


EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-TRYPANOSOMAL DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE PLANTAS CON USO MEDICINAL

Karla Carmelita Pérez-Treviño , Zinnia Judith Molina-Garza y Lucio Galaviz-Silva

Laboratorio de Patología Molecular y Experimental, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, Pedro de Alba S/N, Ciudad Universitaria, 66450 San Nicolás de los Garza, NL

 Autor de correspondencia: aestusdrako@hotmail.com

RESUMEN. La Tripanosomiasis americana afecta cerca de 8, 000,000 de personas en el mundo. Actualmente existen dos medicamentos para tratar la enfermedad, benznidazol y nifurtimox, sin embargo ambos presentan efectos secundarios contra el ser humano. Se evaluó la actividad biológica de extractos metanólicos de *Cymbopogon citratus*, *Haematoxylum brasiletto*, *Marrubium vulgare* y *Schinus molle* contra epimastigotes de la cepa neolonesa de *T.cruzi* a diferentes concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1mg/ml). Se colocaron 200 µl de medio y se adicionó el extracto diluido en DMSO al 1 %, se incubó 96Hrs a 27 °C; posteriormente se contaron los parasitos viables mediante cámara de Neubauer. El extracto con mayor efecto tripanocida a menor dosis fue seleccionado para las pruebas fitoquímicas y determinar su DL50. *Haematoxylum brasiletto* presentó la mejor actividad tripanocida, su DL50 fue de 5.88 mg/ml. Las pruebas fitoquímicas mostraron compuestos ricos en insaturaciones, grupos carbonilos y grupos carboxilos; también triterpenos, sesquiterpenlactonas, quinonas, taninos y flavonoides. Diversos compuestos han sido reportados con actividad antiparasitaria, cómo es el caso de las sesquiterpenlactonas y flavonoides, que tuvieron actividad contra *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Giardia* y *Trichomonas*. *H. brasiletto*, es una opción para buscar tratamientos alternativos contra la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: *Haematoxylum brasiletto*, Fitoquímica, Etnobotánica

Evaluation of anti-trypanosomal activity of methanolic extract from plants with medicinal use

ABSTRACT. American trypanosomiasis affects at 8,000,000 people in the world. There are two drugs to treat the disease, benznidazole and nifurtimox, however both present toxicity on human being. Biological activity of methanolic extracts of *Cymbopogon citratus*, *Haematoxylum brasiletto*, *Marrubium vulgare* and *Schinus molle* against an epimastigote *T.cruzi* NuevoLeon strain was evaluated with different doses (0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 1 mg/ml). The epimastigotes were placed on ELISA plates; were added 200 ul of medium and extract diluted in DMSO 1%, it incubated 96hrs at 27 °C; subsequently viable parasites were counted using a Neubauer chamber. The extract with higher tripanomicidal activity at lower doses was selected for phytochemical analysis and LD₅₀ determination. *Haematoxylum brasiletto* present the highest trypanocidal activity, with a LD₅₀ of 5.88mg/ml. Phytochemical tests showed a variety of compounds with unsaturations, carbonyl groups and carboxyl groups; also triterpenes, sesquiterpenlactones, quinones, flavonoids and tannins. A variety of compounds have been reported with antiparasitic activity, as is the case of sesquiterpenlactones and flavonoids, which had activity against *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Giardia* and *Trichomonas*. *H. brasiletto* is an option for seek alternative treatments against Chagas disease

Keywords: *Haematoxylum brasiletto*, Phytochemical, Ethnobotany.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Cerca de siete a ocho millones de personas están infectadas en todo el mundo, principalmente en América Latina (WHO, 2013). Actualmente solo existen dos medicamentos para tratar la enfermedad, benznidazol y nifurtimox, ambos son eficaces para controlarla si se administran en la etapa aguda, pero su eficacia disminuye después del inicio de la infección. Los tratamientos son prolongados y sumamente tóxicos, con reacciones adversas

que se presentan hasta en un 40 % de los pacientes tratados; tales como cólicos, vómito, anorexia, dermatopatías alérgicas, insomnio, linfadenopatías y dolor muscular, depresión de la médula espinal, trombocitopenia y agranulocitosis, polineuropatía, parestesia y polineuritis de nervios periféricos (Noguera-Torres *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2011). Por lo tanto, se hace necesario encontrar nuevas sustancias con actividad tripanocida, con menores efectos adversos así como tratamientos más cortos y eficaces para las diferentes cepas de *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODO

La colecta del material vegetal se realizó dentro del estado de Nuevo León, las plantas se seleccionaron en base a estudios previos que reportan actividad tripanocida (Molina-Garza *et al.*, 2014). Se utilizaron las partes aéreas de *Cymbopogon citratus*, *Haematoxylum brasiletto*, *Marrubium vulgare* y *Schinus molle*.

Obtención de los extractos. El material vegetal fue colectado de Allende y la zona metropolitana de Nuevo León. Se descartaron los ejemplares que tuvieran signos de infección o enfermedad, el resto se lavó y se procedió a secarlo a una temperatura de 30 °C, una vez seco se molió hasta polvo fino, 50 g de cada planta se colocaron en frascos de vidrio con tapón de rosca a los cuales se les agregaron 200 mililitros de metanol absoluto (MeOH) durante 36 horas a temperatura ambiente. Se filtraron y resuspendieron en no más de 50 ml de metanol y fueron almacenados a 4 °C en viales ámbar hasta su uso (Sánchez *et al.*, 2010).

Ensayo *in vitro* de la actividad de la plantas anti-*T. cruzi*. Los bioensayos se realizaron por duplicado en una placa de ELISA de 96 pozos. Se colocaron 200 µL de medio de cultivo con 10⁶ epimastigotes, posteriormente se añadieron los extractos resuspendido en DMSO 1% a las diferentes concentraciones 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/ml. Posteriormente se incubaron a 27 °C por 96 horas. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia mediante el número de epimastigotes vivos se determinado con la ayuda de una cámara de Neubauer.

Pruebas químicas coloridas. La determinación de flavonoides se efectuó mediante la prueba de Shinoda; las cumarinas mediante Hidróxido de sodio 10 %. Se utilizó la prueba de Dragendorff para determinar la presencia de alcaloides; los esteroides y terpenos se identificaron mediante Lieberman-Buchard; La prueba de Balje detectó presencia de sesquiterpenlactonas; Quinonas y Taninos mediante ácido sulfúrico y cloruro férrico 1 %, respectivamente. La determinación de saponinas se realizó mediante la prueba de la espuma (Samara-Ortega *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto de *H. brasiletto* presentó la mejor dosis tripanomicida, al presentar la DL₅₀ menor (Cuadro 1).

Cuadro 1. Dosis de extracto en mg/ml para obtener la mortalidad del 50 y 80 % de los parásitos expuestos.

| Extracto | Nombre común | Familia | DL50 (mg/ml) | DL80 (mg/ml) |
|--------------------------------|----------------|---------------|----------------------|----------------------|
| <i>Haematoxylum brasiletto</i> | Palo de Brasil | Fabaceae | 0.543(0.446- 0.635) | 0.824 (0.727- 0.952) |
| <i>Cymbopogon citratus</i> | Zacate limón | Poaceae | 1.211 (1.051- 1.404) | 1.491 (1.310- 1.742) |
| <i>Marrubium vulgare</i> | Marrubio | Lamiaceae | 0.647 (0.521- 0.776) | 0.927 (0.797- 1.097) |
| <i>Schinus molle</i> | Pirul | Anacardiaceae | 0.827 (0.712- 0.957) | 1.107 (0.975- 1.292) |

De los extractos analizados fue el del Palo de Brasil el que presento 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 (Yasunaka *et al.*, 2005). 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.

Las pruebas fitoquímicas realizadas demostraron compuestos ricos en insaturaciones, grupos carbonilos, grupos carboxilos, triterpenos, sesquiterpenlactonas, quinonas, taninos y flavonoides en el extracto de *H. brasiletto*. La determinación de familias de compuestos se realizó por pruebas químicas coloridas (Cuadro 2). Diversos compuestos han sido reportados con actividad antiparasitaria, cómo es el caso de las sesquiterpenlactonas que presentan actividad *in vitro* contra los parásitos de la malaria y la leishmaniasis (Oketch-Rabah, *et al.*, 1998; Rosella *et al.*, 2007; Sagástegui *et al.*, 2015). Además, otros estudios con extractos con presencia de flavonoides, tuvieron actividad antiparasitaria contra *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Giardia* y *Trichomonas* (Ramírez *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Identificación de familias de compuestos mediante pruebas coloridas.

| Familia de compuestos | Prueba | Resultado |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| Esteroles y terpenos | Lieberman-Burchard | Positivo a triterpenos |
| Cumarinas | Hidróxido de Sodio 10 % | Negativo |
| Alcaloides | Dragendorff | Negativo |
| Sesquiterpenlactonas | Prueba de Balje | Positivo |
| Quinonas | Ácido sulfúrico | Positivo |
| Taninos | Cloruro férrico 1 % | Positivo |
| Saponinas | Espuma | Negativo |
| Flavonoides | Prueba de Shinoa | Positivo |

CONCLUSIÓN

Haematoxylum brasiletto, es una opción para buscar tratamientos alternativos contra la enfermedad de Chagas.

Literatura citada

- Abdel-Sattar, E., Maes, L. and M. M. Salama. 2010. *In vitro* activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytotherapy Research*, 24(9): 1322–1328.
- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, S., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-Estrada, M. and R. Reyes-Chilpa. 2002. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(9): 1188–1191.
- Chagas, C. 1909. Nova tripanozomiasis humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *chizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homen. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159–218.
- Cuhna, W. R., Martins, C., Ferreir, D. dS., Miller-Crotti, A. E., Peporine-Lopes, N. and S. Albuquerque. 2003. In vitro Trypanocidal Activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Medica*, 69: 470–472.
- Molina-Garza, Z. J., Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Quintanilla-Licea, R. and L. Galaviz-Silva. 2014. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used innortheast Mexico. *Acta Tropica*, 136: 14–18.
- Nogueta-Torres, B., Rodríguez-Páez, L., Ramírez, I. B. and C. W. Ramírez. 2001. Trypanocidal activity of 4 isopropyl salicylaldehyde and 4-isopropyl salicylic acid on *Trypanosoma cruzi*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 43(1): 1–6.

- Oketch-Rabah, H. A., Christensen, S. B., Frydenvang, K., Dossaji, S. F., Theander, T. G., Cornett, C., Watkins, W. M., Kharazmi, A. and E. Lemmich. 2001 Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalixolide from *Vernonia brachycalyx*. *Planta Medica*, 64: 559–562.
- Paveto, C., Güida, M. C., Esteva, M. I., Martino, V., Coussio, J., Flawiá, M. M. and H. N. Torres. 2004. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1): 69–74.
- Pizzolatti, M. G., Koga, A. G., Grisard, E. C. and M. Steindel. 2002. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, 9: 422–426.
- Ramírez, M. E., Mendoza, J. A., Arreola, R. H. y C. Ordaz. 2010. Flavonoides con actividad antiprotozoaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(1): 6–21.
- Rosella, M. A., Castillo, A., Romero, L., Spegazzini, E. D., Urena, L., González, J. y S. L. Debenedetti. 2007. Actividad antiparasitaria de *Gaillardia* spp. (Asteraceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(2): 270–274.
- Sagástegui, W., Cruzado, L., Cuellar, A. and C. Silva. 2015. Actividad antiplasmodium “in vitro” e “in vivo” de extractos y fracciones a partir de hojas de *Artemisia absinthium* L.(Asteraceae) que crece en Perú. *Revista Ciencia y Tecnología*, 11(1): 129–139.
- Samara-Ortega, N., Benítez-Campo, N. y F. A. Cabezas-Fajardo. 2011. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1): 8–16.
- Sánchez, E., Heredia, N. and S. García. 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20): 6888–6894.
- Santoro, G. F., Das-Gracas-Cardoso, M., Guimaraes, L. G. L., Salgado, A. P. S. P., Menna-Barreto, R. F. S. and M. J. Soares. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, 100: 783–790.
- Valencia, L., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Echeverri, F., Arango, G. J., Vélez, I. D. y O. Triana. 2011. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica*, 31: 552–559.
- WHO. 2013. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet No. 340. Updated March 2013. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Perez, L., Lopez-Villafranco, E., Estrada-Muñiz, E., Aguilar, A. and R. Reyes-Chilpa. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 293–299.