

Efecto antiparasitario contra *Trypanosoma Cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae) de plantas de una Reserva Biológica de Costa Rica.

Antiparasitic effect of plants against *Trypanosoma Cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae) in a Biological Reserve from Costa Rica.

MISAEEL CHINCHILLA-CARMONA.¹, IDALIA VALERIO-CAMPOS¹, RONALD SÁNCHEZ-PORRAS.²
VANESSA BAGNARELLO-MADRIGAL.¹, JAVIER ALPIZAR-CORDERO¹, MARIBEL CORDERO-
VILLALOBOS¹, & DANIELA RODRÍGUEZ-CHAVES¹

¹ Departamento de Investigación, Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED), San José, Costa Rica; chinchillacm@ucimed.com; valeriaci@ucimed.com; danirodrigu@gmail.com, bagnarellomv@ucimed.com, alpizarcj@ucimed.com, corderomv@ucimed.com

² Sección de Biología, Sede Occidente, Universidad de Costa Rica (UCR), San Ramón, Alajuela, Costa Rica; rsanchez@cariari.ucr.ac.cr

Summary

Different parts of 67 plants from the Biological Reserve Alberto Manuel Brenes (REBAMB) of Costa Rica, were studied for the presence of active components against *Trypanosoma Cruzi*. The hydroalcoholic extracts of fresh or dried materials, were analyzed, in principle, with pilot presumptive tests, and then more specific, for their potential activity against the parasite; the Silvio (ATCC-50799) strain was used in all analyzes. Plants with at least one of its parts with a $IC_{50} < 100 \text{ ug / mL}$ were: *Beilschmedia pendula*, *Bocconia frutescens*, *Guarea rhopalocarpa*, *Hydrocotyle mexicana*, *Povedadaphne quadriporata*, *Piper auritum*, *Ruagea glabra* and *Xanthosoma undipes*. Most of the fresh extracts showed activity against *T. cruzi*. The species *B. frutescens* had the major number of active parts and only 3 of all the extracts studied showed some degree of toxicity. The impact of these findings, represent alternatives in terms of treatment of Chagas disease.

Introducción

La Enfermedad de Chagas es una parasitosis ampliamente conocida, localizada fundamentalmente en Latinoamérica, con mayor presencia en los países del Cono Sur. Es causada por *Trypanosoma cruzi* y la patología más característica en el ser humano se ubica en el corazón y en órganos del sistema digestivo como el esófago y el intestino grueso del ser humano. Otros órganos pueden verse afectados, especialmente aquellos que albergan células del sistema retículo endotelial. El proceso agudo de la enfermedad involucra el miocardio, desarrollándose patología cardíaca que puede llevar a la muerte del paciente. Sin embargo, usualmente tiende a evolucionar hacia una condición crónica o latente. Bajo esta condición y de acuerdo con eventos inmunes ampliamente conocidos, se producen los llamados megas en los órganos intestinales, sintomatología típica de la fase crónica de esta entidad nosológica (Boletín ISP 2014).

En Costa Rica varios trabajos realizados demuestran la presencia de transmisores del parásito, tanto domiciliarios (Chinchilla & Montero-Gei 1967, Zeledón et al. 2005, Calderón et al. 2010) como silvestres (Valerio et al. 2009) y también serológicamente se han detectado varios casos humanos (Chinchilla et al. 2006). Sin embargo, los casos agudos de esta enfermedad son relativamente pocos, el último de ellos informado por Moreno & Valerio (2007). El tratamiento actual para la fase aguda

de esta parasitosis está circunscrito al Nifurtimox y al Benznidazol, medicamentos que presentan varios inconvenientes como lo son el tiempo prolongado del tratamiento, efectividad relativa, desarrollo de resistencia y toxicidad tisular y genética (Lopera et al. 2013). Con el fin de aminorar este tipo de reacciones a algunos fármacos preparados artificialmente, desde hace varios años se busca en las plantas componentes químicos con actividad antimicrobiana (Wink 2012, Bero et al. 2011, Gurib-Fakin et al. 2014, Valencia et al. 2011). Específicamente, se conocen varios estudios con plantas en busca de metabolitos activos contra parásitos de la Familia Trypanosomatidae tales como *T. cruzi* (Soeiro et al. 2009, Apt & Zulantay 2011). De acuerdo con esos trabajos, se ha informado de componentes químicos con actividad contra esta parasitosis en plantas de los géneros *Cinamomun* (Azeredo et al. 2014); *Carica* (Jiménez-Coello 2014); *Piper* (Lopes et al. 2008, Regasini et al. 2009); *Conchocarpus* y *Trichilia* (Ambrozin et al. 2004); *Cymbopogum* (Rojas et al. 2005, 2010); *Aloysia* (Rojas et al. 2012); *Eugenia* (Santos et al. 2012); *Aristeguietia* (Varela et al. 2014) y *Bocconia* (Ibañez et al. 2008, Yu et al. 2014). En Costa Rica, aunque se han hecho estudios sobre plantas con actividad contra otras parasitosis tales como malaria (Castro et al. 1996, Chinchilla et al. 1998, Chinchilla et al. 2001, Calderón et al. 2010, Chinchilla et al. 2011, 2012) toxoplasmosis (Chinchilla et al. 1990) y leishmaniosis (Chinchilla et al. 2014), no existen trabajos sistemáticos en el caso de la Enfermedad de

Chagas; solo existe una mención de algunas plantas usadas en la cura de enfermedad de Chagas (Sánchez 2007). Este trabajo tiene como objetivo fundamental el informar, por primera vez, de la presencia de algunas plantas en una Reserva Biológica, cuyos componentes químicos son activos contra *T. cruzi*.

Material Y Métodos

Plantas: De acuerdo con una selección previa, se colectaron varias partes de 67 especies de plantas presentes en la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (REBAMB) (Cuadro 1), para ser estudiadas por su posible actividad antiparasitaria contra *T. cruzi*. Esta Reserva se encuentra en una zona ubicada entre los 600 y 1 640 m de altura, con una temperatura promedio de 21°C y una humedad relativa del 98%, lo que establece la presencia de variados climas y nichos ecológicos (Sánchez 2000). El material fue seleccionado y colectado de acuerdo con las publicaciones de Barrantes (2004) y de Gomez-Laurito y Ortiz (2004) empleando los métodos previamente descritos (Chinchilla et al. 2011, 2012).

Tabla 1. Plantas de la REBAMB estudiadas por su actividad contra *Trypanosoma cruzi*.

Familia	Especie	Actividad	Partes activas
Acantaceae	<i>Aphelandra aurantiaca</i>	Negativa	Ninguna
Acantaceae	<i>Aphelandra tridentata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Beilschmiedia pendula</i>	Promisoria	HM
Papaveraceae	<i>Bocconia frutescens</i>	Promisoria	C-F-FI-FM-HM-HT-R
Cecropiaceae	<i>Cecropia obtusifolia</i>	Negativa	Ninguna
Cecropiaceae	<i>Cecropia peltata</i>	Promisoria	HM
Meliaceae	<i>Cedrela odorata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Cinnamomum chavarrianum</i>	Negativa	Ninguna
Ranunculaceae	<i>Clematis dioica</i>	Promisoria	HT
Boraginaceae	<i>Cordia cymosa</i>	Negativa	Ninguna
Boraginaceae	<i>Cordia megalantha</i>	Negativa	Ninguna
Euphorbiaceae	<i>Croton megistocarpus</i>	Ninguna	Ninguna
Euphorbiaceae	<i>Croton schiedeanus</i>	Negativa	Ninguna
Sapindaceae	<i>Cupania macrophylla</i>	Promisoria	F-HT
Myrtaceae	<i>Eugenia austini-smithii</i>	Promisoria	HT
Myrtaceae	<i>Eugenia sp</i>	Negativa	Ninguna
Arecaceae	<i>Euterpe precatoria</i>	Negativa	Ninguna
Meliaceae	<i>Guarea bullata</i>	Negativa	Ninguna
Meliaceae	<i>Guarea glabra</i>	Promisoria	FI-HM
Meliaceae	<i>Guarea kunthiana</i>	Promisoria	HM

Annonaceae	<i>Gutteria iondicii</i>	Negativa	Ninguna
Malvaceae	<i>Hampea appendiculata</i>	Negativa	Ninguna
Tiliaceae	<i>Helicarpus appendiculatus</i>	Negativa	Ninguna
Hernandiaceae	<i>Hernandia stemura</i>	Negativa	Ninguna
Campanulaceae	<i>Hippobroma longiflora</i>	Negativa	Ninguna
Apiaceae	<i>Hydrocotyle mexicana</i>	Promisoria	HM
Arecaceae	<i>Iriartea deltoidea</i>	Negativa	Ninguna
Caricaceae	<i>Jacaranda spinosa</i>	Negativa	Ninguna
Asteraceae	<i>Liabum bourgenii</i>	Negativa	Ninguna
Fabaceae	<i>Lonchocarpus pentaphyllus</i>	Negativa	Ninguna
Fabaceae	<i>Machaerium sp</i>	Negativa	Ninguna
Asteraceae	<i>Mikania holwayana</i>	Promisoria	F-HM
Urticaceae	<i>Myriocarpa longipes</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Nectandra membranacea</i>	Promisoria	F-HM-HT
Asteraceae	<i>Neuolaena lobata</i>	Promisoria	C-FI-HT
Lauraceae	<i>Ocotea dentata</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Persea povedae</i>	Promisoria	FM
Piperaceae	<i>Piper aurinum</i>	Promisoria	F-HM
Piperaceae	<i>Piper friedrichshalii</i>	Negativa	Ninguna
Sapotaceae	<i>Pouteria congestifolia</i>	Negativa	Ninguna
Lauraceae	<i>Povedadaphne quadriporata</i>	Promisoria	R
Rosaceae	<i>Prunus annularis</i>	Negativa	Ninguna
Mirtaceae	<i>Psidium gnajava</i>	Promisoria	HM
Rubiaceae	<i>Psychotria elata</i>	Negativa	Ninguna
Rubiaceae	<i>Psychotria sp</i>	Negativa	Ninguna
Fabaceae	<i>Pterocarpus hayesii</i>	Negativa	Ninguna
Fagaceae	<i>Quercus cortesia</i>	Negativa	Ninguna
Fagaceae	<i>Quercus insignis</i>	Negativa	Ninguna
Annonaceae	<i>Rollinia pittier</i>	Negativa	Ninguna
Meliaceae	<i>Ruagea glabra</i>	Promisoria	FI-FM
Anathaceae	<i>Ruellia tubiflora</i>	Negativa	Ninguna
Caprifoliaceae	<i>Sambucus canadensis</i>	Negativa	Ninguna
Caesalpinaceae	<i>Senna papillosa</i>	Negativa	Ninguna
Siparunaceae	<i>Siparuna thecaphora</i>	Negativa	Ninguna
Solanaceae	<i>Solanum arboreum</i>	Negativa	Ninguna
Solanaceae	<i>Solanum quitoense</i>	Negativa	Ninguna
Bignoniaceae	<i>Tabebuia chrysantha</i>	Negativa	Ninguna
Apocynaceae	<i>Tabernaemontana longipes</i>	Negativa	Ninguna
Ticodendraceae	<i>Ticodendron incognitum</i>	Negativa	Ninguna
Urticaceae	<i>Urera baccifera</i>	Promisoria	F
Asteraceae	<i>Vernonia patens</i>	Promisoria	HT
Clusiaceae	<i>Vismia baccifera</i>	Promisoria	C-FI
Solanaceae	<i>Witheringia solanacea</i>	Negativa	Ninguna
Araceae	<i>Xanthosoma undipes</i>	Promisoria	HM-HT
Rutaceae	<i>Zanthoxylum juniperinum</i>	Negativa	Ninguna

C: corteza F: flor FI: fruto inmaduro FM: fruto maduro HM: hojas maduras HT: hojas tiernas R: raiz

Resumiendo, las diferentes partes de la planta tales como corteza, flores, hojas maduras y tiernas, así como frutos maduros e inmaduros y raíz, fueron empacadas en bolsas plásticas. Estas se depositaron en un recipiente con hielo y se transportaron al Laboratorio de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED) para su respectivo procesamiento.

Preparación de los extractos: Después de lavar y triturar todas las partes de las plantas, una porción fue enviada inmediatamente para ser sometida al proceso de extracción constituyendo el material fresco de estudio. Otra porción fue secada y finamente triturada; este material fue denominado como extracto seco en este estudio; ambas porciones fueron procesadas como se ha descrito previamente (Chinchilla et al. 2013). Brevemente, 15 g del material fresco o seco fueron sometidos a un proceso de extracción con etanol al 70% por una semana, a temperatura ambiente y con agitación ocasional. Los extractos hidroalcohólicos fueron filtrados y concentrados a 40°C usando un rotavapor (Buchi R-114) para eliminar el alcohol.

Parásitos: Epimastigotos de la cepa Silvio (ATCC-50799) fueron mantenidos en medio de Rugai para su correspondiente uso; el medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, fue usado específicamente para los experimentos correspondientes.

Ensayos in vitro: Se realizaron experimentos previos para seleccionar las plantas promisorias con actividad contra *T. cruzi*. Para ello se estudiaron extractos frescos y secos de diferentes partes de la planta diluidos 1:20 en solución salina bufferizada (PBS) agregando, algunas veces, DMSO para facilitar la disolución de los extractos. A estas diluciones se agregaron 10^5 a 10^6 epimastigotos y estas mezclas junto con los respectivos controles, fueron incubadas a 4° C por 24 horas (Vieira et al. 2001) determinando luego la viabilidad de los parásitos por medio de la conocida técnica del azul tripano. Aquella preparación que presentó más del 50% de parásitos teñidos, fue considerada como promisorias en cuanto a su actividad contra *T. cruzi*. Para una segunda prueba confirmatoria de la potencia de la actividad encontrada, diluciones dobles de 1:20 a 1:160 fueron preparadas para cada uno de los extractos positivos; estas diluciones fueron procesadas como fue descrito

para las pruebas preliminares.

Extractos en que los parásitos presentaron una viabilidad menor del 50% en diluciones de 1:80 en adelante, se consideraron positivos y fueron seleccionados para los siguientes procesos. El paso a seguir fue la determinación de la concentración mínima inhibitoria en $\mu\text{g/mL}$ (CI_{50}) que consiste en establecer la cantidad del producto activo necesario para disminuir el movimiento o causar de muerte del 50% de los organismos. Con este objetivo se repitieron las pruebas anteriores pero usando esta vez, los extractos positivos con peso seco previamente conocido.

Pruebas de toxicidad: El efecto de los extractos en cuanto a su actividad lítica y aglutinante sobre glóbulos rojos fue medido en estas pruebas. Para ello seguimos los procedimientos descritos por (Luize et al. 2005) con ligeras modificaciones, métodos que han sido descritos en detalle previamente (Chinchilla et al. 2014). En resumen, glóbulos rojos de ratones blancos fueron sometidos al tratamiento con diferentes diluciones de los extractos por 24 h a 4 °C. El efecto lítico o aglutinante de los extractos fue analizado considerando tóxicos aquellos que presentaran el efecto en diluciones iguales o mayores de 1:80.

Análisis estadísticos: Los resultados finales en el cálculo de CI_{50} son obtenidos de acuerdo con el método de Probit (Díaz et al. 2004).

Resultados

De las 67 plantas estudiadas, 23 fueron consideradas promisorias en la primera prueba presuntiva (Tabla 1), positividad que se confirmó en una segunda prueba usando diluciones de 1:80 y 1:160; los resultados fueron positivos para extractos frescos o secos de ciertas partes de cada planta (Tabla 2). Todas las plantas no promisorias fueron descartadas y no se les siguió ningún proceso posterior. Dado que en el cuadro 2 se nota que varias partes de las plantas son positivas en los extractos frescos o en los secos, se procedió a realizarles CI_{50} a todos ellos para así determinar la verdadera potencia del efecto contra *T. cruzi*. En la tabla 3 se presentan las 8 plantas cuyo CI_{50} fue menor a 100 $\mu\text{g/mL}$, índice máximo aceptado por varios autores (Kakar et al. 2013) como indicador de actividad antiparasitaria importante. Se nota que *B. frutescens* fue la planta

que presentó mayor cantidad de partes positivas en algunas de las cuales se encontraron los valores más bajos (mejor actividad) del CI₅₀; el extracto de raíz fresco presentó la actividad antiparasitaria inducida por la menor cantidad del componente (CI₅₀. 4.4 µg/ml). El número de extractos con alguna actividad demostrada bajo este parámetro fue de 14, de los cuales 8 eran frescos y 6 eran secos. En la mayoría de los extractos la toxicidad estuvo ausente o fue muy ligera, con excepción de las hojas tiernas de *X. undipes* que sí mostraron ser muy tóxicas (Tabla 4).

Tabla 2. Actividad de varias partes de plantas de la REBAMB sobre epimastigotos de *Trypanosoma cruzi*.

Familia	Género	Actividad antiparasitaria (Dilución positiva 1/—)															
		C		F		FI		FM		HM		HT		R			
		f	s	f	s	f	s	f	s	f	s	f	s	f	s		
Lauraceae	<i>B. pendula</i>									160							
Papaveraceae	<i>B. frutescens</i>	160	160	160		160	160	160	160	160	160	160	160	160	160		
Cecropiaceae	<i>C. peltata</i>									160							
Ranunculaceae	<i>C. dioica</i>											160					
Sapindaceae	<i>C. macrophylla</i>		160									80					
Myrtaceae	<i>E. ussuri-smithii</i>												160				
Meliaceae	<i>G. glabra</i>							80									
Meliaceae	<i>G. kunthiana</i>									160							
Meliaceae	<i>G. rhopalocarpa</i>	80															
Apiaceae	<i>H. mexicana</i>							80	80								
Asteraceae	<i>M. holroyana</i>		160							160							
Lauraceae	<i>N. membranacea</i>		80							160		160					
Asteraceae	<i>N. lobata</i>		160							160		160					
Lauraceae	<i>P. povesiac</i>									160							
Piperaceae	<i>P. auritum</i>			160						160							
Lauraceae	<i>P. quadripurata</i>												160				
Mirtaceae	<i>P. guianae</i>									160							
Meliaceae	<i>R. glabra</i>					160		80									
Anacardiaceae	<i>T. mexicana</i>									80							
Urticaceae	<i>U. bucaifera</i>			160													
Asteraceae	<i>V. patens</i>											80					
Clusiaceae	<i>V. baccifera</i>	160				80	160										
Araceae	<i>X. undipes</i>									80		80					

C: corteza F: flor FI: fruto inmaduro FM: fruto maduro HM: hojas maduras HT: hojas tiernas R: raíz f: extracto fresco s: extracto seco

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria anti-*Trypanosoma cruzi* (CI₅₀, mg/mL) de los extractos frescos (F) y secos (S) de las partes positivas de plantas de la REBAMB.

Especie	Parte de la planta															
	C		F		FI		FM		HM		HT		R			
	f	s	f	s	f	s	f	s	f	s	f	s	f	s		
<i>B. pendula</i>															70.0	
<i>B. frutescens</i>	19.4	14.2	56.9				14.1					50.6		4.4		
<i>G. rhopalocarpa</i>	88.8															
<i>H. mexicana</i>									81.3	83.8						
<i>P. quadripurata</i>														91.9		
<i>P. auritum</i>											60*					
<i>R. glabra</i>							48.6									
<i>X. undipes</i>													75.0			

C: corteza F: flor FI: fruto inmaduro FM: fruto maduro HM: hojas maduras HT: hojas tiernas R: raíz f: extracto fresco s: extracto seco
Categorización de actividad de CI₅₀.
De 1 a 10: muy activo; >10 a 50: activo; >50 a 100: sospechoso * Las hojas tenían agallas

Tabla 4. Relación entre la toxicidad máxima *in vitro* (diluciones 1:80, 1:160) y la actividad contra *Trypanosoma cruzi* de las partes positivas de plantas de la REBAMB.

Especie	Actividad lítica o aglutinante				
	Ligera		Intensa		Ausente
	1:80	1:160	1:80	1:160	
<i>B. pendula</i>			HM		
<i>B. frutescens</i>					C,F, HT, R, Cs
<i>G. rhopalocarpa</i>	C				
<i>H. mexicana</i>					HM, HMs
<i>P. auritum</i>					HMs
<i>P. quadripurata</i>					R
<i>R. glabra</i>			FIs		
<i>X. undipes</i>				HT	

C: corteza F: flor FI: fruto inmaduro FM: fruto maduro HM: hojas maduras HT: hojas tiernas R: raíz s: extracto seco

Discusión

El tratamiento de la Enfermedad de Chagas puede ser logrado con cierto éxito durante su fase aguda, ya que en el estado crónico en que intervienen una serie de factores ajenos a la acción del parásito per se, los fármacos conocidos no tienen buen efecto (Apt & Zulantay 2011; Lopera et al. 2013). El Nifurtimox y el Benznidazol son difíciles de encontrar en Costa Rica y otros países. Además estos medicamentos presentan una toxicidad importante para el ser humano (Kakar et al. 2013) por lo que el tratamiento de la Enfermedad de Chagas debe darse bajo vigilancia médica. Por estas razones existe un interés mundial en encontrar otras alternativas tales como el uso de ciertos bloqueadores o inhibidores de enzimas fundamentales en el proceso bioquímico de la reproducción de *T. cruzi*. (Da Silva et al. 2014). El hecho de que investigadores de todos los continentes han vuelto la vista también hacia los productos naturales como otra posibilidad para el tratamiento de esta y otras enfermedades, (Goel & Sharma 2014, Gurib-Fakim 2014, Gohari et al. 2008), impulsa a que se realicen estudios similares en un país que como el nuestro, posee una importante biodiversidad

botánica. Dentro de los países epidemiológicamente, relacionados con esta enfermedad, tenemos estudios en América del Sur (Azeredo et al. 2014, Calderón et al. 2002, Cardoso & Soares 2010, Lopera et al. 2013, Cozzari et al. 2010, Satalaya et al. 2009, Santos et al. 2012), en el Caribe y en Norte y Centro América (Gupta 2013, Cabrera 2013, Molina-Garza 2014, Jiménez-Coello et al. 2014). Aunque en Costa Rica se han hecho algunos estudios sobre el efecto de componentes de plantas contra parásitos tales como especies del género *Plasmodium* (Castro et al. 1996, Chinchilla et al. 2011, 2012), *Toxoplasma gondii* (Chinchilla et al. 1990) y *Leishmania* (Chinchilla et al. 2014), no existe ninguna información sobre plantas cuyos componentes químicos actúen contra *T. cruzi*.

Dado que en nuestro país se ha informado de casos humanos de la Enfermedad de Chagas, el más reciente descrito por (Moreno & Valerio 2007), la búsqueda de una alternativa natural para posibles componentes activos contra *T. cruzi* en plantas costarricenses se hace imperativo. Los datos que se observan en los respectivos cuadros nos muestran que, aunque 22 de las 67 plantas estudiadas presentaron una actividad antiparasitaria considerada como promisorias, cuando se hicieron análisis más específicos, especialmente al realizar el cálculo del CI₅₀, este número se redujo a 8 especies con CI₅₀ menor a 100 µg/mL; límite establecido por Kakar et al. 2013, entre otros autores, para que una planta se considere al menos, levemente activa contra el parásito. Un porcentaje mayor de extractos, 8 de los 14 extractos activos (57%), eran frescos, hecho muy similar a lo informado previamente en un estudio con *Leishmania* sp. (Chinchilla et al. 2014). Este aspecto refleja, en parte, la importancia del análisis de material fresco en este tipo de estudios. Además representa cierta congruencia con lo que sucede en los tratamientos populares donde usualmente se utiliza el material sin secar (Idowu et al. 2010). El número de plantas con componentes activos contra *T. cruzi*, cuyo CI₅₀ fue menor de 100 µg/mL, resultó ser más bajo que las halladas en un estudio similar del efecto anti-*Leishmania* realizado con las mismas plantas (Chinchilla et al. 2014). Este hecho correlaciona con lo que se conoce en la literatura, ya que existen muchos estudios con *Leishmania* pero no es igual para *T. cruzi*. Para este parásito, las plantas que han presentado actividad pertenecen a las familias Anonaceae, (Laundry de

Mesquita et al. 2005, Ocampo & Ocampo 2006), (Papaveraceae et al. 1994, Yu et al. 2014), Piperaceae (Lopes et al. 2008, Regasini et al. 2009) Lauraceae (Stokes et al. 2007) de las cuales nosotros estudiamos algunas especies con resultado negativo en la mayoría de ellas. Dentro de la familia Lauraceae, una de cuyas especies, *Nectandra membranacea*, fue encontrada muy activa contra *Plasmodium berghei* en estudios anteriores (Chinchilla et al. 2011, 2012), encontramos la especie *Bleishmedia pendula* cuyas hojas maduras también presentaron alguna actividad contra *T. cruzi*. Lo mismo sucede con *Ruaagea glabra* de la familia Meliaceae, con plantas que tienen componentes activos contra agentes etiológicos de la malaria y cuyo fruto maduro tiene también efecto anti-tripanicida. La planta que presentó una mayor actividad en la mayoría de sus partes fue *Bocconia frutescens* de la familia Papaveraceae. En algunos informes se mencionan especies de esta familia, *B. intergrifolia* y *B. pearcei* por ejemplo (Fournet et al. 1994), y en el caso de *B. frutescens* (Yu et al. 2014) menciona el hallazgo de varios componentes tanto en esta especie como en otras del género. En relación con las otras especies de otras familias que se mencionan en este estudio con alguna actividad contra *T. cruzi*, no se encontraron reportes previos.

Con excepción de *X. undipes* cuyo extracto positivo fue muy tóxico para eritrocitos de ratón, en las otras plantas los extractos fueron ligeramente tóxicos o no lo fueron del todo; esto es importante para la ejecución de las pruebas siguientes con células cultivadas in vitro o en animales de laboratorio. Otro aspecto a considerar es la ventaja que significa el que estas plantas se encuentren protegidas en una Reserva Biológica, lo cual las resguarda del peligro de su extinción como ha sido mencionado por (Dharani et al. 2010), entre otros autores. El aporte de este estudio que es de tipo científico y cultural, también contribuye, desde el punto de vista médico, en la exploración de las posibilidades terapéuticas de plantas tropicales con poder antiparasitario. Tarde o temprano estos estudios podrían repercutir positivamente en la salud de los seres humanos. Análisis específicos para identificar los componentes responsables de la actividad encontrada en las plantas respectivas, se encuentran en proceso en nuestros laboratorios.

Agradecimientos:

Los autores agradecen el patrocinio de este estudio, al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) y al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por medio de los proyectos FI-291-09 y FI-490-11, al Departamento de Investigación de la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED) y al Centro Regional de Occidente, Universidad de Costa Rica. Agradecimiento especial para el señor Víctor Mora por la identificación de las plantas, a Juan Carlos Vanegas por los análisis estadísticos y a Laura Valerio encargada de la logística del desarrollo de los proyectos. Reconocemos también la colaboración de los señores José Bolaños, Luis León y Hugo Pérez por su labor asistencial y manejo de animales de laboratorio. También a un grupo de estudiantes de la UCIMED que colaboraron en el proyecto.

Referencias

- Ambrozín PAR, Vieira PC, Batista Fernandez J, Fernandes Da Silva MFG, Albuquerque S. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae plant extract. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004; 99: 227-231.
- Anselin L, Syabri I, Kho Y. GeoDa: an introduction to spatial data analysis. *Geographical analysis.* 2006; 38: 5-22.
- Apt W, Zulantay A I. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Med Chile.* 2011;139: 247-257.
- Azeredo C, Santos T, Lameiro De Noronha B & Soares M. *In vitro* biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Compl Alt Med.* 2014 ; 14: 309-316.
- Barrantes L T. Flora del sotobosque de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes, San Ramón, Alajuela, Universidad de Costa Rica: Coordinación de Investigación, Sede de Occidente. (Consultado: 03 Enero 2015. Disponible de <http://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/8982/>). 2004.
- Bero J, Hannaert V, Chataigné G, Herent MF, Quetin-Leclercq J. *In vitro* anti-trypanosomal and anti-leishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. *J Ethnopharmacol.* 2011 ;137: 998-1002.
- Boletín Instituto De Salud Pública De Chile, Junio 2014. 4. (Consultado: 12 enero 2015). Disponible en http://www.ispch.cl/sites/default/files/Chagas%2023-06-2014_0.pdf. 2014.
- Cabrera M. Búsqueda de productos naturales con actividad anti-*Trypanosoma cruzi*: nuestra experiencia, Primer Congreso Nacional de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas: "Dr. Rafael A. Cedillos", El Salvador. 2013.
- Calderón AI, Romero LI, et al. Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria, Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharm Biol.* 2010 ;48: 545-53.
- Calderón-Arguedas O, Troyo A, Castro A, Guerrero O & Chinchilla M. Infestación por vectores de la enfermedad de Chagas en cuatro zonas endémicas de la meseta central de Costa Rica. *Parasitol Latinoam.* 2002; 57: 88-95.
- Cardoso J, Soares MJ. *In vitro* effects of Citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz ;* 2010;105: 1026-1032.
- Castro O, Barrios M. & Guerrero O.M. Evaluación química y biológica del efecto de extractos de plantas contra *Plasmodium berghei*. *Rev Biol Trop.* 1996; 44: 361-367.
- Chinchilla-Carmona M, Valerio-Campos I, et al. Actividad contra *Leishmania* sp. (Kinetoplastida: *Trypanosomatidae*) de plantas en una Reserva Biológica de Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 2014; 62: 1229-1240.
- Chinchilla M, Montero-Gei F. Observaciones sobre las condiciones de la vivienda en relación con la presencia de los transmisores de la enfermedad de Chagas en el cantón de Santa Ana. *Acta Med Cost.* 1967; 10: 19-30.
- Chinchilla M, Castro A, Reyes L, Guerrero O, Calderón-Arguedas O & Troyo A. Enfermedad de Chagas en Costa Rica. Estudio comparativo en dos épocas diferentes. *Parasitol Latinoam.* 2006; 61: 138-145.
- Chinchilla M, Guerrero OM, Tamayo G, Sittenfeld A. Empleo de técnicas y materiales biológicos en la búsqueda de productos activos contra la malaria. *Información Tecnológica.* 2001;12: 187-192.
- Chinchilla M, Valerio I, Sánchez R, Mora V, Bagnarello V, Martínez L, González A, Vanegas JC, Apéstegui A. *In vitro* antimalarial activity of extracts of some plants from a biological reserve in Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 2012; 60: 881-891.
- Chinchilla M, Valerio I, Sánchez R, Mora V, Bagnarello V, Martínez L, González A., Vanegas JC. Evaluación *in vivo* de la actividad anti-malárica de 25 plantas provenientes de una

- reserva de Conservación Biológica de Costa Rica. *Rev Chil Hist Nat.* 2011; 84: 115-123.
- Chinchilla M, Guerrero OM, Abarca G, Barrios M & Castro O. An in vivo model to study the anti-malaric capacity of plants extracts. *Rev Biol Trop.* 1998; 46: 35-39.
- Chinchilla M, Marín R & Catarinella G. Increase of sulfadiazine effect against *Toxoplasma gondii* by using watermelon or cantaloupe seeds. *Rev Biol Trop.* 1990; 38: 235-241.
- Cozzari J, Feresin G, Tapia A & Barrera PA. Acción de compuestos naturales obtenidos de plantas de la zona Cuyo sobre *Trypanosoma cruzi* (Consultado: 12 Enero 2015). Disponible en <http://www.fem.uncu.edu.ar/jornadas2010/index.php/articulos/view/67>) 2010.
- Da Silva Junior E.N, Jardim G.A.M, Menna-Barreto R.F.S & De Castro S. Anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of Naphthoquinones and derivatives. *J Braz Chem Soc.* 2014; 25: 1780-1798.
- Dharani N , Rukunga G , Yenesew A , Mborra A , Mwaura L & Dawson I J jamnadass R. Common Antimalarial Trees and Shrubs of East Africa: a description of species and guide to cultivation and conservation through use: The World Agroforestry Centre (ICRAF) (Consultado: 20 Enero 2015) Disponible en: http://www.ku.ac.ke/schools/environmental/images/stories/research/anti_malarial_shrubs.pdf). 2010.
- Díaz Báez M.C, Bulus Rossine G.D, Pica Granados Y & In G. Castillo-Morales (Ed.) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. México: IMTA. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. 2004; 99-124.
- Fournet A, Barrios AA & Muñoz V. Ethnopharmacology. leishmaniacidal and trypanocidal activities of bolivian medicinal plants. *Ethnopharmacol.* 1994; 41: 19-37.
- Gohari AR, Saeidnia S, Hadjiakhoondi A, Naghinejad A & Yagura T. Trypanocidal activity of some medicinal plants against the epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Med Plants.* 2008 ; 7: 44-48.
- Goel A & Sharma K. Plant Extracts and Phytochemicals as Herbal Medicines and Antimicrobials. *Int J Biol Med Res.* 2014; 5: 3940-3946.
- Gomez-Laurito J & Ortiz R. Lista con anotaciones de las angiospermas de los ríos San Lorenzo y San Lorencito, Costa Rica. *Lankesteriana.* 2004; 4: 113-142.
- Gupta M.P. Cuatro décadas de investigaciones farmacognosias sobre la flora panameña. *Tecnociencia.* 2013; 15.
- Gurib-Fakim A, Bero J, Kpoviessi S & Quetin-Leclercq J, 2014. Anti-Parasitic activity of essential oils and their active constituents against *Plasmodium*, *Trypanosoma* and *Leishmania*. (Consultado: 12 Febrero 2015) Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118460566.ch33/summary>)
- Ibañez-Calero S.L, Ruiz G, Michel R & Sauvain M. Evaluación de la flora en el valle de Zongo contra *Leishmania* y Chagas. *Rev. Bol. Quim.* 25. (Consultado: 30 enero 2015) disponible en: <http://revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S0250-5460200>) 2008.
- Idowu O.A, Soniral O.T, Ajana O & Aworinde D.O. Ethnobotanical Survey of antimalarial plants used in Ogun State, Southwest Nigeria. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2010; 4: 55-60.
- Jiménez-Coello M, Acosta-Viana KY, Ortega-Pacheco A & Pérez-Gutierrez S, Guzman-Marin E. In vivo antiprotozoal activity of chloroform extract from *Carica papaya* seeds against amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* during indeterminate and chronic phase of infection. 2014: 458263 (Consultado: 05 Febrero 2015) disponible en <http://dx.doi.org/10.1155/2014/458263>). 2014.
- Kakar A.M, Khan A.A, Nabi S, Kakar M.A, Yasinzai M & Al-Kahraman M.S.A. In vitro antileishmanial, cytotoxic activity and phytochemical analysis of *Thuspeinanta brahuica* leaves extract and its fractions. *Int J Pharma Bio Sci.* 2013; 2: 520-528.
- Laundry De Mesquitai M, Desrivottii J, Boriesii C, Fournetiii A, Elias De Paulaiv J, Grellierv P & Salmen Espindolai L. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005; 100: 783-787.
- Luize Shima P, Tatiana Shioji Tiunan, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Ciências Farmacêuticas*, 41. (http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s1516-93322005000100010&script=sci_arttext) 2005.
- Lopes AA, Lopez SN, Regasini LO, Junior JM, et al. In vitro activity of compounds isolated from *Piper crassinervium* against *Trypanosoma cruzi*. *Nat Prod. Res.* 2008; 22: 1040-1046.
- Lopera Valle J S1, Rojas Jiménez S1, Mejía Ochoa M1, Pamplona Sierra AP1, Marín Castro AE. Actividad

- tripanocida de plantas latinoamericanas, una futura alternativa terapéutica para la Enfermedad de Chagas. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol.* 2013; 72: 22-30.
- Luize Shima P, Tatiana Shioji Tiunan, Luis Gustavo Morello, Paloma Korehiza Maza Tânia Ueda-Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, Diógenes Aparício Garcia Cortez, João Carlos Palazzo De Mello, Celso Vataru Nakamura. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Ciências Farmacêuticas*, 41. (http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s1516-93322005000100010&script=sci_arttext) 2005..
- Molina-Garza ZJ, Bazaldúa-Rodríguez AE, Quintanilla-Licea R, Galaviz-Silva L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in Northeast Mexico. *Acta Trop.* 2014; 136: 14-18.
- Moreno-Medina E, Valerio-Campos I, Goyenaga-Castro P. Miocarditis y miocardiopatía dilatada por *Trypanosoma cruzi*: Reporte de un caso. *Parasitol Latinoam.* 2007;62: 148-153.
- Ocampo S DM, Ocampo C R Bioactividad de la Familia Annonaceae. *Revista Universidad de Caldas.* 2006; 135-155.
- Regasini LO, Cotinguiba F, Passerini GD, Da Silva Bolzani V, Barretto RM, Kato MJ Furlan M. *Trypanocidal* activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Rev Bras Farmacogn.* 19 (Consultado: 10 Febrero 2015) disponible en :<http://dx.doi.org/10.1590/S0120-65X2009000200003>) 2009.
- Rojas J, Ronceros S, Palacios O, Sevilla C. Efecto anti-*Trypanosoma cruzi* del aceite esencial *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (hierba luisa) en ratones Balb/c. *An fac med.* 2012;73: 7-12.
- Rojas J , Palacios O, Ronceros S. Efecto del aceite esencial de *Aloysia triphylla britton* (cedrón) sobre el *Trypanosoma cruzi* en ratones, *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 29: 61-68. (Consultado: 05 Febrero 2015) disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S1726-46342012000100009>). 2012.
- Rojas J, Solis H, Palacios O. Evaluación in vitro de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *An Fac Med.*, 71: 161-5.
- Sánchez R. 2000. Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes. Costa Rica: Edit. Tomás Saravil San Jose; 2010.
- Sánchez Z. Golpe de gato. Plantas que curan mal de Chagas. (Consultado: 27 Febrero 2015) disponible en:<http://golpedegato.blogspot.com/2007/03/plantas-que-curan-el-mal-de-chagas>). 2007.
- Santos Kka, Matias Eff, et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Exp Parasitol.* 2012; 131: 130-132.
- Satalaya R J, Rojas U J, Ríos B, Grandez Rengifo M, Ruiz G, Gutierrez D, Gimenez A & Flores N. Antiparasitic activity of medicinal plants from Peruvian Amazon BIOFARBO.2009; 17: 23-31.
- Soeiro Mn, Dantas Ap, et al. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from in vivo and in vitro studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 301-310.
- Stokes SI, Takaku S, Penton Af & Setzer Wf. et al. Cruzain inhibitory activity of leaf essential oils from neotropical Lauraceae. Actividad inhibidora de la cruzain de los aceites esenciales de la hoja de lauráceas neotropicales. Annual Meeting of the Society for Economic Botany, 48th Chicago US June 4-7. 2007. (Consultado: 15 Marzo 2015) disponible en: <http://cro.ots.ac.cr/rdmcnfs/datasets/biblioteca/pdfs/nbina-9738>.)
- Valencia L, Muñoz DI, Robledo Sm, Echeverri F, Arango GJ, Vélez I.D, Triana O. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica.* 31. (Consultado: 16 Marzo 2015) disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572011000400010&lng=en&nrm=iso) 2011.
- Valerio I, Chinchilla M, Sanchez R. *Triatoma dispar* nuevo transmisor silvestre de *Trypanosoma cruzi* en Costa Rica: su implicación en la epidemiología de la Enfermedad de Chagas. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol.* 2009; 68: 137-141.
- Varela J, Serna E, Torres S, Yaluff G, Vera De Bilbao Ni, Miño P, Chiriboga X, Cerecetto H & Gonzalez M. *In Vivo* Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of Hydro-ethanolic Extract and Isolated Active Principles from *Aristeguietia glutinosa* and Mechanism of Actions Studies. *Molecules.* 2014; 19: 8488-8502.
- Wink M. Medicinal Plants: A Source of Anti- Parasitic Secondary Metabolites. *Molecules.*2012; 17: 12771-12791.
- Yu X, Gao X, Zhu Z, Cao Y, Zhang Q, Tu P, & Chai X. Alkaloids from the Tribe Bocconieae (Papaveraceae): A Chem Biol R. *Molecules.* 2014; 19: 13042-13060.
- Zeledón R, Calvo N, Montenegro VM, Lorosa S. E & Arévalo C. A survey on *Triatoma dimidiata* in an urban area of the province of Heredia, Costa Rica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio.* 2005; 100: 507-512.

