37% a nivel mundial y las tasas de mortalidad en un 60% (OMS, 2015).

En la región de las Américas, después de Brasil con aproximadamente el (42%) de los casos, Venezuela es el segundo país con mayor número de casos (18%), y se reporta Colombia con (12%) de los casos (OMS/OPS, 2015). En años anteriores se registraba Bolivia (1,9%) y Ecuador (1,1%), así como el Caribe, principalmente Haití (2,8%), y algunos países de Centroamérica, Guatemala (3,8%), Panamá (0,4%) y Honduras (1,5%). Un número limitado de casos (0,3%) también se informó en México (Arévalo-Herrera M., *et al.*, 2012).

En Colombia particularmente hay predominio de la enfermedad en regiones con altitud inferior a 1.000 m.s.n.m, aspectos que entre otros favorece la transmisión, constituyéndose un perfil ecoepidemiológico específico y propicio. Áreas rurales con cerca de 100 municipios son zonas predominantes, con cargas de enfermedad del 95%, enmarcadas en tres principales focos de producción y dispersión de la enfermedad: el foco de Urabá - Bajo Cauca – Sur de Córdoba; el foco de la Costa Pacífica y el foco de transición de la Orinoquia-Amazonia (INS/OPS, 2015).

Aun teniendo en cuenta el subregistro en la notificación del lugar de origen de los casos de malaria, se tiene por generalidad que las condiciones ecológicas, sociales, culturales y geográficas son determinantes para una alta dispersión de la enfermedad (INS, 2013). Según (Sachs & Malaney, P., 2002) “*Cuando la malaria prospera más, las sociedades humanas han prosperado menos*”. Existe una relación directa entre la pobreza, la malaria y su distribución a nivel mundial. El crecimiento económico en bajas tasas que presentan los países con la enfermedad endémica, es una de las evidencias de este fenómeno; padecer la enfermedad afecta el desarrollo demográfico, la productividad laboral, el ahorro, la inversión e incluso el hecho mismo de la fertilidad autónoma y responsable (Sachs & Malaney, P., 2002).

## 1.2 El parásito

La enfermedad es producida por protozoos del género *Plasmodium* que incluye más de 100 especies de las cuales 22 infectan a primates no humanos y 82 son patógenos de reptiles y aves (Cox, F., 2002). Cuatro especies de parásitos pueden infectar al ser humano: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malarie* y *Plasmodium falciparum*, siendo esta última la especie más patógena y mortal para el ser humano, los eritrocitos infectados pueden incluso obstruir vasos sanguíneos a nivel cerebral provocando la muerte (Snow, R., *et al.*, 2004) consultado en (Tuteja, R., 2007). Adicionalmente se tienen reportes acerca de la infección en humanos por *Plasmodium knowlesi*, una especie que causa la malaria en monos y se produce en algunas zonas boscosas de Asia sudoriental (OMS, 2013).

Las principales diferencias entre estas cuatro especies están relacionadas con su ubicación en zonas geográficas, la apariencia morfológica microscópica que presentan, su potencial de infección y las recaídas que provocan (Tuteja, R., 2007). En la figura 1-1 se presentan características morfológicas de las diferentes especies de *Plasmodium spp.* que afectan al ser humano, estas presentan gran relevancia para el diagnóstico de la enfermedad.

**Figura 1-1.** Morfología de cuatro especies de *Plasmodium* causantes de malaria en humanos. Consultado Enero de 2015.

Adaptado de: <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/447/1/Paludismo.html>.

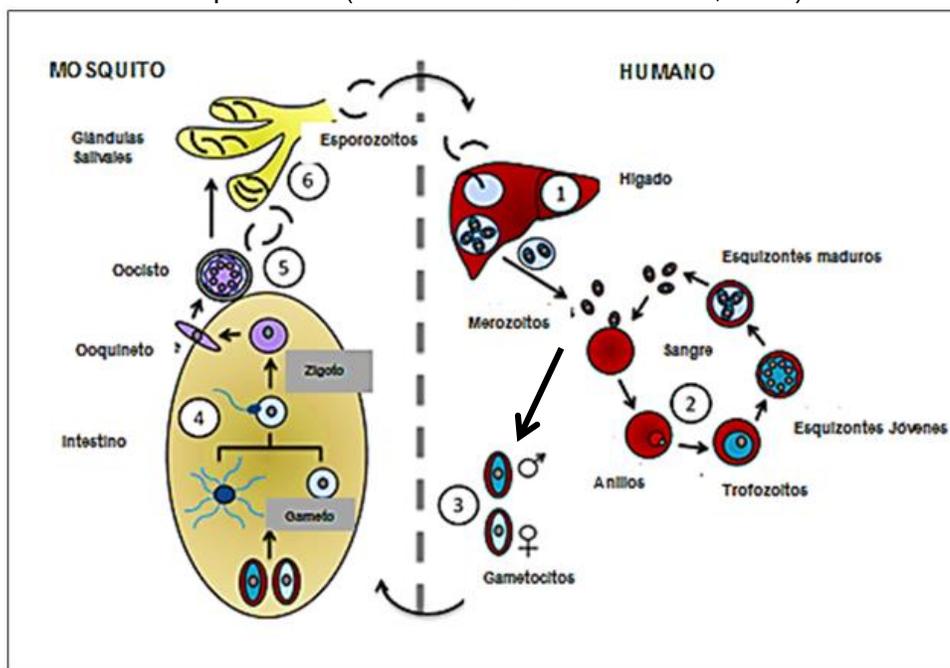
	Gametocitos		Esquizontes		Trofozoitos	
	Femenino	Masculino	Maduros	Inmaduros	Jóvenes	Viejos
P. Falciparum						
P. Vivax						
P. Malarie						
P. Ovale						

### 1.2.1 Ciclo de vida del parásito

La transmisión del *Plasmodium* se da por la picadura de hematófagos antropofílicos del género *Anopheles*. Una vez el mosquito ha picado a un humano infectado, los gametocitos tomados de este hospedero se desarrollan sexualmente en su tracto digestivo, evolucionan desde ooquinetos pasando por ooquistos hasta llegar a esporozoitos que migran a las glándulas salivales (etapa denominada ciclo esporogónico), siendo inyectados en el torrente sanguíneo de un nuevo hospedero humano (Tuteja, R., 2007) cuando ingresan a este organismo, la migración por fluido sanguíneo les permite la invasión de hepatocitos, en donde tiene lugar la reproducción asexual del parásito o esquizogonia permitiendo la formación de merozoitos; alcanzada su madurez las células que los contienen se rompen liberándolos a la circulación, así infectan glóbulos rojos en donde se multiplican nuevamente pasando por sus diferentes estadios, anillos, trofozoitos, esquizontes y finalmente nuevos merozoitos que se liberan e invaden otros eritrocitos, esta fase es la responsable de la sintomatología de la malaria. En cada glóbulo rojo se produce una esquizogonia que da lugar a la formación de 4 a 36 merozoitos en 48-72 horas, según la especie de parásito (Deharo, E., *et al.*, 2000).

La transmisión del parásito entre sus dos hospederos involucra transformaciones morfológicas notables que de manera cíclica se repiten constantemente, tal como lo muestra Figura 1-2

**Figura 1-2.** Ciclo de vida del *Plasmodium*  
Adaptado de: (Aminake & Gabriele Pradel., 2013)



### 1.3 El vector

Existen aproximadamente 400 especies de *Anopheles* alrededor del mundo, de los cuales cerca del 15% son transmisores de la enfermedad en condiciones naturales y un 7,5% se consideran de gran importancia (Tuteja, R., 2007). *Anopheles gambiae* es la principal especie transmisora del *P. falciparum* (Nathan, J., *et al.*, 2014). En Colombia se tienen registros de 43 especies, siendo consideradas como vectores principales *A. albimanus*, *A. darlingi* y *A. nuñez-tovari* (Olano, V., 2001) en (Gómez, G., *et al.*, 2010).

El hospedero invertebrado se reproduce en el agua y se ve favorecido por condiciones de temperatura, precipitaciones y humedad, de esta manera la epidemiología de la enfermedad se encuentra estrechamente relacionada con condiciones climáticas y geográficas (Tellez, J., *et al.*, 2004). En muchos lugares la transmisión es estacional, en muchos otros pueden presentarse picos durante y después de la época de lluvia; así, puede estimarse que aproximadamente la mitad de la población mundial está en riesgo por lo que se establece incluso como un problema de salud pública.

Teniendo en cuenta la problemática que representa la malaria para el mundo entero, se tienen previstas diferentes estrategias para el control de la enfermedad, entre las que se contempla la prevención de la picadura a través del control del vector mediante el uso de insecticidas de acción residual y de mosquiteros tratados con insecticidas (Guerra, C., *et al.*, 2008). El éxito en el control de la malaria hasta la fecha es consecuencia en gran parte de la lucha contra los vectores, no obstante se ha determinado en varios países resistencia a los piretroides que son actualmente los insecticidas recomendados (Flores, A., *et al.*, 2001).

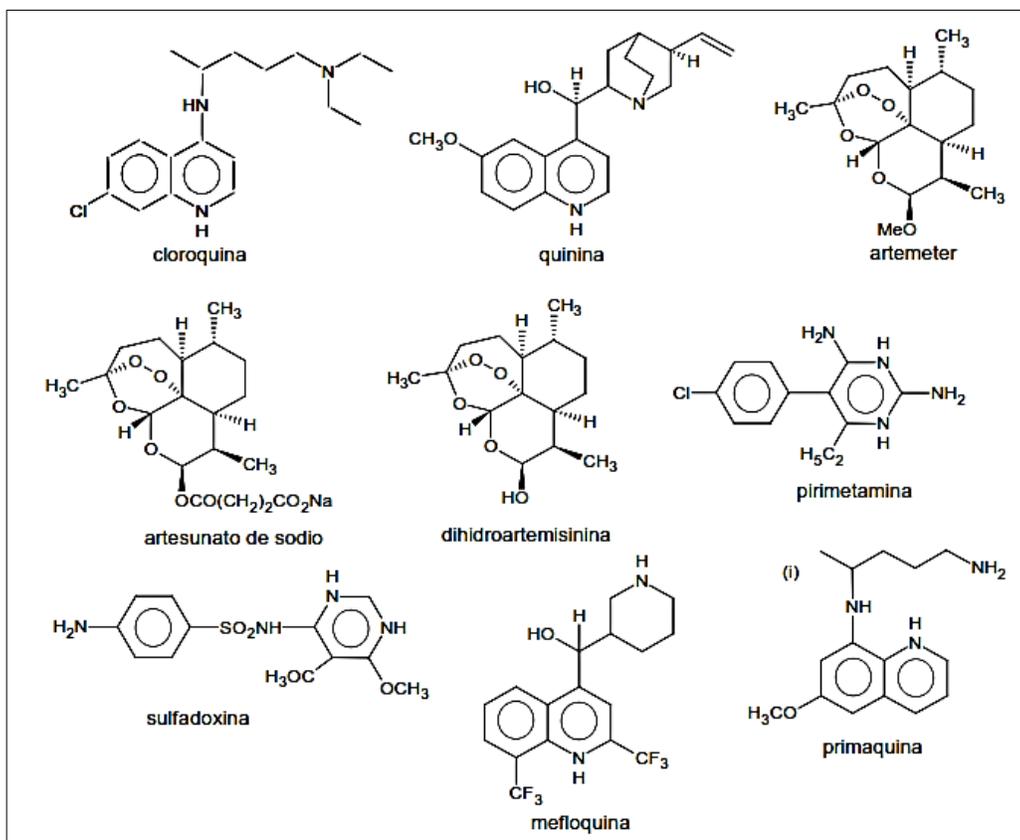
### 1.4 Terapéutica y resistencia a fármacos

El origen del tratamiento de la malaria en América se remonta hacia inicios del siglo XVII, los indígenas a partir de infusiones de la corteza de un árbol, hoy conocido como *Cinchona*, trataban las fiebres. Medio siglo después científicos franceses aislaron la quinina como compuesto que se constituiría por largo tiempo como el primer tratamiento (Deane., 2007).

En la actualidad se conocen fármacos antimaláricos como los derivados quinolínicos (Cloroquina, mefloquina, quinina, amodiaquina), derivados de la artemisinina (Artemisinina, artemeter, artesunato) y los antifolatos (pirimetamina, proguanil).

Los antimaláricos pueden ser clasificados según el estadio del parásito sobre el cual actúan y el sitio donde atacan al parásito. A partir de estos criterios, los fármacos utilizados en la quimioterapia de esta enfermedad se dividen en: esquizonticidas sanguíneos; esquizonticidas tisulares y esquizonticidas sanguíneos de acción lenta (Pascual., 2000). En la figura 1-3 se presenta la estructura química de algunos de estos fármacos.

**Figura 1-3** Estructura química de fármacos utilizados en el tratamiento de la malaria. Adaptado de (Winstanley, P., 2000).



A pesar del arsenal de moléculas con actividad antimalárica, hoy por hoy se viene manifestando farmacorresistencia, que puede ser atribuida a factores como el perfil de inmunidad del individuo, propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco, monoterapia fallida, entre otros. Las infecciones producidas por parásitos resistentes conllevan a que la resistencia se difunda a la siguiente generación o progenie, de manera que la infección continúa y consigo la resistencia; de esta manera reaparece la parasitemia, el estado anémico del paciente empeora, y se propaga la infección de gametocitos resistentes desencadenando fracasos terapéuticos en posteriores infecciones (Aminake & Gabriele Pradel., 2013).

En la Tabla 1-1 podemos evidenciar los principales tratamientos y algunas de sus características.

**Tabla 1-1.** Fármacos antimaláricos, y algunos reportes de resistencia.  
Adaptado de (Aminake & Gabriele Pradel, 2013).

Fármaco	Tipo	Recomendación	Diana Farmacológica	Resistencia
Cloroquina	Quinolínicos	Malaria, <i>vivax</i>	Estadio Sanguíneo	1950's
Mefloquina		Malaria no complicada como ACT		1990's
Quinina		Malaria Severa		Raro
Primaquina		<i>Malaria vivax y ovale</i> ; como Gametocida malaria por <i>falciparum</i>	Estadio hepático y gametocitos	Poco claro
Artemisinina	Derivados de artemisinina	Principal componentes de los ACT's	Estadio sanguíneo y gametocitos	Poco claro
Artemeter		Malaria no complicada como ACT		
Artesunato				
Sulfadoxina /pirimetamina	Antifolato	Malaria no complicada como ACT	Estadio Sanguíneo	1970's

El fenómeno de resistencia es creciente y recurrente lo que conlleva a la urgente necesidad de plantear y desarrollar otras estrategias terapéuticas, diversas alternativas (Muregi, F., *et al.*, 2007) en (Nguta, J., *et al.*, 2010), en las que pueda incluso emplearse medicamentos occidentales en combinación con nuevos tratamientos (Zowai, J., *et al.*, 2003), que además pongan en consideración la gravedad del estado clínico del paciente y reconozcan la biología del parásito (Garavito, G., 2007).

## 1.5 Medicina tradicional

La civilización humana desde la antigüedad ha hecho uso de plantas, animales o minerales con fines terapéuticos pues los productos naturales eran las únicas fuentes de medicación que se tenían (Bourdy, G., *et al.*, 2008). Muchas enfermedades tropicales en todo el mundo, incluida la malaria, se han tratado con medicina tradicional. En la Tabla 1-2 se tienen ejemplos de especies vegetales usadas en la medicina tradicional cubana para tratamientos relacionados con esta enfermedad (Rodríguez – Pérez., *et al.*, 2006).

**Tabla 1-2** Relación de las plantas medicinales estudiadas y su utilización en la medicina tradicional cubana.

Adaptado: (Rodríguez – Pérez., *et al.*, 2006)

<b>Especie (Familia)</b>	<b>Nombre común</b>	<b>Utilización tradicional</b>
<i>Parthenium hysterophorus</i> (Asteraceae)	Escoba amarga	Febrífugo, antipalúdico, contra afecciones de la piel como sífilis, herpes, tiña, etc. Es tónico y estimulante estomacal
<i>Bambusa vulgaris</i> (Graminaceae)	Caña brava	Para las fiebres palúdicas. Es depurativa y diurética
<i>Artemisia absinthium</i> (Asteraceae)	Insienso ajeno	Febrífuga, tónica y vermífuga. Estimulante y emenagoga
<i>Indigofera suffruticosa</i> (Fabaceae)	Añil cimarrón	Se usa como febrífugo (para fiebres intermitentes) y antiparasitario (insecticida poderoso en pediculosis y sarna)

Fuentes naturales dieron origen a las dos principales familias de compuestos antimaláricos (quinina de *Cinchona* spp., y artemisinina de *Artemisia annua*), en consecuencia, las plantas podrían dar origen a otros medicamentos contra estas patologías (Willcox, M., *et al.*, 2001). Sin embargo, la eficacia y los componentes activos de origen vegetal en general no se han estudiado de forma sistemática (Phillipson, J., 1994).

En virtud de lo señalado, toma fuerza el conocimiento en el campo de la medicina tradicional a la que suelen también denominar medicina alternativa o complementaria, que se encuentra definida por la (OMS, 2008) como: “*suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales*”. Ahora bien cuando los ingredientes activos de las preparaciones son partes de plantas u otras materias vegetales, se denomina medicina herbaria siendo precursora de la fitoterapia.

En muchos países desarrollados, del 70% al 80% de la población ha recurrido alguna vez de una u otra forma a éste tipo de medicina (Zirih, G., *et al.*, 2005) en (Mesquita, M., 2006). Con el fin de favorecer la conservación del conocimiento de la medicina tradicional y el uso de la misma, la OMS planteó políticas para ofrecer un marco regulador. En Colombia desde el año 2004 entró en vigor el Decreto 2266 que dio origen a los productos fitoterapéuticos tradicionales (PFT). La fabricación a nivel Nacional de los PFT y el uso de materias primas cultivadas en el país son parámetros en consonancia con lo propuesto en el marco del decreto mencionado (Guevara, H., *et al.*, 2010).

Por otra parte, las investigaciones que se adelantan actualmente en los productos naturales de origen vegetal pretenden, entre otros, aportar en la validación científica de tratamientos herbolarios, además de recuperar y conservar el conocimiento tradicional. La recientemente galardonada premio Nobel de medicina Tu Youyou en su investigación

evidencia que debió retornar los textos de la medicina tradicional china para lograr el aislamiento de la Artemisinina.

Este conocimiento puede aprovecharse en programas de salud con bajos costos (Aragadvay, P., 2009); como lo enuncia (Plotkin, M., 2001) *“Las fronteras más prometedoras para la investigación de plantas implican probar materiales nuevos, prestando bastante atención a la preparación de las recetas por parte de los curanderos, teniendo en cuenta incluso los aditivos empleados, de repente pretendiendo no buscar un solo compuesto que presente actividad como si fuese una bala mágica”*.

Con esto en mente es preciso documentar el conocimiento ancestral de los pueblos indígenas que están desapareciendo como consecuencia del desplazamiento forzado o falta de garantías para la vida, y a su vez se pierde con el paso de las generaciones pues los jóvenes presentan desinterés creciente hacia sus temas terapéuticos, culturales, religiosos entre otros.

Consecuentemente surge la necesidad de documentar estas prácticas tradicionales antes de que desaparezcan; por lo tanto una articulación entre el enfoque científico de la sociedad y la cultura con respecto al estudio de los factores ambientales físicos, químicos y biológicos de la materia viva se considera importante y en ella podemos enmarcar el concepto de etnofarmacología, en la cual se privilegian los aportes culturales en el campo de la etnomedicina cobrando relevancia la concepción de enfermedad, su representación en el cuerpo, la forma de tratarla y las rutas terapéuticas a emplear. Puede definirse también como la evaluación de la acción farmacológica de los recursos en los organismos vivos y el estudio de la acción de los remedios, además de la identificación botánica, zoológica o química de los componentes activos de las preparaciones y la racionalización de los regímenes terapéuticos; así *“la etnofarmacología es por naturaleza interdisciplinaria y trata de articular dos puntos de vista, uno cultural y otro biológico, en un enfoque complementario”*. Existen diferentes metodologías para aproximarnos a la etnofarmacología que partiendo del análisis de las prácticas en general desarrolladas al interior de una comunidad, se pueden centrar en una enfermedad precisa, o bien, desde el interés en especies de las que no se conoce aún su utilidad (Bourdy, G., et al., 2008).

### **1.5.1. Comunidades indígenas en Colombia**

La nación colombiana es hoy en día producto del más variado mestizaje, donde interactúan la cultura y las tradiciones de los pueblos americanos, europeos y africanos; esta situación de diversidad la hace privilegiada respecto de los demás países del mundo. Desde la época de la conquista hasta la actualidad la población indígena se ha visto ampliamente disminuida. Según el censo general 2005 en Colombia residen 87 pueblos indígenas, sus resguardos están constituidos legalmente, ubicados de preferencia en zona rural, en selvas, sabanas naturales y ecosistemas afines. Los departamentos con mayor porcentaje de indígenas son Guainía, Vaupés, Guajira, Amazonas, Vichada, Cauca y Nariño.

Los departamentos de Guajira, Cauca, y Nariño concentran aproximadamente la mitad de los indígenas del país. Se reporta en el Amazonas cerca del 43,43% de población indígena, lo que sugiere inminente riqueza cultural, conocimientos ancestrales de gran valor y valiosas tradiciones (DANE, 2007). Es preciso recordar que Colombia atraviesa por un periodo de crisis que amenaza constantemente la integridad de las comunidades indígenas en la actualidad.

La comunidad ciudad Hitoma está ubicada en el km 7 vía Leticia-Tarapacá, descienden de los Muinane, pertenecientes a la comunidad lingüística Bora, su denominación significa “*hombre de la desembocadura del río*”. Se piensa como fundamental la utilización de plantas sagradas dentro de su vida cultural y social (Arango, R & Sánchez, E., 1997), como lo es para la mayoría de pueblos que habitan la región del Amazonas. Se ha evidenciado que la medicina tradicional no sólo es utilizada por la población indígena, sino también por los colonos que acuden a ellos, abriendo espacios importantes en el campo de la medicina occidental, logrando de esta manera el reconocimiento externo de sus prácticas de medicina tradicional indígena (Cárdenas, P., 2011).

## 1.6. *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff.

Pertenece a la familia de las menispermáceas, es una planta trepadora vigorosa en forma de liana, es nativa de las zonas bajas de los Andes. La familia se caracteriza por tener porte leñoso de hojas alternas, pecioladas, penninervadas, paralelinervadas o más comúnmente palmatinervadas, enteras o pinatilobuladas o compuestas, presentan flores: pequeñas, verdosas, amarillentas o blanquecinas, dispuestas en racimos (Jacques, F & Bertolino, P., 2008). Esta vegetación es característica del bosque húmedo y se encuentra distribuida en países como Bolivia, Brasil, Perú y Colombia. La clasificación taxonómica de la especie se presenta en la Tabla 1-3.

Entre algunos de los usos comunes de especies de esta familia se encuentran las decocciones para regular la menstruación, para tratar síntomas del reumatismo, e incluso como purga. El conocido alcaloide (tubocurarina) que constituye uno de los principios activos del curare, se encuentra presente en las hojas de *Chondrodendrum tomentosum* Ruiz & Pavón, y es muy usado por los indígenas en sus flechas para cazar por ser un potente relajante muscular que incluso puede causar colapso cardíaco (Betcher., A., 1977) consultado en (Carod-Artal, F., 2012).

En el género *Curarea* se encuentran *Curarea cuatrecasassi*, *Curarea candicans*, *Curarea tecunarium* y *Curarea toxicofera*. Para la familia de las menispermáceas se reportan estructuras alcaloidales, saponinas y algunas sustancias tóxicas como la picrotoxina (Fuller, T & May McClintock, E., 1986).

**Tabla 1-3.** Clasificación taxonómica *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff.  
Fuente: (ICN, 2015)

<b>Nombre Científico</b>	<b><i>Curarea toxicofera</i></b>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ranunculales
Familia	Menispermaceae
Género	<i>Curarea</i>
Epíteto Específico	<i>Toxicofera</i>
Autor Epíteto Específico	(Wedd.) Barneby & Krukoff

La especie vegetal *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff presenta sinonimias, las cuales se registran en la tabla 1-4 (The plant List, 2013).

**Tabla 1-4.** Sinónimos de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff.

<b>Sinónimos</b>	<b>Fuente</b>	<b>Fecha de reporte</b>
<i>Abuta boliviana</i> Rusby	Memoirs of The New York Botanical Garden	2012-03-23
<i>Chondrodendron bioccai</i> Lusina	Revista do Museu Paulista	2012-03-23
<i>Chondrodendron polyanthum</i> (Diels) Diels	Pflanzenr.	2012-03-23
<i>Chondrodendron toxicoferum</i> (Wedd.) Krukoff & Moldenke	Brittonia	2012-03-23
<i>Cocculus toxicoferus</i> Wedd.	Expédition dans les parties centrales de l'Amérique du Sud	2012-03-23
<i>Hyperbaena polyantha</i> Diels	Verhandlungen des Botanischen Vereins für die Provinz Brandenburg	2012-04-18

Los estudios reportados por la literatura para la especie vegetal en su mayoría responden a aspectos taxonómicos, botánicos y/o biológicos, por lo cual estudios farmacológicos a partir de reportes de la etnofarmacología son de gran importancia para el expediente de esta planta.

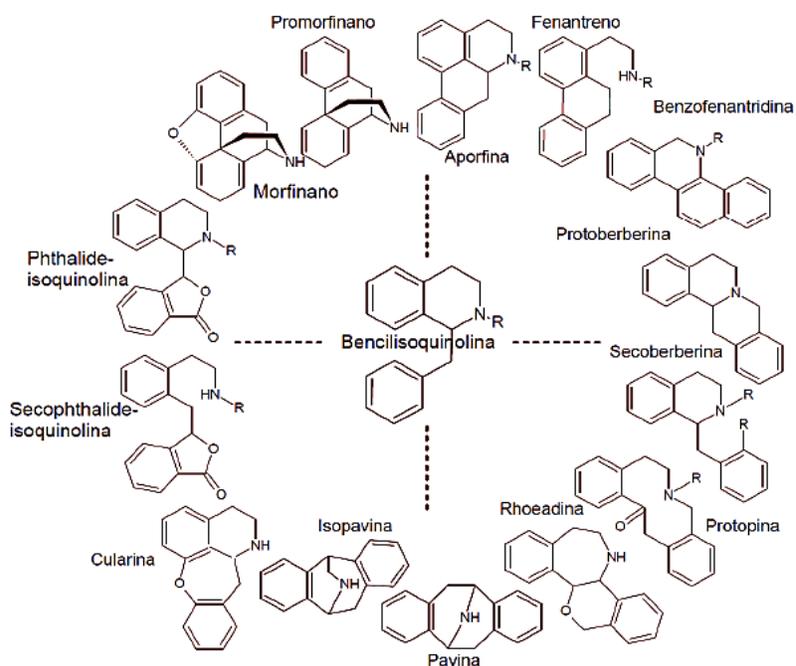
## 1.7 Alcaloides

Los alcaloides son un grupo de metabolitos con gran diversidad estructural y de amplia variedad biológica; es el grupo mas importante entre las sustancias naturales con interés terapéutico. Hacia el año de 1819 el farmacéutico W. Meissner propuso el término alcaloide (de alcalí) para referirse a compuestos provenientes de las plantas con propiedades básicas debido a la presencia de nitrógeno amínico en sus estructuras.

Los aminoácidos son precursores de los alcaloides, una gran variedad de estructuras son derivados de la fenilalanina, tirosina y sus productos de descarboxilación; como ejemplo se tienen las aminas simples o fenil etil aminas, isoquinoleinas simples, derivados bencilisoquinoleinas, alcaloides del opio aporfinoideos entre otros. Estos alcaloides tienen una variada actividad farmacológica, muchos de ellos usados en terapéutica como es el caso de la emetina, morfina, codeína, tubocurarina etc.

El primer alcaloide bencilisoquinolínico (ABI) conocido fue la morfina, aislada del opio por Friedrich Wilhelm Sertürner en 1804, constituyendo todo un suceso en la química de los productos naturales (Schäfer, D., 2007) y (Meyer, A., 2011) en (De la Cruz Chacón, I., *et al.*, 2012). En la actualidad aproximadamente 2.500 estructuras tienen común característica la presencia de un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro bencil, en la figura 1-4 podemos observar diversas estructuras asociadas a este tipo de alcaloides.

**Figura 1-4.** Diversidad estructural de alcaloides bencilisoquinolínicos.  
Fuente: (De la Cruz Chacón, I., *et al.*, 2012)



Las principales familias de plantas en las cuales se encuentran las más de 400 estructuras alcaloides con núcleo benciltetrahidroisoquinoleinas, son las menispermáceas (alrededor de 25 géneros), ranunculáceas, berberidáceas, monimiáceas, anonáceas y Lauráceas.

Existen algunas reacciones para la valoración cualitativa de estos metabolitos, se basan en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno; en general se tiene como prueba positiva la formación de precipitados, estas son pruebas sencillas de realizar (Arango, G., 2002).

A inicios del siglo XIV con el aislamiento de los primeros alcaloides en Europa se iniciaron estudios sobre sus propiedades, por lo cual surgió un interés por desarrollar análisis en la flora de países de todo el mundo, que pudieran ser útiles como medicamentos. (Bick I. R., 1996). Especies vegetales han dado origen a reconocidos ABI con propiedades farmacológicas importantes como muestra la tabla 1-5.

**Tabla 1-5.** Alcaloides bencilisoquinolínicos de interés farmacológico (Singla, D., *et al.*, 2010) en (De la Cruz Chacón, I., *et al.*, 2012)

<b>Alcaloide</b>	<b>Actividad farmacológica</b>	<b>Planta de donde se aisló</b>
Anonaína	Antimicrobiano	<i>Annona muricata</i>
Berberina	Antimicrobiano	<i>Coptis japonica</i>
Codeína	Analgésico narcótico, Antitusígeno	<i>Argemone mexicana</i>
Colchicina	Disruptivo muscular	<i>Colchium autumnale</i>
Emetina	Parasitocida	<i>Uragoga ipecacuanha</i>
Liriodenina	Antimicrobiana, Anticancerígeno	<i>Annona diversifolia</i>
Morfina	Analgésico narcótico	<i>Papaver somniferum</i>
Noscapina	Antiespasmódico, Potencial antineoplásico	<i>Papaver somniferum</i>
Papaverina	Vasodilatador	<i>Papaver somniferum</i>
Sanguinarina	Antimicrobiano	<i>Sanguinaria canadensis</i>
(+)-Tubocurarina	Bloqueador muscular	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Tetrandrina	Bloqueador de canales de Ca <sup>2+</sup>	<i>Stephania tetandra</i>

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Aproximación a la comunidad indígena

Desde hace más de 12 años el grupo de investigación FaMeTra ha trabajado en colaboración con una comunidad Huitoto de la Amazonia Colombiana, en alianza con la Universidad Nacional de Colombia Sede Amazonía. A través del diálogo, la socialización de objetivos y alcances del proyecto, la exposición de normatividad en el trabajo con comunidades indígenas, y la aclaración de dudas al respecto; se logra retomar comunicación con el médico tradicional.

Re-establecida la relación cordial con la comunidad se logró bajo un itinerario de trabajo programar salidas de campo, así como presenciar y documentar la preparación del remedio tradicional. Se obtuvo asesoría para realizar colecta de material vegetal, bajo el permiso marco de colecta dado a la Universidad Nacional de Colombia mediante resolución 0255 del 12 de marzo de 2014 por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales ANLA, y para la cual no se requirió trámite de consulta previa según oficio OFI15-000039982-DCP-2500 del Ministerio del Interior. Se realiza firma del consentimiento previo informado y se comunican los mutuos beneficios derivados de la investigación.

#### 2.1.1 Preparación de remedio tradicional

De manera preliminar a la salida de campo (selva) se prepara material de trabajo como bolsas, costales, cinta, marcadores, alcohol, machete, cámara fotográfica, GPS, entre otros. Se colectaron, en época seca, en una vereda del municipio de Leticia –Amazonas, partes aéreas (lianas) de la especie vegetal base del remedio, y un ejemplar fue depositado en el Herbario Nacional Colombiano para su respectiva identificación. A partir del material colectado se obtuvo una preparación tradicional indígena a la cual se denominó remedio, identificada de ahora en adelante con la abreviatura **COM**.

## 2.2 Preparación de extractos

Una vez colectado el material vegetal fresco, se dispone en bolsas plásticas debidamente rotuladas previa selección de material en mal estado o extraño (insectos, hojas de otros árboles, trozos de suelo, entre otros). Es trasladado a la Universidad Nacional de Colombia Sede Amazonía, donde posteriormente es sometido a un proceso de secado en estufa de aire circulante a 40-50°C por espacio de aproximadamente 48 horas, allí queda listo para ser transportado a Bogotá. A partir de la base etnofarmacológica suministrada por el médico tradicional de la comunidad, se obtienen bajo condiciones experimentales controladas preparaciones a base de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff.

Teniendo en cuenta los objetivos de la investigación, se llevan a cabo dos montajes experimentales, los cuales tienen en común el uso del material vegetal seco y reducido en tamaño de partícula, además del empleo de agua destilada como solvente de extracción.

La preparación de extractos primarios se describe a continuación:

- **Extracto Acuoso Reflujo (LR):** Se realiza un montaje de reflujo donde se emplean la liana o bejuco de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, que previamente fueron cortados en pedazos más pequeños siendo equivalentes a 66 g de material vegetal seco. Fueron colocados en un balón de fondo redondo acoplado a una columna refrigerante, teniendo como fuente de calor un baño de arena, el montaje es sometido a temperatura de ebullición del solvente (agua destilada), con calentamiento constante por un tiempo aproximado de 1 hora. Se obtiene como volumen final 500 ml de lo que denominamos extracto primario el cual es filtrado y liofilizado en equipo liofilizador LABCONCO FREEZONE 4,5; es almacenado al abrigo de la luz y con humedad y temperatura reguladas.
- **Extracto Acuoso Percolación Acuosa (PA):** Se utiliza el método de percolación en frío para 30 g de material vegetal seco y pulverizado de manera previa en molino de cuchillas. Con 3 horas de anterioridad al proceso de extracción la porción de material vegetal se humedeció con 100 ml de agua, fue colocado de manera homogénea en un embudo cilíndrico con llave de teflón sobre el cual se hizo pasar el solvente (agua) en repetidas ocasiones hasta evidenciar agotamiento del material vegetal a través de monitoreo mediante cromatografía en capa delgada (CCD), empleando condiciones cromatográficas para identificación de principales metabolitos. Posterior al proceso de extracción se obtiene un volumen final de 900 ml de extracto acuoso. La preparación fue liofilizada siguiendo el esquema previamente descrito.

## 2.3 Análisis fitoquímico preliminar

Con la intención de aproximarnos al conocimiento de la composición química de los extractos se lleva a cabo una caracterización fitoquímica preliminar por cromatografía en capa delgada (CCD) en la que se establece mediante pruebas químicas la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos secundarios, como son: Glicósidos cardiotónicos, Polifenoles, Saponinas, Esteroides/triterpenos, Flavonoides y Alcaloides.

Se evalúan grupos de metabolitos como indica la Tabla 2-1, revelando con luz UV a 365 nm y haciendo uso de reactivos reveladores relacionados en el Anexo 1.

Se evalúan grupos de metabolitos reportados en la literatura para el género al cual pertenece la *Curarea toxicifera* (Wedd). Barneby & Krukoff, entre los que se encuentran terpenos, esteroides y alcaloides.

Se realiza un análisis en paralelo de las diferentes formas de preparación del extracto, haciendo uso de patrones de comparación y reveladores correspondientes a cada grupo.

Una muestra de 2 mg de cada forma de preparación de extracto fue redissuelto en metanol, procurando solubilidad total y homogeneidad de la muestra, y se coloca el mismo volumen en la placa cromatográfica con el fin de comparar los perfiles.

**Tabla 2-1.** Condiciones para caracterización fitoquímica preliminar por CCD.  
Fuentes: Adaptado de: (Wagner, H., *et al.*, 1984) (Sanabria, A., 1983)

Tipos de metabolitos secundarios	Fase móvil	Fase Estacionaria	Revelador	Color esperado	Patrón
Esteroides y triterpenos	AcOEt: MetOH Ac. Acético (80:10:10) Modificada	Silica gel 60F 254	Vainillina/ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100°C	Tonalidades rojas, Azul, verde, cafés.	Lupeol B - sitosterol
Flavonoides (flavonas, flavonoles y flavanonas glicosidadas)	AcOEt-AcOH HCO <sub>2</sub> H -H <sub>2</sub> O (100:15:11:27) Modificada		NP/PEG	Fluorescencia de Color naranja, amarillo, amarillo-verdoso  Manchas amarillo al visible.  Ácidos carboxílicos fenólicos Fluorescencia azul - verde	Rutina Ac. Clorogénico
Alcaloides	Tol:AcOEt:Dietilamina (10:90:10) Modificada		Dragendorff	Naranja al visible Fluorescencia azul o amarillo a 365 nm	Fracción alcaloidal de Yagé

Glicósidos Cardiotónicos	AcEt/MeOH/H <sub>2</sub> O (81:11:8)		Reactivo de Kedde Hidroxamato ferrico	Rosado al visible	Digoxina Extracto de Digitalis
Polifenoles	AcOEt/Ác. fórmico/ Ác. acético/H <sub>2</sub> O (100:15:11:27) Modificada		UV 365nm	Fluorescencia Amarillo, verde	Rutina Ac. Clorogénico
Saponinas	CHCl <sub>3</sub> /Ác. acético glacial/ MeOH/H <sub>2</sub> O (15:8:3:2)		Anisaldeído sulfúrico; Δ 100°C, 5 min	Rojo	Saponina

AcOEt = Acetato de etilo; AcOH = Ácido acético glacial; HCO<sub>2</sub>H = Ácido fórmico; H<sub>2</sub>O = Agua destilada; MeOH: Metanol; Tol = Tolueno; CHCl<sub>3</sub> = Cloroformo; NP: Ácido difenilbórico aminoetiléster; PEG: Polietilenglicol 4000.

## 2.4 Evaluación de la actividad antiplasmodial

La evaluación de la actividad antiplasmodial *in vitro* fue desarrollada a través del ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo del parásito descrita por (Deharo, E., et al., 2000) y adaptada por el grupo de investigación FaMeTra a las condiciones experimentales del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (Anexo 2). Para cada una de las preparaciones **COM**, **LR** y **PA**, se preparó una solución stock pesando 20 mg de liofilizado y se disolvió en 1 mL de RPMI, fue filtrada en membrana de nitrocelulosa de 0,22µm para asegurar inocuidad microbiológica, a partir de ésta por medio de diluciones dobles seriadas fueron obtenidas concentraciones de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL y 0,78 µg/mL, cada concentración fue evaluada por triplicado; partiendo de una parasitemia ajustada en pozo de 2%, con hematocrito al 2,5%, y se realizaron al menos dos ensayos independientes. Como control positivo se utilizó cloroquina (SIGMA Lote 84H1169) y como control negativo se empleó una suspensión de eritrocitos parasitados al 2%.

Este ensayo permite determinar el efecto de un tratamiento frente a los parásitos en estadios eritrocitarios. Para lo anterior se empleó un cultivo de *Plasmodium falciparum* cepa FCR-3 de origen africano, resistente a Cloroquina (Donada por el grupo de investigación de Malaria de la Universidad de Antioquia).

La cepa fue manejada siguiendo el protocolo propuesto por (Trager & Jensen, J, 1976) (Anexo 3), el cual consiste en el mantenimiento continuo de las cajas de cultivo empleando RPMI 1640 (Sigma- Aldrich®) como medio de cultivo suplementado HEPES (25 mM), glucosa (22nM), hipoxantina (170 µM), bicarbonato de sodio (24 mM) y suero humano al 10%, incubación en atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y balance de nitrógeno, a 37° C, y con una parasitemia en caja de alrededor del 2%. El medio de cultivo fue renovado todos los días y a partir de frotis de sangre se realizó monitoreo microscópico con tinción de Giemsa (Deharo, E., et al., 2000) y (Garavito, G., 2007). Previo a los ensayos de actividad el cultivo fue sincronizado con una solución de sorbitol al 5%.

### 2.4.1 Determinación de la densidad parasitaria método visual por tinción de Giemsa (microscopía)

Después de 48 horas de incubación, se centrifugaron las placas a 500 G por 5 min, se realizaron extendidos sobre láminas portaobjetos a partir de aproximadamente 5 µl de precipitado de glóbulos rojos, se fijaron con metanol para posterior tinción con Giemsa. Se realiza lectura con objetivo de inmersión en microscopio óptico Nikon Eclipse. La cuantificación de la parasitemia se efectuó haciendo recuento de Glóbulos Rojos Sanos (GRS) y parasitados (GRP) por cada 1.000 glóbulos rojos totales (Ecuación 2-1).

**Ecuación 2-1.** Cálculo de porcentaje parasitemia y porcentaje de inhibición

$$\% \text{Parasitemia} = \left( \frac{\text{Globulos rojos parasitados}}{\text{globulos rojos totales}} \right) * 100$$

Para el cálculo del % de inhibición se emplea la (Ecuación 2-2), donde se tiene en cuenta la parasitemia del blanco entendido como el control de crecimiento.

**Ecuación 2-2.** Cálculo de porcentaje parasitemia y porcentaje de inhibición

$$\% \text{de Inhibición} = \left( \frac{\text{Parasitemia del blanco} - \text{Parasitemia de muestra}}{\text{Parasitemia del blanco}} \right) * 100$$

El nivel de actividad de las muestras se clasificó según la Tabla 2-2 bajo los criterios de *Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods - RITAM*

**Tabla 2-2.** Criterios de clasificación en nivel de actividad en el modelo *in vitro* (Adaptado de (Willcox, M., *et al.*, 2004))

Cl <sub>50</sub> (µg/mL)	Nivel de actividad
<0.1	Muy bueno
0.1 – 1.0	Bueno
1.1 – 10	Bueno a moderado
11 – 25	Moderado
26- 50	Poco activo
51-100	Débil
>100	Inactivo

### 2.4.2 Determinación de la densidad parasitaria por el método fluorométrico

La densidad parasitaria puede determinarse por varios métodos, atendiendo a las ventajas y desventajas que estos presentan. El grupo de investigación está avanzando en la optimización y adaptación del método de lectura basado en la fluorescencia de SYBR Green I, el cual es considerado como un fluorocromo disponible en muchos laboratorios, resultando un método preciso, robusto, accesible y rápido.

Después de 48 horas de incubación, se centrifugaron las placas a 500 G por 5 min, se retiró cuidadosamente el sobrenadante; de manera consecutiva se realizaron dos lavados con PBS 1% para retirar residuos de tratamiento. Posteriormente con un volumen de 150 µl de PBS 1% se re suspendió el precipitado en cada pozo, con pipeta multicanal se transfirieron 100 µl de muestra a placa de negra de 96 pozos fondo plano, según protocolo optimizado (Arias, H., 2015); cada una de la concentraciones evaluadas es sembrada por triplicado, 100 µl de una solución de SGI 2x (preparado en tampón de lisis, justo antes de usar) es adicionada en cada uno de los pozos, se realizó incubación por 2 horas a temperatura ambiente, en la oscuridad. Posterior al tiempo de incubación se realizó lectura de la placa en Fluorómetro LB 970 Twinkle Berthold, empleando como filtros 485nm y 535nm, para excitación y emisión respectivamente. Los resultados se expresan en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF), estas son proporcionales a la parasitemia. (Arias, H., 2015).

Se realiza corrección de la lectura restando los valores asociados al blanco (GRS). El porcentaje de Inhibición de la parasitemia fue calculado teniendo en cuenta la ecuación de calibración del método para la cepa FCR-3.

## 2.5 Evaluación de la actividad antimalárica

Para la evaluación de la actividad antimalárica de los extractos, se emplearon los modelos farmacológicos actualmente optimizados por el grupo de investigación FaMeTra, protocolo descrito por (Deharo, E., *et al.*, 2000), adaptado por (Garavito, G., 2003) se llevó a cabo la evaluación *in vivo* empleando el modelo de malaria murina “Prueba supresiva de cuatro días (*Test de Peters*)”; respetando la normatividad en cuanto el manejo ético de animales así como lo establecido en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, capítulo sexto, la cual hace referencia al uso de animales vivos en experimentos en investigación en Colombia. De igual forma, se siguen las normas establecidas por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y los protocolos internos de la Universidad Nacional de Colombia en cuanto al manejo y disposición de material

biológico. El protocolo se encuentra avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias.

Se hizo especial énfasis en generar el mínimo sufrimiento posible a los animales respetándolos como un organismo vivo, teniendo en cuenta el principio de las 3'Rs para reducir el número de animales y refinar las técnicas empleadas.

La prueba se desarrolló empleando ratones ICR hembras (criados en el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia) de aproximadamente 4 semanas de edad (peso  $20 \pm 2$  g), los cuales fueron mantenidos con consumo de agua y comida *Ad libitum* en un cuarto con temperatura controlada ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y ciclos de 12 horas luz/oscuridad.

Cada grupo de tratamiento fue conformado por 5 animales. El primer día del ensayo los animales se infectaron vía intraperitoneal con aproximadamente  $1 \times 10^7$  parásitos/100 $\mu\text{L}$  provenientes de ratones infectados con *P. berghei* ANKA y con parasitemia superior al 20%, como se observa en la figura 2-1. Dos horas después de la infección y a la misma hora durante los 4 días siguientes, los animales recibieron el tratamiento correspondiente por vía oral con dosis de 400mg/Kg\*día, la cual fue ajustada por el grupo de investigación en sus protocolos, a partir del análisis de trabajos de investigación conjuntos con la Universidad Federal de Minas Gerais y otros grupos, así como de los reportes recientes de la literatura para este modelo. La evaluación de extractos de origen vegetal con el Test de Peters se ha reportado en dosis comprendidas entre 100mg/kg\*día y 800 mg/kg\*día (Patrick, B., et al., 2015), (Abdulelah H. Al-Adhroeya., et al., 2011).

Figura 2-1. Infección vía intraperitoneal.  
Fuente: Zully Rodríguez



El control negativo fue el vehículo del remedio (Agua) y el control positivo cloroquina a una dosis de 3mg/kg\*día.

El cuarto día post infección se preparó un extendido de sangre periférica de cada animal que se coloreó con Giemsa, por observación microscópica se determinó porcentaje de la parasitemia.

Como parámetro de actividad biológica se calculó la reducción en la parasitemia de los animales tratados respecto al grupo control (vehículo - agua), expresado en porcentaje de inhibición como muestra la Ecuación 2-3 como la media  $\pm$  DE y se clasificó cada muestra en nivel de actividad de acuerdo a lo registrado en la Tabla 2-3, siguiendo los parámetros propuestos por RITAM (Willcox, M., *et al.*, 2004). Fue realizado un control de mortalidad en los días posteriores al muestreo, con observación diaria, aplicando eutanasia, de acuerdo al punto final de la experimentación determinado en los aspectos éticos de protocolo.

**Ecuación 2-3.** Cálculo de porcentaje de inhibición en el ensayo *in vivo*

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left( \frac{\text{Parasitemia de vehiculo} - \text{Parasitemia de tratamiento}}{\text{Parasitemia de vehiculo}} \right) * 100$$

**Tabla 2-3.** Criterios de clasificación en nivel de actividad en el modelo *in vivo*  
(Do. 400mg/kg)  
(Willcox, M., *et al.*, 2004)

Porcentaje de Inhibición (%)	Nivel de actividad
100 – 90	Muy buena a buena actividad
90 – 50	Buena a moderada
50 – 10	Moderada a débil
0	Inactiva

## 2.6 Actividad hemolítica

El ensayo de actividad hemolítica busca evaluar el efecto de las sustancias o extractos sobre la integridad de los eritrocitos, se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Malagoli, D., 2007) y adaptado a nuestras condiciones por el grupo FaMeTra (Anexo 4). Cada una de las muestras fue preparada en PBS a partir de extracto seco liofilizado, evaluando concentraciones de extracto de 100, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 µg/mL. Estas concentraciones se usan con el fin de determinar el porcentaje de hemólisis y la Concentración Hemolítica 50 (CH<sub>50</sub>).

Se colocaron 100 µL de cada muestra por triplicado y se adicionaron 100 µL de una suspensión de eritrocitos al 2 % en PBS en una placa de 96 pozos de fondo redondo.

La máxima concentración de extracto evaluada corresponde a la máxima concentración evaluada en el ensayo de actividad antiplasmodial *in vitro*. Como control positivo se empleó Triton X-100 al 0,1 % y como blanco PBS. Se incubó a 37°C por una hora, transcurrido este tiempo se centrifugó a 500 G por 10 minutos y se separó el sobrenadante de cada uno de los pozos en una placa de 96 pozos de fondo plano para realizar la lectura espectrofotométrica a 418 nm.

El porcentaje de hemólisis fue determinado aplicando la Ecuación 2-4 considerando como control los pozos tratados con PBS.

**Ecuación 2-4.** Calculo del porcentaje de hemólisis

$$\% \text{hemólisis} = \left( \frac{(ABS_{muestra} - Prom_{ABS_{PBS}}) - (Prom_{ABS_{GR}} - PBS)}{(Prom_{ABS_{Ctrl\_positivo}} - Prom_{ABS_{PBS}}) - (Prom_{ABS_{GR}} - PBS)} \right) * 100$$

## 2.7 Análisis estadístico de los datos

Para los ensayos de evaluación de actividad antiplasmodial *in vitro* se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) para cada uno de los ensayos mediante análisis de regresión no lineal a partir de los porcentajes de inhibición y el logaritmo de la concentración, empleando el software GraphPad Prism 6, expresando los resultados como la media  $\pm$  DE de al menos dos ensayos independientes.

Para realizar análisis comparativo de las diferentes formas de preparación del remedio, los datos para ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* fueron sometidos a pruebas con el fin de verificar requisitos para realizar pruebas paramétricas. Teniendo en cuenta los resultados se aplicaron pruebas de hipótesis ANOVA con  $\alpha = 0,05$  y posterior prueba de Tukey con  $\alpha = 0,05$ .

En el ensayo de actividad hemolítica se realiza una prueba T student con  $\alpha = 0,05$ , respecto al control positivo Triton X-100.

## **3. Resultados**

### **3.1 Acercamiento a la Comunidad**

Colombia es considerada una región con características geográficas y ambientales de amplia riqueza, es territorio de diversas culturas, grupos étnicos, idiosincrasia, mestizaje entre otras particularidades, razón por la cual el grupo de investigación FaMeTra desde hace aproximadamente 12 años se interesó en estudios etnofarmacológicos con énfasis en el tratamiento de la malaria. Para este caso en particular se tuvo por objeto contribuir a la validación del uso de preparaciones tradicionales indígenas empleadas para el tratamiento de dicha enfermedad, donde a partir de trabajos precedentes y con el apoyo del profesor Pablo Palacios de la Universidad Nacional de Colombia Sede Amazonía se logró retomar contacto y cooperación con la comunidad Indígena Ciudad Hitoma, perteneciente al resguardo Ticuna-Huitoto ubicado en área rural en el Kilómetro 7 vía Leticia – Tarapacá, del Departamento de Amazonas, Colombia, a (4° 05' 50" latitud Sur, 69° 56' 12" longitud Oeste), legitimado mediante resolución No. 005 del 29 de enero de 1986 del Instituto Colombiano de la Reforma Agraria INCORA. Figura 3-1.

La comunidad Ciudad Hitoma, perteneciente a la cultura Huitoto, ilustra ampliamente a través de herramientas como la oralidad, su percepción de la creación del mundo con lo que reflejan su cultura. Reflexionan acerca de la influencia de los animales en el hombre y el entorno, admirando la naturaleza y haciendo énfasis en el poder curativo de las plantas así como en el importante rol de su dios y la espiritualidad en ello.

**Figura 3-1.** Algunas comunidades ubicadas dentro del resguardo Indígena Ticuna-Huitoto.  
Fuente: (López, 2008).



Describen con minuciosa narración sus condiciones de vida, detallando las características de su maloca (lugar de vivienda), del manguaré (instrumento empleado como medio de comunicación) y resaltan la admiración y respeto por la naturaleza. Por todo lo anterior consideramos que la comunidad indígena mencionada es una fuente de conocimiento tradicional que merece ser documentado.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el año 2011 por nuestro grupo de investigación y con el objetivo de continuar con la investigación, el 28 de febrero del 2013 en la ciudad de Bogotá se llevó a cabo una reunión en la que se restableció la relación con el médico tradicional de la comunidad a quien se le llama abuelo; quien como resultado de las buenas relaciones establecidas en el trabajo previo y el retorno de los resultados de esa investigación a la comunidad hecho directamente por el director del grupo de investigación, mostró disposición para la continuación del trabajo etnofarmacológico.

El abuelo don José Octavio García, también conocido con su nombre tradicional *Hitoma Safiama* (Luz del Sol), como médico tradicional de su comunidad heredó las prácticas de sus predecesores Don José García su padre, quien fue un adiestrado curandero y su abuelo Kima Baiji gran sabedor de la nación muinane – Amazonía colombo-peruana– (Urbina, 2006). *Hitoma Safiama* es considerado cacique o jefe en lo que se refiere a tradiciones de su cultura, creencias y rituales y, como es de

esperarse, es transmisor activo de sus conocimientos procurando no interrumpir la anhelada convicción de ser portadores de saberes generacionales.

Con la aprobación del abuelo se realizó una visita a la comunidad entre el 26 y el 31 de agosto de 2013, tiempo durante el cual se presentó la oportunidad de compartir con ellos varias de sus actividades cotidianas, lo que permitiría afianzar la buena relación con la comunidad.

En un principio reseñamos a profundidad los objetivos del proyecto en curso, rememorando los resultados obtenidos en el anterior estudio donde socializamos un plegable con la información obtenida (Anexo 5), adicionalmente se realizó una presentación completa de los derechos de consulta previa y consentimiento libre previo e informado; basados en documentos públicos del Ministerio del Interior y de Justicia y de la cartilla “Tejiendo Derechos” de la Organización Nacional Indígena de Colombia – ONIC, en las cuales especificamos la posición del grupo de investigación. De igual manera se describió la participación justa y equitativa de los beneficios que se deriven de la información obtenida dentro del proyecto siguiendo el Protocolo de Nagoya sobre Acceso y Participación en los Beneficios; con el fin de aclarar dudas en los temas legales de la investigación y siguiendo una política de investigación transparente con la comunidad, dejamos documentos para revisión interna por parte de la familia del abuelo con el fin de discutir las correcciones que ellos consideraran necesarias. Finalmente se procedió a la firma del consentimiento previo informado, Anexo 6.

A medida que se hizo posible una cercanía con la familia, accedimos a su casa donde nos explicaron la importancia de fomentar de manera constante sus prácticas y diálogo familiar; estos procesos requieren tiempo para ganar la confianza, una actitud transparente respecto a la investigación y disposición respetuosa para conocer los hábitos y costumbres particulares de la comunidad.

Una vez establecida la relación con la familia del abuelo, se indagó acerca de los conocimientos usos y actitudes, en particular el concepto general que tienen de enfermedad, la cual plantean como un desbalance alimenticio y espiritual que permite que se puedan desarrollar patologías que han acompañado a los indígenas desde su origen y para las cuales ancestralmente han desarrollado tratamientos y curas. En el caso específico de la malaria reconocen además del vector de transmisión, algunos aspectos fisiopatológicos; afirman que se trata de una enfermedad *“que llegó con los blancos”* y para la cual no conocían cura, por lo que la población sufrió y se vió en la necesidad de buscar alternativas terapéuticas en la selva siguiendo las prácticas anteriormente descritas. La abuela Rosa responde *“es la enfermedad del mal, es cuando pica un mosquito”*, complementa su descripción en términos de síntomas tales como *“la persona se vuelve amarilla y la cabeza pesa, no come es un calor que da en el pecho, como en el estómago, es muy caliente; hace sudar frío y seco, el sudor pasa y la piel queda seca, se siente mucho frío; la persona se mueve continuamente y de forma desesperada”*.

En nuestra estadía en la comunidad el abuelo José Octavio mencionó que muchas de las plantas que ellos utilizan en el tratamiento de la malaria, cuando se mezclan pueden dar paso al veneno llamado “*curare*”, que es empleado en prácticas de cacería, condición que relacionan con la afirmación “*algo puede ser remedio o veneno a la vez*” dependiendo de las dosis, preparación, combinación y otras características, por esta razón el paciente debe ser acompañado de manera frecuente por el médico tradicional durante la evolución de la enfermedad.

El tratamiento se debe alimentar de la meditación constante y el lugar propicio para hacerlo es la maloca, donde en reuniones familiares o de la comunidad en general se realiza intercambio de información. Ellos mismos reconocen que este tipo de socialización hoy en día se encuentra influenciada y bastante intervenida por la cultura occidental.

La influencia del mundo occidental se evidencia por ejemplo con el conocimiento de la tecnología, el manejo de palabras propias de la medicina occidental, el acercamiento y el uso ocasional que tienen de la medicina convencional, el conocimiento de ciudades capitales en el país, experiencias de vida urbana de algunos de sus miembros, entre otras; condición que promueve alteraciones tanto en la transmisión de conocimientos como en la visión tradicional del mundo, la religión, las prácticas medicinales y la conservación de la cultura.

La comunidad hoy en día se encuentra fuertemente intervenida por el mundo que ellos denominan de “*occidente*”, a pesar de ello, el abuelo Hitoma señaló con gran sapiencia que su forma de ser es parte de su identidad como indígenas, sus actividades cotidianas son características de su esencia y su manera de vivir, con cantos, con la cacería, con su alimentación y la chagra.

Dentro de las múltiples problemáticas de las comunidades indígenas en el país, el abuelo resaltó el impacto de empresas en la región amazónica y la prevención que se tiene frente a las investigaciones y trabajos que se quieran hacer a partir de conocimiento tradicional puesto que en muchas ocasiones se ha intervenido sin generar beneficios en la comunidad, llevándolos a la desmotivación.

Por lo anterior las nuevas generaciones muestran un mermado interés en las actividades tradicionales, ésta situación afecta la conservación del conocimiento que tienen sobre las especies vegetales con potencial en el campo de la medicina, de manera que, ante la necesidad de contribuir en la preservación de las culturas indígenas y en la validación del uso de sus preparaciones, aludimos a la tradición oral gesticulada por el abuelo y con el compromiso de divulgación documentamos sus relatos y nos acercamos con relación de respeto y admiración de su ancestral sabiduría.

### **3.2 Recolección de material y preparación de remedio tradicional**

Para el momento de la visita al Amazonas, la familia de médico tradicional se encontraba constituida por el abuelo curandero Don José Octavio, la abuela Rosa, sus dos hijos José

y José de Jesús y su nieto José Mauricio. José de Jesús fue la persona encargada de guiar el trabajo de campo, haciendo uso del amplio conocimiento que tiene de la selva, su experiencia con las plantas medicinales empleadas contra la malaria y las historias acerca de su cultura.

Con ayuda de nuestro guía y siguiendo sus recomendaciones se programaron las salidas para la recolección del material vegetal. Se realizó un trabajo exhaustivo y enérgico que implica una caminata de aproximadamente dos horas desde la maloca para entrar a la selva. Haciendo uso de un machete se van realizando cortes a las plantas de interés, para nuestro caso particular se realizan incisiones a un bejuco o liana que en un corte transversal permite observar anillos de crecimiento en forma de cilindros vasculares de color amarillo y rojo, que tiene sabor amargo. En la figura 3-2 se observa una liana colectada. Un ejemplar fue colectado para clasificación en el Herbario Nacional Colombiano y fue identificado como *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff con un número de COL 570486 (Anexo 7) y puede observarse en la figura 3-3. La colecta se realizó en época seca, se registró una humedad relativa de 84%, la altura de la zona se encuentra entre 90 y 100 m.s.n.m, con una temperatura oscilante entre los 29°C - 32°C, las coordenadas específicas determinadas con GPS Garmin Etrex vista® fueron S 04° 07' 7.68" W 069° 55' 2.46", a una altura aproximada de 93,6 metros.

**Figura 3-2.** Colecta de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff con Jesús García.

Fuente: Victoria Rodríguez



**Figura 3-3.** Ejemplar de herbario *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff. Número de COL 570486. Fuente: Victoria Rodríguez



Durante el recorrido por la selva fue evidente que la elección de algunas especies vegetales resulta más fácil por el aroma y el sabor que estas emitan, ya que entre más amarga “más contenido de quina” por lo tanto la asocian con ser “mejor para el tratamiento de la enfermedad” afirma Jesús. Para otras especies es más sencilla la identificación de la planta y no requieren de esta evaluación organoléptica, bastando con la observación de la anatomía vegetal, para lo cual Jesús también demostró gran habilidad y conocimiento.

Uno de los aspectos a tener en cuenta para la recolección del material es la abundancia o escases en este tipo de plantas lo que se atribuye a su poder sagrado “como son sagradas son pocas”. Durante las caminatas se observó el gran arraigo religioso y tradicional con las plantas lo que en repetidas ocasiones se vió ilustrado con leyendas que sustentan la idea de que son un regalo del padre creador; por ejemplo: el “ambil” obtenido del tabaco significa fuerza y protección, el “mambe” extraído de las hojas de la coca se asocia con el uso de la palabra y el “Jaibiqui” como llaman al té de albaca es la principal planta medicinal en su cultura.

El conocimiento sobre plantas medicinales lo obtienen por tradición oral, Jesús nos cuenta que meditando con el “mambe” han realizado hallazgos de comunicación con la naturaleza y con su dios, así sueñan con la fuente vegetal que los puede curar. Para encontrar la mejor opción terapéutica ensayan con diferentes partes de las plantas o con varias de ellas, “ya que no en todas las personas funciona igual el mismo tratamiento” dice el abuelo; también es muy frecuente compartir con otros médicos tradicionales para afianzar conocimientos y hallar plantas útiles.

En cuanto a las especies vegetales que ellos utilizan para tratar la malaria, reportan con sus nombres comunes esencialmente: el costillo, el aifo, y el bejuco de Ilaño, las cuales responden a los nombres científicos *Aspidosperma excelsum*, *Abuta grandifolia* y *Curarea toxicofera* respectivamente.

Los resultados precedentes a esta investigación inclinaron nuestro interés hacia el estudio del bejuco de Ilaño o “curare” como lo llaman comúnmente en la comunidad; es una especie vegetal perteneciente a la familia *menispermáceas*, la cual se reconoce por su sabor amargo

y consiste en unas lianas y enredaderas que trepan a los árboles, con dimensiones aproximadas de 10 metros de altura y 4 cm de ancho que se encuentra alrededor de un árbol de tronco liso llamado “castaño”, tiene hojas blanquecinas por el envés y al cortar el bejuco presenta abundante exudado liquido de color traslucido y hace parte de la vegetación selvática.

Una vez colectado el material se acompañó al médico tradicional en la preparación de los remedios, en su maloca hacia el atardecer nos reunimos alrededor de la fogata a compartir la experiencia de su saber tradicional. Este proceso consiste en la decocción de algunas partes de cada planta, para nuestro caso fue empleado la liana o bejuco de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Por un tiempo de más o menos una hora se realiza la cocción en fogón de leña de estos trozos de bejuco que previamente fueron cortados en pedazos más pequeños, se tomaron en cantidades aproximadas 20 centímetros de bejuco en dos litros de agua de río como se observa en la Figura 3-4. Las condiciones de ebullición y tiempo de cocción son determinadas por la práctica por tanto se debe ir revisando la preparación hasta que el agua “quede rojiza”, también se debe ir probando para saber “cuál es su punto”, el abuelo sabe a través de su práctica que el agua se debe evaporar alrededor de un 80%.

El punto final de la cocción se determina por el sabor y el color que toma el agua. La preparación fue rotulada como **COM** y en condiciones de refrigeración fue transportada a Bogotá procurando el menor tiempo de exposición a condiciones ambientales que pudieran aportar a su deterioro.

**Figura 3-4.** Preparación del remedio tradicional (COM) por parte del abuelo Hitoma.  
Fuente: Victoria Rodríguez



A medida que se va preparando el remedio el abuelo explica detalladamente que el consumo de este por parte del paciente se hace por tres días seguidos dos veces al día, o bien dependiendo del tiempo y complejidad del padecimiento, es decir según los síntomas que provoca la malaria. En estas circunstancias es común resaltar que en medicina tradicional el componente espiritual expresado a través de la fe debe acompañar durante el tratamiento tanto al médico tradicional como al paciente. La fortaleza interior debe tener un papel protagónico al ser proveniente de la confianza en sus creencias, ya que aseguran que *“hasta el agua puede curar”* si el espíritu es fuerte. Entre otras recomendaciones mencionan la importancia de que el paciente se cohiba de sustancias dulces, alcohólicas y de las relaciones sexuales con el fin de que el tratamiento sea efectivo.

Finalmente queda de manifiesto que para esta comunidad el uso de las plantas como medicina está constituido como parte de su cultura, de su vida y de su sociedad. No obstante los cambios generacionales que suceden de manera espontánea, tienen una influencia claramente definida respecto a la conservación de su ancestral sabiduría, por tanto es de vital importancia documentar y aportar en la validación del uso de sus remedios tradicionales como opción terapéutica contra la malaria.

Al término de la visita se encuentra consolidada una relación con los integrantes de la familia y con el abuelo Hitoma, con lo cual se cumple el objetivo de acercarnos de manera asertiva dejando la puerta abierta a futuros proyectos y fortaleciendo una importante experiencia en el campo de la investigación en etnofarmacología.

### 3.2.1 Extractos primarios LR y PA

Atendiendo a las técnicas de extracción elegidas para la obtención de extractos primarios **LR** y **PA** se presentan en la figura 3-5 los respectivos montajes experimentales.

**Figura 3-5.** Montajes de extracción  
Izquierda: Reflujo, Derecha: Percolación  
Fuente: Zully Rodríguez



Se calcula el porcentaje de rendimiento para cada una de las preparaciones mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{Rendimiento} = \left( \frac{\text{Peso del extracto Seco}}{\text{Peso material seco}} \right) * 100$$

**Tabla 3-1.** Porcentaje de rendimiento extractos obtenidos

EXTRACTO	PESO DE MATERIAL SECO (g)	PESO EN GRAMOS DE EXTRACTO SECO (g)	% RENDIMIENTO
LR	66	4,79	7,25%
PA	30	2,67	8,90%

### 3.3 Caracterización fitoquímica preliminar

Empleando cromatografía en capa delgada (CCD) se estableció la presencia y/o ausencia de grupos de metabolitos secundarios en el remedio original de la comunidad (COM) y los extractos por reflujo (LR) y Percolación (PA).

Como criterio cualitativo de identificación se tiene en cuenta la intensidad y color de la mancha generada tras la adición de revelador.

Los resultados obtenidos en los perfiles cromatógraficos por CCD permitieron establecer la presencia de alcaloides, flavonoides, polifenoles y esteroides/triterpenos.

De manera general, se registran los resultados en la tabla 3-2.

**Tabla 3-2.** Resultados caracterización fitoquímica preliminar de las diferentes formas de preparación de los extractos.

Caracterización fitoquímica Preliminar Metabolitos evaluados	<i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff		
	Formas de preparación de los extractos		
	Comunidad COM	Reflujo LR	Percolación Acuosa PA
Flavonoides	+	+	+
Alcaloides	+	+	+
Esteroides/triterpenos	+	+	+
Polifenoles	+	+	+
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-
Saponinas	-	-	-

Nota: Criterios: (+) resultado positivo, (-) Resultado negativo

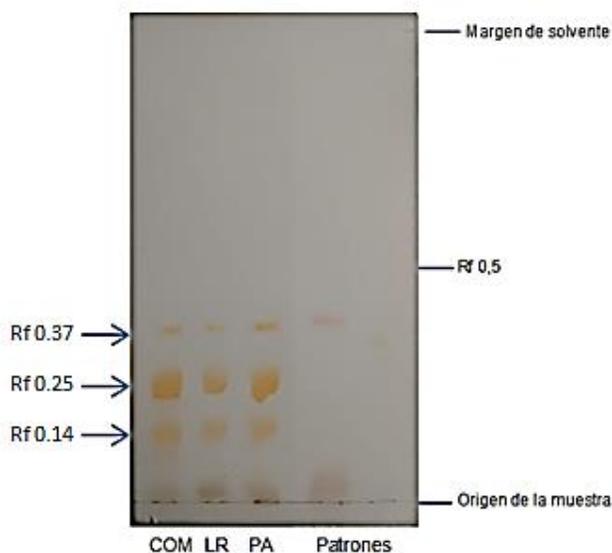
### 3.3.1 Identificación de Alcaloides

Con modificaciones de la fase móvil propuesta por (Wagner., *et al.*, 1984), hasta llegar a Tolueno: Acetato de Etilo: Dietilamina (10:90:10). Se tiene como evidencia de la presencia de alcaloides la aparición de manchas color marrón/naranja tras la adición del revelador Dragendorff, se observaron tres grupos de compuestos de diferente polaridad, que fueron similares en las tres formas de preparación, cuyos Rf corresponden a 0.14, 0.25 y 0.37 respectivamente.

Se presenta prueba positiva dada la intensidad de la coloración en comparación con las sustancias de referencia.

**Figura 3-6.** Identificación Fitoquímica de Alcaloides.

Fase móvil: Tolueno: Acetato de Etilo: Dietilamina (10:90:10). De izquierda a derecha: Remedio Comunidad (COM), Extracto Reflujo (LR), Extracto Percolación (PA), Patrones Alcaloides: Alcaloides del Yagé y sulfato de quinina. Observación al visible.



### 3.3.2 Identificación de Flavonoides

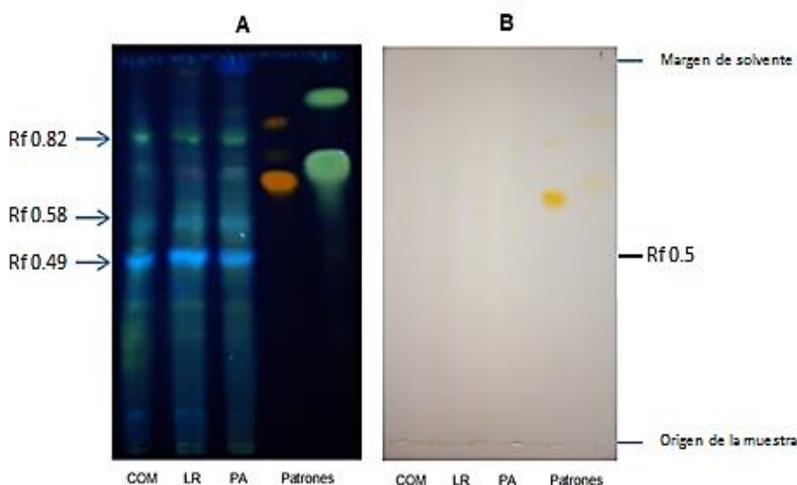
Se realiza la CCD, modificando la fase móvil propuesta por (Wagner, H., *et al.*, 1984), hasta llegar a Acetato de etilo: Ácido acético: Acido fórmico: Agua (100:15:11:27).

Previo a la utilización del reactivo revelador se realiza observación de las placas a la luz UV a 365nm, cuyo perfil se observa en la figura 3-7 (A). Se resaltan entre otros, zonas de fluorescencia azul brillante con Rf de 0.49 y 0.58, así como zonas verde-amarillo con Rf de 0.82, con intensidad de color similar al patrón ácido clorogénico, por lo cual pueden asociarse a compuestos de tipo ácido carboxílico fenólico.

Las señales fluorescentes identificadas de manera comparativa en las tres formas de preparación, generan al visible coloración amarilla tenue tras adición de reactivo revelador NP/PEG. Teniendo como criterio de identificación de flavonoides de tipo heterósido la aparición de manchas de color amarillo al revelar, se presume presencia de este tipo de metabolitos.

**Figura 3-7.** Identificación fitoquímica de flavonoides.

Fase móvil: Acetato de etilo: Ácido acético: Acido fórmico: Agua (100:15:11:27).  
De izquierda a derecha: Remedio Comunidad (COM), Extracto Reflujo (LR), Extracto Percolación (PA), Patrones Flavonoides: Rutina y Ac. Clorogénico. (A) UV 365nm. (B) Visible.



### 3.3.3 Identificación de esteroides y triterpenos

La prueba se considera positiva al revelar con Vainillina 1%/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> manchas de color marrón, tonalidades de rojo o violeta después del calentamiento a 100°C. De manera similar al montaje precedente, con modificación de la fase móvil propuesta por (Wagner, H., *et al.*, 1984) Acetato de Etilo: Metanol: Ac. Acético (80:10:10), se realiza análisis comparativo de las formas de preparación de extractos de *Curarea* y patrones.

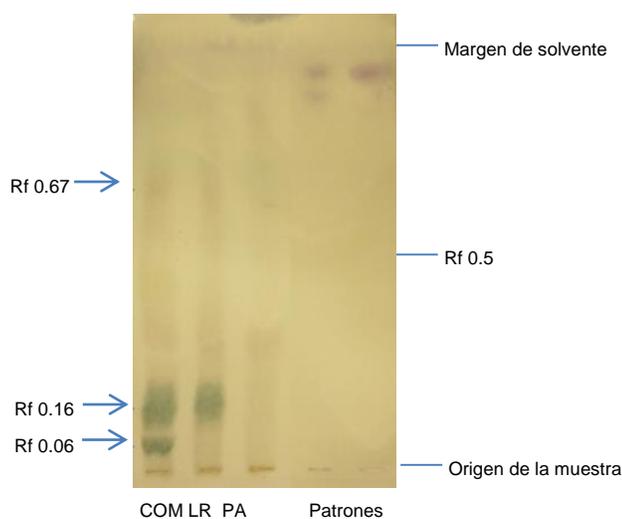
Los resultados se muestran en la figura 3-8. Se pueden observar manchas de tonalidades café a rojo violeta, considerándose prueba positiva para este grupo de metabolitos.

Con un Rf de 0.06, se evidencia la presencia de un grupo de compuestos de tipo esterooidal y/o triterpeno en la preparación COM, ausente en las otras dos formas de preparación.

Con un Rf de 0.16, se presentan manchas en color e intensidad similares en las preparaciones COM y LR, que para la percolación acuosa está ausente.

En las tres preparaciones se observa con Rf de 0.67 una mancha de color rojo- violeta tenue.

**Figura 3-8.** Identificación Fitoquímica de Esteroides y triterpenos. Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Ac. Acético (80:10:10). De izquierda a derecha: Remedio Comunidad (COM), Extracto Reflujo (LR), Extracto Percolación (PA), Patrones Esteroides: Lupeol y  $\beta$ -sitosterol. Observación al visible.

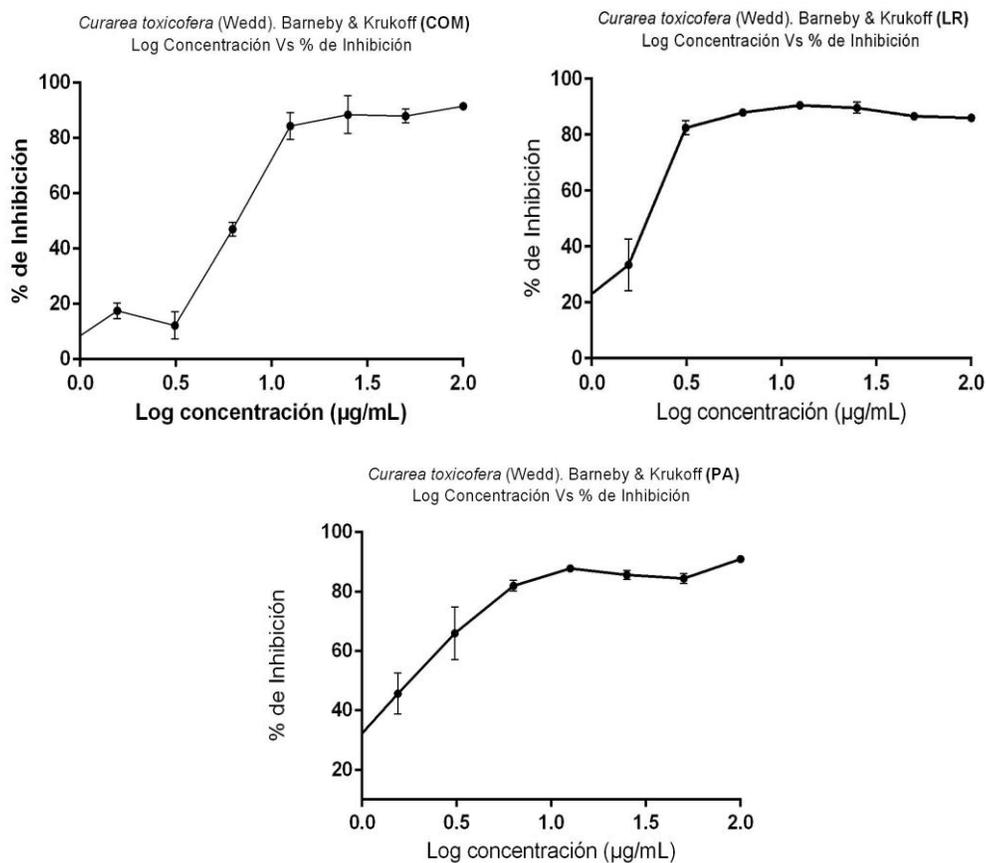


### 3.4 Evaluación de la actividad antiplasmodial *in vitro*

A través del modelo farmacológico empleado se puede evidenciar la influencia de los extractos evaluados respecto al estadio eritrocitario del *Plasmodium*, valorando posibles efectos en la invasión y desarrollo de los parásitos de un cultivo, este ensayo resulta útil para obtener información de su potencial actividad antimalárica. La mayoría de fármacos empleados en la actualidad actúan en estadio sanguíneo.

Para la cepa FCR-3, a través de determinación de la parasitemia por método microscópico se presentan en la figura 3-9 las curvas concentración-respuesta, representación de las concentraciones evaluadas cada una por triplicado en al menos dos ensayos independientes.

**Figura 3-9.** Gráficas concentración- respuesta. Lectura por microscopía. Remedio comunidad COM – Extracto por reflujo LR – Percolación PA.



En la tabla 3-3 se registran los resultados de la  $CI_{50}$  para cada una de las formas de preparación del remedio tradicional, el valor representa el promedio  $\pm$ DE de dos ensayos realizados para cada muestra; se registran datos de determinación de densidad parasitaria por microscopía. El análisis de los datos se realizó por regresión no lineal usando el Software Graph pad Prism 6.

**Tabla 3-3.**  $CI_{50}$  de las preparaciones evaluadas en el ensayo de Inhibición de la invasión y el desarrollo de *P. falciparum* cepa FCR-3. Clasificación RITAM (Willcox, M., *et al.*, 2004)

Preparación	MICROSCOPIA		
	$CI_{50}$ ( $\mu$ g/mL)	DE	Clasificación
COM	6,56	0,18	Bueno a moderado
LR	1,86	0,33	
PA	1,87	0,40	
CQ	0,37	0,04	-

Para la CQ como control positivo se reportan porcentajes de inhibición en todos los ensayos superiores al 86%, a una concentración de 1  $\mu$ g/mL, para la cepa trabajada.

Para la determinación de densidad parasitaria por el método fluorométrico, se obtienen  $CI_{50} = 8,46 \pm 0,01$   $\mu$ g/mL;  $5,16 \pm 0,41$   $\mu$ g/mL y  $4,39 \pm 1,01$   $\mu$ g/mL para el remedio original y los extractos reflujo y percolación respectivamente. Son clasificadas en nivel de actividad bueno a moderado, siendo los obtenidos por este método consistentes con los aquí reportados por microscopía. (El método se encuentra en adaptación y optimización).

### 3.5 Evaluación de la actividad antimalárica *in vivo*

En la tabla 3-4 se presentan los resultados en porcentaje de parasitemia para la evaluación de actividad antimalárica por Test de Peters, lectura por microscopía. Se muestran datos del remedio de la comunidad **COM**, las dos formas de extracción **LR** y **PA**, en animales administrados por cuatro días con dosis de 400 mg/kg\*día, así mismo se reportan datos para los controles CQ y vehículo (Agua destilada).

Los porcentajes de inhibición se pueden observar en la figura 3-10.

Entre los principales síntomas que presentan los animales como manifestación clínica de la enfermedad se observa: debilidad progresiva, anorexia, pilo erección, palidez de las mucosas, hematuria, ataxia, tetraparesis, convulsiones y estupor.

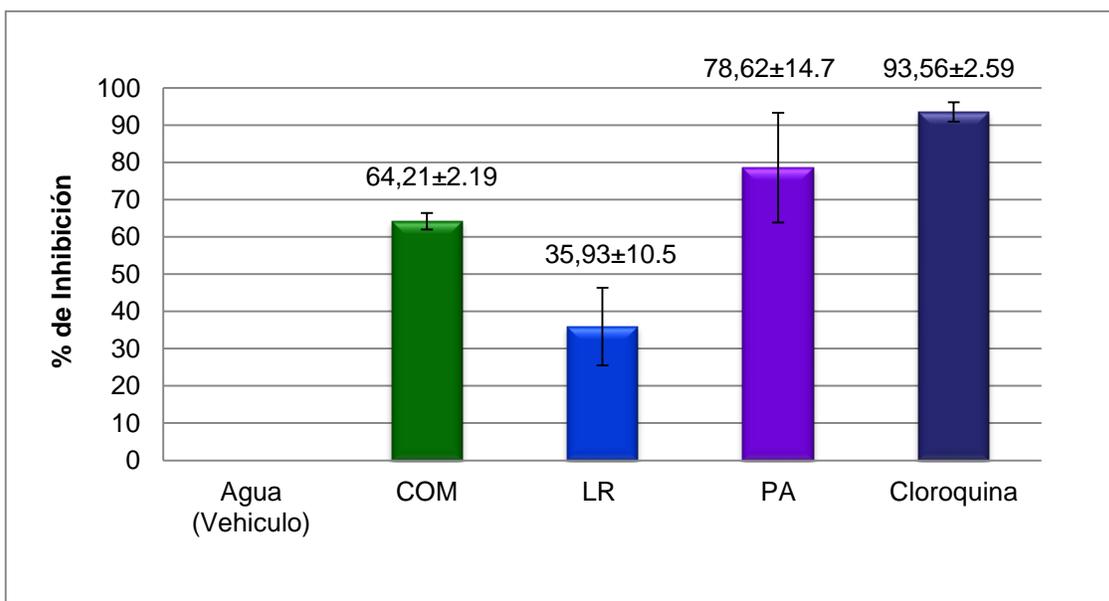
En cuanto al seguimiento de la mortalidad se registra sobrevivencia hasta por 13 días, tiempo durante el cual diariamente se llevó control del número de animales en cada caja; bajo criterio del experimentador se dio muerte anticipada por eutanasia según síntomas y el punto final establecido en el protocolo operacional del ensayo, acorde al manejo ético del animal como reactivo biológico, en la figura 3-11 se muestra la supervivencia de los animales de cada uno de los grupos de tratamiento.

Los datos muestran una diferencia significativa de los porcentajes de parasitemia de los tratamientos Cloroquina, **COM**, **LR** y **PA** frente al vehículo  $p < 0,05$ .

**Tabla 3-4.** Porcentajes de parasitemia ensayo *in vivo*  
Test de Peters, Cepa *P. berghei* ANKA.  $n=5$ ,  $*p < 0,05$ .

TRATAMIENTO	% PARASITEMIA
Vehículo*	22,07±1,08
COM	8,38±2,83
LR	15,00±2.44
PA	5,01±2,12
CQ	1,51±2.08

**Figura 3-10.** Porcentajes de inhibición de la parasitemia por tratamiento, ensayo *in vivo*  
Test de Peters. Cepa *P. berghei*,  $n=5$ . Promedio ±DE

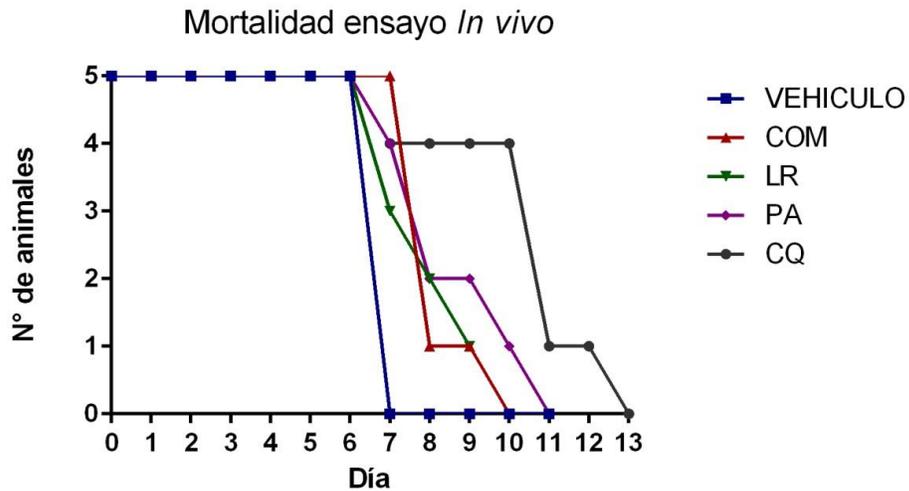


Teniendo en cuenta los criterios de clasificación en el modelo *in vivo* se presentan en la tabla 3-5 los niveles de actividad para cada tratamiento evaluado.

**Tabla 3-5.** Niveles de actividad para cada tratamiento evaluado.  
(Willcox, M., *et al.*, 2004)

TRATAMIENTO	Nivel de actividad
COM	Buena a moderada
LR	Débil a moderada
PA	Buena a moderada
CQ	Buena a muy buena

**Figura 3-11.** Seguimiento de supervivencia de los animales, durante el desarrollo de test de Peters.



### 3.6 Actividad Hemolítica

Para el ensayo se tomó como control positivo una solución de Triton X-100 al 0,1% y como blanco tampón PBS, adicionalmente se utiliza una solución de glóbulos rojos al 2% en PBS para realizar corrección de ruido de fondo, el cual es denominado control de lisis espontanea. Los resultados para los controles se presentan en la tabla 3-6.

Para las tres preparaciones de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, fue negativo el resultado de la prueba de actividad hemolítica, en dos ensayos realizados de manera independiente, lo que implica **CH<sub>50</sub> > 100µg/mL**. La máxima concentración de extractos evaluada, es estadísticamente diferente al control positivo Triton X-100  $p < 0,05$ .

El ensayo sugiere que los extractos no comprometen la integridad del eritrocito, como consecuencia indirecta de su actividad antiplasmodial (Kwiecinski, M., *et al.*, 2008), (Ifeoma, O., *et al.*, 2013).

**Tabla 3-6.** Resultados ensayo de hemólisis.  
Se presentan los resultados de dos ensayos independientes.

Tratamiento		Absorbancia	% Hemolisis
Blanco	PBS	0,053±0,004	0%
Lisis espontanea	GRS 2%	0,077±0,002	0%
Positivo	Triton X-100	3,957±0,041	100%

## 4. Discusión de resultados

Se considera desde hace varios años que la etnofarmacología tiene dos objetivos principales, hacer una aproximación científica a la cultura y a la sociedad, así como estudiar científicamente efectos biológicos de fármacos o drogas (Bourdy, G., *et al.*, 2008).

En concordancia con los objetivos de la etnofarmacología y siguiendo el interés y misión del grupo de investigación FaMeTra en cuanto el estudio de terapias antiparasitarias empleadas en medicina tradicional y popular en Colombia, se forjaron con el presente trabajo espacios de reflexión, debate y análisis crítico sobre la farmacología pensando en generar alternativas a la problemática de las enfermedades parasitarias para preservar o contribuir al sostenimiento del conocimiento tradicional.

El proceso de acercamiento a la comunidad requiere por parte del investigador capacitación en temas relacionados con aspectos legales y éticos acerca de este tipo de trabajo intercultural, teniendo en cuenta el acceso y protección del conocimiento tradicional de comunidades étnicas, por lo cual el proyecto relacionó otras áreas del conocimiento, como la biología, la antropología, el derecho, entre otras, lo que implicó interactuar y establecer relaciones fructíferas con diferentes grupos de investigación, promoviendo el trabajo interdisciplinar.

Trabajar con la comunidad indígena Ciudad Hitoma representó para el grupo de investigación una oportunidad valiosa de documentar ese conocimiento que con el pasar de las generaciones se ha visto disminuido; sumado a esto, la desafortunada “*Tendencia de las comunidades a desaparecer. Por la realidad del país, conflicto armado, comercio, industria, cultivos ilícitos, frágil existencia ante la avalancha de progreso que penetra las zonas en el presente siglo, tumbando monte, tumbando conocimiento*” (Blair & Madrigal, B., 2005).

El saber que conserva el médico tradicional de esta comunidad es una fuente de información invaluable, la percepción que tienen de la enfermedad y las acciones terapéuticas que emplean contra la malaria fueron el origen de esta investigación.

Resultados preliminares del grupo FaMeTra con la comunidad Ciudad Hitoma (Cárdenas, P., 2011), proporcionaron un reporte etnofarmacológico para un remedio tradicional a base de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, con colecta en época de lluvia, determinando en pruebas de tamizaje preliminar para actividad antiplasmodial en modelo *in vitro* una  $CI_{50} = 3,02 \pm 1,01 \mu\text{g/mL}$  y en *in vivo* una inhibición del  $88,4 \pm 7,2$  siendo considerado bueno a moderado.

De esta manera surge el interés de aportar en la validación de su uso, a partir de la obtención a nivel de laboratorio de extractos primarios de la misma especie vegetal tradicionalmente utilizada, demostrando que la actividad farmacológica se conserva; consolidándose como punto de partida para generar a futuro estudios bioguiados que desemboquen, quizás, en la obtención de extractos estandarizados, y/o aislamiento de moléculas responsables de la actividad antimalárica para la especie vegetal trabajada.

En la mayoría de ocasiones las prácticas de la medicina tradicional van acompañadas de fuerzas naturales que el médico tradicional invoca, así el efecto placebo está a menudo inmerso en la práctica. La obtención de los remedios a nivel de laboratorio implica tomar distancia de esta concepción sobrenatural para dar paso a la validación científica del uso de la preparación; es un paso importante llevar la sabiduría de las comunidades indígenas a una puesta a punto en un modelo farmacológico, robusto y reproducible, sin el ánimo de desvirtuar sus prácticas heredadas, sino por el contrario con el máximo respeto por el conocimiento acumulado tradicionalmente.

Las formas de extracción empleadas para generar el extracto primario fueron el reflujo y la percolación, cuya característica en común para este caso, es el uso de agua como solvente; los métodos se basan en obtener metabolitos según la solubilidad de estos compuestos en el solvente. En el primero la matriz vegetal es sometida a extracción continua a elevadas temperaturas (punto de ebullición del solvente), se considera como ventaja de este método la disminución de la pérdida de solvente (Cabello, M & Belloso, G., 2009). Se obtiene así un extracto liofilizado con un porcentaje de rendimiento de 7%. El segundo es un método de extracción continua en frío el cual preserva de descomposición a aquellos compuestos que puedan ser termolábiles, se obtiene un liofilizado con un rendimiento de 9%.

La obtención del remedio en condiciones de laboratorio a partir de plantas con la eficacia farmacológica e inocuidad deseada, depende en gran medida de la calidad de la materia prima, de la técnica de extracción e incluso de la forma del secado y molienda evitando afectación sobre los metabolitos responsables de su actividad biológica (Reyes, A., *et al.*, 2007). Es probable que en términos de extracción ésta se vea influenciada por el tipo de solvente mas no por el método utilizado para tal fin (Valencia, M., *et al.*, 2011). De manera cualitativa y general por medio de la caracterización por CCD no se observan diferencias o influencia entre las formas de extracción (reflujo y percolación) en cuanto a grupos de metabolitos como alcaloides y flavonoides. Las técnicas fueron elegidas a partir de criterios prácticos y de conveniencia técnica, entre los que se incluye principalmente la similitud con la preparación original, además de factores diferenciadores como la temperatura para realizar comparaciones entre los métodos. El extracto por percolación presenta un mayor % de rendimiento, factor que puede tenerse en cuenta a la hora de reproducir en mayores cantidades este extracto, con respecto al rendimiento obtenido por reflujo.

En el análisis fitoquímico preliminar por CCD (Tabla 3-2) se evidencia la presencia de flavonoides, que difiere con el reporte de (Cárdenas, P., 2011) y el resultado obtenido para la especie *Chondrodendron tomentosum* también perteneciente a las menispermáceas para la cual se ha descartado la presencia de este tipo de compuestos (Pérez, D., *et al.*, 2008).

De otra parte la caracterización fitoquímica permitió identificar principalmente en estas preparaciones la presencia de alcaloides, dando como resultado contundente la aparición de manchas color naranja con el reactivo de Dragendorff, esta comparación cualitativa entre el remedio original **COM** y el extracto primario por reflujo **LR** y percolación **PA** revela a grandes rasgos similitud química de las muestras, para este grupo de metabolitos.

La técnica cromatográfica empleada revela diferencias en el perfil de esteroides, que atendiendo al método de extracción puede relacionarse con la concentración de los mismos en cada muestra y a su vez podría tener influencia en el comportamiento de las preparaciones en el modelo *in vivo*; se precisa el uso de técnicas que permitan cuantificación de los componentes del extracto.

La familia de las menispermáceas a la cual pertenece la especie vegetal estudiada, se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo tropical, en ella se considera cerca de setenta géneros identificados; se reportan aproximadamente 142 especies. Los estudios fundamentales sobre alcaloides en especies vegetales pertenecientes a esta familia fueron desarrollados por King, H y Wintersteiner & Dutcher, J, hacia los años de 1932 – 1935 (Marini, B., 1972). El alcaloide más importante de este grupo es el hoy en día conocido como (+) – Tubocurarina, el cual posee una estructura dimerica bis-benzil-isoquinoleinica asimétrica, con dos grupos cuaternarios en cada hemimolécula.

De un total de 801 alcaloides reportados en la literatura, las familias con alcaloides más abundantes son la lauráceas con 116 alcaloides reportados (14.5 %) y la menispermáceas con 108 (13.5 %) (González-Esquinca, A., *et al.*, 2007).

Pelletier, W., 1999 ha recopilado información importante acerca de especies como *Chondrodendron tomentosum*, reportando los alcaloides: (+) - Chondrocurina, (+) - Chondrocurarina, (-) - Curina, (+) - Tubocurarina, (-) - Tubocurarina, (+) - Tomentocurarina, (-) - Tumentocurarina. En la especie *Curarea candicans* se reporta (+) - Curina, (+) - Isochondodendrina, (+) - Candicusina, (-) - Limacina, entre otros y para *Curarea toxicoferum* se tienen registros entre otros de la presencia de alcaloides como (-) - Curina, (+) - Isochondodendrina, (-) - Toxicoferina.

De esta manera se evidencia que la caracterización fitoquímica preliminar de metabolitos secundarios es consistente con reportes previos del género *Curarea*, donde predominan estructuras tipo alcaloide (Lavault, M., *et al.*, 1985), confirmando además los resultados anteriores de nuestro grupo de investigación (Cárdenas, P., 2011). Estos compuestos en ensayos *in vitro* han demostrado ser potentes inhibidores del crecimiento de algunas cepas de *Plasmodium* (Angerhofer, C., *et al.*, 1999).

Los datos obtenidos en la evaluación de actividad antiplasmodial *in vitro*, fueron sometidos a una prueba de hipótesis ANOVA con  $\alpha=0,05$ , con lo cual se determina diferencia estadísticamente significativa entre las tres preparaciones del remedio **COM**, **LR** y **PA**. Por tanto a partir de una prueba de contrastes Tukey con  $\alpha=0,05$ , se establece la diferencia entre el remedio original de la comunidad y los extractos primarios obtenidos en condiciones de laboratorio. Sin embargo según los datos calculados para la concentración Inhibitoria 50, como se muestra en la tabla 3-3,  $CI_{50}$  **COM**=  $6,56\pm 0.18$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50}$  **LR**= $1,86\pm 0.33$   $\mu\text{g/mL}$  y  $CI_{50}$  **PA**= $1,87\pm 0.40$   $\mu\text{g/mL}$ , las tres formas de preparación se pueden clasificar con actividad buena a moderada, puesto que se obtienen concentraciones inhibitorias inferiores a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Se establece una aproximación similar a los datos obtenidos por el método de cuantificación de densidad parasitaria por fluorometría (Método que se encuentra en proceso de adaptación y optimización).

La concentración inhibitoria 50 del remedio original de la comunidad, que en nuestro caso es colecta de época seca, está enmarcada en el mismo orden de magnitud a lo reportado en época de lluvia por (Cárdenas, P., 2011), con lo que se confirma la actividad de la preparación del médico tradicional partiendo de dos colectas y preparaciones independientes.

Es destacable que la  $CI_{50}$  de los extractos sea significativamente inferior de la obtenida en el remedio tradicional, lo cual puede ser considerado un hallazgo, entendido como una actividad significativamente mejor de la especie vegetal al ser sometida a los procesos de extracción en laboratorio respecto al procedimiento tradicionalmente usado por la comunidad.

Resulta interesante la comparación entre los tipos de extracción y preparación de los extractos, el remedio de la comunidad es una decocción a altas temperaturas por un tiempo prolongado, en el reflujo se lleva el solvente a punto de ebullición, mientras la percolación es un método de extracción en frío. Así, los perfiles por CCD y el comportamiento en los modelos farmacológicos empleados sugieren que los compuestos responsables de la actividad antimalárica no son susceptibles a las altas temperaturas.

El modelo farmacológico utilizado para la evaluación *in vitro* presenta varias ventajas a la hora de realizar un tamizaje a extractos con posible actividad antimalárica, entre estas se encuentran 1) La capacidad de obtener una información confiable con cantidades pequeñas (microgramos) de material, en nuestro caso fueron preparadas soluciones stock con 20 mg de cada uno de los liofilizados de las tres preparaciones; 2) La medición de la actividad intrínseca antimalárica en que no intervienen factores de hospedador, además de los costos no muy elevados (Deharo, E., *et al.*, 2000), el protocolo se encuentra optimizado y permite resultados reproducibles.

En cuanto la determinación de actividad antimalárica *in vivo*, se tiene que las preparaciones **COM** y **PA** presentan porcentajes de inhibición de la parasitemia superiores al 60%. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la actividad antimalárica de estas dos formas de preparación y a su vez entre esta última y el control Cloroquina, con una confianza del 95%. Pueden ser clasificados en la escala de bueno a moderado (tabla 3-5).

Por su parte la preparación obtenida por reflujo **LR** solo presenta un porcentaje de inhibición de  $35.33 \pm 10.45\%$ , por lo cual es clasificado con actividad débil a moderada (Willcox, M., *et al.*, 2004). El comportamiento de este extracto no es el esperado teniendo en cuenta los resultados *in vitro* y de caracterización fitoquímica preliminar; atendiendo a esos dos parámetros podría esperarse un comportamiento similar a las otras dos preparaciones en este ensayo, no obstante el resultado difiere estadísticamente de **COM** y **PA**, por lo cual se recomienda una nueva evaluación con el fin de confirmar los resultados obtenidos, teniendo en cuenta la rigurosidad que el ensayo *in vivo* requiere.

En relación a los datos de mortalidad registrados se evidencia comportamiento de los controles dentro de las especificaciones del ensayo, para el día 7 y día 13 se registra muerte de todos los animales de los grupos control y cloroquina respectivamente.

La mayoría de los métodos utilizados en la evaluación de la eficacia de sustancias antimaláricas centran su orientación en la fase eritrocitaria del parásito. Los tamizajes primarios, pretenden generar información que permita clasificar y priorizar algunas drogas o especies vegetales, para profundizar los estudios fitoquímicos y de actividad biológica (Willcox, M., *et al.*, 2004). Dada la clasificación del remedio de la comunidad **COM** y de los extractos primarios estudiados **LR** y **PA** puede considerarse que *Curarea toxicifera* (Wedd.) Barneby & Krukoff es una especie vegetal promisorias; se realiza un aporte en cuanto a la validación del uso de tal especie en el tratamiento de la malaria por parte de la comunidad indígena Ciudad Hitoma. El presente trabajo aporta información farmacológica y de composición química de la especie vegetal, considerados de gran importancia para su expediente, dado que en la literatura actual no se cuenta con registros de actividad antimalarica y de caracterización fitoquímica.

A grandes rasgos, los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* se relacionan con lo observado en el modelo farmacológico de malaria murina, pues en los dos modelos se demuestra buena actividad, es viable asumir que uno de los posibles estadios sobre el cual actúan los activos presentes en la preparación es el sanguíneo.

Los resultados del ensayo de actividad hemolítica permiten descartar que la actividad antiplasmodial comprometa la integridad de los eritrocitos, con lo cual se aporta a la seguridad y se aclara mecanismo de acción directo sobre el parásito. El diseño de los ensayos farmacológicos relaciona las concentraciones de extracto evaluadas, demostrando que a la máxima evaluada ( $100\mu\text{g/mL}$ ), los extractos no generan daño a la célula hospedera y por tanto la actividad antiplasmodial establecida es atribuible a su composición química.

Existen en el planeta aproximadamente 400.000 especies vegetales y un mínimo porcentaje de ellas se ha investigado fitoquímicamente, y uno mucho menor ha sido sometido a estudios farmacológicos o de actividad biológica, su riqueza metabólica es tan amplia que cualquier aporte fitoquímico revelaría solo un espectro limitado de sus constituyentes (Hostettmann, K., *et al.*, 2008), el presente trabajo es considerado una aproximación fitoquímica preliminar. Los resultados obtenidos para la misma especie son consistentes con lo reportado previamente por nuestro equipo (Cárdenas., P, 2011), y consolidan un primer reporte del remedio tradicional que demuestra actividad antimalárica, donde también se logró por primera vez reproducirlo en condiciones de laboratorio manteniendo su actividad, dando solidez al reporte etnofarmacológico recibido por parte del abuelo Hitoma.

Los resultados de ésta investigación, fueron socializados con la comunidad Ciudad Hitoma, a través de una estrategia de divulgación de la información que implicó el diseño de un póster, un folleto informativo y una presentación formal frente al cabildo de la comunidad indígena y frente a la comunidad académica de la sede Amazonía de la Universidad Nacional. A pesar de que la comunidad propiamente dicha no cambiará su cosmovisión y forma de utilizar el remedio, se propende por la documentación de los usos tradicionales como estrategia de prevención ante la hoy marcada pérdida de tradiciones y oralidad en las comunidades indígenas.

## 5. Conclusiones

El conocimiento, usos y actitudes que tienen las comunidades indígenas en cuanto a la medicina tradicional y al manejo de enfermedades, merece ser reconocido y documentado con el fin de preservarlo por muchas generaciones más, ya que es considerado una fuente de información que permite no solo la validación de su uso tradicional sino además el aprovechamiento de los recursos naturales accesibles para el tratamiento de la enfermedad y/o para la obtención de compuestos con actividad biológica frente a la malaria. El trabajo con la comunidad Hitoma permitió profundizar el acceso a sus prácticas terapéuticas frente a esta enfermedad.

Se generaron a nivel de laboratorio extractos por reflujo y percolación a partir de la especie vegetal *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff que mantienen la actividad farmacológica del remedio original de la comunidad, con lo cual la especie vegetal estudiada puede considerarse de interés farmacológico.

La preparación de la comunidad, y los extractos por reflujo y percolación mostraron actividad buena a moderada en el ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo de *P. falciparum* para la cepa FCR-3.

En el ensayo *in vivo*, tanto el remedio de la comunidad como su reproducción a nivel de laboratorio presentan un nivel de actividad buena a moderada, validando la actividad del remedio en este modelo farmacológico y aportando al conocimiento etnofarmacológico de la flora medicinal empleada para el tratamiento de la malaria, por la comunidad Ciudad Hitoma.

A partir de los resultados de la prueba de actividad hemolítica es posible establecer que la integridad del glóbulo rojo no se ve comprometida por acción de las preparaciones evaluadas.

Mediante pruebas cualitativas se evidenció en las tres preparaciones, la presencia de alcaloides, los cuales pueden estar relacionados con la actividad antimalárica

Se genera el segundo reporte de actividad antimalárica para la preparación del remedio original de la comunidad, considerando así que, las preparaciones del médico tradicional (Abuelo Hitoma) son reproducibles y mantienen su actividad farmacológica.

## **5.1 Recomendaciones y perspectivas**

Determinar cuantitativamente diferencias en los procesos de extracción con el fin de optimizar procesos de extracción de metabolitos responsables de la actividad.

Establecer influencia de la época de colecta en cuanto expresión de los metabolitos responsables de la actividad antimalárica.

Una vez establecida la actividad buena a moderada de los extractos acuosos de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, se recomienda realizar fraccionamientos bioquímicos con el fin de establecer fracciones enriquecidas en los principios activos con actividad antimalárica.

Se recomienda consolidar resultados de la preparación por reflujo en el modelo de malaria murina.

Es recomendable realizar pruebas de toxicidad aguda por vía oral para las preparaciones *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, con el fin de aportar en términos de seguridad de su uso.

Desarrollar ensayos de combinación con fármacos de referencia a fin de determinar el tipo de interacción que se presenta en el uso concomitante con el remedio, de cara a la situación de uso clínico que en zona endémica se presenta.

## A. Anexo 1. Reactivos Reveladores.

Tomado de: Wagner, H., Blandt, S, & Zgainski, E. (1984). *Plant Drug Analysis* . New York: Springer-Verlang.

➤ Reactivo de Dragendorff con ácido clorhídrico (modificado):

Solución A: 0,3g de subnitrito de bismuto, 1 ml de HCL 25%, % ml de agua.

Solución B: 3g de ioduro de potasio en 5ml de agua.

Reactivo Asperjado: 5ml A + 5 ml B + 5 ml de HC 12% + 100ml Agua.

Detección: Alcaloides, compuestos nitrogenados heterociclicos, aminas cuaternarias.

➤ Vainillina – Ac. Sulfúrico:

Solución A: ácido sulfúrico al 5%

Solución B: vainillina 1% en etanol

La placa es asperjada vigorosamente con la solución A, inmediatamente después asperjar con solución B. Calentar 5 min a 110°C observar al visible.

Detección: terpenos, compuestos fenólicos y derivados de fenilpropano.

➤ Natural Products – Polietilenglicol (NP/PEG)

Solución NP: Difenilboriloxietilamina al 1% en metanol.

Polietilenglicol (PEG): 4000 5% en etanol

Asperjar con los reactivos de manera consecutiva

Detección: fluorescencia intensa es producida inmediatamente o después de 15 min bajo la luz UV 365nm. PEG incrementa la sensibilidad (De 10µg – 2,5µg). El comportamiento de la fluorescencia depende la estructura.

➤ Reactivo de Kedde.

5ml de una solución etanolica fresca al 3% de fresca de ácido 3,5 – dinitrobenzoico, mezclado con 5 ml de NaOH 2M.

La placa es asperjada con la mezcla y evaluada al visible.

Detección: cardenolidos

➤ Anisaldehido sulfúrico:

0,5 ml de anisaldehido es mezclado con 10ml de ácido acético glacial, seguido por 85ml de metanol y 5ml de ácido sulfúrico, en estricto orden. El reactivo tiene estabilidad limitada, tiene coloración rojo a violeta.

Asperjar la placa y calentar a 100°C. evaluar al visible o a 365nm.

Detección: saponinas.

## B. Anexo 2. Protocolo de actividad antimalárica *in vitro*

Para la determinación de la  $CI_{50}$  de cada extracto o sustancia se necesitan mínimo tres puntos de diferentes concentraciones (sembrar por triplicado), el presente protocolo permite la evaluación de 1 muestra en cada placa de 96 pozos, teniendo pozos para determinación por microscopia y fluorometría de manera simultánea.

### 1. Distribución de la placa de 96 pozos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Ctrl de Cto	GRS	
C		Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Ctrl de Cto	GRS	
D		Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Dil 1	Dil 3	Dil 5	Dil 7	Ctrl de Cto	GRS	
E		Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Ctrl de Cto	CQ	
F		Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Ctrl de Cto	CQ	
G		Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Dil 2	Dil 4	Dil 6	Dil 8	Ctrl de Cto	CQ	
H												

Muestra en diferentes concentraciones; pozos para lectura por microscopia  
 Muestra en diferentes concentraciones; pozos para lectura por fluorometría  
 Control de crecimiento en placa lectura por microscopia  
 Control de crecimiento en placa lectura por fluorometría  
 GRS: Glóbulos rojos sanos (Blanco fluorometría)  
 Borde de agua  
 Cloroquina 1  $\mu$ g/ml (Cárdenas., 2011)

### 2. Procedimiento

#### 2.1 Preparación de las soluciones de trabajo

Las concentraciones a ensayar se obtienen por dilución seriada las cuales pueden ser preparadas en tubos cónicos de 1,5 mL estériles.

**2.1.1.** Marque 3 tubos plásticos estériles de 15 mL. (A, B, C)

**2.1.2. Tubo A:** Pesar 20mg de extracto y diluir en 1mL de vehículo (RPMI).  
(concentración final 20000 $\mu$ g/ml). Filtrar bajo flujo laminar con poro 0.22 $\mu$ m.

**2.1.3. Tubo B.** Adicione 900  $\mu$ l de RPMI y agregue 100  $\mu$ l de la solución anterior, homogenice (2000 $\mu$ g/ml).

**2.1.4. Tubo C.** Adicione 1800µl de cRPMI y agregue 200µl de la solución anterior, homogenice (200 µg/ml).

**2.1.5.** Rotular ocho tubos cónicos de 1.5ml como sigue:

**Tubo N° 1:** 200µg/ml (Solución madre)

**Tubo N° 2:** 100µg/ml

**Tubo N° 3:** 50µg/ml

**Tubo N° 4:** 25µg/ml

**Tubo N° 5:** 12,5µg/ml

**Tubo N° 6:** 6,25µg/ml

**Tubo N° 7:** 3,125µg/ml

**Tubo N°8:** 1,56 µg/ml

La concentración en placa queda ajustada a la mitad de lo rotulado en el tubo.

**2.1.6.** Del tubo C transfiera 1500 µl al **tubo N°1** (solución madre)

**2.1.7.** A cada uno de los tubos desde el **N°2** hasta el **N°8** adicione 750 µl de cRPMI.

**2.1.8.** Realizar diluciones seriadas a partir del **tubo N°1**, tomando en cada caso 750 µl del tubo anterior homogenizando con el cRPMI agregado anteriormente. (cambie de punta cada vez que sirva).

## **2.2. Siembra de la placa para evaluación de extractos vegetales**

**2.2.1.** Colocar 100 µl de cada una de las diluciones en todos los pozos de las letras B a G del número 2 al 9 según distribución en placa.

**2.2.2.** Colocar 100 µl de la suspensión de glóbulos rojos parasitados ajustada al 2% (**apéndice 6**), en todos los pozos de las letras B a G del número 2 al 9.

**2.2.3.** Colocar 100 µl de RPMI + 100 µl de la suspensión de glóbulos rojos parasitados (**apéndice 6**), en todos los pozos de la columna 10 como control de crecimiento.

**2.2.4.** Colocar 100 µl de cRPMI + 100 µl de CQ (Solución C - Apéndice 3), en los pozos B11, C11 Y D11 como control positivo.

**2.2.5.** Adicionar 200 µl de glóbulos rojos sanos con hematocrito al 2% en los pozos E11, F11 y G11.

- 2.2.6. Homogenizar toda la placa por agitación durante 60seg.
- 2.2.7. Tapar las placas, llevar a incubadora con balance de gases N<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>
- 2.2.8. Incubar a 37°C por 48 horas.

### 3. Preparación de Patrón (Cloroquina)

- 3.1. Solución inicial: Preparar en agua destilada una solución 1 mg/mL (Pesar 10 mg y disolver en 10 mL), Solución A (1000µg/mL)
- 3.2. En cabina de flujo realizar las siguientes diluciones:
  - 3.2.1. Tomar 100 µL de solución A y disolver en 900 µL de cRPMI (Solución B) (100µg/mL)
  - 3.2.2. Tomar 10 µL de solución B y disolver en 990 µL de cRPMI (Solución C). (1µg/mL)
  - 3.2.3. Transfiera 100µl de la solución C, a la placa de 96 pozos según corresponda.

### 4. Determinación de la densidad parasitaria

#### 4.1. Microscopia

- 4.1.1. Retirar cuidadosamente de uno de los pozos control de crecimiento (B10 a G10) el medio sobrenadante.
- 4.1.2. Realizar el frotis del precipitado, evaluar la parasitemia y los estadíos del cultivo
- 4.1.3. Verificar que el cultivo se encuentra en estadíos jóvenes y la parasitemia es considerablemente superior a la inicial.
- 4.1.4. Realizar los frotis de los pozos destinados a determinación por microscopia.
- 4.1.5. Fijar el frotis con metanol
- 4.1.6. Realizar coloración de Giemsa

#### 4.2. Determinación por fluorimetría

- 4.2.1. Centrifugar la placa de 96 pozos a 500 G x 5min
- 4.2.2. Descartar el sobrenadante y re suspender el precipitado en 150µl de PBS 1X
- 4.2.3. Repita pasos 4.4.1 y 4.4.2

- 4.2.4. Transferir 100µl de cada pozo a una placa de 96 pozos negra.
- 4.2.5. Agregar 100µl de SYBR 2X en buffer de lisis, mezclar para garantizar hemolisis completa.
- 4.2.6. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas en la oscuridad
- 4.2.7. Leer en el fluorómetro (Excitación 485nm y emisión 538nm)

## 5. Cálculo de parasitemia

### 5.1. Calculo de la parasitemia por microscopia

- 5.1.1. Realizar conteo de glóbulos rojos parasitados y no parasitados por el método visual (1000 glóbulos rojos totales)
- 5.1.2. Realizar cálculo de parasitemia y porcentaje de inhibición de acuerdo a las ecuaciones

$$\% \text{Parasitemia} = \left( \frac{\text{Globulos rojos parasitados}}{\text{globulos rojos totales}} \right) * 100$$

### 5.1.3. Calculo del porcentaje de inhibición

$$\% \text{ de Inhibición} = \left( \frac{\text{Parasitemia de blanco} - \text{Parasitemia de muestra}}{\text{Parasitemia de blanco}} \right) * 100$$

## 6. Ajuste de hematocrito y parasitemia para montaje en placa

- 6.1. Tome una muestra de la caja de cultivo a emplear y realice determinación de parasitemia por conteo microscópico.
- 6.2. En la orden de trabajo anexa a este protocolo (Hoja de Excel), digite en la celda G45 el valor determinado
- 6.3. La hoja de cálculo arroja la cantidad en µl de GRP a emplear (Celda G49) y la cantidad de GRS a emplear (G50).
- 6.4. Prepare lo anterior en cRPMI según corresponda (Celda D50), para lo cual el hematocrito en placa quedará ajustado al 2,5%.

## **C. Anexo 3. Protocolo de manejo y mantenimiento de cultivo de *Plasmodium***

Para cultivar y mantener el *Plasmodium falciparum* se deben seguir cuidadosamente los siguientes pasos:

### **1. Equipos, Materiales y Reactivos**

#### **1.1 EQUIPOS**

- Agitador Talboys
- Balanza analítica Shimadzu
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar de bioseguridad Tipo II
- Centrífuga Universal PLC-012E.
- Incubadora
- Microscopio Nikon

#### **1.2 MATERIALES**

- Cajas de cultivo estériles de 25 ml
- Tubos para centrífuga estériles de 15 ml y 50 mL
- Gradillas para tubos de 15 mL y 50 mL
- Micropipeta de 100 – 1000  $\mu$ L
- Micropipeta de 20 – 100  $\mu$ L
- Pipetas aforadas estériles de 2 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL
- Pipetas pasteur estériles
- Puntas para micropipeta de 10, 200, 1000  $\mu$ L en racks
- Frascos de filtración de 500 mL con membrana de 0.22  $\mu$ m
- Frasco tipo schott estéril de 500 mL
- 3 Frascos tipo schott estériles de 50 mL
- Frascos para descarte de material
- Crioviales estériles

### 1.3 REACTIVOS

- Medio RPMI incompleto (RPMI) = Solo RPMI
- Medio RPIM base (bRPMI) = RPMI + bicarbonato
- Medio RPMI completo (cRPMI) = RPMI + bicarbonato + plasma
- Bicarbonato de sodio al 5%
- Sorbitol 5%
- Colorante Giemsa
- Pool de plasma (Según grupo sanguíneo que se requiera)
- Glóbulos rojos (Según grupo sanguíneo que se requiera)
- Hipoclorito de sodio al 5%

## 2. Preparación de medios de cultivo

### 2.1 Preparación de medio de cultivo base (bRPMI)

2.1.1 Para un litro de medio de cultivo base debe tomar:

- 2 g de glucosa disuelta en 50 mL de agua destilada
- 5.92 g de Hepes disuelto en 50 mL de agua destilada
- 50 mg de Hipoxantina disuelta en 75 mL de agua destilada CALIENTE
- 1 frasco de RPMI disuelto en 400 mL de agua destilada
- Se completa a 900 mL en probeta (el resto 100 mL corresponderán a plasma)
- Se filtra en frasco de filtración con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  que viene incluida.
- Realizar prueba de esterilidad colocando 3 mL de medio preparado en tubo de 15 mL.

### 2.2 Obtención de GR para descongelar el cultivo (GRN)

2.2.1 Tomar en tubo tapa azul (citrato) el volumen de sangre que se obtenga por venopunción, de un voluntario sano que no haya consumido ningún tipo de medicamento durante 3 semanas previas a la toma de la muestra; por voluntario debe tomar 4 tubos.

- 2.2.2 Pasar el contenido de los tubos de citrato a tubos de 50 mL con pipeta aforada de 10 mL.
- 2.2.3 Centrifugar 10 minutos a 800G.
- 2.2.4 Marcar el tubo hasta el nivel del sobrenadante.
- 2.2.5 Con pipeta de 10 mL tomar el plasma y procesar según apéndice 2.3.
- 2.2.6 Con pipeta pasteur tomar las células blancas y descartar.
- 2.2.7 Adicionar bRPMI al nivel donde estaba el plasma.
- 2.2.8 Centrifugar 5 minutos a 800G. y descartar sobrenadante.
- 2.2.9 Repetir paso 2.2.7 y 2.2.8.
- 2.2.10 Descartar sobrenadante.
- 2.2.11 Volver a centrifugar para retirar todo el medio de cultivo.
- 2.2.12 Dejar solo los GR empaquetados resuspendidos en iRPMI (RPMI + Bicarbonato) en proporción 1:1.

### **2.3 Preparación de plasma**

- 2.3.1 Solicitar las bolsas (mínimo 2) al Hemocentro Distrital, aclarar que el plasma no venga ni lipémico ni hemolizado.
- 2.3.2 Descongelar las bolsas de plasma a temperatura ambiente o en baño maría a 37 °C.
- 2.3.3 Inactivar por 30 minutos a 56°C en baño de maría.
- 2.3.4 Una vez termine el tiempo, limpie muy bien las bolsas con alcohol al 70%.
- 2.3.5 Asegúrese de que TODO el material a utilizar dentro de la cabina esté LIMPIO Y ESTÉRIL.
- 2.3.6 En un frasco tipo schott estéril de 1000 mL deposite el contenido de las bolsas de plasma, no olvide mezclar muy bien.
- 2.3.7 Separar en alícuotas de 45 mL en falcon estéril.
- 2.3.8 Centrifugar a 1000 G por 20 minutos.
- 2.3.9 Una vez centrifugado recupere el sobrenadante, si el sobrenadante presenta una capa grasosa retírela primero antes de pasarla a un tubo falcon estéril.
  - 2.3.10 Llevar a congelador -20°C (Stock)
  - 2.3.11 Una vez utilice un falcon del congelador de -20°C, manténgalo en refrigeración a 4°C hasta agotarlo.

2.3.12 Si no tiene plasma del hemocentro realice el mismo procedimiento con el plasma que obtiene de los pacientes.

#### **2.4 Descongelación del cultivo**

- 2.4.1 Revisar en el mapa de congelación, cual vial va a retirar del ultracongelador de -135°C.
- 2.4.2 Tomar el criovial del congelador de -135°C y sosténgalo en la mano con el fin de darle temperatura de 37°C por 5 minutos o hasta que se descongele completamente.
- 2.4.3 En cabina de flujo laminar adicionar en el mismo criovial gota a gota 100 µL de **NaCl 12%**, mezclar cada vez que se adicione una gota, siempre sosteniendo el tubo en la mano para mantener la temperatura.
- 2.4.4 Mantener en la mano por 5 minutos en reposo total.
- 2.4.5 Pasar con micropipeta de 1000 el contenido a un tubo de 50 mL
- 2.4.6 Adicionar 5 mL de **NaCl 1.6%** estéril gota a gota, agitando suavemente.
- 2.4.7 Centrifugar a 500 G por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta pasteur de vidrio.
- 2.4.8 Adicionar 5mL de **iRPMI** y agitar suavemente mientras lo adiciona.
- 2.4.9 Centrifugar a 500 G por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta pasteur.
- 2.4.10 Resuspender el precipitado en 10 mL de medio **cRPMI**
- 2.4.11 Adicionar 300 µL de GRN.
- 2.4.12 Pasar a una caja de cultivo de 25 mL cerrar la caja y llevar a incubadora a 37°C con balance de gases y una vez en la incubadora destapar la caja hasta donde lo permite el tope de la misma.
- 2.4.13 Dejar por dos días sin revisar la parasitemia por medio frotis y coloración por giemsa.

#### **2.5 Revisión de parasitemia del cultivo**

- 2.5.1 Transferir la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.
- 2.5.2 Agitar suavemente la caja con el fin de desprender los GR que están sedimentados.
- 2.5.3 Destapar la caja y retirar 500 µL pasándolos a tubos de 1.5mL.

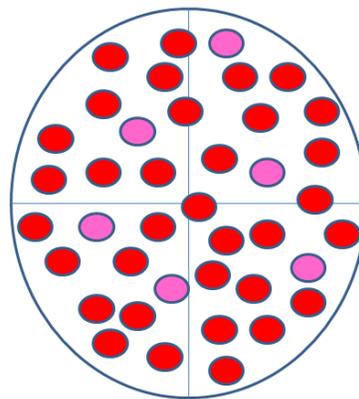
- 2.5.4 Devolver la caja a la incubadora.
- 2.5.5 Tomar el tubo de 1.5mL y llevar a centrifugar por 2 min. a 500 G.
- 2.5.6 Del precipitado tomar 5  $\mu$ L para realizar el frotis.
- 2.5.7 Realizar coloración Giemsa (apéndice 2.6)
- 2.5.8 Observar estadios y calcular parasitemia.

## 2.6 Coloración de los frotis con Giemsa

- 2.6.1 Fijar el extendido adicionando metanol suficiente para cubrir todo el frotis.
- 2.6.2 Descartar el metanol y dejar que se seque completamente a temperatura ambiente o con secador.
- 2.6.3 Preparar solución de Giemsa 1:9 (1 de colorante por 9 de buffer de Giemsa).
- 2.6.4 Adicionar la solución de Giemsa sobre la placa y dejar por 10 minutos.
- 2.6.5 Lavar con agua potable.
- 2.6.6 Secar.
- 2.6.7 Observar al microscopio con objetivo de inmersión 100X.

## 2.7 Cálculo del porcentaje de parasitemia

- 2.7.1 Calcular el porcentaje de parasitemia leyendo los campos necesarios.
- 2.7.2 Cada campo debe contener entre 30 y 300 GR que estén dispuestos de manera homogénea y no superpuestos, esto con el fin de obtener un recuento de 1.000 glóbulos rojos totales.
- 2.7.3 Una vez tenga escogido el campo separa el cuatro cuadrantes y en uno de ellos haga el recuento de GR
- 2.7.4 Posteriormente realice el recuento de GR parasitados en todo el campo (4 cuadrantes)
- 2.7.5  $\% \text{ parasitemia} = (\text{GRP} / \text{GRN} * 4) * 100$
- 2.7.6 Ejemplo, si el campo de la parte superior izquierda fuese su campo los GR rojos son



sus GRN y los GR rosados son sus GRP, entonces

$$2.7.7 \quad \% \text{ parasitemia} = (6 / 9 * 4) * 100 = 16.6\%$$

2.7.8 No olvide anotar los estadios y el porcentaje de estos con respecto en la muestra.

## 2.8 Cambio y mantenimiento del cultivo

2.8.1 Atemperar el medio de cultivo en incubadora a 37°C.

2.8.2 Atemperar los GR y el suero colocándolos en la cabina de flujo laminar

2.8.3 Transferir cuidadosamente la caja de cultivo a cabina de flujo laminar, con el fin de que no se desprendan los GR sedimentados. si la caja se agita durante este proceso debe dejarse estabilizar unos 30 minutos.

2.8.4 Descartar el medio de cultivo de la parte superior con pipeta pasteur.

2.8.5 Adicionar medio **cRPMI**, recordando que cada caja debe quedar con 10 mL.

2.8.6 Homogenizar y dependiendo de la parasitemia y hematocrito adicionar GRN y/o ampliar el cultivo según apéndice 2.9.

2.8.7 Recuerde que el cultivo inicia con 20% de plasma, usted debe llevarlo gradualmente al 10% de plasma (20 – 15 -10% plasma).

## 2.9 Ampliación de cultivo

2.9.1 Atemperar el medio de cultivo colocándolos en incubadora a 37°C.

2.9.2 Atemperar los GRN y el plasma, en la cabina de flujo laminar.

2.9.3 Tomar la caja de cultivo de la incubadora y colocarla en la cabina de seguridad.

2.9.4 Agitar suavemente la caja con el fin de que se levanten los GR que están sedimentados.

2.9.5 Con el porcentaje de parasitemia utilice la fórmula  **$V1 * C1 = V2 * C2$**  esto dependiendo la concentración a la cual desee y necesite dejar el cultivo.

2.9.6 Tomar la cantidad de cultivo que necesite y adicionar medio de cultivo para completar 10 mL, adicionar GR sanos para que el hematocrito se mantenga, agitar suavemente

2.9.7 Llevar a incubadora.

## 2.10 Sincronización del cultivo

- 2.10.1 Sincronizar con una parasitemia mayor a 4% en estadio de anillos y un precipitado cercano de 0.5 mL.
- 2.10.2 Transferir la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.
- 2.10.3 Transferir el contenido de la caja aun tubo estéril de 15 mL.
- 2.10.4 Centrifugar a 500 G por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta.
- 2.10.5 Adicionar 9 partes de sorbitol 5%, homogenizar e incubar a 37°C por 10 minutos.
- 2.10.6 Centrifugar a 500 G por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta pasteur.
- 2.10.7 Adicionar 5 mL de **bRPMI**, homogenizar
- 2.10.8 Centrifugar a 500 G por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta.
- 2.10.9 Adicionar medio **cRPMI** suficiente para que el hematocrito quede a 5%.
- 2.10.10 Pasar a una caja de cultivo de 25 mL cerrar la caja y llevar a incubadora a 37°C con y una vez en la incubadora destapar un poco la caja.
- 2.10.11 Revisar a las 48 horas.

## 2.11 Congelación del cultivo

- 2.11.1 Cuando tenga un cultivo con predominio de anillos y una parasitemia superior al 10%
- 2.11.2 Transferir la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.
- 2.11.3 Transferir el contenido de la caja aun tubo estéril de 15 mL
- 2.11.4 Centrifugar a 2600rpm por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta pasteur.
- 2.11.5 Retirar la capa de GR de color negra.
- 2.11.6 Adicionar solución criopreservante 1:4 (1 de precipitado : 4 de criopreservante)
  - 2.11.7 Adicionar la solución gota a gota, agitando suavemente
  - 2.11.8 Servir de 1000 µL en tubos de criopreservación estériles
  - 2.11.9 Pasar a Nitrógeno líquido o a freezer de -135°C.

## Preparación de las soluciones de NaCl 12%

1. Para preparar la solución de **NaCl 12%**: Pesar 12 g de NaCl y disolver en 100 mL de agua destilada.

#### **Preparación de las soluciones de NaCl 1.6%**

2. Para preparar la solución de **NaCl 1.6%**: Pesar 1.6 g de NaCl y disolver en 100 ml de agua destilada.

#### **Preparación de la solución de sorbitol al 5%**

3. Para preparar la solución de sorbitol al 5%: pesar 5g de sorbitol y diluirlos en 100 mL de agua destilada estéril y filtrar con pirinola de 0.22  $\mu\text{m}$ .

#### **Preparación de la solución criopreservante:**

Mezclar 28 ml de glicerol + 3.024 g de sorbitol + 0.65 g de cloruro de sodio + 72 ml de agua destilada y filtrar en pirinola de 0.22  $\mu\text{m}$

## **D. Anexo 4. POE para evaluación de actividad hemolítica.**

Tomado y adaptado de:

Hoffman Group. Procedimiento estándar para el ensayo de hemólisis

Malagoli, D. A full-length protocol to test hemolytic of palytoxin on human erythrocytes. ISJ 4:92-94, 2007

### **Materiales:**

- Tubos citrato de sodio (tapa azul)
- Sangre
- Solución salina 0.9%
- Goteros
- PBS 1X (pH 7.0)
- Tubos falcon 15 ml
- Placas de 96 pozos fondo redondo
- Pipeta de 1000  $\mu$ l
- Pipeta de 100  $\mu$ l
- Frasco para descartar puntas

### **Equipos:**

- Centrifuga
- Vortex
- Espectrofotómetro de placas

### **Procedimiento:**

#### **1. Preparación de glóbulos rojos**

- a. Tomar la muestra de sangre en tubo de citrato (tapa azul)
- b. Centrifugar 5 min a 500 G.
- c. Marcar el volumen total de sangre
- d. Remover el suero con pipeta plástica pasteur
- e. Llevar a volumen marcado con solución salina (SS)
- f. Mezclar por inversión muy suavemente o con vortex a 2000 rpm (solo un toque)
- g. Centrifugar 5 min a 500 G.
- h. Repetir 4 veces
- i. Remover la solución salina del último lavado
- j. Dejar el paquete de glóbulos rojos para la utilización de la prueba
- k. Adicionalmente se puede adicionar PBS si la sangre se utiliza para varios días con el fin de visualizar la hemólisis.

#### **2. Preparación de las muestras**

- a. Pesar 2 mg del material.
- b. Adicionar DMSO que no supere el 25%, este se debe adicionar de poco a poco e ir mezclando en el vortex, si es necesario someterla a calor por 10

minutos mientras se disuelve, también se puede llevar al sonicador. (En este caso no fue necesario el uso de DMSO ya que no se evidencian problemas de solubilidad en PBS, se pasa al paso c).

- c. Posteriormente completar el volumen con PBS
- d. Preparar las siguientes concentraciones a 1000; 100; 10; 1; 0,1; 0,01 y 0,001 µg/ml.
- e. Estas concentraciones se usa con el fin de determinar el porcentaje de hemólisis y la Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>).
- f. Si el porcentaje de hemólisis es superior a 50% se deberán realizar las siguientes diluciones 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3 y 15.6.

### 3. Controles

- a. Blanco: PBS
- b. Control de lisis espontánea: GR disueltos en PBS 1:10
- c. Control Positivo: Agua ó Triton X-100 al 0.1%

### 4. Análisis de las muestras

- a. Los tres primeros pozos, se usan para depositar el blanco
- b. Los siguientes tres pozos se usan para el control de lisis espontánea
- c. Los siguientes tres pozos se usan para el control positivo
- d. Los otros pozos se utilizarán para las muestras
- e. Mezclar las muestras en un vortex a 2500 rpm.
- f. Servir 100 µl de las muestras por triplicado en placas de 96 pozos de fondo redondo o cónico.
- g. Adicionar 100 µl de los GR.
- h. Incubar por 1 hora a 37°C
- i. Una vez cumplido el tiempo de incubación, centrifugar a 500 G por 10 minutos.
- j. Tomar 50 µl del sobrenadante en una placa de fondo plano.
- k. Leer en espectrofotómetro a 418 nm.

### 5. Cálculo del porcentaje de hemólisis

$$\% \text{hemólisis} = \left( \frac{(ABS_{\text{muestra}} - Prom_{ABS\_PBS}) - (Prom_{ABS\_GR} - PBS)}{(Prom_{ABS\_Ctrl\_positivo} - Prom_{ABS\_PBS}) - (Prom_{ABS\_GR} - PBS)} \right) * 100$$

## **E. Anexo 5. Plegable socialización de resultados previos con la comunidad.**

### Estudios farmacológicos

Se realizaron ensayos para estudiar la capacidad de los remedios de inhibir (*in vitro*) la invasión y el desarrollo del parásito (*Plasmodium falciparum*) dentro de los eritrocitos; también se realizaron ensayos donde se utilizaron ratones de laboratorio infectados, que fueron tratados con los remedios.

Planta a partir de la que se preparo el remedio.	Ensayo <i>in vitro</i> frente a <i>Plasmodium falciparum</i> C <sub>150</sub> (µg/mL)	Ensayo <i>in vivo</i> frente a <i>Plasmodium</i> de ratones % de la inhibición de la parasitemia
Costillo	>50 (poco activo)	1% (poco activo)
Bejuco de Llaño	3.02+/-1 (Activo)	88% (Activo)
Alfo	36.95+/-5 (Poco activo)	3% (poco activo)
Cloroquina (control)	0.04+/-0.006	93%

### CONCLUSIÓN

La información suministrada corresponde al conocimiento de la familia de *Hiloma Saffarna*, quienes muestran prevención de trabajar en proyectos de investigación

*"muchos llegan y se van y nosotros nunca nos enteramos de que pasó, si sirvió o no, y muchos han logrado cosas y a nosotros no nos cuentan".*

La familia posee conocimientos del concepto de salud y de la malaria.

Los anteriores resultados permiten proponer la planta Bejuco de Llaño como activa bajo las condiciones de ensayo estudiadas.

### AGRADECIMIENTOS

El grupo de investigación FaMeTra agradece a la comunidad Ciudad Hitoma, al abuelo José y a la abuela Rosa, por la confianza depositada y las enseñanzas tan valiosas. Por lo anterior presentamos esta información con el fin de retornar a la comunidad los resultados encontrados en el trabajo realizado.

Agradecemos al profesor Pablo A. Palacios de la Sede Leticia de la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo local a este proyecto.

También queremos agradecer a la Dirección de Investigación sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia, que financió el desarrollo de este trabajo.

Bibliografía Universidad Nacional de Colombia. Tesis Maestría en Ciencias Farmacéuticas "Evaluación de la actividad antimalárica de preparaciones tradicionales obtenidas de dos especies promisorias usadas por una comunidad en zona endémica y profundización en el estudio de su actividad farmacológica" Paola Andrea Cardenas Cuadros.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE PREPARACIONES TRADICIONALES USADAS POR UNA COMUNIDAD EN ZONAS ENDÉMICAS Y PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD

FARMACOLÓGICA.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN

FARMACOLOGÍA DE LA MEDICINA

TRADICIONAL Y POPULAR

FAMETRA

GIOVANNY GARAVITO CARDENAS



Facultad de Ciencias  
Departamento de Farmacia

La malaria es una infección causada por un parásito del género *Plasmodium spp*; y transmitida de humano a humano por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* infectado.



#### **SÍNTOMAS:**

Son escalofríos, fiebre, sudoración, dolor de cabeza, vómito, dolor muscular, entre otros y se presentan cada 48 a 72 horas. Los primeros síntomas aparecen de 10 días a 4 semanas después de la picadura.

#### **OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN:**

Estudiar la actividad antimalárica de tres remedios tradicionales, a base de las plantas, empleados por la comunidad.



#### **PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS:**

##### La comunidad

La comunidad fue contactada por intermedio del profesor Pablo Palacios de la Sede de Leticia de la Universidad Nacional de Colombia, se les explicó el proyecto y se obtuvo consentimiento informado por parte del médico tradicional quien preparó los remedios que posteriormente fueron congelados y transportados a Bogotá para su estudio. El abuelo José Octavio García o Hitoma Safama (Luz del Sol) es el médico tradicional de la comunidad y cacique en lo que se refiere a rituales, creencias y tradiciones de su cultura.



##### Concepto de salud y conocimiento de la enfermedad

El concepto de salud es muy importante para la familia "nosotros comemos mucho ají, por eso tenemos sangre caliente que hace que no enfermemos", para ellos la enfermedad es consecuencia de la falta de buena alimentación o debilidad espiritual. La familia conoce la malaria "es cuando pica el mosquito", identifican al vector de transmisión "es el que se para derecho y tiene las puntas de las patitas y de las alas blancas"; la enfermedad la describen como "es un calor que da como aquí (en el pecho), como en el estomago, es muy caliente, hace sudar frío y seco, el sudor pasa y la piel

queda seca, se siente mucho frío, la persona se mueve continuamente y de forma desesperada, la persona se vuelve amarilla, y la cabeza pesa, no come." Diferencian distintas clases de "calentura", unas pueden ser causadas por querer hacer mal "algún espíritu que quiere hacer daño", pero la de la malaria es diferente "es más caliente, en las noches es más y no es seguida, es intermitente".

##### Tratamiento de la enfermedad:

La familia reporta no usar ningún tipo de "medicinas de blancos" porque "son venenos que nos matan", comentan tener su propia farmacia "la selva", su aproximación terapéutica es dual, remedios y oración "esa es nuestra diferencia con los blancos, nosotros tratamos el bichito con los remedios, pero también espiritual que es lo más importante, toca fortalecer el espíritu". Los remedios son amargos "cuando el agua es amarga es mejor, mientras más amargo mejor", se preparan generalmente en decocciones lo cual concentra el remedio "la sal de la planta" que logran obtener a través de la oración que acompaña el proceso desde la colecta de las plantas.

La dosis de remedio de cada paciente depende de cuánto lleva con la enfermedad, el tratamiento se da al final de la tarde "cuando el mosquito pica" y en las mañanas; en pacientes con mucho tiempo con la enfermedad el tratamiento puede ser cada tres o cuatro horas.

Los remedios estudiados fueron preparados a partir de tres plantas, el costillo (corteza), el aifo (raíz) y el bejuco de llano.

## F. Anexo 6. Consentimiento previo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Departamento de Farmacia

**Consentimiento fundamentado previo**

**Título del proyecto:**

**Actividad antimalárica de un remedio tradicional usado por una comunidad en zona endémica, profundización en interacciones consecuencia de su empleo en combinación con medicamentos para tratar la enfermedad.**

Lo invitamos a participar como informante voluntario en el proyecto de investigación realizado por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

El objetivo general de esta investigación es obtener información sobre la preparación de los remedios tradicionales obtenidas de dos plantas usadas para el tratamiento de la malaria, con el fin de valorar experimentalmente el efecto de su uso combinado con medicamentos de uso común en la enfermedad y determinar las ventajas o desventajas que dichas combinaciones conllevan.

Su participación será voluntaria, comunicándonos la información sobre los remedios y las plantas utilizadas en la enfermedad.

La información que le solicitamos incluirá indicarnos que parte de la planta utiliza, los métodos de preparación y forma de uso. La entrevista y preparación de los remedios podrá ser grabada si está de acuerdo con ello, el material audiovisual será empleado íntegramente y únicamente por los investigadores.

Usted presenció las explicaciones completas de los derechos de consulta previa y consentimiento libre previo e informado, basados en documentos públicos sobre consulta previa del Ministerio del Interior y de Justicia y de la cartilla "tejiendo derechos" de la Organización Nacional Indígena de Colombia – ONIC, en los cuales queda descrita la posición que tiene nuestro grupo de investigación, también fue precisa la explicación sobre la participación justa y equitativa de los beneficios que se deriven de la información obtenida dentro del proyecto siguiendo el Protocolo de Nagoya sobre Acceso y Participación en los Beneficios. descrita la posición que tiene nuestro grupo de investigación.

1

Carretera 30 No. 45-03 FACULTAD DE CIENCIAS, Edificio 416 Piso 1º Oficina 17  
Teléfono: (57-1) 316 5116 Correo electrónico: (57-1) 316 5900 Ext: 15626 Fax: 15625  
Correo electrónico: vitorica\_librero@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia, Sur América

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ, FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE FARMACIA GRUPO DE INVESTIGACIÓN FARMETRA

También se le explicó a profundidad el objetivo del estudio, los integrantes del grupo de investigación, la metodología y los aspectos sociales, ambientales, culturales y económicos que el proyecto promueve en la comunidad. Usted decidirá voluntariamente participar en esta investigación. En la publicación o presentación de resultados de investigación su identidad se mantendrá confidencial, esto significa que su nombre, dirección, fecha de nacimiento u otra información que lo pueda identificar no será dada a nadie sin su autorización.

**Informante:**  
HE LEÍDO Y/O ESCUCHADO LO DESCRITO EN LAS PRESENTACIONES Y EN EL PRESENTE DOCUMENTO Y HE TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER LAS PREGUNTAS PERTINENTES.

Al firmar este documento, acepto participar voluntariamente en la investigación en los términos estipulados.

Nombre de la comunidad: Ciudad Hitoma Km. 7

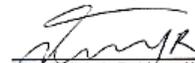
Nombre del líder o representante: José Otmar García (CA) (Tome)

Firma: 

CC: 4963489

Hemos informado de buena voluntad todos los aspectos científicos, éticos y legales vigentes relacionados con la investigación en la siguiente fecha:

Día 30 Mes Agosto Año 2013

  
**Yinneth Victoria Rodríguez N.**  
 C.C. 53.167.559  
 Estudiante Maestría Ciencias - Farmacología

  
**Giovanni Garavito C.**  
 C.C. 19.420.648  
 Profesor Asociado  
 Investigador Principal

2

**145 años**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Carretera 30 No. 45-03 FACULTAD DE CIENCIAS Edificio 416 Piso 1º Oficina 17  
Teléfono: (57-1) 316 5116 Correo electrónico: (57-1) 316 5900 Ext: 15626 Fax: 15625  
Correo electrónico: vitorica\_librero@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia, Sur América

## G. Anexo 7. Clasificación taxonómica



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES  
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 221  
Bogotá D.C., 16 de octubre de 2013

Señores  
Giovanny Garavito  
Ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica muestras

Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

Nombre	FAMILIA	No. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Ambelania</i> cf. <i>duckei</i> Markgr.	APOCYNACEAE	570483	Victoria Rodríguez & José García	1	A. Jara/2013
<i>Abuta grandifolia</i> (Mart.) Sandwith	MENISPERMACEAE	570484	Victoria Rodríguez & José García	3	A. Jara/2013
<i>Abuta grandifolia</i> (Mart.) Sandwith	MENISPERMACEAE	570485	Victoria Rodríguez & José García	4	A. Jara/2013
<i>Curarea toxicifera</i> (Wedd.) Barneby & Krukoff	MENISPERMACEAE	570486	Victoria Rodríguez & José García	2	A. Jara/2013

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

Prof. CARLOS ALBERTO PARRA  
Administrador General  
Herbario Nacional Colombiano -COL  
E-mail: herbacol\_fcboq@unal.edu.co

Copia: Archivo COL  
Héctor Tobo.

ciencia, tecnología e innovación para el país

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,  
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222  
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext.11538 – 11518 Fax: 11538  
Correo electrónico: herbacol\_fcboq@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia, Sur América

# Bibliografía

Abdulelah H. Al-Adhroeya, Zurainee, M., Hesham M. Al-Mekhlafia, Amran, A., & Mahmud, R. (2011). Evaluation of the use of *Cocos nucifera* as antimalarial remedy in Malaysian. *Journal of Ethnopharmacology*, 988–991.

Aminake, M. N., & Gabriele Pradel. (2013). Antimalarial drugs resistance in *Plasmodium falciparum* and the current strategies to overcome them . *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.), 269 - 282.

Angerhofer, C., Guinaudeau, H, Wongpanich, V, Pezzuto, JM , & Cordell, G. (1999). Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, 59–66.

Aragadvay, P. (2009). *Elaboración y control de calidad de tinturas y gel cicatrizante y antiinflamatorio a base de chilca (Bacharis latifolia) y hierva mora (Solanum nigrum)*. Rio Bamba - Ecuador: Tesis de grado Bioquímico Farmacéutico, Escuela superior politécnica de Chimborazo.

Arango, G. (2002). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Recuperado el 25 de Septiembre de 2015, de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides2001.pdf>

Arango, R., & Sánchez, E. (1997). Los pueblos Indígenas de Colombia. *DANE: Censo 1993 - Proyección 2001*.

Arévalo-Herrera M., Quiñones M, Guerra, C, Céspedes, N, Girón, S, Ahumada, M, y otros. (2012). Malaria in selected non-Amazonian countries of Latin America. (Elsevier, Ed.) *Acta trópica*, (3), 303–314.

Arias, H. (2015). *Estadarización de un método fluorométrico para la determinación de la densidad parasitaria por Plasmodium en modelos farmacológicos de malaria en In vivo e In vitro*. Bogotá, Colombia. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Bertani, S., Bourdy, G, Landau, I, Robinson, J, Esterre, Ph, & Deharo, E. (2005). Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 45–54.

Bick, I. R. (1996). Alkaloids from Australian Flora, Chapter One. En *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Hobart, Tasmania: University of Tasmania, 2 - 142.

- Bick, I., & Clezy, P. (1960). *Journal of the Chemical Society*, 2402.
- Blair, S., & Madrigal, B. (2005). *Plantas antimaláricas de Tumaco: Costa Pacífica colombiana*. Universidad de Antioquia.
- Bourdy, G., Willcox, M., Ginsburg, H., Rasoanaivo, P., Graz, B., & Deharo, E. (2008). Ethnopharmacology and malaria: New hypothetical leads. *International Journal for Parasitology*, 33 - 41.
- Cabello, M., & Belloso, G. (2009). Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. *Revista UDO Agrícola* 9, (3), 705-710.
- Cáceres, J. (2009). Epidemiología de malaria por *Plasmodium malariae* en Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, (2).
- Cárdenas, P. (2011). *Evaluación de la actividad antimalárica de preparaciones tradicionales obtenidas de dos especies promisorias usadas por una comunidad en zona endémica y profundización en el estudio de su actividad antimalárica*. Bogotá, Colombia. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia.
- Carod-Artal, F. (2012). Curares y timbós, venenos del Amazonas. *Revista de Neurología*, 55 (11), 689-698.
- Cava, M., Kunitomo, K., & DaRocha, A. (1969). *Phytochem* (8), 2341.
- Chassaing, J. (2001). Malaria and antimalarial drugs. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21.
- Chilengi, R., & Gitaka, J. (2010). Is vaccine the magic bullet for malaria elimination? A reality check. *Malaria Journal*, Suplemento 3.
- Cox, F. (2002). History of Human Parasitology. *Clinical microbiology reviews*, 15, 595-612.
- DANE. (2007). Colombia una nación multicultural: su diversidad étnica. En DANE. Bogotá.
- De la Cruz Chacón, I., González-Esquinca, A., & Riley-Saldaña, C. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*, (17) 2, 189-202.
- Deane, L. (2007). Os grandes marcos na história do controle da malaria. *Revista Brasileira de Medicina Tropical*, 40 - 59.
- Deharo, E., Bourdy, G., Quenevo, C, Muñoz, V, Ruiz, G, & Sauvain, M. (2001). A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 91 - 98.

Deharo, E., Gautret, P, Muñoz, V, & Auvain, M. (2000). *Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas*. CITED- IRD. La Paz.

Flores, A., Badii, M, & Ponce, G. (2001). Resistencia a insecticidas en insectos vectores de enfermedades con énfasis en mosquitos. *Revista de salud pública y nutrición*, (2)4.

Fuller, T., & May McClintock, E. (1986). *Poisonous Plants of California*. Londres: The regents of the university of california.

Garavito, G. (2003). *Estandarización de dos modelos de actividad antimalárica como herramientas para la evaluación farmacológica de sustancias o extractos de origen vegetal*. Bogotá: Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. .

Garavito, G. (2007). *Etude pharmacologique expérimentale del activité antipaludique d un composé de synthèse: le chlorure de methylthioninium*. Paris: Tesis de doctorado, Université Toulouse III- Paul Sabatier École.

Garavito, G., Rincon, J, Arteaga, L, Hata, Y, & Bourdy, G. (2006). Antimalarial activity of some Colombia medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 460-462.

Gómez, G., Cienfuegos, A, Gutierrez, L , Conn, J, & Correa, M. (2010). Análisis morfológico y molecular evidencia problemas al identificar *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) por claves dicotómicas. *Revista Colombiana de Entomología* (36), 68 - 75.

González-Esquinca, A., Luna-Cazáres, L, & Schlie-Guzmán, M. (2007). Los alcaloides de Annonaceae en el complejo ranaleano. *Lacandonia*, (1)1, 19-28.

Guerra, C., Gikandi, P., Tatem, A., Noor,, & Smith,. (2008). The Limits and Intensity of Plasmodium falciparum Transmission: Implications for Malaria Control and Elimination Worldwide. Resumen del editor Académico: Stephen John Rogerson, Royal Melbourne.

Guevara, H., Luengas, P, & Garavito, G. (2010). Documental revision of the natural products authorized for marketing in Colombia. *Colombia Médica*, (41)2, 129-140.

Hata, Y. (2005). *Contribución a la estandarización de un extracto con base en *Abuta grandifolia**. Bogotá, Colombia. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.

Hostettmann, K., Gupta, M, Martson, A, & Ferreira E. (2008). *Manual de estrategias para el asilamiento de productos naturales bioactivos*. Bogotá: CYTED.

<http://www.biologia.edu.ar/>. (2015). Recuperado el 29 de septiembre de 2015, de <http://www.biologia.edu.ar/diversidadv/fascIII/16.%20Menispermaceae.pdf>

ICN. (2015). *Instituto de Ciencias Naturales*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2015, de Universidad Nacional de Colombia: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/>.

Ifeoma, O., Itohan, A., Samuel, O., & Adeola, S. (2013). Isolation, fractionation and evaluation of the antiplasmodial properties of *Phyllanthus niruri* resident in its chloroform fraction. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 169-175.

INS. (2013). *Boletín Epidemiológico Semanal*. Recuperado el 29 de julio de 2013, de <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2013%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2024.pdf>.

INS. (2014). *Boletín epidemiológico semanal N° 51*. Recuperado el Diciembre de 2014, de <http://www.ins.gov.co/>

INS. (2015). Recuperado el 8 de septiembre de 2015, de <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2015%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2036.pdf>

INS/OPS. (Noviembre de 2015). *Guía de Vigilancia Entomológica y Control de Malaria*. Recuperado de: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/Documentacin%20Malaria/03%20Vigilancia%20entomo%20malaria%20.pdf>

Jacques, F., & Bertolino, P. (2008). Molecular and morphological phylogeny of Menispermaceae (Ranunculales). *Journal of Systematics and Evolution*, (274), 83-97.

King, H. (1940). Curare alkaloids. Part V. Alkaloids of some *Chondrodendron* species and the origins of Radix Pareirae Bravae. *Journal of the Chemical Society*, 737-746.

King, H. (1947). Curare alkaloids. Part VI. Alkaloids from *Chondrodendron tomentosum*. *Journal of the Chemical Society*, 936 - 937.

Kwiecinski, M., Felipe KB, Schoenfelder T, de Lemos Wiese LP, Rossi MH, & González E. (2008). Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 69-75.

Kvist, L., Christensen, S, Rasmussen, H, Mejia, K, & Gonzalez, A. (2006). Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 390–402.

Lavault, M., Fournet, A, Guinaudeau, H, & Bruneton, J. (1985). Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. *Journal of Chemical Research*, 248.

López, A. (2008). *Aproximaciones conceptuales y metodológicas en la identificación de requerimientos para la conceptualización de un sistema de información geográfica participativo en el resguardo indígena Ticuna Huitoto kilómetros 6 y 11 carretera Leticia – Tarapacá*. Bogotá: Tesis de pregrado. Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Malagoli, D. (2007). A full-length protocol to test hemolytic of palytoxin on human erythrocytes. *Invertebrate Survival Journal*, (4), 92-94.

Marini, B. (1972). Recientes progresos en el estudio del curare y de los alcaloides de menispermaceae y loganiaceae. *Comentar II*, 1-28.

Mekonnen, L. (2015). In vivo antimalarial activity of the crude root and fruit extracts of *Croton macrostachyus* (Euphorbiaceae) against *Plasmodium berghei* in mice. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 168 - 173.

Mesa, A., Toro, J., Cardona, F., & Blair, S. (2012). Actividad antiplasmodial y citotóxica de extractos etanólicos de especies de género *Piper*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, (11)2, 154 - 162.

Mesquita., M. (2006). *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 165-170.

Meyer, A. (2011). Imming P. Benzylisoquinoline Alkaloids from the Papaveraceae: The Heritage of Johannes Gadamer (1867–1928). *Journal Natural Products*, (74), 2482-2487.

Muregi, F., Ishih, A, Miyase, T, Suzuki, T, Kino, H, Amano, T, y otros. (2007). Antimalarial activity of methanolic extracts from plants used in Kenyan ethnomedicine and their interactions with chloroquine (CQ) against a CQ tolerant rodent parasite, in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, (133)1, 850-855.

Nathan, J., Omar, J , & George, D. (2014). MicroRNA-regulation of *Anopheles gambiae* immunity to *Plasmodium falciparum* infection and midgut microbiota. *Developmental and Comparative Immunology*, 170 - 178.

Nguta, J., Mbaria, J, Gakuya, D, Gathumbi, P, & Kiama, S. (2010). Antimalarial Herbal remedies of Msambweni, Kenia. *Journal of Ethnopharmacology*, 424 - 432.

Olano, V. (2001). Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de malaria en Colombia. *Biomédica*, 402 - 408.

OMS. (2008). Recuperado el 17 de Julio de 2013, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/>

OMS. (2013). Recuperado el 19 de Julio de 2013, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>

OMS. (2015). *Informe Mundial sobre el Paludismo*. Recuperado el Septiembre de 2015, de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/161914/1/WHO\\_HTM\\_GMP\\_2015.2\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/161914/1/WHO_HTM_GMP_2015.2_spa.pdf?ua=1)

OMS/OPS. (2015). Recuperado el Septiembre de 2015, de Dossier Paludismo. Dia mundial del paludismo. Abril de 2015. Invertir en el futuro, vencer el paludismo.: <http://www.who.int/malaria/es/>

Pascual, H. (2000). *Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Ciencias fisiológicas*. Recuperado el noviembre de 2015, de <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c801.htm>

Patrick, B., Memvanga, A., Gaston, L., Tona, B., Gauthier, K., Mesia, B., y otros. (2015). Antimalarial activity of medicinal plants from the Democratic Republic of Congo: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, (169),76–98.

Pelletier, W. (1999). *Alkaloids: Chemical and biological perspectives*. Pergamon.

Pérez, D., Iannacone, J., & Tueros, A. (2008). Toxicidad de *Paullina Clavigera* Scgltdl (SAPINDACEAE) y *Chondrodendron Tomentosum* Ruiz ET PAV (MENISPERMACEAE) sobre el piojo saltador del CAMU CAMU *Tuthillia Cognata* (HEMIPTERA: PSYLLIDAE). *Gayana Bótanica*, 145-152.

Phillipson, J. (1994). Natural products as drugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Vol 88. Suplemento 1. 17 – 19.

Plotkin, M. (2001). Global phytochemistry: The ethnobotanist view. *Phytochemistry*, (56)2, 117–120.

Rasoanaivo, P., Deharo, E, Ratsimamanga-Urverg, S, & Frappier, F. (2004). Guidelines for the Nonclinical Evaluation of the Efficacy of Traditional Antimalarials. En M. Willcox, Bodeker, G, & Rasoanaivo, P, *Traditional Medicinal Plants and Malaria* (págs. 255-270). CRC Press.

Reyes, A., Gonzalez, J, Urquiola, A, Garcia, M, & Monteagudo, R. (2007). Influencia del método de secado y el tiempo de almacenamiento en estante de las hojas de *Erythroxylum minutifolium* Griseb sobre la actividad citotóxica y antiherpética tipo 1. *Revista Cubana de Química*, (19)1.

Rodríguez - Pérez, Martinez, J, Rivero, L, Alvarez, H, Valdez, A, Rodríguez, D, y otros. (2006). Evaluación de la actividad antimalárica de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional cubana. *Revista de Ciencias Farmacéuticas Básicas y Aplicadas*, (27)3.

Sachs, J., & Malaney, P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature*, 680-685.

Sanabria, A. (1983). *Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

Schäfer, D. (2007). Milk of paradise? Opium and opiates in nineteenth and twentieth century literature. *Der Schmerz*, 21(4):339-346.

Singla, D., Sharma, A, Kaur, J, Panwar, B, & Raghava. (2010). BIAdb: A curated database of benzyloquinoline alkaloids. *BMC Pharmacology*, (10), 4.

*Sistema de plantas vasculares.* (2015). Recuperado el 29 de Septiembre de 2015, de [http://www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/menispermaceae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/menispermaceae.html)

Smeijsters, L., Zijlstra, N, Franssen, F, & Overdulve, J. (1996). Simple, fast, and accurate fluorometric method to determine drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* in 24-well suspension cultures. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, (40)4, 835 - 838 .

Snow, R., Korenkromp, E, & Gouws, E. (2004). Pediatric mortality in Africa: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. Suplemento 2. 16 - 24.

Tellez, J., Ovea, R, Osorio, C, Arrieta, J, & Mendoza, D. . (2004). Relación entre el clima y la transmisión de la malaria en la costa atlántica: un trabajo de investigación formativa. . *Universidad Magdalena, Fondo Editorial*, (1).

*The plant List.* (2013). Recuperado el 9 de Octubre de 2015, de <http://www.theplantlist.org/cite/>

Thomas C. Fuller, & Elizabeth May McClintock. (1986). *Poisonous Plants of California*. Londres: The regents of the university of california.

Trager, & Jensen. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 673 - 675.

Trager, W., & Jensen, J. (1976). Human malaria parasites in Continuous culture. *Science*, 193, 673.

Tuteja, R. (2007). Malaria - an overview. *The FEBS journal*, 4670 - 4679.

UNICEF. (2013). Recuperado el 17 de Julio de 2013, de [http://www.unicef.org/health/index\\_malaria.html](http://www.unicef.org/health/index_malaria.html)

UNNE. (2015). *Guía de Consultas Botánica II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura* .

Urbina, F. (2006). *Mito y gesto un relato de Don José García 1976*. Antipoda N°3.

Valencia, M., Durango, S, Pinillos, J , Mejía, A, & Gallardo-Cabrera, C. (2011). Extracción de fracciones con actividad antioxidante en hojas de *Guadua angustifolia* Kunth. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, (16)4.

Wagner, H., Blandt, S, & Zgainski, E. (1984). *Plant Drug Analysis*. New York: Springer-Verlang.

Willcox, M., Bodeker, G., & Rasoanavio, P. (2004). *Traditional medicine plants and Malaria*. Paris, Francia. CRC PRESS.

Willcox, M., Cosentino, M, Richard, R, Wayling, S, & Bodeker, G. (2001). Natural products for the treatment of tropical diseases. *Trends in parasitology*, 58 – 60.

Winstanley, P. (2000). Chemotherapy for falciparum malaria: The Armoury, the Problems and the prospects. *Parasitology Today*, 146 - 147.

Wintersteiner, & Dutcher, J. (1943). *Science* 97, 467.

Zirihi, G., Mambu, F, Guede-Guina, B, Bodo., P, & Grellier. (2005). In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *Journal Ethnopharmacology*, 281-285.

Zowai, J., Muli, F, Boga, H, Chhabra, S, Kofi, W, Oudo, J, y otros. (2003). The invitro determination of the potency of selected Kenyan medicinal plants traditionally used to treat tuberculosis and other bacterial infections. In: Proceedings of the Second National Congress on Quality Improvement in Health Care. *Medical Research and Traditional Medicine in Nairobi, Kenya*, 24 - 28.