



Evaluación de la actividad tripanosomicida de 4 extractos metanólicos de plantas con uso medicinal

Molina Garza Zinnia Judith,* Pérez-Treviño Karla Carmelita, Rodríguez-Arzave Juan Antonio, Galaviz Silva Lucio

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Pedro de Alba S/N, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León. C.P. 66455. México.

*Autor para correspondencia: molinazinnia@hotmail.com

Recibido:

21/abril/2016

Aceptado:

02/agosto/2016

Palabras clave

Enfermedad de Chagas,
Fitoquímica,
Haematoxylum brasiletto

Keywords

Chagas Disease,
phytochemistry,
Haematoxylum brasiletto

RESUMEN.

La enfermedad de Chagas es potencialmente mortal, se estima que en el mundo hay entre 6 - 7 millones de personas infectadas; actualmente, existen dos medicamentos para tratar la enfermedad, benznidazol y nifurtimox; ambos son eficaces si se administran en la etapa aguda, pero su eficacia disminuye después del inicio de la infección, además presentan efectos secundarios serios. En el siguiente estudio se evaluó la actividad anti-*Trypanosoma* de extractos metanólicos de plantas con uso medicinal. Se evaluaron cuatro extractos, siendo *Haematoxylum brasiletto* el extracto con la mejor actividad, presentó una DL50 de 543 µl/mL. Ninguno de los extractos presentó una citotoxicidad elevada. Por lo que *H. brasiletto*, es una opción para buscar tratamientos alternativos contra la enfermedad de Chagas.

ABSTRACT

Chagas disease is a life threatening problem, an estimated between 6 - 7 million of people are infected worldwide; currently, there are only two drugs to treat the disease, benznidazole and nifurtimox; however both them are effective only on the acute phase, and its effectiveness decreases after the onset of infection and also shows serious side effects. In this study the anti-*Trypanosoma* activity of methanolic plant extracts were evaluated. Extracts of *Haematoxylum brasiletto* showed the best activity with a LD50 of 543 µl/mL. None of the extracts showed high cytotoxicity. *H. brasiletto* is an option as an alternative treatments for Chagas disease.

Introducción

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*, y es potencialmente mortal. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectada, sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina, donde se transmite principalmente por las heces de insectos triatomíneos (WHO, 2016). Actualmente, existen dos medicamentos para tratar la enfermedad, benznidazol y nifurtimox; ambos son eficaces si se administran en la etapa aguda, pero su eficacia disminuye después del inicio de la infección. En la fase aguda de la enfermedad de Chagas se establecen cifras serológicas de curación entre el 75 al 80% con el tratamiento con benznidazol (Cancado, 2002; Rassi, 2000; Ferreira, 1988). En la fase crónica de la enfermedad se habla de cifras de curación mucho más bajas, aunque muy variables, hasta de un 60% en menores de 12 años y entre un 8 y un 25% en adultos (Ferreira, 1990; Fragata., 1995). Debido a la poca eficacia que han mostrado los medicamentos, los esfuerzos para contener la enfermedad se han volcado en productos naturales como extractos de plantas; Cáceres et al. (1998) prepararon extractos a partir de 13 plantas nativas de Guatemala, las *in vitro* sobre epimastigotes y tirpomastigotes de *T. cruzi*. Cinco de las plantas analizadas mostraron actividad en contra de *T. cruzi in vitro* a una concentración de 2 mg/mL. Luize et al. (2005) evaluaron 19 especies de plantas usadas en la medicina tradicional brasileña para el tratamiento de diversas enfermedades, 12 plantas tuvieron efectos significativos contra los parásitos, con porcentajes de inhibición del crecimiento de entre el 49.5 y el 99%; los extractos a su vez no mostraron efecto citotóxico sobre eritrocitos de oveja. Por lo tanto, el siguiente trabajo tiene como objetivo, evaluar el uso de extractos naturales para el tratamiento de la enfermedad.

Metodología

Preparación de los extractos.

Se colectaron ejemplares de *Haematoxylum brasiletto*, *Cymbopogon citratus*, *Marrubium vulgare* y *Schinus molle* en diferentes localidades del estado de Nuevo León. Se lavaron y se procedió a secarlas a una temperatura de 30 °C, una vez secas se molieron hasta polvo fino, se utilizaron diversas porciones de los ejemplares, como la parte aérea, tallos y hojas según corresponda. El material vegetal molido se depositó en un cartucho de celulosa (Cartucho Whatman 33 X 80 mm), para la extracción Soxhlet, donde se depositaron 50 gramos de planta por

cartucho con 250 mL de metanol como solvente de extracción, y se colocaron a reflujo por 40 horas. Posteriormente, se filtró el extracto con papel Whatman N° 1 y se concentró mediante Rotavapor Buchi R-205. Se analizó el rendimiento de cada planta, previo a realizar las pruebas biológicas (g de extracto/ 100 g de planta) (Quintanilla-Licea, 2012).

Evaluación de la actividad tripanocida de los extractos

Se realizó una solución stock de cada extracto metanólico de 15 mg, disueltos en dimetil sulfoxido 1% (DMSO) e incubados por 24 h. Los bioensayos se realizaron por duplicado en una placa de ELISA de 96 pozos con 200 µL de la suspensión del medio con parásitos y extracto a diferentes concentraciones (1 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0.1 mg/mL). La microplaca se incubó por 96 horas a 27 °C. El número de epimastigotes vivos se determinó mediante recuento en cámara de Neubauer. Los resultados se expresarán como la concentración inhibitoria 50 (CI50), que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50% de muerte celular.

Determinación de la actividad citotóxica de los extractos

El ensayo consistió en exponer grupos de larvas a las mismas concentraciones de extracto que se utilizaron contra *T. cruzi* (0.1, 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg/mL) durante 24 h a temperatura ambiente y bajo régimen continuo de luz. Primero, se prepararon placas de 96 pozos, se añadió a cada uno 200 µL de agua de mar suplementada con extracto de levadura y con diluciones del extracto correspondiente. Seguidamente, se transfirieron 10 larvas a cada pozo. Al finalizar las 24 h de exposición, se contó el número de organismos muertos y se realizó una prueba PROBIT. Las larvas se consideraron muertas si no exhibían movimiento durante varios segundos de observación al microscopio estereoscópico. El experimento se consideró válido si el porcentaje de mortalidad en los controles no excedió de 10% (Fernández-Calienes, 2009).

Resultados y discusión

El rendimiento mediante la relación g de planta g de extracto obtenido, siendo *H. brasiletto* el que presentó mayor rendimiento con un 21.32%; y en orden decreciente se encuentran *S. molle* con 17.78%, *M. vulgare* con 16.3% y finalmente *C. citratus* con un 14.8%.

El extracto de *H. brasiletto* presentó una alta actividad tripanosomicida a comparación de los demás extractos y su citotoxicidad no fue elevada (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad tripanosomicida de los extractos metanólicos y actividad citotóxica en modelo *Artemia*.

Especie	Parte	IC50 (mg/mL) 95%C	IC50 <i>Artemia</i>
<i>Haematoxylum brasiletto</i>	Corteza	0.543 (0.446-0.635)	2.412(1.731-4.659)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Parte aérea	1.21(1.05-1.40)	3.148(2.129-6.300)
<i>Marrubium vulgare</i>	Parte aérea	0.647(0.521-0.776)	2.115(1.554-3.974)
<i>Schinus molle</i>	Hojas	0.827(0.712-0.957)	2.279(1.648-4.368)

Los extractos de plantas con antecedentes de uso medicinal han sido un referente constante en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, debido a los efectos adversos del benznidazol y el nifurtimox (Abdel-Sattar et al., 2010; Paveto et al., 2004; Cuhna et al., 2003). Se ha utilizado ampliamente el extracto de *S. molle* contra diferentes organismos; Pizzolatti et al. (2002) lo probaron contra *T. cruzi* obteniendo DL50 de 50 µg/mL, en contraste con los que se obtuvo en este estudio de 7.7 mg/mL de extracto. Abe et al. (2005) hizo una evaluación del extracto de *M. vulgare* contra *T. cruzi*, obtuvo una DL100 entre 125—250 µg/mL contra los 7.5 mg/mL necesarios para obtener un 50% de letalidad en este trabajo; estas discrepancias puede estar dada por las diferentes localidades de donde fue obtenido el material vegetal. El aceite de *C. citratus* fue evaluado por Santoro et al. (2007) contra *T. cruzi*, requirió concentraciones de 126.5 µg/mL para la inhibición media del crecimiento de los epimastigotes; la concentración del extracto metanólico utilizado en nuestros experimentos para obtener una mortalidad media fue de 18.4 mg/mL, notoriamente mayor, inclusive se observó que este extracto era capaz de proliferar el crecimiento del parásito. Los aceites esenciales son obtenidos mediante arrastre de vapores, y el extracto metanólico fue obtenido mediante maceración, es posible que los compuestos activos presentes en el aceite no se obtuvieran por nuestro método. De los extractos analizados fue el del Palo de Brasil el que presentó una actividad marcada; el efecto antibiótico de *H. brasiletto* ha sido probado contra bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; dando mejores resultados contra el último. Abe et al. (2002) realizó pruebas preliminares con 20 familias y 37 especies de plantas con uso medicinal en México y Guatemala, reportando la fijación de epimastigotes de *T. cruzi* a 2 mg/mL y un 90-80% de inmovilización a 1 mg/mL; sin embargo no profundizó en los compuestos presentes en el extracto o en la purificación del compuesto activo. Los extractos no presentaron una toxicidad elevada en el modelo de

Artemia salina, se necesitan dosis muy elevadas, por encima de las que presentaron actividad tripanosomicida para obtener un efecto tóxico en las *Artemias*.

Conclusiones

El extracto metanólico completo de *H. brasiletto* demostró alta actividad tripanosomicida con baja citotoxicidad en modelo de *Artemia*; por lo tanto es recomendable continuar con estudios más detallados sobre los compuestos presentes en este extracto, pues es una opción para buscar tratamientos alternativos contra la enfermedad de Chagas.

Referencias

- Abdel-Sattar E., Maes L., Salama M. (2010). In Vitro Activities of Plant Extracts from Saudi Arabia against Malaria, Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas Disease. *Phytother. Res.* 24: 1322–1328.
- Abe F., Nagafuji S., Yamauchi S., Okabe H., Maki J., Higo H., Akahane H., Aguilar A., Jiménez-Estrada M., Reyes-Chilpa R. (2002). Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol. Pharm. Bull.* 25: 1188—1191
- Cáceres A., López B., González S., Berger I., Tada, I., Maki J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. 6: 195-202
- Cancado J.R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 44: 29-37.
- Cuhna W.R., Martins C., Ferreira DdS., Miller Crotti A.E., Pepporine Lopes N, Albuquerque S. (2003). In vitro Trypanocidal Activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Med.* 69: 470-472
- Fernández-Calienes Valdés A., Mendiola Martínez J., Monzote Fidalgo L., García Parra M., Sariago Ramos I, Acuña Rodríguez D., Scull Lizama R., Gutiérrez Gaitén Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61: 254-258.
- Ferreira H.O. (1990). Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. *Rev Soc Bras Med Trop.* 23: 209-211.



- Ferreira H.O. (1988). Tratamento específico na fase aguda da doença de Chagas. *J. Pediat.* 64: 126-128.
- Fragata F.A.A, Dias S.M.A., Boainain E. (1996). Ethnologic treatment of acute and chronic Chagas' heart Disease. *Sao Paulo Med J.* 113: 867-872.
- Luize P.S., Tiunan T.S., Morello L.G., Maza P.K., Ueda-Nakamura T., Dias-Filho B.P., Garcia-Cortez D.A., Palazzo-de-Mello J.C., Vataru-Nakamura C. (2005). Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* pp. 85-94.
- Paveto C., Güida M.C., Esteva M.I., Martino V., Coussio J. Flawiá M.M., Torres H.N. (2004). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrob. Agentes Chemothe.* 48: 69-74.
- Pizzolatti M.G., Koga A.H. Grisard E.C. Steindel M. (2002). Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine.* 10: 422-426
- Quintanilla-Licea R., Morado-Castillo R., Gomez-Flores R., Laatsch H., Verde-Star M.J., Hernández-Martínez H., Tamez-Guerra P., Tamez-Guerra R., Rodríguez-Padilla C. (2012). Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds from *Gymnosperma glutinosum* leaves. *Molecules* 17: 11229-11241.
- Rassi A., Rassi A. Jr., Rassi G.G. Fase aguda da doença de Chagas. En: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Netto M, editors. (2000). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2a ed. Río de Janeiro: Guanabara Koogan. pp. 161-186
- Santoro GF, Das-Gracas-Cardoso M, Guimaraes LGL, Salgado APSP, Menna-Barreto RFS and Soares MJ. (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res.* pp. 100: 783-790
- WHO. (2016). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Nota descriptiva N°340. Recuperado el día 13 de junio 2016 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>