

## Efecto de los extractos de plantas medicinales en los cultivos de *Trypanosoma cruzi*, causante de la tripanosomiasis americana

Molina-Garza Zinnia Judith, Galaviz-Silva Lucio, Iruegas Buentello Francisco,  
Rodríguez Arzave Juan Antonio

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas,  
Laboratorio de Parasitología.  
Av. Universidad s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México. CP 66455.

molinazinnia@hotmail.com

Fecha de aceptación: 01 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

### RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria tropical, generalmente crónica, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Se extiende desde el Sur de EUA hasta Sudamérica. Durante el desarrollo de la enfermedad se presentan dos etapas: una aguda y una crónica, causando una sintomatología diferente en cada una de estas. Actualmente sólo se conocen dos fármacos con los que se puede tratar a la tripanosomiasis: el nifurtimox y el benznidazol, ambos con una toxicidad alta y sólo son útiles durante la fase aguda. El objetivo fue: determinar la actividad de extractos metanólicos de cinco plantas medicinales usadas en el Noreste de México en los cultivos de *Trypanosoma cruzi*, entre las plantas utilizadas se encuentran *Schinus molle* (Pirul), *Marrubium vulgare* (Marrubio), *Ruta chalepensis* (Ruda), *Persea americana* (Aguacate) y *Lippia graveolens* (Orégano); de las cuales las dos primeras mostraron una actividad inhibitoria importante contra el crecimiento del parásito con una IC<sub>50</sub> de 16.31 µg/ml para *S. molle* y 22.66 µg/ml para *M. vulgare*.

**Palabras clave:** enfermedad de Chagas, *T. cruzi*, plantas medicinales.

### ABSTRACT

Chagas disease is usually a chronic tropical parasitic disease, which is caused by the haemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. It extends from the southern US to South America. During the development of the disease, it presents two stages: acute and chronic, causing different symptoms in each one of them. The unique available medicines are currently nifurtimox and benznidazole, both of them are highly toxic and are useful only during the acute phase. The objective of this work was to determine the activity of methanol extracts of five medicinal plants used in northeastern Mexico on cultures of *Trypanosoma cruzi*; the studied plants were *Schinus molle* (Pirul), *Marrubium vulgare* (Marrubio), *Ruta chalepensis* (Ruda), *Persea americana* (aguacate) and *Lippia graveolens* (Oregano). The first two showed significant inhibitory activity against the growth of protozoans, with an IC<sub>50</sub> of 16.31 µg/ml for *S. molle* and 22.66 µg/ml for *M. vulgare*.

**Key words:** Chagas disease, *T. cruzi*, medicinal plants

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria tropical, generalmente crónica, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Se considera que la enfermedad de Chagas es endémica de América, distribuyéndose desde Argentina hasta México, aunque existen vectores y reservorios incluso en el sur de los Estados Unidos, provocando que en la actualidad se considere una enfermedad mortal, aunque esporádica, con casos identificados en Canadá y EE.UU (Lennox *et al.*, 2007). En la actualidad es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad de 9 a 12 millones de personas infectadas y aproximadamente 21.000 muertes que ocurren cada año (PAHO, 2013). *T. cruzi* se transmite por insectos hematófagos a los seres humanos, reservorios domésticos y silvestres (Mas-Coma y Bargues, 2009). La subfamilia Triatominae contiene un estimado de 140 especies, sin embargo, las especies biológicas no siempre se definen con precisión que todos los estadios son capaces de transmitir *T. cruzi* por su comportamiento hematófago (Schofield *et al.*, 1999; Dujardin y Schofield, 2004).

La enfermedad de Chagas tiene dos fases claramente diferenciadas. Inicialmente, la fase aguda dura unos dos meses después de contraerse la infección, durante esta fase aguda circula por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos. En la mayoría de los casos no se presentan síntomas o éstos son leves, como son fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico (Quiroz, 1990). Durante la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardiaco y digestivo provocando en un 30 % de los pacientes trastornos cardiacos y en un 10 % alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Estas alteraciones causadas por la infección crónica pueden causar muerte súbita o insuficiencia cardiaca por la destrucción progresiva del músculo cardiaco (Quiroz, 1990).

La enfermedad de Chagas puede tratarse con benznidazol o nifurtimox los cuales poseen una actividad importante ante el parásito. Ambos medicamentos son eficaces casi al 100 % para curar la enfermedad si se administran al comienzo de la infección en la etapa aguda, sin embargo su eficacia disminuye a medida que transcurre más tiempo desde el inicio de la infección. Por lo cual nuestro objetivo fue determinar la actividad de extractos metanólicos de 5 plantas medicinales usadas en el estado de Nuevo León, México sobre la cepa Brenner de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

## METODOLOGÍA

Se colectaron 5 plantas de uso medicinal regional: *Lippia graveolens* (Orégano), *Marrubium vulgare* (Marrubio), *Ruta chalepensis* (Ruda), *Persea americana* (aguacate) y *Schinus molle* (Pirul). Se utilizó la parte aérea de las plantas, se preparó su etiqueta y su folio para el herbario, se trasladó a la Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.

Preparación del material vegetal para la extracción: Se procedió a secar las plantas con calor producido por focos de halógeno de 90 watts, tratando de obtener una temperatura a 30°C, se realizó el molido de las partes aéreas de la planta, tallos y hojas, con ayuda de un molino manual. El material vegetal molido fue depositado en un cartucho de celulosa (Cartucho Whatman 33 X 80 mm), el cual fue sellado con un tapón de fibra de vidrio para la extracción en metanol-con Soxhlet, depositando de 50 a 60 gramos de planta por cartucho, el solvente de extracción fue de 600 mL de metanol en 40 horas continuas (Quintanilla-Licea *et al.*, 2012).

Controles: El compuesto de ensayo Nifurtimox (SIGMA) comprimidos (100 mg) de Bayer se pulverizó y se disolvió en solución salina hasta obtener una solución de (2 mg/mL). Medio LIT sin parásitos y/o parásitos en fase logarítmica ( $2 \times 10^6$ /mL) (Muelas-Serrano *et al.*, 2000).

Ensayo *in vitro* de la actividad de las plantas anti-*T. cruzi*: Los extractos fueron suspendidos en DMSO (dimetilsulfóxido) de la siguiente manera: 15 µg de extracto fueron suspendidos en 200 µL de DMSO al 1 % de esta solución. Posteriormente se realizaron concentraciones de 150 µg/mL hasta llegar a la dilución de 4.68 µg/mL.

Ensayo colorimétrico para evaluar extracto de plantas medicinales en la viabilidad de *T. cruzi*: En la microplaca se depositaron 100 µL de parásitos en fase logarítmica ( $1 \times 10^6$ /mL), luego se añadieron 10 µL de extracto de planta o de la droga a analizar, se incubaron a 26°C durante 5 días. Para evaluar la viabilidad de las células, se añadieron 20 µL del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (5mg/mL), se incubaron a 26°C durante 4 horas. Finalmente se añadió isopropanol-HCl para detener la reacción, el formazan fue medido a 570 nm (Muelas-Serrano *et al.*, 2002). El efecto inhibitorio sobre los parásitos fue estimado por el método colorímetro MTT (Muelas-Serrano *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2010). La actividad tripanocida fue expresada como el porcentaje de *T. cruzi* de formas epimastigotas ( $\pm$  SD) que fueron lisadas. Las plantas se clasificaron como altamente citotóxicas, medianamente y levemente citotóxicas para las formas epimastigotas de *T. cruzi* (Pizzolatti *et al.*, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad tripanocida fue evaluada con extractos metanólicos de 5 especies de plantas colectadas en el estado de Nuevo León, las cuales son: *Lippia graveolens* (Orégano), *Marrubium vulgare* (Marrubio), *Ruta chalepensis* (Ruda), *Persea americana* (aguacate) y *Schinus molle* (Pirul). Estas plantas se utilizaron debido al reporte etnobotánico que previamente se ha descrito en la literatura.

Controles: El control positivo Nifurtimox mostró una inhibición de la forma epimastigota de los parásitos de 83% a una concentración de 10 µg/ml. El control negativo fue el medio LIT con DMSO al 1% con parásitos, mostró 100% de viabilidad (Muelas-Serrano *et al.*, 2000).

Los resultados del presente estudio demostraron que la composición química de *S. molle* y *M. vulgare* podrían jugar un papel importante para el control de la enfermedad de Chagas, debido a que presentaron propiedades tripanocidas, confirmando así que el uso de plantas como medicina alternativa para el cuidado de la salud humana, sería una buena alternativa para sustituir los fármacos tradicionales.

Estos extractos metanólicos se pueden considerar útiles en el tratamiento de la tripanosomiasis, debido a que presentaron actividad tripanocida, *S. molle* tuvo un  $CI_{50}$  de 16.31 µg/ml y *M. vulgare* de 22.66 µg/ml, alcanzando altos porcentajes de inhibición cerca del 90% como se demuestran en la tabla 1. Algunos extractos tuvieron una actividad moderada (70%) contra la forma epimastigote de *T. cruzi*, estos fueron *P. americana* y *R. chalepensis*, sin embargo el extracto metanólico de *L. graveolens* no tuvo actividad contra la forma epimastigote (30%).

Estudios previos han demostrado que *S. molle* presentó una actividad inhibitoria moderada en contra de *Giardia lamblia* con valores  $CI_{50}$  de 154.7 µg/ml (Calzada *et al.*, 2006). También los extractos de las hojas y del fruto de *S. molle* se mostraron como repelentes y propiedades como insecticida en contra de ninfas y huevos de *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas (Ferrero *et al.*, 2006).

**Tabla 1.** Actividad tripanocida *in vitro* de extractos metanólicos de las plantas medicinales seleccionadas.

<b>Especie botánica</b>	<b>Parte usada</b>	<b>Crecimiento inhibitorio <math>\pm</math>DS 150 <math>\mu</math>g/ml</b>	<b>CI<sub>50</sub> (<math>\mu</math>g/ml) (95% intervalos de confianza)</b>
<i>Lippia graveolens</i>	H	33.01 $\pm$ 0.31	>150
<i>Marrubium vulgare</i>	PA	98.99 $\pm$ 0.13	22.66 (17.72-27.06)
<i>Persea americana</i>	H	61.32 $\pm$ 0.45	65.51 (26.43-294.50)
<i>Schinus molle</i>	PA	100 $\pm$ 0.0	16.31 (12.98-20.35)
<i>Ruta chalepensis</i>	H	75.85 $\pm$ 0.28	72.30 (52.38-96.81)

H = Hoja; PA= Parte aérea

*P. americana* y *R. chalepensis* mostraron inhibición del crecimiento a una concentración de 67.18 and 70.68  $\mu$ g/ml (CI<sub>50</sub>) respectivamente. En otro estudio similar *P. americana* también mostró una inhibición moderada con *T. cruzi* todos los derivados de 1, 2, 4- trihydroxyheptadecane (CI<sub>50</sub> = 140 $\mu$ g/ml) y 1, 2, 4- trihydroxynonadecane (CI<sub>50</sub> = 127 $\mu$ m/ml) obtenidos a partir de semillas de *P. americana* mostraron la misma actividad contra epimastigotes y tripomastigotes (Abe *et al.*, 2005). El olor de *R. chalepensis* influyó en el ciclo de vida de *Rhodnius prolixus* vector de la enfermedad de Chagas exponiendo a *R. prolixus* al olor de *R. chalepensis* lo que provoco un retraso en la aparición de la muda de un 98.2% (Abramson *et al.*, 2007).

Sin embargo, *L. graveolens* se mostró inactiva contra los epimastigotes de *T. cruzi*. Este extracto ha sido reportado con actividad anti giardial *in vitro* ya que los aceites esenciales de *L. graveolens* desde la primera hora de incubación fueron capaces de matar casi el 50% de la población de parásitos de *G. lamblia* en cambio con los epimastigotes de *T. cruzi* el extracto *L. graveolens* solo tuvo un 33.01% de inhibición lo que muestra que *L. graveolens* es mejor anti giardial que tripanocidal por eso durante el experimento tuvo baja actividad (Machado *et al.*, 2010).

Por lo tanto es importante resaltar el uso de productos naturales para el control de la enfermedad de Chagas, debido a que *T. cruzi* tiene una muy baja sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos en la fase crónica de la enfermedad, como nitronidazol o derivados nitrofuránlicos (benznidazol, nifurtimox) y frecuentemente, estos fármacos tienen efectos secundarios tóxicos en las dosis utilizadas para el tratamiento de la tripanosomiasis.

## CONCLUSIONES

En la búsqueda de nuevos fármacos para tratamientos alternativos a la enfermedad de Chagas, los productos naturales han demostrado poseer importante actividad contra parásitos hemoflagelados. Los investigadores han analizado nuevas alternativas para el tratamiento de la enfermedad y han demostrado efectos tripanocidas de diversos extractos vegetales, más efectivas, menos tóxicas y de menor costo (Rojas *et al.* 2010). Por lo tanto el presente estudio demuestra como conclusión, que los extractos metanólicos de *S. molle* y *M. vulgare*, obtenidos de la parte aérea de la planta, contra las formas epimatigotas de *T cruzi* se pueden recomendar como un buen tratamiento alternativo contra la enfermedad de Chagas, abriendo una perspectiva para realizar estudios posteriores.

## REFERENCIAS

- Abe F., Nagafuji, S., Okawa, M., Kinjo, J., Akahane, H., Ogura, T., Martinez-Alfaro, M. A., Reyes-Chilpa, R. (2005). Trypanocidal constituents in plants. 5. Evaluation of some Mexican plants their trypanocidal activity and active constituents in the seeds of *Persea americana*. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 1314–1317.
- Abramson C. I., Aldana E., Sulbara E. (2007). Exposure to citral, Cinnamon and Ruda Disrupts the Life Cycle of Vector of Chagas Disease. *American. J. Environ. Sci*, 3: 7–8.
- Dujardin J. P., Schofield J. C. (2004). Triatominae: systematics, morphology, and population biology. In: Maudlin, I., Holmes, P.H., Miles, M.A. (Eds.), *The Trypanosomiasis*. CAB International, Wallingford, UK, p. 181–201.
- Ferrero A. A., Werdin-González J. O., Sánchez-Chopa C. (2006). Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 77: 381–383.
- Lennox H. A., Karcz D. A., Tales H., El Masri M. (2007). Chagas Disease: clinical overview and implications for nursing. *Medsurg Nurs*, 16: 229–35.
- Mas-Coma S., Bargues M. D. (2009). Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Trop*, 110: 112–136.
- Machado M., Santoro, G., Sousa M. C., Salgueiro L., Cavaleiro C. (2010). Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. *Flavour Fragr J*, 25: 156–160.
- Muelas-Serrano S., Nogal-Ruiz J., Gómez-Barrio A. (2000). Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res*, 86: 999–1002.
- PAHO (Pan American Health Organization). (2013). Infographic: Chagas in the Americas. Factsheet-chagas-eng-2013.  
[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=19667&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19667&Itemid=)
- Pizzolatti M. G., Koga, A. H., Grisard, E. C., Steindel M. (2002). Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic rain forest plant species. *Phytomedicine*, 9: 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., Cristina Rodríguez-Padilla C. (2012). Bioassay-guided isolation and identification of cytotoxic compounds from *Gymnosperma glutinosum* Leaves. *Molecules*, 17: 11229–11241.
- Quiroz Romero H. (1990). *Parasitología*. Primera edición, 4ª reimpresión. Ed. LIMUSA S.A. De C.V. España. p. 76–80.
- Rojas, J., Solís, H., Palacios, O., 2010. Evaluación in vitro de la actividad anti Trypanosoma cruzi de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *Anal. Facult. Med.*, 71, 161–165
- Schofield C. J., Diotaiuti L., Dujardin J. P. (1999). The process of domestication in Triatominae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94: 375–378.