



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**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 Cárdenas Cuadros**

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

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 farmacológica.**

## **Paola Andrea Cárdenas Cuadros**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Farmacéuticas**

Director:

Ph.D., Giovanni Garavito Cárdenas

Línea de Investigación: Actividad antiparasitaria

Grupo de Investigación:

FaMeTra "Farmacología de medicina tradicional y popular"

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

2011

*A mi familia por su apoyo incondicional.  
Especialmente a ti Mamá.*



## **Agradecimientos**

A Dios y mi Virgen María, por ser mi fortaleza y guía en este hermoso caminar por la vida.

A mis padres Nair y Pedro por la confianza depositada, por su amor incondicional y por ser mi motivo de lucha.

A mi Hermano Wilmer, por su amistad y paciencia para escucharme en los momentos de desesperación, a mis hermanitas Yamira y Alejandra.

A la Universidad Nacional de Colombia, en especial a la planta docente del Departamento de Farmacia por la formación brindada.

A la Dirección de Investigación sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia, por el programa de “Apoyo a tesis de posgrado” que financió el desarrollo de este trabajo

A la comunidad Ciudad Hitoma, en especial al abuelo José y a Jesus, sin su ayuda esto no habría sido posible, a la abuela Rosa, a José, Mauricio, Pedro, Merengue, simplemente gracias por confiar en mí y por enseñarme que la vida es sencilla y se puede ser feliz.

Al Profesor Giovanni Garavito por su ayuda y enseñanzas brindadas durante el desarrollo del proyecto

Al profesor Pablo Palacios por su ayuda en mi estadía en Leticia.

Al Profesor Edgar Linares, ayuda indispensable en la determinación botánica de las especies.

Al Profesor Juan Camilo Marín Loaiza, por su compañía en mi primera travesía.

A mis compañeras de ensayos Maritza y Milena, por tantos ensayos fallidos pero finalmente culminados.

A Jessica, Ana María, Carolina, por su colaboración en la lectura de los ensayos.

A Reina por su ayuda en los ensayos y en la lectura de los mismos.

A Cesar por su amistad, que esta perdure mucho tiempo más.

A mis viejos y constantes amigos Ana, Ximena, Juan Carlos.

Al Profesor Jaiver Rosas por enseñarme y permitirme dar mis primeros pasos en la vida docente.

A Marcela Aragón por su valiosa amistad, por su constante apoyo y por creer en mí.

Al Profesor Javier Rincón quien siempre ha estado ahí presente.

## Resumen

Se trabajó con la comunidad Ciudad Hitoma de la ciudad de Leticia, obteniéndose información de tres plantas usadas para el tratamiento de la malaria por parte del médico tradicional. Las preparaciones fueron evaluadas en los modelos de actividad antiplasmodial (Ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo de *P. falciparum* cepa FCB2) y en el modelo de actividad antimalárica *in vivo*, ratones infectados con *P. berghei*.

De las cinco preparaciones evaluadas, solamente la preparación obtenida de *Curarea toxicofera* mostró una actividad buena a moderada en el ensayo *in vitro* (CI50 de 1.1 a 10 µg/mL) y actividad buena a moderada (Inhibición de la parasitemia de 50 a 90%) en los ensayos *in vivo*. Mediante perfiles de CCD (Cromatografía en capa delgada) se encontró cualitativamente la presencia de compuestos de tipo alcaloidal principalmente y de tipo esteroideo y/o triterpénico en esta preparación.

Las otras preparaciones evaluadas, obtenidas de *Abuta grandifolia* y *Aspidosperma excelsum*, mostraron muy poca actividad (CI50 de 26 a 50 µg/mL) en los ensayos *in vitro* e inactivas en las condiciones del ensayo *in vivo*. Se detectó la presencia de flavonoides en estas mismas preparaciones.

**Palabras clave:** Medicina Tradicional, Malaria, *Abuta grandifolia*, *Aspidosperma excelsum*, *Curarea toxicofera*.

## Abstract

We worked with the community “Ciudad Hitoma” of the Leticia, obtaining information from three plants used for the treatment of malaria by the traditional healer. Preparations were evaluated in antiplasmodial activity (Test of inhibition of invasion and development of *P. falciparum* strain FCB 2) and the model of antimalarial activity *in vivo*, mice infected with *P.berghei*.

Of the five preparations tested, only the preparation obtained from *Curarea Toxicofera* showed a good activity to moderate *in vitro* assay (CI<sub>50</sub> of 1.1 to 10 mg / mL) and good to moderate activity (inhibition of parasitemia of 50 to 90%) *in vivo* testing. By TLC profiles (thin layer chromatography) showed qualitatively the presence of compounds mainly type and type alkaloidal steroid and / or triterpenes in this preparation.

The other preparations tested obtained from *Abuta grandifolia* and *Aspidosperma excelsum* showed very little activity (CI<sub>50</sub> of 26 to 50 mg / mL) in the inactive *in vitro* and *in vivo* test conditions.

**Keywords:** Traditional medicine, Malaria, *Abuta grandifolia*, *Aspidosperma excelsum*, *Curarea toxicofera*



# Contenido

	Pág.
Resumen .....	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas .....	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIV
Introducción .....	1
<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>3</b>
1.1 La malaria.....	3
1.1.1 El parásito .....	3
1.1.2 Ciclo de vida del parásito .....	5
1.1.3 La enfermedad.....	6
1.2 Medicina tradicional .....	8
1.3 Especies vegetales.....	10
1.3.1 <i>Abuta grandifolia</i> Sandwith.....	11
1.3.2 <i>Aspidosperma excelsum</i> Benth .....	12
1.3.3 <i>Curarea toxicofera</i> Wedd .....	13
1.4 Comunidades indígenas en Colombia .....	13
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>15</b>
2.1 Acceso a la comunidad indígena y al médico tradicional .....	15
2.1.1 Preparación de remedios tradicionales .....	15
2.1.2 Conservación de remedios tradicionales.....	16
2.2 Material vegetal .....	16
2.3 Caracterización del remedio .....	16
2.4 Actividad antimalárica <i>in vitro</i> .....	17
2.5 Actividad antimalárica <i>in vivo</i> .....	19
2.6 Ensayo de actividad hemolítica.....	20
2.7 Análisis estadístico .....	20
<b>3. Resultados.....</b>	<b>21</b>
3.1 Acercamiento a la comunidad indígena .....	21
3.1.1 Remedios y especies vegetales informadas para validación de su uso.....	25
3.2 Caracterización química .....	28
3.3 Actividad antimalárica.....	31
3.3.1 Actividad antimalárica <i>in vitro</i> .....	31

---

3.3.2	Actividad antimalárica <i>in vivo</i> .....	36
3.4	Actividad hemolítica .....	37
<b>4.</b>	<b>Discusión de resultados.....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>45</b>
5.1	Conclusiones.....	45
5.2	Recomendaciones.....	46
<b>A.</b>	<b>Anexo: Consentimiento informado.....</b>	<b>47</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo: Realización del ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo de <i>Plasmodium falciparum</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>D.</b>	<b>Anexo: Ensayo de actividad hemolítica .....</b>	<b>57</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>59</b>

## Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Estadios sanguíneos de las cuatro especies de <i>Plasmodium</i> causantes de malaria en humanos.....	4
Figura 1-2. Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> .....	5
Figura 1-3. Distribución territorial de los casos de Paludismo 2010.....	7
Figura 1-4. <i>Abuta grandifolia</i> Sandwith.....	11
Figura 1-5. <i>Aspidosperma excelsum</i> Benth.....	12
Figura 1-6. <i>Curarea toxicofera</i> Wedd.....	13
Figura 2-1. Diseño de placa, ensayo <i>in vitro</i> de inhibición del crecimiento.....	18
Figura 3-1. Coordenadas de trabajo.....	22
Figura 3-2. Colecta de costillo ( <i>Aspidosperma excelsum</i> ). .....	25
Figura 3-3. Abuelo Hitoma Safiama preparando remedios tradicionales.....	26
Figura 3-4. Remedios tradicionales de las diferentes plantas utilizadas por la comunidad Ciudad Hitoma.....	27
Figura 3-5. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales UV 254 nm; fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20). .....	29
Figura 3-6. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales UV 365 nm; fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20). .....	29
Figura 3-7. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales, fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20), Revelador de Godin. Detección de compuestos de tipo Esteroidal y/o triterpeno. ....	30
Figura 3-8. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales, fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20), Revelador de NP/PEG. A. visible, B. UV 365 nm. Detección de compuestos tipo flavonoide.. .....	30
Figura 3-9. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales, fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20), Revelador de Dragendorff. Detección de compuestos tipo alcaloides.....	31
Figura 3-10. Gráfica Concentración –Respuesta de RTCC y RTCH, preparación tradicional de corteza y hojas de <i>Aspidosperma excelsum</i> respectivamente .....	32
Figura 3-11. Gráfica Concentración –Respuesta de RTB, preparación tradicional de <i>Curarea toxicofera</i> .....	33
Figura 3-12. Gráfica Concentración –Respuesta de RTAR, preparación tradicional de <i>Abuta grandifolia</i> raíz.....	33
Figura 3-13. Gráfica Concentración –Respuesta de RTAH, preparación tradicional de <i>Abuta grandifolia</i> hojas. ....	34
Figura 3-14. Concentración –Respuesta de Cloroquina .....	34

Figura 3-15. Concentración –Respuesta de Cloroquina y RTB preparación tradicional de <i>Curarea toxicofera</i> . .....	35
Figura 3-16. Porcentaje de inhibición de la parasitemia en la evaluación de la actividad antimalárica <i>in vivo</i> mediante Test de Peters. ....	36
Figura 3-17. Porcentaje de supervivencia de los animales, durante el desarrollo de test de peters.....	37

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 2-1. Reveladores utilizados para los perfiles cromatográficos.....	16
Tabla 3-1. Nombres científicos de plantas usadas por la comunidad Ciudad Hitoma para el tratamiento de la malaria. ....	27
Tabla 3-2. Descripción de la preparación de los remedios descritos por la Comunidad Ciudad Hitoma y evaluados en ensayos de actividad antimalárica. ....	28
Tabla 3-3. Metabolitos secundarios detectados por CCD en las preparaciones tradicionales evaluadas. ....	31
Tabla 3-4. $CI_{50}$ de las preparaciones evaluadas en el ensayo de inhibición del desarrollo de <i>P. falciparum</i> cepa FCB-2.....	35
Tabla 3-5. Promedio de porcentajes de parasitemia de animales tratados con los remedios tradicionales a dosis de 250 mg/kg*día, en test de Peters .....	36
Tabla 4-1. Criterios de clasificación de la actividad antimalárica de extractos evaluados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . ....	41

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

ACT	Artemisinin Combination Therapy
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
Cf	Concentración final
Ci	Concentración inicial
Cl <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
DMSO	Dimetil Sulfoxido
G	Gravedades
GPS	Global Position System
GR	Glóbulos Rojos
GRP	Glóbulos Rojos Parasitados
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
INS	Instituto Nacional de Salud
IPA	Índice Parasitario Anual
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
NA	Naranja de Acridina
NP/PEG	Reactivo de Productos Naturales (Ácido difenilbórico aminoetilester 1%)/ Reactivo PEG (Polietilenglicol 4000 5% en metanol)
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONIC	Organización Nacional de Indígenas de Colombia
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Phosphate buffered saline

PFT	Producto Fitoterapéutico Tradicional
RITAM	Research Initiative on Traditional Antimalarial Method
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium





# Introducción

La malaria o paludismo es una de las enfermedades más importantes de la región ecuatorial, ya que es causante de una morbilidad y mortalidad especialmente en niños y mujeres embarazadas. En Colombia la malaria es endémica en gran parte del territorio, siendo éste el país de América con mayor número de casos reportados después de Brasil. La Malaria representa un problema de salud en el 85% del territorio rural situado por debajo de los 1600 m.s.n.m, con condiciones climáticas y geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad. Adicionalmente, según el reporte de 2010 de la Organización Mundial de la Salud, Colombia junto con Brasil y Guyana tienen los menores logros en cuanto a la reducción de la enfermedad en el periodo de 2000 a 2009 [1]. El panorama de la enfermedad a nivel mundial con la aparición y avance de la resistencia por parte del parásito ha llevado a que la Organización Mundial de la Salud sugiera que, la utilización de nuevas herramientas terapéuticas no se realice de manera individual sino en combinación con fármacos ya existentes de manera que se pueda evitar y retrasar en el tiempo la aparición de la resistencia.

La biodiversidad de nuestro país es una de las más grandes a nivel mundial, ocupando el segundo lugar en flora y fauna. Por esta razón nuestros esfuerzos como país deben ser cada vez mayores con el fin de conocer y sostener este patrimonio a través de la conservación y utilización sostenible de dichos recursos con retorno a las comunidades de sus beneficios. En Colombia existen 1'392.323 indígenas distribuidos en todo el territorio nacional [2], población portadora de un valioso conocimiento tradicional acerca de la utilización de plantas y demás recursos naturales útiles para el cuidado y mantenimiento de la salud. Sin embargo este conocimiento se ve amenazado por los constantes desplazamientos de su territorio, y la introducción de nuestra cultura urbana que ha generado la falta de interés de los jóvenes por continuar conservando dicho conocimiento. Como es sabido, este conocimiento se transmite de generación en generación por tradición oral, ya que así aseguran que solo las personas merecedoras del mismo sean las que lo conozcan y utilicen. Sin embargo, esto puede llevar a que la pérdida del conocimiento sea fácil si no existen descendientes interesados en el mantenimiento de su cultura.

En algunas oportunidades es conocida la especie vegetal utilizada tradicional o popularmente para el tratamiento de diferentes enfermedades pero muy pocas veces es conocida la forma de preparación de sus "remedios" empleados por los médicos tradicionales, cuáles son las condiciones de selección, procesamiento, combinación, preparación y dosificación de sus propios remedios además de los rituales y contexto en el cual pueden ser empleadas sus preparaciones. La medicina tradicional no es solo la

utilización de determinada planta para el tratamiento de las enfermedades sino la cultura y todo el contexto involucrado en los rituales de cuidado, mantenimiento y restauración de la salud [3]. Para la validación de la medicina tradicional es necesario conocer y evaluar las preparaciones tradicionales en el contexto de su uso.

Con el fin de realizar una aproximación a la etnofarmacología y a los conocimientos tradicionales de nuestros pueblos indígenas se planteó como objetivo principal del presente trabajo la evaluación de la actividad antimalárica de preparaciones tradicionales obtenidas de dos especies promisorias usadas por una comunidad en zonas endémicas, y como objetivos específicos:

1. Acceder al médico tradicional de una comunidad indígena de la Amazonia.
2. Conocer la forma de obtención y utilización de las preparaciones tradicionales, utilizadas como antimaláricos, de una comunidad indígena de la Amazonia.
3. Caracterizar fitoquímicamente de manera preliminar y cualitativamente la preparación tradicional mediante perfiles cromatográficos.
4. Evaluar la actividad antimalárica *in vitro* e *in vivo* de la preparación tradicional.

# 1. Marco teórico

## 1.1 La malaria

La malaria representa una enfermedad ancestral, las muertes por fiebres periódicas y la esplenomegalia han sido descritas desde 2700 a. C. en escritos egipcios y chinos, se dice que a Roma llegó en el año 200 a. C. y se expandió rápidamente por Europa; se asume que los conquistadores y colonizadores europeos importaron *Plasmodium vivax* y *Plasmodium malariae* de las Américas. De otro lado, la llegada de *Plasmodium falciparum* a Europa coincidió con la importación de esclavos desde África, de tal forma que cerca del año 1800 la malaria ya se había descrito a nivel mundial. La malaria ha sido una enfermedad infecciosa de gran impacto a nivel mundial, ha tenido impacto sobre las guerras, movilizaciones de poblaciones, y en el desarrollo o declinación de varias naciones [4].

### 1.1.1 El parásito

La malaria es una infección causada por protozoarios del género *Plasmodium spp.* (familia *Sporozoa*, orden *Haemosporidae*), y transmitida a los humanos por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles*, después que esta ha picado otro humano infectado. Cuando el mosquito pica, toma del hospedero humano infectado los gametocitos que desarrollan su ciclo sexual en su tracto digestivo y evolucionan a esporozoitos que migran a las glándulas salivales y son inyectados en el torrente sanguíneo del hospedero al ser picado por el mosquito [5].

*Anopheles gambiae* es la especie responsable mayoritariamente de la transmisión de la enfermedad. En Colombia se consideran tres vectores principales *A. albimanus*, *A. darlingi* y *A. nuñez-tovari* [6].

Cuatro especies del parásito infectan al humano, estas especies difieren en la distribución geográfica, apariencia microscópica y características clínicas como potencial de infección, severidad de la enfermedad y potencial para causar recaídas; de las cuatro especies *P. falciparum* es la más virulenta y potencialmente mortal para el humano [7].

*Plasmodium falciparum*: Es la especie más patógena, responsable del mayor número de casos mortales, se distribuye mayoritariamente en las zonas ecuatoriales, principalmente en África [4].

*Plasmodium vivax*: Agente responsable de malaria terciaria, llamado así pues su ciclo febril dura 48 horas, predomina principalmente en las zonas donde la malaria es

endémica; recientemente han crecido el número de reportes donde *P. vivax* ha sido causante de malaria severa y fatal [8].

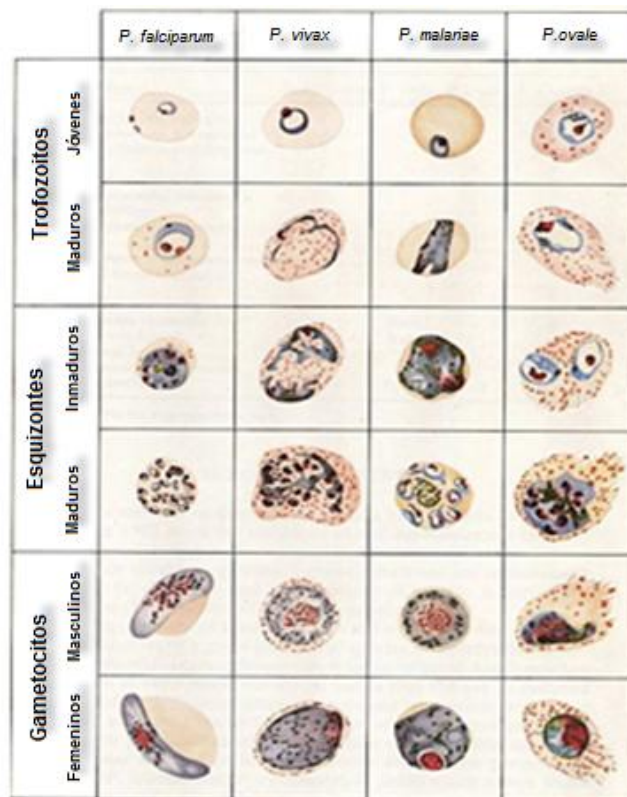
*Plasmodium ovale*: Se conoce desde 1922 y se encuentra mayoritariamente en África tropical aunque también aparece en Suramérica y Asia, causa un tipo de malaria terciaria [9].

*Plasmodium malarie*: Esta especie es la responsable de fiebre cuaternaria (fiebres que se producen cada 72 horas), su distribución se encuentra a nivel mundial [10],[9].

Recientemente en Asia se han descrito numerosos casos de malaria en humanos causada por *Plasmodium knowlesi*, especie causante de la enfermedad en monos [4].

En la figura 1- 1 se muestran algunas diferencias morfológicas de las especies causantes de malaria en humanos, características importantes para el diagnóstico de la enfermedad.

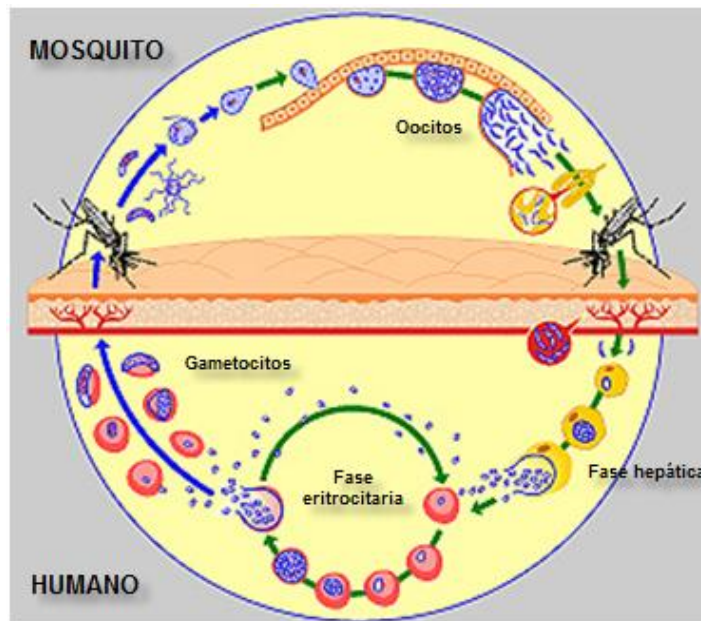
**Figura 1-1.** Estadios sanguíneos de las cuatro especies de *Plasmodium* causantes de malaria en humanos. Adaptado de <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/447/1/Paludismo.html> [10].



### 1.1.2 Ciclo de vida del parásito

El parásito para su desarrollo necesita dos hospederos: el humano donde sucede el ciclo asexual y el mosquito (género *Anopheles*) donde se desarrolla el ciclo sexual.

Figura 1-2. Ciclo de vida de *Plasmodium*. Adaptado de <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/malaria> [11].



La hembra *Anopheles* es el vector de todas las especies de *Plasmodium*, cuando el mosquito pica, inyecta al hombre los parásitos en forma de esporozoitos que se encuentran en sus glándulas salivales estos migran vía sanguínea hacia el hígado instalándose en los hepatocitos donde se multiplican de manera activa para dar vida a miles de merozoitos (10000 para *P. falciparum* y hasta 30000 para *P. vivax*). Los hepatocitos se rompen y liberan a la sangre estos nuevos parásitos los cuales invaden rápidamente los glóbulos rojos donde se multiplican nuevamente pasando por sus estadios sanguíneos anillos, trofozoitos, esquizontes y finalmente merozoitos que se liberan e invaden a nuevos glóbulos rojos; esta etapa eritrocitaria es la responsable de la sintomatología propia de la enfermedad [4].

Durante cada ciclo de replicación en el estadio sanguíneo algunos se diferencian a su forma sexual, gametocitos, los cuales son transmitidos al mosquito cuando este pica a una persona infectada, y se inicia el desarrollo sexual de nuevos parásitos en el intestino del vector.

### 1.1.3 La enfermedad

La OMS estima que 3.3 millones de personas en más de 109 países, habitan en zonas donde la malaria es una enfermedad endémica causando entre 300 y 500 millones de casos sintomáticos en el mundo, que directamente producen entre 1 y 3 millones de muertes al año, especialmente en niños menores de 5 años. Se estima que cada hora en el mundo mueren 200 a 300 niños de malaria, la población susceptible habita en las zonas intertropicales de Asia, África y América [1, 13].

La malaria es la enfermedad parasitaria más importante. El surgimiento y diseminación global de la resistencia del parásito a los medicamentos de mayor uso y más accesibles, la resistencia del vector a insecticidas; el crecimiento demográfico con deterioro de los estándares de vida en zonas endémicas, la expansión poblacional hacia zonas marginales pobres que abundan en la periferia de las ciudades, las viviendas con diseños inadecuados, el hacinamiento y la cercanía a los criaderos del mosquito (con lo cual se favorece el contacto humano-vector), los conflictos armados que movilizan a las personas por áreas endémicas, la adaptación del vector a los ambientes urbanos [14, 15], adicionalmente el impacto del calentamiento global, como consecuencia de este, en África se ha reportado cambios en la distribución, intensidad de la transmisión de la enfermedad [16].

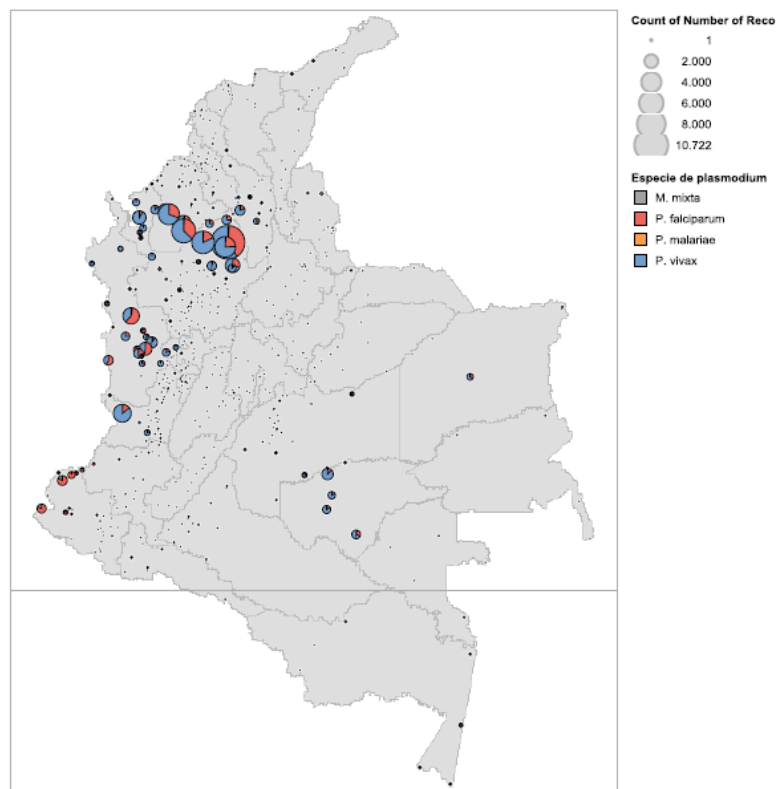
Un tratamiento oportuno y efectivo es uno de los elementos con mejor balance costo-beneficio para el control de la malaria, por lo tanto la búsqueda continua de fármacos útiles en el tratamiento de la malaria es una de las prioridades en salud a lo largo del mundo [17-21]. El diagnóstico rápido, temprano, específico y accesible; la predicción de las epidemias, el control del vector son también claves para el control de la enfermedad, aunque el parásito es detectable mediante la coloración de Giemsa, la especie de *Plasmodium* no es fácilmente identificable por este medio, lo cual es importante para una buena decisión clínica del tipo de terapia a emplear [22]. Las epidemias de malaria son súbitas e impredecibles, lo que plantea serios desafíos para el control de la enfermedad. En teoría, pueden ser controladas al detectarse los ascensos repentinos en la transmisión temprana, movilizandolos recursos rápidamente y con intervenciones rápidas como la fumigación de paredes y techos con insecticidas de larga duración (fumigación residual de interiores), o con la administración masiva de medicamentos; por eso también es importante la creación de programas de detección temprana y efectiva [23].

En el año 2007 se reportaron 110480 casos de malaria en Colombia en donde un 11,4 % de la población se encuentra en riesgo de adquirir la enfermedad, con un IPA (Índice Parasitario Anual) de 19,3. Este indicador permite clasificar la población como en situación de riesgo moderado (IPA = 1-10/ 1000 habitantes) o alto riesgo (IPA > 10/1000 habitantes) [24].

Al finalizar el año 2010 se notificaron en el sistema de vigilancia en salud pública del Instituto Nacional de Salud de Colombia 115884 casos de malaria de los cuales el 70,71 % corresponden a *P. vivax*, 28,0 % a *P. falciparum*, 1,24 % a la asociación *P. vivax* y *P. falciparum*, y 0,05% a *P. malarie*. Al finalizar el año se acumularon 23 casos de muerte por paludismo. El grupo de edad más afectado es de 10 a 29 años, los departamentos

con mayor número de casos son Córdoba, Antioquia, Bolívar, Chocó, Valle, Nariño y Vaupés [25]. El antimalárico de primera línea (sulfadoxina/ pirimetamina para malaria no complicada y cloroquina para el tratamiento de *P.vivax*) fue suficiente para tratar todos los casos reportados, y ACT (Artemisinin Combination Therapy) fue introducida en 2007 [1]. El acceso de la población menos favorecida al arsenal terapéutico disponible es muy bajo debido a sus altos costos, se estima que en Colombia el costo de los medicamentos antipalúdicos comparado con el precio promedio internacional, está por encima del 800 %, en un rango de 26,7 % para cloroquina sulfato y 4867 % para sulfadoxina/pirimetamina [26].

Figura 1-3. Distribución territorial de los casos de Paludismo 2010. Fuente: *Boletín epidemiológico 52 de 2010 Sivigila*.



La resistencia, entendida como la habilidad del parásito para sobrevivir y multiplicarse después de la administración y absorción de un fármaco dado en dosis iguales o mayores de las recomendadas pero toleradas por el sujeto, ha incrementado a nivel mundial los costos del control de la enfermedad, los fallos terapéuticos requieren consultar el servicio de salud nuevamente y la selección de un nuevo tratamiento lo cual conlleva a un aumento en las incapacidades laborales y ausencia escolar en niños [1].

Varios factores contribuyen al incremento de la resistencia, dentro de ellos el desarrollo humano, la biología del vector y del parásito y tratamientos fallidos [1]. Por esto la recomendación de la Organización Mundial de la Salud es el tratamiento con

quimioterapia combinada, especialmente los regímenes que contienen artemisinina; actualmente la estrategia es combinar la artemisinina con otros fármacos de larga duración. Esto por tener una potente acción y un tiempo de vida media corto, lo que en un momento dado puede llegar a producir gran velocidad en la cura de la enfermedad y reducir la aparición de resistencia. Otra ventaja de los regímenes que contienen artemisinina es la disminución de la transmisión de la enfermedad, ya que puede reducir el número de gametocitos por paciente [17, 20].

La eliminación, definida como el estado donde han sido detenidas las intervenciones, la transmisión endémica y transmisiones de infecciones importadas son limitadas, manteniendo un umbral en el cual el riesgo de restablecimiento se minimiza, y donde es necesario, tanto la capacidad como el compromiso para mantener este estatus indefinidamente. La eliminación de *P. falciparum* de países de las Américas es más fácil comparado con países de la región Africana [27].

## 1.2 Medicina tradicional

El conocimiento tradicional es un conjunto complejo de conocimientos vinculados con la observación, adaptación y manejo de los recursos naturales del entorno en el que se desarrolla la vida comunitaria de las comunidades indígenas y locales [3].

La medicina tradicional es la suma total del conocimiento de enfermedades y prácticas basadas en las teorías, cuidados y experiencias de indígenas de diferentes culturas, usadas para el mantenimiento de la salud, como también para la prevención, diagnóstico, mejoramiento y tratamiento de desórdenes mentales y físicos. El uso a través de la historia de la medicina tradicional practicada de generación en generación demuestra la seguridad y eficacia de esta medicina. Sin embargo, la investigación científica es necesaria para proveer evidencia adicional de la seguridad y eficacia. La evaluación de la medicina tradicional se divide en dos partes: la medicina herbal y las terapias basadas en procedimientos tradicionales, un tratamiento exitoso es la combinación de las dos partes; por eso la eficacia de la medicina tradicional debe ser evaluada de manera integral [28]. La medicina tradicional tiene importantes raíces históricas y culturales, los practicantes por lo general son miembros bien conocidos en la comunidad que inspiran respeto y cuyas aptitudes y remedios han captado la confianza en la población [29].

En Colombia desde el año 2004 entró en vigor el Decreto 2266 que dio origen a los productos fitoterapéuticos tradicionales (PFT), constituyendo un importante esfuerzo del legislador para, en consonancia con políticas sobre evaluación y conservación de la medicina tradicional de la Organización Mundial de la Salud, ofrecer un marco regulador que favorezca la conservación de ese conocimiento y su uso en el país. Bajo esos preceptos los PFT deberían ser de fabricación nacional y elaborados a partir de material de plantas medicinales o sus asociaciones, cultivadas en el país. Toda vez que estos medicamentos estarían destinados al alivio de manifestaciones sintomáticas de una enfermedad, su eficacia y seguridad se podrían justificar a partir de la experiencia generada por su uso a lo largo del tiempo mediante *«pruebas documentales que demuestran que las sustancias activas presentes en las plantas medicinales se han*



*utilizado durante tres o más generaciones para un uso medicinal o relacionado con la salud. En los casos en que el uso sea registrado como tradición oral y no escrita, las pruebas se obtendrán recurriendo a un profesional competente o a grupos indígenas o comunidades afrocolombianas que mantengan dicha historia» [30].*

En zonas endémicas de países tropicales la medicina moderna no se encuentra disponible o no es de fácil acceso para muchas personas que se encuentran en el área rural. Adicionalmente, las personas prefieren el uso de medicina tradicional como primera elección para el cuidado de su salud [14]. La medicina tradicional es por lo general una opción disponible, asequible y ampliamente usada. La OMS estima que cerca del 80 % de la población mundial usa la medicina tradicional para sus necesidades primarias del cuidado de la salud [31]. Para muchas personas habitantes de zonas rurales de los países en desarrollo, las medicinas herbarias, los tratamientos y prácticas tradicionales son la principal fuente, si no la única, de atención sanitaria. Se trata de una atención cercana al hogar, de fácil acceso y de costos asequibles [29]. Incluso en zonas donde el acceso a medicamentos está garantizado, la población recurre a la medicina tradicional, utilizando remedios antimaláricos herbales solos o en combinación con fármacos modernos [32].

La medicina basada en el uso de plantas medicinales es la principal terapéutica empleada en el sistema de medicina tradicional, ésta ha sido empleada en la práctica médica por miles de años y ha hecho una gran contribución al mantenimiento de la salud humana [33]. En los países en desarrollo entre un 65 y 80 % de la población depende esencialmente de las plantas para satisfacer sus necesidades primarias de cuidado de la salud debido esencialmente a su pobreza, en estos mismos países donde vive el 75% de la población mundial, se consume menos del 15 % del mercado total de medicamentos; las plantas medicinales por lo tanto representan el principal recurso terapéutico accesible en sectores más desfavorecidos de esta población [34].

Desde la introducción de la enfermedad por los Europeos a las Américas, la población indígena ha experimentado con plantas locales con el fin de encontrar tratamientos para esta enfermedad [35]. La tendencia de la investigación a nivel regional según lo muestran algunas publicaciones y las directrices de la Organización Mundial de la Salud incentivan el estudio de la medicina tradicional por su fácil acceso y economía, se evidencia entonces la necesidad de programas contra la malaria que permita detectar preparaciones locales con alta eficacia, a través de la investigación y que puedan ser promovidos en otras áreas donde la planta existe o puede ser cultivada [31].

La etnofarmacología puede ser definida como un estudio científico interdisciplinario de materiales de origen animal, mineral, o vegetal y relacionados con el conocimiento y prácticas que diferentes culturas usan para modificar el estado de un organismo vivo, con propósitos terapéutico (curativo/profiláctico), o diagnóstico. La etnofarmacología involucra dos disciplinas: la etnología y la farmacología, en la primera se realiza un acercamiento científico a la cultura o sociedad, y el segundo es un estudio científico de factores ambientales fisicoquímicos y su efecto sobre organismos vivos, especialmente el efecto biológico de fármacos [14].

Un programa etno-farmacológico a largo plazo se encamina hacia saber cuáles especies de plantas son usadas, cómo son usadas tradicionalmente por la población indígena, y

cuál o cuáles pueden ser priorizadas para futuras investigaciones. Adicionalmente el conocimiento y actitudes de la población frente a la enfermedad, a las últimas crisis vividas y los tratamientos usados solos o en combinación para superarla y además tratamientos preventivos usados [36]. Algunas investigaciones etno-farmacológicas revelan que la población utiliza sus preparaciones tradicionales en combinación con medicamentos modernos y la manera de combinarlos varía; en algunos casos se ha visto que la administración de la preparación con el medicamento se realiza al mismo tiempo, aunque el preparado se sigue utilizando por más tiempo después de terminado el medicamento moderno. También se ha visto que primero se realiza el tratamiento con la medicina moderna y después de terminado se inicia el consumo de la preparación tradicional, en otros el tratamiento se inicia con sus preparaciones y terminan con el medicamento moderno [36, 37].

En un estudio realizado en Cuba se encontró que cerca del 65% de las preparaciones usadas por los médicos tradicionales son mezclas de dos o tres plantas; 22% de cuatro y cinco plantas y 13 % de seis a nueve plantas; en el mismo estudio también se describió las diferentes formas de preparación de los remedios tradicionales, en su mayoría son decocciones, pero también existen maceraciones en alcohol, partes secas y trituradas de las plantas, aplicaciones tópicas, freído en aceite, o el zumo de las plantas [38]. Las plantas usadas para el tratamiento de la malaria son usualmente tomadas en forma de infusión, preparadas por decocción del material vegetal en agua; en algunos trabajos con preparaciones tradicionales se ha logrado concluir que el proceso de decocción usado activa la extracción de compuestos activos contra el parásito, actuando incluso en estadios hepáticos [39].

### 1.3 Especies vegetales

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades parasitarias es bien conocido y documentado desde la antigüedad. Tradicionalmente las plantas han tenido importancia terapéutica y algunas se encuentran vigentes hoy día en el tratamiento de la malaria; ejemplos de estos son *Cinchona spp* y la *Artemisia annua* de quienes se han derivado las mayores familias de compuestos antimaláricos: Quinina y Artemisinina respectivamente [40].

### 1.3.1 *Abuta grandifolia* Sandwith

Figura 1-4. *Abuta grandifolia* Sandwith.



Es una especie perteneciente a la familia Merispermaceae, la cual se encuentra representada por cerca de 70 géneros y 527 especies, distribuidas en regiones intertropicales y subtropicales de América, Asia, África y Australia. Es un arbusto bejucoso, hojas alternas, con tres nervios principales en la base, inflorescencia axilar y fruto amarillo ovoideo. En Colombia se encuentra distribuida en los departamentos de Amazonas, Vaupés, Caquetá, Meta y Putumayo, es usada por los indígenas Sionas, ubicados Putumayo, Colombia, para tratar fiebres palúdicas y como componente de flechas venenosas [41, 42]. Tiene diferentes nombres comunes de acuerdo a la región de colecta: Aralém de monte (Guaviare), calentuno (Caquetá), castaño, aifo, tres rayas (Amazonas).

Dentro de los usos medicinales se ha reportado la actividad antipalúdica usando diferentes partes de la planta. Las cortezas, hojas y tallos o la raíz, se exprimen y cocinan en decocción y se administran por vía oral. Las hojas en infusión son usadas por los indígenas Sionas como febrífugo; otros usos como analgésico dental, hipocolesterolemiantes, hipoglicemiantes, para tratar la esterilidad, antituberculoso entre otros también han sido reportados [42]. Dentro del grupo de investigación “Principios Bioactivos de Plantas Medicinales”, se ha realizado un tamizaje extenso para plantas con actividad antimalárica, encontrando que *Abuta grandifolia* es de las pocas que ha arrojado resultados positivos en pruebas tanto *in vitro* como *in vivo* [43, 44].

Los indígenas Sionas toman una infusión de las hojas para el tratamiento de las fiebres [45, 46]. En Tarapacá, Amazonas se toma el zumo de la corteza raspada para reducir la fiebre y tratar el paludismo, pero las personas que lo utilizan advierten que en gran cantidad es tóxica [46].

### 1.3.2 *Aspidosperma excelsum* Benth

Especie perteneciente a la familia Apocynaceae, la cual incluye más de 150 especies y cerca de 1000 géneros, distribuida principalmente en zonas intertropicales. Es un árbol de hasta 30 metros de altura, con exudado lechoso, hojas alternas, elípticas, flores pequeñas agrupadas en racimos y frutos leñosos, circulares y aplanados; su madera es dura y pesada y es emplea para la fabricación de mangos de herramientas, en Colombia se conoce comúnmente como cabo de hacha, costillo blanco, costillo caspi, costillo verdadero [47], en Perú es conocido como Remocaspi [45].

Figura 1-5. *Aspidosperma excelsum* Benth



La corteza es utilizada para aliviar la fiebre; en Bolivia la especie es utilizada para el tratamiento de la malaria y el asma, en Centroamérica para la malaria, en Perú como antiinflamatorio, desinfectante, para tratar el dolor de oídos, la hepatitis y la malaria, en Surinam contra la ictericia, malaria y nefritis [46, 48], dentro de sus constituyentes aislados se encuentra la yohimbina [49].

Numerosas especies de *Aspidosperma* han sido usadas por población indígena, dentro de estas *Aspidosperma nitidum* por los Yanomami, y *Aspidosperma excelsum* por la población Ingaricó, que se encuentran presentes en la región amazónica de Brasil. Generalmente sus preparaciones son usadas en forma de decocción extremadamente amarga o infusión de su corteza. También son empleadas las hojas de *Aspidosperma desmanthum*, la madera y corteza de *Aspidosperma marcgravianum*, la madera corteza y el látex de *Aspidosperma nitidum*, la corteza de *Aspidosperma schultesii*, entre otras [50].

### 1.3.3 *Curarea toxicofera* Wedd

Figura 1-6. *Curarea toxicofera* Wedd



Especie perteneciente a la familia Menispermaceae, la cual se encuentra representada por cerca de 70 géneros y 527 especies distribuidas en regiones intertropicales y subtropicales de América, Asia, África y Australia; se caracterizan por ser bejuco leñosos, con hojas coriáceas, palmatinervas, base redonda, glabras en el haz en el envés con pubescencia fina y densa [51], se conoce comúnmente en las zonas de colecta en Colombia como bejuco bravo, curare, o veneno [47].

Esta planta es usada por los Yanéscha para el tratamiento de diarrea y parásitos intestinales, tomando la decocción de la corteza, la maceración de la corteza durante varias semanas es usada para el tratamiento de la gripa y la tos, para el fortalecimiento de los niños usado como baño de vapor de la corteza y la raíz [52], utilizada por los pueblos indígenas de la Amazonia como uno de los componentes principales para la preparación del curaré [53].

## 1.4 Comunidades indígenas en Colombia

Colombia es considerado un país pluricultural y multilingüe, aunque no hay un acuerdo acerca del censo de la población indígena antes de la conquista, se dice que esta población fue diezmada, casi a desaparecer en un 90%. Según datos censales de 2005 en Colombia existen 87 etnias indígenas, con una población total de 1'392.323 personas (3,4 % de la población del país), de ellas 933.800 se asientan en los 710 resguardos existentes. Los departamentos que tienen un mayor porcentaje de población indígena son en su orden: Vaupés (66,65%), Guainía (64,90%), Guajira (44,94%), Vichada (44,35%), Amazonas (43,43%), Cauca (21,55%) y Putumayo (20,94%) [2]. En cuanto a la distribución por edad el censo muestra que la población es joven, el 40 % de la población es menor a 15 años.[54]

La preocupación de los pueblos indígenas es la extinción a la que se ven avocadas sus comunidades y por ende su cultura, identidad y conocimientos. De los 102 pueblos registrados por la ONIC (Organización Nacional de Indígenas de Colombia), 32 están en riesgo de desaparición y 18 de ellos en riesgo de extinguirse por su cultura; esto debido principalmente al desplazamiento interno de Colombia y a las acciones armadas realizadas en el país [55], el 10,2 % de la población indígena asume esta razón como causa del abandono de su territorio [54].

Los Muinane pertenecen a la comunidad lingüística Bora, se les conoce como los Muinane de la sabana, justamente para diferenciarlos del sector uitoto que lleva el mismo nombre. Su denominación significa “*hombre de la desembocadura del río*”, viven en el río Caquetá, cerca de Araracuara y en las sabanas del Alto Cahuinarí, sobre las márgenes de algunos afluentes superiores de este mismo río, jurisdicción del departamento del Amazonas. Como para la mayoría de pueblos que habitan la región del Amazonas, el uso de plantas sagradas se constituye en un elemento fundamental dentro de su vida cultural y social [56]. La comunidad ciudad Hitoma, descendientes de los Muinane, se localiza en el kilómetro 7 de la vía Leticia –Tarapacá, pertenece al resguardo Ticuna–Huitoto kilómetro 6 y 11. La medicina tradicional no sólo es utilizada por la población indígena, pues a los curacas también acuden los colonos. En la actualidad los Taitas han abierto espacios importantes en el campo de la medicina occidental, para lograr reconocimiento externo a la medicina tradicional indígena.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Acceso a la comunidad indígena y al médico tradicional**

El trabajo con comunidades requiere tener un “contacto” que es una persona que pueda presentar ante el jefe de la comunidad. Se deben realizar reuniones con el jefe con el fin de explicar el objetivo del proyecto, dar a conocer la institución con la cual se trabaja, la importancia de la colaboración de ellos, cómo se retribuirá y conocer cómo ellos desean recibir la información de los resultados de la investigación. Es importante también dar a conocer el plan de trabajo planteado, cuantas salidas de campo se planean realizar, cuánto tiempo se va a estar, cómo será el trabajo en la comunidad y cómo se realizará el pago a las personas que acompañen al investigador por cada jornada laboral. Normalmente la decisión de trabajar en el proyecto se toma en asambleas por lo que es necesario tener paciencia mientras ellos discuten, preguntan y aclaran todas las dudas respecto al proyecto [57].

Es necesario contar con un plan de trabajo establecido en donde se encuentre claro el nombre del proyecto, la institución responsable, los investigadores encargados, los objetivos y propósitos de la investigación, el aporte de la comunidad a la investigación, los cuales deben quedar por escrito en el consentimiento informado; se debe explicar y dar espacios para resolver las preguntas que puedan surgir en la comunidad respecto al proyecto y sus implicaciones.

Las reglas de buena educación en la comunidad, saludar amablemente a la gente, saludar a las autoridades, pedir permiso para ir a un sitio solo, todas las reglas de buena educación, no gritar en la comunidad, no hablar mal de otras personas, mostrar respeto por sus creencias y sus rituales, escuchar a las personas cuando estas quieran hablar, y trabajar al ritmo que ellos están acostumbrados a trabajar.

#### **2.1.1 Preparación de remedios tradicionales**

Los remedios tradicionales fueron preparados por el médico tradicional de la comunidad. El proceso inicia desde el momento de la colecta del material vegetal, el cual es destinado para la preparación que permita aliviar la dolencia para la cual será destinada, posteriormente en la vivienda del médico tradicional se realiza la preparación del remedio.

## 2.1.2 Conservación de remedios tradicionales

Los remedios que son principalmente decocciones, fueron congelados en el sitio de trabajo con el fin de evitar su deterioro, el transporte fue vía aérea y se mantuvieron congelados hasta su posterior liofilización, en Bogotá, con el fin de obtener una preparación que pudiera ser dosificada para los ensayos de actividad realizados.

## 2.2 Material vegetal

Adicional al material necesario para la preparación del remedio se colectaron ejemplares para su identificación botánica, que fueron depositados en el Herbario Nacional Colombiano.

El material fue colectado en cercanías a las viviendas de la comunidad Ciudad Hitoma, en el municipio de Leticia, las coordenadas fueron tomadas con GPS Garmin Etrex vista®. La colecta se realizó en época de lluvia en el mes de Marzo de 2010.

## 2.3 Caracterización del remedio

Cada uno de los remedios fue caracterizado preliminarmente por medio de perfiles cromatográficos en capa delgada CCD que permiten visualizar de manera general el tipo de metabolitos secundarios presentes.

Perfil cromatográfico por CCD: Se emplearon cromatofolios (Silica gel 60F<sub>254</sub>) como fase estacionaria, y como fase móvil Acetato de etilo: Metanol: Ácido Acético (65:25:20) que permitieron una separación adecuada de los diferentes metabolitos presentes.

De acuerdo al tipo de metabolito a detectar se emplearon los reveladores correspondientes:

Tabla 2-1. Reveladores utilizados para los perfiles cromatográficos

<b>Clase de compuestos a detectar</b>	<b>Revelador</b>	<b>Color esperado</b>
Esteroides y triterpenos	Godin	Azul- violeta
Flavonoides	NP/PEG	Amarillo, fluorescencia a 365 nm
Alcaloides	Dragendorff	Naranja



## 2.4 Actividad antimalárica *in vitro*

La actividad antimalárica *in vitro* fue evaluada en cultivo de *P. falciparum* cepa FCB-2 cloroquino resistente aislada en el Instituto Nacional de Salud Bogotá (Colombia).

La cepa fue cultivada *in vitro* de acuerdo con la metodología descrita por Trager y Jensen [58]. Se mantuvieron en cultivos continuos con medio RPMI 1640 suplementado con HEPES ( 25 mM), Glucosa (22nM), gentamicina (10 mg/L), hipoxantina (170  $\mu$ M), bicarbonato de sodio (24 mM) y 10 % de plasma humano; manteniendo un hematocrito de 5% con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub> y balance de nitrógeno, a 37 °C, y con una parasitemia no mayor a 3%. El medio de cultivo es cambiado diariamente y para el control de la parasitemia se realizó un frotis diario el cual era fijado con metanol y coloreado con Giemsa.

El ensayo de inhibición del desarrollo se realiza siguiendo el protocolo desarrollado por Deharo [59], y adaptado a las condiciones experimentales del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia por Hata [42]. (Anexo 2)

Se evaluó cada remedio en diferentes concentraciones según lo recomendado por Deharo [59] y Willcox [31] iniciando con 50  $\mu$ g/mL y diluciones consecutivas a partir de ésta, hasta concentraciones finales en pozo de 50, 25, 10, y 0,1  $\mu$ g/mL.

De cada uno de los remedios a evaluaron se pesaron 10 mg y se preparó una solución de 10 mg/mL en una mezcla agua: DMSO (50: 50), con el fin de asegurar la disolución de los componentes. Esta solución se diluyó 1 en 10 de medio de cultivo RPMI suplementado con 10 % de plasma (Cf= 1000  $\mu$ g/mL), seguida de una segunda dilución en la misma proporción (Cf= 100  $\mu$ g/mL). De esta última solución se colocan 200  $\mu$ L en la primera fila (B) de la placa por triplicado y de la cual se hacen las diluciones sucesivas para obtener las concentraciones a las cuales se evalúan los tratamientos.

Para la realización del ensayo el cultivo del parásito es sincronizado en estadio de anillos usando para esto una solución de sorbitol 5%, el cual lisa aquellos eritrocitos parasitados con estadios maduros del *Plasmodium falciparum*. Los eritrocitos parasitados con estadios jóvenes se suspenden en medio RPMI suplementado al 10% con plasma humano, y manteniendo un hematocrito de 4%, el cultivo es incubado a 37 °C bajo atmosfera de O<sub>2</sub> (5%) y CO<sub>2</sub> (5%) durante 48 horas [59].

Como control positivo se utilizó cloroquina (SIGMA Lote 84H1169) y como control negativo se utilizó una suspensión de eritrocitos parasitados al 2% este último para verificar la viabilidad de los parásitos durante el tiempo del ensayo. La disposición de las muestras se realiza como se indica en la figura 2-1, con el fin de evaluar por triplicado

cada una de las muestras en sus diferentes concentraciones, los controles cloroquina y vehículo fueron tratados como muestras.

Figura 2-1. Diseño de placa, ensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento.

Concentración	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3			Muestra 4			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													A
50 µg/mL													B
25 µg/mL													C
10 µg/mL													D
1 µg/mL													E
0,1 µg/mL													F
G	Control de crecimiento												G
H													H

El control positivo cloroquina es probado a concentraciones de 0,5; 0,25; 0,10; y 0,05 µg/mL. Se inicia preparando una solución madre de 1 mg / mL de agua ( $C_i = 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) seguida de una dilución 1 en 10 en RPMI ( $C_f = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y una segunda dilución 1 en 100 ( $C_f = 0,001 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); de esta última dilución se colocaron 200 µL en la fila B por triplicado y se realizaron las diluciones sucesivas con el fin de obtener las concentraciones a evaluar.

Una vez transcurrido el tiempo de las 48 horas se centrifugaron las placas a 600 G por 7 minutos y se retiró el sobrenadante, se tomaron 5 µL de glóbulos rojos y se realizó un extendido de cada uno de los pozos, se fijaron con metanol, para posteriormente realizar la coloración con Giemsa. La cuantificación de la parasitemia se realizó por observación microscópica de extendidos con objetivo de inmersión (100x); se escogieron campos de conteo con 50 a 200 glóbulos rojos, contando como mínimo 1000 glóbulos rojos, se cuantificaron los glóbulos rojos totales y parasitados.

Posteriormente se calcula el porcentaje de inhibición de la parasitemia comparando cada una de las muestras con el control positivo. Finalmente, con los porcentajes de inhibición se calcula mediante análisis de regresión no lineal la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ).

## 2.5 Actividad antimalárica *in vivo*

Se emplearán los modelos farmacológicos actualmente utilizados por nuestra unidad de investigación, para la evaluación de la actividad antimalárica de sustancias o extractos de origen vegetal. Se tuvieron en cuenta las recomendaciones internacionales acerca del uso 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 e 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 desarrollo del proyecto contó con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias. La investigación fue llevada a cabo buscando causar el mínimo sufrimiento posible a los animales y teniendo en cuenta un punto final adecuado para los fines experimentales, pero evitando al máximo el malestar generado inevitablemente por la infección, y utilizando el menor número de animales por grupo de tratamiento.

La actividad antimalárica se evaluó siguiendo el ensayo de supresión descrito por Peters [60] y adaptado por Garavito [41], utilizando ratones ICR machos criados en el Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, de aproximadamente 4 semanas de edad en un rango de peso de 18 a 22 g. Las condiciones de temperatura se mantienen constantes en 22°C +/- 1°C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, el consumo de comida y agua se dejó a voluntad de los animales, los cuales son infectados vía intraperitoneal con eritrocitos parasitados con *P. berghei* ANKA. La sangre infectada es obtenida de ratones donadores con parasitemia alrededor de 20%, se realizan ajustes de manera que la concentración del inóculo infectante sea de  $1 \times 10^7$  parásitos/mL.

Dos horas después de la infección y durante cuatro días consecutivos, a la misma hora, se trataron los animales por vía oral con remedio tradicional a dosis de 250 mg/kg\*día de remedio tradicional, el control negativo fue el vehículo del remedio y el control positivo cloroquina a una dosis de 4 mg/kg\*día.

El día 4 se toma una muestra de sangre, de la cola del ratón, y se suspende en 40 µl de PBS que contiene 500 U/mL de heparina. Se transfieren 10 µL de esta suspensión a tubos de citometría que contienen 180 µL de PBS y 10 µL de una solución de NA (Naranja de Acridina) cuya concentración final es de 0.5 µg/mL y se incuba por 3 minutos a temperatura ambiente; se mantiene en oscuridad hasta el análisis.

Comparando con el control positivo se calcula el porcentaje de inhibición. Los animales sobrevivientes son sometidos a observación diaria hasta su muerte, aplicando en su momento la muerte anticipada.

## 2.6 Ensayo de actividad hemolítica

El ensayo se realizó siguiendo el protocolo descrito por Okamoto [61], cada uno de los remedios fue disuelto en PBS a una concentración de 100 µg/ mL y se adicionaron 50 µL en una placa de 96 pozos para ser evaluado por triplicado, 50 µL de una suspensión de eritrocitos al 2 % en PBS se adicionan a cada pozo. La placa es incubada a 37°C por una hora, transcurrido el tiempo se centrifuga a 500 G por 10 minutos. La cantidad de hemoglobina en el sobrenadante fue determinada espectrofotométricamente a 490 nm. La concentración final a la que se evaluaron los remedios fue de 50 µg/ mL.

## 2.7 Análisis estadístico

Para la determinación de la  $CI_{50}$  de los ensayos de inhibición de la invasión y desarrollo de *P. falciparum*, se realizó la gráfica de Logaritmo de la concentración (µg/mL) vs porcentaje de inhibición; empleando una regresión de tipo no lineal y por interpolación se determinó la  $CI_{50}$ .

El promedio de las  $CI_{50}$  de al menos dos ensayos independientes, fue comparado mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posterior prueba de Dunnett,  $p < 0,05$ .

El tratamiento de los datos de la actividad *in vivo* se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente una prueba de Tukey,  $p < 0,05$ .

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa estadístico GraphPad Prism 5.

## **3.Resultados**

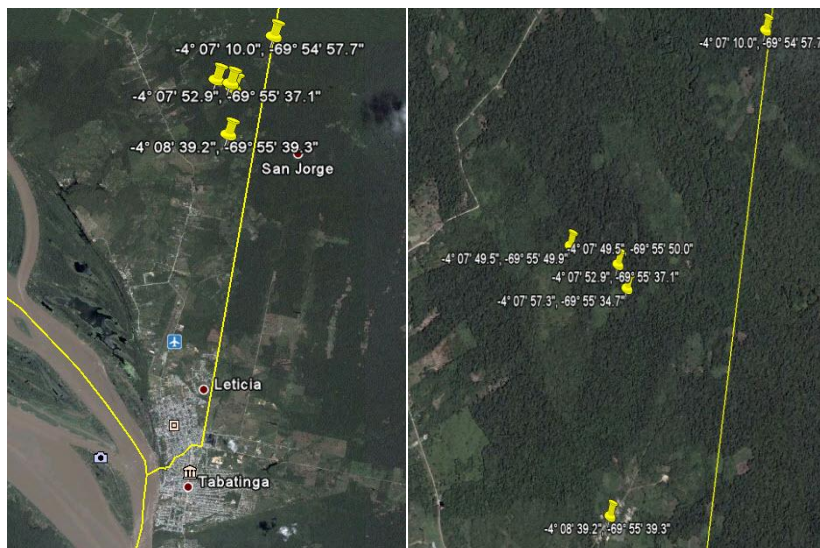
### **3.1 Acercamiento a la comunidad indígena**

El lugar de trabajo se escogió de acuerdo a su facilidad de acceso, se tuvo en cuenta la presencia de una sede de la Universidad Nacional de Colombia en la región y la presencia de un Profesor investigador que conocía el terreno y adelantara los contactos iniciales.

El trabajo se realizó con la guía de la comunidad Ciudad Hitoma en el municipio de Leticia, Departamento de Amazonas, ubicada en el Kilómetro 7 vía Leticia – Tarapacá, en el municipio de Leticia del Departamento de Amazonas, Colombia. El acceso a esta comunidad se realizó gracias al contacto del profesor Pablo Palacios de la Universidad Nacional de Colombia sede Amazonía.

En la figura 3-1 se relacionan las coordenadas de los sitios de trabajo, las imágenes se realizaron usando el programa Google Earth 6.0.1.2032 (beta), disponible gratuitamente en red.

Figura 3-1. Coordenadas de trabajo



La altura de la zona se encuentra entre 90 y 100 m.s.n.m, una humedad relativa de 92% y temperatura promedio de 26 °C; la colecta se realizó en época de lluvia.

La comunidad tiene un curaca que es escogido cada dos años por la misma comunidad, quien se encarga del manejo administrativo. Sin embargo las decisiones se toman en reuniones donde la comunidad es informada de los proyectos; existe una gran influencia de parte de los abuelos en cada decisión tomada, y es muy respetado su conocimiento y su punto de vista ante cada situación.

Se logró realizar un acercamiento a los abuelos de la comunidad Ciudad Hitoma de la ciudad de Leticia; proceso inicialmente difícil ya que como ellos mismos lo expresaron, en otras ocasiones han sido víctimas de personas que van con el propósito de robar su conocimiento el cual finalmente utilizan para su propio beneficio sin un adecuado retorno a la comunidad de los resultados que se obtuvieron. A través de un proceso de escuchar y hablar, que es como ellos transmiten el conocimiento de sus tradiciones, y gracias a la colaboración de uno de los hijos de los abuelos, se logró el acercamiento a ellos, paso sumamente importante en la aproximación a la comunidad indígena y capital para poder dar inicio a estudios etnofarmacológicos que nos permitan conocer mejor su cultura.

Antes de poder consignar cualquier información dada por la comunidad fue necesario realizar un proceso de concertación con la comunidad, explicar el proyecto y los objetivos del mismo, con el fin de obtener el consentimiento informado por parte del médico tradicional para el desarrollo del proyecto (Anexo 1). No fue posible lograr el permiso para la filmación o grabación de la información dada por la comunidad.

Descendiente de la etnia Murui – muinane, el abuelo José Octavio García o *Hitoma Safiama* (Luz del Sol) su nombre tradicional, es el médico tradicional de la comunidad y cacique o jefe en lo que se refiere a rituales, creencias, y tradiciones de su cultura, las cuales son transmitidas a sus hijos portadores de todos sus conocimientos y sabiduría. En el momento de la realización del trabajo la familia estaba constituida por el abuelo Jose Octavio y la abuela Rosa, José uno de sus hijos, José de Jesús otro de los hijos y José Mauricio hijo de José de Jesús. Inicialmente José de Jesús fue el encargado de guiar el trabajo, la colecta e identificación de las plantas, la enseñanza de la selva, e historias acerca de su cultura.

*Durante el día se trabaja, pero en la noche se debe descansar y es en el mambeadero, lugar donde se tuesta la coca y donde se reúnen los hombres a hablar de lo que les pasó en el día, a contar historias, cantar canciones y a compartir las cosas que saben para que los demás las conozcan. La comunidad se reúne en el mambeadero de la casa del abuelo Hitoma; estas reuniones se deben realizar en la maloca, pero actualmente la comunidad no cuenta con su propia maloca pues en diciembre del 2009 se incendió.*

El trabajo y la información suministrada corresponde al conocimiento de la familia de *Hitoma Safiama*; en general se observa desconfianza para vincularse a trabajar en proyectos de investigación, consecuencia de que en ocasiones anteriores la información que ellos suministraron fue usada para beneficio de los investigadores y a la comunidad no se le retribuyó, como dice el abuelo “*muchos llegan y se van y nosotros nunca nos enteramos de que paso, si sirvió o no, y muchos han logrado cosas y a nosotros no nos cuentan*”. En un principio y para comenzar a ganar la confianza de la comunidad fue necesario acompañarlos a sus chagras (sitios de cultivo de sus principales productos: yuca, plátano y coca); fue importante trabajar al ritmo de ellos, no presionarlos a brindar la información requerida, simplemente ir indagando acerca de su cultura y sus creencias.

Durante el trabajo con la familia se realizaron una serie de preguntas que nos permitieron evidenciar el grado de conocimiento de las personas acerca de la enfermedad y su forma de transmisión. El concepto de salud es muy importante para ellos, si no se tiene salud no se puede trabajar, el secreto para tener buena salud es la buena alimentación, “*nosotros comemos mucho ají, por eso tenemos sangre caliente que hace que no enfermemos*”. Adicionalmente, para ellos la enfermedad es una falta de buena alimentación, o debilidad espiritual por eso generalmente sus tratamientos van acompañados de la dieta, donde se debe evitar el consumo de azúcar, sal, bebidas alcohólicas y el fortalecimiento de la parte espiritual gracias a la oración del abuelo médico; la creencia de tener la sangre caliente por la alimentación les da una ventaja frente al hombre blanco, y es que ellos se enferman menos.

Al plantear la pregunta ¿Que es la malaria?, la abuela Rosa respondió “*es cuando pica mosquito*”, el abuelo y sus hijos saben que la enfermedad es causada por la picadura de un mosquito, no es considerada una enfermedad “*del mal*” y dicen que afecta más a los niños y las mujeres. La transmisión de la enfermedad, es clara para la comunidad, saben

que el responsable es un mosquito e incluso logran identificarlo “*es el que se para derecho y tiene las puntas de las patitas y de las alas blancas*”. Esto, según lo descrito, corresponde con las diferencias morfológicas que permiten identificar el mosquito transmisor de la malaria frente a otros mosquitos.

Cuando se habló acerca de cómo es la enfermedad ellos la describen: “*es un calor que da como aquí* (señalando 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, la persona se vuelve amarilla, y la cabeza pesa, no come*”. Ellos describen diferentes clases de “*calentura*”, que pueden ser causadas por querer hacer el mal, “*algún espíritu quiere hacer daño*” o por otras causas; pero la del paludismo es diferente “*es más caliente, en las noches es más y no es seguida, es intermitente*”. El paludismo y malaria es lo mismo para ellos, y “*si la persona no está bien alimentada y está débil se vuelve amarilla*” por eso es que toca sacar la enfermedad.

En cuanto al tratamiento de las enfermedades ellos dicen no usar ningún tipo de “*medicinas de blancos*” porque esos son “*venenos que nos matan*”, para eso tenemos nuestra propia farmacia: “*la selva*”. Para ellos las enfermedades deben ser tratadas con remedios y con oración o conjuros, el médico prepara los remedios y se los da al paciente, acompaña al paciente toda la noche para hacer la oración y meditación que permita curar la enfermedad, “*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 para el tratamiento de la malaria son generalmente amargos, “*cuando el agua es amarga es mejor, mientras más amargo mejor*”, por eso la preparación de los tratamientos, se hace en decocciones por periodos cercanos a las 2 horas, lo cual permite concentrar el remedio; ellos llaman a las sustancias que ejercen el efecto “*la sal de la planta*” que logran extraer a través de la oración que hacen desde la colecta de las plantas y durante la elaboración del remedio, la decocción la describen como la concentración de la sal de la planta.

El tratamiento que el médico tradicional realiza consiste principalmente en la oración y fortalecimiento espiritual que realiza a través de su propia meditación y con la ayuda e iluminación del “*abuelo del tabaco*” y de “*la coca*”. El acompañamiento que el médico realiza al paciente durante todo el tiempo es importante, la cantidad de remedio que cada paciente necesita depende de cuánto tiempo lleva con la enfermedad, “*hay veces que vienen a mí, cuando ya llevan varios días con fiebre* (Hitoma)”. Según lo comentado por el abuelo, el tratamiento se da en las noches de 5 a 6 de la tarde que “*es cuando el mosquito pica*”, y en las mañanas; pero si la persona lleva mucho tiempo con la enfermedad “*se puede dar cada tres o cuatro horas*” para que el parásito muera más rápido.



### 3.1.1 Remedios y especies vegetales informadas para validación de su uso

En cuanto a las plantas utilizadas para el tratamiento de la malaria utilizan tres plantas principalmente el costillo, el aifo, y el bejuco de llaño.

Costillo en castellano y *Gollaveai* en uitoto (*Aspidosperma excelsum*); es un árbol leñoso que se reconoce porque su tronco tiene forma de costillas, se utiliza la corteza de la misma, pero hay dos clases de costillo, el rojo del cual se informó no ser usado por no tener el mismo efecto y el blanco que es el que sirve para tratar la malaria; el color es definido por el exudado cuando se corta la corteza; el sabor de la corteza es muy amargo. El color del exudado es la principal diferencia para determinar la especie utilizada por la comunidad.

Si el árbol está de pie se limpia de los helechos que crecen sobre él, se raspa la corteza de arriba hacia abajo, si el árbol está caído (porque “en ocasiones se corta para tener la medicina cerca”) se raspa de donde está el corte hacia la rama, y el segundo corte de la punta hacia abajo, durante el corte de la corteza se hace una oración a la planta pidiendo permiso para su uso y diciéndole cual será su uso, para que su efecto sea el deseado.

Figura 3-2. Colecta de costillo (*Aspidosperma excelsum*) para preparación del remedio. A la izquierda realizando el corte de la corteza del costillo blanco para la preparación del remedio; a la derecha el corte de la corteza del costillo rojo.



La preparación del remedio consiste en la decocción de la corteza; se toma “una manotada” (aproximadamente 200 g) y se coloca a hervir en medio litro de agua, se va triturando “machacando” a medida que va hirviendo y “se debe ir probando para saber cuál es el punto”; la evaporación del agua se da en aproximadamente un 80 %, el tiempo de cocción es de dos horas aproximadamente, el resultado es un agua color café - rojizo y sabor amargo. Durante la decocción el médico tradicional está presente y pendiente del sabor del remedio, ya que es con el sabor cuando se define que está listo, mientras tanto se va haciendo una oración “que permite sacar la sustancia que hace el efecto”. Al paciente “se le da una copita caliente” (aproximadamente 50 mL), si los síntomas siguen debe tomar nuevamente el remedio, sin embargo describen que con una sola toma generalmente el paciente “ya queda bien”; el tratamiento se da en las noches y en la madrugada principalmente. Esta es de las tres plantas descritas la que más utilizan para el tratamiento de la malaria, por el acceso y porque con una sola toma el paciente se mejora. Se debe tener cuidado con la cantidad consumida, pues es venenoso; la planta la utilizan también como componente del curare, y también para el tratamiento de la hepatitis.

Bejuco de llaño u “oso perezoso” en castellano y *Llaño K+nai* (+ suena como aie nasal) en uitoto (*Curarea toxicofera*); llamada así porque “por ahí trepan los osos perezosos”; es una liana plana con módulos, se reconoce también por su sabor amargo y por la forma cómo se trepa en los árboles. Su preparación consiste también en decocción del bejuco: se toma una porción de 20 centímetros aproximadamente y “se pica bien pequeño”, se coloca en aproximadamente un litro de agua y se deja hervir hasta que “el agua quede rojiza”. Es la segunda planta más usada para el tratamiento de la malaria, también es usada como componente del curare, advierten que se debe tener cuidado con la cantidad consumida porque es muy tóxica.

*A+fo* (+ suena como aie nasal) en uitoto (*Abuta grandifolia*) es, de las tres escogidas, la planta menos utilizada debido a su difícil acceso, ya que no se encuentra en cercanías a la vivienda. Es reconocida por sus hojas con tres venas principales y de hoja lisa; se utiliza principalmente la raíz, la cual es raspada tostada y después cocinada. El inconveniente para el uso de esta planta, aparte del acceso, es que la planta posee una raíz delgada y sería necesario el uso de dos o tres plantas para poder obtener una cantidad suficiente para la preparación del remedio.

Figura 3-3. Abuelo Hitoma Safiama preparando remedios tradicionales.



Figura 3-4. Remedios tradicionales de las diferentes plantas utilizadas por la comunidad Ciudad Hitoma de derecha a izquierda: Remedio de Bejuco, Remedio de Costillo, Remedio de Aifo.



De cada una de las plantas se colectó un ejemplar para su clasificación botánica; en la tabla 3-1 se muestran los nombres científicos para cada una de las plantas, determinadas por el Herbario Nacional Colombiano.

Tabla 3-1. Nombres científicos de plantas usadas por la comunidad Ciudad Hitoma para el tratamiento de la malaria.

Nombre común	Nombre científico	Voucher
Costillo	<i>Aspidosperma excelsum</i>	COL 546007
A+fo	<i>Abuta grandifolia</i>	COL 546008
Bejuco de Ilaño	<i>Curarea toxicofera</i>	

Se obtuvieron tres remedios tradicionales preparados por el médico tradicional de la comunidad; los cuales se evaluaron en ensayos de actividad antimalárica *in vivo* e *in vitro*; estos remedios fueron preparados empleando la corteza de *Aspidosperma excelsum*; raíz de *Abuta grandifolia*, y el bejuco de *Curarea toxicofera*.

Sin embargo, pensando en el posible aprovechamiento y en el uso sostenible de las plantas a evaluar, se prepararon dos remedios adicionales obtenidos de las partes de las plantas con mayor capacidad de regeneración como los son las hojas; estos remedios fueron preparados en el laboratorio siguiendo procesos de decocción durante el tiempo similar al usado por el médico tradicional.

En la tabla 3-2 se reporta en resumen los remedios tradicionales que se evaluaron, y su clasificación; primario: hace referencia a que son los remedios preparados y utilizados por la comunidad y secundario: hace referencia a que son los remedios preparados en el laboratorio.

Tabla 3-2. Descripción de la preparación de los remedios descritos por la Comunidad Ciudad Hitoma y evaluados en ensayos de actividad antimalárica.

Planta	Parte utilizada	Forma de preparación	Denominación	Clasificación
<i>Aspidosperma excelsum</i>	Corteza	Decocción de aproximadamente 200 g de corteza fresca, en 500 mL de agua; decocción por dos horas.	RTCC	Primario
	Hojas	Decocción de aproximadamente 200 g de hojas frescas, en 500 mL de agua; decocción por dos horas.	RTCH	Secundario
<i>Abuta grandifolia</i>	Raíz	Decocción de aproximadamente 200 g de raíz fresca, se tuesta y se coloca en en 500 mL de agua; decocción por una hora.	RTAR	Primario
	Hojas	Decocción de aproximadamente 200 g de hojas fresca, en 500 mL de agua; decocción por una hora.	RTAH	Secundario
<i>Curarea toxicofera</i>	Bejuco	Decocción de aproximadamente 20cm (500 g) del bejuco, en 500 mL de agua; decocción por dos horas.	RTB	Primario

### 3.2 Caracterización química

Se realizó la caracterización química empleando la metodología utilizada en el Departamento de Farmacia, de la Universidad Nacional de Colombia, usando cromatografía de capa delgada como método cualitativo para la identificación de componentes de los extractos.

Las preparaciones liofilizadas fueron disueltas en metanol y aunque no se disolvieron totalmente, se realizaron las cromatografías con la fracción soluble, como fase estacionaria se empleó Sílice gel F<sub>254</sub>.

Figura 3-5. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales UV 254 nm; fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20); de izquierda a derecha: RTAR, RTAH, RTCH, RTCC, RTB, Patrón flavonoides, cloroquina.

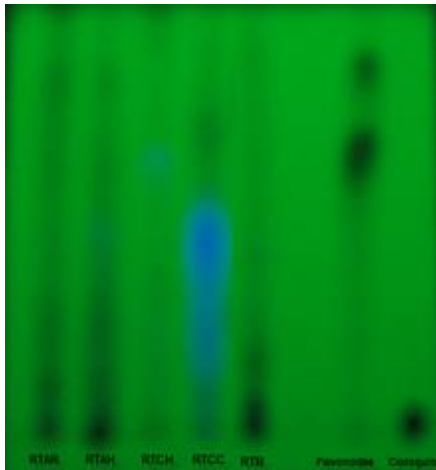


Figura 3-6. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales UV 365 nm; fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20); de izquierda a derecha: RTAR, RTAH, RTCH, RTCC, RTB, Patrón flavonoides, cloroquina.

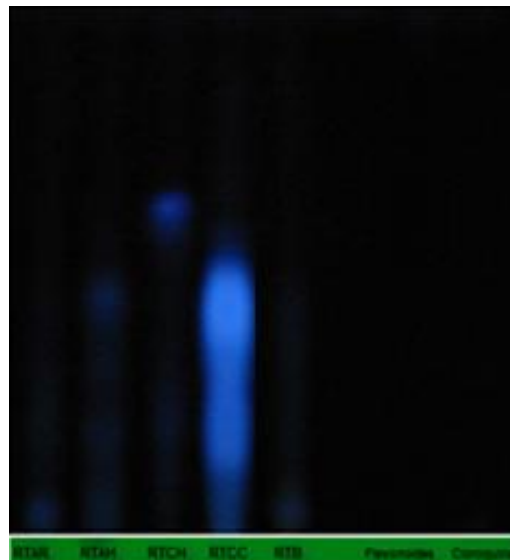


Figura 3-7. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales, fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20), Revelador de Godin. Detección de compuestos de tipo Esteroidal y/o triterpeno. De izquierda a derecha: RTAR, RTAH, RTCH, RTCC, RTB, Patrón flavonoides, cloroquina.

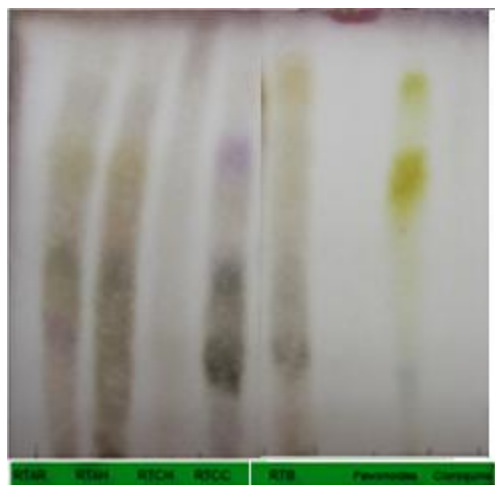


Figura 3-8. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales, fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20), Revelador de NP/PEG. A. visible, B. UV 365 nm. Detección de compuestos tipo flavonoide. De izquierda a derecha: RTAR, RTAH, RTCH, RTCC, RTB, Patrón flavonoides, cloroquina.

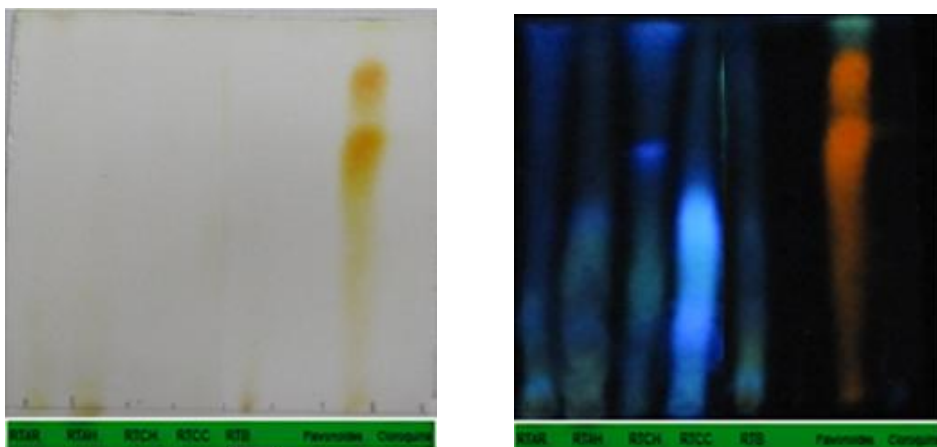


Figura 3-9. Cromatografía en capa delgada de preparaciones tradicionales, fase móvil Acetato de etilo:Metanol: Ácido acético (65:25:20), Revelador de Dragendorff. Detección de compuestos tipo alcaloides. De izquierda a derecha: RTAR, RTAH, RTCH, RTCC, RTB, Patrón flavonoides, cloroquina.

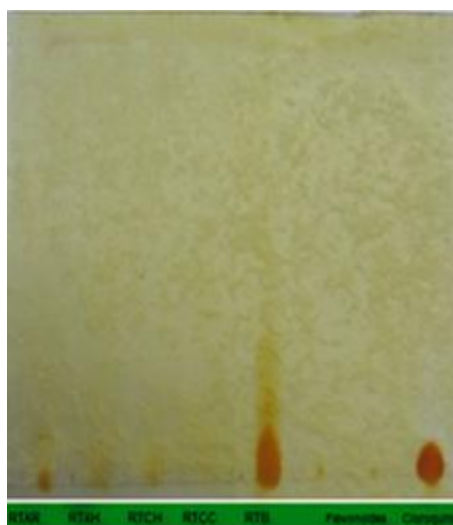


Tabla 3-3. Metabolitos secundarios detectados por CCD en las preparaciones tradicionales evaluadas.

Planta	Preparación	Esteroides y/o triterpenos	Flavonoides	Alcaloides
<i>Abuta grandifolia</i>	RTAR	+	+	+
	RTAH	+	+	-
<i>Aspidosperma excelsum</i>	RTCH	-	+	-
	RTCC	+	++	-
<i>Curarea toxicofera</i>	RTB	+	-	+

### 3.3 Actividad antimalárica

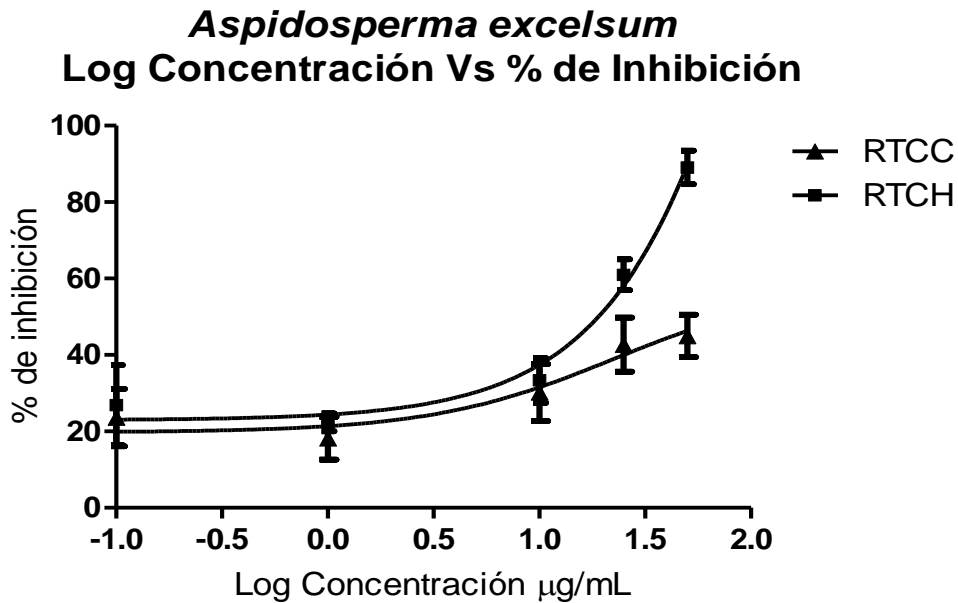
#### 3.3.1 Actividad antimalárica *in vitro*

El método utilizado para evaluar la actividad antimalárica fue el de inhibición del desarrollo, que permite evidenciar si el tratamiento a evaluar tiene algún efecto en el desarrollo de los parásitos de un cultivo sincrónico desde su estadio anillo hasta esquizonte. Teniendo en cuenta que la mayoría de compuestos actualmente empleados

como antimaláricos tienen efecto sobre el estadio sanguíneo del ciclo de vida del parásito, este ensayo resulta útil para obtener información de su potencial actividad antimalárica.

Para las preparaciones tradicionales obtenidas a partir de las hojas (RTCH) y la corteza (RTCC) de *Aspidosperma excelsum* se realizaron dos ensayos independientes que permitieron la determinación de la  $CI_{50}$  los resultados a las diferentes concentraciones evaluadas se presentan en la figura 3-10.

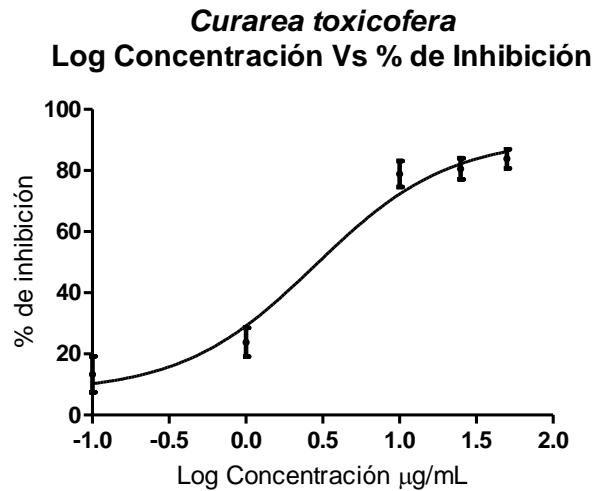
Figura 3-10. Gráfica Concentración –Respuesta de RTCC y RTCH, preparación tradicional de corteza y hojas de *Aspidosperma excelsum* respectivamente, representación de cinco concentraciones evaluadas cada una por triplicado, se representa el promedio  $\pm$  ESM de dos ensayos independientes, análisis de regresión no lineal.



Para la preparación tradicional obtenida a partir del Bejuco (*Curarea toxicofera*) se realizaron cuatro ensayos independientes y sus correspondientes gráficas se presentan en la figura 3-11.



Figura 3-11. Gráfica Concentración –Respuesta de RTB, preparación tradicional de *Curarea toxicofera*, representación de cinco concentraciones evaluadas cada una por triplicado, se representa el promedio +/- ESM de cuatro ensayos independientes; análisis de regresión no lineal.



Las figuras 3-12 y 3-13 representan el comportamiento de las preparaciones obtenidas a partir de las raíces y las hojas de *Abuta grandifolia*, se realizaron tres y dos ensayos independientes, respectivamente.

Figura 3-12. Gráfica Concentración –Respuesta de RTAR, preparación tradicional de *Abuta grandifolia* raíz, representación de cinco concentraciones evaluadas cada una por triplicado, se representa el promedio +/- ESM de tres ensayos independientes; análisis de regresión no lineal.

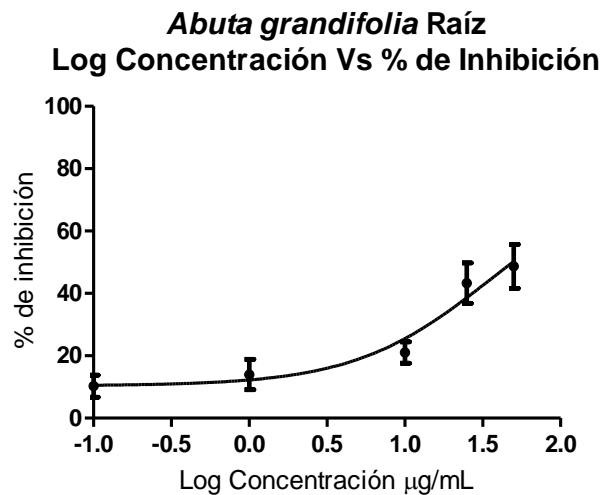
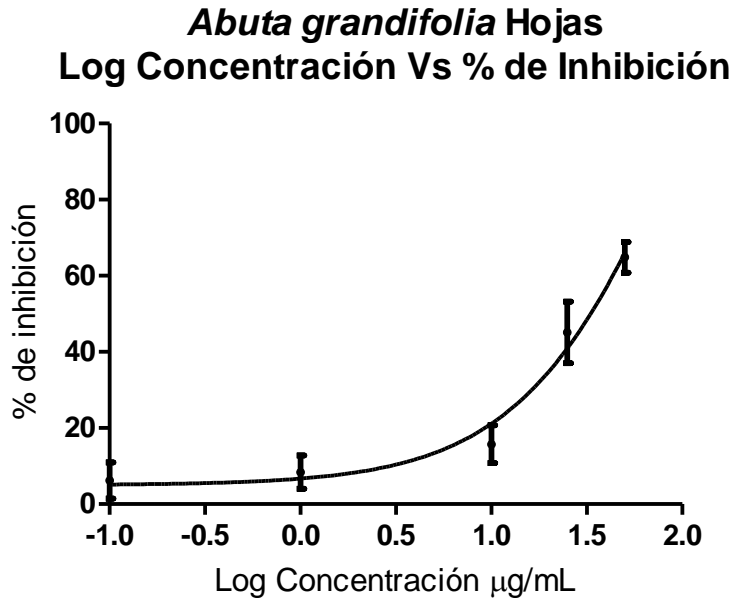
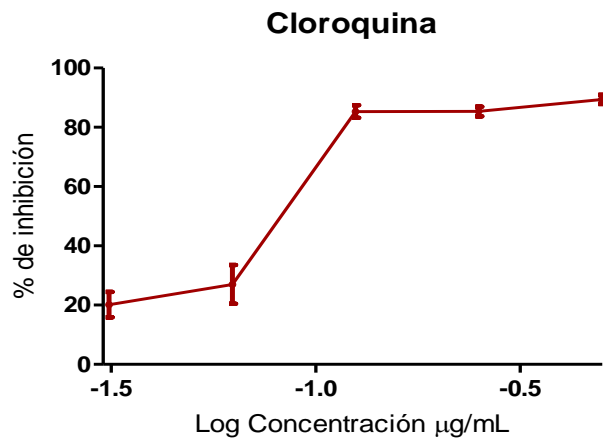


Figura 3-13. Gráfica Concentración –Respuesta de RTAH, preparación tradicional de *Abuta grandifolia* hojas, representación de cinco concentraciones evaluadas cada una por triplicado, se representa el promedio  $\pm$  ESM de dos ensayos independientes; análisis de regresión no lineal.



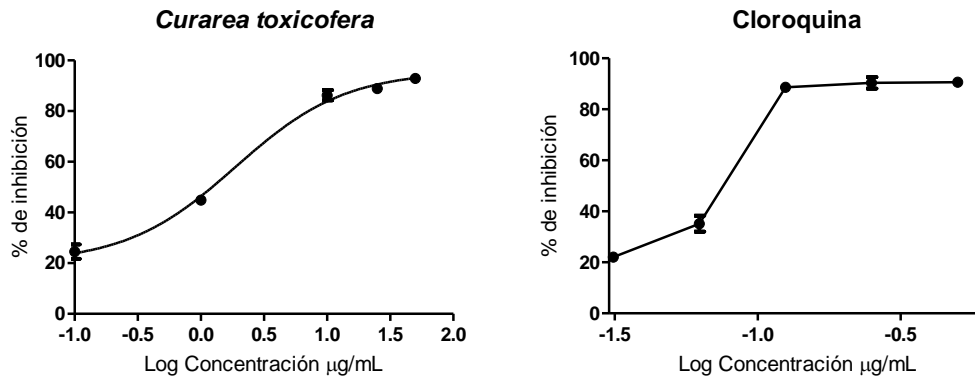
Nuestro patrón de referencia de actividad fue la cloroquina y su comportamiento se representa en la figura 3-15

Figura 3-14. Concentración –Respuesta de Cloroquina, representación de cinco concentraciones evaluadas cada una por triplicado, se representa el promedio  $\pm$  ESM de cuatro ensayos independientes; análisis de regresión no lineal.



Como parte del proceso de optimización del método de lectura actualmente utilizado, se realizó la lectura mediante citometría de flujo, de un ensayo adicional de RTB y Cloroquina, los datos se presentan en la figura 3-16, utilizando como fluorocromo Naranja de acridina.

Figura 3-15. Concentración –Respuesta de Cloroquina y RTB preparación tradicional de *Curarea toxicofera*, representación de cinco concentraciones evaluadas cada una por triplicado, se representa el promedio +/- ESM; análisis de regresión no lineal; lectura por citometría de flujo.



Las concentraciones inhibitorias 50 de los remedios evaluados se reportan en la tabla 3-4 y de acuerdo a la clasificación dada por RITAM (*Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods*) [31], se ponderó el nivel de actividad.

Tabla 3-4.  $CI_{50}$  de las preparaciones evaluadas en el ensayo de inhibición del desarrollo de *P. falciparum* cepa FCB-2. El valor representa al promedio +/- desviación estándar, de mínimo dos ensayos independientes realizados.

Planta	Preparación	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Des	Lim Superior	Lim Inferior	Clasificación
<i>Aspidosperma excelsum</i>	RTCC	>50	-	-	-	Muy poco activo
	RTCH	36,03	2,8	38,85	33,21	Muy poco activo
<i>Curarea toxicofera</i>	RTB	3,02	1,0	4,03	2,01	Bueno a moderado
<i>Abura grandifolia</i>	RTAR	36,95	4,9	41,92	31,98	Muy poco activo
	RTAH	27,45	4,4	31,85	23,05	Muy poco activo
	CQ	0,039	0,006	0,045	0,033	

### 3.3.2 Actividad antimalárica *in vivo*

En la tabla 3-5 se resumen los porcentajes de parasitemia para cada uno de los grupos tratados así como para el control positivo (cloroquina) y control de parasitemia (agua), que fue el vehículo en el cual se disolvieron los tratamientos a evaluar.

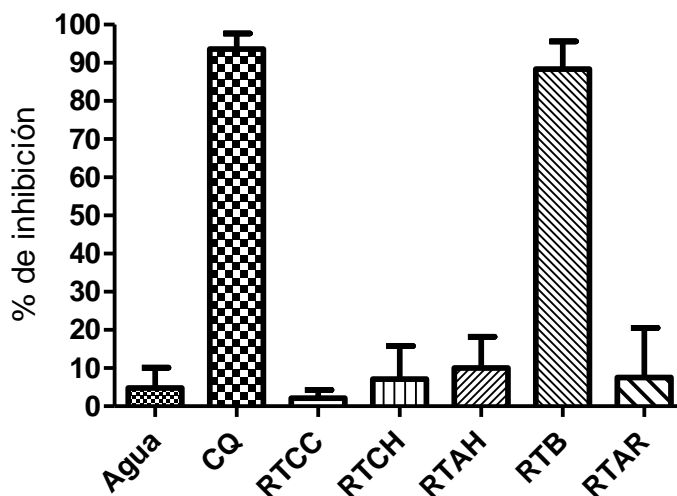
Tabla 3-5. Promedio de porcentajes de parasitemia de animales tratados con los remedios tradicionales a dosis de 250 mg/kg\*día, en test de Peters, n=5, p < 0,05

Agua	CQ*	RTCC	RTCH	RTAH	RTB*	RTAR
63,4 +/- 8,0	4,1 +/- 2,6	62,8 +/- 2,6	59,3 +/- 6,0	58,1 +/- 6,9	7,3 +/- 4,5	61,7 +/- 11,0

Los datos muestran una diferencia significativa de los porcentajes de parasitemia de los tratamientos Cloroquina y RTB frente al vehículo de los tratamientos con un p < 0,05.

Los porcentajes de inhibición se muestran en la figura 3-17

Figura 3-16. Porcentaje de inhibición de la parasitemia en la evaluación de la actividad antimalárica *in vivo* mediante Test de Peters, promedio +/- ESM, n=5.

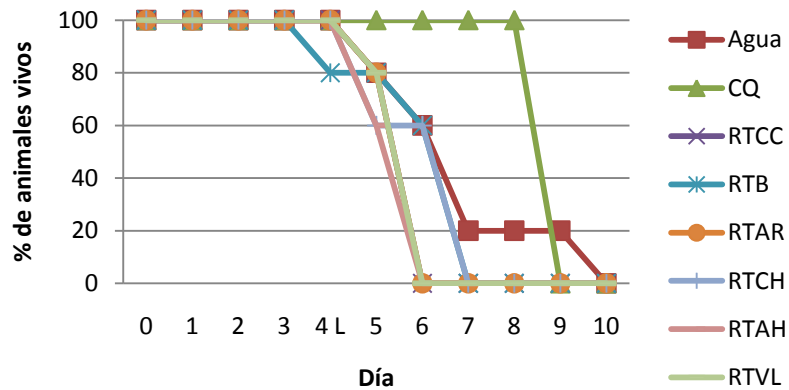


De acuerdo con nuestro protocolo, el punto final del ensayo se da el día 4 en el cual se toman las muestras de sangre periférica para cuantificar la parasitemia en los animales. El tiempo de supervivencia resulta ser otro parámetro de interés, por lo que los animales son monitoreados dos veces al día hasta el momento de su muerte o de eutanasia

(cuando el estado es irreversible y el sufrimiento del animal lo amerita), este parámetro nos permite evaluar comparativamente este factor respecto al grupo control.

En la figura 3-17 se muestra la supervivencia de los animales de cada uno de los grupos tratamiento.

Figura 3-17. Porcentaje de supervivencia de los animales, durante el desarrollo de test de peters.



### 3.4 Actividad hemolítica

El ensayo realizado tomó como control de 100 % de hemólisis, agua; como control el vehículo de los tratamientos, agua:DMSO (50:50) y como control de 0% de hemólisis, tampón de PBS. Las cinco preparaciones tradicionales y cloroquina fueron evaluadas a una concentración de 50 µg/mL; no se observó hemólisis en dos ensayos realizados de manera independiente.



## 4. Discusión de resultados

Desde inicios de los años 80 se dice que la etnofarmacología es una mezcla de ciencia y disciplina, y su desarrollo involucra diferentes corrientes y tiene dos objetivos principales; el primero una aproximación científica a la sociedad y la cultura, y el segundo es un estudio científico de los efectos sobre factores fisicoquímicos de los organismos vivos, especialmente los efectos biológicos de los fármacos o drogas [14].

Con el objetivo de iniciar la realización de estudios que involucren el acercamiento a comunidades y a su valioso conocimiento y buscando validar y rescatar dicha información, en riesgo de extinción hoy en día, consecuencia de que en la mayoría de ocasiones la transmisión de este conocimiento se hace por tradición oral y la actual generación, deslumbrada por la “cultura occidental”, no muestra interés en su conservación. El propósito del presente trabajo fue el acercamiento a una comunidad con el fin de generar confianza en sus integrantes y escuchar sus historias y leyendas, orientados principalmente la información de plantas usadas para el tratamiento de la malaria, sus formas de preparación e indirectamente indagar acerca de los conceptos de salud, enfermedad manejados por la comunidad, y su forma de tratar las dolencias propias de la comunidad.

Este trabajo tiene la limitante de obtener la información de una única fuente, que es el médico tradicional, quedando sin conocer la información de la población que conforma la comunidad. Durante el trabajo con la familia de *Hitoma Safiama*, se pudo evidenciar conocimiento de la malaria por parte de las personas con las que se trabajó, es claro para ellos que es una enfermedad transmitida por la picadura de un mosquito y sorprendentemente logran la identificación de la clase de mosquito que transmite la enfermedad. La descripción de la sintomatología que, al ellos narrarla en su dialecto, en términos generales es similar a la sintomatología descrita para la enfermedad; ya que principalmente la fiebre es asociada con la malaria, pero el escalofrío, el dolor de cabeza, y la falta de apetito son identificados como síntomas acompañantes de la enfermedad. Las personas también diferencian la malaria de una fiebre común y por lo tanto el tratamiento dado es diferente en cada caso; la comunidad también percibe que la enfermedad puede ser letal tanto en niños como en adultos.

Aunque la descripción de la enfermedad logra asociarse con la sintomatología clínica de la misma, no existen casos descritos, por las personas con las que se indagó, en los cuales pacientes hayan sido diagnosticados a través de métodos de laboratorio, y cuyo

tratamiento haya sido a base de medicina tradicional. Según la información dada por el abuelo de la comunidad, para ellos sus medicinas son mucho más efectivas que los medicamentos modernos, y es que según ellos sus medicinas limpian el cuerpo y el hígado especialmente, que es lo que se necesita para sacar totalmente la enfermedad; la relación que hacen acerca del sabor de las preparaciones resulta también interesante, ya que según ellos mientras más amarga es la preparación mejor y más rápido es su efecto. Comparando la información obtenida con lo reportado por Vigneron [36], existen similitudes en cuanto a la concepción de la enfermedad, la identificación de la sintomatología, claridad del método de transmisión, como también en la concepción de lo amargo y la relación que tiene con la efectividad de las preparaciones.

La decocción es el proceso de obtención de las preparaciones tradicionales obtenidas por la comunidad, aunque también en ocasiones, para otras dolencias, se realizan infusiones o se emplea el jugo de la planta utilizada; la decocción consiste en un proceso de ebullición del material vegetal por tiempos prolongados; y resulta ser el método de preparación mayoritariamente utilizado en sistemas de medicina tradicional [62, 63].

La cromatografía en capa delgada, permitió identificar de manera preliminar los metabolitos presentes en las preparaciones tradicionales; se utilizaron reveladores universales que nos llevaron a tener una información cualitativa de los metabolitos presentes. Este es un procedimiento sencillo, que ofrece una aproximación certera a la cantidad del compuesto presente, en comparación a las reacciones en tubo y no requiere la purificación de los extractos previa a la realización de la prueba; en general la cromatografía en capa delgada tiene muchas ventajas ampliamente conocidas en el análisis de la composición de plantas medicinales.

El análisis de los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antimalárica de las preparaciones tradicionales, tomo como base la clasificación dada por RITAM (*Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods*) [31], la cual nos permite realizar una clasificación de los extractos vegetales como promisorios o no para continuar y profundizar los estudios de los mismos. Para la evaluación de actividad antimalárica *in vitro* fue escogido el ensayo de inhibición de la invasión y el desarrollo, el cual permite evidenciar si existe algún efecto en el desarrollo del parásito en un cultivo sincrónico.



Tabla 4-1. Criterios de clasificación de la actividad antimalárica de extractos evaluados *in vitro* e *in vivo*; adaptado de Willcox, M., G. Bodeker, y P. Rasoanaivo [31].

Ensayo de inhibición $CI_{50}$ <i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>		
$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Nivel de Actividad	Dosis mg/Kg/día	%Inhibición	Nivel de actividad
< 0,1	Muy Buena	250	100 – 90	Muy buena
0.1 - 1.0	Buena		90 - 50	Buena a moderada
1.1 – 10	Buena a Moderada		50 - 10	Moderada a poco
11.0 -25	Poco activo		0	Inactivo
26 – 50	Muy poco activo			
>100	Inactivo			

La cepa empleada para el presente estudio es cloroquino resistente, y el solvente empleado para la disolución de las preparaciones fue una mezcla de agua: DMSO (50:50) ya que las preparaciones liofilizadas no eran completamente solubles en agua, pero si en la mezcla utilizada; las preparaciones eran solubles completamente en agua cuando se calentaban a ebullición, pero visto que esto puede afectar la integridad de los compuestos presentes o dar origen a artefactos, se decidió usar la mezcla de solventes para la primera disolución de las preparaciones y posteriormente en medio de cultivo como se describió anteriormente.

*Aspidosperma excelsum* es la planta conocida por la comunidad como *costillo*, es la más utilizada por encontrarse en mayor cantidad en lugares cercanos a la vivienda.

La tabla 3-3 resume en los metabolitos, detectados por cromatografía de capa delgada con los diferentes reveladores, en las preparaciones obtenidas de *A. excelsum*; se observa una clara diferencia en la composición de la preparación obtenida de las hojas (RTCH) y la corteza (RTCC). En las hojas se observan tres manchas principalmente que fluorescen inicialmente y cuya fluorescencia se mantiene después de ser asperjados con NP/PEG lo que nos indica la presencia de compuestos de tipo flavonoide; para el caso de la preparación obtenida con la corteza se observan dos manchas principales ( $R_f$  0,90 y 1,70) que fluorescen en las dos longitudes de onda ultravioleta color azul (Figuras 3-5 y 3-6), y mantienen la fluorescencia después de ser asperjados con NP/PEG (Figura 3-8), adicionalmente estas manchas revelan color morado-café con el revelador de Godin (Figura 3-7), lo que nos indicaría posiblemente la presencia de compuestos de tipo esteroideo o terpénicos. En ninguna de las dos preparaciones se detectó la presencia de alcaloides; en estudios previos se ha reportado la presencia de este tipo de compuestos en la especie e incluso la identificación de alcaloides tipo indólicos como la yohimnina [49], el proceso de extracción usado en este caso no permitió la obtención de este tipo de compuestos.

Los resultados de actividad antiplasmodial *in vitro* obtenidos para el caso de las preparaciones obtenidas con *A. excelsum* se muestran en la figura 3-10, se observa una

correlación entre la concentración evaluada y el porcentaje de inhibición obtenido (respuesta). De acuerdo con las  $CI_{50}$  obtenidas (Tabla 3-4), se observa que las preparaciones son consideradas poco activas según la clasificación de RITAM (Tabla 4-1); aunque resulta ser la preparación obtenida de las hojas de la planta la que posee mejor actividad con una  $CI_{50}$  de  $36,03 \pm 12,7 \mu\text{g/mL}$ , frente a la preparación obtenida con la corteza con una  $CI_{50}$  mayor a  $50 \mu\text{g/mL}$ . Debido a que las hojas se regeneran más fácil que la corteza, si se quisiera iniciar un proceso productivo para la elaboración de fitomedicamentos, sería ventajoso desde el punto de vista del desarrollo sostenible.

Se encontraron pocos estudios en que *Aspidosperma excelsum* fue evaluada en ensayos de actividad antimalárica *in vitro*, uno de ellos evaluó el extracto hidroalcohólico de la madera concluyendo que el mismo es inactivo cuando se realiza sobre cultivo de *P. falciparum* cepa F32 sensible a cloroquina [46, 48].

En los ensayos *in vivo*, estas preparaciones mostraron un porcentaje de inhibición de  $2,1 \pm 2,2$  para la preparación obtenida con la corteza de la planta y, un porcentaje de inhibición de  $7,1 \pm 8,7$  para la obtenida con las hojas de la misma. Al comparar la supervivencia de los animales (Figura 3-17) después de terminado el test de Peters no se observa una supervivencia diferente comparada con el vehículo utilizado en el ensayo.

Los resultados obtenidos y la clasificación propuesta por RITAM, nos lleva a concluir que las dos preparaciones son inactivas frente a los dos modelos utilizados para la evaluación de la actividad antimalárica.

Otra de las plantas utilizadas por la comunidad para el tratamiento de la malaria es *Abuta grandifolia*. Esta planta es la menos usada por ellos debido a la dificultad en el acceso; pues es una planta que se da lejos de la vivienda o la chagra donde comúnmente colectan las plantas necesarias para el tratamiento de las diferentes enfermedades.

En las preparaciones obtenidas con las hojas o la raíz de *A. grandifolia*; se puede detectar, mediante cromatografía en capa delgada, la presencia de compuestos de tipo esteroide o terpénico y flavonoides (Tabla 3-3). En general se observa similitud entre las dos preparaciones obtenidas de diferentes órganos de la planta (hojas y la raíz). La mayoría de los metabolitos detectados están presentes en las dos preparaciones, se evidencia alguna diferencia en cuanto a la presencia de alcaloides en la preparación obtenida de las raíces de la planta (Figura 3-9), la cual ya ha sido previamente reportada e incluso las preparaciones han sido evaluadas en pruebas de actividad antimalárica obteniendo  $CI_{50}$  entre  $0,21$  y  $8,73 \mu\text{g/mL}$  [64]. En los extractos etanólicos de esta planta nuestro equipo ya se ha reportado la presencia de compuestos de tipo esteroideo y flavonoides [42].

En los ensayos de inhibición del desarrollo de *P.falciparum* las preparaciones obtenidas con las hojas y la raíz de esta planta, presentaron  $CI_{50}$  de 27,95 +/- 4,4  $\mu\text{g/mL}$  y 36,95 +/- 4,97  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, estos resultados llevarían a clasificar los extractos como poco activos, según la clasificación de RITAM (Tabla 4-1).

Los ensayos *in vivo* generaron resultados de porcentajes de inhibición muy bajos para el caso de la preparación de las hojas 10,0 +/- 8,2 % y para la preparación de la raíz 7,5 +/- 13,1 %, que nos hacen clasificarlo como inactivo.

Estudios previos, desarrollados por el grupo de investigación, han reportado la promisoría actividad del extracto alcaloidal de *A. grandifolia*, con una  $CI_{50}$  <1- 2,1  $\mu\text{g/mL}$ , y un porcentaje de inhibición del 66 % en el ensayo *in vivo* a una dosis de 250 mg/kg/día [44].

Estas diferencias de actividad de las preparaciones tradicionales que consisten en decocciones frente a los extractos alcaloidales pueden derivarse, como se puede evidenciar en los perfiles cromatográficos, de que en la decocción de la hojas no se detecta la presencia de alcaloides. En la cromatografía de la preparación de las raíces se observa una mancha que revela la posible presencia de alcaloides, la cual puede explicar la diferencia de actividad entre las preparaciones de las hojas y la raíz; lo anterior nos permiten intuir que la actividad de esta planta está relacionada directamente con los alcaloides presentes en la misma, adicionalmente la colecta del estudio anterior se realizó en época seca [42], mientras que en nuestro caso fue época de lluvia, lo cual posiblemente genere cambios en la composición de las plantas.

*Curarea toxicifera* conocida por la comunidad como *bejuco de llano*, es otra de las plantas utilizadas para el tratamiento de la malaria, según la información de la comunidad esta planta debe ser usada a dosis moderadas y siempre con la compañía espiritual del médico tradicional por la “*fuera de la planta*”; esta especie es la que el médico tradicional utiliza en los casos más difíciles, cuando la enfermedad ya lleva mucho tiempo y se dice que con una sola toma, la persona ya se recupera de la enfermedad; esta misma planta también es utilizada como una “*vacuna*” ya que la toman para prevenir ser picados por los mosquitos, la preparación de la planta y el ritual para este fin es diferente, no se tuvo la posibilidad de obtener dicha preparación o de escuchar la forma en cómo era preparada para tal fin; la preparación estudiada en esta oportunidad es la preparada con fines curativos.

En la tabla 3-3 se resumen los resultados obtenidos en las cromatografías de capa delgada que nos permiten evidenciar la presencia de compuestos de tipo terpénico o esteroideo (Figura 3-7) y, principalmente por la intensidad de la mancha la presencia de alcaloides (Figura 3-9).

En el modelo farmacológico de cultivo *in vitro* se realizaron cuatro ensayos independientes y fueron leídos por el método visual, encontrándose una  $CI_{50}$  de 3,02 +/- 1,01  $\mu\text{g/mL}$ ; utilizando el método de citometría de flujo, como parte de la optimización del método de lectura que se lleva a cabo actualmente en el grupo de investigación. El dato de  $CI_{50}$  para la preparación fue de 3,3  $\mu\text{g/mL}$  y para cloroquina 0,008  $\mu\text{g/mL}$ ; estos valores nos permiten aportar a la validación del método de lectura a la vez que confirman los resultados obtenidos por el método visual (que resulta ser más subjetivo); desafortunadamente por no estar aun estandarizado el método de citometría no fue posible realizar la lectura de todos los ensayos con dicho método.

En la actividad *in vivo* esta preparación mostró una buena actividad, con un porcentaje de parasitemia de 7,3 +/- 4,5 que resultó ser estadísticamente diferente del vehículo, agua ( $p < 0,05$ ); generando una inhibición de 88,4 +/- 7,2 que nos permite clasificar la preparación con actividad buena a moderada.

Teniendo en cuenta que la preparación presentó actividad antimalárica tanto *in vivo* como *in vitro*, podemos decir que el posible estadio sobre el cual actúan los activos presentes en la preparación es el sanguíneo.

Una búsqueda en las bases de datos Sciece Direct, PubMed y Lilacs, usando como descriptor el nombre científico de la planta, no reportó estudios previos de uso como antimalárico, tampoco se encontró información de la composición química de la planta; sin embargo otra planta del género *Curarea* (*Curarea tecunorum*) es utilizada por la comunidad Waorani del Ecuador, para el tratamiento de infecciones por hongos y para el tratamiento de infestaciones por parásitos [65], de esta planta se utiliza la corteza y ha sido evaluada en prueba de actividad antimalárica frente a *P. falciparum* 3D7, una cepa cloroquino sensible, encontrando una alta actividad con una  $CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$  [35].

Los requerimientos para que una sustancia o extracto pase de etapas de investigación a desarrollo son demostrar eficacia *in vitro* e *in vivo* y evaluar su toxicidad. Se ha reportado que algunos componentes químicos pueden interaccionar con la bicapa lipídica del glóbulo rojo causando lisis [66]. Como una aproximación con el fin de descartar que las preparaciones causen este tipo de daño al eritrocito, y que la actividad encontrada se derive de ese daño y no de un verdadero efecto antiplasmodial, se realizó el ensayo de hemólisis a una sola concentración, que corresponde a la más alta evaluada en los ensayos de actividad antiplasmodial, es decir 50  $\mu\text{g/mL}$ ; encontrándose que ninguna de las seis preparaciones genera daño a la membrana del eritrocito.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

El trabajo con la comunidad Ciudad Hitoma permitió conocer las percepciones acerca de los conceptos de salud y enfermedad a nivel general enfocado, específicamente, a la malaria por parte del médico tradicional y su familia.

Se accedió a información de las plantas usadas para el tratamiento de la malaria y su forma de preparación por parte del médico tradicional de la comunidad Ciudad Hitoma.

Mediante pruebas cualitativas se evidenció la presencia de alcaloides en las preparaciones de *Abuta grandifolia* (raíces) y *Curarea toxicofera*. Compuestos de tipo flavonoide se detectaron en las preparaciones de *Abuta grandifolia* (tanto hojas y raíces) y *Aspidosperma excelsum* (hojas y corteza) mientras que los compuestos de tipo esteroideo y/o triterpénico se manifestaron en las preparaciones de *Abuta grandifolia* (raíces y hojas), *Aspidosperma excelsum* (corteza) y *Curarea toxicofera*.

Las preparaciones obtenidas de hojas y corteza de *A. excelsum* y de raíz y hojas de *A. grandifolia* mostraron muy poca actividad ( $CI_{50}$  de 26 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) en el ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo de *P. falciparum*, mientras que la preparación de *C. toxicofera* mostró una actividad buena a moderada ( $CI_{50}$  de 1.1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ).

En el ensayo de actividad antimalárica *in vivo*, únicamente la preparación obtenida de *C. toxicofera* mostró un nivel de actividad buena a moderada (Inhibición de 50 a 90 %), las demás preparaciones se mostraron inactivas en las condiciones del ensayo.

Con estos resultados se contribuye al conocimiento etnofarmacológico de la flora medicinal empleada para el tratamiento de la malaria.

## 5.2 Recomendaciones

Con el fin de profundizar la información obtenida en el desarrollo del presente trabajo se plantean las siguientes recomendaciones:

Continuar con el estudio químico de *Curarea toxicofera* con el fin de identificar los metabolitos responsable de la actividad antimalárica.

Realizar ensayos de actividad en otros estadíos del ciclo del parásito como por ejemplo el estadío hepático.

Realizar ensayos de cronofarmacología y potenciación de la preparación tradicional con fármacos de uso en la actualidad.

Evaluar comparativamente la preparación tradicional frente a extractos obtenidos con procedimientos convencionales, en aspectos fitoquímicos y de actividad farmacológica con miras al desarrollo de un producto fitoterapéutico.

Desarrollar una monografía tradicional de *Curarea toxicofera* con el fin de retornar a la comunidad los resultados de la evaluación de la actividad antimalárica de la especie.

# A. Anexo: Consentimiento informado

## Titulo del proyecto:

**Evaluación de la actividad antimalárica de preparaciones tradicionales obtenidas de dos especies promisorias usadas por una comunidad en zonas endémicas y profundización en el estudio de su actividad farmacológica.**

Le 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 preparaciones tradicionales obtenidas de dos plantas promisorias usadas para el tratamiento de la malaria.

Su participación será voluntaria y como informante. La información que le solicitaremos incluirá indicarnos la parte de la planta utilizada y los métodos para su preparación usos y formas de usos. La entrevista que le hagamos podrá ser grabada si usted está acuerdo con ello.

Usted decidirá voluntariamente participar en esta investigación.

Su identidad será confidencial. 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 por su nombre **no será dada a nadie sin su autorización escrita.**

He/hemos explicado lo descrito en el texto del consentimiento informado al participante en la siguiente fecha: Día \_\_\_\_\_ Mes \_\_\_\_\_ Año \_\_\_\_\_.

Nombre/firma de los investigadores:

\_\_\_\_\_  
Paola Andrea Cárdenas.

\_\_\_\_\_  
Giovanny Garavito Cárdenas.

**INFORMANTE**

HE LEIDO – ESCUCHADO LO DESCRITO EN ESTE CONSENTIMIENTO Y HE TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER LAS PREGUNTAS PERTINENTES

Al firmar este documento, acepto participar en la investigación de este consentimiento informado.

Nombre de la comunidad: \_\_\_\_\_

Nombre del líder o representante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Firma

C.C

Grabación: SI  NO



## **B. Anexo: Cultivo de *Plasmodium falciparum***

### **Preparación de medio RPMI 1640.**

- Pesar 5,92 g de Hepes y disolver en 100 mL de agua destilada.
- Pesar 10 mg de hipoxantina y disolver en agua destilada en ebullición.
- Pesar 2 g de glucosa y disolver en agua destilada.
- Traspasar las soluciones a un balón de 1 L, las soluciones deben estar a temperatura ambiente.
- Adicionar aproximadamente 500 mL de agua destilada, adicionar un frasco (10,4 g) de medio RPMI 1640, disolver totalmente.
- Adicionar 60 mg de gentamicina.
- Completar a 1 L.
- Esterilizar con filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  en cabina de flujo laminar.
- Mantener a 4 °C, antes de utilizar se debe atemperar a 37 °C.

### **Preparación medio RPMIc (Medio de cultivo RPMI completo).**

Se debe preparar en el momento de su utilización.

- Preparar una solución con 85 % medio RPMI suplementado con 10 % de plasma humano y 5 % de una solución de bicarbonato de sodio al 5%.

### **Preparación Colorante Giemsa.**

- Pesar 1 g de colorante, traspasarlo a un mortero y disminuirlo a tamaño de partícula.
- Adicionar 10 mL de metanol hasta disolver el colorante.
- Traspasar a un frasco color ámbar y adicionar 74 mL más de metanol, y 54 mL de glicerina.
- Dejar madurar por 5 días a temperatura ambiente.
- Filtrar y guardar nuevamente en frasco ámbar.

### **Preparación tampón de Giemsa.**

- Pesar 0,273 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y disolverlo en 40 mL de agua.
- Pesar 0,227 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y disolverlo en 40 mL de agua.

- Traspasar las dos soluciones a un balón de 500 mL y completar a volumen con agua.
- Homogenizar y almacenar a 4°C.

Todos los procesos de manipulación del cultivo se *P.falciparum*, se realizan en cabina de seguridad biológica tipo II.

### **Congelación del parásito.**

- Tomar el contenido de la caja de cultivo y transferir a un tubo de 15 mL.
- Centrifugar a 500 x G por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar al pellet en proporción 1:4 una solución de glicerinal 5%.
- Repartir en tubos de congelación, no más de 0,7 mL.
- Congelar a -70°C o en tanque de nitrógeno.

### **Descongelación del parásito.**

- Sacar un vial del ultrarrefrigerador (-80°C) o del tanque de nitrógeno.
- Descongelar por un minuto a 37°C.
- Transferir el contenido del vial a un tubo estéril de 15 mL.
- Adicionar gota a gota y agitando suave y cuidadosamente 0,1 mL de solución estéril de NaCl 12%.
- Dejar en reposo por 5 minutos.
- Adicionar gota a gota y agitando suavemente 5 mL de solución estéril de NaCl 1,6 %.
- Centrifugar a 500 x G por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar al pellet 5 mL de una solución estéril de NaCl 0,9% y Dextrosa 0,2%.
- Centrifugar a 500 x G por 10 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 5 mL de medio RPMI estéril y mezclar suavemente.
- Centrifugar a 500 x G por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Adicionar 200 µL de glóbulos rojos frescos y 10 mL de RPMIc estéril.
- Transferir a la caja de cultivo y gasear con mezcla de gases (5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, balance de Nitrógeno) por 1 minuto.
- Sellar el frasco y cultivar a 37°C en incubadora.

### **Mantenimiento diario del Cultivo**

- Mantener la caja de cultivo siempre en posición horizontal.

- Retirar de la incubadora la caja de cultivo y manipularla dentro de la cabina de seguridad biológica.
- Abrir la caja de cultivo.
- Retirar cuidadosamente el medio sobrenadante y eliminarlo con la utilización de pipeta.
- Tomar una muestra del pellet y realizar el frotis correspondiente.
- Realizar la tinción de Giemsa.
- Observar a través de microscopio estadíos y calcular la parasitemia.
- Si la parasitemia se encuentra mayor al 4%, realizar la dilución, con glóbulos rojos normales, necesaria para que esta no sea superior al 2%.
- Teniendo en cuenta que el hematocrito no debe ser mayor al 5 %, determinar si es necesario dividir el cultivo en una caja nueva.
- Adicionar medio RPMIc estéril suficiente para mantener un hematocrito de 5%.
- Gasear con mezcla de gases (5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, balance de Nitrógeno) por 1 minuto.
- Sellar el frasco y cultivar a 37°C en incubadora.

#### **Sincronización del cultivo.**

Este proceso se utiliza en el momento del ciclo en que hay predominancia de estadíos jóvenes (anillos).

- Tomar la suspensión de glóbulos rojos parasitados, transferir a un tubo estéril de 15 mL.
- Centrifugar a 500 x G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar 9 partes de sorbitol 5% estéril, al pellet.
- Homogenizar e incubar a 37 °C por 10 minutos.
- Centrifugar a 500 x G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante.
- Adicionar 5 mL de RPMI, homogenizar.
- Centrifugar a 500 x G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante, adicionar RPMIc estéril suficiente para hematocrito 5%.
- Transferir a una caja de cultivo.
- Gasear con mezcla de gases (5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, balance de Nitrógeno) por 1 minuto.
- Sellar el frasco y cultivar a 37°C en incubadora.

#### **Tinción de Giemsa.**

- Realizar el frotis en láminas portaobjetos.
- Secar el frotis con la ayuda de un secador de cabello.
- Adicionar 1 o 2 mL de metanol a la lámina.
- Permitir la evaporación del metanol.

- Colocar una solución al 10 % de Giemsa en el tampón correspondiente de tal manera que cubra la superficie del frotis.
- Dejar reposar por 10 minutos.
- Lavar la lámina con abundante agua de llave.

## **C. Anexo: Realización del ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo de *Plasmodium falciparum*.**

### **Preparación de las soluciones.**

#### **Disolución de extractos.**

- Solución inicial: Preparar una solución a concentración 10 mg/mL en DMSO (Solución A).
- En la cabina de flujo realizar las siguientes diluciones:
  - Tomar 100  $\mu$ L de solución A y disolver en 900  $\mu$ L de RPMIc (Solución B).
  - Tomar 100  $\mu$ L de solución B y disolver en 900  $\mu$ L de RPMIc (Solución C).

#### **Solución de Cloroquina.**

- Solución inicial: Preparar en agua destilada una solución 1 mg/mL (Pesar 5 mg y disolver en 5 mL), Solución A.
- En cabina de flujo realizar las siguientes diluciones:
  - Tomar 100  $\mu$ L de solución A y disolver en 900  $\mu$ L de RPMIc (Solución B).
  - Tomar 10  $\mu$ L de solución B y disolver en 990  $\mu$ L de RPMIc (Solución C).

#### **Preparación suspensión glóbulos rojos parasitados.**

- Preparar una suspensión de glóbulos rojos parasitados, sincrónicos, de tal forma que tenga un hematocrito al 4%, y un porcentaje de parasitemia no superior al 2%.

**Diluciones en placa.**

En placas de 96 pozos fondo plano.

Concentración	Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3			Muestra 4			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
50 µg/mL													A
25 µg/mL													B
10 µg/mL													C
1 µg/mL													D
0,1 µg/mL													E
													F
	Control de crecimiento											G	
													H

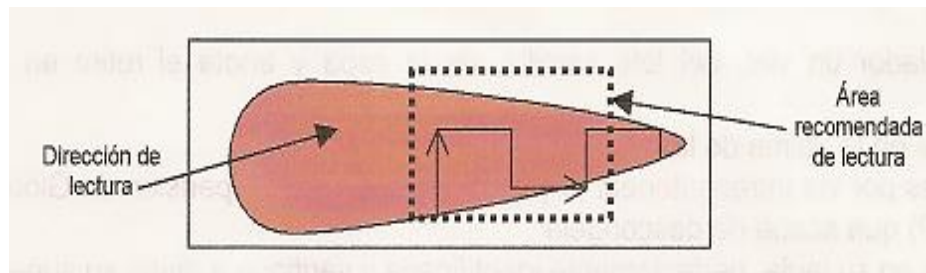
- En las filas B colocar 100 µL de RPMIc
- En las filas C colocar 120 µL de RPMIc
- En las filas D colocar 180 µL de RPMIc
- En las filas E colocar 180 µL de RPMIc
- En las filas F colocar 180 µL de RPMIc
- En las filas C colocar 100 µL de RPMIc
- Colocar en la fila B 100 µL de solución A de los tratamientos, homogenizar.
- Tomar 100 µL de la fila B y traspasar a la fila C, homogenizar.
- Tomar 80 µL de la fila C y traspasar a la fila D, homogenizar.
- Tomar 20 µL de la fila D y traspasar a la fila E, homogenizar.
- Tomar 20 µL de la fila E y traspasar a la fila F, homogenizar.
- Desechar de la fila F 100 µL.
- Desechar de la fila E 80 µL.
- Desechar de la fila D 80 µL.
- Desechar de la fila C 20 µL.
- Colocar 100 µL de la suspensión de glóbulos rojos parasitados, en todos los pozos de las letras B a G y del número 1 al 12.
- Tapar las placas, colocarlas en un recipiente adecuado, gasear con mezcla de gases (5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, balance de Nitrógeno) por 5 minutos
- Incubar a 37 °C por 48 horas.

**Realización de frotis.**

Transcurridas las 48 horas, retirar de la incubadora el recipiente con las placas y trabajar bajo cabina de seguridad biológica.

- Aspirar cuidadosamente de uno de los pozos control (pozos de la fila G), el medio sobrenadante.
- Realizar un frotis del pellet del pozo y evaluar la parasitemia y los estadios del cultivo.

- Si el cultivo se encuentra en estadios jóvenes y la parasitemia superior a la inicial, indica que se desarrolló normalmente el cultivo.
- Tomar la placa y centrifugarla a 500 x G por 10 minutos.
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
- Realizar el frotis de cada uno de los pozos.
- Realizar la tinción de Giemsa.
- Realizar el conteo de la parasitemia de cada uno de los pozos, por el método visual.



Contar 1000 glóbulos rojos, discriminando glóbulos normales de parasitados, realizar el cálculo de parasitemia.

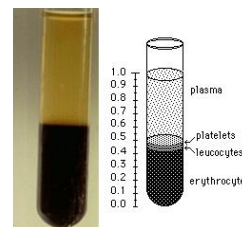
$$\% \text{ Parasitemia} = [\text{GR infectados} / (\text{GR sanos} + \text{GR infectados})] * 100$$





## D. Anexo: Ensayo de actividad hemolítica.

- Se toma una muestra de sangre de tipo “O” Rh + heparinizada.
- Centrifugar a 500 G por 5 minutos
- Sacar sobrenadante y la capa leucocitaria o coágulo blanco (buffy coat).
- Lavar 3 veces con PBS.
- Preparar una suspensión al 2% de glóbulos rojos en agua destilada y otra en PBS.
- Colocar en placa de 96 pozos de fondo en V:
  - 50  $\mu$ L de la suspensión en agua destilada + 50  $\mu$ L de agua destilada en la fila correspondiente a 100% de hemólisis.
  - 50  $\mu$ L de la suspensión en PBS + 50  $\mu$ L de PBS en la fila correspondiente a 100% de no hemólisis (0% de hemólisis).
  - En el resto de los pozos que se van a usar se adicionan 50  $\mu$ L de la suspensión en PBS + 50  $\mu$ L de la muestra.
  - La muestra se encuentra preparada en una concentración de 100  $\mu$ g/ mL.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 % DE HEMOLISIS											
B												
C												
D	M1	M3	M5	M7	M9	M11	M13	M15	M17	M19	M21	M23
E												
F												
G	M2	M4	M6	M8	M10	M12	M14	M16	M18	M20	M22	M24
H	0 % DE HEMOLISIS											

- Incubar a 37 °C por 1 hora, transcurrido el tiempo centrifugar a 500 x G por 10 minutos.
- Transferir el sobrenadante a una placa de fondo plano.
- Determinar espectrofotométricamente la cantidad de hemoglobina a 490 nm.

Calcular el porcentaje de hemólisis.

$$\% \text{ de hemolisis} = \frac{\text{Absorbancia muestra} - \text{Absorbancia PBS}}{\text{Absorbancia agua} - \text{Absorbancia PBS}} \times 100$$



# Bibliografía

1. OMS: Organización Mundial de la Salud. World Malaria Report. In. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
2. DANE: Sistema de consulta censal, Censo 2005. *www.danegov.co* Consultado en Junio 2009 2005.
3. Nemoga G, Correa P, Galindo E, Lizarazo O: Conocimientos tradicionales: Riesgos y retos de una protección efectiva. *Instituto unidad de investigaciones jurídico sociales Gerardo Molina Universidad Nacional de Colombia* 2006.
4. Garcia LS: Malaria. *Clinics in Laboratory Medicine* 2010, 30(1):93-129.
5. Beier JC: Malaria parasite development in mosquitoes. *Annu Rev Entomol* 1998, 43:519-543.
6. Olano V, Brochero H, Saéñz R, Quiñonez ML, Molina J: Mapas preliminares de la distribución de especies de *Anopheles* vectores de Malaria en Colombia. *Biomédica* 2001, 21:402-408.
7. Esteva L, Gumel AB, de León CV: Qualitative study of transmission dynamics of drug-resistant malaria. *Mathematical and Computer Modelling* 2009, 50(3-4):611-630.
8. Anstey NM, Russell B, Yeo TW, Price RN: The pathophysiology of vivax malaria. *Trends in Parasitology* 2009, 25(5):220-227.
9. Kawamoto F, Kawamoto H, Liu Q, Ferreira MU, Tantular IS: How prevalent are *Plasmodium ovale* and *P. malariae* in East Asia? *Parasitology Today* 1999, 15(10):422-426.
10. Scopel KKG, Fontes CJF, Nunes AC, Horta MF, Braga EM: High prevalence of *Plasmodium malariae* infections in a Brazilian Amazon endemic area (Apiacás - Mato Grosso State) as detected by polymerase chain reaction. *Acta Tropica* 2004, 90(1):61-64.
11. <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articles/447/1/Paludismo.html>, Consultado Enero 2011.
12. <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/malaria>. Consultado Enero 2011.
13. RBM: The Global Malaria Action Plan. In: <http://www.rbmwho.int/gmap/gmappdf>. Edited by Partnership RBM; 2008.
14. Bourdy G, Willcox ML, Ginsburg H, Rasoanaivo P, Graz B, Deharo E: Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials? *Int J Parasitol* 2008, 38(1):33-41.
15. Osorio L, Ochoa J: Situación del paludismo urbano en Colombia. *Biomédica* 2007, 27(2):59.
16. Kurane I: The Effect of Global Warming on Infectious Diseases. *Osong Public Health and Research Perspectives* 2010, 1(1):4-9.
17. Kremsner PG, Krishna S: Antimalarial combinations. *Lancet* 2004, 364(9430):285-294.

18. Winstanley PA: Chemotherapy for Falciparum Malaria: The Armoury, the Problems and the Prospects. *Parasitology Today* 2000, 16(4):146-153.
19. Guerin PJ, Olliaro P, Nosten F, Druilhe P, Laxminarayan R, Binka F, Kilama WL, Ford N, White NJ: Malaria: current status of control, diagnosis, treatment, and a proposed agenda for research and development. *The Lancet Infectious Diseases* 2002, 2(9):564-573.
20. Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S: Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* 2004, 3(6):509-520.
21. Nwaka S, Ridley RG: Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2(11):919-928.
22. Campuzano G, BLAIR S: Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico” *Medicina y Laboratorio* 2010, 16(7-8):311- 354.
23. TDR: The special programme for research and training in tropical diseases. In: <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/malaria>. Edited by TDR, vol. 2010; 2010.
24. OPS: Organización Panamericana de la Salud. Información y Análisis de Salud:Situación de Salud en las Américas: Indicadores Básicos 2009. Washington D.C, 2009.
25. INS: Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico semanal número 52, 2010.
26. Chaparro P, Restrepo P, Osorio L, Schotborg I: Costo de los medicamentos antipalúdicos en Colombia, 2005- 2008. *Informe epidemiológico quincenal Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud* 15 Septiembre de 2009, 14(17).
27. Tatem AJ, Smith DL, Gething PW, Kabaria CW, Snow RW, Hay SI: Ranking of elimination feasibility between malaria-endemic countries. *Lancet* 2010, 376(9752):1579-1591.
28. OMS: Organización Mundial de la Salud.General guidelines for methodologies on Research and evaluation of traditional medicine. Geneva, Switzerland; 2000.
29. Chan M: Alocución al Congreso de la OMS sobre Medicina Tradicional Dra. Margaret Chan Directora General de la Organización Mundial de la Salud Beijing, República Popular China 7 de noviembre de 2008. <http://www.who.int/dg/speeches/2008/20081107/es/indexhtml> Agosto 2009.
30. Guevara HA, Luengas PE, Garavito G: Documental revision of the natural products authorized for marketing in Colombia. *Colombia Médica* 2010, 41(2):129-140.
31. Willcox ML, Bodeker G: Traditional herbal medicines for malaria. *BMJ* 2004, 329(7475):1156-1159.
32. Bertani S, Houel E, Stien D, Chevolut L, Jullian V, Garavito G, Bourdy G, Deharo E: Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an Amazonian traditional remedy made with Quassia amara L. (Simaroubaceae). *J Ethnopharmacol* 2006, 108(1):155-157.
33. OMS: Organización Mundial de la Salud. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Geneva, Switzerland; 1993.
34. Sharapin N: Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de Fitoterapia* 2000, 1(3):197 - 203.

35. Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A: Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology* 2006, 106(3):390-402.
36. Vigneron M, Deparis X, Deharo E, Bourdy G: Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. *J Ethnopharmacol* 2005, 98(3):351-360.
37. Vigneron M: Ethnopharmacologie quantitative: contexte d'usage et caractérisation de quelques traitements antipaludiques en Guyane française. Environnement tropical et valorisation de la biodiversité, Université Antilles-Guyane, 2003. Guyane française.
38. Cano JH, Volpato G: Herbal mixtures in the traditional medicine of Eastern Cuba. *Journal of Ethnopharmacology* 2004, 90(2-3):293-316.
39. Jullian V, Bourdy G, Georges S, Maurel S, Sauvain M: Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. *J Ethnopharmacol* 2006, 106(3):348-352.
40. Willcox ML, Cosentino MJ, Pink R, Bodeker G, Wayling S: Natural products for the treatment of tropical diseases. *Trends Parasitol* 2001, 17(2):58-60.
41. Garavito G: Estandarización de dos modelos de actividad antimalárica como herramientas para la evaluación farmacológica de sustancias o extractos de origen vegetal. *Tesis de Maestría*. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia.; 2003.
42. Hata Y: Contribución a la estandarización de un extracto con base en *Abuta grandifolia*. *Maestría*. Bogotá. D.C: Universidad Nacional de Colombia.; 2005.
43. Reguero MT, Arteaga L, Rico C, Torres G: Actividad antimalárica y toxicidad de *Abuta grandifolia*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 1998, 29:10.
44. Garavito G, Rincón J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Gimenez A, Pinzón R, Deharo E: Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2006, 107(3):460-462.
45. Fox N: La mayoría de las plantas medicinales en la reserva Jatun Sacha Ecuador -Una guía informativa de los usos tradicionales. 1998.
46. Pérez D: Etnobotánica medicinal y biocidas para malaria en la región de Ucayali. *Folia Amazónica* 2002, 13(1):87-108.
47. Bernal R, Galeano G, Cordero Z, Cruz MP, Gutiérrez M, Rodríguez A, Sarmiento H: Diccionario de nombres comunes de las plantas de Colombia. Versión en línea. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <http://www.biovirtual.unal.edu.co/diccionario/> In.; 2008.
48. Gutiérrez Y D, Sosa F F, Paco G MA, Ruisz P GE, Gimenez T A: Actividad antipalúdica de plantas procedentes de la Amazonía peruana. *BIOFARBO* 2004, 12(12):33-38.
49. Burnell RH, Nguyễn Thi S: [alpha]-yohimbine from *aspidosperma excelsum*. *Phytochemistry* 1971, 10(4):895-895.
50. de Mesquita ML, Grellier P, Mambu L, de Paula JE, Espindola LS: In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. *J Ethnopharmacol* 2007, 110(1):165-170.
51. Vasquez R: Flórua de las Reservas Biológicas de Iquitos, Perú: Allpahuayo-Mishana. Missouri Botanical Garden ISBN 978-0915279487. 1997, vol. 63.
52. Valadeau C, Castillo JA, Sauvain M, Lores AF, Bourdy G: The rainbow hurts my skin: Medicinal concepts and plants uses among the Yanasha (Amuesha), an

- Amazonian Peruvian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* 2010, 127(1):175-192.
53. Mejía LE, Turbay S: Los venenos de cacería en la Amazonía Colombiana; ¿ Sustancias letales o fuentes de vitalidad? *Boletín de Antropología, Universidad de Antioquia* 2009, 23(40):129 - 153.
54. DANE: Colombia una nación multicultural: su diversidad étnica. In. Edited by DANE. Bogotá D.C; 2007.
55. Alvarado M: Situación de las comunidades indígenas de Colombia, revisión e iniciativas. <http://www.indepaz.org.co> Septiembre 2009.
56. Arango R, Sánchez E: Los pueblos Indígenas de Colombia. *DANE: Censo 1993 - Proyección 2001* 1997.
57. Bourdy G: Trabajo con comunidades. In.; 2010.
58. Trager W, Jensen JB: Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 1976, 193:673 - 675.
59. Deharo E, Gautret P, Muñoz V, Sauvain M: Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas., Primera Edición edn. La Paz, Bolivia.: CYTED (Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) - IRD (Institut de Recherche pour le Développement). 2000.
60. Peters W, Bafort J, Ramkaran AE: The chemotherapy of rodent malaria. XI. Cyclically transmitted, chloroquine-resistant variants of the Keyberg 173 strain of *Plasmodium berghei*. *Ann Trop Med Parasitol* 1970, 64(1):41-51.
61. Okamoto Y, Ohkoshi K, Itagaki H, Tsuda T, Kakishima H, Ogawa T, Kasai Y, Ohuchi J, Kojima H, Kurishita A *et al*: Interlaboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (3) Evaluation of the haemolysis test. *Toxicology in Vitro* 1999, 13(1):115-124.
62. Li S-L, Lai S-F, Song J-Z, Qiao C-F, Liu X, Zhou Y, Cai H, Cai B-C, Xu H-X: Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 53(4):946-957.
63. Sanz-Biset J, Campos-de-la-Cruz J, Epiqueñ-Rivera MA, Cañigüeral S: A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *Journal of Ethnopharmacology* 2009, 122(2):333-362.
64. Steele JCP, Simmonds MSJ, Veitch NC, Warhurst DC: Evaluation of the Anti-Plasmodial Activity of Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Med* 1999, 65(05):413-416.
65. Davis EW, Yost JA: The ethnomedicine of the waorani of Amazonian Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology* 1983, 9(2-3):273-297.
66. Ziegler HL, Jensen TH, Christensen J, Staerk D, Hagerstrand H, Sittie AA, Olsen CE, Staalso T, Ekpe P, Jaroszewski JW: Possible artefacts in the in vitro determination of antimalarial activity of natural products that incorporate into lipid bilayer: apparent antiplasmodial activity of dehydroabietinol, a constituent of *Hyptis suaveolens*. *Planta Med* 2002, 68(6):547-549.