

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



Universidad de El Salvador

Hacia la libertad por la cultura.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA *IN VITRO* DE LOS
EXTRACTOS ETANOLICO AL 95° Y DICLOROMETANICO DE *Alvaradoa*
amorphoides Liebm. (PLUMAJILLO)

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

LORENA GUADALUPE CARDONA LOPEZ

SANDRA MARLENE RAMIREZ ABREGO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL DE 2015

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

DIRECCION DE PROCESO DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

TRIBUNAL CALIFICADOR

**COORDINADORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES**

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza

COORDINADORA DE AREA: MICROBIOLOGIA

MSc. Amy Elieth Morán

DOCENTE ASESOR

Lic. Salvador Castillo Arévalo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar **A Dios** por brindarnos sabiduría, paciencia, fortaleza y por poner en nuestro camino a las personas indicadas para llevar a cabo uno de nuestros sueños.

A **Nuestros padres** por estar en los momentos difíciles brindándonos ánimos y apoyo incondicional a lo largo de toda nuestra formación académica y enseñarnos que todo lo que se desea con esfuerzo se puede lograr.

A **Nuestro Docente Director**, Lic. Salvador Castillo Arévalo por el tiempo, paciencia, dedicación, conocimientos y sobre todo el apoyo brindado para poder realizar nuestro trabajo.

A **la Directora General y Coordinadoras de Área**, Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza y MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez por ser objetivas en sus evaluaciones y su buena crítica que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), a la Licda. Ana Maricela Villacorta, al Lic. Miguel Ángel Minero, al Lic. Juan Pablo Sánchez Pérez y Dr. Marvin Núñez por su colaboración, disponibilidad y amabilidad durante el desarrollo de la parte experimental de este trabajo de graduación.

Y **nuestros amigos y amigas** que nos mostraron su apoyo incondicional y buenos deseos para la realización y finalización de esta meta.

Lorena y Sandra

DEDICATORIA

En primer lugar **A Dios** por brindarme sabiduría y fuerzas en todo momento para lograr superar los obstáculos que se presentaron a lo largo de este camino y por haberme permitido llegar hasta aquí y culminar uno de mis más grandes sueños.

A Mis Padres, Luis Alonso Abrego y Martha Alicia Ramírez, por todo su apoyo y amor incondicional a lo largo tanto de mi vida como de mi carrera, por ser mi ejemplo a seguir y por enseñarme que todo se puede lograr con esfuerzo, dedicación y determinación.

A mis amigas, Johanna Emilia Torres y Wanda Tatiana Galán, por estar en todo momento apoyándome y brindarme su valiosa amistad a lo largo de la carrera.

A mi compañera y asesor de tesis, Lorena G. Cardona y Lic. Salvador Castillo, por ser una parte fundamental para lograr esta meta y por su apoyo incondicional.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma fueron parte importante para poder culminar esta meta. Infinitas gracias y bendiciones.

Sandra M. Ramírez Abrego

DEDICATORIA

A **Dios**, porque en su infinita misericordia me permite culminar esta etapa tan importante en mi vida, por darme fuerzas y por acompañarme a lo largo de mi vida. Por que se que él nunca se separo de mi lado. Hasta aquí me has ayudado.

A **mis Padres**, Flor A. López de Cardona y Joaquín N. Cardona Reyes, por ser los pilares fundamentales de mi vida, por todo su apoyo, por sus consejos, por su amor, por sus sacrificios, por sus palabras de fortaleza en mis momentos más difíciles, por ser los padres más maravillosos del mundo, lo que he logrado ha sido por ustedes. Los amo.

A **mis hermanas**, Flor A., Sandra C. y Mayra A. Cardona, por ser mis mejores amigas, mis confidentes, por siempre alentarme en los momentos más difíciles, porque siempre han reído y llorado a mi lado. Las amo.

A **mi hermanito**, Joaquín Alexander Cardona †, a quien a pesar de la separación física, amo y recuerdo. Este logro también es por ti.

A **mis sobrinitos**, David, Aldair, Ximena y Alejandra, gracias por los momentos de alegría, sin duda mi vida no fuera igual sin ustedes.

A **mi abuela y primas**, Alejandra López, Sandra, Milton, Ada y Sara, gracias por la ayuda y las palabras de ánimo que siempre me ofrecieron.

A **mis amigos y amigas**, por el apoyo incondicional que me brindaron antes, durante y después de terminar mis estudios, gracias por hacer mis cargas más livianas.

A **mi compañera de tesis y asesor de tesis**, Sandra M. Ramírez y Lic. Salvador Castillo, por haber compartido esta experiencia conmigo, por la paciencia y por siempre animarme a seguir adelante.

Lorena Guadalupe Cardona.

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	N° Pág.
1. Vector y Parasito transmisor de la enfermedad de Chagas.	24
2. Signo temprano de Romaña.	26
3. A. Extrasístole ventricular polifocal. B. Radiografía torácica. Chagas avanzada.	27
4. Musculo Cardíaco con nido de amastigotes. B. Megacolon.	27
5. Tamizaje de Bancos de Sangre. El Salvador. 2007.	31
6. Estructura Celular de la forma tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	38
7. Morfología de <i>T. cruzi</i> .	39
8. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .	42
9. Árbol de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	45
10. Hojas de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	46
11. Inflorescencias de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	46
12. Frutos de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	47
13. Corteza de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	47

FIGURA N°	N° Pág.
14. Distribución Potencial de <i>A. amorphoides</i> Liebm. en Centroamérica.	48
15. Condiciones de crecimiento de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	48
16. Metabolitos encontrados en los extractos de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	50
17. Nueva antraquinona aislada de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	51
18. Muestras de ramas con hojas y corteza de <i>A. amorphoides</i> Liebm. colectadas en el Municipio de San Juan Opico.	64
19. A y B. Fraccionamiento de la corteza. C. Proceso de secado. D y E. Molienda de la corteza, F. Cantidad de corteza en polvo obtenido de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	65
20. Obtención de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico por Método Soxhlet.	66
21. Eliminación de los solventes de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico utilizando rotaevaporador.	67
22. A. Estructura molecular de las Antraquinonas. B. Prueba de Borntrager para la identificación de Antraquinonas.	68

FIGURA N°	N° Pág.
23. Cromatografía en capa fina del extracto etanólico (EE) al 95° y del extracto diclorometánico (ED) de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	69
24. Preparación de las diluciones de trabajo de los extractos diclorometánico y etanólico al 95° de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	71
25. Codificación de las muestras de trabajo.	72
26. Muestras sometidas a la evaluación tripanocida.	74
27. Cultivo in vitro de <i>T. cruzi</i> (Estadio epimastigote) en medio LIT.	74
28. Conteo de células de <i>T. cruzi</i> en Cámara de Neubauer.	75
29. Conteo por duplicado de la muestra 1A sometida a la evaluación tripanocida	79
30. Documento que autentica la especie estudiada como <i>A. amorphoides</i> Liebm.	99

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	N° Pág.
1. Condiciones para realizar Cromatografía en Capa Fina.	56
2. Resultados Rf obtenidos de la Cromatografía en Capa Fina de las manchas reveladas con Hidróxido de Potasio 10%.	69
3. Códigos asignados a las muestras en estudio.	72
4. Resultados de los conteos de Células vivas o con Morfología anormal en Cámara de Neubauer para las seis muestras en estudio por duplicado.	76
5. Porcentaje de Supervivencia y Porcentaje de células muertas de <i>T. cruzi</i> para las seis muestras, junto con sus promedios, Desviación Típica y Coeficiente de Variación.	78
6. Comportamientos anormales de las células de <i>T. cruzi</i> .	79
7. Muestras que presentaron actividad tripanocida en el ensayo	79

ABREVIATURAS

µg =	Microgramo
µg /mL =	Microgramo por mililitro
µL =	Microlitros
L =	Litro
mg/Kg/día =	Miligramo/kilogramo/día
cm =	Centimetro
mm =	Milímetro
LIT =	Medio Infusión de Hígado-Triptosa/ Liver Infusion Tryptosa
SNC =	Sistema Nervioso Central
<i>T. cruzi</i> =	<i>Trypanosoma cruzi</i>
CICES	Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador
CENSALUD	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

INDICE

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xviii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	21
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	23
3.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas	23
3.1.1 Transmisión de la enfermedad de Chagas	23
3.1.2 Espectro Clínico de la enfermedad de Chagas	25
3.1.2.1 Fase Aguda	25
3.1.2.2 Fase Indeterminada (Crónica asintomática)	26
3.1.2.3 Fase Crónica	26
3.1.3 Pruebas diagnósticas	28
3.1.4 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas	29
3.1.5 Tratamiento	32
3.1.5.1 El tratamiento en la fase crónica	35
3.2 Estructura Celular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
3.2.1 Morfología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.2.2 Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
3.2.3 Patogenia	42

	Pág.
3.3 Género <i>Alvaradoa</i>	43
3.3.1 Generalidades	43
3.4 Especie <i>Alvaradoa amorphoides</i>	43
3.4.1 Información Taxonómica	43
3.4.2 Descripción botánica de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm	44
3.4.3 Distribución de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm	47
3.4.4 Usos Etnobotánicos de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm	48
3.4.5 Estudio Fitoquímico de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm	49
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	53
4.1 Tipo de Estudio	53
4.2 Investigación Bibliográfica	53
4.3 Investigación de Campo	54
4.3.1 Trabajo de Campo	54
4.3.2 Identificación taxonómica de la especie vegetal	54
4.4 Parte Experimental	54
4.4.1 Tratamiento de la muestra	54
4.4.2 Obtención de los extractos de la corteza de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	55
4.4.2.1 Extracción de la corteza de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm. con etanol al 95°	55
4.4.2.1 Extracción de la corteza de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm. con diclorometano	55

	Pág.
4.4.3 Identificación de Antraquinonas presentes en los extractos mediante la Prueba de Borntrager y Cromatografía en Capa Fina.	56
4.4.3.1 Prueba de Borntrager	56
4.4.3.2 Cromatografía en capa fina	56
4.4.4 Preparación de las diluciones de los extractos de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	57
4.4.5 Determinación de la posible actividad tripanocida de los extractos de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	59
4.5 Análisis Estadístico	60
4.5.1 Media Aritmética	61
4.5.2 Desviación típica	62
4.5.3 Coeficiente de Variación	62
Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	64
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	84
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	87
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad tripanocida *in vitro* de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de la corteza de la especie vegetal *Alvaradoa amorphoides* Liebm. (Plumajillo) con el fin de aportar una alternativa en la búsqueda de especies vegetales con actividad antiparasitaria que posean un efecto sobre las células de *Trypanosoma cruzi*, debido a que los medicamentos existentes para el tratamiento de la enfermedad de Chagas producen significativos efectos secundarios; por lo cual se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos mediante el descubrimiento de moléculas bioactivas, que pueden ser aisladas de fuentes naturales, principalmente de especies vegetales, como es el caso de las especies del género *Alvaradoa* que poseen compuestos activos con propiedades antiparasitarias que han sido comprobadas en investigaciones anteriores y cuyos resultados incentivaron a realizar el estudio de la especie *Alvaradoa Amorphoides* Liebm.

La realización de esta investigación se inició con la recolección de la corteza de *Alvaradoa Amorphoides* Liebm. que posteriormente fue identificada por un botánico experto. Seguidamente la corteza se secó en estufa a una temperatura entre 40 ° C y 60 °C para luego ser molida.

Luego se realizaron dos extractos, uno con etanol al 95° y otro con diclorometano, por el método Soxhlet hasta agotar la muestra. Seguidamente se eliminó el solvente para obtener así los extractos secos. A partir de estos extractos se procedió a la identificación de antraquinonas mediante cromatografía en capa fina usando Hidróxido de potasio al 10% como revelador y mediante la prueba de Borntrager. Posteriormente se realizaron tres diluciones de cada extracto para obtener un total de seis muestras, tres para el

extracto etanólico al 95° y tres para el extracto diclorometánico, a concentraciones de 50, 100 y 125 µg/mL.

Las seis muestras fueron evaluadas mediante el Método en Cámara de Neubauer utilizando como medio de cultivo el medio LIT y cepas de *Trypanosoma cruzi* en estadio epimastigote.

De acuerdo a los resultados obtenidos se confirmó la actividad antiparasitaria de ambos extractos, de los cuales el extracto diclorometánico de *Alvaradoa Amorphoides* Liebm a una concentración de 100 µg/mL, fue quien presentó mayor actividad antiparasitaria sobre las células de *Trypanosoma cruzi*.

Por lo que se recomienda continuar el estudio para realizar futuras investigaciones de otras actividades biológicas que pudiesen presentar los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de la corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La utilización de plantas medicinales en El Salvador, y el hecho que en gran cantidad de especies vegetales se encuentran principios activos empleados en el tratamiento de diversas enfermedades, ha incrementado el interés por su estudio. La Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de los más de 4.000 millones de habitantes de la tierra confían en las medicinas tradicionales para suplir sus principales necesidades de salud.

Y dado el hecho de que la enfermedad de Chagas se considera una enfermedad extremadamente olvidada, ha sido una de las razones que ha originado la falta de interés en el desarrollo de nuevos medicamentos eficaces para su tratamiento, lo que explica que se sigan utilizándose fármacos que fueron comercializados en los años 70, como es el caso de Nifurtimox y el Benznidazol, que no solo no están aprobados por la FDA (Federal Drug Administration) sino que también producen significativos efectos secundarios que hacen que el tratamiento se vuelva más tedioso para el paciente que presenta la enfermedad.

Por tanto en aras de buscar alternativas de aprovechamiento y conocer la presencia de principios activos presentes en la corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. procedente del municipio de San Juan Opico, en el departamento de La Libertad, se evaluó la actividad tripanocida *in vitro* de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de la especie anteriormente mencionada en cultivos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, ya que estudios anteriores⁽¹⁹⁾ sugieren que los metabolitos activos presentes en las

especies de *Alvaradoa*, antraquinonas y cumarinas constituyen una fuente de compuestos bioactivos con potencial antiparasitario.

La parte experimental del presente trabajo, se dividió en cuatro etapas:

- Obtención de los extractos por el método Soxhlet
- Identificación de las antraquinonas por medio de Cromatografía en Capa Fina y Prueba de Borntrager.
- Preparación de diluciones de trabajo a concentraciones de 150 µg/mL, 100 µg/mL y 50 µg/mL para ambos extractos.
- Evaluación de la actividad tripanocida por medio de Recuento en Cámara de Neubauer.

El proceso experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Productos en el periodo de Junio a Agosto del año 2014, posteriormente la evaluación tripanocida se realizó durante el mes de noviembre, en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES) .

Por tanto, la importancia de este tipo de investigación radica en la aportación de conocimiento científico y a la vez permite promover el uso de plantas medicinales de una manera eficaz en beneficio de la salud salvadoreña.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad tripanocida *in vitro* de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de la especie vegetal *Alvaradoa amorphoides* Liebm. (Plumajillo)

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Identificar la especie vegetal por un botánico experto del Jardín Botánico La Laguna.

2.2.2 Aplicar el método de extracción Soxhlet para la obtención de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de la corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. y determinar por métodos fitoquímicos la presencia de antraquinonas en los extractos obtenidos.

2.2.3 Demostrar el posible efecto tripanocida en cultivos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* utilizando el método de conteo en cámara de recuento de NeuBauer.

2.2.4 Analizar mediante porcentaje de células muertas la actividad tripanocida de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis americana, descubierta por Carlos Chagas en Brasil en 1909, es una afección parasitaria, sistémica, crónica, transmitida por vectores y causada por el protozoo *T. cruzi*, con una firme vinculación con aspectos socio-económico-culturales deficitarios, considerándosele una enfermedad desatendida. Es una patología endémica en 21 países de las Américas, aunque las migraciones de personas infectadas pueden llevarle a países no endémicos de América y el mundo. ⁽¹³⁾

El principal mecanismo de transmisión es vectorial, por hemípteros (chinchas), de la subfamilia *Triatominae* (con alimentación hematófaga). Infectan personas expuestas a su picadura, al depositar sus heces infectadas en heridas de la piel o sobre mucosas. Otras modalidades de transmisión son transfusional, congénita, trasplantes de órganos u oral.

Según ECOSALUD, se estima que en la Región, cerca de 100 millones de personas están en riesgo de infectarse, estimando 56.000 nuevos casos anuales por todas las formas de transmisión, motivando 12.000 muertes anuales. ⁽¹³⁾

3.1.1 Transmisión de la enfermedad de Chagas

1. Los triatóminos que se encuentran en grietas y ranuras de viviendas se alimentan de sangre, habitualmente por la noche. Durante la picadura defecan en la piel del hospedero. En las heces del insecto se encuentran los

tripomastigotes metacíclicos, que penetran por rascado o frotamiento del mismo hospedero, ya sea en el sitio de la picadura o en lesiones de continuidad. (41)

2. Por transfusión sanguínea y transplante de órganos. Chagas urbano.

3. De forma congénita. (Vertical o connatal). Se estima que en Latinoamérica existen unos 2 millones de mujeres en edad fértil, susceptibles de transmitir el parásito al feto. También se ha indicado que se infectan al menos 15,000 neonatos cada año en Latinoamérica y 2,000 en Norteamérica. La transmisión se ha acentuado en Europa por la migración de personas infectadas provenientes de países endémicos. (41)

4. Accidentes de laboratorio.

5. Vía oral, a través de ingesta de los triatóminos; ingesta de alimentos contaminados con heces de los artrópodos. (41)

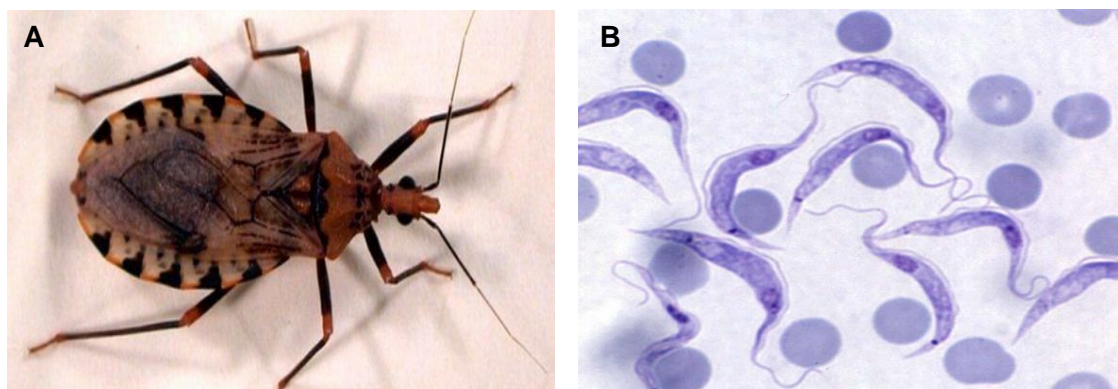


Figura N° 1. A. *T. dimidiata*. B. *T. cruzi*. Vector y parasito transmisor de la enfermedad de Chagas. ((Fuente: Uribarren Berrueta T. Enfermedad de Chagas. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México. 2013.)

Cabe considerar la abundancia de reservorios silvestres, domésticos y peridomésticos. Entre los reservorios identificados se encuentran armadillos, ratones, ratas, ardillas, murciélagos frutícolas, perros, gatos, burros, cerdos.

Un número importante de mamíferos domésticos están en contacto directo con los vectores y permanecen en la habitación humana. (41)

3.1.2 Espectro clínico de la enfermedad de Chagas

3.1.2.1 Fase Aguda

Asintomática en aproximadamente el 70% de los infectados. Más frecuente en niños. La incubación es de unos 14 días y la duración del cuadro oscila entre 6 - 8 semanas. Se caracteriza por alta parasitemia e invasión tisular multiparenquimatosas. Durante los primeros 15 días puede presentarse el llamado "chagoma de inoculación", un nódulo subcutáneo con adenitis regional en el sitio de la picadura; en casos de inoculación ocular, es posible identificar el "signo de Romana", edema bpalpebral unilateral, con adenitis retroauricular, característico de la enfermedad, aunque poco frecuente. (41) (32)

Esta fase se puede manifestar con fiebre, linfadenopatías, hepatoesplenomegalia y mal estado general.

Complicaciones: Miocarditis aguda o meningoencefalitis, principalmente en niños, ancianos y sujetos inmunocomprometidos (en éstos, por reactivación o infección aguda). El 5% de los niños fallece durante esta etapa. (41), (32)



Figura N° 2. Signo temprano de Romaña. (Fuente: Uribarren Berrueta T. Enfermedad de Chagas. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México. 2013.)

3.1.2.2 Fase Indeterminada (Crónica asintomática)

Una gran proporción de pacientes entra en una fase asintomática, de duración variable (años), sin parasitemias detectables. Se han reportado anomalías anatómicas y funcionales, y muerte súbita. Se han implementado técnicas diagnósticas serológicas y de gabinete. Estas personas implican un riesgo alto en la transmisión transfusional en bancos de sangre y en la connatal de la madre al producto. (41)

3.1.2.3 Fase Crónica

Alrededor del 30% de los pacientes en fase indeterminada desarrollan la forma crónica de la enfermedad, que se caracteriza fundamentalmente por compromiso visceral irreversible.

El compromiso cardíaco es el más importante y frecuente de la enfermedad en la etapa crónica (miocardiopatía chagásica). (41)

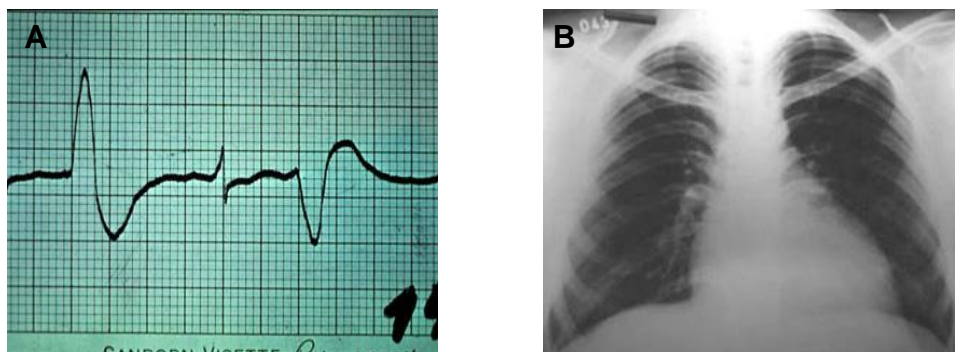


Figura N° 3. A. Extrasístole ventricular polifocal. **B.** Radiografía torácica. Chagas avanzada. (Fuente: Uribarren Berrueta T. Enfermedad de Chagas. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México. 2013.)

Además en la etapa crónica se pueden presentar también los megasíndromes a nivel de tubo digestivo que son manifestaciones tardías debidas a la dilatación del esófago o colon. (41)

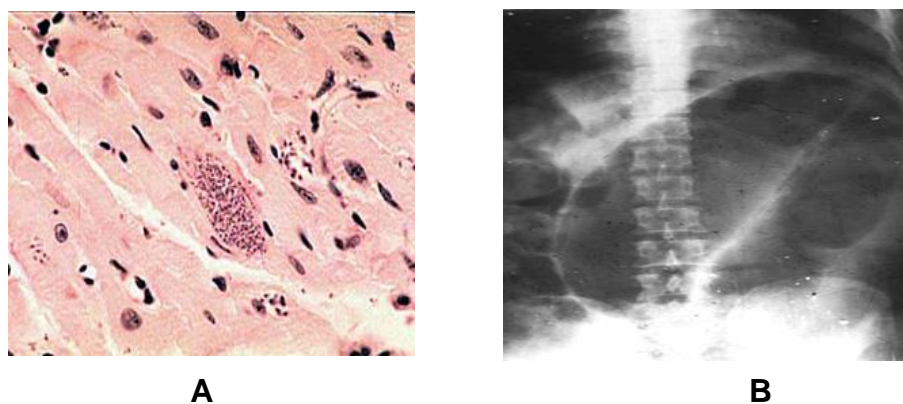


Figura N° 4. A. Músculo cardíaco con nido de amastigotes. **B.** Megacolon. (Fuente: Uribarren Berrueta T. Enfermedad de Chagas. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México. 2013.)

El diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas se basa en la evaluación clínica, epidemiología y pruebas de laboratorio. Para el diagnóstico de laboratorio, los exámenes adecuados dependen de la etapa clínica del paciente.

(41)

En la etapa aguda los estudios se centran en la búsqueda y reconocimiento de *T. cruzi* en sangre (Metodología: parasitológica directa), porque en las etapas iniciales de la enfermedad se encuentran parasitemias importantes y a medida que transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse mínimas y aleatorias.

En las etapas crónicas (inaparente o indeterminada y sintomática) las parasitemias son transitorias y por ello el diagnóstico se realiza fundamentalmente mediante el hallazgo de anticuerpos circulantes contra el *T. cruzi*. (41)

3.1.3 Pruebas diagnósticas (31)

3.1.3.1 Examinación al microscopio

Esta se realiza buscando la motilidad del parásito en la sangre no-coagulada del paciente, lo que es posible solo en la fase aguda cerca de 2 semanas después de la picadura, permite detectar más de 60% de los casos en esta fase. El parásito puede ser también visualizado microscópicamente en un frotis sanguíneo bajo la tinción de Giemsa.

3.1.3.2 Xenodiagnóstico

En el diagnóstico basado en la detección indirecta del organismo donde el paciente es intencionalmente picado por el insecto transmisor no contaminado y, cuatro semanas después, su intestino es examinado en la búsqueda de

parásitos; o por la inoculación de la sangre del enfermo en animales de laboratorio (ratones, por ejemplo) y verificación se desarrollan la enfermedad aguda. Existen también medios de cultivo especializados (NNN y LIT, por ejemplo) para el crecimiento y multiplicación de posibles parásitos que estén en sangre.

3.1.3.3 Detección del ADN del parásito por PCR.

3.1.3.4 Varias pruebas inmunológicas.

3.1.3.5 Detección de anticuerpos específicos contra el parásito en la sangre.

3.1.3.6 Fijación del complemento

3.1.3.7 Hemaglutinación indirecta

3.1.3.8 ELISA

3.1.3.9 Aglutinación directa

3.1.3.10 Aglutinación de partículas

3.1.4 Epidemiología de la enfermedad de Chagas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la enfermedad de Chagas afecta entre 16 y 18 millones de personas, con unos 100 millones (25% de la población de Latinoamérica) de personas que estarían en riesgo de contraer la enfermedad, matando anualmente a cerca de 50 mil personas. ⁽³²⁾

Dado que la enfermedad de Chagas o Trypanosomiasis americana es un importante problema de salud pública que aflige a amplios sectores de

población constituye una infección crónica de difícil diagnóstico, manejo y tratamiento, que plantea una importante carga de morbilidad, mortalidad y discapacidad, para los países y la región.

Esta enfermedad asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda y está considerada como la enfermedad parasitaria con mayor carga económica en América Latina debido a su prolongada cronicidad. En general, los programas de control han centrado sus presupuestos y sus estrategias hacia la eliminación de los insectos vectores más asociados al hábitat humano, y el paciente infectado ha sido relegado a un segundo plano. (32)

En El Salvador, desde 1914, cuando se identificó por primera vez el primer caso de Chagas según datos la infección se ha mantenido sub-diagnosticada por la falta de estudio y conocimientos de la enfermedad por el personal sanitario sin embargo, existen estudios epidemiológicos amplios que indican la extensión de los vectores *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* hasta 1976, la persistencia de *Triatoma dimidiata* en los últimos años y de la misma población hasta unas pocas décadas han habido avances en la identificación de la población seropositiva por los avances en materia de laboratorio y tamizajes de los hemoderivados. En la encuesta entomológica más reciente fue realizada entre el 1999 al 2000 por la Universidad de El Salvador con cooperación de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Los índices de dispersión e infestación fueron respectivamente de 64.8%, 105 localidades infestadas por *Triatoma dimidiata*, de un total de 162 estudiadas y de 20,9%, 480 casas infestadas entre 2,299 pesquisadas. El mismo estudio reportó ausencia de ranchos de paja, elevado porcentaje de propietarios de la vivienda (80%) y uso irregular de insecticidas de uso doméstico (Baygón: propoxur mas ciflutrin) y de la agricultura (folidol líquido) en 30,0 a 67,0% de las casas, sin efecto evidente.

En El Salvador, en un estudio realizado en el año 2005, se encontraron los siguientes resultados: se encontraban infectadas aproximadamente 232,000 habitantes, y casos nuevos reportados por transmisión vectorial es 2,500, y la tasa de prevalencia anual es de 3,372, y la prevalencia de donantes en los bancos de sangre es de 2.42 por cada 100, 000 habitantes.

Estos datos indican que el índice de la enfermedad de Chagas en El Salvador es el más alto en Centro América y sobrepasa a la de VIH, hepatitis B y C y sífilis. Alrededor de 100 casos agudos de la enfermedad de Chagas se detectaron anualmente entre 2009 y 2010. (32)

Año	2004		2005		2006		2007	
	Total:	%	Total:	%	Total:	%	Total:	%
Hepatitis B	184	0,24	196	0,25	226	0,28	197	0,24
Hepatitis C	171	0,22	200	0,25	154	0,19	260	0,32
<i>T. cruzi</i>	2576	3,3	2228	2,87	1942	2,4	1746	2,09
VIH	159	0,2	113	0,14	73	0,09	83	0,09
Sífilis	548,00	0,72	686	0,86	784	1,02	668	0,83

Figura N° 5. Tamizaje de bancos de sangre. El Salvador 2007. (Fuente: Peñate de Cornejo A. R., Tobar Gómez K. G. La enfermedad de Chagas como problema de salud pública a través del tamizaje de los casos positivos de infección por *Trypanosoma cruzi* en los donantes de los cinco bancos de sangre de la zona metropolitana de San Salvador. Enero a diciembre 2010. San Salvador, El Salvador. 2011.)

3.1.5 Tratamiento

El benznidazol y nifurtimox son los únicos fármacos de eficacia probada contra la enfermedad de Chagas. Debido a que el benznidazol es mejor tolerado, esta droga es considerada por muchos expertos como el tratamiento de primera línea. Sin embargo, la tolerancia individual varía. Si un fármaco debe interrumpirse, el otro se puede utilizar como una alternativa. (8)

Ambos fármacos no están aprobados en los Estados Unidos; pero ambos se pueden obtener a partir del CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades) y deben ser utilizados bajo protocolos de investigación. (6)

Benznidazol (Inicialmente comercializado como Radanil, Rochagan, Roche 7-1051), introducido en 1971, es un derivado nitroimidazol activo tanto contra las formas tripomastigote y amastigote. Suele ser mejor tolerado por los pacientes. (32)

Benznidazol está indicado como línea terapéutica alterna al Nifurtimox (cuando se presenten reacciones farmacológicas adversas) en el tratamiento de Trypanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Espectro: *T. cruzi*. (3)

Dosis

- Adultos: tratamiento de Chagas agudo: VO 5mg/Kg de peso corporal al día dividido en 2 dosis durante 30 días.
- Tratamiento de casos de Chagas agudo complicado: VO 25mg/Kg de peso corporal al día dividido en 3 dosis durante 60 días.

- Tratamiento de casos de Chagas congénito: VO entre 0,8-25mg/Kg de peso corporal al día dividido en 3 dosis durante 60 días.
- Niños de 1 a 15 años de edad: VO 10mg/Kg de peso corporal al día dividido en 2 dosis durante 30 días.
- Menores de 1 año: 10mg/Kg al día dividido en 2 dosis durante 30 días
- Tratamiento de casos de Chagas agudo complicado: VO 10mg/kg de peso corporal al día dividido en 2 dosis durante 30 días.
- Tratamiento de casos de Chagas congénito: VO entre 5-10mg/kg de peso corporal al día dividido en 2 dosis durante 30 días. (3)

Farmacocinética

Se absorbe aproximadamente el 92% de la dosis oral. Se une en un 44% a proteínas totales. El nivel de concentración máxima ocurre aproximadamente a las 3 a 4 horas. Su $t_{1/2}$ es aproximadamente 10 a 14 horas.

Precauciones

- Embarazo: no se ha establecido su seguridad; sin embargo está contraindicado en gestantes.
- Lactancia: no se conoce si se excreta en la leche materna.
- Pediatría: no se han descrito problemas hasta la fecha; sin embargo se ha reportado menor toxicidad en niños que en adultos.
- Geriátrica: no se han descrito problemas hasta la fecha.
- Insuficiencia renal y hepática: no se han descrito problemas. (3)

Reacciones adversas

Frecuentes: Rash alérgica, dermatitis alérgica, polineuropatía periférica (dosis dependiente), disturbios gastrointestinales, disturbios psíquicos. (3) (42)

Nifurtimox (Lampit, Bayer 2502), introducido en 1965, es un compuesto de los nitrofuranos, también con actividad contra tripomastigotes y amastigotes. Suele tener mayores reacciones adversas sobre los pacientes. (31)

Nifurtimox está indicado como primera línea terapéutica en el tratamiento de Trypanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. Espectro: *T. cruzi*.(27)

Dosis

- Adultos: tratamiento de Chagas agudo: VO 10mg/Kg/día dividido en 3 dosis por 60 días.
- Tratamiento de casos de Chagas agudo complicado: VO 25mg/Kg/día dividido en 3 dosis durante 60 días.
- Niños: de 1 a 15 años de edad: VO 15mg/Kg/días dividido en 3 dosis durante 60 días.
- Menores de 1 año: 20mg/Kg./días dividido en 3 dosis durante 60 días.
- Tratamiento de casos de Chagas congénito: VO entre 8-25mg/Kg. de peso corporal al día dividido en 3 dosis durante 60 días. (27)

Farmacocinética

Absorción en el Tracto gastrointestinal es baja. El nivel de concentración máxima ocurre aproximadamente a las 2 horas. Presenta metabolismo hepático. Solo pequeñas cantidades han sido encontradas sin cambios en la orina. El $t_{1/2}$ es aproximadamente 3 horas.

Precauciones

- Embarazo: No se ha establecido su seguridad; sin embargo está contraindicado en gestantes.
- Lactancia: No se conoce si se excreta en la leche materna.
- Pediatría: Puede producir aberraciones cromosómicas.
- Geriatría: No se han descrito problemas hasta la fecha.

- Insuficiencia renal: Se sugiere reducción de la dosis.
- Insuficiencia hepática: Debido a su metabolismo hepático se sugiere ajuste de dosis.
- Deficiencia de G6PD: puede ocurrir anemia hemolítica.
- Desórdenes neurológicos: historial convulsivo.
- Enfermedad pulmonar. (27)

Reacciones adversas

Se observan en un 40 a 70% de los pacientes tratados, son más frecuentes al aumentar la edad.

- Frecuentes: Intolerancia gastrointestinal (vómitos), anorexia, pérdida de memoria, debilidad, parestesias, polineuritis.
- Raras: Toxicidad del SNC (que puede obligar a suspender el tratamiento) incluyendo confusión, ataxia, nistagmo, excitación, insomnio, irritabilidad, psicosis, convulsión, fiebre, infiltración pulmonar, rash cutáneo, neuropatía periférica, eosinofilia, leucopenia, impotencia. (27) (42)

El benznidazol y nifurtimox son a la vez mutagénicos y se ha informado que aumentan el riesgo de linfomas en animales de experimentación.

3.1.5.1 El tratamiento en la fase crónica

En la década de 1990, 2 ensayos aleatorios, doble ciego, controlados con placebo de benznidazol para niños de 6 años a 12 años con infección por *T. cruzi* asintomáticos demostró aproximadamente el 60 % de eficacia, los niños tratados también mostraron una marcada reducción en xenodiagnósticos positivos en comparación con el grupo placebo. El benznidazol fue bien tolerado en estos ensayos pediátricos. Junto con la creciente experiencia clínica en toda

América Latina, estos estudios llevaron a las recomendaciones para el diagnóstico precoz y la terapia antitripanosómica para todos los niños infectados. ⁽⁶⁾⁽⁸⁾

En una reciente publicación de un ensayo no ciego y no aleatorizado, el tratamiento con benznidazol pareció retrasar el desarrollo y progresión de la miocardiopatía chagásica en adultos. Sobre la base de estos y otros datos, una serie de expertos en la actualidad recomienda el tratamiento de adultos con infección por *T. cruzi* crónica en ausencia de miocardiopatía chagásica avanzada. Un ensayo multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo de benznidazol para los pacientes con insuficiencia renal leve a moderada miocardiopatía chagásica está actualmente en curso. Los datos de este estudio deberían ayudar a aclarar las decisiones de tratamiento para este grupo de pacientes. ⁽⁸⁾

3.2 Estructura celular de *T. cruzi*

T. cruzi es un organismo unicelular eucariota, por lo tanto, posee un núcleo asociado a la membrana nuclear, membrana plasmática, aparato de Golgi y retículo endoplasmático. Sin embargo, al igual que otros miembros del orden kinetoplástida, *T. cruzi* posee una serie de estructuras celulares particulares (Figura 5). *T. cruzi* posee una única mitocondria, cuyo ADN se encuentra en el interior de una estructura suborganular muy característica denominada kinetoplasto. El ADN del kinetoplasto está formado por una red interconectada de cientos de moléculas circulares de ADN, los minicírculos y los maxicírculos. ⁽⁴⁰⁾

En *T. cruzi*, como en la mayoría de tripanosomátidos, la glucólisis ocurre fundamentalmente en orgánulos especializados en forma de vesículas que

contienen enzimas glucolíticas y rodeadas de membrana denominados glicosomas. Además, posee orgánulos especializados en el almacenamiento, como los acidocalcisomas, donde almacena cationes, y el reservosoma, en el que almacena macromoléculas que toma del medio y que serán empleadas en el proceso de diferenciación de la forma epimastigote a la forma tripomastigote. *T. cruzi* presenta un citoesqueleto peculiar, ya que éste debe ser capaz de dirigir enormes cambios morfológicos y el crecimiento y movilidad del flagelo. El citoesqueleto está formado principalmente por microtúbulos que se encuentran distribuidos por toda la célula inmediatamente después de la membrana plasmática, por ello, se denominan subpelículas. (40)

Están formados por la proteína tubulina, y se encuentran interconectados entre sí y con la membrana plasmática, lo cual, confiere al parásito una gran resistencia mecánica, a cambios de temperatura e incluso a fármacos. *T. cruzi* se caracteriza por poseer un único flagelo muy característico que varía de longitud, desde 20 μm hasta menos de 2 μm , en las diferentes etapas del ciclo vital del parásito.

El flagelo está rodeado por una membrana especial que es rica en esteroides y esfingolípidos y se sujeta por un cuerpo basal y probasal que se encuentra en el interior de la célula. En la zona en la que el flagelo penetra a la célula se forma una invaginación entre la membrana plasmática pelicular y la membrana flagelar que se conoce como bolsillo flagelar. Esta zona es rica en receptores y se piensa que es muy importante en el tráfico vesicular y la captación de nutrientes. (40)

Cerca de este bolsillo flagelar aparece otra pequeña invaginación denominada citostoma, común en otros grupos de protozoos, y que está implicada en la captación de nutrientes.

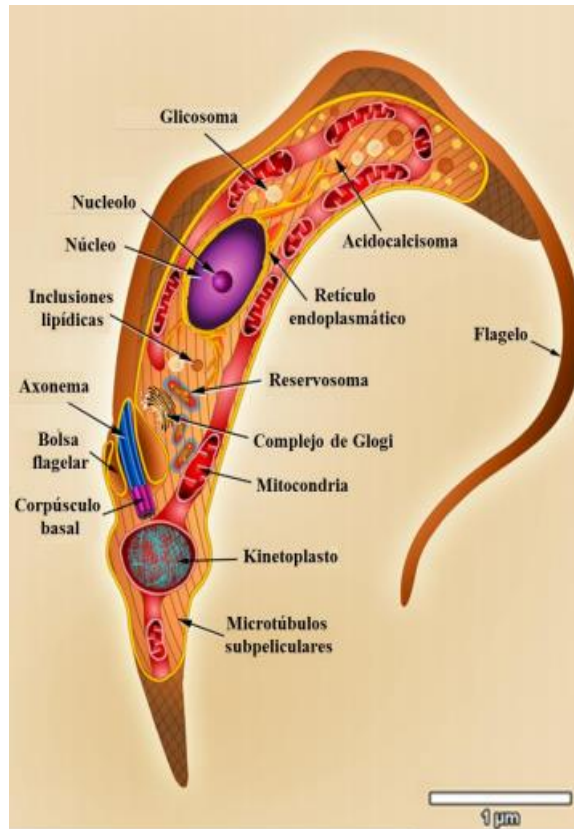


Figura N° 6. Estructura celular de la forma tripomastigote de *T. cruzi*. (Fuente: Torres Pastor E. Diseño, Síntesis y Evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4-di-N oxido de quinoxalina como potenciales agentes antichagásicos. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 2013.)

3.2.1 Morfología de *T. cruzi*

Las poblaciones de *T. cruzi* circulan en la naturaleza entre el insecto vector y los reservorios mamíferos, incluido el hombre. A lo largo de su ciclo vital sufren alteraciones morfológicas y bioquímicas para adaptarse al medio en el que se encuentran. Las diferentes morfologías que adquiere *T. cruzi* se clasifican en

función de su aspecto general, de la manera en que el flagelo emerge del cuerpo celular y de la posición relativa de dos importantes estructuras celulares: el núcleo y el kinetoplasto. Así, como se muestra en la Figura N° 7, *T. cruzi* adquiere 3 morfologías diferentes principales durante su ciclo de vida. (40)

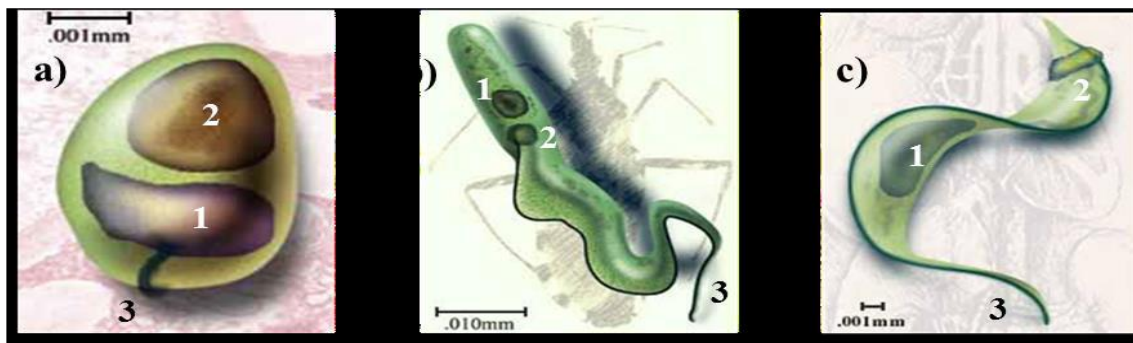


Figura N° 7. Morfologías de *T. cruzi*, a) Forma amastigote; b) Forma epimastigote; c) Forma tripomastigote. 1: kinetoplasto; 2: Núcleo; 3: Flagelo. (Fuente: Torres Pastor E. Diseño, Síntesis y Evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4-di-N oxido de quinoxalina como potenciales agentes antichagásicos. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 2013.)

- **Amastigote:** Se trata de una forma esférica u ovalada de unas 2 μm de diámetro. Posee un núcleo voluminoso y un kinetoplasto del que nace un flagelo corto que no sale al exterior. Es la forma reproductiva en el interior de las células mamíferas.
- **Epimastigote:** En esta fase *T. cruzi* adquiere una morfología fusiforme y una longitud de unas 20 μm . El núcleo es grande y el kinetoplasto se sitúa delante o al nivel del núcleo. A partir de él nace una membrana ondulante corta que acaba en un flagelo libre. Presenta una elevada movilidad. Es la forma reproductiva en el tracto digestivo de los vectores invertebrados y en medios de cultivo. (40)

- **Tripomastigote:** Presenta una morfología fusiforme y mide aproximadamente 20 μm de longitud. Presenta un gran núcleo central vesiculado y un kinetoplasto subterminal posterior al núcleo. Del kinetoplasto surge una membrana ondulante que recorre todo el cuerpo del parásito y emerge como un flagelo libre en la parte anterior del cuerpo.

En función del tejido que colonizan se distingue entre:

A. Tripomastigote sanguíneo: Es la forma que aparece en la sangre de los vertebrados infectados. Es capaz de infectar células y no puede replicarse.

B. Tripomastigote metacíclico: Es la forma que aparece en la luz intestinal y posteriormente en las heces del insecto vector y es la que se transmite al hospedador vertebrado. (40)

3.2.2 Ciclo biológico de *T. cruzi*

En general, la infección se propaga a los seres humanos cuando un insecto infectado deposita heces en la piel mientras que la persona está durmiendo en la noche. La persona a menudo se frota las picaduras, introduciendo accidentalmente las heces en la herida, un corte abierto, los ojos o la boca. Los animales pueden infectarse de la misma forma y también contraen la enfermedad comiendo un insecto infectado. (32)

El ciclo biológico se completa al infectar la sangre y otros tejidos de los reservorios y en el tubo digestivo de los vectores, en estos últimos sufre distintas transformaciones.

En el humano, el parásito transmitido al hospedador vertebrado en las heces del insecto es llamado en esta etapa *tripomastigote metacíclico*. En la sangre, el

parásito se observa como un *tripomastigote fusiforme*, en forma de "C" o de "S" de 20 μm de largo por 1 μm de anchura. Durante esta etapa, el *tripomastigote* no se multiplica en la sangre del hospedero. (32)

Cuando el parásito infecta las fibras del músculo cardiaco estriado o a los fagocitos, se acorta el flagelo y se transforma en un *amastigote redondo* de 2 a 5 μm de diámetro y con un flagelo externo muy corto o inexistente, este se multiplica por medio de fisión binaria formando "racimos" o "nidos" que se acumulan en la célula huésped hasta que esta se rompe.

Los parásitos liberados de la célula se convierten en *promastigotes* y *tripomastigotes*, estos son liberados a la sangre circulante, son de un tamaño total que varía entre 15 y 20 μm tienen flagelo libre, un cinetoplasto voluminoso, terminal o subterminal que contiene el 30% del ADN del parásito, y un núcleo oval. Estos *tripomastigotes* pueden infectar otras células, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma *amastigote* intracelular e invaden otras células, para repetir el ciclo.

(32)

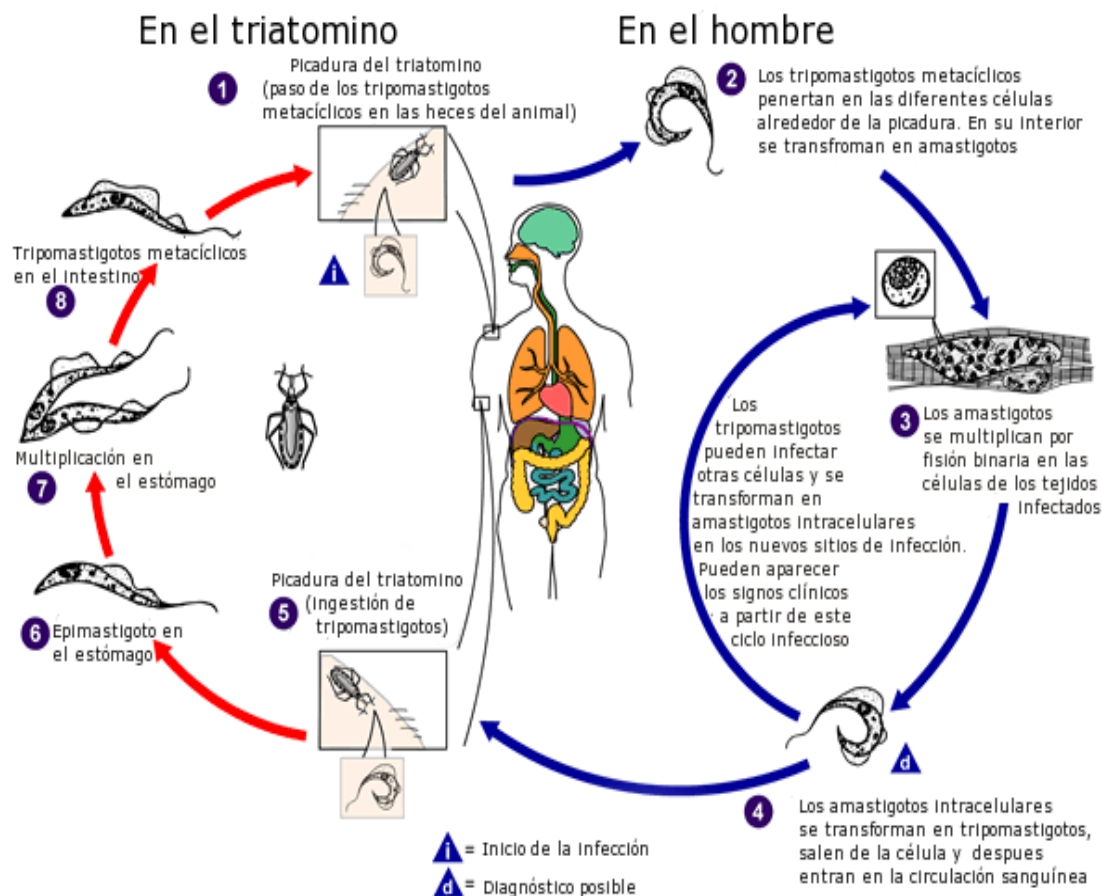


Figura N° 8. Ciclo biológico de *T. cruzi*. (Fuente: Uribarren Berrueta T. Enfermedad de Chagas. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México. 2013.)

3.2.3 Patogenia

Las lesiones que produce *T. cruzi* dependen de las características del parásito y del hospedero. (41)

- *Son factores asociados al parásito:* Polimorfismo, tropismo, virulencia, constitución antigénica, cantidad de parásitos.

- *Son factores relacionados con el hospedero:* Constitución genética, sexo, edad, especie, raza, infecciones asociadas, estado nutricional y respuesta inmune.

La evolución de la enfermedad de Chagas desde su forma asintomática hacia la sintomática es muy controvertida. Las hipótesis que correlacionan las lesiones histopatológicas, son:

1. Presencia del parásito con el consecuente proceso inflamatorio crónico.
2. Mecanismos de sensibilización (autoinmunidad).
3. Lesiones en células no parasitadas desencadenadas por trastornos isquémicos o metabólicos, debidos al proceso inflamatorio. (40)

3.3 GENERO *Alvaradoa*

3.3.1 Generalidades del genero *Alvaradoa*

La familia Simaroubaceae, se encuentra ubicada dentro de las angiospermas, en el grupo de las dicotiledóneas, clase Magnoliopsida y el orden Sapindale. Dicha familia, está básicamente compuesta de alrededor de 22 géneros y 170 especies en el mundo, la mayoría en zonas tropicales. (7)

Las especies pertenecientes a esta familia se caracterizan por el sabor amargo de sus cortezas, ramas y hojas. Hojas compuestas imparipinnadas, rara vez simples, alternas y con folíolos de bordes enteros y coriáceos al tacto, de base

asimétrica; casi todas las especies tienen folíolos pequeños terminales a diferencia de la familia Sapindaceae, con quien se puede confundir.⁽¹⁶⁾

Alvaradoa es un género americano con la presencia de cinco especies, cuatro en México y América Central (Entre ellas, *Alvaradoa amorphoides*), Florida y el Caribe y una en Sudamérica (Bolivia y Norte de Argentina). La mayoría de las especies de *Alvaradoa* prefieren hábitats rocosos, vegetación abierta y bosques secos. ⁽¹⁶⁾

3.4 ESPECIE *Alvaradoa amorphoides* Liebm.

3.4.1 Información Taxonómica ⁽¹⁷⁾

- **Reino:** *Plantae*
- **Filo:** *Magnoliophyta*
- **Clase:** *Magnoliopsida*
- **Orden:** *Sapindales*
- **Familia:** *Simaroubaceae*
- **Género:** *Alvaradoa*
- **Especie:** *amorphoides*

Nombres Comunes de *A. amorphoides* Liebm.

- Cola de Zorro, Palo de Sobo, Plumajillo (El Salvador); Palo de hormigas, Plumajillo, Cola de ardilla. (Guatemala); Zorra (Honduras); Rabo de ardilla (Costa Rica). ⁽⁴³⁾

3.4.2 Descripción botánica de *A. amorphoides* Liebm.

- **ÁRBOL:** Es un árbol pequeño a mediano, de hojas cedizas, que alcanza una altura de 20 metros y un diámetro de 28 cm. Se ramifica desde el medio o alto en el tallo. La corteza es de color gris claro a anaranjado,

con grietas finas verticales y hendiduras horizontales. La corteza interior es delgada, de color rojo cafésoso con rayas blancas y de sabor astringente. Las ramitas son de color gris oscuro, con muchos puntos y líneas verrugosas cafésosos (lenticelas) y grietas longitudinales. El nuevo crecimiento tiene pelillos finos y la cicatriz foliar es oscura. Las hojas están apiñadas en el ápice de la ramita. (43)



Figura N° 9. Árbol de *A. amorphoides* Liebm.

- HOJAS: Las hojas alternas, imparipinnadas tienen de 6 a 32 cm. de largo. El eje central mide de 5 a 34 cm. de largo y sostiene entre 8 a 50 hojuelas, alternas en el raquis, con peciolos de 1 a 2 mm de largo. Las láminas son de forma oblonga, de 1 a 3.8 cm. de largo y de 4 a 13 mm de ancho, de borde liso. El ápice es redondeada u obtusa. El haz es verde mate lampiño y el envés es verde blancuzco y cubierto de pelillos finos. (43)



Figura N° 10. Hojas de *A. amorphoides* Liebmann

- **FLORES:** Las flores masculinas están en distintos árboles (dioicas) en grupos florales alargado (racimos). Los racimos masculinos miden como de 20 cm. de largo y los racimos femeninos, hasta 13 cm. de largo. Las flores pequeñas, en pedicelos cortos, tienen 5 sépalos cortos, apenas unidos, pero no tienen pétalos. Las flores masculinas tienen 5 estambres. Las flores femeninas, muy apiñadas en racimos semejantes a plumas, tienen el pistilo con ovario de 2 o 3 celdas y de 2 o 3 estilos.



Figura N° 11. Inflorescencias de *A. amorphoides* Liebmann. (Fuente: Witsberger D., Current D., Archer E. Árboles del Parque Deninger. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Primera Edición. San Salvador, El Salvador. 1982.)

- FRUTOS: Los frutos (sámaras) son de forma lanceolado-elíptica, de 1 a 1.5 cm. de largo y de 3 mm de ancho, aplanados y contiene una semilla en la base y una ala hacia el ápice. Su color es café al madurarse, y están densamente cubiertos por pelos blancos largos. La semilla elíptica mide como 4 mm de largo. Los frutos son dispersados por el viento. (43)



Figura N° 12. Frutos de *A. amorphoides* Liebm.

- CORTEZA: La albura es de color café. El duramen generalmente está ausente o no se distingue bien de la albura. La madera es de peso mediano, la textura mediana, y es fácil de trabajar. Se informa que se la aprecia para leña por que se quema despacio y por mucho tiempo. (43)



Figura N° 13. Corteza de *A. amorphoides* Liebm.

3.4.3 Distribución de *A. amorphoides* Liebm.

Es un árbol común del bosque seco. Crece en elevaciones bajas, desde el nivel del mar hasta 1400 m, en climas secos a húmedos. Crece en suelos arenosos a franco arcillosos, bien drenados, pH 6-7. Tolera suelos pobres y pedregosos. Se distribuye de modo natural de Florida a México, Cuba, América Central, Bolivia y Argentina. (2)

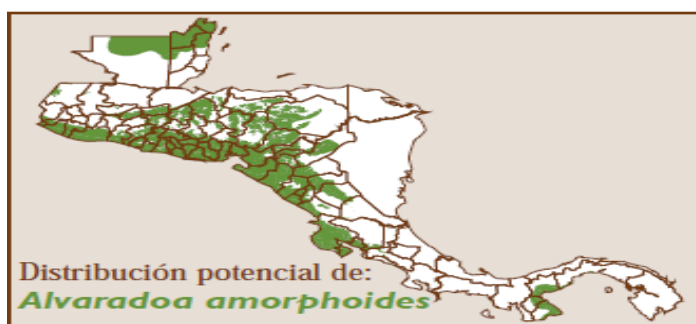


Figura N° 14. Distribución potencial de *A. amorphoides* en Centroamérica.

(Fuente: Barrance A., Beer J., Boshier D. H., y colaboradores. Árboles de Centroamérica. Un Manual para Extensionistas. Revisión en Español. 2003.)

Clima y Suelo en condiciones naturales				¿Dónde crece mejor?
Pluviometría	400-1200 mm año	Textura	Arenosos a Franco arcillosos	Suelos Arenosos a Franco arcillosos, aunque tolera suelos pobres y pedregosos
Estación seca	3-7 meses			
Altitud	0-1400 m	pH	6-7	
T media anual	24-28 °C	Drenaje	Bueno	

Figura N° 15. Condiciones de crecimiento de *A. amorphoides* Liebm. (Fuente:

Barrance A., Beer J., Boshier D. H., y colaboradores. Árboles de Centroamérica. Un Manual para Extensionistas. Revisión en Español. 2003.)

3.4.4 Usos etnobotánicos de *A. amorphoides* Liebm.

En Yucatán, la decocción de la corteza se bebe como tónico para el tracto digestivo y se aplica en enfermedades de la piel, la decocción de las hojas se toma en las quejas urinarias. Las hojas se mezclan con miel y la seda del maíz para detener hemorragias. Las hojas se colocan en baños de agua tibia para pacientes reumáticos. (17)

3.5 Estudio Fitoquímico de *A. amorphoides* Liebm. (39)

En un estudio fitoquímico realizado a la especie *A. amorphoides* en el año 1980, se investigó, en forma general, los principios activos que esta contenía.

Después de observar los resultados de las diferentes columnas cromatográficas y las correspondientes cromatografías en capa fina, el trabajo se orientó hacia el estudio de 3 compuestos: β -sitosterol, cumarinas y antraquinonas.(39)

En las últimas fracciones del extracto original de corteza y fracción B del extracto de hojas, fueron detectados por cromatografía en capa fina (sílica gel) un compuesto que eluído con acetona-metanol presentaba un marcado carácter polar y característico de glucósido. Este glucósido después de haber sido saponificado dio como resultado un residuo insaponificable al cual se le practicó una cromatografía en capa fina en donde aparecieron diferentes manchas. Queriendo investigar que compuestos había en esta capa fina, se inició esta búsqueda con un patrón de β -sitosterol partiendo de que este compuesto es abundante en las plantas superiores. Entre las manchas del residuo, una dio un R_f del mismo valor que el del patrón, así como una coloración con tonalidad

semejante, por lo que se sospechó la presencia de β -sitosterol en forma de glucósido en esta planta. (39)

En las fracciones 40-48 de los extractos etanólicos de corteza que se eluyeron con benceno-acetona (8:2) en una columna cromatográfica, se detectó un producto que se aisló por cromatografía en capa gruesa. Una vez purificada por re cristalización se le determinó su punto de fusión, análisis elemental y los correspondientes espectros IR y RMN, evidenciando así, la presencia de cumarinas. (39)

La prueba final de la estructura de la sustancia se realizó al metilarla con $\text{SO}_4(\text{CH}_3)_2$, en donde el OH^- se convierte en metoxi, dando la cumarina conocida por HERNIARINA, lo que se comprobó por cromatografía en capa fina, dando idénticos R_f para disolventes diferentes (metanol-cloroformo 8:2; 7:3; 5:5). (39)

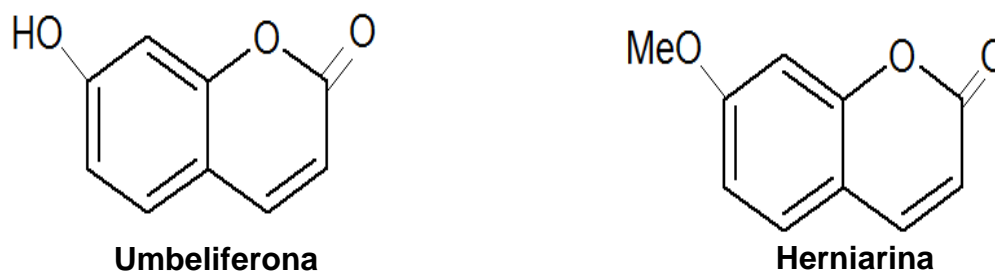
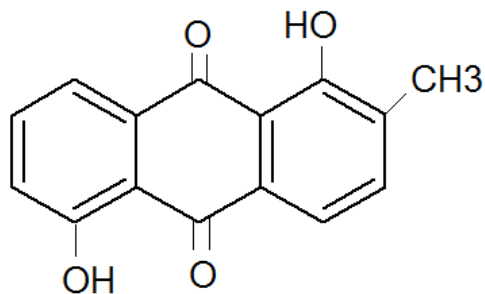


Figura N° 16. Metabolitos encontrados en los extractos de *A. amorphoides* Liebm. (Fuente: Toledo Mendoza R. A., Estudio Fitoquímico de *Alvaradoa amorphoides* (Cola de zorro). Universidad de El Salvador. 1980.)

En las fracciones 8-10 y 11-17 del extracto etanólico de corteza y fracción 8-10 del extracto clorofórmico de corteza, se aisló otro compuesto por cromatografía sobre sílica gel al cual, de acuerdo a su análisis elemental y espectro de masas (M/e 254) le corresponde una formula empírica de $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$. (39)

La antraquinona, que es un derivado dihidroxi mono metil, parece ser un nuevo miembro de este tipo de compuesto para los que se propone, en principio la siguiente estructura y el nombre ALVARADONA de posibles propiedades anticancerígenas según su estructura. (39)



Alvaradona

Figura N° 17. Nueva antraquinona aislada de *A. amorphoides* Liebm. (Fuente: Toledo Mendoza R. A., Estudio Fitoquímico de *Alvaradoa amorphoides* (Cola de zorro). Universidad de El Salvador. 1980.)

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio

La presente investigación se clasificó como: Experimental, Retrospectivo y Prospectivo.

- Experimental: porque a partir de los resultados obtenidos en el laboratorio y utilizando pruebas *in vitro* se pudo evaluar la posible actividad tripanocida de *A. amorphoides* Liebm.
- Retrospectivo: porque está basada en estudios anteriores de la actividad tripanocida del género *Alvaradoa*.
- Prospectivo: proyectándose a que los resultados obtenidos sean de utilidad y aplicación en el futuro como una nueva alternativa para el tratamiento natural de la enfermedad de Chagas.

4.2 Investigación bibliográfica

Se llevó a cabo la búsqueda y revisión de información en los siguientes lugares:

- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca de la de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)
- Biblioteca y Herbario del Jardín Botánico La Laguna
- Internet

4.3 Investigación de campo

- **Universo:** especies vegetales con antecedentes de actividad tripanocida.
- **Muestra:** corteza de *A. amorphoides* Liebm.

4.3.1 Trabajo de campo

Se recogió una muestra de aproximadamente 4 Kg de la corteza de *A. amorphoides* Liebm., en el municipio de San Juan Opico del departamento de La Libertad, que posteriormente fue llevada al Laboratorio de Investigación en Productos donde se obtuvieron los respectivos extractos.

4.3.2 Identificación taxonómica de la especie vegetal

Posterior a la recolección de la especie vegetal, se tomó una muestra representativa de la misma y se llevó al Jardín Botánico La Laguna donde se realizó la respectiva identificación taxonómica de la especie vegetal.

4.4 Parte Experimental

4.4.1 Tratamiento de la muestra

El tratamiento de la muestra se inició cortando en fresco la corteza en trozos pequeños y colocándolos sobre una bandeja metálica. Se le retiró la humedad que poseía colocándola en estufa a una temperatura entre 40° C y 60° C. Posteriormente a ello se realizó la molienda de la muestra seca y se colocó en bolsas plásticas debidamente rotuladas para su posterior uso.

4.4.2 Obtención de los extractos de la corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm.

4.4.2.1 Extracción de la corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. con etanol al 95°

- Se tomó 100 g de la corteza molida de *A. amorphoides* Liebm.
- Se extrajo en un Soxhlet con 0.5 L de etanol al 95° durante 12 horas.
- Este procedimiento se repitió con otros 0.5 L de etanol al 95° hasta agotar la muestra.
- El extracto obtenido se concentró en rotaevaporador a presión reducida, hasta eliminar el etanol.

4.4.2.2 Extracción de la corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. con diclorometano

- Se tomó 100 g de la corteza molida de *A. amorphoides* Liebm.
- Se extrajo en un Soxhlet con 500 mL de diclorometano durante 48 horas.
- El extracto obtenido se concentró en rotaevaporador a presión reducida, hasta eliminar el diclorometano.

Nota: En ambas extracciones se reportó la cantidad de extracto obtenido.

4.4.3 Identificación de Antraquinonas presentes en los extractos mediante la Prueba de Borntrager y Cromatografía en Capa Fina.

4.4.3.1 Prueba de Borntrager

Se colocó 25 mL de extracto etanólico en una ampolla de separación y se extrajo con 15 mL de Benceno, se agito cuidadosamente y se dejó en reposo hasta la separación de las dos capas. La fase etanólica se eliminó. A la fase bencénica se agregó 5mL de Hidróxido de Amonio y se agito. La formación de un color rojo indica la presencia de antraquinonas.

NOTA: Efectuar la prueba en cámara de extracción de gases. De igual manera se realizó esta prueba con el extracto diclorometánico.

4.4.3.2 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se realizó sobre una cromatoplaaca de sílica gel, tomando en cuenta condiciones específicas que se describen a continuación en la Tabla N° 1

Tabla N° 1. Condiciones para realizar cromatografía en capa fina

Fase Estacionaria	Cromatoplaaca de Silica Gel G de 0.25 mm de espesor y 20 cm x 20 cm, con cubierta de Aluminio.
Fase Móvil	Éter de petróleo: Acetato de etilo: Ácido fórmico (7.5:2.5:0.1)
Muestra	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto etanólico al 95° de la corteza de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm. • Extracto diclorometánico de la corteza de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.
Revelador	Hidróxido de Potasio 10 %
Evidencia	Manchas color rojo

4.4.4 Preparación de las diluciones de los extractos de *Alvaradoa amorphoides* Liebm.

Preparación de las diluciones de los extractos.

- Dilución a concentración 125 µg/mL

0.125 g de extracto etanólico → 100 mL (1250 µg/mL)
 125000 µg de extracto etanólico
 ↓
 1 mL → 10 mL (125 µg/mL)

0.125 g de extracto diclorometánico → 100 mL (1250 µg/mL)
 125,000 µg de extracto diclorometánico
 ↓
 1 mL → 10 mL (125 µg/mL)

- Dilución a concentración 100 µg/mL

0.100 g de extracto etanólico → 100 mL (1000 µg/mL)
 100,000 µg de extracto etanólico
 ↓
 1 mL → 10 mL (100 µg/mL)

0.100 g de extracto diclorometánico → 100 mL (1000 µg/mL)
100,000 µg de extracto diclorometánico
↓
1 mL → 10 mL (100 µg/mL)

- **Dilución a concentración 50 µg/mL**

0.050 g de extracto etanólico → 100 mL (500 µg/mL)
50,000 µg de extracto etanólico
↓
1 mL → 10 mL (50 µg/mL)

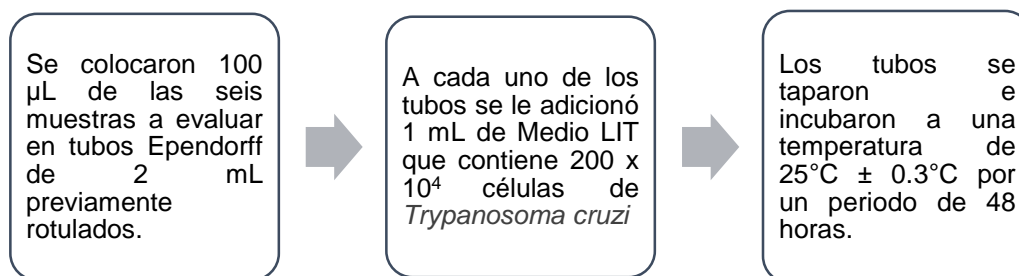
0.050 g de extracto diclorometánico → 100 mL (500 µg/mL)
50,000 µg de extracto diclorometánico
↓
1 mL → 10 mL (50 µg/mL)

NOTA: Los balones conteniendo la muestra se mantuvieron cubiertos con papel carbón. Se obtuvieron tres diluciones del extracto etanólico al 95° y tres diluciones del extracto diclorometánico, obteniendo un total de seis muestras.

4.4.5 Determinación de la posible actividad tripanocida de los extractos de *Alvaradoa amorphoides Liebm*

Para la realización de la evaluación de la actividad tripanocida se requirieron las siguientes condiciones:

- Medio de cultivo utilizado para el ensayo: Medio Infusión de Hígado-Triptosa/ Liver Infusion Tryptosa (LIT)
- Volumen de muestra: 100 μL
- Número de células de *T. cruzi* inoculadas: 200×10^4 células por mililitro de medio LIT.
- Temperatura de Incubación: $25^\circ\text{C} \pm 0.3^\circ\text{C}$
- Periodo de Incubación: 48 horas
- Tubos Ependorff de 2 mL



NOTA: Realizar este procedimiento en cabina de flujo laminar. El número de células inoculadas de *T. cruzi* y el procedimiento utilizado fue proporcionado por la Licda. Ana Maricela Mejilla Villacorta del Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES).

Transcurrido el periodo de incubación, se realizó el conteo en Cámara de Neubauer, contando la cuadrícula central en su totalidad para así determinar el porcentaje de células muertas de *T. cruzi*. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra.

4.5 Análisis estadístico

En el diseño estadístico, se analizaron los datos con base a media aritmética, desviación típica, coeficiente de variación, porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de células muertas utilizando Microsoft Office Excel 2013.

Posteriormente se realizó un análisis comparativo de coeficientes de variación, con la finalidad de comprobar si existía una diferencia significativa entre la actividad tripanocida de cada muestra evaluada y así determinar qué tan confiable es el método utilizado para dicho estudio. Así mismo se realizó la comparación de resultados obtenidos con el artículo “Evaluación de la actividad tripanocida y antibacteriana de extractos de *Alvaradoa subovata* Cronquist” realizado por M. Laura Martínez, y colaboradores, en el año 2013.⁽¹⁹⁾

4.5.1 Media Aritmética

Es la suma de todos los valores de la variable dividida entre el número total de elementos.⁽³⁰⁾

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

Dónde:

X_i = Muestra individual

n = Numero de muestras

$\sum_{i=1}^n$ = Sumatoria desde muestra 1 a n número de muestras

4.5.2 Desviación típica

Es la más importante de las medidas de dispersión; puede definirse como la raíz cuadrada de la media aritmética del cuadrado de las desviaciones de cada valor de la variable con respecto a la media.⁽³⁰⁾

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Dónde:

S = Desviación típica

X_i = Muestra individual

\bar{X} = Promedio de muestras

n = Numero de muestras

$\sum_{i=1}^n$ = Sumatoria desde muestra 1 a n número de muestras

Cuanta más pequeña sea la desviación típica mayor será la concentración de datos alrededor de la media.

4.5.3 Coeficiente de Variación

En estadística el coeficiente de variación a distintas escalas pero que están correlacionadas estadísticamente y sustantivamente con un factor en común.

Es decir, ambas variables tienen una relación causal con ese factor. Su fórmula expresa la desviación estándar como porcentaje de la media aritmética, mostrando una mejor interpretación porcentual del grado de variabilidad que la desviación típica o estándar.⁽³⁰⁾

A mayor valor de coeficiente de variación (C.V.) mayor heterogeneidad de los valores de la variable; y a menor C.V., mayor homogeneidad en los valores de la variable.

El coeficiente de variación es la relación entre la desviación típica de una muestra y su media.⁽³⁰⁾

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

Dónde:

CV= Coeficiente de variación

S = Desviación típica estándar

X = Promedio de muestras

100 % = Valor constante

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Recolección, preparación e identificación del material vegetal.

De la especie vegetal colectada se llevó una muestra al Jardín Botánico La Laguna, donde fue identificada por el botánico Dagoberto Rodríguez, la cual correspondía a *Alvaradoa amorphoides* Liebm., tal como se presenta en el Anexo N° 1.



Figura N° 18. Muestras de ramas con hojas y corteza de *A. amorphoides* Liebm. colectadas en el municipio de San Juan Opico.

El material vegetal de *A. amorphoides* Liebm. se fraccionó en partes pequeñas y se secó en una estufa a una temperatura de 40° C. Posteriormente la corteza seca fue reducida a polvo en un molino de drogas, la droga molida se guardó en bolsas plásticas previamente identificadas.



A



B



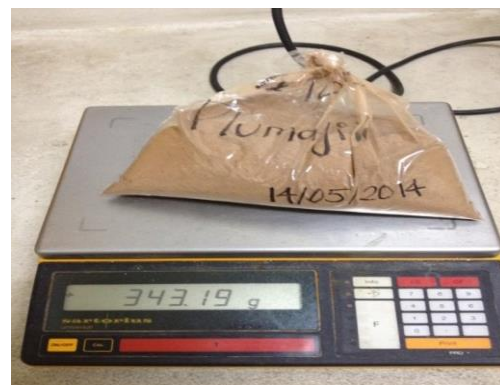
C



D



E



F

Figura N° 19. A y B. Fraccionamiento de la corteza. C. Proceso de secado. D y E. Molienda de la corteza. F. Cantidad de corteza en polvo obtenido de *A. amorphoides* Liebm.

5.2 Obtención de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico.

Después de haber obtenido los diferentes extractos de la corteza de *A. amorphoides* Liebm. y posteriormente concentrados en un rotaevaporador se obtuvieron los siguientes resultados:

EXTRACTO ETANÓLICO AL 95°

Cantidad de extracto etanólico obtenido: 1.0 L

De este total se tomaron 500 mL para luego evaporar el etanol mediante el uso de un rotaevaporador del cual se obtuvieron 20.2 gramos de extracto resinoso.

EXTRACTO DICLOROMETÁNICO

Cantidad de extracto diclorometánico obtenido: 500 mL

De este total se tomaron 250 mL para luego evaporar el diclorometánico mediante el uso de un rotaevaporador del cual se obtuvieron 6.96 gramos de extracto resinoso.

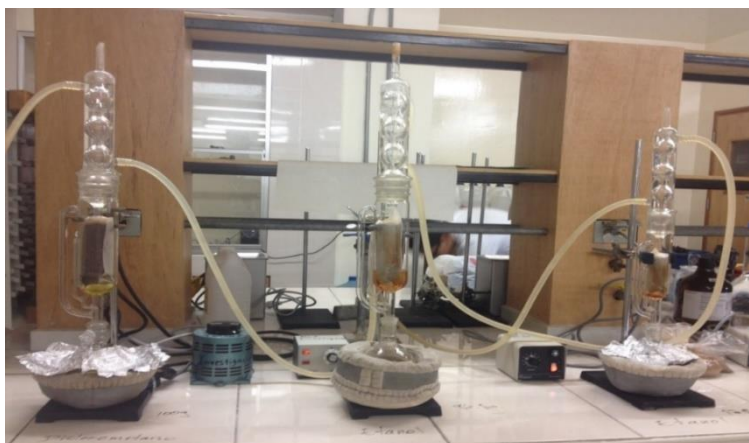


Figura N° 20. Obtención de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico por Método Soxhlet.



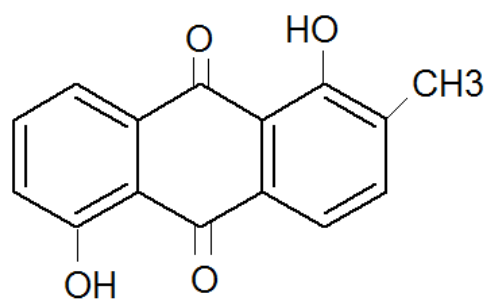
Figura N° 21. Eliminación de los solventes de los extractos etanólico al 95° y diclorometánico utilizando rotaevaporador.

5.3 Resultados de la identificación de Antraquinonas

5.3.1 Prueba de Borntrager

Se realizó la identificación de antraquinonas presentes en los dos extractos de la corteza observándose la formación de un color rojo lo cual indica la presencia de antraquinonas.

Las antraquinonas son compuestos que tienen dentro de su estructura grupos fenólicos en posición para, los cuales reaccionan con compuestos alcalinos desarrollando una coloración roja. (25), (34), (36)



A



B

Figura N° 22. A. Estructura molecular de las antraquinonas. B. Prueba de Borntrager para identificación de Antraquinonas

5.3.2 Cromatografía en capa fina

Al revelar la placa cromatográfica con Hidróxido de Potasio al 10 %, se identificó la presencia de antraquinonas evidenciado por el aparecimiento de manchas color rojo. (Ver figura N° 23).

Cabe aclarar que no se utilizaron testigos para el desarrollo de la cromatografía en capa fina por el hecho de no contar con ellos.

Al igual que con las pruebas químicas las antraquinonas reaccionan en presencia de soluciones alcalinas.

La prueba de Borntrager se realizó tanto en las pruebas químicas como en la cromatografía en capa fina con la diferencia que en la identificación por capa fina las antraquinonas presentes son separadas del extracto, evidenciando con más claridad la formación de las manchas de color rojo.

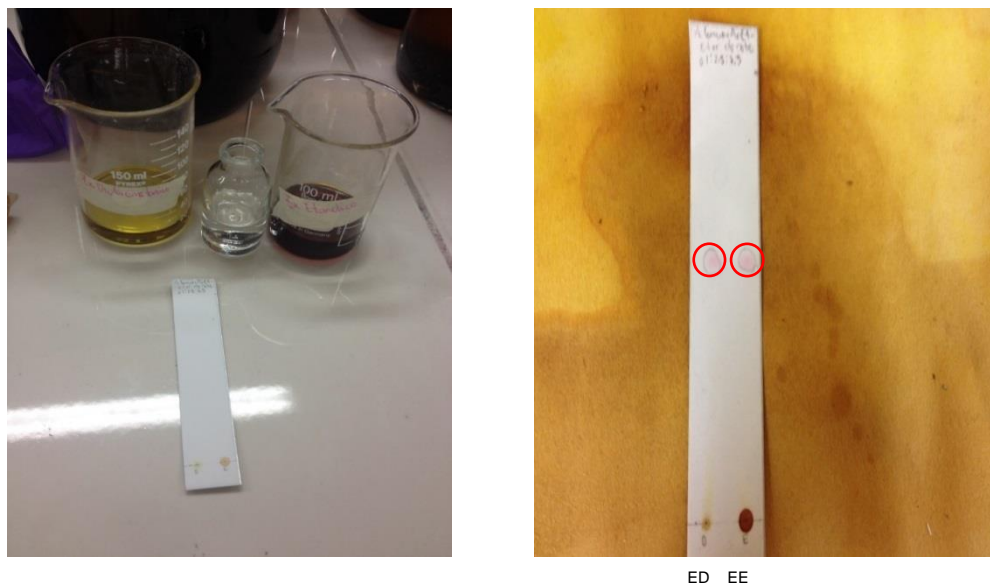


Figura N° 23. Cromatografía en capa fina del extracto etanólico al 95° (EE) y del extracto diclorometánico (ED) de *A. amorphoides* Liebm.

Luego del revelado se procedió a obtener los Rf de las manchas eluidas. (Ver Tabla N° 2)

Tabla N° 2. Resultados Rf obtenidos de la cromatografía en capa fina de las manchas reveladas con Hidróxido de Potasio 10%.

Extracto en estudio	Rf de la mancha
Extracto etanólico al 95° de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	0.5
Extracto diclorometánico de <i>A. amorphoides</i> Liebm.	0.5

Frente del solvente: 9.2 cm

Como se observa en la Tabla N° 2 utilizando una fase móvil compuesta por Éter de petróleo, Acetato de etilo, Acido Fórmico (7.5:2.5:0.1) se observó la separación de una mancha en cada extracto, la cual presento igual Rf en los dos extractos lo que se comprueba al observar la Figura N° 23.

5.4 Preparación de las diluciones de los extractos.

Para realizar las diluciones a evaluar en el ensayo, se utilizó cada uno de los extractos concentrados, para lo cual se pesó la cantidad respectiva y así obtener la concentración final de cada una.

Se realizaron para ambos extractos, etanólico al 95° y diclorometánico, las diluciones a concentraciones de 125 µg/mL, 100 µg/mL y 50 µg/mL.

Para determinar las concentraciones anteriormente mencionadas se tomó como parámetro de referencia las realizadas por el grupo de investigadores del artículo que se presenta en la metodología, tomando en consideración que por tratarse de dos especies vegetales que pertenecen al mismo género, quimiotaxonómicamente (Parte de la Farmacognosia que estudia la relación entre la parte química y la parte botánica de una planta) se podían tomar como referencia.

En la elaboración de las diluciones se agregó propilenglicol para poder solubilizar los extractos ya que por su consistencia resinosa no eran solubles en agua. Según la metodología en las diluciones a una concentración de 50 y de

100 $\mu\text{g/mL}$, 1 mililitro de propilenglicol fue suficiente para disolver los extractos, pero en la concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ no se lograba disolución total por lo cual se optó por calentar en Baño de María a temperatura baja dicha dilución, para lograr la disolución completa.



Figura N° 24. Preparación de las diluciones de trabajo de los extractos diclorometánico y etanólico al 95° de *A. amorphoides* Liebm.

5.5 Codificación de las muestras a evaluar

A cada una de las muestras se le asignó un código, los cuales se muestran en la Tabla N° 3. Junto a las muestras se llevó un blanco el cual se preparó de igual forma que las muestras, a excepción que no se le incluyó extracto.

Tabla N° 3. Códigos asignados a las muestras en estudio.

Extracto	Concentración	Código
Extracto de Etanólico al 95° <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	125 µg/mL	1A
	100 µg/mL	2A
	50 µg/mL	3A
Extracto Diclorometánico de <i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	125 µg/mL	3B
	100 µg/mL	2B
	50 µg/mL	1B



Figura N° 25. Codificación de las muestras de trabajo.

5.6 Resultados de la Evaluación de la posible actividad tripanocida de los extractos de *Alvaradoa amorphoides* Liebm.

Se ensayaron las tres concentraciones de cada extracto evaluando la actividad tripanocida, tomando en consideración la metodología utilizada en Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES).

Posteriormente a las 48 horas de incubación se observó, mediante el uso de cámara de Neubauer, un cambio en la morfología, crecimiento y motilidad de las células de *T. cruzi*.

Los cambios observados en las células de *T. cruzi* indican la acción que ejercen los compuestos activos presentes en los extractos utilizados en el ensayo.

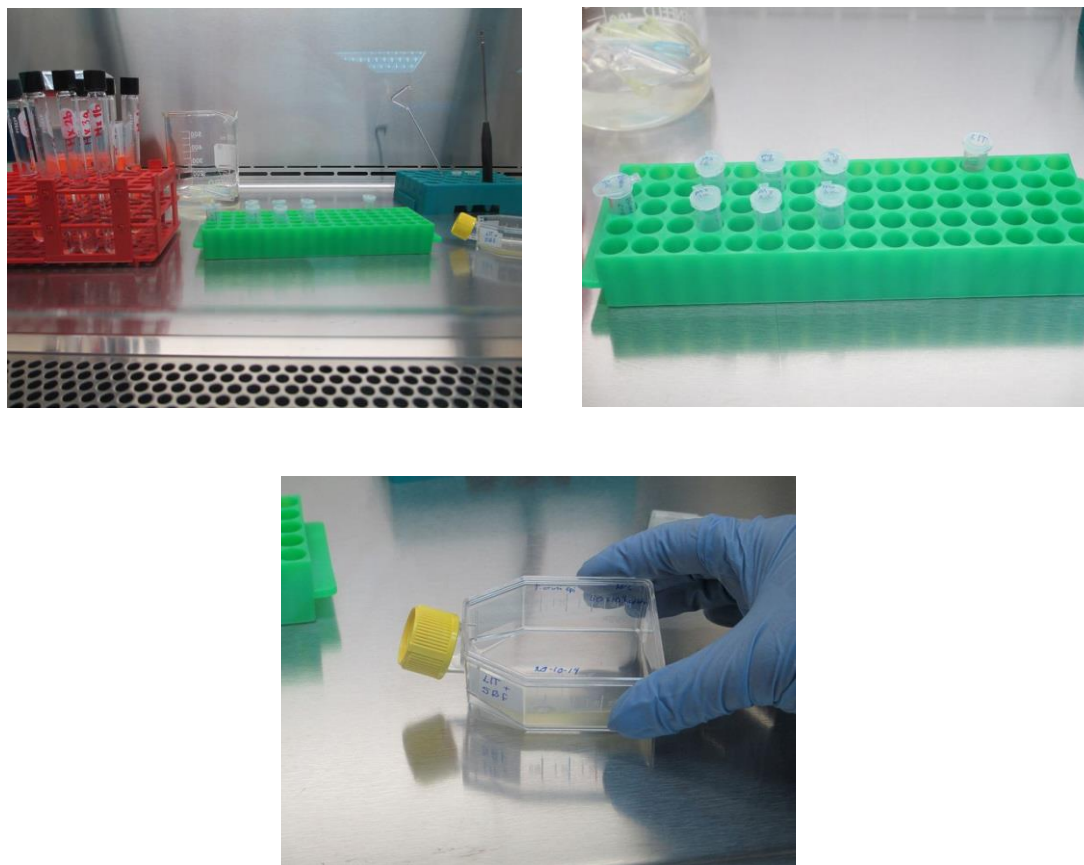


Figura N° 26. Muestras sometidas a la evaluación tripanocida.

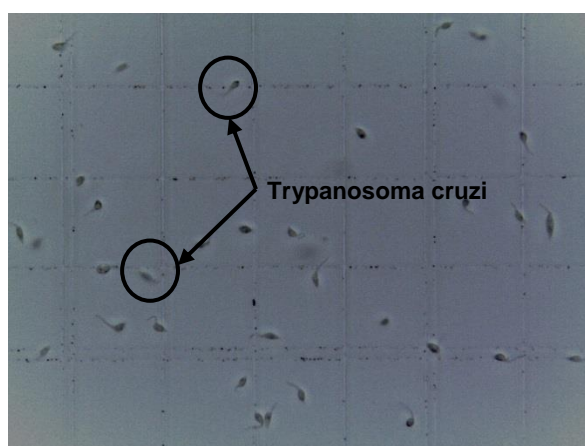


Figura N° 27. Cultivo *in vitro* de *T. cruzi* (estadio epimastigote) en medio LIT

El conteo en cámara de Neubauer se realizó contando la cuadrícula central en su totalidad. Cabe mencionar que para cada muestra se realizó el conteo por duplicado. (Ver Figura N° 28)

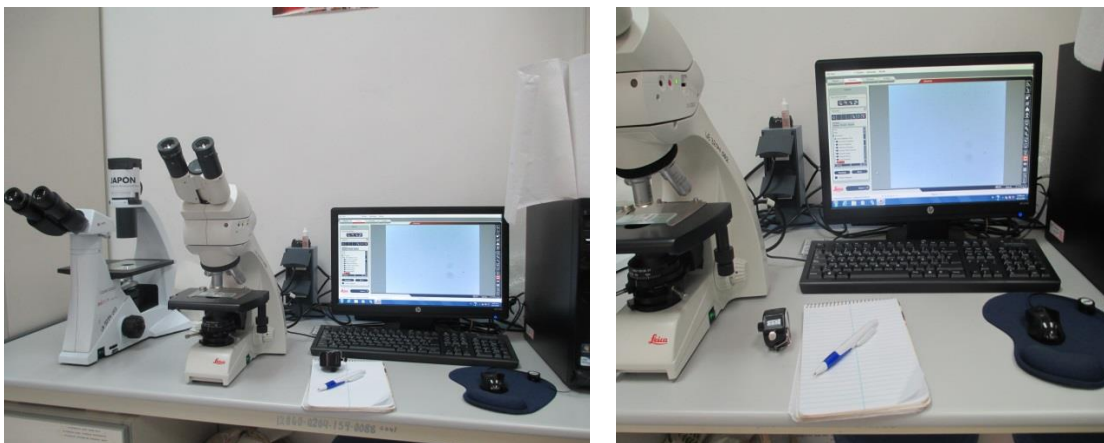
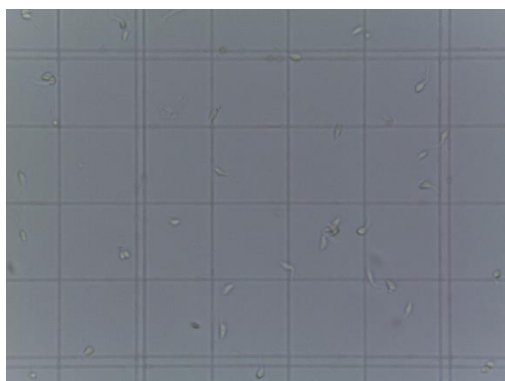
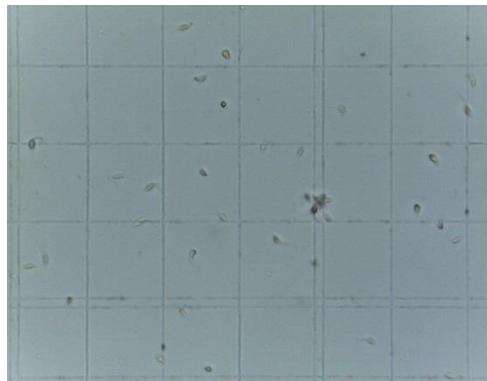


Figura N° 28. Conteo de células de *T. cruzi* en cámara de Neubauer



Mx 1A (Primer conteo)



Mx 1A (Segundo conteo)

Figura N° 29. Conteo por duplicado de la muestra 1A sometida a la evaluación tripanocida.

En la figura N° 27 y N° 29 se observan las células que mostraban cambios en su morfología, se especifica el ejemplo de la muestra 1A para mayor

comprensión. Esta cuadrícula es la que se observa en la cámara de Neubauer. De igual manera se realizó la observación y el conteo en las otras muestras dando como resultado los datos de la tabla N° 4.

Tabla N° 4. Resultados de los Conteos de células vivas en cámara de Neubauer para las seis muestras en estudio por duplicado.

MUESTRA	CUADRICULA 1	CUADRICULA 2
Mx 1A	193	190
	187	198
Mx 2A	93	139
	99	145
Mx 3A	143	161
	154	165
Mx 1B	98	108
	100	103
Mx 2B	69	84
	64	76
Mx 3B	67	93
	71	87
Blanco	130	129
	134	137

Nota: Cada uno de los valores obtenidos para cada muestra debe ser multiplicado por el factor 10^4 .

Los datos presentados en la Tabla N° 4 son los que se utilizaron para determinar los parámetros estadísticos: media, desviación típica estándar, coeficiente de variación, porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de células muertas, mediante el uso de Microsoft Office Excel 2013.

5.7 Resultados de la Evaluación Tripanocida expresada como porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de células muertas de *T. cruzi*, promedio, desviación estándar, coeficiente de variación.

Tabla N° 5. Porcentaje de sobrevivencia y porcentaje de células muertas de *T. cruzi* para las seis muestras, junto con sus promedios, desviación típica y coeficiente de variación.

Muestras en evaluación	Cámara de conteo 1		Cámara de conteo 2		Media Aritmética	Desviación Estándar	Coeficiente de Variación	Porcentaje de Sobrevivencia	Porcentaje de células muertas
MX 1A	193	187	190	198	192	4.06	2.11	96	4
MX 2A	93	99	139	145	119	23.19	19.49	59.5	40.5
MX 3A	143	154	161	165	155.75	8.35	5.36	77.87	22.13
MX 1B	98	100	108	103	102.25	3.77	3.68	51.12	48.83
MX 2B	64	69	84	76	73.25	7.53	10.28	36.62	63.38
MX 3B	67	71	93	87	79.5	10.80	13.59	39.75	60.25
BLANCO	130	134	129	137	132.5	3.69	2.79	66.25	33.75

Durante el ensayo, las células de *T. cruzi* mostraron los comportamientos anormales siguientes:

Tabla N° 6. Comportamientos anormales de las células de *T. cruzi*

MUESTRAS	COMPORTAMIENTOS
Mx 1A	Crecimiento y movimientos normales en las condiciones <i>in vitro</i> .
Mx 2A	Movimientos lentos.
Mx 3A	Movimientos erráticos y muy lentos.
Mx 1B	Movimientos erráticos y lentos.
Mx 2B	Crecimiento y movimientos normales en las condiciones <i>in vitro</i> .
Mx 3B	Movimientos lentos.

Estos comportamientos se deben a que los extractos alteraron las condiciones de crecimiento de las células de *T. cruzi*, provocando cambios en su morfología y posiblemente pueda tener una repercusión en los niveles de infestación.

Tabla N° 7. Muestras que presentaron actividad tripanocida en el ensayo.

CODIGO	EXTRACTO	CONCENTRACION DE LA DILUCION	PORCENTAJE DE ACTIVIDAD TRIPANOCIDA
Mx 1B	Diclorometánico	50 µg/mL	48.83 %
Mx 2B	Diclorometánico	100 µg/mL	63.38 %
Mx 3B	Diclorometánico	125 µg/mL	60.25 %
Mx 2A	Etanólico al 95°	100 µg/mL	40.50 %

En la Tabla N° 7 se observa que la mayor actividad tripanocida se obtuvo con los extractos diclorometánico de concentración 125 µg/mL y 100 µg/mL

De igual forma se puede observar en la Tabla N° 7 que los extractos diclorometánico a las tres concentraciones de las diluciones utilizadas, demostraron actividad tripanocida, no así con el extracto etanólico, en el cual la concentración de la dilución que mostró actividad fue a 100 µg/mL, esto se debe a la naturaleza del solvente utilizado en las extracciones, ya que las antraquinonas a quienes se debe la actividad tripanocida fueron más fácilmente extraíbles con diclorometano que con etanol al 95°.

El etanol por tratarse de un solvente polar, extrajo otros componentes químicos afines a su polaridad y en menor cantidad antraquinonas, esto se refleja en los resultados de actividad tripanocida, en el cual los valores mayores de actividad tripanocida se obtuvieron a concentraciones de 100 µg/mL y 125 µg/mL. Se observa además que aun a la concentración de 50 µg/mL del extracto diclorometánico, su valor de actividad tripanocida fue superior a la del extracto etanólico de concentración 100 µg/mL, lo cual comprueba lo anteriormente mencionado. Por lo tanto se puede afirmar que de los dos extractos, el que extrajo la mayor cantidad de antraquinonas de la corteza de *A. amorphoides* Liebm. fue el diclorometano. Según la revisión bibliográfica, las antraquinonas son compuestos fácilmente solubles en disolventes no polares y medianamente polares como lo es el diclorometano, por lo que al extraer con este tipo de disolventes se rompe la molécula provocando la separación del azúcar y la genina, esta última es soluble en disolventes no polares.

Cabe hacer mención que el valor de actividad tripanocida de la muestra 3B resultó con un valor inferior a la muestra 2B posiblemente se deba a factores como la no completa disolución que se observó en los extractos y por lo cual fueron sometidos a calor leve para completar su disolución.

Posteriormente se realizó un análisis comparativo de coeficientes de variación, con la finalidad de comprobar la precisión de los datos obtenidos, es decir que tan dispersos están los datos entre sí. Al no tener un valor de referencia de coeficiente de variación se acordó que el límite establecido para el valor de coeficiente de variación sea <15%, puesto que, valores superiores a este se consideraron con un alto grado de dispersión y por tanto no serían confiables.

Para la muestra 2B el valor del coeficiente de variación es de 10.28, lo cual indica que existe dispersión moderada entre los datos, por lo que el método utilizado es confiable ya que no supera el valor establecido del coeficiente de variación para el ensayo, a diferencia de la muestra 2A correspondiente al extracto etanólico a una concentración de 125 microgramos por mililitro, en donde su coeficiente de variación fue de 19.49, sobrepasando el límite establecido, por lo que se considera un dato con alto grado de dispersión.

Los resultados de la evaluación se presentan en porcentaje debido a que se realizó un único ensayo donde solo se llevaba un grupo experimental y donde todos los factores determinantes durante el mismo (temperatura, volumen, cantidad de nutrientes, cantidad de células inoculadas y concentraciones de los extractos) estaban controlados.

Los resultados de sobrevivencia y porcentaje de células muertas obtenidos para los extractos de *A. amorphoides* Liebm. parecen importantes pues a concentraciones bajas han demostrado efecto letal para las células de *T. cruzi*. Estos hallazgos coinciden con la investigación de referencia, en la cual se obtuvieron resultados similares con la especie del mismo género, donde se estudió la actividad antioxidante, antibacteriana y tripanocida de los extractos

de *Alvaradoa subovata* Cronquist donde la mayor actividad la presentó el extracto diclorometánico mostrando una actividad tripanocida de 60 % a una concentración de 100 µg/mL.

Por lo cual se puede afirmar que las especies del género *Alvaradoa* presentan similitudes quimiotaxonómicas.

Y de acuerdo a los resultados de actividad tripanocida obtenidos con el extracto diclorometánico se considera que éste debería estudiarse como un posible insumo en la formulación de fitofármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Se confirmó la presencia de antraquinonas en los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. a través de la prueba directa de Borntrager y cromatografía en capa fina.
2. El extracto diclorometánico de corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. mostró mayor actividad contra *Trypanosoma cruzi* a una concentración de 100 microgramos por mililitro y 125 microgramos por mililitro. Estos resultados sugieren que el diclorometano extrae en mayor cantidad las antraquinonas, las que se considera que son las responsables de esta actividad.
3. Tanto con diclorometano como con etanol a 95° se logró la extracción de antraquinonas, lo cual se reflejó en los resultados de actividad tripanocida.
4. La mayor actividad la demostró el extracto diclorometánico, debido a que este solvente presenta mayor afinidad con compuestos medianamente polares como lo son las antraquinonas.
5. Además de los resultados obtenidos de actividad tripanocida, también fueron observados comportamientos anormales en las células de *Trypanosoma cruzi*, evidenciado por movimientos erráticos y lentos, además de variaciones en su morfología, lo que indica que los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. aún a bajas concentraciones ejercen un efecto negativo sobre las células de *Trypanosoma cruzi*.

6. Se considera que el método microbiológico utilizado para la realización de esta investigación resultó ser confiable, rápido y efectivo, debido a que con un único ensayo se obtuvieron resultados de coeficientes de variación dentro del límite establecido, lo que confirma la precisión y confiabilidad del método.

7. Los resultados indican que las especies vegetales son una fuente potencial de sustancias con posibles usos en beneficio del ser humano y que pueden tener un valor significativo para el tratamiento de enfermedades que no presentan rentabilidad para la industria farmacéutica como es el caso de la enfermedad de Chagas.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Continuar el estudio de separación y cuantificación del extracto diclorometánico, a fin de aislar y elucidar los compuestos que poseen la actividad tripanocida, con el objetivo de validar la metodología de extracción y así en un futuro proceder a formular un fitofármaco.
2. Realizar futuras investigaciones de otras actividades biológicas que puedan presentar los extractos etanólico al 95° y diclorometánico de la corteza de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. para comprobar su espectro de acción y así poder utilizarlo en un mayor número de afecciones.
3. Dar seguimiento al extracto diclorometánico de *Alvaradoa amorphoides* Liebm., considerando una mayor cantidad de ensayos que permitan una mayor reproducibilidad de los resultados.
4. Incentivar la propagación de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. ya que es una especie vegetal promisoría en la obtención de metabolitos de interés para uso medicinal, ya que por desconocimiento de sus usos, a dicha especie vegetal no se le da la importancia que esta amerita.

BIBLIOGRAFIA

1. Antiprotozoarios. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Pontificia Universidad Javeriana Bogotá. Disponible en:
<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c792.htm>
2. Barrance A., Beer J., Boshier D. H., y colaboradores. Arboles de Centroamérica. Un Manual para Extensionistas. Revisión en Español. 2003.
3. Benznidazol. Centro de Atención Farmacéutica. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. Ministerio de Salud. Perú. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoaded/PDF/Benznidazol.pdf>
4. Bonilla Rodríguez J. A. Determinación de la toxicidad, actividad sedante y ansiolítica del extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroana* (Pito) en ratones NIH. Universidad de El Salvador. 2013.
5. Bosson de Suarez C.A.B. Bases morfológicas de la miocarditis chagásica con especial referencia a los estudios en autopsias y biopsias realizados en Venezuela. 2012.
6. CareFirst. Biblioteca Pediátrica de la Salud. 2014. Disponible en: <http://carefirst.staywellsolutionsonline.com/spanish/DiseasesConditions/Pediatric/90,P05151>.
7. Carvajal L. J., González J.F. Dendrología Colombiana. 2005. Disponible en: <http://canal.unad.edu.co/dendro/Info.html>

8. Caryn Bern. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas Disease. 2011. Disponible: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMct1014204>.
9. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Parásitos – Enfermedad de Chagas. 2010. Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/hcp/tratamiento.html>.
10. Cortadi A. y otros. Estudio farmacobotánico de hojas, cortezas y leños de *Simaroubaceae sensu lato* de Argentina. Parte I. *Alvaradoa subovata* Cronquist, *Picramnia parvifolia* Engl., *Picramnia sellowii* Planch. y *Castela coccinea* Griseb. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Universidad de Santiago de Chile. Chile. vol. 9, núm. 1. Enero. 2010.
11. Diccionario El Mundo. Unidad Editorial Información General S.L.U. 2013. Disponible en: http://diccionarios.elmundo.es/diccionarios/cgi/diccionario/lee_diccionario.html?busca=endemico&diccionario=1&submit=Buscar+
12. Diccionario enciclopédico Larousse. Ediciones Larousse. México. 1994.
13. ECOSALUD PARA LA PREVENCION DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN AMERICA CENTRAL. Disponible en: www.chagasecosalud.censalud.ues.edu.sv
14. Flores Lima C. A., Mejía Marroquín A. (1986); Investigación del posible efecto inhibitorio de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. en *Pseudomonas* sp. y *Staphylococcus aureus*.

15. G. Prats. Microbiología Clínica. Editorial Médica Panamericana. Primera Edición. México. 2008
16. Jaramillo Pérez A.T. Anatomía Foliar Funcional de *Alvaradoa amorphoides* Liebm. (*Pricamniaceae*) del Estado de Morelos. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Mexico, D.F. 2011. Disponible en: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI15499.pdf>
17. Julia F. Morton D, Sc., F.L.S., Atlas of Medicinal Plants of Middle America Bahamas to Yucatan. United States of America. 1981.
18. Lista de especímenes de *Alvaradoa amorphoides*. Disponible en: <https://www.inbio.ac.cr/bims/k03/p13/c045/o0133/f01658/g009033/s028752.htm>
19. M. Laura Martínez, M. Lucía Travaini, M. Victoria Rodríguez, Elena Orellano, Isabel Nocito, Esteban Serra, Martha Gattuso & Adriana Cortadi; (2013); Evaluación de la Actividad tripanocida y antibacteriana de extractos de *Alvaradoa subovata* Cronquist.
20. Manacorda A. M., Cuadros D.P., Álvarez A.S., Manual Práctico de Microbiología. Tomo I. 2007.
21. Martínez Díaz R.A. variabilidad intraespecífica en *Trypanosoma cruzi* y ensayo de nuevos métodos para el cribado farmacológico. Universidad Complutense de Madrid. España. 1996.

22. Martínez Martínez A. Quinonas y Compuestos Relacionados. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín 2012. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/quinonas.pdf>
23. M. L. Martínez y otros. Trypanocide activity of *Castela coccinea* Griseb. Extracts. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad de Santiago de Chile. Chile. Vol. 8. núm. 3. Mayo. 2009. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/856/85611774008.pdf>.
24. MedLine. Información de Salud para usted. Disponible en:
www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp.../17215.htm
25. Ministerio de Salud de El Salvador, Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, Agencia de Cooperación Internacional del Japón. Universidad de El Salvador. La Enfermedad de Chagas en El Salvador, Evolución Histórica y Desafíos para el Control. Primera Edición. San Salvador, El Salvador. 2010.
26. Morales Mendizábal C. D. Caracterización Fitoquímica y Evaluación Biológica de *Solamun hartwegii* (Nombre común lavaplatos). Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2011. Disponible en:
http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3180.pdf
27. Nifurtimox. Centro de Atención Farmacéutica. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas. Ministerio de Salud. Perú. Disponible en:
<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Nifurtimox.pdf>

28. Núñez C. E., Extracciones con equipo Soxhlet, 2008.
29. Océano Uno Color. Diccionario Enciclopédico. España. Edición 1997.
30. Ordoñez Pinzón H., Estadística II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Matemáticas y Estadística, Marzo, 2014.
31. Órgano Divulgativo de la Asociación Venezolana de la Industria de Salud Animal. AVISA La Revista. Zoonosis ¿Emergentes? Mal de Chagas, Migraciones de Aves y su Implicación en la Salud Pública y Animal. Año 2010. Disponible en:http://issuu.com/santosg/docs/revista_n_8_web/19.
32. Peñate de Cornejo A. R., Tobar Gómez K. G. La enfermedad de Chagas como problema de salud pública a través del tamizaje de los casos positivos de infección por *Trypanosoma cruzi* en los donantes de los cinco bancos de sangre de la zona metropolitana de San Salvador. Enero a diciembre 2010. San Salvador, El Salvador. 2011.
33. Pérez Mazliah D.E. Efecto del tratamiento con benznidazol sobre la respuesta celular T específica para *Trypanosoma cruzi* en pacientes en la etapa indeterminada de la enfermedad de Chagas crónica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.
Disponible en:
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_5024_PerezMazliah.pdf
34. Plant List. A working list of all plant species. Disponible en:
<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-2631685>

35. Rivas Paneca M. y otros. Meroterpenos (Antraquinonas) en diferentes partes de la planta de *Morinda royoc* L. Alelopatía y Sustancias Bioactivas. 2006. Disponible en:
http://cagricola.uclv.edu.cu/descargas/pdf/V33Numero_3/cag133061501.pdf
36. Rojas J., Solís H., Palacios O. Evaluación *in vitro* de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. Lima, Perú. 2010.
37. Rosa E. L. De Ruiz y otros. Aislamiento de Antraquinonas y de Pigmentos Flavonoides en Frutos de "yerba del pollo" (*Alternanthera pungens* H. B .K. *Amaranthaceae*). Área de Farmacognosia, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera. Argentina. 1995. Disponible en:
http://www.latamjpharm.org/trabajos/15/1/LAJOP_15_1_4_1_Q819BXONGD.pdf
38. Rosa E. L. De Ruiz y otros. Aislamiento de Antraquinonas y de Pigmentos Flavonoides en Frutos de "yerba del pollo" (*Alternanthera pungens* H. B .K. *Amaranthaceae*). Área de Farmacognosia, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera. Argentina. 1995. Disponible en:
http://www.latamjpharm.org/trabajos/15/1/LAJOP_15_1_4_1_Q819BXONGD.pdf
39. Sánchez Pérez J. P. Cuantificación de sesquiterpenlactonas totales procedentes del extracto cloroformico de hojas de *Calea urticifolia*

(Juanislama) recolectadas en el periodo correspondiente de julio a diciembre de 2012. Universidad de El Salvador. 2014.

40. Toledo Mendoza R. A., Estudio Fitoquímico de *Alvaradoa amorphoides* (Cola de zorro). Universidad de El Salvador. 1980.

41. Torres Pastor E. Diseño, Síntesis y Evaluación biológica de nuevos derivados de 1,4-di-N oxido de quinoxalina como potenciales agentes antichagásicos. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 2013.

42. Uribarren Berrueta T. Enfermedad de Chagas. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México. 2013. Disponible en:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>

43. Viotti R. y otros. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. Expert Review of Anti-infective Therapy. Argentina. March 2009. Disponible en:
<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/14787210.7.2.157>

44. Witsberger D., Current D., Archer E. Árboles del Parque Deninger. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Primera Edición. San Salvador, El Salvador. 1982.

GLOSARIO

Albura: Blancura perfecta. (28)

Antraquinonas: Constituyen el grupo más grande de sustancias del tipo quinona presentes en la naturaleza, suelen ser compuestos de color rojo-anaranjado. (25)

Chagoma de inoculación: es un nódulo o una placa con inflamación aguda o subaguda de la piel con parásitos presentes que pueden presentarse macroscópicamente como una lesión de tipo erisipelatoide con zona central (5)

Endémico: Enfermedad propia de una zona y de una época. (10)

Deficiencia de G6PD: Deficiencia de glucosa -6- fosfato-deshidrogenasa (también llamada deficiencia de G-6-PD) es una enfermedad hereditaria que se da generalmente en los varones. Aproximadamente 1 de cada 10 afroamericanos en los EE.UU. la padece. La deficiencia de G-6-PD afecta principalmente los glóbulos rojos, que son los que llevan el oxígeno desde los pulmones a los tejidos del cuerpo. El problema médico que puede causar es la anemia hemolítica. Esto sucede cuando los glóbulos rojos son destruidos antes que el cuerpo pueda reponerlos. (23)

Hematófagos: Que se alimentan de sangre. (10)

Hemípteros: Insectos con aparato bucal chupador y cuatro alas, las dos anteriores coriáceas. (28)

Lenticelas: Abertura en forma de cráter de volcán de los troncos y cortezas suberificadas de las plantas, que permite el paso del aire atmosférico al interior del parénquima cortical. (28)

Medio LIT: Medio Liver Infusion Tryptose. Medio ideal para el cultivo de *Trypanosoma cruzi*. (14)

Medio NNN: Medio de Novy, McNeal, Nicoll: Medio para el cultivo de *Leishmanias*. (14)

Mutágeno: Dícese de los distintos agentes físicos o químicos capaces de inducir a mutación a los distintos materiales biológicos que constituyen la dotación genética de los seres vivos. (20)

Nistagmo: Es un término para describir movimientos rápidos e involuntarios de los ojos que pueden ser:

- De un lado a otro (nistagmo horizontal)
- Arriba y abajo (nistagmo vertical)
- Rotatorio (nistagmo rotatorio o de torsión)

Dependiendo de la causa, estos movimientos pueden ser en ambos ojos o sólo en uno. El término "ojos danzantes" se ha usado para describir el nistagmo. (23)

Nitroimidazoles: Los Nitroimidazoles son profármacos que se activan en el interior de las células sensibles reduciendo su grupo nitro por la ferredoxina del parásito, formando un compuesto reactivo que interfiere en el transporte de electrones y rompe el DNA. Este grupo de fármacos poseen son activos contra protozoarios y algunas bacterias. (1)

Parestesias: Es una condición donde una parte del cuerpo, generalmente un pie o una mano, comienza a sentir un hormigueo y se adormece. (23)

Peridomésticos: Que vive en los alrededores de las viviendas humanas. (11)

Quimiotaxonomía: Estudio de la composición química de las plantas. Que parte del supuesto de que las plantas que contienen una determinada sustancia están emparentadas entre sí. Pero no siempre es así. (15)

Transmisión Vectorial: Se produce a través del *Triatoma dimidiata* (chinche). La transmisión se produce cuando el vector infectado defeca el tripanosoma al picar al ser humano o reservorio. (21)

ANEXOS



Antiguo Cuscatlán, 12 de Septiembre de 2014

A quien interese

Por medio de la presente nota hago constar que, Sandra Marlene Ramírez Abrego y Lorena Guadalupe Cardona López, estudiantes de Carrera de Licenciatura en Química y Farmacia de La Universidad de El Salvador, se hicieron presente al herbario de nuestra institución con una muestra botánica estéril conocida comúnmente como plumajillo o cola de zorro, la cual se identificó como: *Alvaradoa amorphoides* Liebm. (SIMAROUBACEAE)

Y para lo que las interesadas estimen conveniente se extiende la presente.

Atte.

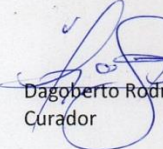

Dagoberto Rodríguez Galdiz
Curador



Figura N° 30: Documento que autentica la especie estudiada como *Alvaradoa amorphoides* Liebm.