

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**“ESTUDIO DE PLANTAS ANTIPARASITARIAS DE LA FARMACOPEA
TACANA:
Galipea longiflora y *Ficus spp.*”**

“Tesis de Pos-grado para optar al título de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y Biomédicas en la mención de QUÍMICA FARMACÉUTICA Y PRODUCTOS NATURALES”

Elaborado por:

Lic. Marcia Gabriela Quiroga Selaez

**La Paz – Bolivia
2015**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS**



**“ESTUDIO DE PLANTAS ANTIPARASITARIAS DE LA FARMACOPEA
TACANA:
Galipea longiflora y *Ficus spp.*”**

“Tesis de Pos-grado para optar al título de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y Biomédicas en la mención de QUÍMICA FARMACÉUTICA Y PRODUCTOS NATURALES”

Elaborado por:

Lic. Marcia Gabriela Quiroga Selaez

Asesores:

Alberto Giménez Turba Ph. D.

Esther Ninoska Flores Quisbert Ph. D.

Efraín Salamanca Capusiri Mg. Sc.

**La Paz – Bolivia
2015**

Esta tesis se la dedico a Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy.

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes quienes han sido y son mi motivación, inspiración y felicidad. Por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por haberme brindado la oportunidad de crecer profesionalmente y aprender cosas nuevas; así como participar en el Proyecto de “Desparasitación en Escuelas Rurales II”.

A mis directores de tesis, Dr. Alberto Giménez, Dra. Ninoska Flores y Efraín Salamanca, por su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas. Por transmitirme sus conocimientos y brindarme su amistad.

A mis buenos amigos por todos los momentos que pasamos juntos. Por las tareas que realizamos juntos y por todas las veces que a mí me explicaron gracias. Por la confianza que en mí depositaron.

Y a todas las personas por su colaboración directa e indirectamente para la realización del presente trabajo.

RESUMEN

Farmacopea Tacana

Se realizó el estudio de 2 especies vegetales antiparasitarias de la Farmacopea Tacana: *Galipea longiflora* (Evanta) y *Ficus spp.* (Ojé). El estudio de la Evanta comprende a su vez: el **estudio de plantines** de diferentes tamaños, este se centra en el análisis de variaciones de la mezcla de alcaloides quinolínicos y la actividad antiparasitaria frente a la variación del tamaño del plantin; y la **validación del uso tradicional como antiparasitario**, mediante un estudio de campo, que compara la efectividad de la decocción de alcaloides de Evanta en jugo de naranja, frente a un fármaco de actividad reconocida (Mebendazol). En el caso del **Ojé**, se realizaron estudios comparativos de las proteasas contenidas en su látex, colectado en diferentes zonas [Iquitos-Perú; Provincia Sud Yungas y Provincia Abel Iturralde, La Paz-Bolivia]

Materiales y métodos

En el estudio de plantines se obtuvieron los alcaloides totales de plantin (PAT), los cuales fueron analizados por cromatografía de gases - masas (GC/MS) y evaluados frente a promastigotes de *Leishmania*.

Para la validación de Evanta como antiparasitario, se realizó un examen coproparasitológico seriado a niños de la escuela Charcas II, aplicando el método de Ritchie para la evaluación microscópica.

En el estudio del Ojé, se emplearon métodos de cuantificación de proteínas (Biuret), determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína (Cristen-Marshall) y leche (Balls y Hoover), además de caracterización por SDS-PAGE.

Resultados

Se identificaron hasta 14 alcaloides quinolínicos, 5 de ellos comunes entre adultos y plantines, otros aparecen cuando el plantin tiene mayor edad. Se obtuvo una mejor actividad biológica para los plantines con respecto al árbol adulto.

La validación de Evanta como antiparasitario, en general, muestra un control en los niveles de parasitosis y la disminución de parásitos por muestra. A nivel de tratamientos tanto la decocción de Evanta como el Mebendazol presentan alta tasa de curación para helmintos, en protozoarios los niveles de eliminación son mínimos. La administración de placebo (2013) confirma la eficacia de los tratamientos al existir un incremento en la prevalencia de parásitos; reapareciendo parásitos que se habían eliminado y otros que no se reportaron al inicio del estudio.

El estudio del látex de Ojé muestra concentraciones de proteínas, actividad proteolítica y especies proteínicas por SDS-PAGE variables entre zonas de colecta. Además de la conservación

TABLA DE CONTENIDO

INTRDUCCION

	Pag.
1. CAPITULO 1. ESTUDIO QUÍMICO BODIRIGIDO DE PLANTINES DE <i>Galipea longiflora</i> (EVANTA)	
1.1 RESUMEN	1
1.2 ANTECEDENTES	2
1.2.1 <i>Galipea longiflora</i>	2
1.2.2 Estudios químicos y biológicos del genero <i>Galipea</i>	4
1.3 OBJETIVO	9
1.4 METODOLOGIA	10
1.4.1 Recolección del material vegetal	11
1.4.2 Obtención del concentrado de alcaloides totales (AT)	11
1.4.3 Método de cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG/MS) para la caracterización de alcaloides de Evanta (<i>Galipea longiflora</i>)	12
1.4.4 Evaluaciones antiparasitarias in vitro	12
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIONES	13
1.5.1 Recolección del material vegetal	13
1.5.2 Obtención del concentrado de alcaloides totales de Plantines (PAT)	14
1.5.3 Caracterización de alcaloides de Evanta (<i>Galipea longiflora</i>) por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG/MS)	15
1.5.4 Actividad biológica in vitro	22
1.6 CONCLUSIONES	25
1.7 REFERENCIAS	26
2. CAPITULO 2. ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE LA DECOCCIÓN DE CORTEZA DE <i>Galipea longiflora</i> (EVANTA) EN JUGO DE NARANJA COMO TRATAMIENTO EN LA DESPARASITACIÓN DE NIÑOS EN EDAD ESCOLAR	
2.1 RESUMEN	28
2.2 ANTECEDENTES	29
2.2.1 Parasitosis intestinales	30
2.2.2 Parasitosis Intestinales en Bolivia	32
2.2.2.1 <i>Giardia lamblia</i>	33

2.2.2.2	<i>Blastocystis hominis</i>	33
2.2.2.3	<i>Ascaris lumbricoides</i>	33
2.2.2.4	<i>Trichuris trichiuria</i>	33
2.2.2.5	<i>Strongiloides stercoralis</i>	34
2.2.2.6	<i>Uncinarias</i>	34
2.2.3	Tratamientos contra las Parasitosis	35
2.3	OBJETIVO	37
2.4	METODOLOGIA	38
2.4.1	Preparación de la emulsión de alcaloides totales de <i>Galipea longiflora</i>	39
2.4.2	Cuantificación de alcaloides totales, presentes en la decocción de <i>G. longiflora</i> en jugo de naranja, por HPLC	39
2.4.3	Estudio de campo controlado	39
2.4.3.1	Población	40
2.4.3.2	Diagnostico coproparasitológico	41
2.4.3.3	Recolección de muestras fecales	41
2.4.4	Procesamiento y análisis de las muestras fecales	41
2.4.4.1	Examen macroscópico de las muestras fecales	41
2.4.4.2	Método de Concentración de Ritchie	41
2.4.4.3	Parámetros de análisis	42
2.4.4.4	Análisis estadístico	42
2.5	RESULTADOS Y DISCUSION	43
2.5.1	Cuantificación de alcaloides totales, presentes en la decocción de <i>G. longiflora</i> en jugo de naranja, por HPLC	43
2.5.2	Validación de la decocción de galipea longiflora (Evanta) en jugo de naranja como tratamiento en la desparasitación de niños en edad escolar	45
2.5.3	Análisis de la eficacia posterior a la administración de los diferentes tratamientos	49
2.5.3.1	HELMINTOS	50
2.5.3.1.1	Decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja	50
2.5.3.1.1.1	<i>Ascaris lumbricoides</i>	51
2.5.3.1.1.2	<i>Hymenolepis nana</i>	52
2.5.3.1.1.3	<i>Strongiloides stercoralis</i>	52
2.5.3.1.1.4	<i>Trichuris trichiuria</i>	53
2.5.3.1.1.5	<i>Uncinarias</i>	53

2.5.3.1.2	Mebendazol	54
2.5.3.1.2.1	<i>Ascaris lumbricoides</i>	55
2.5.3.1.2.2	<i>Hymenolepis nana</i>	55
2.5.3.1.2.3	<i>Strongiloides stercoralis</i>	55
2.5.3.1.2.4	<i>Uncinarias</i>	56
2.5.3.1.3	Albendazol	56
2.5.3.1.3.1	<i>Ascaris lumbricoides</i>	57
2.5.3.1.3.2	<i>Hymenolepis nana</i>	58
2.5.3.1.3.3	<i>Strongiloides stercoralis</i>	58
2.5.3.1.3.4	<i>Trichuris trichiura</i>	59
2.5.3.1.3.5	<i>Uncinarias</i>	59
2.5.3.2	PROTOZOARIOS	60
2.5.2.1	Decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja	60
2.5.3.2.1.1	<i>Chilomastix mesnili</i>	61
2.5.3.2.1.2	<i>Endolimax nana</i>	61
2.5.3.2.1.3	<i>Entamoeba coli</i>	62
2.5.3.2.1.4	<i>Giardia lamblia</i>	63
2.5.3.2.1.5	<i>Iodamoeba bustchlii</i>	63
2.5.3.2.1.6	<i>Blastocystis hominis</i>	64
2.5.3.2.2	Mebendazol	65
2.5.3.2.2.1	<i>Chilomastix mesnili</i>	66
2.5.3.2.2.2	<i>Endolimax nana</i>	66
2.5.3.2.2.3	<i>Entamoeba coli</i>	67
2.5.3.2.2.4	<i>Giardia lamblia</i>	68
2.5.3.2.2.5	<i>Iodamoeba bustchlii</i>	68
2.5.3.2.2.6	<i>Blastocystis hominis</i>	69
2.5.3.2.3	Albendazol	70
2.5.3.2.3.1	<i>Chilomastix mesnili</i>	70
2.5.3.2.3.2	<i>Endolimax nana</i>	71
2.5.3.2.3.3	<i>Entamoeba coli</i>	71
2.5.3.2.3.4	<i>Giardia lamblia</i>	72
2.5.3.2.3.5	<i>Iodamoeba bustchlii</i>	73
2.5.3.2.3.6	<i>Blastocystis hominis</i>	73
2.5.3.3	Placebo	74

2.5.3.3.1	Placebo de decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja	74
2.5.3.3.2	Placebo de Mebendazol	76
2.5.3.4	Análisis comparativo entre los tratamientos contra parasitosis intestinales con <i>Galipea longiflora</i> 2010 – 2012	77
2.5.3.4.1	Jarabe al 2%	79
2.5.3.4.2	Decocción acuosa de Evanta	81
2.6	CONCLUSIONES	85
2.7	REFERENCIAS	88
3.	CAPITULO 3. ESTUDIOS DE PROTEASAS DE LÁTEX DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>Ficus spp.</i> (OJÉ) Y CARACTERIZACION DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	
3.1	RESUMEN	92
3.2	ANTECEDENTES	93
3.2.1	<i>Ficus spp.</i>	93
3.2.2	Composición del látex	94
3.2.3	Proteasas cisteínicas de plantas lactíferas	96
3.2.4	Estructura bioquímica de las cisteín-proteinasas vegetales	97
3.2.5	Ficina y sus Componentes Proteolíticos	99
3.2.6	Antecedentes etnofarmacológicos	103
3.3	OBJETIVOS	105
3.4	METODOLOGIA	106
3.4.1	Recolección del Material Vegetal	107
3.4.2	Procesamiento del látex	108
3.4.3	Caracterización del látex	108
3.4.4	Cuantificación de la concentración total de proteínas	108
3.4.5	Determinación de la actividad proteolítica sobre un sustrato cromogénico hidrosoluble: Azocaseína	109
3.4.6	Actividad coagulante sobre leche en polvo (Balls y Hoover)	110
3.4.7	Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	111
3.4.7.1	Preparación de los geles	112
3.4.7.1	Preparación de las muestras	112
3.4.7.3	Aplicación de las muestras y condiciones de corrida	112
3.4.8	Determinación de la estabilidad y conservación de actividad enzimática del complejo proteolítico de <i>Ficus spp.</i>	113

3.4.8.1 Frente a la variación de pH	113
3.4.8.2 Conservación de actividad proteolítica en diferentes soluciones	113
3.4.8.3 Conservación después de secado	113
3.4.9 Actividad Proteolítica del látex de <i>Ficus spp.</i> sobre proteínas de origen vegetal	114
3.5 RESULTADOS Y DISCUSION	115
3.5.1 Recolección del Material Vegetal	115
3.5.2 Caracterización del látex	115
3.5.3 Cuantificación de la concentración total de proteínas	115
3.5.4 Determinación de la actividad proteolítica del complejo proteolítico de <i>Ficus spp.</i>	117
3.5.5 Actividad coagulante sobre leche en polvo (Balls y Hoover)	119
3.5.6 Caracterización electroforética del látex de <i>Ficus spp.</i>	120
3.5.7 Determinación de la estabilidad y conservación de actividad enzimática del complejo proteolítico de <i>Ficus spp.</i>	122
3.5.7.1 Frente a la variación de pH	122
3.5.7.2 Conservación de actividad proteolítica en diferentes soluciones	123
3.5.7.3 Conservación de actividad proteolítica después de secado	124
3.5.7 Actividad Proteolítica del látex de <i>Ficus spp.</i> sobre proteínas de origen vegetal	125
3.6 CONCLUSIONES	126
3.7 REFERENCIAS	128
 ANEXOS	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Tabla 2. Composición de alcaloides quinolínicos aislados de los diferentes órganos de *Galipea longiflora*.

Tabla 3. Tabla comparativa de los rendimientos de Alcaloides Totales obtenidos de plantines de Evanta

Tabla 4. Proporción relativa de alcaloides quinolínicos en los plantines

Tabla 5. Actividad leishmanicida de los PAT de plantines

Tabla 6. Prevalencia de parásitos en menores de cinco años de la ciudad de El Alto (2000) y de Alto Beni (1998)

Tabla 7. Parámetros de diagnóstico coproparasitológico

Tabla 8. Áreas para las diferentes concentraciones 2-FQ mediante HPLC

Tabla 9. Estimado administrado de CAT

Tabla 10. Niños parasitados con *Ascaris lumbricoides* tratados con decocción de Evanta

Tabla 11. Niños parasitados con *Hymenolepis nana* tratados con Evanta

Tabla 12. Niños parasitados con *Strongyloides stercoralis* tratados con decocción de Evanta

Tabla 13. Niños parasitados con *Trichuris trichiura* tratados con decocción de Evanta

Tabla 14. Niños parasitados con *Uncinarias spp.* tratados con decocción de Evanta

Tabla 15. Niños parasitados con *Ascaris lumbricoides* tratados con decocción de Evanta

Tabla 16. Niños parasitados con *Hymenolepis nana* tratados con Mebendazol

Tabla 17. Niños parasitados con *Strongyloides stercoralis* tratados con Mebendazol

Tabla 18. Niños parasitados con *Uncinarias spp.* tratados con Mebendazol

Tabla 19. Niños parasitados con *Ascaris lumbricoides* tratados con Albendazol

Tabla 20. Niños parasitados con *Hymenolepis nana* tratados con Albendazol

Tabla 21. Niños parasitados con *Strongyloides stercoralis* tratados con Albendazol

Tabla 22. Niños parasitados con *Trichuris trichiura* tratados con Albendazol

Tabla 23. Niños parasitados con *Uncinarias spp.* tratados con Albendazol

Tabla 24. Niños parasitados con *Chilomastix mesnili* tratados con decocción de Evanta

Tabla 25. Niños parasitados con *Endolimax nana* tratados con decocción de Evanta

- Tabla 26. Niños parasitados con *Entamoeba coli* tratados con decocción de Evanta**
- Tabla 27. Niños parasitados con *Giardia lamblia* tratados con decocción de Evanta**
- Tabla 28. Niños parasitados con *Iodamoeba bustchlii* tratados con decocción de Evanta**
- Tabla 29. Niños parasitados con *Blastocystis hominis* tratados con decocción de Evanta**
- Tabla 30. Niños parasitados con *Chilomastix mesnili* tratados con Mebendazol**
- Tabla 31. Niños parasitados con *Endolimax nana* tratados con Mebendazol**
- Tabla 32. Niños parasitados con *Entamoeba coli* tratados con Mebendazol**
- Tabla 33. Niños parasitados con *Giardia lamblia* tratados con Mebendazol**
- Tabla 34. Niños parasitados con *Iodamoeba bustchlii* tratados con Mebendazol**
- Tabla 35. Niños parasitados con *Blastocystis hominis* tratados con Mebendazol**
- Tabla 36. Niños parasitados con *Chilomastix mesnili* tratados con Albendazol**
- Tabla 37. Niños parasitados con *Endolimax nana* tratados con Albendazol**
- Tabla 38. Niños parasitados con *Entamoeba coli* tratados con Albendazol**
- Tabla 39. Niños parasitados con *Giardia lamblia* tratados con Albendazol**
- Tabla 40. Niños parasitados con *Iodamoeba bustchlii* tratados con Albendazol**
- Tabla 41. Niños parasitados con *Blastocystis hominis* tratados con Albendazol**
- Tabla 42. Cisteína-Proteinasas vegetales y sus fuentes**
- Tabla 43. Detalle de identificación para las muestras de *Ficus* spp.**
- Tabla 44. Distribución de muestras según el lugar de procedencia**
- Tabla 45. Absorbancia para las concentraciones de B.S.A.**
- Tabla 46. Absorbancias para la actividad enzimática de Ficina**

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Galipea longiflora* k.

Figura 2. Plantines de *Galipea longiflora* (Evanta),

Figura 3. Espectros de masas de los alcaloides presentes en de los plantines de Evanta, de acuerdo al fraccionamiento de masas de moléculas con grupos aromáticos (a), cadenas alifáticas (b) y/o grupos metoxilo (c)

Figura 4. Comparación de los cromatogramas del árbol adulto y los plantines de Evanta

Figura 5. Comparación de los cromatogramas de los plantines de Evanta (25, 90 y 175 cm de altura)

Figura 5. Curva de calibración de la 2-fenilquinolina

Figura 6. Cromatograma típico de la 2-fenilquinolina estándar

Figura 7. Cromatograma de la muestra de análisis de la inyección de decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja

Figura 8. Prevalencia de helmintos y protozoarios intestinales, previa al tratamiento, en la población en estudio.

Figura 9. Frecuencia de parásitos intestinales, previa al tratamiento, en la población en estudio

Figura 10. Prevalencia de helmintos y protozoarios intestinales, pre y post tratamiento, en la población en estudio.

Figura 11. Número de parásitos intestinales encontrados en las muestras, previo al tratamiento, en la población en estudio.

Figura 12. Número de parásitos intestinales encontrados en las muestras, antes y después del tratamiento, en la población en estudio.

Figura 13. Eficacia del tratamiento con decocción de Evanta en jugo de naranja frente a helmintos intestinales encontrados, casos de infección antes y después del tratamiento.

Figura 14. Prevalencia de infección helmintos encontrados antes y después del tratamiento con Mebendazol.

Figura 15. Prevalencia de infección helmintos encontrados antes y después del tratamiento con Albendazol.

Figura 16. Eficacia del tratamiento con decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja frente a protozoarios intestinales encontrados, casos de infección antes y después del tratamiento.

Figura 17. Eficacia del tratamiento con Mebendazol a protozoarios intestinales encontrados, casos de infección antes y después del tratamiento.

Figura 18. Prevalencia de infección protozoarios intestinales encontrados antes y después del tratamiento con Albendazol.

Figura 19. Comparación de casos de infección por helmintos, después de la administración del tratamiento antiparasitario (noviembre 2012) y después de la

administración del placebo (septiembre 2013), en el grupo tratado con decocción de Evanta en jugo de naranja.

Figura 20. Casos de infección por protozoarios intestinales, después de la administración del tratamiento antiparasitario (noviembre 2012) y después de la administración del placebo (septiembre 2013), en el grupo tratado con decocción de Evanta en jugo de naranja.

Figura 21. Casos de infección por helmintos, después de la administración del tratamiento (noviembre 2012) y después de la administración del placebo (septiembre 2013), en el grupo tratado con Mebendazol.

Figura 22. Casos de infección por protozoarios intestinales, después de la administración del tratamiento (noviembre 2012) y después de la administración del placebo (septiembre 2013), en el grupo tratado con Mebendazol.

Figura 23. Comparación de medias entre los tres tratamientos (Decocción de Evanta, Mebendazol y Albendazol).

Figura 24. Prevalencia de helmintos y protozoarios intestinales, en 2010 (primer diagnóstico) y 2012 (último diagnóstico), en la población en estudio.

Figura 25. A. Casos de infección por helmintos y protozoarios antes y después de la primera administración de Jarabe de Evanta al 2% (marzo-mayo). B. Casos de infección por helmintos y protozoarios antes y después de la segunda administración de Jarabe de Evanta al 2% (marzo-mayo).

Figura 26. A. Casos de infección por helmintos y protozoarios antes y después de la administración de Decocción acuosa de Evanta (noviembre-diciembre 2010).

Figura 27. Modelo demostrativo de las oscilaciones en la población de parásitos utilizando un método antiparasitario de control alternativo.

Figura 28. Dibujo de *Ficus insípida* Willd. Spp. *insípida* (Moraceae).

Figura 29. Estructura de las cisteína-proteasas. (A) Diagrama de cintas de la estructura de la papaína.

Figura 30. Mecanismo catalítico de las proteinasas cisteínicas

Figura 31. Incisión realizada sobre el árbol del Ojé (*Ficus spp.*).

Figura 32. Mecanismo de reacción de Biuret

Figura 33. Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína soluble. Presencia de azopeptidos solubles en ácido susceptibles de cuantificación y la presencia de azocaseína precipitada no hidrolizada.

Figura 34. Curva de calibración del Método de Biuret

Figura 35. Concentración de proteínas totales en el látex de *Ficus spp.*

Figura 36. Curva de calibración del Método de la Azocaseína

Figura 37. Actividad proteolítica del látex (A) y la fase acuosa (B) de *Ficus spp.*

Figura 38. Actividad proteolítica del complejo proteolítico del látex de *Ficus spp.* sobre leche en polvo (Método de Balls y Hoover)

Figura 39. Diagrama de la electroforesis SDS-PAGE. (1) Patrón de masa molar, (2) 20 µg de ficina patrón, (3 y 4) látex de Perú (P-IQ); (5 y 6) muestras látex Provincia

Abel Iturralde (B-AI); (7, 8, 9 y 10) látex provincia Sud Yungas (B-SY).

Figura 40. Actividad proteolítica del complejo proteolítico de *Ficus spp.* a diferente pH (3.2 a 8.2)

Figura 41. Actividad proteolítica del complejo proteolítico de *Ficus spp.* en diferentes soluciones (a) leche; (b) jugo de naranja y (c) agua.

Figura 42. Actividad proteolítica del complejo proteolítico de *Ficus spp.* Secado por diferentes métodos.

Figura 43. Gráfico de la electroforesis SDS-PAGE. Digestión de proteínas vegetales. (7) Concentrado proteico de Soya, (8) aislado proteico digerido por látex de *Ficus spp.*, (9) muestra de látex HER-11.

INTRODUCCION

Los productos naturales, en especial los de origen vegetal, han sido una importante fuente de agentes terapéuticos. Los medicamentos derivados de productos naturales representan alrededor de un 25-30% de los agentes terapéuticos actuales. Si bien en las últimas décadas, debido al avance de la química combinatoria, la investigación sobre productos naturales en la industria farmacéutica ha mostrado una desaceleración, para algunas enfermedades complejas los productos naturales todavía constituyen una fuente muy valiosa para la producción de nuevas entidades químicas, ya que representan estructuras seleccionados por mecanismos evolutivos durante millones de años (Calixto, 2005).

El interés por las plantas medicinales y las fitomedicinas adopta diferentes características en las diferentes partes del mundo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, aproximadamente el 65-80% de la población de los países en desarrollo, como consecuencia de la pobreza y de la imposibilidad de acceso a la medicina moderna, dependen esencialmente de las plantas para la Atención Primaria de la Salud (Calixto, 2005).

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), desde 1993 viene trabajando en la evaluación biológica de plantas medicinales listadas en Farmacopeas Tradicionales, poco estudiadas, a partir del proyecto multidisciplinario "Conservación Ambiental a través de la Valoración Etnobotánica y Etnofarmacológica en Bolivia" (FONAMA - UMSA), cuyo principal objetivo ha sido dirigido a la búsqueda y obtención de productos naturales con actividad biológica contra parásitos.

Se han realizado estudios con las Etnias Chacobo y Tsimane (Beni), Mosekene y Tacana (La Paz), Raqaypampeños (Cochabamba), Guaraní (Santa Cruz). Llegando a profundizar dichos estudios con los Tacana por lo cual se nombró a Rogelio Chuqui *Doctor Honoris causa* de la UMSA en reconocimiento a la cultura Tacana.

Diferentes especies vegetales fueron evaluadas, y se han seleccionado a *Galipea longiflora* (Evanta) y *Ficus spp.* (Ojé) por tener buena actividad contra diversos parásitos intestinales, y frente a varias cepas de *Leishmania*.

Dentro de los estudios realizados en el IIFB, sobre *Galipea longiflora* (Evanta) se ha logrado caracterizar y aislar sus componentes activos (alcaloides quinolinicos), estos alcaloides han demostrado tener baja toxicidad y un buen nivel de actividad leishmanicida, tomando en cuenta estas características se han formulado preparados de uso sistémico y tópico de los que se han realizando estudios clínicos de fase I y II. (Gimenez *et al.*, 2005)

Por otra parte recientemente se ha realizado el estudio del látex de *Ficus spp.* (Ojé), ya que presenta un complejo de enzimas proteolíticas cuya actividad se atribuye principalmente a una cisteína–proteasa con múltiples isoformas denominada Ficina. Dicha enzima es candidata para el tratamiento de infecciones producidas por nematodos gastrointestinales. (Lansky, 2011). El IIFB basado en el uso tradicional de esta especie vegetal como vermífugo, viene realizando estudios acerca de la actividad proteolítica del látex proveniente de especies de *Ficus spp.* nativas de Bolivia, así como caracterizando el contenido de proteínas del mismo.

En el presente trabajo se realizó un estudio de estas dos especies vegetales y se evaluó la actividad antiparasitaria de acuerdo al principio activo que posee cada una de ellas. Con el ideal, que a futuro permitan encontrar nuevas alternativas que reduzcan los costos de obtención de la materia prima para continuar con el desarrollo de formulaciones farmacológicas, eficientes y económicas, o encontrar nuevas aplicaciones a diferentes ramas de la química farmacéutica

- Calixto, J.B. (2005) **Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America**. A personal view. *J. Ethnopharmacol.* 100: 131–134
- Giménez A., Ávila JA., Ruiz G., Paz M., Udaeta E. (2005) **Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipealongiflora Krause***. *Revista boliviana de química.* 22 (1):94-107.

1.1 RESUMEN

Farmacopea Tacana

Se han realizado estudios sobre plantines de la especie medicinal Tacana: *Galipea longiflora* (Evanta) de diferentes tamaños, colectados Provincia Sud Yungas, La Paz. El trabajo se centró en el análisis de variaciones de la mezcla de los alcaloides quinolínicos presentes en los extractos de plantines y la variación de la actividad antiparasitaria; comparados entre sí y con alcaloides totales de corteza (**CAT**) de especímenes de 9 metros.

Materiales y métodos

El material vegetal se sometió a secado, maceración etanólica, para luego obtener los alcaloides totales de plantin (**PAT**) por precipitación selectiva ácido-base. Una vez obtenidos los extractos se dividieron en 3 grupos de acuerdo al tamaño de plantines y al rendimiento de alcaloides obtenidos: A (25 a 60 cm), B (70 a 90 cm) y C (110 a 175 cm). Estos fueron analizados por cromatografía de gases acoplado a masas (GC/MS) y se evaluó la actividad antiparasitaria, sobre promastigotes de *Leishmania*.

Resultados

Se identificaron 5 alcaloides mayoritarios comunes entre el árbol adulto y plantines: 2-n-propilquinolina (**8**), 2-n-pentilquinolina (**7**), 2-n-fenilquinolina (**1**), 4-metoxi-2-n-fenilquinolina (**2**) y 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**4**). En plantines se identificaron hasta 14 alcaloides, llegando a aparecer: Shikimanina (**13**), y 2-(3',4'-metoxifeniletílquinolina) (**3**) cuando presentan mayor edad. En general, los **PAT**, presentan mejor actividad biológica con CI_{50} medias de $13,4 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ sobre *L. amazonensis* y $7,2 \pm 0,55 \mu\text{g/mL}$ sobre *L. braziliensis* que el **CAT**. Esta comparación entre la variación de la actividad antiparasitaria frente a la variación del tamaño del plantin y a la composición química de los **PAT**, nos da una pauta de que moléculas propias de las hojas (Chimaninas A, B, C, D) y otras como la 2-n-propilquinolina y la 2-n-pentilquinolina influyen en la actividad biológica.

Estudio químico biodirigido de plantines de Galipea longiflora (EVANTA)

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 *Galipea longiflora*

Galipea es un género neotropical de la familia *Rutaceae*, con aproximadamente 60 especies indexadas y distribuidas a lo largo de Panamá, Nicaragua, Perú, Venezuela Brasil y Bolivia (Missouribotanicalgarden.com). En Bolivia la especie *Galipea longiflora* (K. Krause) se distribuye en los bosques tropicales con elevada humedad (entre 350 – 600 m.s.n.m.) en los departamentos de Beni; Ballivián, Misión Fátima y La Paz; Sud Yungas, Alto Beni, tiene diversos nombres comunes, pero es ampliamente conocida con el nombre de Evanta y sus nombres; Tacana *Yuruma huana epuna* y mosetene Ji'pamtyae. (Zipcodezoo.com)

La Evanta, es un árbol de 10 a 15 m de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama, con un pecíolo frecuentemente alado, flores blancas y perfumadas en cimas, panículos o racimos. El árbol florece entre los meses de Mayo a Junio, los frutos se observan en los meses de Junio a Julio. (Pirani, 2007; Killen, *et al.* 1993)



Figura 1. *Galipea longiflora* k.

Fuente: IIFB/UMSA

El uso más frecuente de la *Galipea longiflora* por las etnias Tacanas es para el tratamiento de la leishmaniasis o espundia, en este tratamiento la corteza seca es molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las úlceras, adicionalmente, es bebida como infusión durante el tiempo que dure el tratamiento. También es utilizada como antiemético, vermífugo y amebicida, el uso más frecuente es en forma de cocción en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales, tales como la disentería amebiana y como antihelmíntico (Bourdy, *et al.*, 1999).

Según los conocimientos en la medicina tradicional de varios países la corteza, de muchas de las especies del genero *Galipea*, es utilizada para el tratamiento de la dispepsia, disentería, diarreas crónicas y fiebre (Mester, 1973) y es utilizada también en casos de enflaquecimiento, debilidad en niños y como fortifican te para adultos. (Bourdy, *et al.*, 1999)

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Dominio	: <i>Eucariota</i>
Reino	: <i>Plantae</i>
División	: <i>Magnoliophyta</i>
Clase	: <i>Magnoliopsida</i>
Sub-clase	: <i>Rosidae</i>
Superorden	: <i>Rutanae</i>
Orden	: <i>Rutales</i>
Suborden	: <i>Rutineae</i>
Familia	: <i>Rutaceae</i>
Género	: <i>Galipea, Angostura</i>
Especie	: <i>G. longiflora</i> (k. Krause) <i>kallunki</i>
Nombre común	: <i>Yuruma huanaepuna, Evanta, Ivab`ta, Tantac.</i>

Fuente: Levietava, *J Ethnopharmacology* 1992

1.2.2 Estudios químicos y biológicos del género *Galipea*

Desde 1989, se viene estudiando varias especies del genero *Galipea*, por su alto contenido de alcaloides quinolínicos, llegando a aislarse y caracterizar 13 componentes activos de la corteza, corteza de raíz y hojas de la *Galipea longiflora*. (Fournet *et al.*, 1989)

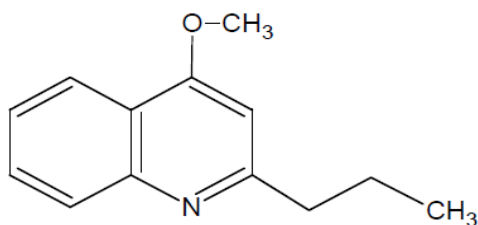
Tabla 2. Composición de alcaloides quinolínicos aislados de los diferentes órganos de *Galipea longiflora*.

Estimación de la composición de alcaloides (%)			
Alcaloide	Tronco %	Raíz %	Hojas %
2- fenilquinolina (1)	47,7	66,7	29
4- metoxi-2-fenilquinolina (2)	2,8	3,3	
2-(3',4'-metoxifeniletiquinolona) (3)	1,1		
2-(3',4'-metilendioxifeniletil)-quinolona (4)	10,2	6,7	
4- metoxi-2-(3',4'-metilendioxifeniletil) -quinolona (cusparina) (5)	3,1	2,0	
4-metoxi-2-n-pentilquinolona (6)	1,0		
2-n-pentilquinolona (7)	2,4	17,3	
2-n-propilquinolona (8)	1,3		12,5
4-metoxi-2-n-propilquinolona (Chimanina A) (9)	2,4		
2-(E) -prop-1'-enilquinolona (Chimanina B) (10)			16,7
4-metoxi-2-(E)-prop-1'-enilquinolona (Chimanina C) (11)			0,5
2-(1',2'-trans-epoxipropil)-quinolona (Chimanina D) (12)			1,7
Shikimanina (13)		4,0	1,7

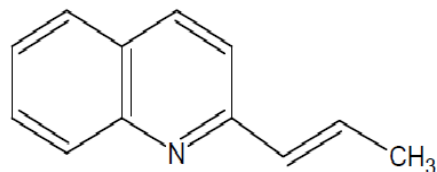
Fuente: Fournet *et al.*, Journal of Natural Products, 1993

Algunos de los principios activos han sido aislados exclusivamente de las hojas de la *Galipea longiflora* y debido a su eficacia demostrada (Fournet *et al.*, 1994) y su baja toxicidad determinada en modelos *in vivo* (Gantier *et al.*, 1996) han sido patentados como Chimaninas A (9), B (10), C (11) y D (12), US4209519/15/04/93. Las Chimaninas B y D mostraron actividad leishmanicida *in vitro* contra cepas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. donovani* en sus formas

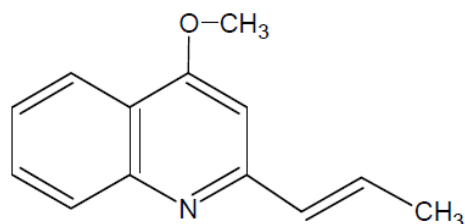
promastigotes con valores de $CI_{90}=25$ mg/mL, y las Chimaninas A y C valores de $CI_{90}=100$ mg/mL.



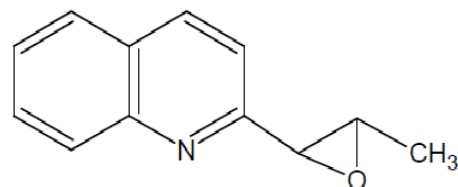
4-metoxi-2-n-propilquinolina (**9**)
(Chimanina A)
 $C_{13}H_{15}NO$
m/z: [201]



2-(E)-prop-1'-enilquinolina (**10**)
(Chimanina B)
 $C_{12}H_{11}N$
m/z: [169]

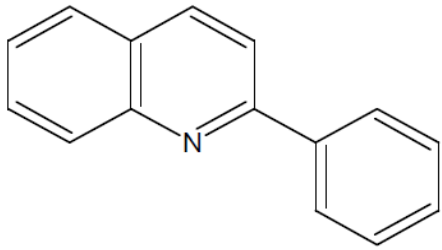


4-metoxi-2-(E)-prop-1'-enilquinolina (**11**)
(Chimanina C)
 $C_{13}H_{13}NO$
m/z: [199]



2-(1',2'-trans-epoxipropil)quinolina (**12**)
(Chimanina D)
 $C_{12}H_{11}NO$
m/z: [185]

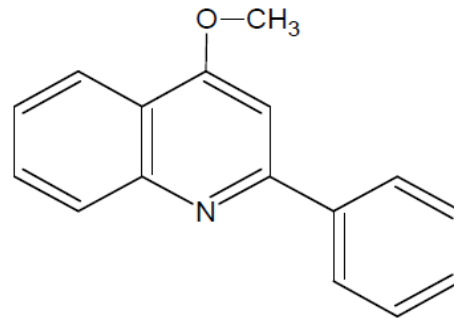
El trabajo sobre la Evanta, se centra en el análisis de variaciones de la mezcla de los cinco alcaloides quinolínicos principales aislados de la corteza de *Galipea longiflora*, varios estudios reconocen a la 2-fenilquinolina (**1**); 2-pentilquinolina (**7**); 4-metoxi-2-fenil-quinolina (**2**); 2-propil-quinolina (**8**) y 2-(3,4-metoxifeniletíl)-quinolina (**4**), como los compuestos mayoritarios que representan cerca del 90% del total de los alcaloides y junto a otros alcaloides como 2-(3',4'-dimetilendioxifeniletíl)-quinolina (**3**), cusparina (**5**), 4-metoxi-2-n-pentilquinolina (**6**) y Shikimianina (**13**) mostraron actividad leishmanicida con un $CI_{90} = 100$ mg/mL (Fournet *et al.*, 1993). El extracto de corteza de *Galipea longiflora* compuesto por la mezcla de estos alcaloides ha demostrado tener capacidad gastroprotectora e inhibir la formación de úlceras a una dosis de 50 mg/Kg (Zanatta *et al.*, 2009)



2-n-fenilquinolina (1)

$C_{15}H_{11}N$

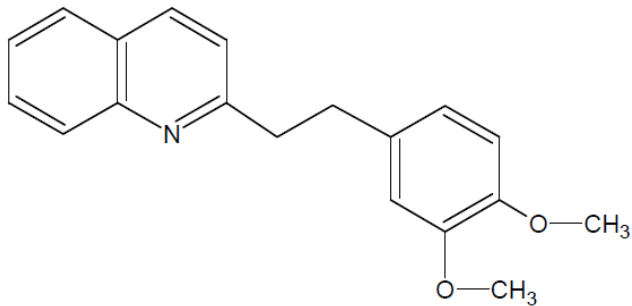
m/z: [205]



4-metoxi-2-n-fenilquinolina (2)

$C_{16}H_{13}NO$

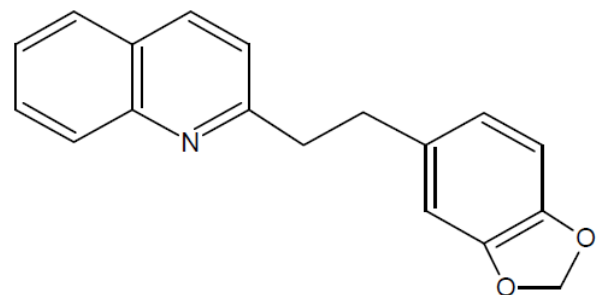
m/z: [235]



2-(3,4-dimetoxifenilettil) quinolina (3)

$C_{19}H_{19}NO_2$

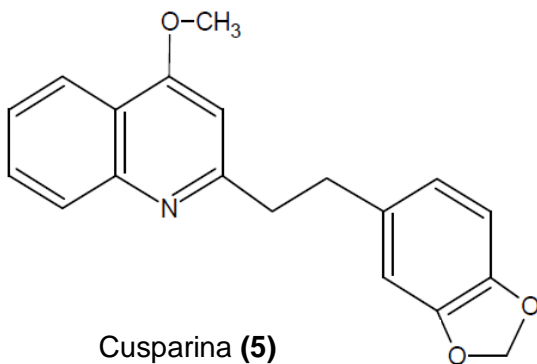
m/z: [293]



2-(3,4-metilendioxifenilettil) quinolina (4)

$C_{18}H_{15}NO_2$

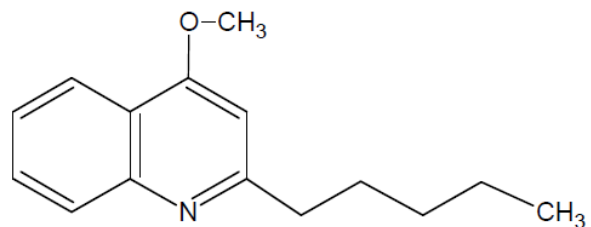
m/z: [277]



Cusparina (5)

$C_{19}H_{17}NO_3$

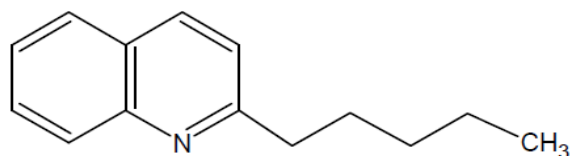
m/z: [307]



4-metoxi-2-n-pentilquinolina (6)

$C_{15}H_{19}NO$

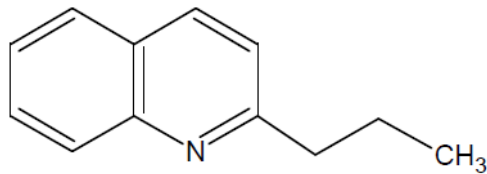
m/z: [229]



2-n-pentilquinolina (7)

$C_{14}H_{17}N$

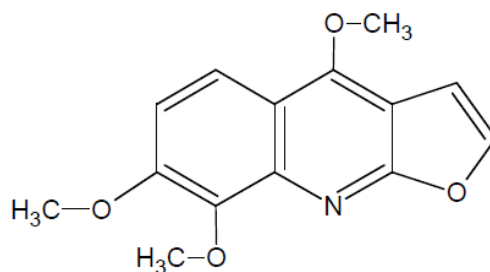
m/z: [199]



2-n-propilquinolina (**8**)

C₁₂H₁₃N

m/z: [171]



Shikimianina (**13**)

C₁₄H₁₃NO₄

m/z: [259]

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), ha venido estudiando esta especie vegetal a partir del año 1993 donde la mayor parte de los estudios de la *Galipea longiflora*, han sido dirigidos a la actividad frente a parásitos intracelulares como leishmania y malaria (Giménez *et. al.* 2005), pero según las farmacopeas tradicionales, también se la utiliza como antiemético, vermífugo, amebicida y en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales (Bourdy *et al.*, 1999).

Una muestra científica del uso tradicional de la Evanta como amebicida, fue descrito al determinar el CI₅₀ del CAT frente a dos cepas de *Acanthamoeba* (*A. castellani* y *A. polyfaga*) CI₅₀ = 12,01 µg/mL (+/-0,67) y 27,34 µg/mL (+/- 2,65) respectivamente, que muestra una estrecha relación al CI₅₀ de miltefosina (Salamanca, 2008). También se ha demostrado que los alcaloides totales de corteza (CAT) matan directamente el parásito a una dosis de 10 µg/mL, pero en esta baja concentración CAT no tienen un efecto importante sobre la viabilidad y la proliferación de las células eucariotas. También el extracto total (CAT), es más fuerte que la 2-fenilquinolina (**1**). Otros estudios sugieren, que el extracto crudo de Evanta, cura no solo por la acción sobre el parásito sino por una combinación, con un efecto sobre componentes de la respuesta inmune principalmente sobre la producción de IFN-γ y la proliferación celular. Evanta tienen un efecto leishmanicida directa, y debido al efecto sobre la inhibición de la producción de IFN-γ que podría contribuir al control de la reacción inflamatoria crónica que caracterizan a la infección por *Leishmania*. (Calla *et al.*, 2006; 2009).

En Bolivia el uso tradicional de esta planta como antiparasitario es reconocido dentro de la lista de los recursos naturales aceptados, las normas para medicamentos naturales lo reconocen como medicamento seguro, eficaz y de calidad (Ministerio de Salud y Deportes, 2001).

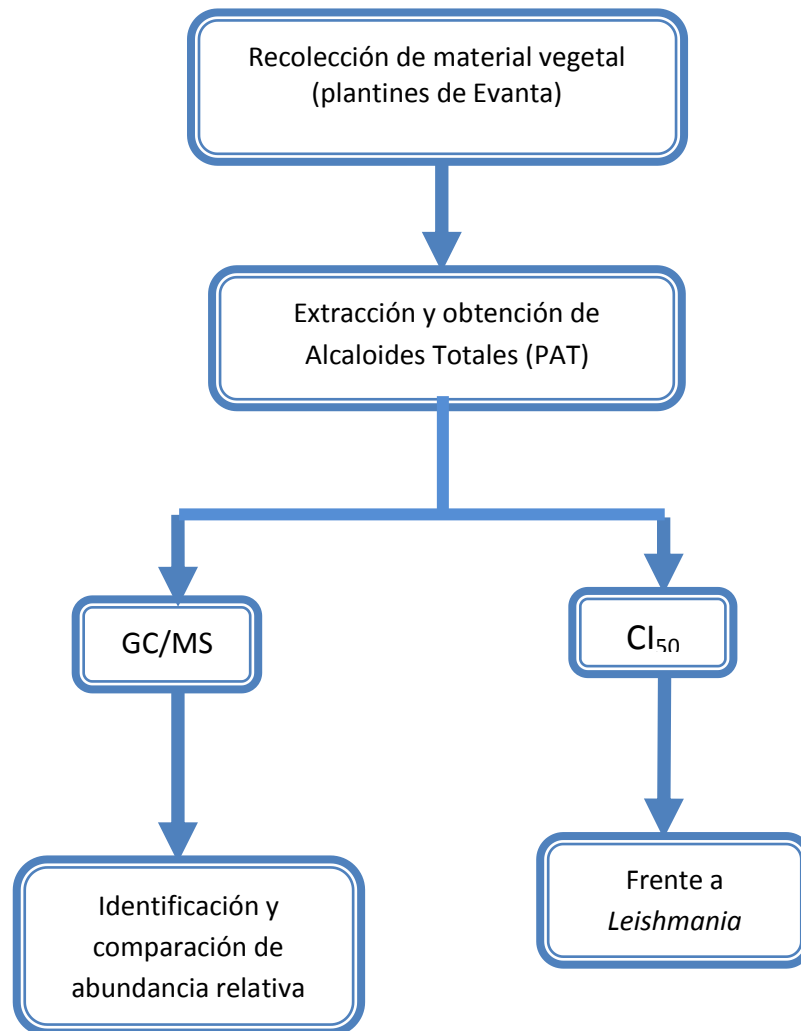
El IIFB ha estandarizado un método de extracción de alcaloides totales (CAT) de Evanta a escala piloto y ha trabajado en el desarrollo de jarabes al 1 %, 2% y 5% (Ticona, 2008). Así mismo mediante modelos tóxico-cinéticos, se determinaron la toxicidad aguda, subcrónica y parámetros farmacocinéticos para el extracto crudo en modelos murino, sobre la base de los antecedentes descritos (Herrera, 2008). Desde 1993 forma parte de un equipo multidisciplinario que ha llevado adelante estudios químicos biodirigidos y pre-clínicos (Herrera, 2008; Ávila, 2000) y hasta la fecha, lleva estudios clínicos sobre la eficacia de formulaciones farmacéuticas en el tratamiento de la Leishmaniasis cutánea en el Hospital de Palos Blancos, con apoyo de la Cooperación Sueca, Proyecto “Enfermedades Infecciosas” UMSA-ASDI-SAREC.

También se realizaron estudios químico cuantitativos del extracto diclorometánico (Ticona, 2008), etanólico (Espinoza, 2012) y acuoso (Llanos et. al., 2009) de la corteza de *G. longiflora* para su uso como antiparasitario mediante la estandarización de un método analítico por cromatografía de gases (CG) que permita la cuantificación de alcaloides totales de corteza y de esta manera saber con certeza cuanto de principio activo se utiliza en las formulaciones a base de Evanta (Limachi, 2013). Así mismo se analizaron los alcaloides obtenidos del aceite esencial de hojas (CAT-AEH) (Limachi, 2009) los alcaloides obtenidos por extracción acuosa y los sometidos a Biotransformación por microorganismos (Quiroga, 2011).

1.3 OBJETIVO

- Realizar la identificación y caracterización de los principales alcaloides de plantines de *Galipea longiflora* por técnicas cromatográficas y compararlos con los patrones de análisis obtenidos de la corteza del árbol adulto.

1.4 METODOLOGIA



1.4.1 Recolección del material vegetal

Los plantines de Evanta (*Galipea longiflora*) recolectados en el mes de septiembre de 2012 por el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), en la comunidad de Hernández (S: 15°21' 527'' y O: 067°20'549''), en la provincia Sud Yungas del departamento de La Paz, Bolivia. La identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con muestras Vaucher (AS49 mayo de 1996 y SD17 septiembre de 1994) depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia, los plantines recolectados fueron secados lejos de la luz del sol hasta obtener pesos constantes.

1.4.2 Obtención del concentrado de alcaloides totales de plantin (PAT)

- Los plantines de *Galipea longiflora* (Evanta) fueron utilizados en su totalidad (hojas, tallo y raíz) estos fueron molidos y macerados en un percolador con alcohol etílico en una relación 1:5 (p/v).
- Con la ayuda de un evaporador rotatorio (Figmay RV20) se concentra el extracto obtenido hasta sequedad, de esta forma se obtiene el **Extracto crudo**.
- El **Extracto crudo** se disolvió en ácido clorhídrico (HCL 1N) y se lavó con diclorometano (CH₂Cl₂, x 3 veces).
- Se extrajeron los alcaloides de la fase acuosa acida, previamente alcalinizadas hasta un pH de 2,5 – 3 con NaOH 2N.
- Se extrajeron los **Alcaloides Totales de Plantin (PAT)** con CH₂Cl₂ (x3 veces) en agitación por 15 minutos, el CH₂Cl₂ fue secado con cloruro de sodio (NaCl), filtrado y concentrado en un evaporador rotatorio.

- Los **PAT** se secaron al vacío y se calculó el rendimiento (%) respecto al peso del plantin

1.4.3 Método de cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG/MS) para la caracterización de alcaloides de Evanta (Galipea longiflora)

Los alcaloides obtenidos del extracto etanólico de Evanta fueron analizados en un Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas SHIMADZU, sobre una columna capilar CARBOWAX (0.25um x 30m), bajo las siguientes condiciones:

T° del horno: 40°C por 5min y ratio 2°C/min

T° del horno: 220°C por 25 min

Inyector: (250°C), gas carrier H₂ (modo flujo 1.78mL/min)

Detector de masas: 2 min - 120 min (start m/z 15, End m/z 400)

Detector de ionización a flama (FID): (250°C).

1.4.4 Evaluaciones antiparasitarias in vitro

La actividad de las muestras fue evaluada a través del método colorimétrico XTT (X-4251 Sigma-Aldrich) sobre cultivos *in vitro* del estadio promastigote de *Leishmania*: complejo *Leishmania amazonensis* (**cepa Lma**), complejo *Leishmania braziliensis* (**cepa M2904**), En cada modelo la CI₅₀ del extracto fue determinada mediante análisis de regresión lineal (porcentaje de inhibición vs. logaritmo de la concentración del extracto) (Salamanca *et al.*, 2008). Ambas pruebas se realizaron en el Laboratorio de Quimioterapia Experimental del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz - Bolivia).

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Estudio químico biodirigido de plantines de Galipea longiflora (Evanta)

1.5.1 Recolección del material vegetal

Los plantines de Evanta (*Galipea longiflora*) fueron recolectados en la comunidad de Hernández S 15°21' 527" y O 067°20' 549", a una altura de 483 m.s.n.m. en la provincia Sud Yungas del departamento de La Paz.

Un total de 113 plantines fueron recolectados llegando a obtener 11 diferentes grupos de acuerdo al tamaño que estos poseían (25, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 110, 130, 150 y 175 cm).



**Figura 2. Plantines de *Galipea longiflora* (Evanta),
Hernández, Provincia Sud Yungas
Fuente: IIFB/UMSA**

1.5.2 Obtención del concentrado de alcaloides totales de Plantines (PAT)

Para la obtención de alcaloides totales (PAT) los plantines de *Galipea longiflora* (Evanta) fueron utilizados en su totalidad (hojas, tallo y raíz) estos fueron molidos, pesados y sometidos a maceración etanólica, para luego obtener los PAT por precipitación selectiva ácido – base. Una vez obtenidos los extractos secos se determinó el rendimiento respecto a la masa de la planta seca (**Tabla 3**), dividiéndose estos en tres grupos: **A** (de 25 a 60 cm), **B** (de 70 a 90 cm) y **C** (de 110 a 175 cm) esto de acuerdo al rendimiento de alcaloides obtenidos.

Tabla 3. Tabla comparativa de los rendimientos de Alcaloides Totales obtenidos de plantines de Evanta

Tamaño de plantin (cm) Σ	# de plantines	Pesomaterial vegetal (g) Σ	Peso de PAT (g) Σ	% PAT/ peso material vegetal Σ
A	35	41,89	0,0898	0,217
B	31	90,33	0,544	0,587
C	47	233,08	4,358	0,929

Como se puede observar los porcentajes de PAT obtenidos en los tres grupos de plantines (0.22, 0.59 y 0.93%) representan menos de la mitad del rendimiento de CAT obtenido de un árbol adulto (2%). Sin embargo a su vez se puede observar que mientras mayor edad tenga el plantin la cantidad de alcaloides obtenidos es mayor, llegando a ser esta, un factor de importancia considerable, ya que influye en la cantidad total de principios activos y la estabilidad presentada por estos.

1.5.3 Caracterización de alcaloides de Evanta (*Galipea longiflora*) por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas (CG/MS)

Se eligieron los plantines de 25, 90 y 175 cm de altura, pertenecientes a cada uno de los grupos de plantines de diferente tamaño, para la identificación de metabolitos. Los cromatogramas de los concentrados de alcaloides totales de plantin (PAT), de los plantines de menor, medio y mayor tamaño, fueron comparados entre sí y además con los patrones de análisis obtenidos del fraccionamiento del CAT etanólico y diclorometánico (IIFB-UMSA, La Paz, Bolivia; Universidad de IUBO-Tenerife, España); la asignación de las estructuras químicas de los alcaloides quinolínicos, se realizó por comparación del tiempo de retención, abundancia relativa y masa obtenida.

Los resultados de CG/MS obtenidos nos permiten llevar a cabo el análisis las relaciones isotópicas de los elementos ligeros presentes en los alcaloides propios de la Evanta (C, H, N y O) para medir las pequeñas variaciones en la abundancia isotópica (fraccionamiento de una molécula), de esta forma se han podido identificar y comparar los alcaloides presentes en los plantines, gracias a las diferentes relaciones masa/carga que existen para las fracciones que pueda tener una molécula (cadenas alifáticas, grupos aromáticos, grupos metoxilo, etc) (scai.uma.es).

Por ejemplo para compuestos con grupos aromáticos como la 2-n-fenilquinolina se observa en su espectro de masas un ión molecular a 205 m/z correspondiente a la fórmula molecular $C_{15}H_{11}N$, donde se observa un fragmento significativo que corresponde a 102 m/z [C_8H_6] (**Figura 3-a**).

En el caso de aquellas moléculas que poseen cadenas alifáticas ($-CH_3$) como es el caso de la 2-n-pentilquinolina, se observa un espectro de masas con un ión molecular a 199 m/z correspondiente a una fórmula molecular $C_{14}H_{17}N$, donde se observan fragmentos significativos a 184 m/z , [$C_{13}H_{14}N$] 169 m/z

[C₁₂H₁₂N], 154 *m/z* [C₁₁H₁₀N] y 139 *m/z* [C₁₀H₆N] correspondientes a la pérdida de cada grupo metilo –CH₃ (**Figura 3-b**).

En el caso de aquellas moléculas que poseen grupos metoxilo (-OCH₃) como es el caso de la 4-metoxi-2-fenilquinolina, se observa un espectro de masas con un ión molecular a 235 *m/z* correspondiente a una fórmula molecular C₁₆H₁₃NO, donde el fragmento significativo observado a 204 *m/z* [C₁₅H₁₀N] corresponde a la pérdida de un grupo –OCH₃ (**Figura 3-c**).

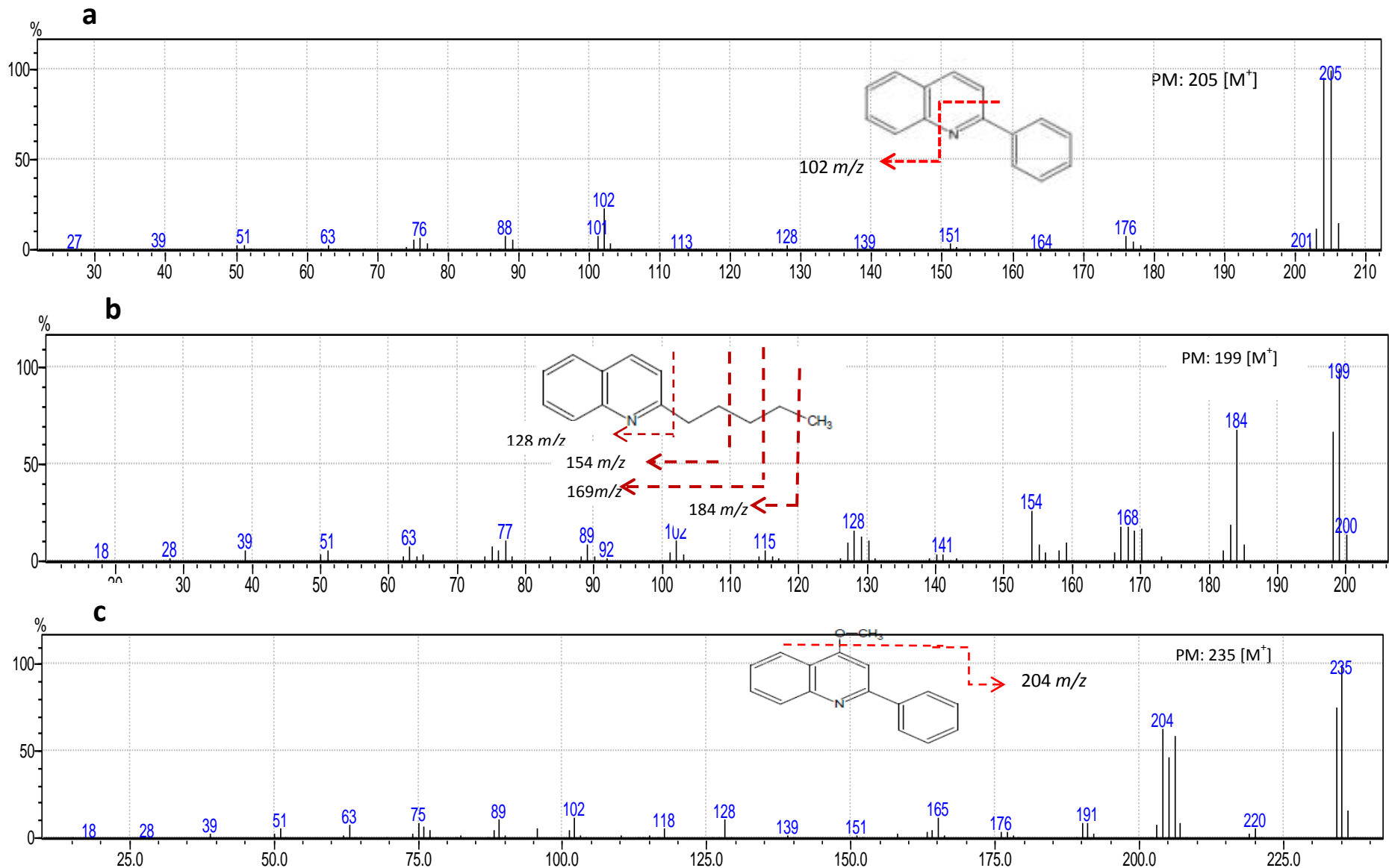
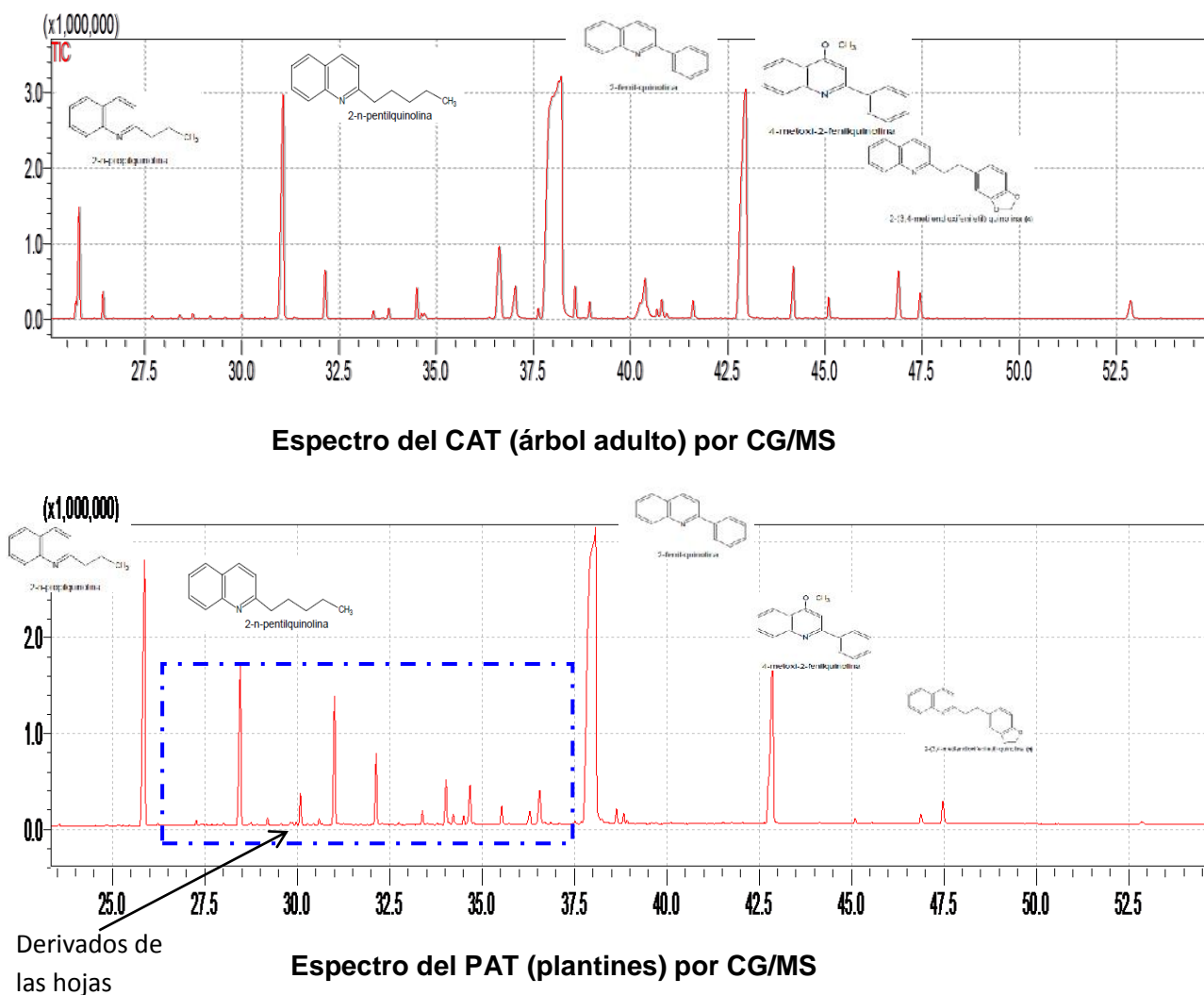


Figura 3. Espectros de masas de los alcaloides presentes en de los plantines de Evanta, de acuerdo al fraccionamiento de masas de moléculas con grupos aromáticos (a), cadenas alifáticas (b) y/o grupos metoxilo (c).

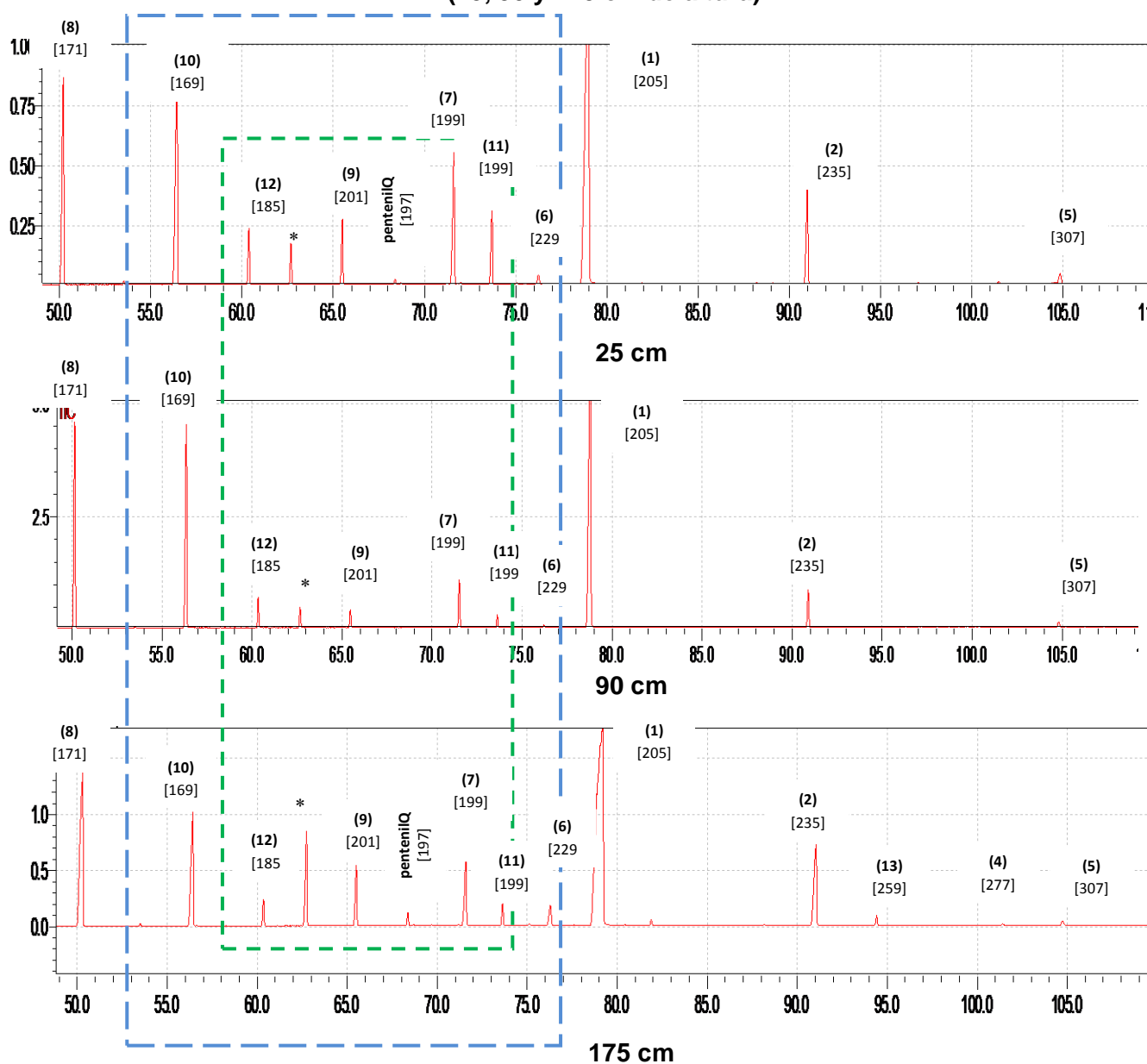
En los cromatogramas obtenidos se pueden observar los cinco alcaloides mayoritarios comunes tanto en la corteza del árbol adulto como en los plantines, estos son: a la 2-n-propilquinolina (**8**), 2-n-pentilquinolina (**7**), 2-n-fenilquinolina (**1**), 4-metoxi-2-fenilquinolina (**2**) y la 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**4**). Así mismo se observan, en el espectro de los plantines, varios picos pequeños de diferente abundancia relativa, encontrandos entre la 2-n-pentilquinolina (**7**) y la 2-n-fenilquinolina (**1**), haciendo a esta el área más variable, respecto a los alcaloides presentes en el árbol adulto, de las cuales, algunas pertenecen exclusivamente a las hojas. (**Figura 4**)

Figura 4. Comparación de los cromatogramas del árbol adulto y los plantines de Evanta



Una vez encontradas las principales diferencias, e identificados los alcaloides presentes en la corteza del árbol adulto CAT y los presentes en los plantines (PAT); se realizó una comparación entre los alcaloides de los grupos A, B y C, logrando obtener un panorama del comportamiento de los alcaloides al ser analizados por CG bajo nuestras condiciones de laboratorio. **(Figura 5)**

Figura 5. Comparación de los cromatogramas de los plantines de Evanta (25, 90 y 175 cm de altura)



Con esta comparación podemos observar que no existen grandes diferencias entre las abundancias relativas obtenidas por CG/MS, entre los diferentes tamaños de los plantines estudiados; la mayor diferencia se encuentra al comparar la región que abarca los 55 a 78 minutos de retención, principalmente entre los 60 y 65 minutos, ya que como se observa existe una mayor variación en cuanto a las proporciones relativas de los alcaloides (**Figura 5**); es en esta región donde se encuentran los alcaloides propios de las hojas como son las Chimaninas A (**9**), B (**10**), C (**11**) y D (**12**).

También se observa un pico a los $62,69 \pm 0.03$ minutos de retención (*) que no se pudo identificar, debido a que presentó diferente fraccionamiento y peso molecular en los distintos espectros de masas.

Para analizar si, se presentaba un patrón en la abundancia relativa de los componentes del concentrado total de alcaloides en los plantines y el aumento de la edad de estos, se realizó un análisis comparativo de las relaciones de porcentaje de cada uno de los alcaloides. (**Tabla 4**).

Tabla 4. Proporción relativa de alcaloides quinolínicos en los plantines

Alcaloides	Tiempo de retención	25 cm	90 cm	175 cm
		Relación (%)	Relación (%)	Relación (%)
8	50.240±0.05 C ₁₂ H ₁₃ N M/Z: [171]	13,2	20,5	16,5
10	56.423±0.05 C ₁₂ H ₁₁ N M/Z: [169]	16	21,6	9,3
12	60.348±0.01 C ₁₂ H ₁₁ NO M/Z: [185]	2,7	2,4	1,4
9	65.484±0.02 C ₁₃ H ₁₅ NO M/Z: [201]	3,1	1,6	3,6
pentenilquinolina	68.378±0.009 C ₁₄ H ₁₅ NO M/Z: [197]	0,2	-----	0,6
7	71.573±0.05 C ₁₄ H ₁₇ N M/Z: [199]	8,5	4,4	4,8
11	73.646±0.04 C ₁₃ H ₁₃ NO M/Z: [199]	3,9	0,8	1,3
6	76.36±0.2 C ₁₅ H ₁₉ NO M/Z: [229]	0,5	0,2	1,6
1	78.95±0.1 C ₁₅ H ₁₁ N M/Z: [205]	43,1	42,8	47
2	90.971±0.08 C ₁₆ H ₁₃ NO M/Z: [235]	6,1	3,6	7,7
13	94.804 C ₁₄ H ₁₃ NO ₄ M/Z: [259]	-----	-----	0.6
4	101.41 C ₁₈ H ₁₅ NO ₂ M/Z: [277]	-----	-----	0.2
5	104.746±0.04 C ₁₈ H ₁₇ NO ₃ M/Z: [307]	0,7	0,4	0.3

Comparando la abundancia relativa de los alcaloides quinolínicos contenidos en los grupos de plantines se observa que la abundancia relativa de alcaloides y por tanto la mezcla de los mismos varían de acuerdo al aumento de la edad o tamaño del plantín. Según algunos datos reportados por otros autores, se ha observado que la abundancia relativa de los alcaloides de *Galipea longiflora* varía mucho dependiendo la parte de la planta que es utilizada, observamos que existen compuestos que se encontrarían en mayor abundancia (Ej: 2-n-propilquinolina **(8)**) o exclusivamente en hojas (Chimaninas), otros en Raíz (Ej: 2-n-pentilquinolina **(7)**) y otros como la 2-n-fenilquinolina **(1)** esta presente en todos los órganos de la planta, llegando a representar entre un 40 y 70% de la abundancia relativa total. Por lo que la proporción de alcaloides en este concentrado es muy variable. (Llanos, 2008; Espinoza, 2011)

1.5.4 Actividad biológica in vitro

Se evaluó la actividad antiparasitaria, sobre promastigotes de *Leishmania* de los PAT de los grupos **A**, **B** y **C**, los resultados muestran fluctuaciones consideradas dependientes de la edad de estos y las proporciones relativas de los alcaloides en cada uno de estos plantines. No se observan diferencias significativas entre ellos, sin embargo, existe una diferencia marcada respecto al árbol adulto (**Tabla 5**) presentando los plantines 1.5 y 2.5 veces mejor actividad biológica frente a las cepas de *Leishmania* estudiadas.

La mejor actividad la presentó el grupo de plantines **A**, tanto sobre *L. amazonensis* ($CI_{50} = 11,5 \pm 2,4 \mu\text{g/mL}$) como sobre *L. braziliensis* ($CI_{50} = 6,4 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$), siendo estas actividades menores a las presentadas por el CAT del árbol adulto: *L. amazonensis* ($CI_{50} = 19,5 \pm 5,4 \mu\text{g/mL}$) y *L. braziliensis* ($CI_{50} = 17,05 \pm 4 \mu\text{g/mL}$). También se observa que mientras mayor tamaño o edad tenga el plantín, la actividad biológica disminuye ligeramente.

Tabla 5. Actividad leishmanicida de los PAT de plantines

Tamaño de plantin (cm)	<i>L. amazonensis</i> Lma IC ₅₀ µg/mL	<i>L. braziliensis</i> M2904 IC ₅₀ µg/mL	Σ
A	11,5±2,4	6,4±0,5	8,95±3,6
B	13,4±0,8	6,5±1	9,95±4,8
C	15,5±0,4	8,6 ± 0,15	12,05±4,8
Σ	13,4±1.2	7,2±0.55	10,3±1,6
CAT	19,5±5,4	17,05±4	18,2±1,7

Anfotericina-B
Droga de referencia

0,22±0,01

0,08±0,02

En trabajos anteriores se reporta que la actividad del CAT puede ser muy variable incluso sobre las mismas cepas de *Leishmania* (Salamanca, 2008), ya que al ser una mezcla de diferentes alcaloides quinolínicos estos influyen de forma independiente la actividad total (Giménez *et. al.*, 2005).

Cabe recalcar que en el presente estudio de trabajó con el plantin en su totalidad, es decir, hojas, corteza y raíz; es así que la comparación entre la variación de la actividad antiparasitaria frente a la variación del tamaño del plantin y a la composición química de los PAT de estos, nos da una pauta de cuáles serían las moléculas que podrían influir de forma directa a la actividad biológica. Haciendo un análisis comparativo de la abundancia relativa de cada uno de los alcaloides, respecto al tamaño y actividad biológica del plantin obtenida podemos observar, centrándonos en el grupo **A** (menor tamaño), ya que es este el que mejor actividad presenta frente a *Leishmania*, la principal diferencia se observa en la 2-n-pentilquinolina (**7**) que posee el doble de abundancia relativa (8,5%) a diferencia de los otros grupos; también se observa que las Chimaninas D (**12**) y C (**11**) presentan una abundancia ligeramente mayor. (**Tabla 4**)

Si bien los alcaloides quinolínicos influyen de forma independiente la actividad total, es decir, que poseen por si solos diferente actividad biológica, la mezcla de los diferentes compuestos en proporciones definidas podrá incrementar y/o disminuir la actividad biológica total. Todos los datos obtenidos, nos llevan a concluir que la edad de la planta, tiene una importancia considerable e influye no solo en la cantidad total de principios activos producidos, sino también en las proporciones relativas de los componentes de la mezcla activa.

1.6 CONCLUSIONES

- Se realizó la obtención de los PAT de los plantines de Evanta, presentando rendimientos muy bajos (menores a 0,93%), respecto al CAT del árbol adulto, del cual se obtiene un rendimiento mayor o igual al 2%.
- Se realizó la comparación química entre los PAT de diferentes tamaños de plantines y el CAT del árbol adulto a partir de cromatogramas y espectros de masas, encontrando similitud entre ambos para los componentes mayoritarios siendo estos la 2-n-propilquinolina (**8**) (50.24±0.05 min), la 2-n-pentilquinolina (**7**) (71.57±0.05 min), la 2-n-fenilquinolina (**1**) (78.95±0.1 min), la 4-metoxi-2-fenilquinolina (**2**) (90.97±0.08 min) y la 2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-quinolina (**4**) (101.41 min). La región con principales diferencias se encontró entre los 55 y 78 minutos con proporciones variables de los alcaloides encontrados en esta y que corresponden a las Chimaninas y alcaloides mayoritarios en hojas.
- Se evaluó la actividad biológica leishmanicida, encontrando una mejora en esta, para los plantines, en especial para el de menor tamaño, obteniendo Cl_{50} bajos (6,4±0,5 µg/mL para *L. braziliensis* y 11,5±2,4 µg/mL para *L. amazonensis*), respecto a los obtenidos a partir del CAT del árbol adulto, la comparación entre la variación de la actividad antiparasitaria frente a la variación de la abundancia relativa de los alcaloides de acuerdo al tamaño del plantin, nos da una pauta de que aquellas moléculas como la 2-n-propenilquinolina (**10**), Chimanina D (**12**), Chimanina C (**11**) y la 2-n-pentilquinolina (**7**) influirían en la actividad biológica. Sin embargo la mezcla de dichos alcaloides en determinadas proporciones es la que en realidad determina la actividad biológica total.

1.7 REFERENCIAS

1. Ávila J. (2000). **Preclinical studies of *Galipea longiflora* Krause (Evanta) using a toxic/kinetic model.** [Tesis de post-grado]. Universidad Andina Simón Bolívar.
2. Bourdy G., Giménez A., Quenevo C., (1999) “**Tacana: Ecunasha aquí, ecuna shaid’re necuana, me schanapaque**” (Tacana: **Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas**). UMSA, IIFB, IIQ, IBBA; FONAMA – EIA, La Paz – Bolivia. 409–416.
3. Calla J., Troye M., Fernández C. (2006) **El extracto de alcaloides de *Galipea longiflora* (Evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas pro-inflamatorias: Factor de necrosis tumoral e interferón-gamma *in vitro*.** *Biofarbo*. 14: 56-66.
4. Calla-Magarinos J., Quispe T., Giménez A., Frreysdottir J., Troye-Blomberg M., Fernandez C. (2009) **Quinolinic alkaloids from *Galipea longiflora* Krause suppress production of proinflammatory cytokines in vitro and control inflammation in vivo upon Leishmania infection in mice.** *Scandinavian Journal of Immunology* 77(1):30-38.
5. Espinoza B., (2011) **Estudio de Plantas Antiparasitarias de Farmacopeas Tradicionales de Bolivia “*Galipea longiflora* Krause y *Piper hispidum* Swartz.** [Tesis de post-grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
6. Estado plurinacional de Bolivia. Ministerio de salud y deportes. (2001) **Normas para medicamentos naturales, tradicionales y homeopáticos.**
7. Fournet A., Angelo A., Muñoz V., (1994) **Leishmanicidal and trypanocidal activities of medicinal bolivian plants.** *Journal of ethnopharmacology*. 41:19-37
8. Fournet A., Hocquemiller R., (1993) **Les chimanines, Nouvelles Quinoleines Substituées en 2, Isolées d’Une plante Bolivienne Antiparasitaire: *Galipealongiflora*.** *Journal of Natural Products*. 56(9): 1547-1552
9. Fournet A., Vagneur B., Richomme P. (1989) **;Aryl-2 et alkyl-2 quinoleines nouvelles isolkes d’un Routacee bolivienne : *Galipealongiflora*.** *Can. J. Chem*. 67 : 2116-2118
10. Gantier JC., Fournet A., Muñoz MH. (1996). **The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on *plasmodium vinckei*petteri, infected mice.** *Plantamedica*. 62(3):285-286.
11. Giménez A., Ávila JA., Ruiz G., Paz M., Udaeta E. (2005) **Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipealongiflora* Krause.** *Revista boliviana de química*. 22 (1):94-107.
12. Herrera V. (2008) **Toxicidad del extracto de alcaloides totales de *Galipea longiflora* Krause kallunki (Evanta) en fase pre-clinica.** Tesis de post-grado. La Paz-Bolivia.
13. <http://www.scai.uma.es/servicios/aqcm/ems/ems.html>[Fecha de acceso abril 2012]
14. Killen T J, García E, Beck S. (1993) **Guía de Árboles de Bolivia.** La Paz – Bolivia 709 – 710.

15. Levietava J. (1992) **Medicinal plants in a middle Paleolithic grave shanidar IV.** *J Ethnopharmacology*. 35:263-266
16. Limachi I. (2009) **Análisis por cromatografía de gases de metabolitos secundarios volátiles de las especies vegetales *Bertholletia excelsa* (Nuez de Brasil) y *Galipea longiflora* (Evanta).** [Tesina de Grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
17. Limachi I. (2013) **Estudio químico cuantitativo y el uso como antiparasitario, del extracto etanolico de la corteza de *Galipealongiflora* (EVANTA).** [Tesis de post-grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
18. Llanos F. (2008) **Estudio químico comparativo alcaloides en corteza de *Galipea longiflora* (Evanta) colectada en cinco regiones del norte de La Paz.** [Tesina de Grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
19. Llanos Medina F., Espinoza Cruz B., Salamanca Capusiri E., Chuqui R., Flores Quisbert N., Giménez Turba A. (2009) **Extracción acuosa de corteza de *Galipea longiflora* y su actividad leishmanicida.** *BIOFARBO* 17(2): 32-38.
20. Mester I., *Fitoterapia*. 1973; 44: 123-152
21. Pirani J., Kallunki J. (2007) **Two new species of *Galipea* (Rutaceae, Galipeae) from Boliva, Ecuador and Peru.** *Brittonia*. 59 (4): 343-349
22. Programa UMSA - ASDI - SAREC, **Proyecto Enfermedades Infecciosas: Evanta en el Tratamiento de la Leishmaniasis cutánea** (Financiador Suecia, 2007-2011)
23. Quiroga S. M. (2011) **Biotransformación del alcaloide 2-n-fenilquinolina por hongos fitopatogenos, procedentes del cepario del IIFB.** [Trabajo de Grado]. Universidad Mayor de San Andrés. . La Paz-Bolivia.
24. Salamanca E. (2008) **Actividad antiparasitaria multiple de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* Krause kallunki (Evanta).** [Tesis de post-grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
25. Salamanca Capusiri Efrain, Ruiz Pinell Grace, Ticona Huallpara Juan Carlos, Giménez Turba Alberto. (2008) **Método colorimétrico - XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida.** *Biofarbo* 16(1):
26. Ticona J C. (2008) **Estudio químico de dos plantas bolivianas de la etnia tacana: *Galipea longiflora* y *Bowdichia virgiloides*.** [Tesis de post-grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
27. www.Missouribotanicalgarden.com. [Fecha de acceso, marzo 2012]
28. www.Zipcodezoo.com/Plants/G/Galipealongiflora.asp. [Fecha de acceso marzo 2012]
29. Zanatta F., Becker Gandolfi R., Lemos, M., Ticona, J., Giménez, A., KurzClasen B. & Faloni de Andrade, S. (2009). **Gastroprotective activity of alkaloid extract and 2-phenylquinoline obtained from the bark of *Galipea longiflora* Krause (Rutaceae).** *Chemico-biological interactions*, 180 (2), 312-317.

2.1 RESUMEN

Farmacopea Tacana

Se realizó un estudio analítico, comparativo para la validación del uso tradicional como antiparasitario de *Galipea longiflora* (Evanta) frente a un fármaco de actividad reconocida (Mebendazol) en niños en edad escolar en la comunidad de Charcas II, en la provincia Sud Yungas, del departamento de La Paz.

Materiales y métodos

El estudio se dividió en 2 partes: la primera en 2012, con la administración de tratamiento a 47 niños. Se realizó un examen coproparasitológico inicial; de acuerdo al diagnóstico a 23 niños se les administró Mebendazol (1200mg), a 24 de ellos la decocción de Evanta en jugo de naranja (100 mL por 10 días). Se determinó la eficacia del tratamiento según la negativización del coproparasitológico y/o disminución del número de parásitos. La segunda parte en 2013, incluye la evaluación del número de casos de infección, después de aplicar un placebo a los grupos que recibieron tratamiento en 2012. Además del tratamiento con Albendazol (400mg) de los alumnos nuevos.

Resultados

Ambos tratamientos presentan alta tasa de curación; siendo mayor para helmintos, llegando a ser muy difícil la eliminación de protozoarios, sin embargo, si se pudo controlar los niveles de parasitosis intestinales mediante la introducción del programa “Desparasitación en escuelas rurales”.

En el caso de *Hymenolepis nana*, ninguno de los tratamientos aplicados tuvo eficacia contra este parásito, ya que los tratamientos aplicados no son los adecuados para la eliminación de este, sin embargo el estudio pretendía evaluar la acción de la decocción de corteza de Evanta en jugo de naranja frente al mismo.

En 2013 se pudo observar un incremento en la prevalencia de parásitos, cuando se administró el placebo; llegando a reaparecer parásitos que se habían eliminado, también se encontraron casos de enterobiosis, cuando en un principio del estudio no se había reportado ningún caso por esta parásito.

En el caso de la eficacia del Albendazol, se encontró un porcentaje de curación bueno frente a helmintos. Frente a los protozoarios, solo tuvo eficacia para algunos de ellos.

Estudio de validación de la decocción de corteza de galipea longiflora (Evanta) en jugo de naranja como tratamiento en la desparasitación de niños en edad escolar

2.2 ANTECEDENTES

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), ha venido realizando, a partir del año 1993 estudios, conocida por los Tacana como Yuruma Huana Epuna o Evanta, (nombre vernacular en las culturas Mosekene y Tsimane), según las farmacopeas tradicionales, también se la utiliza como antiemético, vermífugo, amebicida y en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales (Bourdy *et al.*, 1999).

Entre el 2000 al 2006, las colectas de corteza de Evanta y sus estudios, en el IIFB, han permitido formar parte de la Red Iberoamericana de Investigación (CYTED) y con el apoyo de diversos financiadores internacionales (CYTED; OEA.; IRD; Asdi-SAREC), se completaron estudios químicos biodirigidos, biológicos *in vitro*, (cepas de Leishmania, referencia y circulantes en Bolivia), toxicológicos *in vivo* y de seguridad preclínica de la especie antiparasitaria de la especie Evanta (*Galipea longiflora*).

Una muestra científica del uso tradicional de la Evanta como amebicida, fue descrito al determinar el CI_{50} del CAT frente a dos cepas de *Acanthamoeba (castellani-polyfaga)* $CI_{50} = 12,01 \text{ ug/mL } (\pm 0,67)$ y $27,34 \text{ ug/mL } (\pm 2,65)$ que muestra una estrecha relación al CI_{50} de miltefosina (Salamanca, 2008). Así mismo mediante modelos tóxico-cinéticos, se determinaron la toxicidad aguda, subcrónica y parámetros farmacocinéticos para el extracto crudo en modelos murino, sobre la base de los antecedentes descritos (Herrera, 2008).

También se ha llegado a estandarizar un método de extracción de alcaloides totales (CAT) de Evanta a escala piloto, además se han podido desarrollar formulaciones farmacéuticas tópicas (Rodríguez, 2006) y sistémicas al

1 %, 2% y 5% (Ticona, 2008) a base de los alcaloides totales de la corteza de Evanta, que han sido evaluadas en estudios clínicos de Fase II en el tratamiento de la Leishmaniasis cutánea, en el Hospital de Palos Blancos, gracias al Proyecto multidisciplinario y Facultativo: “Enfermedades Infecciosas” (FCF y B-IIFB-CIDME-SELADIS-UMSA-Asdi-SAREC, OSCAR). El estudio clínico llevado a cabo entre 2007 y 2011 y los excelentes resultados preliminares, han empujado a desarrollar proyectos de desparasitación en niños de escuelas rurales, con el fin de validar los usos tradicionales de esta especie antiparasitaria.

Desde el año 2009, se está validando, el uso tradicional, en el tratamiento de parasitosis intestinales con proyectos UMSA-IDH y el proyecto OSCAR. Gracias al Proyecto de Interacción Social IDH y con aval del comité de ética; reconociendo que el jarabe de Evanta es un medicamento seguro por todos los estudios ya realizados y siguiendo con las farmacopeas tradicionales, se ha realizado el primer estudio piloto de desparasitación de niños, que pretende comparar la efectividad del jarabe de Evanta al 2% (Limachi, 2013) mediante el análisis coparazitológico en niños de la escuela Charcas II, ubicada en la región amazónica del norte del departamento de La Paz, en la provincia Sud Yungas, perteneciente a la sectorial educativa de Inicua.

2.2.1 *Parasitosis intestinales*

Las parasitosis intestinales, producidas por protozoarios y helmintos, afectan a más de 2 billones de la población mundial y constituyen un problema de salud pública, especialmente en países en vías de desarrollo que mantienen altas tasas de prevalencia debido a las deficientes condiciones de saneamiento ambiental, insuficiente educación sanitaria y a la falta de medidas de control y prevención adecuadas (Figuera, 2006).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2010 estimó que en el mundo habían 3500 millones de individuos parasitados y aproximadamente 450

millones padecen enfermedad parasitaria y de esta la mayor proporción corresponde a la población infantil. La alta prevalencia de estas infecciones representa serios problemas médicos, sanitarios y sociales. (Gonzales, 2004). Las enteroparasitosis a pesar de tener una distribución mundial, son más comunes en áreas tropicales y subtropicales, de países subdesarrollados. (Grenier, 2008) La población infantil es la más susceptible debido a su inmadurez inmunológica y al poco desarrollo de hábitos higiénicos. Son considerados actualmente marcadores de subdesarrollo por las Naciones Unidas. (Ledezma, 2004)

Numerosos estudios han demostrado la relación que existe entre la pobreza y las condiciones higiénicas, limitaciones que se asocian a una alta frecuencia e intensidad de estas infecciones. Entre las causas de morbilidad infantil a nivel mundial, la producida por parásitos intestinales se sitúa en el tercer lugar, precedida por las infecciones respiratorias agudas y las diarreas, con una incidencia del 14 al 25%, especialmente en niños menores de 5 años. (OPS, 2009)

Los altos niveles de parasitismo intestinal de la población se explican por la contaminación fecal de la tierra e higiene personal inadecuados, favoreciendo la diseminación peculiar de los parásitos intestinales. En el caso de la mayoría de los protozoos sus estadios ya salen infectantes en las heces por lo que su diseminación es mayor cuando ocurre contaminación de manos, uso de aguas servidas y preparación poco higiénica de alimentos.

Estos parásitos causan diarreas y vómitos, así como dolor y anemia crónica, que hace que los niños falten frecuentemente a la escuela y tengan un peor rendimiento cuando logran asistir a clases. Estas infecciones también limitan el crecimiento físico, tanto en términos de peso como de estatura, a medida que los parásitos roban a los niños el hierro, las proteínas y otros nutrientes vitales. Además, los niños con parásitos en sus intestinos a menudo comen menos de lo que necesitan, porque los geohelminfos (especialmente las uncinarias) pueden suprimir el apetito (Stephenson, 2003).

El parasitismo intestinal es una de las enfermedades transmisibles más difíciles de controlar, no solo por su gran difusión, sino por los diversos factores que intervienen en su cadena de propagación.

2.2.2 Parasitosis Intestinales en Bolivia

Más de una cuarta parte de los niños menores de 5 años en Bolivia (26,5%) padecen de desnutrición crónica (baja talla para la edad), la cual afecta con mayor intensidad a los niños del área rural (37%); si se analiza esta situación de acuerdo a niveles de pobreza, 42%. Casi el 8% de los niños menores de 5 años tienen un peso deficiente para su edad. La desnutrición global en menores de 2 años es de 15%; la aguda de 6% y la desnutrición crónica de 38%, siempre se relaciona la desnutrición con las parasitosis. (Ministerio de Planificación para el Desarrollo, 2009)

En toda América latina y en Bolivia las parasitosis intestinales se constituyen como enfermedades endémicas y prevalentes consecutivas a las deficientes condiciones económicas de saneamiento y educación en salud. Las cifras que suministra la OMS son alarmantes; cuando citan porcentajes de 25% de la población mundial infectadas por una sola parasitosis que altera la calidad de vida (OMS, 2010). Sin embargo en nuestro país, hasta el año 1986 más del 65% de la población se encontraba multiparasitada con cargas parasitarias de moderada a abundantes (Lagrava, 1986). Los valores informados en los últimos años, van desde 6 hasta 58,1 % (Miranda, 2007) no existiendo una gran mejora respecto a décadas pasadas (Calamani, 2006).

En Bolivia, existen aproximadamente 17 especies de parásitos como productores potenciales de infección intestinal humana, de los cuales son los helmintos aquellos de mayor predominancia y riesgo para la salud. Siendo la tasa general de consulta externa por esta dolencia de 1.9/100 habitantes en asegurados residentes en la ciudad de La Paz. (Castillo, 1991)

En los últimos años en nuestro país se han llevado a cabo varios estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de parasitosis intestinales. Por ejemplo: un estudio en cinco unidades educativas de los distritos 4, 5 y 6 de Tiquipaya. Muestra el 61% de los niños parasitados, siendo las parasitosis más frecuentes *Entamoeba histolytica*, *Hymenolepis nana* y *Giardia lamblia* (Martínez, 2008),

2.2.2.1 *Giardia lamblia*

Es el parásito protozoario patógeno más común hallado con una prevalencia general que alcanza hasta un 38% (Herrera, 2005). En niños que habitan la zona altiplánica se informan cifras superiores al 20%, y en la zona tropical del Río Beni, se reporta una prevalencia del 18.5%. (Luna *et. al.*, 2007) siendo los niños de 0-3 años los más afectados (71%). (Condori, 2008)

2.2.2.2 *Blastocystis hominis*

Muchos estudios muestran a *Blastocystis hominis* como el parásito de mayor prevalencia de hasta un 56% de la población adulta (Muñoz *et al.*, 2008). Y hasta un 40% en el área rural en el trópico, encontrando mayor prevalencia en niños de 5 a 10 años (Tamayo, 2003).

2.2.2.3 *Ascaris lumbricoides*

La prevalencia varía en el altiplano de 1,4 a 8,9%, en los valles de 5,1 a 83% y en las zonas tropicales, del 15 al 96%. Un estudio en 155 niños de 2 a 9 años de la población de Isinuta en el Chapare del valle de Cochabamba encontró una prevalencia del 64% para esta parasitosis. (Koller, 1994)

2.2.2.4 *Trichuris trichiuria*

Dentro de los nematodos intestinales ocupa el segundo lugar en prevalencia, estimando una prevalencia hasta el 9,4% en el altiplano, hasta un

66% en los valles y hasta un 87% en las zonas tropicales. Los trabajos específicos que buscaron a este parásito encontraron una prevalencia del 54% (Mollinedo-Prieto, 2006).

2.2.2.5 *Strongiloides stercoralis*

Los datos disponibles acerca de este parásito en zonas tropicales advierte una prevalencia de hasta un 45% (Martínez, 2008). Un trabajo realizado en la población de Caranavi (Zona tropical del departamento de La Paz), en 72 personas, mayormente niños, se informaron once casos (15,27%) con *Strongyloides stercoralis* (Pinal, 2011).

2.2.2.6 *Uncinarias*

Las uncinarias presentan bajas prevalencias con alto grado de daño en los pacientes, un estudio en la provincia de Larecaja en la zona tropical de La Paz informa una prevalencia del 7,2% (Calderón, 2007). Según el informe de la PAHO las uncinarias presentan una prevalencia del 1 al 84% de prevalencia. (Melgar, 2000)

En cuanto a la influencia de los ecosistemas, la zona Andina, seca y fría, no es propicia para el desarrollo del ciclo biológico de los parásitos, particularmente de los nematodos intestinales; mientras que en la zona tropical la prevalencia de nematodos es importante, pero diferenciada por especies, según predominen los bosques húmedos con tasas altas de nematodos y bajas en protozoos, fenómeno inverso en zonas con bosques secos (Urgel, 1992)

En la **Tabla 6** , se compara la frecuencia de parasitismo intestinal en el Departamento de La Paz, en dos zonas geográficas: El Alto (Altiplano) y Alto Beni (Zona Tropical), reconociendo que la contaminación fecal es muy importante, al observar cifras elevadas de protozoos intestinales, patógenos y no patógenos; por el contrario, en Alto Beni predominan los helmintos.

Tabla 6. Prevalencia de parásitos en menores de cinco años de la ciudad de El Alto (2000) y de Alto Beni (1998)

Parásito	El Alto (%)	Alto Beni (%)
<i>E. coli</i>	31.2	45
<i>G. lamblia</i>	26.3	32.5
<i>B. hominis</i>	19.7	50.0
<i>C. mesnili</i>	4.0	---
<i>E. histolytica</i>	3.9	22.3
<i>E. nana</i>	3.0	22.5
<i>I. butschilii</i>	1.9	7.5
<i>A. lumbricoides</i>	6.4	2.5
<i>H. nana</i>	2.8	32.5
<i>T. trichiura</i>	0.4	7.5
<i>S. stercoralis</i>	0.3	12.5
<i>Taenia spp.</i>	0.2	---
<i>Uncinarias</i>	0.2	60.0
<i>E. vermicularis</i>	0.1	---

Fuente: Angles R, *Rev. Sociedad Boliviana de Pediatría*, 2000

Desde el año 1985, el Ministerio de Previsión Social y Salud Pública, decidió aplicar un programa de control de parasitosis en niños de 5 a 12 años con cobertura contra helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Anquilostomideos*). Con la administración de Mebendazol en una dosis única de 200mg en zonas con clima frío, 300mg con clima templado y 400mg con clima cálido, se disminuyó la prevalencia de helmintiasis en zonas urbanas y en menor grado en zonas rurales

2.2.3 Tratamientos contra las Parasitosis

Los niños son el grupo objetivo de máxima prioridad para el tratamiento, debido a los agotadores efectos de las infecciones por parásitos. Se estima que 46 millones de niños en edad preescolar y escolar corren el riesgo de contraer una infección por geohelmintos en la región, debido a que no tienen acceso a instalaciones mejoradas de saneamiento. Esto equivale al 25 % de los niños en edad escolar y más de la mitad de todos los niños de las áreas rurales desde

México hasta Argentina. A pesar de eso, solo entre el 23 y 33% de estos niños está recibiendo tratamiento anti-parasitario (Miguel, 2004).

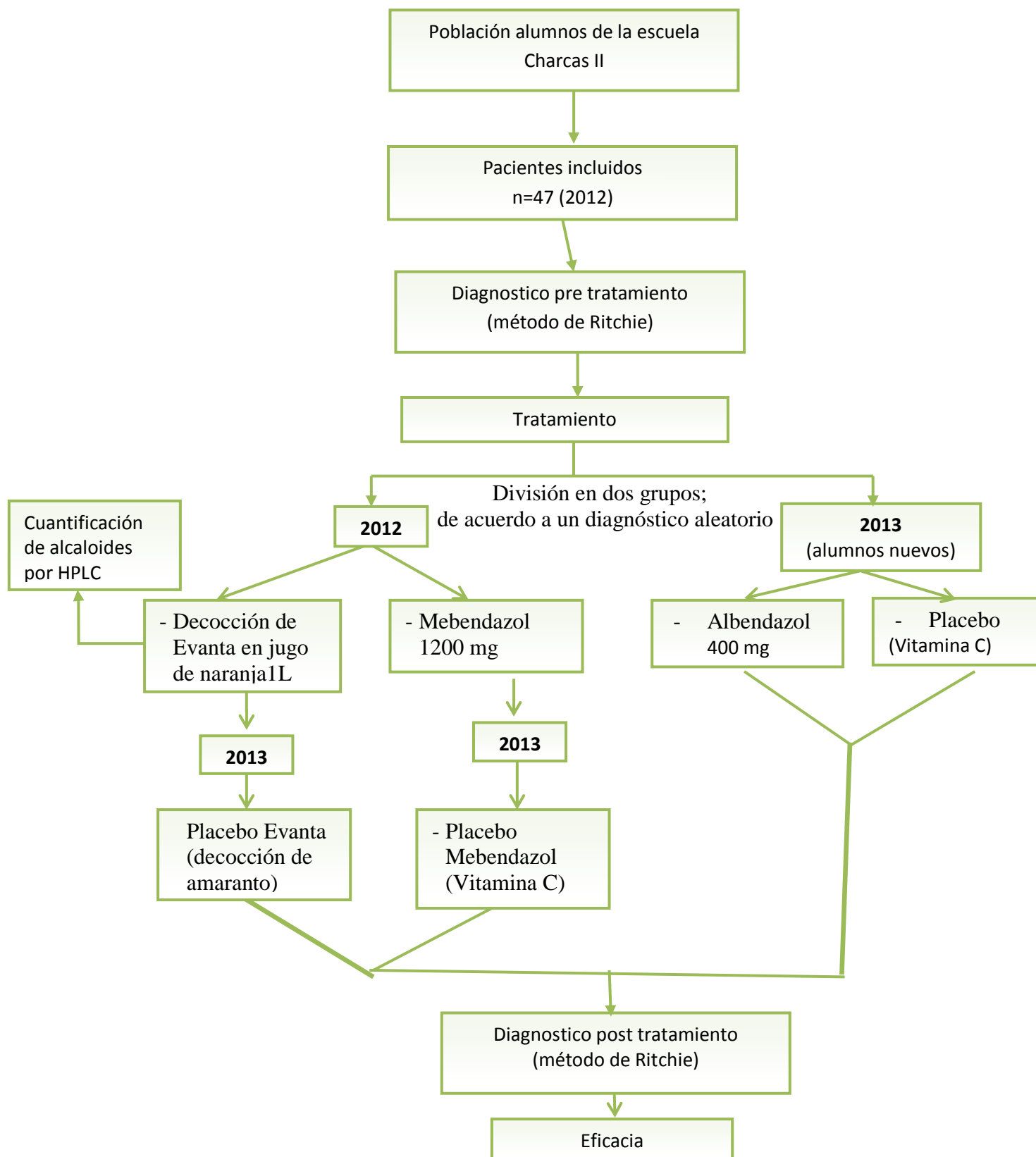
Cuando se administra el tratamiento contra los parásitos intestinales comúnmente se pasa por alto un segmento importante de la población. A los niños muy pequeños se les excluye de la mayoría de las campañas contra los parásitos intestinales, las cuales por lo general tienen lugar en las escuelas. Estudios han demostrado que los niños que todavía no van a la escuela tienen niveles más altos de infección por parásitos intestinales por lo tanto dar medicamentos anti-parasitarios a este grupo es altamente costo-efectivo (Caribin, 2000).

Sin embargo, es importante observar que no todas las formulaciones que existen actualmente para el tratamiento son apropiadas para los niños en edad preescolar (1-4 años). Por consiguiente, se necesitan nuevas formulaciones pediátricas apropiadas para los niños de esa edad, incluyendo las presentaciones líquidas, para llegar a esta población de niños pequeños con medicamentos esenciales (Keiser, 2010).

2.3 OBJETIVO

- Validar la eficacia, de la decocción de la corteza de *Galipea longiflora* (EVANTA) en jugo de naranja, frente al Mebendazol, como tratamiento contra parasitosis en un estudio de campo.

2.4 METODOLOGIA



2.4.1 Preparación de la decocción de alcaloides totales de *G. longiflora* en jugo de naranja

Fueron pesados 6000g de corteza molida de Evanta, repartidos en 10 alícuotas de 600g, los cuales se hacen hervir en 6000 mL de jugo de naranja, hasta obtener un volumen final de 2400 mL de la decocción, luego esta decocción es filtrada, endulzada y enfriada, para luego ser administrada.

2.4.2 Cuantificación de alcaloides totales, presentes en la decocción de *G. longiflora* en jugo de naranja, por HPLC

La cuantificación de alcaloides totales corteza de *Galipea longiflora* (CAT) en la decocción en jugo de naranja preparada, se realizó utilizando un método de análisis por HPLC en gradiente de 65 a 85% de metanol, empleando una columna C-18 y detector por fotodiodo.

Condiciones cromatográficas

Cromatógrafo:	Waters HPLC
Columna:	Phenomenex, Luna-C18 (15cm x 4.6 m), 5 μ
Detector:	W - 2996
Volumen de inyección:	20 μ l
Temperatura de la columna:	20 °C
Velocidad de flujo:	1 ml/min

2.4.3 Estudio de campo controlado

Este estudio pretende demostrar la efectividad de la administración de la decocción de alcaloides totales de corteza de **EVANTA** en jugo de naranja, sobre los parásitos intestinales, frente al tratamiento con un medicamento de efectividad reconocida como el **Mebendazol**. Además de una comparación de la eficacia de estos con el **Albendazol**, siendo este un fármaco reconocido por tener un espectro de acción más amplio.

2.4.3.1 Población

Se tomaron en cuenta para el estudio todos los niños inscritos en las gestiones 2012 – 2013 entre los ciclos; inicial a séptimo de primaria, de 5 a 13 años de edad, pertenecientes a la escuela de la comunidad Charcas II, ubicada en la provincia Sud Yungas, al norte del departamento de La Paz, la escuela pertenece a la sectorial educativa de Inicua.

El estudio se llevó a cabo durante dos gestiones: en la primera gestión (2012) se administraron dos tratamientos y en la segunda gestión (2013) se administró el placebo correspondiente a cada tratamiento, además se administró un tratamiento diferente a los alumnos nuevos. De acuerdo a un diagnóstico aleatorio inicial se administraron los siguientes esquemas de tratamiento:

TRATAMIENTO	2012	2013
Tratamiento 1	Decocción de alcaloides totales de corteza de Evanta en jugo de naranja (100 mL por diez días) cuatro veces al año	Placebo de Evanta; decocción de pito de Amaranto en jugo de naranja (100mL por diez días) tres veces al año.
Tratamiento 2	Mebendazol 1200 mg (400mg por tres días) dos veces al año	Placebo de Mebendazol; Vitamina C 300mg (100mg por tres días) dos veces al año

Alumnos nuevos (gestión 2013):

Tratamiento 3	Albendazol 400 mg en un día, dos veces al año
	Placebo de Mebendazol; Vitamina C 300mg (100mg por tres días) dos veces al año

Variables independientes:

- Administración oral de la decocción de alcaloides totales de corteza de Evanta (*Galipea longiflora*) en jugo de naranja
- Administración oral de Mebendazol
- Administración oral de Albendazol

Las variables dependientes:

- Eficacia del tratamiento (parásitos eliminados--parásitos persistentes y número de casos de infección), mediante la determinación de presencia/ausencia de parásitos en heces fecales, por un estudio coproparasitológico.

2.4.3.2 Diagnóstico coproparasitológico.

2.4.3.3 Recolección de muestras fecales

A cada niño se le hizo entrega de un contenedor estéril de plástico de 100mL de capacidad etiquetado con el nombre y grado escolar. Gracias a la colaboración del personal de apoyo, los contenedores fueron recogidos de forma inmediata y trasladados al laboratorio, montado en un ambiente brindado por la comunidad.

2.4.4 Procesamiento y análisis de las muestras fecales

2.4.4.1 Examen macroscópico de las muestras fecales

Se llevó a cabo un examen macroscópico de las muestras de heces fecales, observando y registrando los caracteres organolépticos: consistencia, color, presencia de moco, sangre, restos alimenticios y la eventual presencia de helmintos (enteros o partes de ellos).

2.4.4.2 Método de Concentración de Ritchie

En un tubo de centrifuga, se colocó 1 a 2 g de heces y diluyó con 3mL de solución fisiológica, se filtró en tres capas de gasa y se enrasó con solución de formol al 10% hasta 8mL, posteriormente se añaden 2mL de éter, por último se mezcla y centrifuga el tubo de 2500 a 3000 r.p.m. por 10 a 15 minutos.

Se decanta el sobrenadante y deposita un poco del sedimento en una lámina portaobjetos con la ayuda de una pipeta Pasteur, en solución salina 0.9% y

Iugol al 2% en busca de huevos de helmintos y quistes y trofozoítos de protozoos, se coloca un cubreobjetos y observa al microscopio a 10x y 40x.

2.4.4.3 Parámetros de análisis

Los parámetros de parasitismo fueron obtenidos en relación a la siguiente tabla.

Tabla 7. Parámetros de diagnóstico coproparasitológico

Asignación	Numero de parásitos
Muy escasos	1-2 por placa
Escasos	1 por campo
Ocasionales	1-3 por campo
Moderada cantidad	3 -5 por campo
Frecuentes	6-10 por campo
Numerosos	11 – 15 por campo
Abundantes	>15 por campo

2.4.5 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se expresaron en tablas de prevalencia mediante estadística descriptiva. Además, se evaluó la eficacia del tratamiento, de acuerdo con la disminución del número de parásitos y su efectividad, mediante la determinación del porcentaje de casos curados que habían estado infectados al inicio del estudio, usando el programa estadístico R-Project versión R-2.15.2-win.

2.5 RESULTADOS Y DISCUSION

2.5.1 Cuantificación de alcaloides totales en la decocción de *G. longiflora* en jugo de naranja, por HPLC

Se determinó el contenido de alcaloides totales de *Galipea longiflora* (Evanta) en jugo de naranja, en las decocciones preparadas y administradas a lo largo del tratamiento, empleando un método de HPLC en gradiente de 65 a 85% de Metanol, durante un tiempo de corrida de 20 minutos, previa elaboración de una curva de calibración empleando 2-fenilquinolina pura, en diferentes concentraciones 5 – 90 µg/mL. La ecuación (1) permitió cuantificar las concentraciones aproximadas de alcaloides totales en las decocciones.

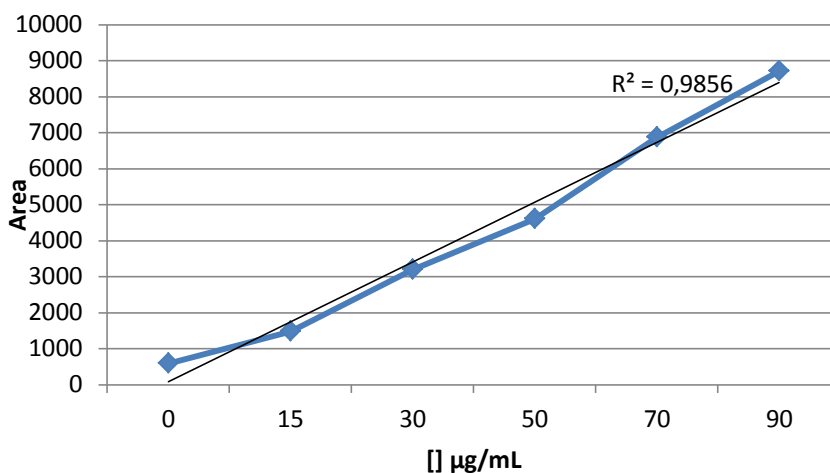
$$y = 95572x + 91398$$

Ecuación 1.
$$x = \frac{y - 91398}{95572}$$

Tabla 8. Áreas para las diferentes concentraciones 2-FQ mediante HPLC

[] µg/mL	área
5	580229
10	1021321
15	1387257
20	1471219
30	3195244
50	4597790
70	6873796
90	8704516

Figura 5. Curva de calibración de la 2-fenilquinolina



Las muestras se inyectaron por triplicado en el sistema HPLC (**Anexo 1**), estas fueron diluidas hasta un factor de 10^{-3} .

La fase móvil resolvió el CAT, con un tiempo de retención de $11,1 \pm 0,46$ minutos. Los cromatogramas de la preparación estándar (2-fenilquinolina) y de la preparación de muestra se muestran en la **Figura 6** y **7** respectivamente.

Figura 6. Cromatograma típico de la 2-fenilquinolina estándar

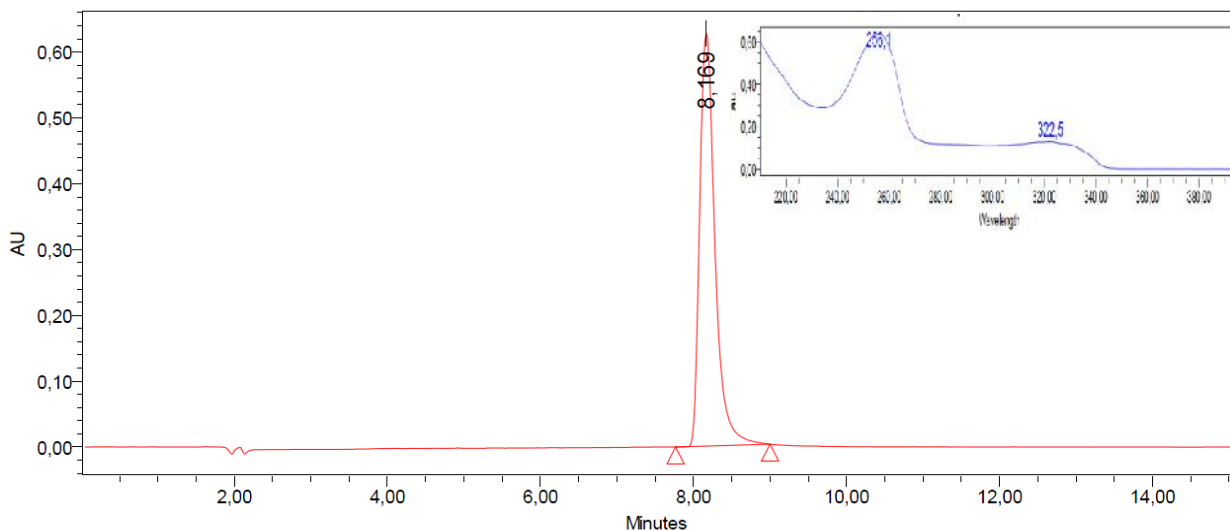
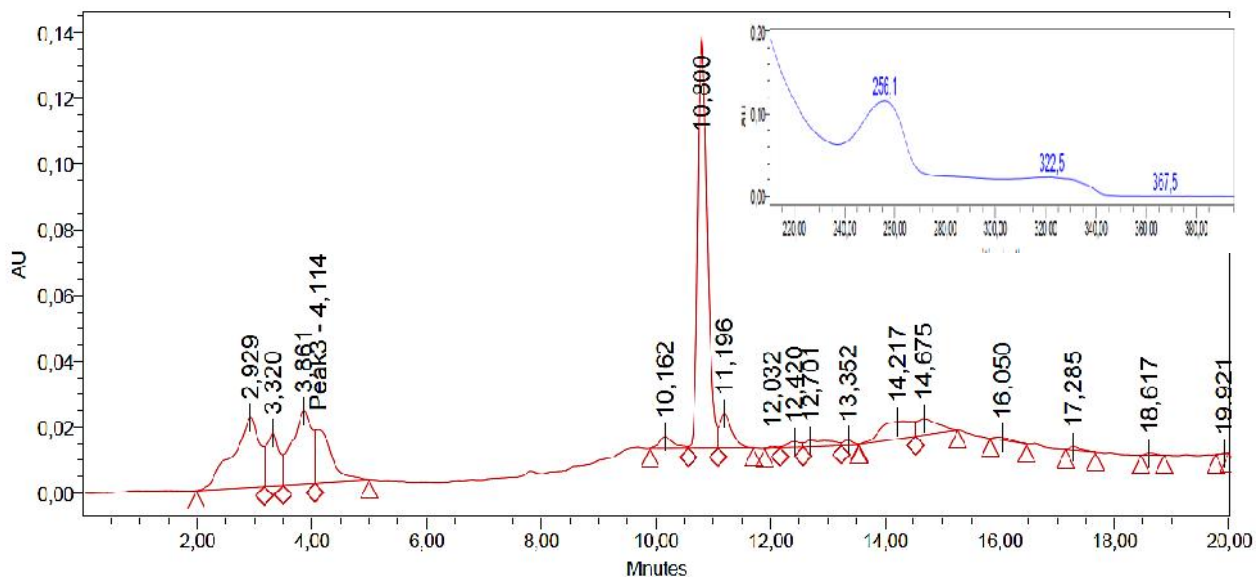


Figura 7. Cromatograma de la muestra de análisis de la inyección de decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja



Las áreas de pico medias obtenidas se indican en la **Tabla 9**. A partir de la pendiente de resultados se calculó el estimado administrado de CAT en cada tratamiento.

Tabla 9. Estimado administrado de CAT

MES	Σ AREA	[] μg/mL	g/100mL	100mL/día por 10 días
JUNIO-2012	1703888±0.41	16870,93	1,69	16,9
AGOSTO-2012	1366457±1.2	13341,34	1,33	13,3
SEPTIEMBRE-2012	1526964±0.5	15019,73	1,50	15,0
NOVIEMBRE-2012	1532436±0.48	15078,04	1,51	15,1

2.5.2 Validación de la decocción de Galipea longilflora (Evanta) en jugo de naranja como tratamiento en la desparasitación de niños en edad escolar

La comunidad de Charcas II está ubicada en la provincia Sud Yungas, al norte del departamento de La Paz, Bolivia; el territorio tiene un rango altitudinal de 400 metros sobre el nivel del mar (S: 15° 27' 607" y O: 67° 15' 862").

Se realizó un estudio comparativo para evaluar la efectividad terapéutica de la decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja frente a un fármaco de acción reconocida como el Mebendazol, y así validar su uso en el tratamiento de las parasitosis intestinales.

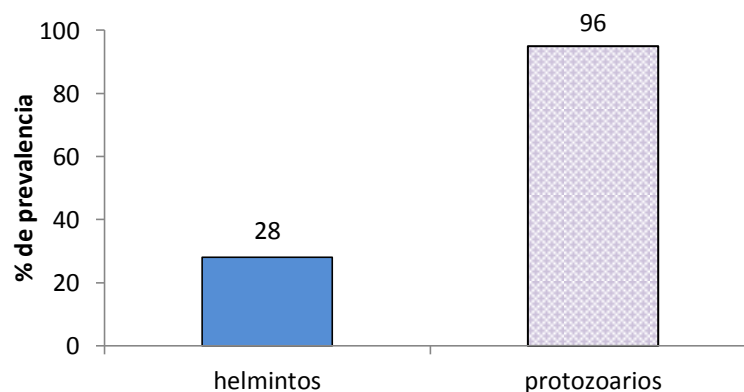
Se tomó como muestra al universo de niños en edad escolar de la comunidad puesto que todos acuden a la escuela. Se realizó un examen coproparasitológico inicial a los niños en edad escolar de la comunidad, para lo cual se solicitó a los padres que llenen y firmen una ficha con los datos del niño y/o niña (consentimiento informado, **Anexo 2**). Para el levantamiento de datos se utilizó una ficha diseñada exclusivamente para este fin (**Anexo 3**).

El análisis de los resultados obtenidos en este estudio está dividido en tres partes: la primera evalúa los resultados a nivel general, independientemente del tratamiento administrado; la segunda evalúa el efecto obtenido sobre los helmintos después de la administración de los diferentes tratamientos, y la tercera parte, el

efecto sobre los protozoarios; este estudio incluye la evaluación antes del tratamiento y la administración de este (2012), el análisis detallado será en relación a la presencia o no de parasitosis y la disminución en el número de parásitos; además de la evaluación del número de casos de infección, después de haber aplicado el placebo correspondiente a cada tratamiento (2013).

Previo al tratamiento de los 47 niños sometidos a los exámenes coproparasitológicos: sólo uno no presentó formas parasitarias al inicio del estudio (2012), 46 resultaron positivos. Encontrando una prevalencia del 99% (46/47) de parasitosis en general. De los niños parasitados, el 21% (10/47) presentó infección por un solo agente (todos por protozoarios y un único caso de infección por helmintos) mientras que el 79% (37/47) presentó poliparasitismo. Se encontró, una mayor prevalencia de protozoarios 96% (45/47) y una prevalencia de 28% para helmintos (13/47).

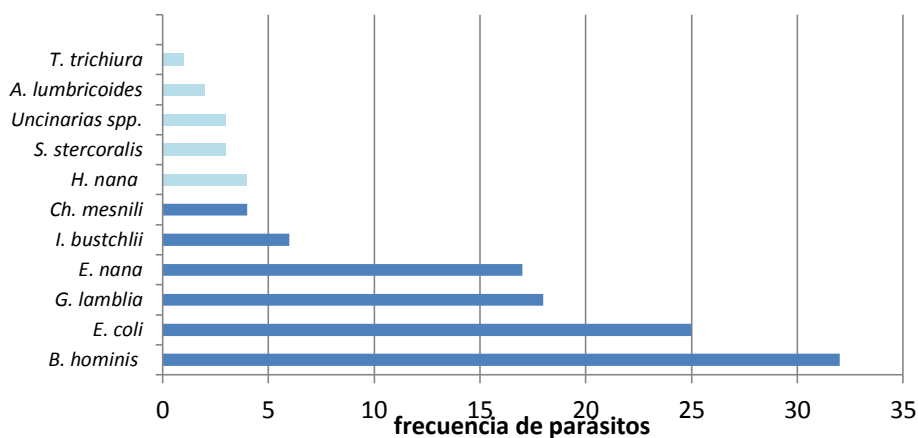
Figura 8. Prevalencia de helmintos y protozoarios intestinales, previa al tratamiento, en la población en estudio.



De acuerdo al resultado del diagnóstico inicial, se identificaron 11 especies de parásitos intestinales, 7 consideradas patógenas, 4 comensales, en el examen coproparasitológico. Según la frecuencia de parásitos se encontró, una mayor prevalencia de protozoarios, siendo *Blastocystis hominis* el parásito encontrado en un 72% de las muestras, dentro del grupo de los protozoarios varios estudios identifican a este como el parásito más prevalente, datos reportados por Luna *et al.* en 2007 con 49,8%; Michelli *et al.* (2006) 48% y Carpio *et al.* en 2007 con 46%

de prevalencia, sin embargo, estos datos no son tan elevados como los encontrados en nuestro estudio. Otros estudios reportaron la prevalencia de *Entamoeba coli* hasta un 38,6% (Bravo, 1994), nuestro estudio reporto una prevalencia del 49%, dentro de las amebiasis, este parásito es considerado un comensal humano. Sin embargo, también puede considerarse un problema cuando está asociado a otros parásitos como *Giardia lamblia* e *Hymemolepis nana*. (Martínez 2008) **(Figura 9)**

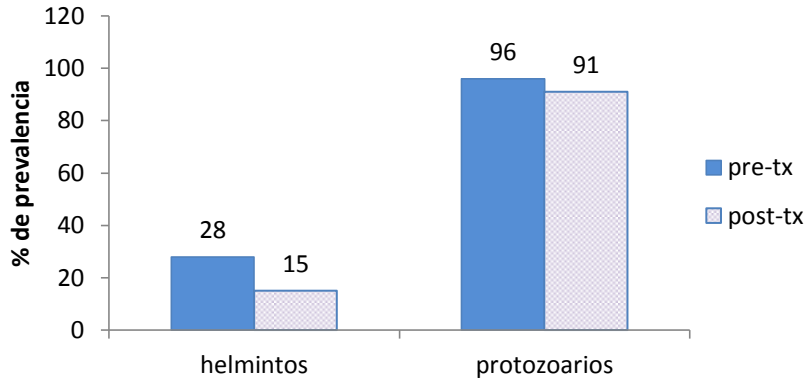
Figura 9. Frecuencia de parásitos intestinales, previa al tratamiento, en la población en estudio



En el caso de los helmintos, la prevalencia varia, dependiendo de la región geográfica, en el presente estudio el helminto de mayor prevalencia fue *Hymenolepis nana* con 8.5%, dato no tan elevado, comparado con otros estudios que reportan a este céstodo como el más prevalente con 21.6 % (Iannacone *et al.*, 2006) y 16.81% (Cabrera, 2003), seguido por *Strongyloides stercoralis* y *Uncinarias spp.* con 6.4%; que presentan valores similares a otros estudios con 3% a 7.85%(Abrahams-Sandí *et al.*, 2005; Suarez, 2006) para *Uncinarias spp.*

Posterior al tratamiento se puede observar una disminución en la prevalencia de helmintos, no así en el caso de los protozoarios, ya que su eliminación conlleva mayor dificultad.

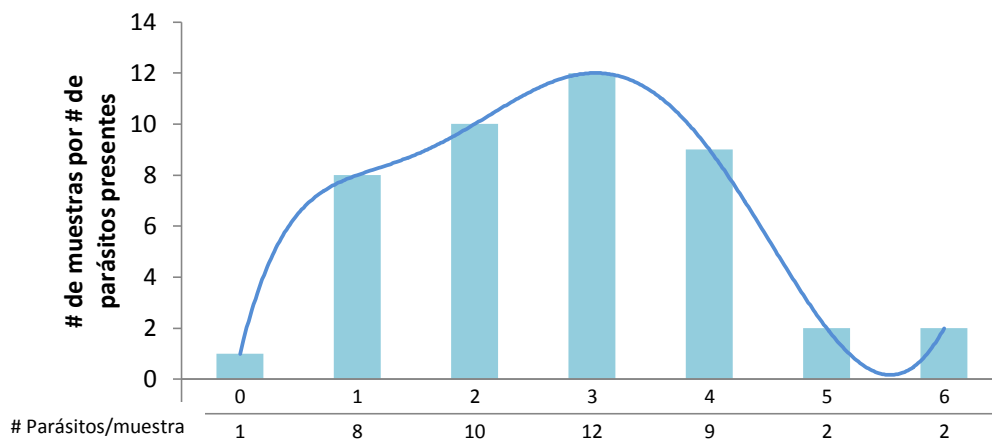
Figura 10. Prevalencia de helmintos y protozoarios intestinales, pre y post tratamiento, en la población en estudio.



En general, los reportes del grado de infección por parásitos intestinales en habitantes de diferentes áreas geográficas son consistentes con nuestros hallazgos, según los cuales, las cargas parasitarias muestran una característica sobredispersa, condicionada por factores inherentes al hospedero y su ambiente, de tal modo que se observan elevados índices de infección y poliparasitismo.

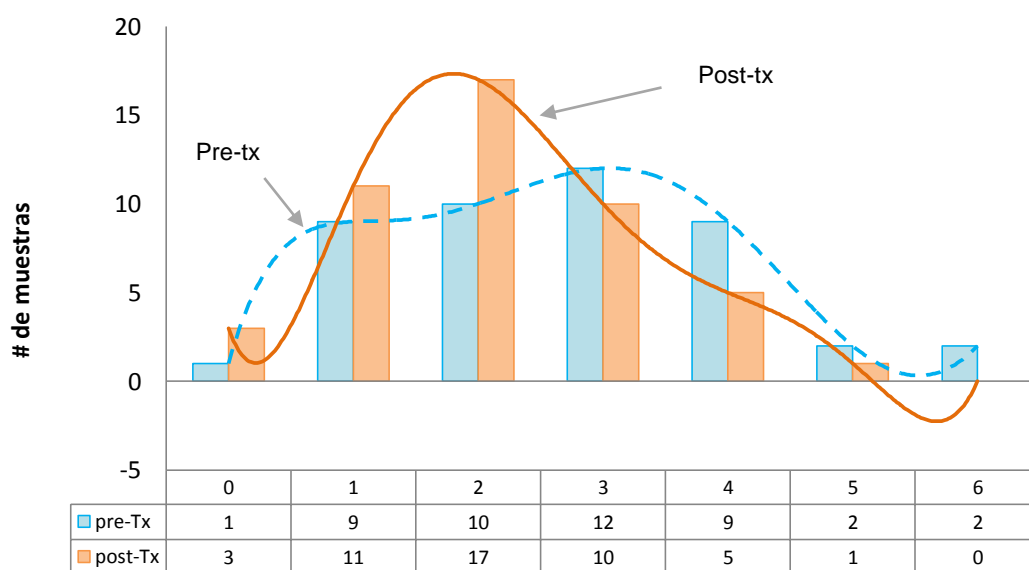
También es importante hacer notar que antes del tratamiento, se presentaban entre dos y cuatro parásitos por muestra (**Figura 11**), pudiendo llegar a encontrarse incluso hasta seis parásitos en una sola muestra.

Figura 11. Número de parásitos intestinales encontrados en las muestras, previo al tratamiento, en la población en estudio.



Los resultados generales del estudio, muestran una disminución en el número de parásitos por muestra, indicando que, independientemente del tratamiento administrado, un programa de desparasitación en las escuelas de zonas rurales, como es el caso de la comunidad Charcas II, tiene un impacto positivo para la población, pudiendo mejorar los hábitos higiénico-nutricionales y por tanto la salud y calidad de vida de los habitantes de estas regiones.

Figura 12. Número de parásitos intestinales encontrados en las muestras, antes y después del tratamiento, en la población en estudio.



2.5.3 Análisis de la eficacia posterior a la administración de los diferentes tratamientos

A todos los niños se le realizó un muestreo inicial (junio de 2012), seguido de la administración del tratamiento y tres muestreos posteriores, en los meses de agosto, septiembre y noviembre de 2012; así mismo, durante estos meses se determinó la prevalencia del número de parásitos, con el fin de evaluar el patrón de variación del número de parásitos en función a la acción del medicamento administrado. A partir de los resultados del examen coproparasitológico realizado durante la semana 0 del estudio (junio 2012), se dividieron a los niños en dos grupos, aplicando los diferentes esquemas de tratamiento.

En la siguiente fase del análisis se pueden observar los resultados obtenidos (eficacia) después de haber administrado el tratamiento correspondiente. La eficacia del tratamiento se midió como la disminución en el número de casos de infección por helmintos y/o protozoarios, después del tratamiento.

2.5.3.1 HELMINTOS

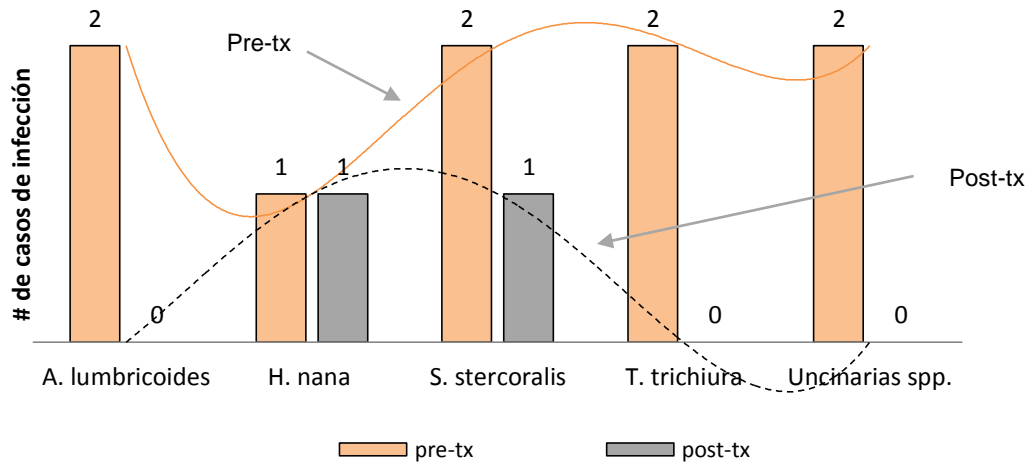
2.5.3.1.1 Decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja

Se seleccionaron 24 niños para tomar decocción de Evanta en jugo de naranja, este grupo recibió este tratamiento cuatro veces durante el 2012 (junio, agosto, septiembre y noviembre).

De acuerdo a la cuantificación mediante HPLC, cada niño recibió un aproximado de $15 \pm 1,7$ g de CAT en cada administración del tratamiento con decocción de Evanta en jugo de naranja.

Es notoria la eficacia de la decocción de corteza de Evanta en jugo de naranja frente a helmintos; ya que en el caso de las infecciones causadas por: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Uncinarias spp.*, se puede observar que el tratamiento alcanzó una eficacia del 100% puesto que no se registró ningún caso de infección por estos parásitos después de su administración. En el caso de *Strongyloides stercoralis* la eficacia se reduce a un 50% y en el caso de *Hymenolepis nana*, la eficacia del tratamiento es nula, ya que no existió disminución en la prevalencia de infección por este parásito. **(Figura 13)**.

Figura 13. Eficacia del tratamiento con decocción de Evanta en jugo de naranja frente a helmintos intestinales encontrados, casos de infección antes y después del tratamiento.



Durante los controles realizados en los meses posteriores al inicio del tratamiento, se pudo evidenciar la eliminación de los parásitos y a su vez la infección por parásitos en niños que antes no los tenían, por lo que se realizó el análisis parásito por parásito y niño por niño.

2.5.3.1.1.1 *Ascaris lumbricoides*

En un inicio, se reportó un solo caso de infección por este parásito, en los controles siguientes la parasitosis persistió, al final del tratamiento se observó que este ya no presentaba el parásito, estos datos mostrarían que la eliminación de este parásito podría llevar más tiempo de tratamiento, también se observó la aparición de un nuevo caso en el mes de agosto, este desaparece inmediatamente después de la administración del tratamiento; llegando a alcanzar un 100% de eficacia contra *Ascaris lumbricoides* hasta el mes de noviembre de 2012; ya en junio de 2013 se observa una reinfección por este parásito; llegando a tener un efecto protector.

Tabla 10. Niños parasitados con *Ascaris lumbricoides* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
CHCRR	1	1	1	0	SD
VPHM	0	1	0	0	1

* Abreviación SD sin datos

2.5.3.1.1.2 *Hymenolepis nana*

No se observó ningún efecto favorable por parte del tratamiento sobre este parásito ya que el único caso de infección persistió durante la administración del tratamiento (junio a noviembre), con eficacia nula.

Tabla 11. Niños parasitados con *Hymenolepis nana* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
CHCRR	1	1	1	1	SD

* Abreviación SD sin datos

2.5.3.1.1.3 *Strongyloides stercoralis*

En este caso se observó que el tratamiento alcanzó una eficacia del 50%, ya que se elimina en 1/2 casos, además se observó que la eliminación de estos parásitos podría llevar más tiempo de tratamiento y que después de su eliminación podría darse una pronta reinfección; como se observa en junio de 2013.

Tabla 12. Niños parasitados con *Strongyloides stercoralis* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
GCJ	1	1	0	1	1
FCHW	1	1	0	0	1

2.5.3.1.1.4 *Trichuris trichiura*

Se pudo observar, hasta noviembre de 2012, que hubo una eliminación del parásito en 2/2 niños, alcanzando un 100% de eficacia sobre este parásito, siendo esta eliminación inmediata, después de la administración de la decocción de Evanta y no existe reinfección temprana por parte del agente infeccioso; sin embargo, al no recibir tratamiento, el parásito puede infectar nuevamente a los individuos (junio 2013).

Tabla 13. Niños parasitados con *Trichuris trichiura* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
GJS	1	0	0	0	0
GJSG	1	0	0	0	1

2.5.3.1.1.5 *Uncinarias spp.*

En el caso de las Uncinarias se observaron 2 casos de infección al inicio del estudio y la eliminación del parásito al final del tratamiento con un 100% de eficacia, se observó que la eliminación del parásito es inmediata tras la administración del tratamiento. *Uncinarias spp.* es el único caso en el que no existiría una reinfección temprana después de dejar de administrar el tratamiento.

Tabla 14. Niños parasitados con *Uncinarias spp.* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
GJS	1	0	0	0	0
CGE	1	0	0	0	0

Haciendo un análisis general podemos decir que el efecto antiparasitario de la decocción de alcaloides totales en jugo de naranja, es de mediano a largo plazo, los datos observados, mostrarían que la eliminación de algunos de estos

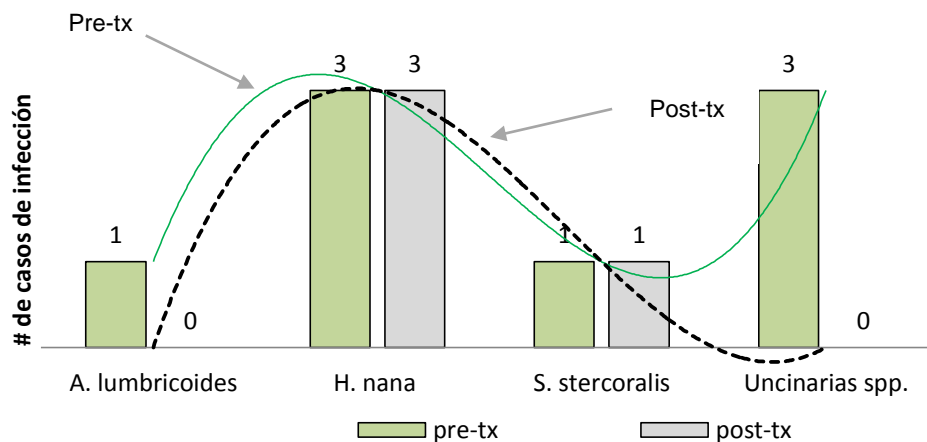
parásitos podrían llevar más tiempo de tratamiento (*Ascaris lumbricoides* y *Strongyloides stercoralis*), también se observó que el consumo de la decocción de Evanta en jugo de naranja llega a eliminar inmediatamente algunos parásitos como las Uncinarias, y que a largo plazo podría tener algún efecto protector para ciertos parásitos como *Uncinarias spp.* dado que no existieron casos de reinfección, y en menor grado para *Trichuris trichiura*.

2.5.3.1.2 *Mebendazol*

El grupo tratado con Mebendazol (1200mg), recibió tratamiento en mayo y septiembre y controles en los meses de junio y noviembre.

Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con Mebendazol es eficaz contra las infecciones causadas por: *Uncinarias spp.* y *Ascaris lumbricoides*, ya que se consiguió eliminar las infecciones causadas por estos parásitos encontrando una eficacia del 100%, sin embargo en los casos de infección por *Strongyloides stercoralis*, e *Hymenolepis nana*, la eficacia del tratamiento es nula, (Figura 14).

Figura 14. Prevalencia de infección helmintos encontrados antes y después del tratamiento con Mebendazol.



2.5.3.1.2.1 *Ascaris lumbricoides*

Se reportó un solo caso de infección, se observó que el parásito es eliminado después de haber recibido tratamiento, pero existe una reinfección pronta, la cual desaparece cuando el tratamiento es administrado nuevamente.

Tabla 15. Niños parasitados con *Ascaris lumbricoides* con tratados Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
MCGI	1	0	1	0	0

2.5.3.1.2.2 *Hymenolepis nana*

En el caso de este parásito no se observó ningún tipo de efecto por parte del tratamiento ya que el mismo número de casos de infección se mantuvo durante todos los controles realizados.

Tabla 16. Niños parasitados con *Hymenolepis nana* tratados con Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
MCGI	1	1	1	1	1
MCN	1	1	1	1	1
MCE	1	1	1	1	1

2.5.3.1.2.3 *Strongyloides stercoralis*

En este caso el tratamiento tuvo una eficacia nula, no eliminando este parásito con la administración del tratamiento.

Tabla 17. Niños parasitados con *Strongyloides stercoralis* tratados con Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
THJ	1	1	1	1	1

2.5.3.1.2.5 *Uncinarias spp.*

Se reportó un solo caso de infección por *Uncinarias* al inicio del estudio y posteriormente se reportaron 2 nuevos casos, sin embargo todos estos fueron eliminados tras administrar el tratamiento (100% de eficacia); manteniéndose estos resultados incluso después de dejar de administrar el tratamiento.

Tabla 18. Niños parasitados con *Uncinarias spp.* tratados con Mebendazol

	MAYO 2012	JUNIO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
FCHD	1	0	0	0	0
PVE	0	1	0	0	0
UPJ	0	1	0	0	0

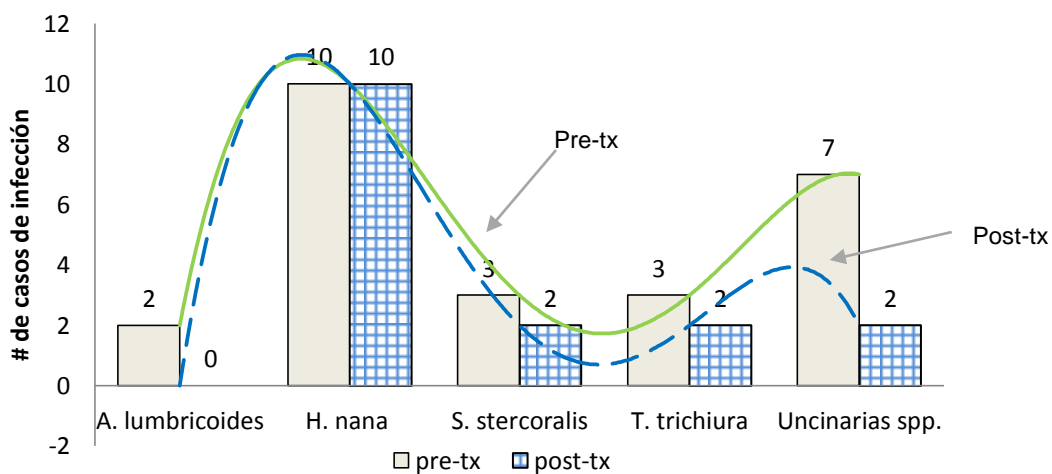
Analizando los resultados podemos decir que, si bien existe acción antiparasitaria por parte del medicamento, este no previene casos nuevos de infección; sin embargo presentaría efecto protector frente a *Ascaris lumbricoides* y *Uncinarias spp.* Evitando una pronta reinfección.

2.5.3.1.3 *Albendazol*

En la gestión 2013 se incorporaron a la unidad educativa 26 nuevos alumnos a los que se les realizó un análisis coproparasitológico inicial, de acuerdo a los datos obtenidos se dividió a estos en dos grupos, se administró Albendazol (400mg) en junio y agosto de 2013 al grupo que presentaba helmintos, el análisis inicial de este grupo, muestra elevados índices de infección por *Hymenolepis nana* el parásito de mayor prevalencia con un 77% (10/13), seguido de *Uncinarias* con 54%, *Strongyloides stercoralis* y *Trichuris trichiura* con un 23% y 30% de prevalencia respectivamente, *Ascaris lumbricoides* presentó un 15% de prevalencia (2/13).

Posterior al tratamiento con Albendazol se puede observar que este fármaco tuvo un 100% de eficacia al eliminar los casos de infección por *Ascaris lumbricoides*, también presenta alta eficacia (71%) contra las *Uncinarias* reduciendo de siete a dos los casos de infección, *Trichuris trichiura* y *Strongyloides stercoralis*, también disminuyeron respecto al diagnóstico inicial. Nuevamente la eficacia contra *Hymenolepis nana*, es nula para este tratamiento ya que no existió disminución en la prevalencia de infección por este parásito.

Figura 15. Prevalencia de infección helmintos encontrados antes y después del tratamiento con Albendazol.



2.5.3.1.3.1 *Ascaris lumbricoides*

Se reportó un caso de infección previo al tratamiento, en el control siguiente se observó un nuevo caso, al final del tratamiento se observó la eliminación de ambos casos después de la administración del tratamiento; llegando a alcanzar un 100% de eficacia contra este parásito.

Tabla 19. Niños parasitados con *Ascaris lumbricoides* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
QFJD	1	0	0
MSY	0	1	0

2.5.3.1.3.2 *Hymenolepis nana*

No se observó ningún efecto favorable por parte del tratamiento sobre este parásito ya que estos persistieron durante la administración del tratamiento (mayo a noviembre), con eficacia nula. Sin embargo, existen dos casos en los que aparentemente se elimina al parásito, pero existiría una pronta reinfección.

Tabla 20. Niños parasitados con *Hymenolepis nana* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
LFMA	1	1	1
MSAR	1	1	1
LFE	1	1	1
QCHN	1	1	1
MJL	1	1	1
QCHMi	1	0	1
QCHM	1	1	1
FBM	1	1	1
MSY	1	1	1
MJLR	1	0	1

2.5.3.1.3.3 *Strongyloides stercoralis*

En este caso se observó que el tratamiento alcanzó una eficacia del 33%, eliminando al parásito en 2/3 casos, además se observó que la eliminación de estos necesitaría de un segundo tratamiento, y que después de su eliminación podría darse una pronta reinfección.

Tabla 21. Niños parasitados con *Strongyloides stercoralis* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
MJLR	1	1	0
MSY	1	1	1
MJL	1	0	1

2.5.3.1.3.4 *Trichuris trichiura*

Se pudo observar que se eliminó al parásito en 2/3 niños, alcanzando un 33% de eficacia sobre este parásito, lo que se pudo observar es que la eliminación, en algunos casos, es inmediata, y no existe reinfección temprana, en otros podría necesitar un refuerzo y en otros no tiene efecto alguno.

Tabla 22. Niños parasitados con *Trichuris trichiura* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
MJL	1	1	1
MJLR	1	1	0
QJFD	1	0	0

2.5.3.1.3.5 *Uncinarias spp.*

Se encontraron 7 casos de infección antes del tratamiento y solo 2 al final de este (71% de eficacia), se observó que la eliminación del parásito es inmediata, pero podría existir una reinfección temprana en ciertos casos y otros en los que Albendazol no tuvo efecto alguno sobre las uncinarias.

Tabla 23. Niños parasitados con *Uncinarias spp.* tratados con Albendazol

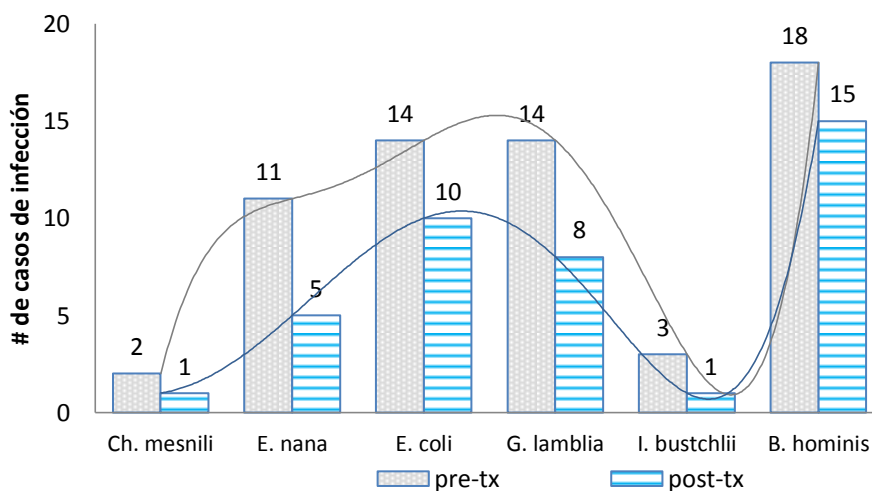
	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
LFE	1	1	1
QJFD	1	0	0
QCHN	1	0	0
MCHAL	1	0	1
QCHM	1	0	0
QCHMi	1	0	0
QME	1	0	0

2.5.3.2 PROTOZOARIOS

2.5.3.2.1 Decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja.

Al evaluar la eficacia de la decocción de alcaloides de Evanta en jugo de naranja frente a los protozoarios, en general se observó una disminución de casos de infección por todos los protozoarios intestinales; en cuanto a la eficacia del tratamiento, se observó que ésta fue mayor para *Iodamoeba bustchlii* con un 67% (2/3 casos curados), *Endolimax nana*, con un 55% (6/11 casos curados), para *Giardia lamblia* y *Entamoeba coli* oscila entre el 40 y 30%, mientras que en los niños con *Blastocystis hominis* se encontró un 17% de eficacia con tan solo 3 casos de cura, haciendo a este parásito el más prevalente durante todo el estudio. (Figura 16).

Figura 16. Eficacia del tratamiento con decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja frente a protozoarios intestinales encontrados, casos de infección antes y después del tratamiento.



La respuesta al tratamiento frente a protozoarios, fue diferente en cada individuo; para entender mejor como actuó dicho tratamiento en los meses posteriores se realizó el análisis parásito por parásito y niño por niño.

2.5.3.2.1.1 *Chilomastix mesnili*

Se reportaron 2 casos de infección por *Chilomastix mesnili* al inicio del estudio, de estos 1 es eliminado tras la toma de dos tratamientos de decocción de Evanta; el otro persiste hasta la conclusión del estudio, llegando a obtener un 50% de eliminación del parásito y eficacia del tratamiento. Se presentó un nuevo caso de infección en el último control, lo cual indica que este tratamiento no tendría un efecto protector a nuevos casos de infección.

Tabla 24. Niños parasitados con *Chilomastix mesnili* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
CHMEI	1	1	0	0	0
VPLA	1	1	1	1	1

2.5.3.2.1.2 *Endolimax nana*

La eliminación de *Endolimax nana* llevaría más tiempo de tratamiento, observándose una disminución de 11 a 5 casos de infección, con un 55% de eficacia. Existieron casos en los que el tratamiento no tuvo efecto. También se presentaron 6 casos nuevos de infección de los cuales 3 se lograron eliminar. Este tratamiento no presenta efecto protector, ya que en junio de 2013 se observa reinfección en la mayoría de los casos.

Tabla 25. Niños parasitados con *Endolimax nana* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
FY	1	1	0	0	0
HQV	1	1	1	1	1
CFS	1	1	0	0	1
CFW	1	0	1	1	1
FPW	1	1	1	0	1
QCHV	1	1	1	0	1
MMJC	1	0	0	0	0

GJY	1	1	1	0	1
GJS	1	1	1	1	1
VPHM	1	1	0	1	1
VPLA	1	1	1	1	0

2.5.3.2.1.3 *Entamoeba coli*

La decocción de Evanta en jugo de naranja mostró una eliminación del parásito en 4/14 casos (29% de eficacia). En cuanto a la respuesta al tratamiento se observaron tres panoramas: el primero donde el tratamiento parece ser eficaz en la eliminación del parásito, pero este vuelve a infectar al niño después de algún tiempo; el segundo donde se produce la eliminación total del parásito, independientemente del número de tratamientos recibidos y el tercero donde el tratamiento no ejerce ningún efecto y la infección persiste. El efecto de eliminación persiste en un solo caso (junio 2013).

Tabla 26. Niños parasitados con *Entamoeba coli* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
FY	1	0	1	1	0
HQV	1	0	1	1	1
MPO	1	0	0	1	1
QCHV	1	0	0	0	0
GJS	1	1	0	0	1
CHMEI	1	1	0	0	1
GJY	1	1	1	0	1
CGE	1	1	1	1	1
CFW	1	1	1	1	1
HQME	1	1	1	1	1
FPW	1	1	1	1	1
VPLA	1	1	1	1	0
MMJC	1	1	1	1	1
CHNY	1	1	1	1	1

2.5.3.2.1.4 *Giardia lamblia*

Se reportaron 14 casos de infección por *Giardia lamblia* de los cuales 6 fueron curados (43% de eficacia). Tomando, la eliminación del parásito, diferentes tiempos de tratamiento; además podría existir una reinfección y posterior eliminación del mismo, tras una nueva administración del tratamiento. En 9 de los casos no existió efecto alguno. De los 6 casos curados, solo 2 mantuvieron este resultado tras dejar de administrar el tratamiento (2013).

Tabla 27. Niños parasitados con *Giardia lamblia* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
HQV	1	0	0	0	0
CHCC	1	0	0	0	SD
CFW	1	1	1	0	1
QCHV	1	1	1	0	0
GJSG	1	0	1	0	1
CGE	1	0	1	0	1
CFS	1	0	1	1	1
CHNY	1	1	1	1	1
HQME	1	1	1	1	1
MPO	1	1	1	1	1
CHCRR	1	1	1	1	SD
MMJC	1	1	1	1	1
FCHW	1	1	1	1	1
GJS	1	1	1	1	1

* Abreviación SD sin datos

2.5.3.2.1.5 *Iodamoeba bustchlli*

En el caso de *Iodamoeba bustchlli*, se obtuvo un 67% de eficacia del tratamiento. La eliminación del agente infeccioso llevaría diferentes tiempos de administración del tratamiento; no se observó una reinfección temprana por parte de este. También existieron casos en el que el tratamiento quedó sin efecto. En los controles posteriores se presentaron 6 casos nuevos de infección, de los cuales 4 fueron curados, no existiendo un efecto protector a nuevos casos de infección.

Tabla 28. Niños parasitados con *Iodamoeba bustchlii* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
FPW	1	0	0	0	0
CHMEI	1	1	0	0	1
VLPLA	1	1	1	1	0

2.5.3.2.1.6 *Blastocystis hominis*

Blastocystis hominis fue el parásito de mayor prevalencia y el que se eliminó en menor porcentaje, con (3/18) casos curados y un 17% de eficacia del tratamiento. Se observó en algunos casos que tras la administración del primer tratamiento se eliminó el parásito, pero se re infectaron nuevamente. En junio de 2013 se observa que todos los niños presentan la infección por *Blastocystis* nuevamente.

Tabla 29. Niños parasitados con *Blastocystis hominis* tratados con decocción de Evanta

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
FY	1	1	1	1	1
CBI	1	1	1	1	1
FPW	1	1	1	1	1
CHCC	1	1	1	1	SD
GJSG	1	1	1	1	1
FCHW	1	1	1	1	1
GJS	1	1	1	1	1
CHK	1	1	1	1	1
CGE	1	1	1	1	1
HQV	1	0	1	1	1
CFS	1	0	1	1	1
CFW	1	0	1	1	1
AQN	1	0	1	1	1
CHCRR	1	0	1	1	SD
MMJC	1	0	0	1	1
QCHV	1	1	1	0	1
GJY	1	1	0	0	1
VPHM	1	1	0	0	1

* Abreviación SD sin datos

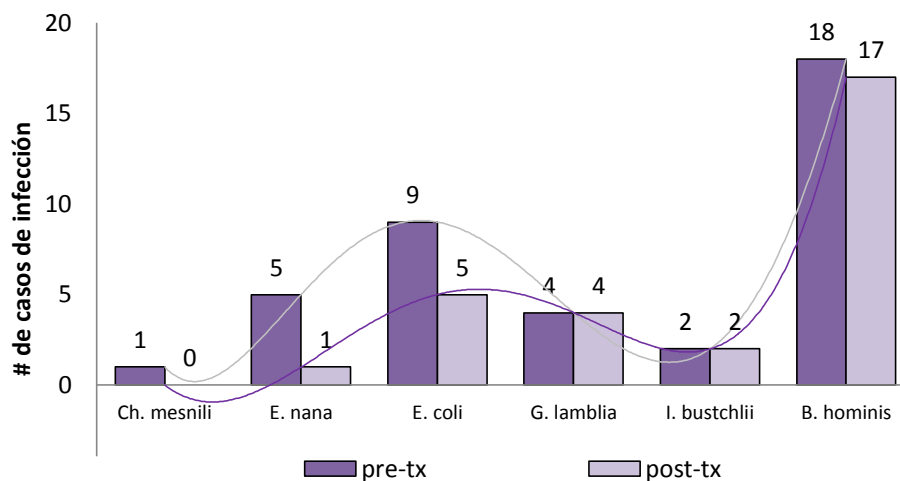
Analizando los resultados obtenidos podemos decir que la decocción de Evanta en jugo de naranja tiene un efecto antiprotozoario mayor para *Iodamoeba bustchlii* y *Endolimax nana*, y que la respuesta al tratamiento es diferente en cada individuo; en algunos casos la eliminación de estos parásitos podría llevar más tiempo de tratamiento y en otros no tendría ningún tipo de acción o efecto sobre estos.

2.5.3.2.2 Mebendazol

Al analizar la eficacia del Mebendazol frente a los protozoarios, se observó un panorama similar al obtenido después de tratamiento con decocción de Evanta. Se observaron diferentes niveles de eficacia dependiendo del parásito tratado, y la respuesta al tratamiento también es diferente de niño a niño. Se obtuvieron mejores resultados contra *Chilomastix mesnili*, *Endolimax nana* con una eficacia superior al 80%, *Entamoeba coli* con una eficacia cercana al 40%, en los casos de *Giardia lamblia*, *Iodamoeba bustchlii* y *Blastocystis hominis*, podemos decir que no existió ningún tipo de acción ya que la prevalencia de estos parásitos prácticamente se mantuvo igual. **(Figura 17)**.

En general Mebendazol presenta resultados favorables contra ciertos protozoarios, pero el resultado del tratamiento dependerá de la respuesta inmune de cada individuo; dándose casos de eliminación de algunos de los parásitos; en algunos casos reinfección temprana y en otros no tiene ningún tipo de acción o efecto sobre el parásito.

Figura 17. Eficacia del tratamiento con Mebendazol a protozoarios intestinales encontrados, casos de infección antes y después del tratamiento.



2.5.3.2.2.1 *Chilomastix mesnili*

Se reportó un solo caso de infección por *Chilomastix mesnili* el cual se eliminó exitosamente después de la administración del tratamiento con Mebendazol, sin embargo en los controles posteriores se presentaron 2 nuevos casos de infección que no pudieron ser eliminados. Mebendazol no protege de reinfecciones por este parásito.

Tabla 30. Niños parasitados con *Chilomastix mesnili* tratados con Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
MCGI	1	0	1	0	1

2.5.3.2.2.2 *Endolimax nana*

En el caso de *Endolimax nana* se observó que su eliminación puede ser inmediata o podría necesitar de un segundo tratamiento; los casos de infección disminuyeron de 5 a 1, con un 80% de eficacia. También existieron 7 casos

nuevos, en 3 de los cuales el tratamiento no tuvo efecto. En junio de 2013 solo un caso no presenta reinfección por el agente infeccioso.

Tabla 31. Niños parasitados con *Endolimax nana* tratados con Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
AMFA	1	0	0	0	0
BQJ	1	1	0	0	1
CHAE	1	0	1	1	SD
FBA	1	1	1	0	1
UPV	1	1	1	0	1

* Abreviación SD sin datos

2.5.3.2.3 *Entamoeba coli*

Los datos obtenidos mostraron una eliminación del parásito en 4/9 casos (44% de eficacia). Lo que se pudo observar es que *Entamoeba coli* presentaría alta resistencia a la eliminación por este tratamiento; además se presentaron 7 nuevos casos de infección por este agente y solo se eliminó en un caso, por lo que no previene infecciones futuras.

Tabla 32. Niños parasitados con *Entamoeba coli* tratados con Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
MCGI	1	1	1	1	1
MCN	1	1	1	1	1
QMS	1	1	0	0	SD
MCE	1	1	1	1	1
PVE	1	1	1	0	SD
PVHR	1	1	0	1	SD
HQJ	1	1	1	0	1
FCHD	1	0	0	0	1
CHBC	1	1	1	1	SD

* Abreviación SD sin datos

2.5.3.2.2.4 *Giardia lamblia*

En el diagnóstico inicial se reportaron 4 casos de infección por *Giardia lamblia*, en los cuales el tratamiento no tuvo ningún efecto. Se observaron, en los controles siguientes, 10 casos nuevos de infección de los cuales aparentemente se eliminaron tan solo 3, haciendo a este parásito uno de los más persistentes frente a Mebendazol. En junio de 2013, la infección persiste.

Tabla 33. Niños parasitados con *Giardia lamblia* tratados con Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
MCN	1	1	1	1	1
QMS	1	0	1	1	SD
FCHD	1	1	1	1	1
PVN	1	1	1	1	SD

* Abreviación SD sin datos

2.5.3.2.2.5 *Iodamoeba bustchlli*

En el caso de *Iodamoeba bustchlli*, no se logró disminuir el número de casos de infección con una eficacia nula del tratamiento sobre este parásito. Se presentaron además; 6 nuevos casos de infección, en 3 de ellos la eliminación del parásito se produce inmediatamente después de la administración del tratamiento.

Tabla 34. Niños parasitados con *Iodamoeba bustchlli* tratados con Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
MCGI	1	1	1	1	1
CHBC	1	1	1	1	SD

* Abreviación SD sin datos

2.5.3.2.2.6 *Blastocystis hominis*

Blastocystis hominis fue el parásito de mayor prevalencia, con sólo un caso de eliminación, alcanzando un 6% de eficacia del tratamiento. Se observó en algunos de los niños infectados que luego de la administración del tratamiento si existiría eliminación del parásito, pero se infectaron nuevamente y en otros la infección persistió, sin ningún efecto del tratamiento. En junio de 2013 nuevamente todos presentan infección por este agente.

Tabla 35. Niños parasitados con *Blastocystis hominis* tratados con Mebendazol

	JUNIO 2012	AGOSTO 2012	SEPTIEMBRE 2012	NOVIEMBRE 2012	JUNIO 2013
MCGI	1	1	1	1	1
AMFA	1	1	1	1	1
UPV	1	1	1	1	1
PME	1	1	1	1	1
BQJ	1	1	1	1	1
UPV	1	1	1	1	1
CHAE	1	1	1	1	SD
HQJ	1	1	1	1	1
UPJ	1	1	1	1	1
QMS	1	1	1	1	SD
CCHP	1	0	1	1	1
MCE	1	0	1	1	1
PVE	1	0	1	1	SD
PVHR	1	0	0	1	SD
FCHD	1	1	0	1	1
CHBC	1	0	1	1	SD
VKJL	1	0	1	1	1
VKA	1	0	0	0	1

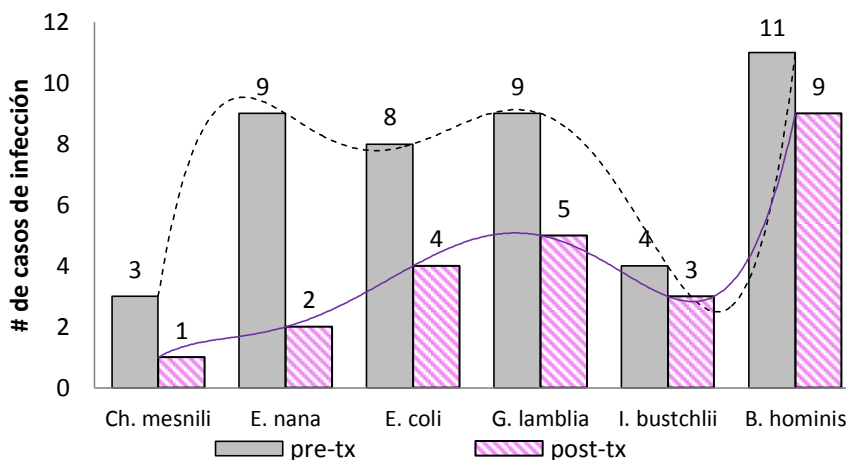
* Abreviación SD sin datos

2.5.3.2.3 Albendazol

El análisis inicial de los alumnos nuevos tratados con Albendazol muestra elevados índices de infección por protozoarios, siendo *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia* y *Endolimax nana* los parásitos de mayor prevalencia con 100, 92 y 85%, *Entamoeba coli* también presenta una alta prevalencia (62%) y en menor proporción encontramos a *Iodamoeba bustchlii* y *Chilomastix mesnilli* con 4/13 y 3/13 casos de infección.

Posterior al tratamiento con Albendazol se pudo observar una reducción en la prevalencia y por tanto en los casos de infección causadas por *Chilomastix mesnilli*, *Entamoeba coli*, y *Endolimax nana* con porcentajes elevados de eficacia (entre 50 y 78%) en el caso de *Blastocystis hominis* la eficacia es mucho menor (18%). (Figura 18).

Figura 18. Prevalencia de infección protozoarios intestinales encontrados antes y después del tratamiento con Albendazol.



2.5.3.2.3.1 Chilomastix mesnilli

Los 3 casos reportados de infección por *Chilomastix mesnilli* se eliminaron inmediatamente después de la administración del tratamiento con Albendazol, sin

embargo, existió reinfección en uno de ellos, llegando a obtener así un 67% de eficacia y eliminación del parásito.

Tabla 36. Niños parasitados con *Chilomastix mesnili* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
QME	1	0	0
QCHM	1	0	1
MCHAL	1	0	0

2.5.3.2.3.2 *Endolimax nana*

En el caso de *Endolimax nana* se observó que su eliminación puede ser inmediata o podría necesitar de un segundo tratamiento; se disminuyeron de 9 a 2 los casos de infección por este agente, con un 78% de eficacia.

Tabla 37. Niños parasitados con *Endolimax nana* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
QFJD	1	1	0
CZR	1	1	0
MSY	1	1	0
LFMA	1	1	0
QCHN	1	0	0
MJL	1	0	1
MCHAL	1	1	1
FBM	1	0	0
QCHM	1	0	0

2.5.3.2.3.3 *Entamoeba coli*

Los datos obtenidos mostraron una eliminación del parásito en la mitad de los casos (50% de eficacia). Lo que se pudo observar en este caso es que para

eliminar a *Entamoeba coli* es necesario un segundo tratamiento en la mayoría de los casos.

Tabla 38. Niños parasitados con *Entamoeba coli* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
FBM	1	0	1
QCHM	1	1	1
QCHMi	1	1	0
MSAR	1	1	0
MSY	1	1	1
QFD	1	1	0
LFE	1	0	1
MJL	1	1	0

2.5.3.2.3.4 *Giardia lamblia*

La eficacia alcanzada por parte del tratamiento frente a *Giardia lamblia* es de 44% ya que en un inicio se reportaron 9 casos de infección de los cuales 4 fueron curados, tras la administración de Albendazol. Se observó también que la infección es persistente en 5 de los casos.

Tabla 39. Niños parasitados con *Giardia lamblia* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
LFE	1	0	1
QCHN	1	1	0
QCHM	1	1	1
QCHMi	1	0	0
MJL	1	1	1
MJLR	1	1	0
MSY	1	1	1
LFMA	1	0	1
MSAR	1	0	0

2.5.3.2.3.5 *Iodamoeba bustchlii*

En el caso de *Iodamoeba bustchlii*, se logró disminuir el número de casos de 4 a 3, obteniendo solo un 25% de eficacia. La infección fue persistente en la mayoría de los casos y 1 mostró reinfección después del tratamiento.

Tabla 40. Niños parasitados con *Iodamoeba bustchlii* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
QCHM	1	0	1
MCHAL	1	0	0
QCHMi	1	1	1
QCHN	1	1	1

2.5.3.2.3.6 *Blastocystis hominis*

Al igual que en los grupos tratados con decocción de Evanta y Mebendazol, *Blastocystis hominis* fue el parásito de mayor prevalencia en este grupo, solo se eliminó en 2/11 casos con un 18% de eficacia. En los demás no tuvo efecto.

Tabla 41. Niños parasitados con *Blastocystis hominis* tratados con Albendazol

	JUNIO 2013	AGOSTO 2013	SEPTIEMBRE 2013
LFE	1	0	1
QFJD	1	0	0
MSY	1	1	1
LFMA	1	1	1
MQC	1	1	1
MSAR	1	1	1
QCHN	1	1	1
MJL	1	1	1
MCHAL	1	1	1
FBM	1	1	1
QCHM	1	0	0

El tratamiento con Albendazol, presenta al igual que los tratamientos con decocción de Evanta y Mebendazol, resultados parcialmente buenos contra protozoarios, sin embargo ninguno de estos tres tratamientos llega a eliminar a los protozoarios en su totalidad.

2.5.3.3 Placebo

2.5.3.3.1 Placebo de decocción de Evanta en jugo de naranja

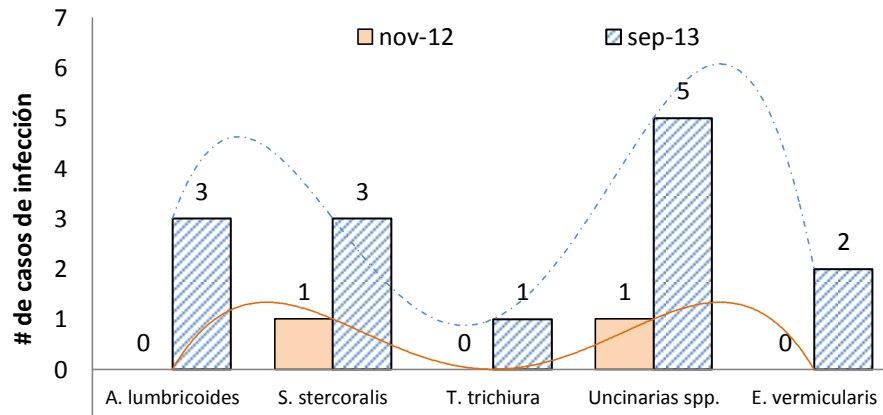
En la segunda parte del estudio (2013) se administró un placebo correspondiente al tratamiento con Evanta, el cual consistió en la preparación de la decocción con pito de amaranto (*Amaranthus*) en vez de la corteza molida de Evanta. El propósito de este estudio es eliminar el poder de la sugestión. Ya que algunas personas que reciben tratamiento *placebo*, con frecuencia reportan mejorías dramáticas y de larga duración en sus síntomas (Abarca, *et all.*, 2005). Por lo cual, si la respuesta al tratamiento real (decocción de Evanta) es significativamente mejor que a la administración del placebo, es un fuerte indicio de que el tratamiento realmente funciona.

Se evaluó al grupo en un examen coproparasitológico inicial y se realizó tres tratamientos y muestreos posteriores, (junio, agosto y septiembre 2013), se determinó el número de casos de infección, con el fin de evaluar la variación del número de parásitos en función a la acción del placebo administrado.

Se observó el incremento en los casos de infección después de la administración de placebo, por una parte se tienen los datos obtenidos después de la administración de los tratamientos (noviembre de 2012) donde se presentaban pocos casos de infección y por otra parte se tienen los que corresponden a la última evaluación después de la administración del placebo (septiembre de 2013). Es en el caso de helmintos donde se observa una gran diferencia entre los datos, incrementándose los casos de infección, principalmente en los de infección por

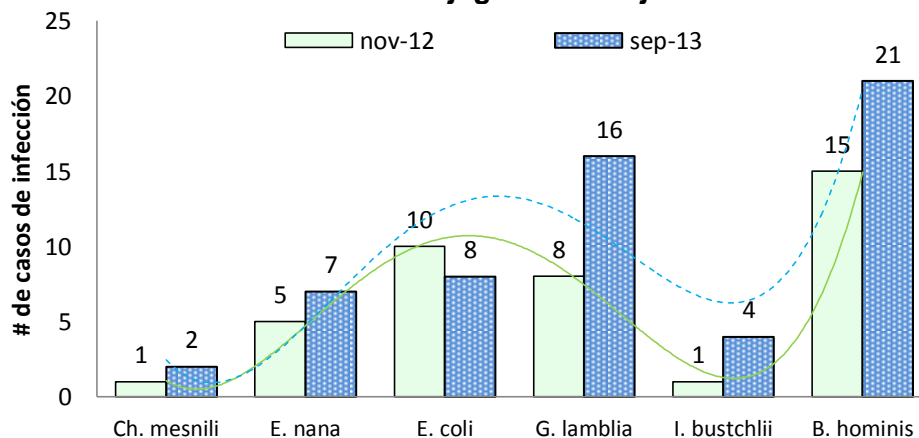
Uncinarias, demostrando la eficacia de la decocción de corteza de Evanta en jugo de naranja como agente antihelmíntico. Además al final del estudio, se presentaron dos casos de infección por *Enterobius vermicularis* que no existieron en 2012. **Figura 19.**

Figura 19. Comparación de casos de infección por helmintos, después de la administración del tratamiento antiparasitario (noviembre 2012) y después de la administración del placebo (septiembre 2013), en el grupo tratado con decocción de Evanata en jugo de naranja.



En los protozoarios se observa un incremento en las infecciones principalmente por *Giardia lamblia*, *Blastocystis* y *Iodamoeba bustchlii*, mientras que en los demás parásitos el número de casos de infección es casi el mismo. **(Figura 20)**

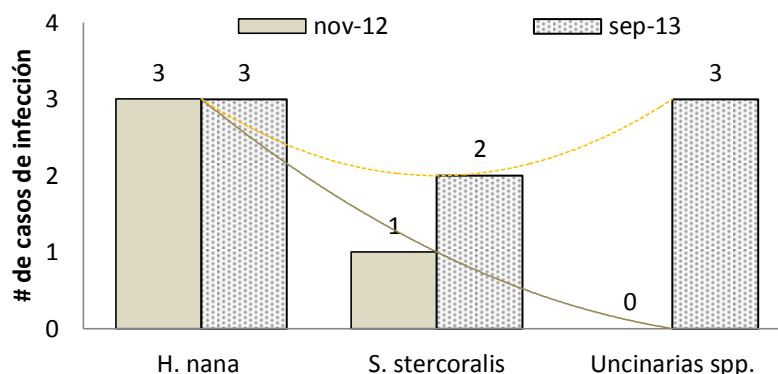
Figura 20. Casos de infección por protozoarios intestinales, después de la administración del tratamiento antiparasitario (noviembre 2012) y después de la administración del placebo (septiembre 2013), en el grupo tratado con decocción de Evanata en jugo de naranja.



2.5.3.3.2 Placebo de Mebendazol

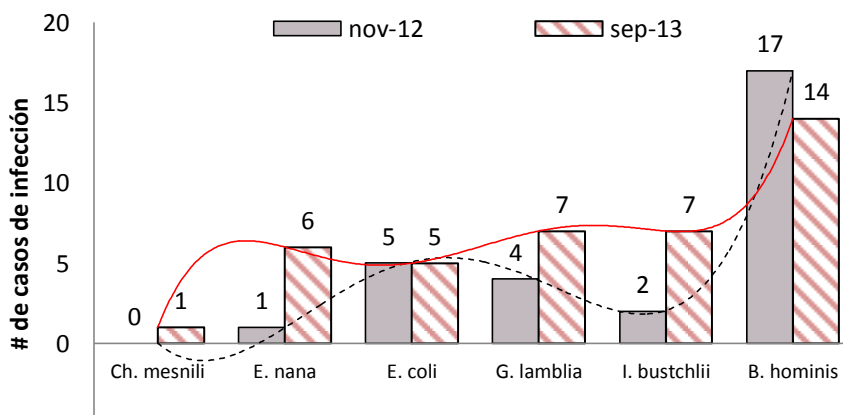
Al grupo tratado con Mebendazol, se le administró el placebo correspondiente, el cual consistió en comprimidos de Vitamina C (300mg). Comparando los datos de noviembre de 2012 (final del tratamiento) y los de septiembre de 2013 (final del placebo) se pudo observar, en helmintos, el incremento de casos para las infecciones causadas por *Strongyloides stercoralis* y *Uncinarias spp.* (Figura 21)

Figura 21. Casos de infección por helmintos, después de la administración del tratamiento (noviembre 2012) y después de la administración del placebo (septiembre 2013), en el grupo tratado con Mebendazol.



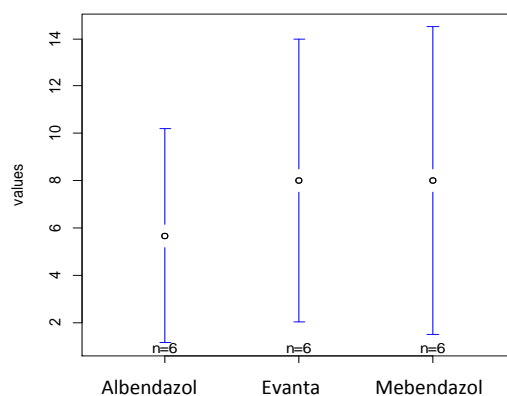
En protozoarios se incrementaron las infecciones causadas por *Endolimax nana*, *Iodamoeba bustchlii* y *Chilomastix mesnili* principalmente. (Figura 22)

Figura 22. Casos de infección por protozoarios intestinales, después de la administración del tratamiento (noviembre 2012) y después de la administración del placebo (septiembre 2013), en el grupo tratado con Mebendazol.



Por último al realizar un estudio estadístico comparativo entre las tres terapias antiparasitarias estudiadas, encontramos que en general no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p=0.97$). **(Figura 23)**

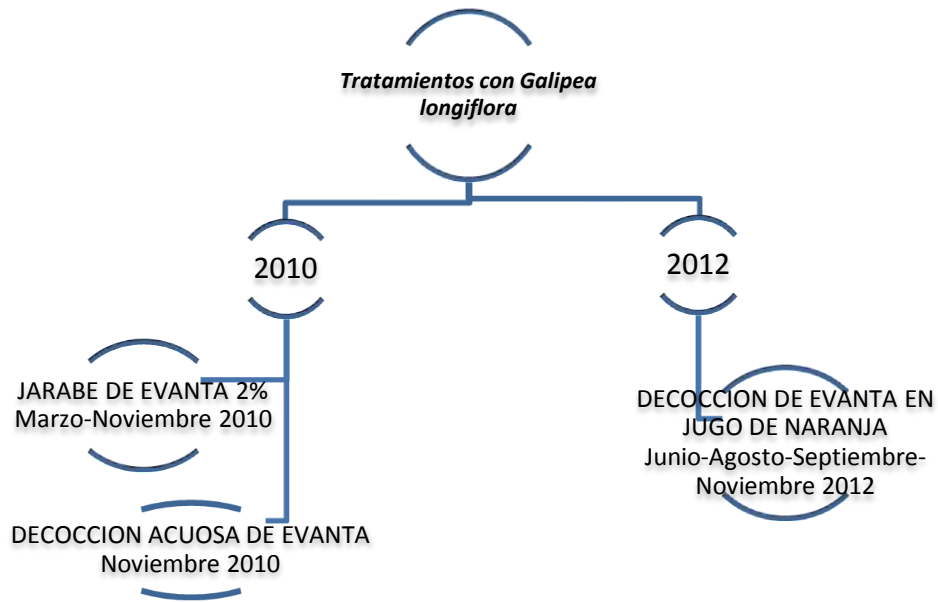
Figura 23. Comparación de medias entre los tres tratamientos (Decocción de Evanta, Mebendazol y Albendazol).



Si bien objetivo de la terapia antiparasitaria es erradicar el organismo rápida y completamente, en este caso, al tratarse de una zona endémica se ha encontrado que estos tratamientos son efectivos contra helmintos y llegan a disminuir la carga parasitaria y/o evitan las complicaciones sistémicas de la infección crónica, este panorama se puede observar en los tres casos.

2.5.3.4 *Análisis comparativo entre los tratamientos contra parasitosis intestinales con Galipea longiflora 2010 - 2012*

Para concluir la validación del uso tradicional de la *Galipea longiflora*, en el tratamiento de parasitosis intestinales y siguiendo con las farmacopeas tradicionales; se realizó un análisis comparativo entre los primeros estudios piloto de desparasitación de niños (2010) y el presente estudio; donde se pretende comparar la efectividad del jarabe de Evanta al 2% (Limachi, 2013); la decocción acuosa de Evanta y la decocción de Evanta en jugo de naranja (2012) mediante el análisis coproparasitológico en niños de la escuela Charcas II en la provincia Sud Yungas - La Paz. [Gracias a proyectos UMSA-IDH y el proyecto OSCAR.]

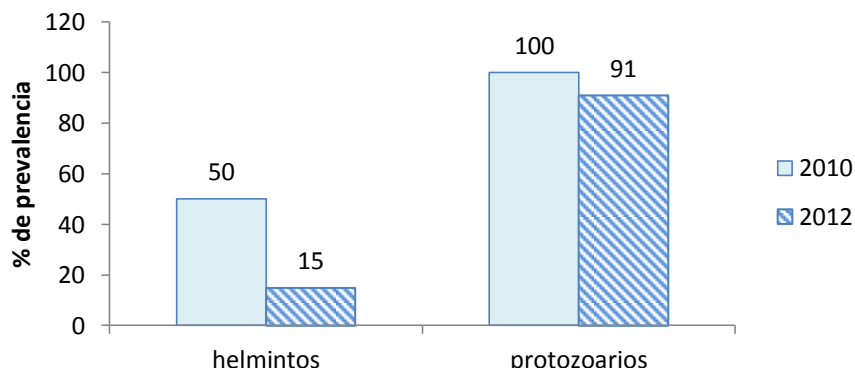


Los resultados obtenidos en la comunidad de Charcas II, durante todo el estudio (2010-2012), son consistentes con los reportados por otros autores en áreas rurales, en las cuales factores ecológicos, socio culturales y económicos, acompañados por el deterioro de los sistemas de salud, favorecen la presencia y el mantenimiento de estas infecciones.

De acuerdo al diagnóstico inicial (Marzo 2010), se dividieron a los niños en dos grupos a los que se les administró jarabe de Evanta al 2% y decocción acuosa de Evanta.

De los 42 niños sometidos a los exámenes coproparasitológicos en marzo de 2010 el 100% de estos resultaron positivos. Solo el 4% presentó infección por un único agente (2/42). La prevalencia de protozoarios alcanzó un 100%, mientras que los helmintos alcanzaron un 50% de prevalencia. En 2012, al final del tratamiento se logró reducir a un 15% la prevalencia de helmintos y se logró disminuir un 10% de la prevalencia de helmintos. **(Figura 24)**

Figura 24. Prevalencia de helmintos y protozoarios intestinales, en 2010 (primer diagnóstico) y 2012 (último diagnóstico), en la población en estudio.



Los resultados obtenidos a lo largo del “Proyecto de Desparasitación en Escuela Rurales” (2010 - 2012) nos indican, que el uso de productos naturales como tratamientos antiparasitarios, ofrecen una alternativa eficiente y económica a un problema latente como son las parasitosis intestinales, sin embargo esta eficacia dependerá de la forma en que la especie vegetal sea administrada y además del número de veces que dicho tratamiento es administrado, como se describe a continuación en la comparación de estos:

2.5.3.4.1 Jarabe de Evanta al 2%

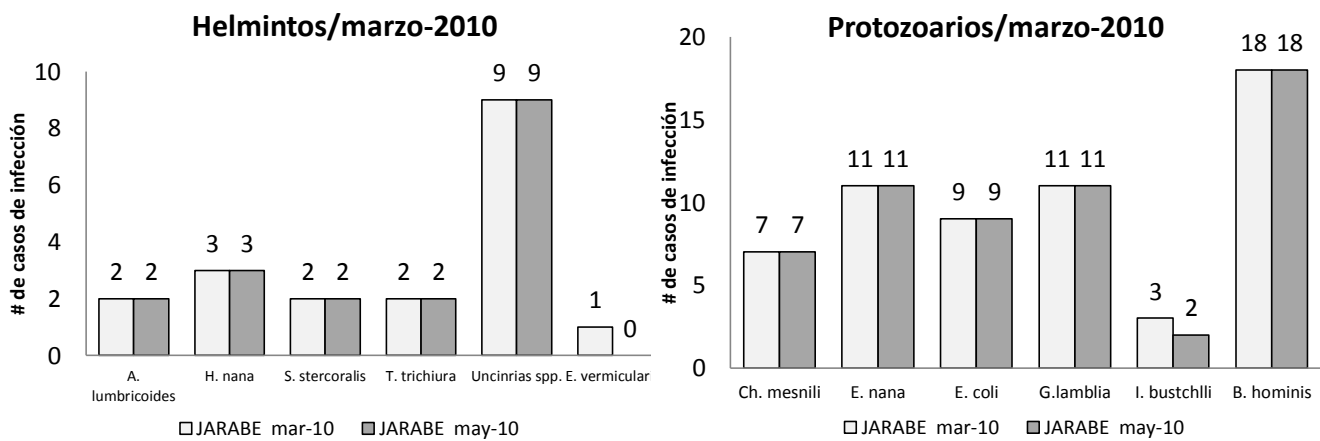
Se realizaron dos tratamientos con Jarabe de Evanta al 2% el primero en marzo y el segundo en noviembre de 2010. Los resultados obtenidos tras la primera administración del jarabe de Evanta al 2% (marzo 2010) muestran que el tratamiento solo tuvo efecto frente a *Enterobius vermicularis* en helmintos y una ligera disminución en el número de casos de infección por *Iodamoeba bustchli* en protozoarios. **(Figura 25-A)**

Ya en la segunda administración del jarabe (noviembre 2010) se observa un panorama algo diferente, ya que los casos de infección son menos que en marzo y comienzan a notarse los efectos del tratamiento. En el caso de los helmintos se observa nuevamente que las infecciones por *Enterobius vermicularis* son

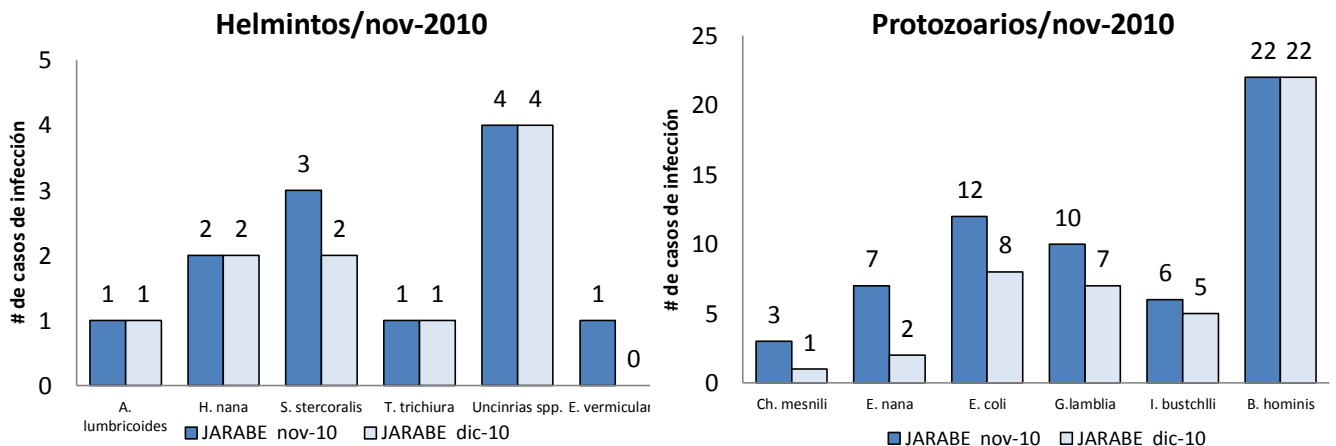
eliminadas y se observa disminución del número de casos de infección por *Strongyloides stercoralis* con un 33% de eliminación. En el caso de los protozoarios se obtuvo mejores resultados ya que se observa una disminución en el número de casos de infección excepto para *Blastocystis hominis* (Figura 25-B)

Figura 25. A. Casos de infección por helmintos y protozoarios antes y después de la primera administración de Jarabe de Evanta al 2% (marzo-mayo). B. Casos de infección por helmintos y protozoarios antes y después de la segunda administración de Jarabe de Evanta al 2% (marzo-mayo).

A. Primera administración - jarabe



B. Segunda administración - jarabe al 2%



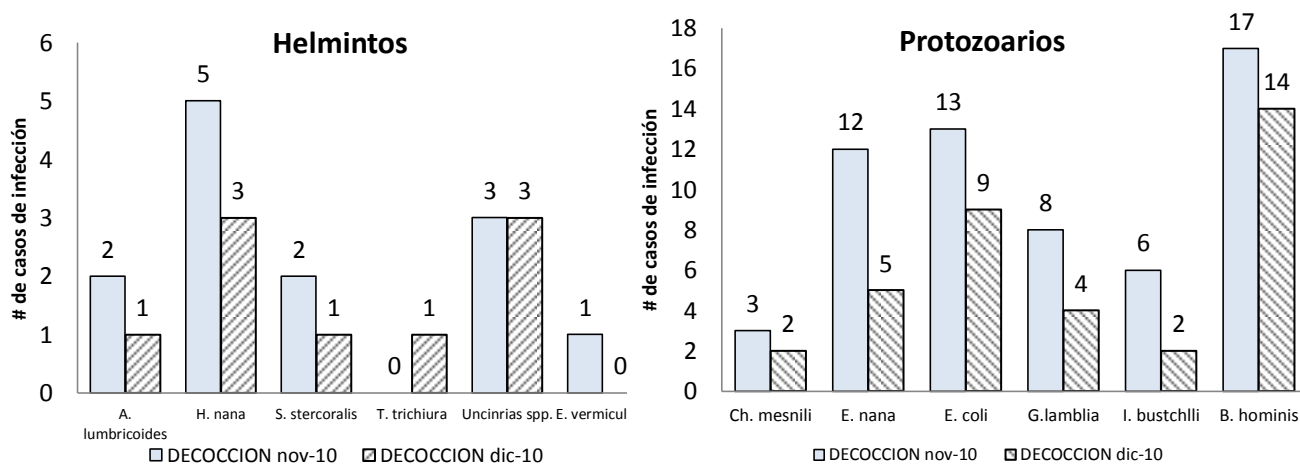
Es posible que la baja efectividad del tratamiento antiparasitario con Jarabe de Evanta al 2%, alcanzada haya sido consecuencia de que, al ser el primer tratamiento aplicado en la escuela, los niños no contaban con la información y

orientación higiénico - dietética sobre las formas de evitar contraer parásitos nuevamente. En algunos casos como el de *Ascaris lumbricoides* la no eliminación podría deberse a la migración larvaria extraintestinal, por lo que evadiría el efecto del jarabe. Los resultados observados entre la primera y segunda administración del jarabe muestran que la eliminación de parásitos llevaría más tiempo de tratamiento o la administración de varios tratamientos durante el año, para que este llegue a ser realmente eficaz.

2.5.3.4.2 Decocción acuosa de Evanta

En el caso del tratamiento con la decocción acuosa de Evanta, se realizó un único tratamiento en noviembre de 2010, los resultados son mejores que los obtenidos para el jarabe, ya que se puede observar una disminución en los casos de infección para la mayoría de los parásitos; además se observa un buen nivel de eliminación de parásitos y por ende de eficacia contra *A. lumbricoides*, *S. stercoralis* y *E. vermicularis* ($\geq 50\%$), en el caso de los helmintos. Mientras que para los protozoarios presenta mayor eficacia contra *E. nana*, *G. lamblia* y *I. bustchlii*; existiendo también una disminución de casos de infección para los demás protozoarios. (Figura 26)

Figura 26. A. Casos de infección por helmintos y protozoarios antes y después de la administración de Decocción acuosa de Evanta (noviembre-diciembre 2010).



En este caso es posible que el efecto del tratamiento se deba a que: al ser administrado en noviembre los niños de la escuela hayan recibido información acerca de las parasitosis y sus consecuencias; lo cual influyó en los hábitos higiénicos y nutricionales de los niños, llegando a obtener un efecto mayor por parte del tratamiento administrado. Otra posibilidad es que en la decocción existiera una mayor cantidad de alcaloides presentando una mayor acción del principio activo hacia los parásitos.

Es importante señalar que en el caso de *Hymenolepis nana* se observó una disminución en el número de casos de infección por este parásito tras la administración de la decocción acuosa de Evanta y no así en los otros tratamientos, sin embargo no se puede afirmar la eficacia de este tratamiento contra el parásito, ya que dicha eficacia podría ser solo parcial o temporal.

Mientras que en 2012 el tratamiento con decocción de Evanta en jugo de naranja, muestra mejores resultados principalmente contra helmintos alcanzando una eficacia del 100% contra *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y *Uncinarias spp*, y un 50% de eficacia contra *S. stercoralis*. En el caso de los protozoarios presenta buena eficacia frente a *E. nana*, *G. lamblia* y *I. bustchlii*, al igual que la decocción acuosa.

La principal diferencia entre los tres tratamientos antiparasitarios, es el número de administraciones, realizándose cuatro tratamientos con la decocción de Evanta en jugo de naranja durante el 2012 (junio, agosto, septiembre y noviembre).

Es esta diferencia y los resultados obtenidos, lo que nos hace pensar que: para que el tratamiento con Evanta, cualquiera sea la forma de administración, alcance porcentajes altos de efectividad y por consecuencia logre una alta tasa de eliminación parasitaria, es necesaria la aplicación periódica de tratamiento, ya que la elevada prevalencia de parasitosis intestinal determinada en el estudio, así

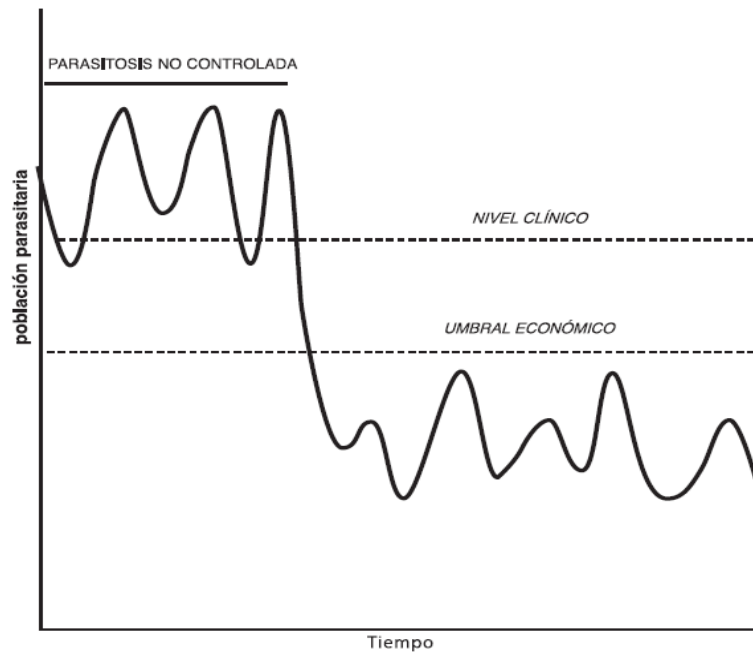
como los altos índices de poliparasitismo y los bajos niveles de eficacia por parte de los tratamientos antiparasitarios, principalmente contra protozoarios, sugieren que los habitantes de estas zonas se encuentran sujetos a procesos continuos de infección y reinfección, gracias a su exposición constante a elementos contaminantes y mucho más al tratarse de una zona rural donde la principal actividad es la agricultura, favoreciendo la transmisión de agentes infecciosos.

Es importante señalar también que estas infecciones afectan especialmente a la población infantil; hecho atribuido al desarrollo de actividades al aire libre que propician su adquisición; y al constante contacto de los escolares con otros niños, e intercambio de alimentos y bebidas, favoreciendo la transmisión y continuidad del ciclo de agentes infecciosos.

Los resultados obtenidos durante todo el estudio nos indican, que si bien el uso de antiparasitarios químicos presenta una ventaja de manejo sobre los productos naturales, los productos naturales ofrecen una alternativa eficiente y económica a un problema tan latente como son las parasitosis intestinales, que además presentan muchas ventajas como su fácil alcance, baja toxicidad, entre otras.

Por otra parte, sabemos que para que las drogas antiparasitarias puedan seguir siendo efectivas, debemos mantener una población sensible a las drogas, es en este umbral donde las alternativas de control parasitario, como el consumo de la decocción de alcaloides totales de corteza de *Evanta* en jugo de naranja y los antiparasitarios químicos como el Mebendazol y Albendazol y la implementación de programas de desparasitación en escuelas en zonas rurales, llegan a cumplir con el modelo de oscilaciones en la población de parásitos, propuesto por Grønvold *et al.*, 1996 (**Figura 27**), modelo que se llegó a cumplir con este estudio.

Figura 27. Modelo demostrativo de las oscilaciones en la población de parásitos utilizando un método antiparasitario de control alternativo.



Fuente: Grønvold *et al.*, 1996

Por lo que en zonas rurales como la comunidad de Charcas II, donde se llevó a cabo el estudio, la aplicación de programas de control parasitario debe ser dirigida principalmente a la disminución de las tasas de morbilidad y mortalidad. El control propuesto en este estudio, está sustentado en la aplicación periódica de tratamiento con productos naturales propios de la región, como es el caso de la Evanta u otros como Mebendazol y/o Albendazol, en combinación con una serie de acciones con el fin de lograr cambios de hábitos y conductas de riesgo que permitan disminuir la incidencia y prevalencia de parasitosis en la población. Además de proporcionar información y educación sobre los hábitos higiénicos y dietéticos adecuados para evitar volver a contraer parásitos.

2.6 CONCLUSIONES

- El diagnóstico coproparasitológico reveló un elevado índice de parasitosis intestinal 28% para helmintos y 96% para protozoarios, por lo que se consideró a la población evaluada como de alto riesgo para contraer este tipo de infecciones. La respuesta parasitaria frente a las terapias antiparasitarias en general mostró una disminución en la prevalencia de infección principalmente en el caso de helmintos (15%) y fue menor para protozoarios (91%).
- El número de parásitos por muestra, encontrados antes del tratamiento oscilaba entre 3 y 4 parásitos, llegando a encontrar hasta 6 parásitos en una sola muestra; posterior al tratamiento este se redujo de uno a dos por muestra.
- En el caso de *Hymenolepis nana*, ninguno de los tratamientos aplicados (Decocción de Evanta en jugo de naranja, Mebendazol, Albendazol) tuvo eficacia contra este parásito.
- Se comprobó la efectividad de la decocción de alcaloides totales de Evanta en jugo de naranja frente a helmintos llegando a eliminar casi en su totalidad a estos, fue más eficaz contra *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Uncinarias*; para *Strongyloides stercoralis* presentó un 50% de eficacia.

Frente a los protozoarios, presentó diferentes niveles de eficacia, esta es mayor frente a *Iodamoeba bustchli* y *Endolimax nana*, presenta acción moderada contra *Chilomastix mesnilli* y *Giardia lamblia*, y es menor para *Entamoeba coli* y *Blastoystis hominis*, siendo este último el parásito de mayor prevalencia durante el estudio y el de mayor dificultad de eliminación.

- El Mebendazol, tuvo eficacia frente a Uncinarias y *Ascaris lumbricoides*, no así frente a *Strongyloides stercoralis* en el caso de helmintos. En protozoarios, Mebendazol presentó buena eficacia contra *Chilomastix mesnili*, *Endolimax nana* y *Entamoeba coli* mientras que para *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia* y *Iodamoeba bustchli* no existió ningún tipo de acción por parte del tratamiento, ya que la eficacia es inferior al 10%.
- Paralelamente se evaluó la eficacia del Albendazol en 2013, frente a parásitos intestinales encontrados en las muestras de los niños recién incorporados, la eficacia encontrada fue elevada para helmintos principalmente para infecciones causadas por *Ascaris lumbricoides*, y Uncinarias y menor para *Trichuris trichiura* y *Strongyloides stercoralis*, Este tratamiento frente a los protozoarios, tuvo similar eficacia a la presentada por los tratamientos con decocción de Evanta y Mebendazol, tuvo mayor acción contra *Endolimax nana*, *Chilomastix mesnili* y *Entamoeba coli*, frente a *Blastocystis hominis*, *Giardia lamblia* y *Iodamoeba bustchli* la eficacia es baja.
- En general la eficacia del tratamiento antiparasitario con decocción de alcaloides de Evanta en jugo de naranja no es superior a la presentada por el tratamiento de Albendazol o Mebendazol. Por lo que, se puede controlar los niveles de parasitosis intestinales mediante una alternativa natural, como es el caso de la decocción de alcaloides de Evanta en jugo de naranja, aprovechando todas las ventajas que presentan el uso de productos naturales propios de la región. Sin embargo, los resultados del tratamiento dependen, también, de la respuesta de cada niño hacia el tratamiento.
- El estudio se continuó administrando un placebo, para así comprobar la eficacia del tratamiento con decocción de alcaloides de Evanta y comparar los resultados obtenidos con los del Mebendazol. Nuevamente se

comprueba la eficacia como antiparasitario de la decocción de alcaloides de Evanta en jugo de naranja, ya que cuando se administró el placebo hubo un incremento en la prevalencia de parásitos, reapareciendo parásitos que se habían conseguido eliminar y también se encontraron dos casos de enterobiosis, cuando en un principio del estudio no se había reportado ninguno.

- Al comparar el presente estudio con los primeros estudios piloto de desparasitación de niños con *Galipea longiflora* (Jarabe al 2% y decocción acuosa de Evanta) la principal diferencia entre los tres tratamientos antiparasitarios, es el número de administraciones; lo que indicaría que para que el tratamiento con Evanta, cualquiera sea la forma de administración, alcance porcentajes altos de efectividad es necesaria la aplicación periódica de tratamiento.

2.7 REFERENCIAS

1. Abarca O., Chacón A., Espinoza F., Vera P. (2005) **Placebo y psicología clínica. Aspectos conceptuales, teóricos e implicancias.** *Terapia psicológica.* **23** (1): 73-82.
2. Abrahams-Sandí, Solano M., Rodríguez B. (2005). **Prevalencia de parásitos intestinales en escolares de Limón Centro, Costa Rica.** *Rev. costarric. cienc. méd.* 26: 33-38.
3. Angles R., Ramírez S. (2000) **Determinación del grado de infestación para parásitos intestinales en una muestra poblacional aleatoria en la ciudad de Viacha,** *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría* 2:50-52.
4. Aparicio M., Tajada P. (2007) **Parasitosis intestinales.** *Pediatr integral.* 11 (2): 149-160
5. Bourdy G., Giménez A., Quenevo C. (1999) **“Tacana: Ecunasha aquí, ecuna shaid’reneuana, me schanapaque” (Tacana: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas).** UMSA, IIFB, IIQ, IBBA; FONAMA – EIA, La Paz – Bolivia. 409 – 416.
6. Bravo R., **Serologia de amebiasis en pacientes con disentería.** (Tesis). La Paz: Hospital del niño. 1994
7. Cabrera, R. (2003) **Helmintos intestinales en el Perú: análisis de la Prevalencia (1981-2001).** Perú/MISA/OGE-03/039 & Serie de Informes Técnicos de Investigación Epidemiológica. 113 p.
8. Calamani MCN. (2006). **Frecuencia de parasitosis intestinal en escolares comprendidos entre los 5 a 12 años de edad de la unidad educativa 16 de Noviembre de la ciudad de El Alto. En el periodo comprendido entre mayo – Agosto 2006.** [Tesina de Grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
9. Calderon N. (2007) **Frecuencia de helmintos en vendedores de alimentos de la población del municipio de Guanay de la provincia de Larecaja tropical, La Paz – Bolivia, durante el primer semestre de la gestión 2007.** [Tesis de licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
10. Carabin H., Chan MS., Guyatt HL., **A Population Dynamic Approach to Evaluating the Impact of School Attendance on the Unit Cost and Effectiveness of School-Based Schistosomiasis Chemotherapy Programmes.** *Parasitology.* August 2000; 121 (2): 171-83
11. Carpio I., Reyes J., Trelles M., et al. (2007) **Presencia de *Strongiloides stercoralis* en un estudio sobre enteroparasitosis en escolares del asentamiento humano “La Candelaria”, distrito de Chancay, provincia de Huaral, departamento de Lima.** *Acta Med Per.* 24(3): 177-180
12. Castillo V., Rios J. (1991) **Helmintos y Protozoos intestinales: Estudio médico social de 52 casos.** *Revista de la Sociedad Boliviana de Medicina Familiar* 2(1):49-66.
13. Condori S. (2008) **Frecuencia de *Giardia lamblia* en niños de 0-15 años de edad que acuden al hospital La Paz durante los meses de Junio-Agosto 2007.** [Tesis de licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
14. Cordero A. (2005) **Enteroparasitosis infantil en Rio abajo, La Paz – Bolivia.** [Tesis de licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.

15. Estado plurinacional de Bolivia. Ministerio de salud y deportes. (2001) **Normas para medicamentos naturales, tradicionales y homeopáticos.**
16. Figuera L., Kalale H., Marchan E. (2006) **Relación entre la helmintiasis intestinal y el estado nutricional-hematológico en niños de una escuela rural en el estado Sucre, Venezuela.** *Kasmera.* 5(1):14-24.
17. González JF., Barbadillo F., Merino J., Sánchez J. (2004) **Parasitosis intestinales. Protocolo diagnóstico-terapéutico.** *Bol Pediatr.* 39:106-11.
18. Grenier G., Rodríguez G., Sánchez R., Almeyda L. (2008) **Frecuencia por parasitosis intestinal en la población del barrio Los Cocos, municipio Sucre, estado Aragua, Venezuela. Años 2005-2006.** *EnfInfMicrobiol.* 28(1):6-12.
19. Grønvold, J., Henriksen, S.A.; Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J. (1996) **Biological control. Aspects of biological control-with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated animals .***Vet. Parasitol.* 64, 47-64.
20. Herrera I. (2005) **Giardiasis y desnutrición.** *Rev Soc Bol Ped.* 44(3): 166-173
21. Herrera V., **Toxicidad del extracto de alcaloides totales de *Galipea longiflora* Krause kallunki (Evanta) en fase pre-clínica.** Tesis de post-grado. La Paz-Bolivia. 2008
22. Iannacone, J.O., Benites, M.J. & Chirinos, L. (2006). **Prevalencia de infección por parásitos intestinales en escolares de primaria de Santiago de Surco, Lima, Perú.** *Parasitol. Latinoam.* 61: 54-62.
23. Keiser, J.; Utzinger. J. (2010) **“The Drugs We Have and the Drugs We Need Against Major Helminth Infections”.** *Advances in Parasitology,* 73:197-230;
24. Koller J., Yañez E., Iporre S. (1994) **Parasitosis de la via biliar: Diagnóstico y tratamiento.** *Acta Gastroenterológica Boliviana.* 25-7
25. Lagrava M. (1986) **Control de las Parasitosis intestinales, un reto para Bolivia.** *Bol Cient CENETROP.;* 4:107-124.
26. Ledezma A., Fernández G. (2004) **Enteroparasitosis: Factores predisponentes en la población infantil de la ciudad de Resistencia.** *Rev Argentina de Pediatría.* 8(2):9-17.
27. Limachi I. (2013) **Estudio químico cuantitativo y el uso como antiparasitario, del extracto etanólico de la corteza de *Galipea longiflora* (EVANTA).** [Tesis de post-grado]. Universidad Mayor de San Andrés.La Paz-Bolivia.
28. Luna S., Jimenez S., Lopez R., *et al.* (2007) **Prevalencia de parasitismo intestinal en niños y mujeres de comunidades indígenas del Rio Beni.** *Vision científica.* 2 (1): 37-46
29. Martinez C. (2008) **Prevalencia de parasitosis intestinales en escolares, ambulatorio San miguel II Enero-Febrero 2008.** [Tesis de licenciatura]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
30. Melgar B., Cuellar C., De Muyneck A. (2000) **Estado de salud de niños escolares del barrio Santa Rosita, Santa Cruz-Bolivia.** *Bol. Inf. CENETROP.* 7:37-40

31. Michelli E., Leon M. De Donato M. (2006) **Efecto antiparasitario del pamoato de piraxel/oxantel y metronidazol y su relación con parámetros hematológicos, en escolares de la escuela Ascanio José Velásquez de Cumana, Estado de Sucre.** *Salud Online.* 11 (1): 23-35
32. Miguel E., Kremer M. (2004) **Worms: identifying impacts on education and health in the presence of treatment externalities.** *Econometrica.* 72(1):159–217
33. Miranda MIC. (2007) **Frecuencia de las enteroparasitosis en menores de 14 años en el cantón Rosario Entre Ríos – Municipio de Caranavi, departamento de La Paz – Bolivia. Marzo del 2004** [Tesis de Grado]. Universidad Mayor de San Andrés.
34. Mollinedo S., Prieto C. (2006) **El enteroparasitismo en Bolivia.** Ministerio de Salud y deportes.
35. Muñoz V., Lizarazu P., Limache G. (2008) **Blastocistosis y otras parasitosis intestinales en adultos mayores del hogar San Ramon, ciudad de La Paz, Bolivia.** *Biofarbo.* 16:9-12
36. ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 2010.
37. ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD. 2009
38. Pan American health organization. IDB. (2011) **Un llamado a la acción: hacer frente a los helmintos transmitidos por el contacto con el suelo en Latino America y el Caribe.**
39. Pinal I., Molina I., Sulleiro E., Segura A. (2011) **Infeccion por Strongiloidesstercoralis con eosinofilia masiva y hepatitis colestasica.** *RevClin Esp.* 39: 695-700
40. **Plan nacional de desarrollo,** ministerio de planificación para el desarrollo, Gobierno de Bolivia. 2006
41. Programa UMSA - ASDI - SAREC, **Proyecto Enfermedades Infecciosas: Evanta en el Tratamiento de la Leishmaniasis cutanea** (Financiador Suecia, 2007-2011)
42. Proyecto IDH-09 **“Desparasitación de niños en escuelas rurales”** (2010-2011)
43. Proyecto Jeune Equipe **“BIOLEISH”** (Financiador Francia, 2004-2007)
44. Proyecto multidisciplinario con Panamá, Guatemala, Colombia y **Bolivia “Flora Regional como fuente de fármacos antiparasitarios y cáncer”.** Financiador OEA. 2001.
45. Proyecto multidisciplinario con Panamá, Guatemala, Colombia, Argentina y Bolivia **“Flora Regional como fuente de fármacos antiparasitarios, antifúngicos y cáncer”.** Financiador OEA. 2002-2004
46. Proyecto X.5 CYTED Subprograma X. **“Búsqueda Obtención y Evaluación de Nuevos Agentes Antiparasitarios”.** FinanciadorCYTED. 1999-2003

47. Rodríguez Olguin Beatriz. (2006) **“Estudio de Pre-formulación en una forma farmacéutica semisólida de uso tópico para el extracto orgánico y concentrado de alcaloides totales de la especie *Galipea longiflora* Krause “Evanta”**. [Tesis de post-grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
48. Salamanca E. (2008) **Actividad antiparasitaria múltiple de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora* Krause kallunki (Evanta)**. [Tesis de post-grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
49. Stephenson LS., Latham M.C., Adams EJ. (2003) **Physical Fitness, Growth and Appetite of Kenyan School Boys with Hookworm, *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* Infections are Improved Four Months after a Single Dose of Albendazole**. *Journal of Nutrition*. 123:1036-46
50. Suarez A. (2006) **Strongyloides stercoralis: Hallazgos histopatológicos en mucosa duodenal 1999-2005**. *Rev Gastroenterol. Per*. 26: 44-48
51. Tamayo L. (2003) **Parasitosis intestinal infantil**. *Rev.Soc.Bol.Ped*. 32(1): 36-40
52. Ticona JC. (2008) **Estudio químico de dos plantas bolivianas de la etnia tacana: *Galipea longiflora* y *Bowdichia virgiloides***. [Tesis de post-grado]. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
53. Urgel R., Darras Ch. (1992) **Parasitosis Intestinal en el Departamento de Santa Cruz**. *Bol Inf CETNETROP*. 8(1) :12-19.
54. www.ops.org.bo/sociedad/rct/2006/200660301/ENTEROPAR-EN-BOLIVIA-OPS [Fecha de acceso febrero 2013]

3.1 RESUMEN

Farmacopea Tacana

Se realizaron estudios de las cistein-proteasas contenidas en el látex de *Ficus spp.* una especie medicinal de la Etnia Tacana: el látex de *Ficus spp.* se ha colectado en diferentes zonas [Iquitos-Perú (**P-IQ**); Provincia Sud Yungas (Charcas II, Los Olivos, Hernández) (**B-SY**) y Provincia Abel Iturralde (Buena Vista, el Tigre) (**B-AI**) del norte de La Paz-Bolivia]. El estudio se basa en la comparación de la actividad proteolítica de las muestras, respecto al lugar de procedencia, cantidad de proteínas contenidas; además de la conservación de la actividad proteolítica.

Materiales y métodos

Se cuantificaron proteínas totales por el método de Biuret, la determinación de la actividad proteolítica se realizó sobre azocaseína y leche; además de la caracterización de especies proteínicas por electroforesis SDS-PAGE. La conservación de actividad proteolítica de *Ficus spp.*, se evaluó cuando este es diluido en soluciones de diferentes rangos de pH y secado por métodos como: liofilización, secado por aire caliente y exposición directa al sol.

Resultados

Los resultados de actividad proteolítica son variables entre las zonas de colecta. En la caracterización por SDS-PAGE se encontró una diversidad de componentes proteínicos, con diferentes masas moleculares: una común cercana a los 25 KDa, correspondiente a la Ficina, también se encontraron otras fracciones con actividad proteolítica. En cuanto a la conservación de la actividad enzimática el complejo proteolítico presenta alta estabilidad y conservación de actividad cuando el látex es disuelto en soluciones con diferente pH y después de ser secado dependiendo del método de secado; llegando a ser dicho complejo, muy estable frente a las variaciones de pH; una propiedad útil que permitiría que sea posible la administración oral, para su uso como antiparasitario.

Estudios de proteasas de látex de especies del género Ficus spp. (Ojé) y caracterización de las enzimas proteolíticas

3.2 ANTECEDENTES

3.2.1 Ficus spp.

El género *Ficus* pertenece a la familia *Moraceae* y al orden *Urticales*. La familia *Moraceae* está compuesta de árboles y arbustos que característicamente tienen un jugo lechoso. El jugo lechoso de plantas de al menos 5 géneros contiene una elevada actividad proteolítica. Éstos son *Maclura* (osage naranja: palo de arco), *Morua* (morera), *Brosimum* (nuez de pan), *Broutsonetia* (mora de papel) y *Ficus* (varias especies de higueras) (Williams *et al.*, 1968).

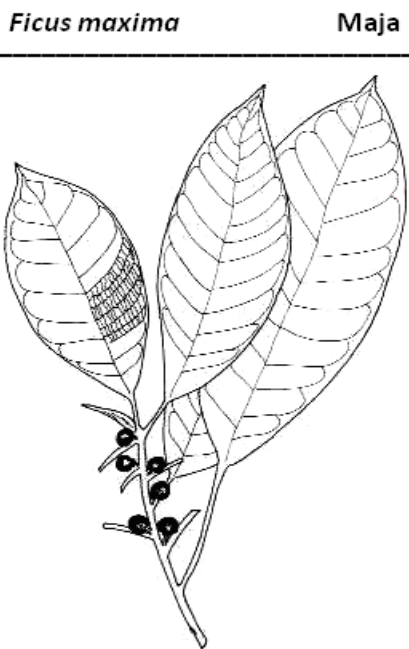


Figura 28. Dibujo de *Ficus insipida* Willd. Spp. *insipida* (Moraceae).

Fuente: *Tacana: Ecuana shaaqui, ecuana shaid'ren ecuana, me schanapaque*, 1999)

Ficus incluye a uno de los géneros más grandes de plantas que florecen con cerca de 750 especies nombradas, las mismas están ampliamente difundidas en las regiones tropicales y sub-tropicales del mundo. Pertenecen a este género

diversas formas tales como el higo comestible común (*F. carica*), la higuera sicómora (*F. sycomorus*), la higuera de Bengala (*F. indica* y *F. benghalensis*), varias higueras estrangulantes; varias especies que incluyen a *F. bonplandiana* y *F. padifolia*, árbol de caucho (*F. elastica*) y la higuera trepadora (*F. repens*) (Lansky y Paavilainen, 2011). Quizás las únicas características que unifican a este género (que incluye a vides, arbustos, y árboles), es el látex lechoso y la producción de frutos, los cuales difieren marcadamente en el tamaño, la forma, el color, la localización de la planta, y la frecuencia de aparición entre las diferentes especies.

Otro rasgo común de este género es la elevada actividad proteolítica del látex. Previamente se ha demostrado que el látex de *F. glabrata* y *F. carica* tiene una actividad proteolítica muy alta (Williams *et al.*, 1969).

En Bolivia se tiene documentada la actividad proteolítica de especies de *Ficus* reconocidas como *Ficus insípida* Willd spp. *insipida* (Moraceae) y *Ficus maxima* Miller (Moraceae), las cuales son conocidas genéricamente como *Maja* en el dialecto del pueblo Tacana (Bourdy *et al.*, 2000). Las mismas se diferencian por el color de sus cortezas: *Maja dhahua* o *dheve* (corteza verde o negra), *Maja dhere* (corteza roja o colorada) y *Maja pasha* (Corteza blanca) (centro de artigos.com), siendo esta última la especie estudiada en el presente trabajo.

Los estudios comparativos realizados indicaron que si bien las condiciones de uniformidad en el cultivo de la planta y la recolección del látex contribuyen a que el contenido de la proteína activa sea mayor, el contenido de enzima de la savia de la *Ficus* nativa crecida en condiciones silvestres es bastante alto (Williams *et al.*, 1968).

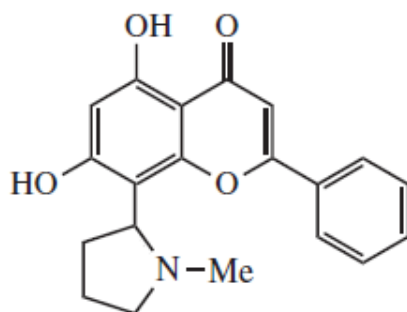
3.2.2 Composición del Látex

Generalmente las proteasas contenidas en el látex se encuentran en cantidades relativamente bajas y son frecuentemente difíciles de detectar si no se

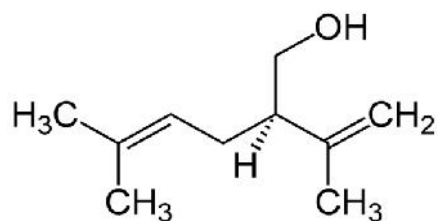
emplean sustratos muy sensibles. Sin embargo, algunas especies de plantas poseen gran concentración de proteasas en ciertos tejidos. Un ejemplo de ello es el látex obtenido a partir de plantas de diversas familias en el que las enzimas proteolíticas superan el 50% de las proteínas totales. En estos casos la actividad proteolítica es por lo menos superior en dos órdenes de magnitud a la encontrada en otros tejidos. (Dalling, 1986; Kono et al., 2004).

El látex de *Ficus spp.* es un líquido blanco y viscoso que contiene 7–25% de sólidos. Después de la filtración para quitar ceras y resinas el contenido de sólidos es de 4–9%. El látex de los árboles de higo contienen lisozimas, quitinasa y peroxidasa, enzimas que junto con la ficina podrían contribuir a proteger a los árboles de los parásitos (Gaughran, 1976).

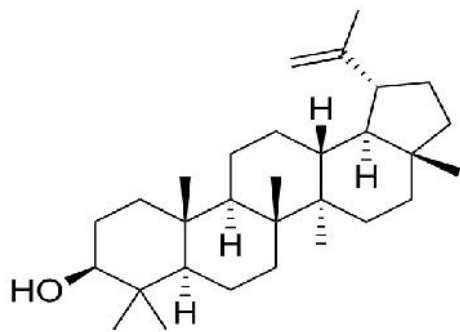
Dentro de los componentes se ha visto que esteroides con actividad biológica están presentes en el látex de *Ficus carica* (Lansky y Paavilainen, 2011). El alcaloide doliarina (**14**) es uno de los principios activos presente en la planta. Además, se ha estudiado a la hexosaminidasa, una enzima lisosómica involucrada en el catabolismo de las glucoproteínas (Orlacchio *et al.*, 1985). Adicionalmente se han reportado a los terpenos: lavandulol (**15**), lupeol (**16**), fillantol (**17**) y eloxantina (**18**) en el látex de *F. glabrata* (López y de Kiyán, 1974). Se sugiere que la eloxantina (**18**) también es responsable de la acción vermífuga (Hansson *et al.*, 1986). Sin embargo, el componente principal es el complejo proteolítico enzimático, llamado ficina o ficaina (Gaughran, 1976).



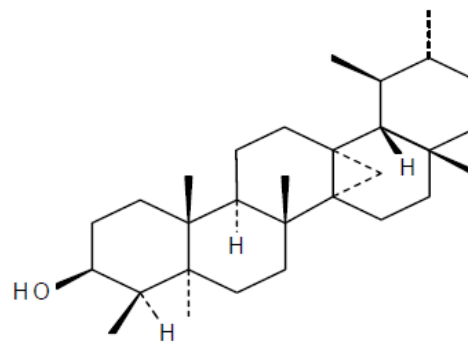
Doliarina (**14**)



Lavandulol (**15**)



Lupeol (16)



Fillantol (17)

Proteasas cisteínicas de látex de frutos tales como papaína y ficina son conocidas por digerir la cutícula de los nematodos y presentar baja toxicidad, por lo que se utilizan desde hace tiempo en el tratamiento gastrointestinal de infecciones por nematodos tanto en animales como en el hombre (Stepek *et al.*, 2004).

3.2.3 *Proteasas cisteínicas de plantas lactíferas*

Comúnmente las plantas están expuestas a una gran variedad de tipos de estrés ocasionado por las condiciones ambientales que van desde factores climáticos hasta los ataques por bacterias, hongos, insectos y otros patógenos y herbívoros (Azarkan *et. al.*, 2004; Kono *et. al.*, 2004). Estas como un mecanismo de defensa a estos tipos de estrés biosintetizan y almacenan una gran variedad de fluidos dentro de cavidades secretoras y canales celulares tales como resinas, gomas, látex y mucilagos, los cuales actúan creando una barrera a través del proceso de coagulación (Coley, 1983).

El látex es un fluido exudado por algunas plantas en respuesta al ataque o daño. Se ha reportado cerca de 35000 especies de plantas que producen este fluido (Dussourd y Denno, 1991), así también se ha dado a conocer que en el látex se encuentran proteasas cisteínicas pertenecientes a las “*papain-like*”. Dentro de

las enzimas proteolítica cisteínicas de origen vegetal más estudiadas están la papaína la cual es extraída de *Carica papaya*, la bromelina de *Ananas comosus* y la ficina de *Ficus glabrata*, estas son ampliamente utilizadas en las industrias alimentaria, textil y farmacéutica (Caffini *et al.*, 1988; Barrett *et al.*, 2004), ya que varias de ellas poseen actividades antiinflamatorias y anticancerígenas entre otras (Duvey y Jagannadham, 2003).

3.2.4 Estructura bioquímica de las cisteín-proteinasas vegetales

Todas las cisteín-proteinasas de la familia de la papaína dependen de un grupo tiol reducido con un residuo de cisteína como nucleófilo, el cual está involucrado en la hidrólisis del enlace peptídico. Constan de una sola cadena polipeptídica de 25 kDa que se pliega para formar una proteína globular con dos dominios (Steppek *et al.*, 2004) (**Figura 29**).

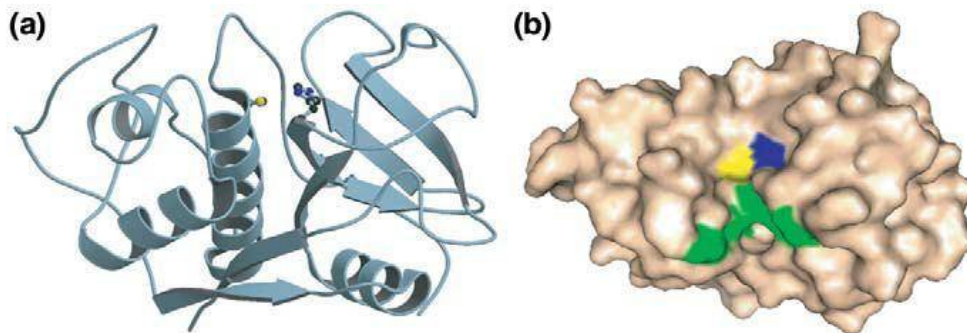


Figura 29. Estructura de las cisteína-proteasas. (A) Diagrama de cintas de la estructura de la papaína.

Fuente: Drenth *et al.*, 1968

En las proteasas cisteínicas el nucleófilo es el grupo sulfhidriilo de un residuo de cisteína. Su máxima actividad se encuentra a valores de pH más neutros que para las proteasas serínicas.

La estructura es similar entre las diferentes cisteína-proteinasas de la familia de la papaína, y los residuos de histidina y cisteína en el sitio catalítico (que

se muestran en el diagrama) son idénticos. La superficie accesible al solvente de la molécula de papaína que muestran la hendidura de unión al sustrato, va de arriba a abajo. Se muestran la superficie ocupada por los residuos de cisteína (amarillo) y de histidina (azul) del sitio activo, junto con el bolsillo principal de unión a los residuos hidrofóbicos (para unirse a la cadena lateral de un aminoácido hidrofóbico presente en el sustrato) en verde. (Stepek et al., 2004).

Las estructuras de estas enzimas son muy similares, el mecanismo catalizador es casi idéntico, y varían en otras características importantes tales como la resistencia a las condiciones de un medio ácido y susceptibilidad a la digestión por las enzimas del tracto digestivo (**Tabla 43**) (Rawlings y Barrett, 1994). Aunque, también pueden diferir en el alineamiento de sus aminoácidos (Williams et al., 1968).

Tabla 42. Cisteína-Proteinasas vegetales y sus fuentes

Especies vegetales (nombre común)	Enzima	pH óptimo	Estabilidad en medio ácido a:
<i>Carica papaya</i> (papaya)	Papaina	4-10	pH = 4
	Quimimopapaína	3-10	pH > 1.2
	Caricaina	3-10	pH = 4
	Glicil-endopeptidasa	3-10	pH = 3
<i>Ficus carica</i> (higo del mediterráneo)	Ficina	4-8.5	pH = 4
<i>Ficus glabrata</i>	Ficaina	4-8.5	pH = 3.3
<i>Ananas comosus</i> (piña)	Bromelina del tallo	5.5-8	ND
	Bromelina del fruto	5.5-8	ND
	Ananaina	5.5-8	ND
	Comosaina	5.5-8	ND
<i>Actinidia chinensis</i> (fruto del kiwi)	Actinidaina	4-10	ND
<i>Calotropis gigantea</i> (planta de madar)	Calotropina	4-8	ND
<i>Asclepias spp.</i> (algodoncillo)	Asclepaina	6-10	ND
Abreviación: ND, no disponible			

Fuente: Stepek et al., 2004

3.2.5 *Ficina y sus Componentes Proteolíticos*

Se ha documentado una actividad proteolítica apreciable de sólo 13 de las diferentes especies de *Ficus*. No existe una correlación entre la actividad proteolítica y el contenido de proteína presente en el látex (Williams *et al.*, 1968).

La naturaleza del grupo activo de la enzima, confirmando que se trata de una proteinasa cisteínica con un único grupo -SH activo por molécula, aun cuando advierte que la misma contiene al menos otro grupo tiol y una unión disulfuro no esenciales para la actividad proteolítica (Liener, 1961).

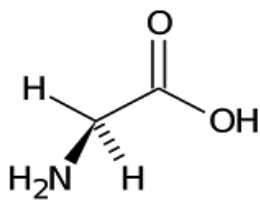
La ficina es una cisteína-proteinasa muy sensible a la inactivación por metales (hierro, cobre, aluminio) y agentes oxidantes (Englund *et al.*, 1968). Dicha enzima requiere ser activada por una variedad de agentes reductores para exhibir una actividad proteolítica máxima. Al parecer, el látex crudo contiene suficiente activador natural para permitir la actividad proteolítica.

Se ha reportado que la ficina tiene varias isoformas proteolíticas las cuales difieren notablemente en sus propiedades cromatográficas (Williams *et al.*, 1968; Kramer y Whitaker, 1969), llegando a considerarse diez confórmers que constan de una sola cadena polipeptídica de 25000 a 26000 Da de peso molecular (Jones y Glazer, 1970), entre las diferentes especies de *Ficus* cuyo látex tiene actividad proteolítica (Gaughran, 1976). Un estudio llevado a cabo sobre una de las variedades más promisorias, *Ficus carica* variedad *Kadota*, permite cristalizar dos de los componentes más importantes (Ficinas C y D), comprobándose que todas las fracciones activas son muy básicas ($pI > 9,6$) y que frente a caseína el pH de máxima actividad se sitúa en la zona neutra (pH 6,7-7) (Kramer y Whitaker, 1964). Sin embargo, la solubilidad de estos componentes es esencialmente idéntica ya que no pueden separarse por las técnicas de fraccionamiento salino (Sgarbieri *et al.*, 1964). La presencia de más de un componente proteolítico enzimático en la ficina es indicada por los estudios sobre la especificidad de sustrato y estabilidad

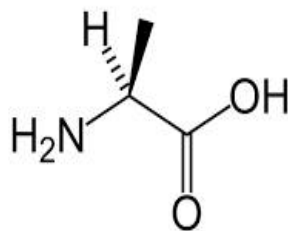
en calor, curva de actividad en el pH, y por los procedimientos de separación (Williams y Whitaker, 1969).

A nivel de la especie, las ficinas son producto de la expresión de diferentes genes. Existe la posibilidad de que la biosíntesis de la ficina esté bajo el control de un solo gen en cada planta, que este gen es diferente para cada especie y variedad, y que las múltiples formas moleculares dentro de cada ficina son determinadas por el plegado de la cadena peptídica (confórmero) (Williams y Whitaker, 1969).

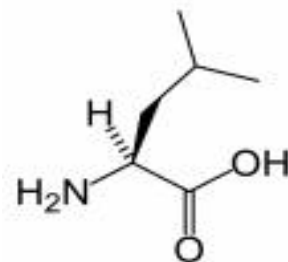
En 1974 un estudio realizado por Kort *et al.* determinó la especificidad de ficina (Ficinas II y III) y de bromelina sobre el tipo de unión peptídica en dipéptidos, tripéptidos y polipéptidos, comprobando que ambas enzimas muestran un comportamiento comparable, ya que hidrolizan preferentemente uniones en las que participan los aminoácidos glicina (**19**), alanina (**20**) y leucina (**21**) y, en menor proporción, aquellas uniones en las que intervienen valina (**22**), fenilalanina (**23**) y tirosina (**24**).



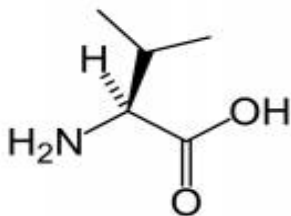
Glicina(**19**)



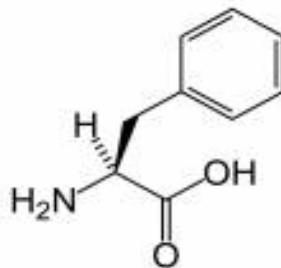
Alanina(**20**)



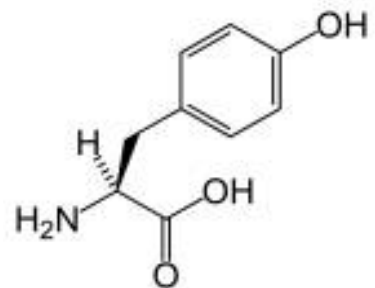
Leucina(**21**)



Valina(**22**)



Fenilalanina(**23**)



Tirosina(**24**)

Al igual que en las proteasas serínicas, la catálisis ocurre a través de la formación de un intermediario covalente e involucra un residuo cisteína y un residuo histidina. La Cisteína 25 y la Histidina 159 (de acuerdo a la numeración de papaína) juegan el mismo rol de la Serina 195 y de la Histidina 57, respectivamente. El nucleófilo en este caso no es un grupo $-OH$, sino un ion tiolato que es estabilizado a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la Histidina 159. Siendo el nucleófilo atacante el par iónico tiolato-imidazol en ambas etapas, no se requiere una molécula de agua. La cisteína catalítica está involucrada en un equilibrio tautomérico entre las formas neutras y dipolar (zwitterion). Se cree que el sulfuro aniónico está involucrado directamente en un ataque nucleofílico en el carboxilo del sustrato. La ruptura del mismo implica el ataque del agua catalizado por la enzima.

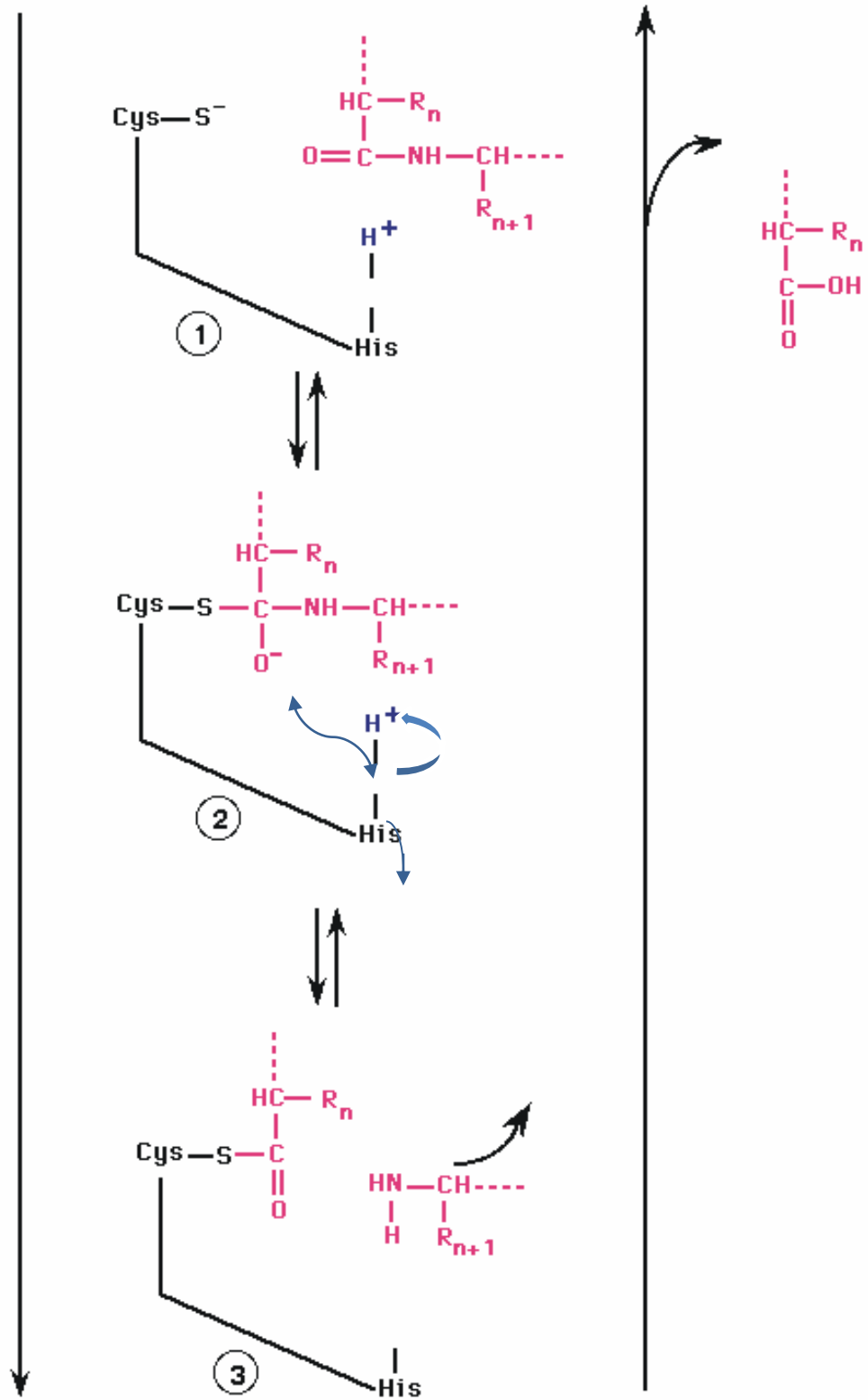


Figura 30. Mecanismo catalítico de las proteinasas cisteínicas.
 Fuente: <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html>.

3.2.6 Antecedentes etnofarmacológicos

El látex del *Ficus* se destaca por la amplitud de su empleo médico a través de milenios. Los usos tradicionales de los pueblos indígenas en todo el mundo incluyen tratamientos externos para las verrugas (Bohlooli *et. Al.*, 2007), erupciones y dermatitis, así como aplicaciones externas para el dolor reumático y oftalmia (Lansky *et. al.* 2008).

El látex blanquecino que produce la corteza del Ojé tiene múltiples propiedades: se le utiliza como purgante, antirreumático, hematopoyético, depurativo de la sangre y para el dolor de muelas, picadura de hormiga, mordedura de serpiente y contra la leishmaniasis (Vega, 2001). Las hojas de esta especie se utilizan como antieméticas, antipiréticas, febrífugas y antianémicas. (www.medicinatradicionalmexicana.com)

El látex de *Ficus spp.* es también usado como antiinflamatorio en forma de parche o crema, actúa inhibiendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias y produciendo una mayor cantidad de citoquinas anti-inflamatorias (Lansky *et al.* 2008), también existen estudios acerca de su participación como factor pro apoptótico e inhibidor de la proliferación celular en el cáncer (Wang *et al.* 2008), tiene propiedades que actúan contra la hipertensión, tiene componentes que actúan como antioxidantes, entre otras propiedades. (Joshep, 2011)

El hallazgo de causalidad entre el efecto antihelmíntico observado y la presencia de actividad proteolítica en el látex de *Ficus laurffolla*, descrito en 1930 por Robbins, sugirió extender el estudio sobre los posibles efectos proteolíticos (hidrólisis de la gelatina) y antihelmínticos (digestión de *Ascaris* provenientes de intestino de cerdo) (Robbins, 1934) a otras quince especies de *Ficus* y a especies de otros géneros de *Moraceae* como *Artocarpus forest*, con resultados poco alentadores, por lo que son las especies de *Ficus* especialmente *Ficus carica* y *Ficus glabrata* aquellas con mayor actividad proteolítica y antihelmíntica, además de ser la principal fuente de ficina. (López *et al.*, 1994)

Ficina constituye un buen ejemplo de productos naturales cuyo estudio fue promovido por el conocimiento previo de su empleo en medicina popular. En este caso la primera referencia etnofarmacológica existente es el uso que hacían algunos nativos de América Central y Sudamérica del látex que obtenían de la higuera (*Ficus máxima*) en el tratamiento de ciertas parasitosis intestinales, principalmente helmintiasis (Caldwell, 1929; Phillips, 1990).

Proteasas cisteínicas de látex de frutos tales como papaína y ficina son conocidas por digerir la cutícula de los nematodos y cumplen en los organismos parásitos roles indispensables en el crecimiento, diferenciación celular, señalización e invasión al huésped (Sajid & McKerrow, 2002), además de presentar baja toxicidad, por lo que se utilizan desde hace tiempo en el tratamiento gastrointestinal de infecciones por nematodos tanto en animales como en el hombre (Stepek et al., 2004).

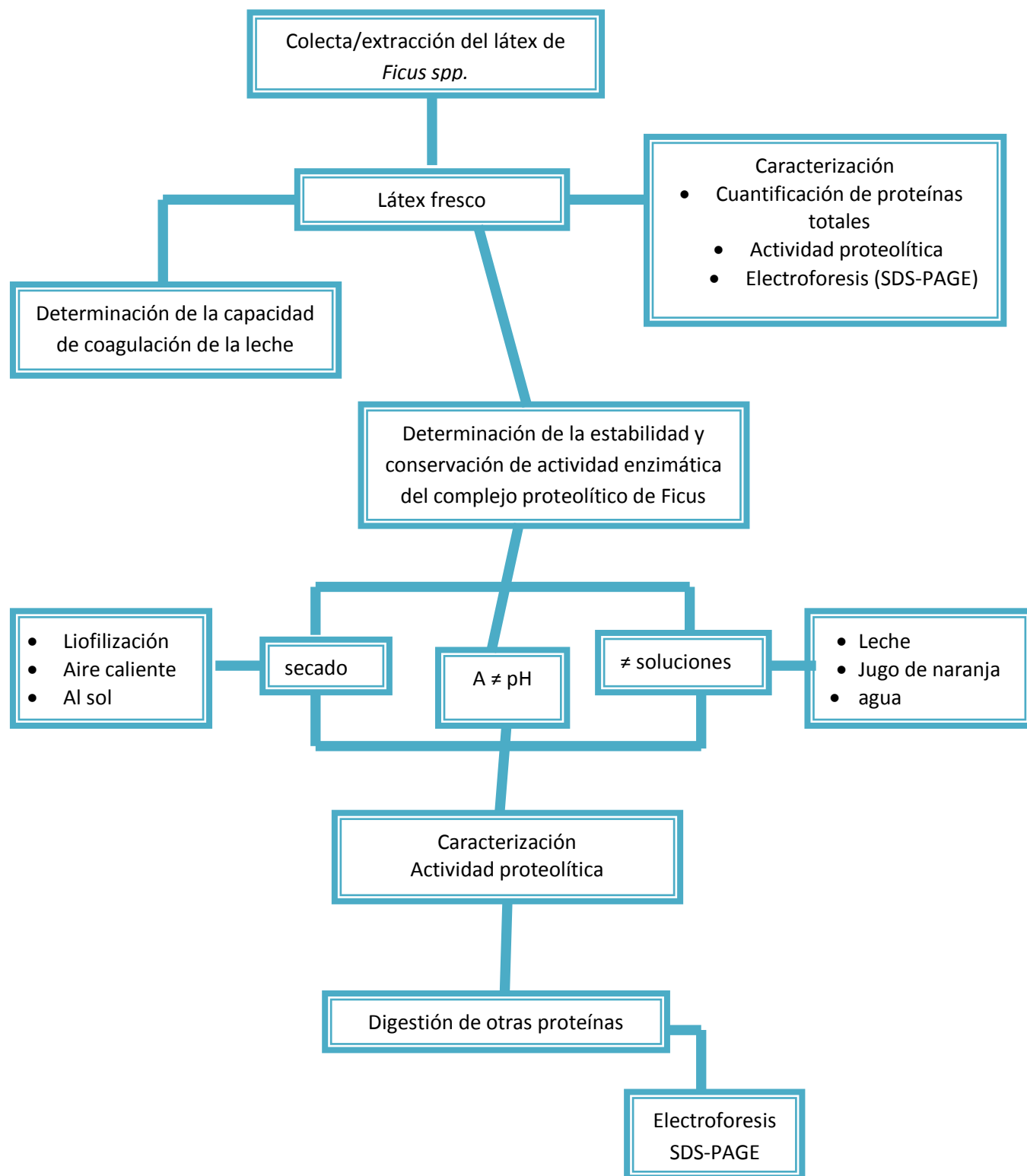
Algunos estudios recientes, demostraron que los extractos: metanólico, acuoso, clorofórmico y en éter de petróleo de *Ficus benghalensis* y *Ficus obtusifolia*; provocan tanto la parálisis (acción vermífuga) y la muerte de estos (acción vermífuga) en gusanos de tierra y nematodos como *Toxocara cati* y *Toxocara canis*, respectivamente. (Aswar et al., 2008; Quezada et al., 2009)

La ficina se emplea en la elaboración de productos farmacéuticos por sus propiedades antihelmínticas mediante las cuales combate todo tipo de parásitos intestinales; actúa principalmente como purgante por ingestión.

3.3 OBJETIVOS

- Comparar la composición proteínica y la actividad enzimática de los diferentes látex de *Ficus spp.*
- Implementar un método sencillo para determinar la actividad proteolítica en el látex del *Ficus spp.*
- Caracterizar la actividad proteolítica de *Ficus spp.* sobre diferentes proteínas.

3.4 METODOLOGIA



3.4.1 Recolección del Material Vegetal

La recolección del látex de Ojé (*Ficus spp.*) se realizó en diferentes épocas y localidades, que se detallan en la **Tabla 43**.

Tabla 43. Detalle de identificación para las muestras de *Ficus spp.*

Código	Fecha de recolección	Estación	Procedencia
PE-09	Noviembre de 2009	Primavera	Departamento de Loreto, Perú.
PE-10	Abril de 2010	Otoño	Departamento de Loreto, Perú.
BV-09	Noviembre de 2009	Primavera	Buena Vista, Prov. Abel Iturralde La Paz, Bolivia.
TG-12	Septiembre de 2012	Primavera	El Tigre, Prov. Abel Iturralde La Paz, Bolivia
OSC-J-10	Junio de 2010	Invierno	Charcas II, Prov. Sud Yungas, La Paz, Bolivia.
OSC-O-10	Octubre de 2010	Primavera	Charcas II, Prov. Sud Yungas, La Paz, Bolivia.
HER-11	Noviembre de 2011	Verano	Hernández, Prov. Sud Yungas, La Paz, Bolivia.
OLV-11	Diciembre de 2011	Primavera	Los Olivos, Prov. Sud Yungas, La Paz, Bolivia.

Para la recolección de muestras de látex se procede a realizar cortes diagonales forma de “v” en el tronco de los árboles, tal como se muestran en la **Figura 31**.



Figura 31. Incisión realizada sobre el árbol del Ojé (*Ficus spp.*).

Las gotas de látex fueron recolectadas en recipientes de polietileno, una vez en el laboratorio, el látex fue almacenado en un equipo refrigerador *Whirlpool*[®], a 4°C hasta que fueran realizados los análisis pertinentes.

3.4.2 *Procesamiento del látex*

Una parte del látex fue depositado en tubos Falcon, para separar la goma de la fase acuosa por centrifugación a 10000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C en un equipo de centrífuga refrigerada multitoro modelo *2-16PK*, de marca *Sigma*[®]. Una vez obtenidas las fases, fueron alicuotadas, se congelaron y se almacenaron a -20°C hasta ser empleadas en las pruebas.

3.4.3 *Caracterización del látex*

3.4.4 *Cuantificación de la concentración total de proteínas*

Se determinó el contenido de proteínas totales en la fase acuosa de las muestras con el método colorimétrico de Biuret. Este método se basa en tratar una proteína o péptido con Cu^{2+} en medio alcalino, produciéndose una coloración violácea por formación de un complejo de coordinación entre el Cu^{2+} y los pares electrónicos libres de los nitrógenos de los grupos imino de la unión peptídica.

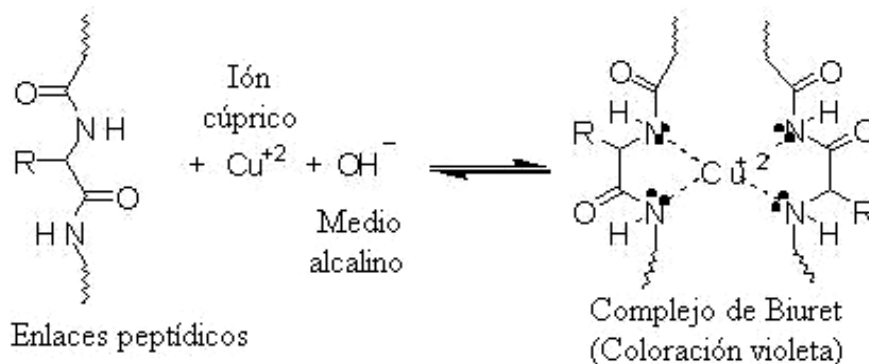


Figura 32. Mecanismo de reacción de Biuret

En todos los casos se mezclaron: 20 μL de la solución de proteína (fase acuosa del látex) y 200 μL del reactivo de Biuret (1,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6 g de tartrato de sodio-potasio en 500 mL de $\text{H}_2\text{O}(\text{d})$); añadir 300 mL de NaOH 2,5 N; agregar 1 g de KI y $\text{H}_2\text{O}(\text{d})$ c.s.p.1000 mL) la mezcla fue equilibrada a temperatura ambiente por 20 minutos, y se determinó su absorbancia a 540nm en un lector un ELISA *Epoch*, modelo ELx800, *Biotek*[®], con el programa de análisis *Gen 5*, contra los blancos apropiados.

La curva de calibración se realizó con albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) manejando un rango de concentración de proteínas entre 0,5 – 10 mg/mL. Como proteínas de referencia también se utilizó a las proteasas comerciales Ficina (Sigma), Papaína (Sigma).

3.4.5 *Determinación de la actividad proteolítica sobre un sustrato cromogénico hidrosoluble: Azocaseína*

Para esta prueba se empleó como sustrato a la azocaseína (Sigma) que consta de caseína conjugada con un azo-tinte. La digestión de una solución de tales azoproteínas con enzimas proteolíticas resulta en la formación de los componentes de color que son solubles en ácido tricloroacético en el sobrenadante, los cuales después de su neutralización, se pueden analizar cuantitativamente, determinando la absorbancia de estos.

El método es una modificación del ensayo descrito por Christen y Marshall (Bendicho et al., 2002). Se agregaron 500 μl de la solución de azocaseína (solución al 1% en tampón fosfato a pH 7.2 (0,78g de Na_2HPO_4 y 1,05g de NaH_2PO_4 y $\text{H}_2\text{O}(\text{d})$ c.s.p.1000 mL) a 50 μl de la muestra que contiene la enzima proteolítica (látex y fase acuosa). Se mezcló y se incubó a 37°C durante 15 minutos. La reacción se detuvo agregando 500 μl de ácido tricloro acético (ATA al 5%). Los tubos fueron equilibrados a 4°C por 30 minutos, y centrifugados a 8000 r.p.m. por 20 minutos a la misma temperatura. Finalmente, se dispusieron 200 μL de cada sobrenadante y se determinó su absorbancia a 415 nm en un lector un

ELISA *Epoch* ELx800, *Biotek*[®], con el programa de análisis *Gen5*, contra los blancos apropiados (tampón fosfato y azocaseína con ATA 5% sin enzima).

La actividad de la enzima se expresa en UI/mL después de verificar la correlación lineal que existe entre los valores dados para el producto de la actividad proteolítica de la Ficina (Sigma) y Papaína (Sigma) estándar preparada a diferentes diluciones de dicha enzima, con la absorbancia del sobrenadante en cada dilución.

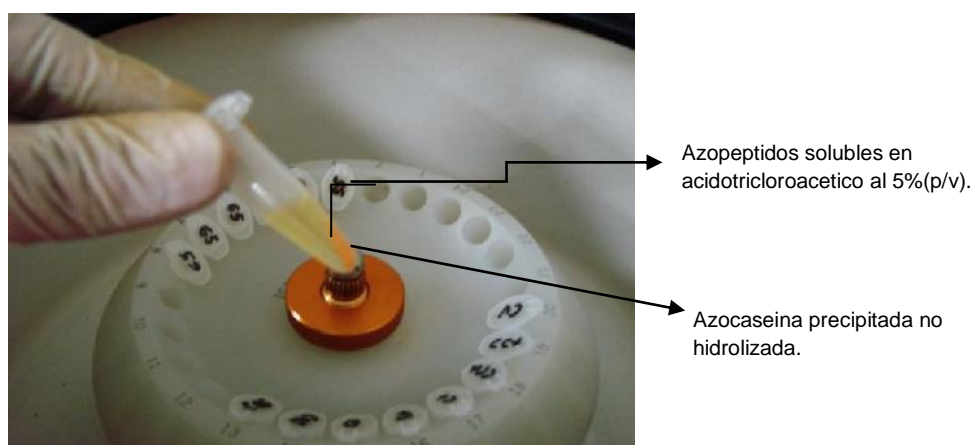


Figura 33. Determinación de actividad proteolítica sobre azocaseína soluble. Presencia de azopeptidos solubles en acido susceptibles de cuantificación y la presencia de azocaseína precipitada no hidrolizada.

3.4.6 Actividad coagulante sobre leche en polvo (Balls y Hoover, 1937)

Para el ensayo de la actividad de coagulación sobre la leche, se empleó como sustrato una solución al 10% de leche en polvo (PIL) con un contenido bajo en lípidos.

En este ensayo, se agregó 1 mL del látex a 10 ml de la solución sustrato y se determinó el tiempo en segundos que le tomaba a la enzima coagular la leche.

3.4.7 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica es la clásica electroforesis discontinua, desnaturalizante y reductora de Laemmli (1970), conocida como SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Se usaron geles de poliacrilamida al 12 % m/v.

3.4.7.1 Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III, Bio-Rad. La composición de los sistemas buffer y de los geles se indica a continuación.

BUFFER DE APILAMIENTO 0.5M	
Tris	36,3 g
HCl 1N, c.s.p.	pH final 6,8
Agua destilada c.s.p.	100 ml

BUFFER DE RESOLUCIÓN 1.5 M	
Tris	36,3 g
HCl 1N, c.s.p.	pH final 8,8
Agua destilada c.s.p.	100 ml

GEL DE APILAMIENTO (5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
Buffer de stacking	0,87 ml
SDS 10%	70 µl
Agua destilada	4,79 ml
PSA 5%	105 µl
TEMED	5 µl
Volumen final	7 ml

GEL DE RESOLUCIÓN (12,5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	4,15 ml
Buffer de resolución	1,25 ml
SDS 10%	100 µl
Agua destilada	4,39 ml
Persulfato de amonio (PSA) 5%	105 µl
TEMED	5 µl
Volumen final	10 ml

Se colocaron 5 ml de la mezcla del gel de resolución en cada placa y se dejaron polimerizar. Sobre la mezcla del gel de resolución se colocó agua destilada para alinear la interfase en contacto con el aire y facilitar la visualización de la polimerización. Luego de la polimerización se retiró el agua, se lavó la superficie y se eliminó el exceso de agua con papel de filtro. A continuación se colocó la mezcla del gel de apilamiento y de inmediato los peines formadores de pozos.

3.4.7.2 *Preparación de las muestras*

Las muestras de látex se redisolviéron en 20 μ L de buffer de muestra.

BUFFER DE MUESTRA	
Tris	1,57 g
SDS	2 g
Mercaptoetanol	5 mL
Glicerol	8 mL
Azul de bromofenol	2 mg
Llevar a pH 6,8 con HCl 1 N	
Agua destilada c.s.p.	1000mL

3.4.7.3 *Aplicación de las muestras y condiciones de corrida*

Los volúmenes de siembra fueron de 20 μ l por pozo. El patrón de Peso Molecular (Sigma) utilizado contenía como marcadores: Atropina, (6,500 Da), α -Lacto albumina (14,200 Da) Inhibidor de Tripsina (20,000 Da), Tripsinogeno, (24,000 Da), anhidrasa carbónica, (29,000 Da), Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (36,000 Da), Ovoalbúmina (45,000 Da), Albumina sérica (66,000 Da). Los reservorios anódico y catódico, se llenaron con buffer de electroforesis.

BUFFER DE ELECTROFORESIS 1x	
Tris	3 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
AD, c.s.p.	1000 ml

La electroforesis se desarrolló empleando una intensidad constante de 80V durante el apilado y de 100V hasta la finalización de la corrida (llegada del colorante al borde inferior del gel). Dichas condiciones se obtuvieron tras una estandarización del método.

3.4.8 Determinación de la estabilidad y conservación de actividad enzimática del complejo proteolítico de *Ficus spp.*

3.4.8.1 Frente a la variación de pH

Para esta determinación se siguió la metodología de la actividad enzimática, sólo que en este caso se varió el pH en el cual estaba disuelta la azocaseína al 1%. Se utilizó buffer fosfato 50mM en un rango desde 3,2 hasta 8,2 y HCl (0.1N). (Pandey *et al.*, 2003). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.4.8.2 Conservación de actividad proteolítica en diferentes soluciones

Para evaluar la conservación de actividad proteolítica del complejo proteolítico de *Ficus spp.* Este fue disuelto en diferentes soluciones como:

- Jugo de naranja (pH 3 – 3.5)
- Agua (pH 5 – 5.5)
- Leche (pH 6.5 – 7)

Cada prueba se realizó por triplicado. Posteriormente se determinó la actividad proteolítica sobre azocaseína.

3.4.8.3 Conservación después de secado

Para evaluar la conservación de actividad proteolítica de *Ficus spp.* se sometió el látex a diferentes sistemas de secado. Para ello iguales cantidades (pesos) del látex fueron depositados en placas de Petri y sometidos a los siguientes sistemas de secado:

- Liofilización
- Secado con aire caliente (50°C durante 6 horas)
- Secado solar: exposición de las muestras directamente al sol por 7 horas

Cada sistema se realizó por triplicado. Posteriormente se determinó la actividad proteolítica sobre azocaseína.

3.4.9 Actividad Proteolítica del látex de *Ficus spp.* sobre proteínas de origen vegetal

Se evaluó la actividad proteolítica del complejo proteolítico de *Ficus spp.* y la acción de este sobre proteínas obtenidas de especies vegetales, como es el caso de la Soya (*Glycine max*) se determinó la actividad tras la digestión de dichas proteínas a diferentes temperaturas y diferentes tiempos de incubación.

Temperatura (°C)	Tiempo de incubación (minutos)
20°	10 – 20 - 30
30°	10 – 20 - 30
40°	10 – 20 - 30

El proceso de digestión fue evaluado mediante electroforesis SDS-PAGE.

3.5 RESULTADOS Y DISCUSION

3.5.1 Recolección del Material Vegetal

Las muestras de látex de *Ficus spp.*, colectadas se dividieron en tres grupos, de acuerdo al lugar de procedencia. **Tabla 44**

Tabla 44. Distribución de muestras según el lugar de procedencia

P-IQ	Iquitos	Loreto-Perú
B-SY	Charcas II Hernández Los Olivos	Provincia Sud Yungas La Paz-Bolivia
B-AI	Buena Vista El Tigre	Provincia Abel Iturralde La Paz-Bolivia

3.5.2 Caracterización del látex

3.5.2.1 Cuantificación de la concentración total de proteínas

Se determinó el contenido de proteínas totales en la fase acuosa de las muestras empleando el método de Biuret, previa elaboración de una curva de calibración empleando albúmina sérica bovina (B.S.A.) en diferentes concentraciones (0,5-10 mg/ml). Esta prueba se realizó para poder comparar el contenido de proteínas totales en cada muestra con respecto al lugar de colecta. La ecuación (2) permitió cuantificar las concentraciones de proteínas en las muestras de látex mediante este método.

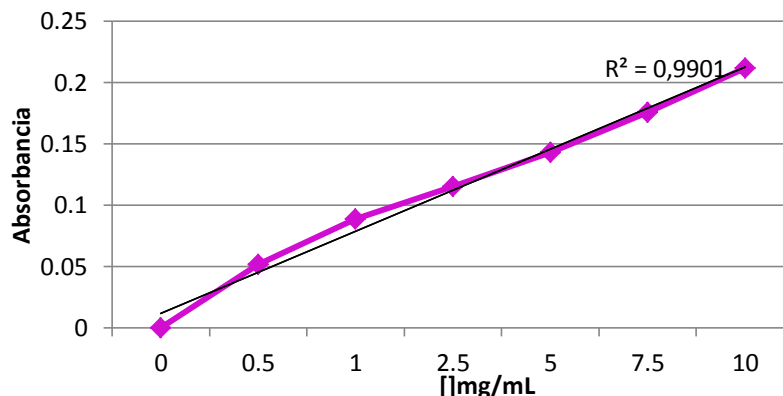
$$y = 0.033x - 0.021$$

Ecuación 2.
$$x = \frac{y - 0.021}{0.033}$$

Tabla 45. Absorbancia para las concentraciones de B.S.A.

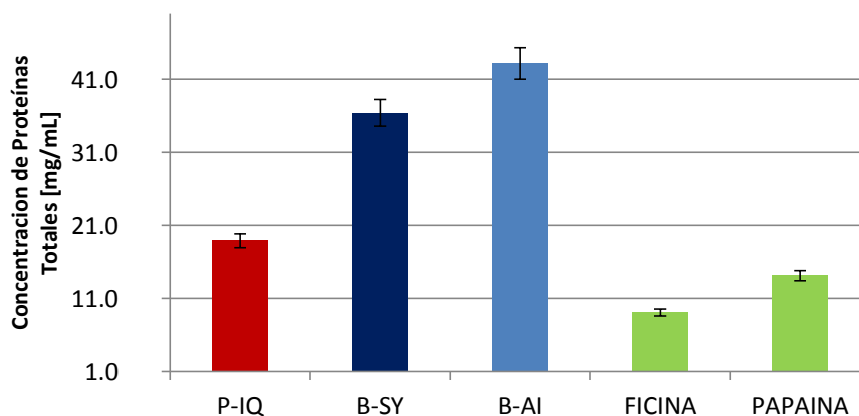
[]mg/mL	Abs X
0	0
0,5	0,052±0,001
1	0,089±0,0005
2,5	0,115±0,004
5	0,143±0,002
7,5	0,176±0,004
10	0,212±0,016

Figura 34. Curva de calibración del Método de Biuret



Se encontraron concentraciones de $9,06 \pm 0,2$ y $14,09 \pm 4,1$ mg/mL en las enzimas de referencia: Ficina y Papaina, respectivamente. Mientras que la concentración de proteínas en las muestras fueron mayores, así mismo es notoria la diferencia en cuanto a la región geográfica de colecta del látex, principalmente las muestras procedentes de Perú (P-IQ) que presentan menor concentración de proteínas totales ($18,91 \pm 1,2$ mg/mL) respecto a las procedentes del norte de La Paz, tanto las de la provincia Sud Yungas y la Provincia Abel Iturralde con $36,39 \pm 3,1$ mg/mL y $43,15 \pm 1$ mg/mL respectivamente, lo cual podría deberse a la presencia de otras proteínas y péptidos pequeños con o sin actividad enzimática contenidos en el látex de las muestras. Así mismo podemos decir que las muestras procedentes de Perú poseen mayor cantidad de Ficina puesto que dichos péptidos y proteínas diferentes se encuentran en menor cantidad en estas muestras; contrariamente a las muestras bolivianas (**Figura 35**)

Figura 35. Concentración de proteínas totales en el látex de *Ficus spp.*



3.5.2.2 *Determinación de la actividad proteolítica del complejo proteolítico de Ficus spp.*

La determinación de actividad enzimática fue realizada para evaluar la relación entre concentración de proteínas totales y actividad proteolítica presentes en las muestras de látex; así como las diferencias entre el lugar de colecta. Inicialmente se elaboró una curva de calibración para determinar los valores de la actividad proteolítica mediante el método de la azocaseína, empleando a la Ficina como estándar. El rango de valores utilizado en la curva de calibración va desde 100 UI/ml a 200 U/ml (**Figura 36**). La ecuación (**3**) permitió determinar la actividad de las muestras de látex mediante este método.

$$y = 0,0779x + 0,0053$$

Ecuación 3.
$$x = \frac{y - 0,0779}{0,0053}$$

Figura 36. Curva de calibración del Método de la Azocaseína

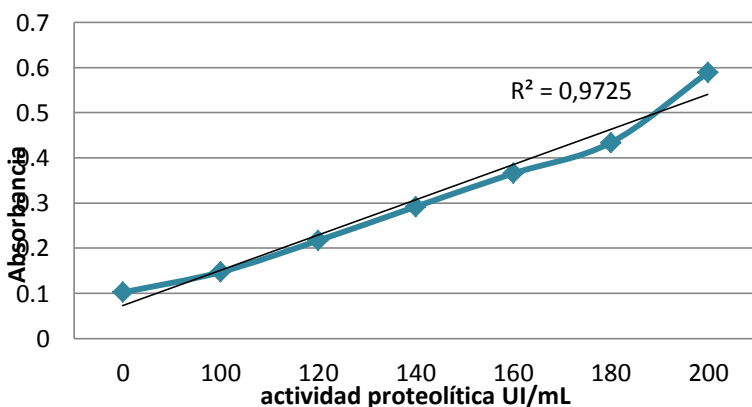


Tabla 46. Absorbancias para la actividad enzimática de Ficina

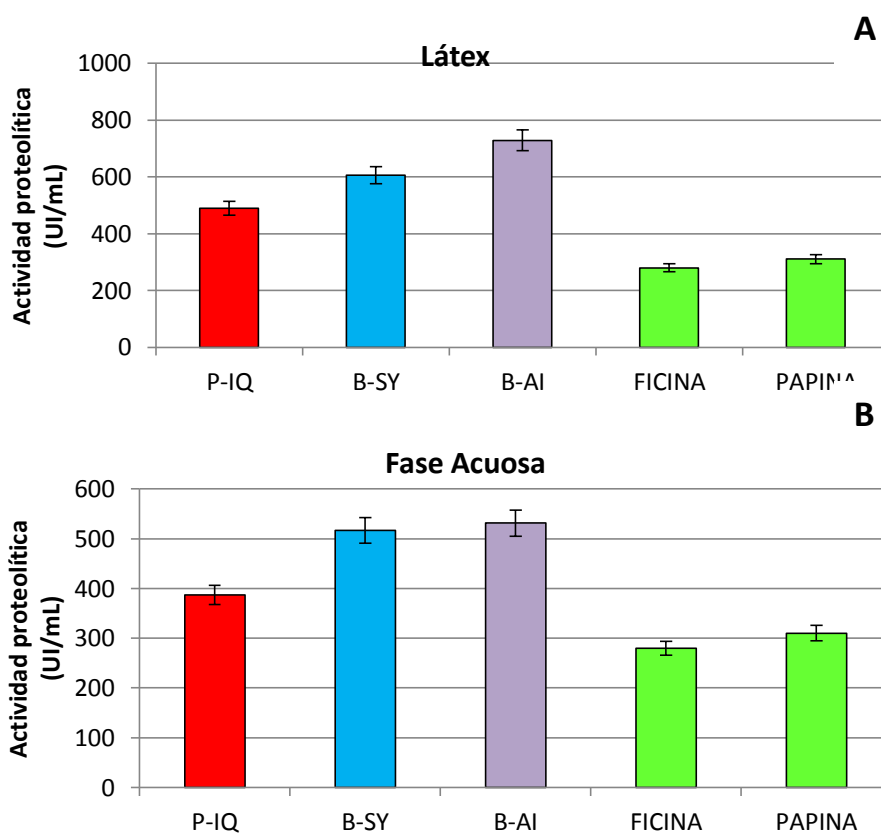
UI/mL	Abs x
0	0,102±0,001
100	0,147±0,001
120	0,217±0,002
140	0,292±0,001
160	0,365±0,001
180	0,433±0,002
200	0,589±0,002

Se observó que las muestras presentan mayor actividad proteolítica que las enzimas comerciales de referencia (Ficina y Papaina). **Figura 37**. En esta prueba se trabajó tanto con el látex entero, como la fase acuosa del mismo, obtenida por

centrifugación; esto para evaluar alguna diferencia en cuanto a la actividad proteolítica antes y después de la separación de la goma.

Ambos presentaron valores altos de actividad, sin embargo los valores máximos de actividad en UI/mL se observaron en el látex entero (superiores a las 600 UI/mL en las muestras bolivianas y superiores a 450 UI/mL en muestras peruanas), lo cual puede deberse a que la separación previa realizada para obtener la fase acuosa, posiblemente, arrastra consigo algunas proteínas o componentes que hacen que la actividad proteolítica disminuya ligeramente.

Figura 37. Actividad proteolítica del látex (A) y la fase acuosa (B) de *Ficus spp.*



Al analizar la actividad proteolítica con relación al lugar de procedencia, es posible observar que las muestras colectadas en Perú (en rojo) presentaron actividad proteolítica menor (~490 UI/mL); a la presentada por las muestras colectadas en Bolivia de las cuales las colectadas en Sud Yungas (en celeste)

poseen menor actividad proteolítica (~600 UI/mL) a las colectadas en la provincia Abel Iturralde (~750 UI/mL) (en lila); al igual a lo observado en la cuantificación de proteínas totales, pudiendo concluir en que existe una relación directa en cuanto a la cantidad de proteína contenida en el látex y a la actividad específica del mismo; como reportan Kramer y Whitaker (1969) al revisar los resultados obtenidos con las variedades *Kadota* y *Black Misión* de *Ficus carica*. La actividad proteolítica se ve influenciada también por distintos factores como las condiciones ecológicas, la edad del árbol, la hora de recolección del látex, incluso el número de incisiones que se realicen sobre el árbol.

También se pudo observar que la actividad proteolítica de la Ficina y las muestras peruanas son muy similares, esto debido a que; como se mencionó anteriormente, estas muestras no poseen grandes cantidades de proteínas y péptidos diferentes a la Ficina, contrariamente a las muestras bolivianas.

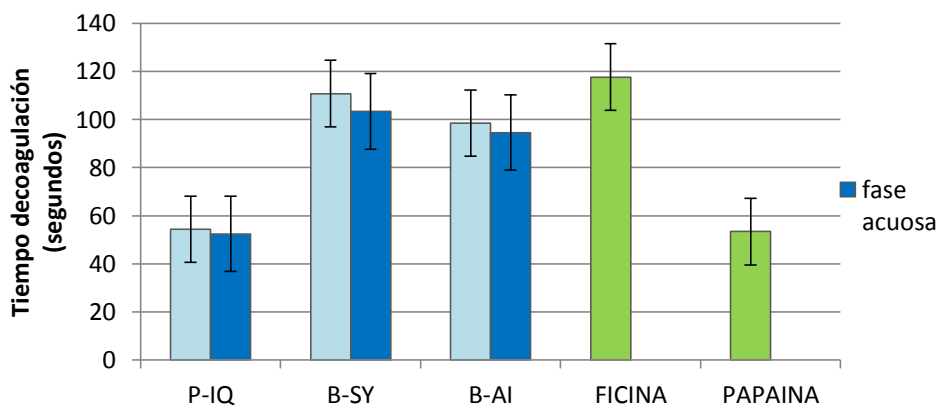
3.5.2.3 *Actividad coagulante sobre leche en polvo (Balls y Hoover)*

La rapidez, la simplicidad y la probable conexión entre el tiempo de coagulación y las propiedades proteolíticas de *Ficus spp.*, hacen de este método, una valiosa ayuda en la descripción de la actividad de esta mezcla de enzimas y la determinación de la potencia de dichas enzimas, pudiendo utilizarse caseramente para una posible dosificación del látex para su administración como tratamiento antiparasitario.

No existe diferencia significativa entre el látex y la fase acuosa y los tiempos requeridos para la coagulación de la leche. **Figura 38.** La principal diferencia radica en los tiempos de coagulación presentados por las muestras obtenidas en Perú, P-IQ con valores de $54,41 \pm 0,32$ segundos para el látex entero y $52,49 \pm 3,2$ segundos para la fase acuosa; que son muy similares a los presentados por la enzima comercial Papaína $53,46 \pm 0,48$. A diferencia de las muestras obtenidas en el departamento de La Paz, Bolivia que presentan tiempos de coagulación más largos B-SY, $110,78 \pm 28,3$ y B-AI, $98,52 \pm 27,19$ segundos, para el látex entero y

103,33±24,9 y 94,58±0,57 segundos, para la fase acuosa, respectivamente.

Figura 38. Actividad proteolítica del complejo proteolítico del látex de *Ficus spp.* sobre leche en polvo (Método de Balls y Hoover)



Respecto al tiempo requerido para la coagulación sea mayor o menor, este puede verse influido por la presencia de otras enzimas con actividad proteolítica, isoformas de la Ficina y/o compuestos activadores presentes en el látex.

La desventaja del método es que no se determina muy bien el punto de coagulación (a largos tiempos) por lo que se deben realizar muchas repeticiones con gran variabilidad. Se llegó a concluir que aquellas muestras con mayor actividad proteolítica no necesariamente coagulan la leche en un menor tiempo, por lo que es necesario buscar otro método que ayude a determinar que tan potente y cuánto de látex podría consumirse para usarse como desparasitante.

3.5.3 Caracterización electroforética del látex de *Ficus spp.*

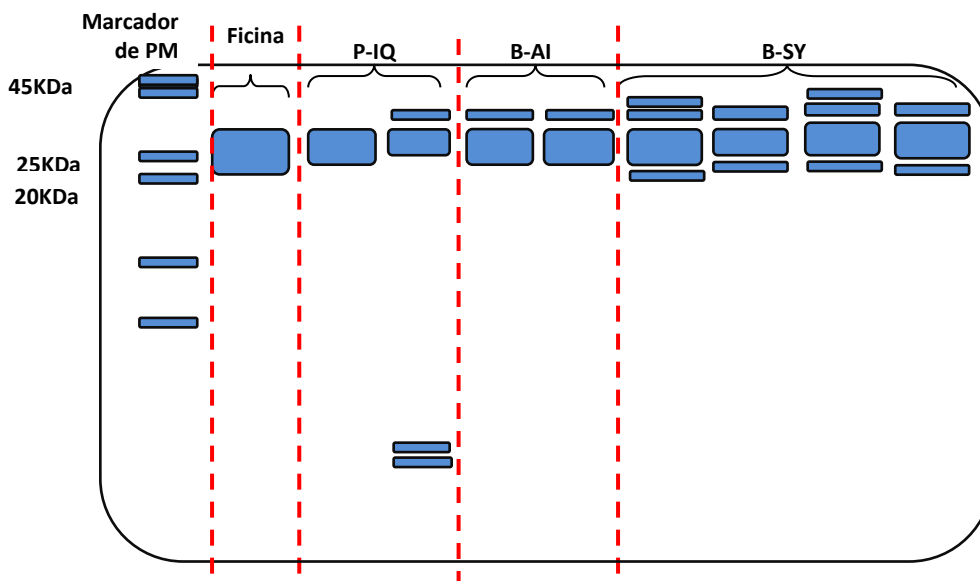
En la caracterización proteínica de *Ficus spp.* se trabajó con muestras de látex ya que no se obtuvieron corridas electroforéticas claras de la fase acuosa. Primeramente se realizó una estandarización de las condiciones de corrida; se probaron diferentes concentraciones de gel de poliacrilamida (entre 10 y 12.5%), intensidades de voltaje (entre 60 y 180 V), el voltaje se aplicó de manera constante en toda la corrida y de manera discontinua con menor voltaje y tiempo durante la corrida en el gel de apilamiento y mayor voltaje y tiempo en el gel de

resolución. Tras la estandarización la electroforesis se desarrolló empleando una intensidad constante de 80V durante el apilado y de 100V hasta la finalización de la corrida.

Se observó la separación de una amplia variedad de componentes proteínicos, de diferente masa molecular, componentes de baja, media y alta movilidad electroforética; una banda mayoritaria con similar movilidad electroforética a la del patrón (**Figura 39**), cercana a los 25 KDa, en las muestras estudiadas, confirmando la presencia de Ficina en dichas muestras de látex.

Es pertinente resaltar las diferencias observadas según el lugar de colecta, ya que se observaron 2 bandas en las muestras de Iquitos de muy bajo peso molecular; una banda proteínica en las muestras de la provincia Abel Iturralde, de aproximadamente 30 KDa y entre 2 y 3 bandas en las muestras de Sud Yungas cercanas a los 30 y 20 KDa (**Figura 39**). Comparativamente en este estudio, el número de componentes y su actividad proteolítica, pueden ser el resultado de las diferencias de las condiciones ecológicas en que se desarrolló el árbol: altitud sobre el nivel del mar, condiciones climáticas, etc. (fotografías en **Anexo 4**)

Figura 39. Diagrama de la electroforesis SDS-PAGE. (1) Patrón de masa molar, (2) 20 µg de ficina patrón, (3 y 4) látex de Perú (P-IQ); (5 y 6) muestras látex Provincia Abel Iturralde (B-AI); (7, 8, 9 y 10) látex provincia Sud Yungas (B-SY).



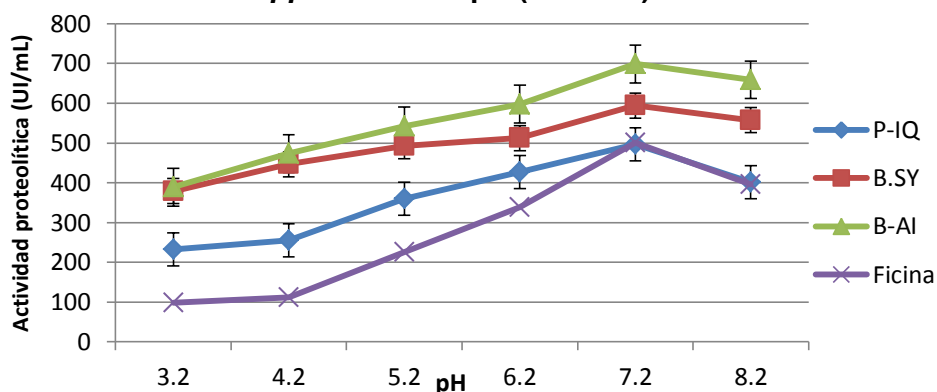
3.5.4 Determinación de la estabilidad y conservación de la actividad enzimática del complejo proteolítico de *Ficus spp.*

3.5.4.1 Frente a la variación de pH

Esta prueba se realizó a fin de determinar cuan estable puede llegar a ser el complejo proteolítico presente en el látex de *Ficus spp.* en un amplio rango de pH (de 3.2 hasta 8.2) y compararlo con la enzima comercial purificada.

Se determinó la actividad proteolítica en cada punto de pH, la **Figura 40** muestra una actividad enzimática alta tanto a pH bajo y alto por lo que el complejo proteolítico de *Ficus spp.* es bastante estable y difícilmente afectado por las variaciones de pH.

Figura 40. Actividad proteolítica del complejo proteolítico de *Ficus spp.* a diferente pH (3.2 a 8.2)



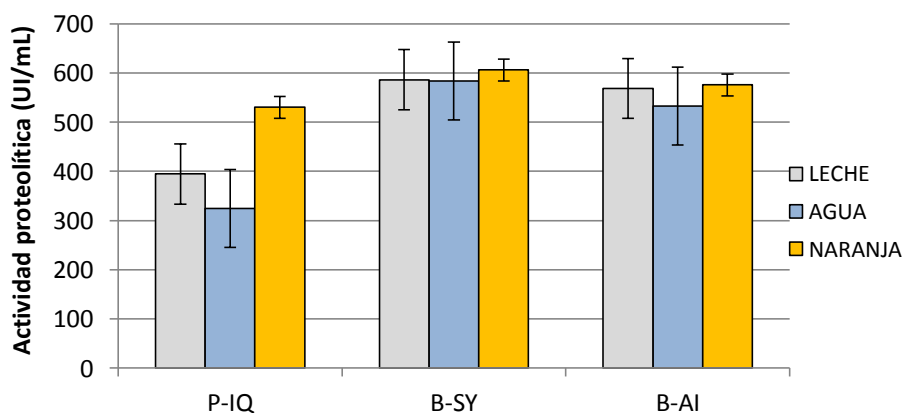
También se observó que el pH de máxima actividad para el complejo proteolítico de *Ficus spp.* se sitúa en la zona neutra de 7 a 8, lo que indica que puede ser clasificada como una proteasa neutra o alcalina. Lo cual concuerda con lo descrito por Messing y van Ness (1961) que encontraron fracciones activas con pH óptimo entre 8,0 a 9,5; también es compatible con los valores obtenidos previamente por Cohen sobre caseína (pH 6,5-9,5) y con los obtenidos por Kramer y Whitaker en 1969 (pH 6.7-7.5). En el caso de la enzima comercial purificada se puede observar que presenta menor actividad proteolítica a un pH ácido y que a mayor pH los valores de actividad son muy similares a las muestras peruanas.

3.5.4.2 Conservación de actividad proteolítica en diferente soluciones

Complementariamente a los resultados obtenidos anteriormente, se decidió probar la conservación de la actividad proteolítica del látex de *Ficus spp.*, en diferentes soluciones como: leche (pH 6.5-7.0), agua (5.0-5.5) y jugo de naranja (3.0-3.5), ya que se quiere emplear dicho producto vegetal de acuerdo a su uso tradicional como agente desparasitante por vía oral.

La disminución de la actividad proteolítica respecto a la del látex sin diluir, es mínima. En cuanto a las soluciones estudiadas, no se encontraron diferencias significativas en los valores de actividad proteolítica cuando el látex es diluido en estas, sin embargo los valores disminuyen ligeramente cuando es disuelto en leche, esto debido a la acción del complejo proteolítico sobre la caseína de la leche; seguido, en orden creciente, del agua y jugo de naranja, esto puede deberse en el caso del jugo de naranja; al efecto inhibitorio que tiene el ácido ascórbico sobre ciertas cisteín-proteasas (Skelton, 1968) (**Figura 41**); a pesar de dicha pérdida, la actividad aún mantiene valores altos; este panorama se observa para todas las muestras, confirmando la estabilidad del complejo proteolítico de *Ficus spp.* ante las variaciones de pH; una propiedad útil de este tipo de cisteín-proteasas es la resistencia a la digestión por ácido, por lo que si se administrara por vía oral, podría elegirse cualquiera de estas soluciones.

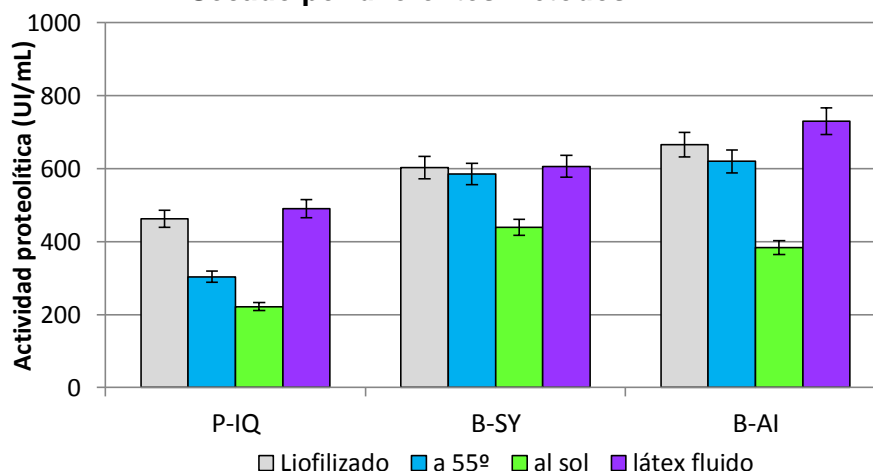
Figura 41. Actividad proteolítica del complejo proteolítico de *Ficus spp.* en diferentes soluciones (a) leche; (b) jugo de naranja y (c) agua.



3.5.4.3 Conservación de actividad proteolítica después de secado

La conservación de la actividad proteolítica del látex, depende del método de secado. Como se ve en la **Figura 42**, las muestras liofilizadas presentan mayor actividad proteolítica, seguidas de las muestras secadas con aire caliente y por último las secadas por exposición directa al sol. Sin embargo, a pesar de la pérdida de actividad proteolítica, las muestras, aún poseen alta actividad enzimática.

Figura 42. Actividad proteolítica del complejo proteolítico de *Ficus spp.* Secado por diferentes métodos.



Los resultados se explican ya que el proceso de liofilización se lleva a cabo a bajas temperaturas, en ausencia de aire y una rápida transición del látex hidratado a deshidratado. El secado por aire caliente, rinde un producto con buena conservación de actividad, ya que la exposición al calor es constante y en una atmosfera cerrada. Cuando se seca por exposición directa al sol la actividad disminuye, ya que al ser la Ficina un compuesto fácilmente alterable, agentes tales como el oxígeno, luz solar y temperatura alteran las propiedades de la enzima (Eliécer, 2003) resultando en una disminución de actividad. Mientras que el látex fluido conserva mucho mejor su actividad proteolítica. Esta observación es muy útil, por cuanto el almacenamiento del látex para su posterior utilización no representa mayor dificultad, ya que llegaría a mantener su actividad por varios meses; aún más cuando el látex se almacena en condiciones de refrigeración.

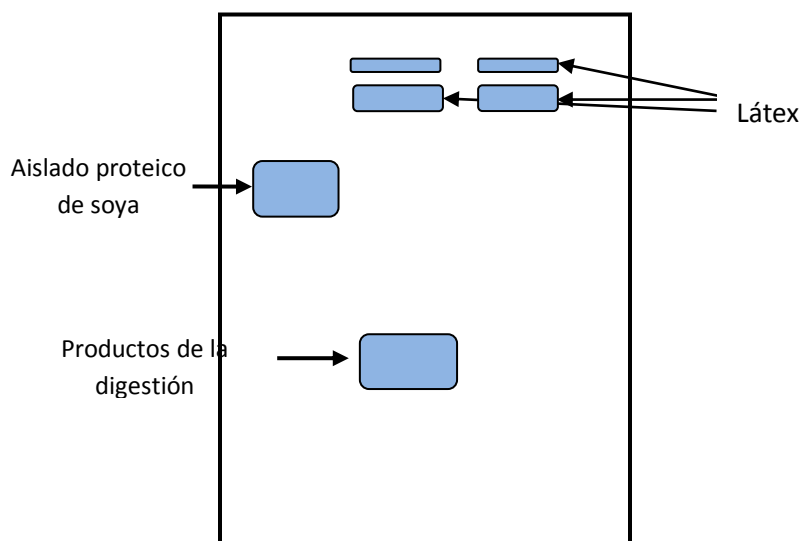
3.5.5 Actividad Proteolítica de *Ficus spp.* sobre proteínas de origen vegetal

Se evaluó la actividad proteolítica, sometiendo a digestión una serie de concentrados proteicos provenientes de granos de Soya (*Glycine max*), la obtención de los concentrados se realizó por los métodos de solubilización alcalina y extracción acuosa (descritos en el **Anexo 5**). Se utilizaron las obtenidas por extracción acuosa, ya que en la corrida electroforética no se observaron bandas de las proteínas extraídas por solubilización alcalina.

La digestión se llevó a cabo probando diferentes tiempos y temperaturas de incubación y frente a los respectivos controles, de esta manera se pudo comprobar la capacidad hidrolizante del látex de *Ficus spp.*

La digestión se comprobó mediante la separación de proteínas por SDS-PAGE, se observaron bandas con mayor claridad a los 10 minutos de incubación y a una temperatura de 30 °C, **Figura 43**, ya que a otros tiempos y temperaturas de incubación sólo se observaron manchas características de una oxidación por parte de las proteínas. (fotografía en **Anexo 6**)

Figura 43. Gráfico de la electroforesis SDS-PAGE. Digestión de proteínas vegetales. (7) Concentrado proteico de Soya, (8) aislado proteico digerido por látex de *Ficus spp.*, (9) muestra de látex HER-11.



3.6 CONCLUSIONES

- Se realizó la cuantificación de proteínas en la fase acuosa, de las muestras colectadas, se compararon las concentraciones de proteínas entre las muestras procedentes del Perú y las de Bolivia, encontrando una mayor cantidad de proteínas en las muestras bolivianas con 36.39 mg/mL para las muestras de la provincia Sud Yungas (B-SY) y 43.15 mg/mL para las de la provincia Abel Iturralde (B-AI). Así mismo se comparó la concentración de proteínas respecto a la enzima comercial Ficina (14.09 mg/mL), encontrando mayor concentración de proteínas en las muestras por la presencia de otras proteínas y/o péptidos.
- Se evaluó la actividad enzimática del complejo proteolítico de *Ficus spp.* comparando la actividad proteolítica con la de la enzima comercial Ficina, la cual presentó menor actividad (~300 UI/mL). Haciendo una comparación según el lugar de colecta las muestras procedentes de Iquitos, Perú (P-IQ) muestran actividad más baja con ~490 UI/mL; frente a las procedentes del norte de La Paz, de las cuales las recolectadas en la provincia Abel Iturralde presentan una mayor actividad (B-AI ~750 UI/mL) y las colectadas en la provincia Sud Yungas (B-SY) presentan una actividad de ~600 UI/mL. Además se realizó una comparación de la actividad proteolítica contenida en el látex con la contenida en fase acuosa obtenida de este, si bien no existe una diferencia significativa entre ambas, se observa una actividad ligeramente mayor en el látex, y es menor cuando se separa la fase acuosa de los materiales sólidos orgánicos; lo que podría deberse a que en la centrifugación posiblemente se arrastran algunas proteínas o componentes que afectan de alguna manera a la actividad proteolítica, haciendo que esta disminuya.
- Se determinó la actividad proteolítica mediante el método de coagulación de la leche, este método al ser sencillo y rápido podría proporcionar una idea de cuál sería la actividad proteolítica de una muestra de látex recién

colectada y cuanto de este podría consumirse para su uso como desparasitante; sin embargo, son las muestras de Iquitos, Perú las que coagulan la leche en un tiempo menor, al contrario que en la prueba de la azocaseína; lo que llega a dificultar el uso de este método como herramienta útil para la determinación casera de la actividad proteolítica del látex.

- Se caracterizaron las muestras por electroforesis, observándose una banda mayoritaria con similar movilidad a la del patrón comercial, a 25 KDa que evidencia la presencia de Ficina. Además se observan en las muestras varios componentes de baja, media y alta movilidad electroforética, según el lugar de procedencia
- Se determinó la conservación de la actividad proteolítica del látex a diferentes puntos de pH, que este es muy estable a las variaciones de pH. Disolviendo el látex en soluciones de diferente pH (leche, jugo de naranja y agua), los valores encontrados fueron elevados, pudiendo usarse cualquiera de estas soluciones para una posible administración del látex como desparasitante. Secando el látex, encontrando que el método de liofilización conserva un mayor porcentaje de actividad con respecto a los otros métodos estudiados, todas estas propiedades presentan un beneficio al momento de almacenamiento y posterior uso.
- Se caracterizó la actividad proteolítica del látex sobre aislados proteicos de Soya, evidenciando la digestión de proteínas a los 10 minutos de incubación y a una temperatura de 30°C, esto indica que se la acción podría ser mayor mientras mayor sea el tiempo de acción del complejo proteolítico.

3.7 REFERENCIAS

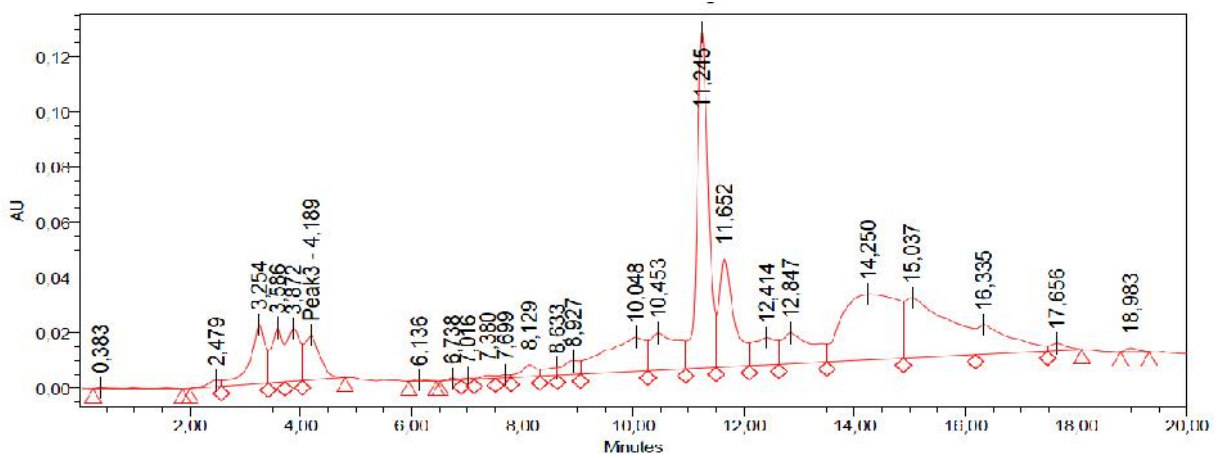
1. Aswar M, Aswar U, Watkar B, Vyas M, Wagh A, Gujar KN. (2008) **Anthelmintic activity of *Ficus benghalensis***. *Int J Green Pharm* 2, 170-1722
2. Azarkan M., Wintjens R., Looze Y. y Baeyens-Volant D. (2004) **Detection of three wound-induced proteins in papaya latex**. *Phytochemistry*. 65, 525-534.
3. Balls A. K. & Hoover Sam R. (1937) **THE MILK-CLOTTING ACTION OF PAPAINE**. *J. Biol. Chem.* 121, 737-745.
4. Barrett A., N. Rawlings & J. Woessner (2004). **Introduction**. **En: Handbook of Proteolytic Enzymes** (A. Barrett, N. Rawlings & J. Woessner, eds.). London: Academic Press.
5. Bendicho S., Martí G., Hernández T., y Martín O. (2002) **Determination of proteolytic activity in different milk systems**. *Food Chemistry* 79, 245–249.
6. Bohlooli, S., Mohebipoor, A., Mohammadi, S., Kounhavard, M., Pashapoor, S. (2007) **Comparative study of fig tree efficacy in the treatment of common warts (*Verrucavulgaris* vs. cryotherapy)**. *International Journal of Dermatology* 46, 524–526.
7. Bourdy, G.; S. J. De Walt; L. R. Chávez de Michel; A. Roca; E. Deharo; V. Muñoz; L. Balderrama; C. Quenevo; A. Gimenez (2000). **"Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group"**. *Journal of Ethnopharmacology* 70 (2): 87–109.
8. Caffini N.O., Natalucci C.L., Priolo N.S. y Buttazzoni M.S. (1988). **Proteasas de Bromilaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasasulfhidrica presente en frutos de *Bromeliaserra* Griseb.** *Actafarmacologica Bonaerense*. 7, 9 -14.
9. Caldwell, F.C. y F.L. Caldwell (1929) **A Study of the Anthelmintic Efficiency of Higuera latex in the Treatment of Trichuriasis, with Comment as to its Effectiveness against Ascaris Infestation**. *Am. J. Trop. Med.* 9, 471-482.
10. Cohen, W. (1958) **Characterization of Ficin**. *Nature* 182, 659-660
11. Coley P. (1983). **Herbivory and defenses of tropical trees**. *Ecological Monographs*. 52 (2):210-229.
12. Dalling, M.J. (1986) **Plant proteolytic enzymes, Vol I**. CRC Press, Inc., Florida.
13. Drenth, J., J.N. Jansonius, R. Koekoek, H.M. Swen & B.G Wolthers (1968). **"Structure of papain"**. *Nature*, 218, 929-932.
14. Dussourd D.D. y Denno R.F. (1991). **Deactivation of plant defense; correspondence between insect behavior secretory canal architecture**. *Ecology*. 72 (4), 1383-1396.
15. Duvey, V.K. y Jagannadham, M.V. (2003) **Proteinase, a stable cysteine protease from latex of *Calotropis procera***. *Phytochemistry*. 62, 1057-1071.
16. Eliécer Carrera J. (2003) **PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DE ENZIMAS INDUSTRIALES**. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 1 (1), 9-15.
17. Englund P.T., King T.P., Craig L.C., Walti A. (1968) **Ficin. I. Its isolation and characterization**. *Biochemistry*, 1968, 7 (1), 163–175.

18. FONAMA–IRD–UMSA–CIPTA. (1999) **Tacana: Ecuanaashaqui, ecuanashaid'renecwana, me schanapaque**. Primera Edición, Ediciones Plural: La Paz, 231–133.
19. Gaughran, E.R.L. (1976) **Ficin: history and present status**. *Q. J. Crude Drug Res.* 14, 1–21
20. Hansson A., Veliz G., Naquira C., Amrenc M., Arroyo M. y Arévalo G. (1986) **Preclinical and clinical studies with latex from *Ficusglabrata* HBK, a traditional intestinal anthelmintic in the amazonian area**. *Journal of Ethnopharmacology.* 17, 105–138.
21. http://centrodeartigos.com/articulos-para-saber-mas/article_46941.html [fecha de acceso mayo 2012]
22. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7103> [fecha de acceso mayo 2012]
23. <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/index.html> [fecha de acceso mayo 2012]
24. Jones, I.K. y A.N. Glazer (1970) **Comparative Studies on Four Sulphydryl Endopeptidases ("Ficins") of *Ficusglabrata* Latex**. *J. Biol. Chem.* 245, 2765-2772.
25. Joseph Baby, Raj.Justin (2011)**Pharmacognostic and phytochemical properties of *Ficuscarica* Linn –An overview**. *International Journal of PharmTech Research.* 3, 08-12
26. Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateishi, Y. Tamura, M. Hattori & K. Kdino (2004). **"Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex"**. *ThePlantJournal*, 37: 370-378.
27. Kort, A.A., J.A. Hinds y B. Zemer (1974) **On the specificity and pH dependence of ficin-catalyzed hydrolyses. Some comparisons with bromelain specificity** *Biochemistry*13, 2029-37
28. Kramer D.E. y Whitaker J.R. (1964) ***Ficus* enzymes II: Properties of the proteolytic enzymes from the latex of *Ficuscarica* variety Kadota**. *J. Biol. Chem.* 239, 2178–2183.
29. Kramer D.E. y Whitaker J.R. (1969) **Multiple Molecular Forms of Ficin-Evidence Against Autolysis as Explanation**. *Plant Physiol.* 44, 1560–1565.
30. Laemmli, U. K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature.* 227, 680-685.
31. Lansky E.P. y Paavilainen H. M. (2011) ***Figs: The Genus Ficus (Traditional Herbal Medicines for Modern Times*; v. 9)** CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, U.S.A.
32. Lansky, E.P., H.M. Paavilainen, A.D. Pawlus, and R.A. Newman (2008)***Ficusspp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents***. *J Ethnopharmacol.*119, 195–213.
33. Liener, I.E. (1961). **A study of the number and reactivity of the sulphydryl groups of ficin**. *BiochimBiophys Acta.* 28(53), 332–342.

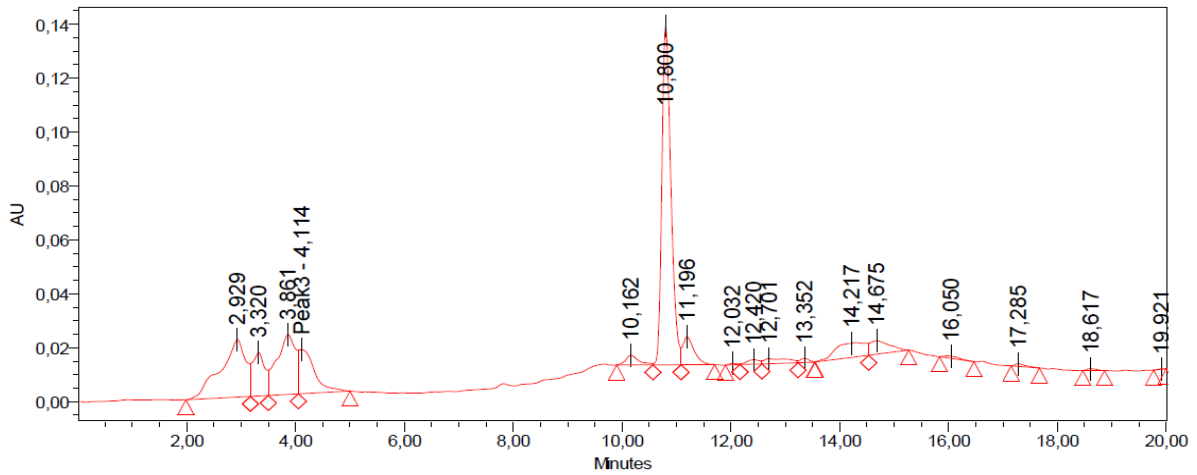
34. López M.I., Natalucci C.L., Priolo N.S., Arribére M.C. y Caffini N.O. (1994) **Proteasas de Plantas Superiores.II. Ficina (EC 3.4.22.32).** *Acta Farm. Bonaerense*. 13 (2): 123-31
35. López J.E. y de Kiyán C.I. (1974) **Plantas medicinales de1 Perú IV**, Ojé, Huito, Huitoc. *Biota* 10, 34–40.
36. Messing, R.A. y W.P. van Ness (1961) *Enzymologia*23,373-9
37. Orlacchio A., Maffei C., Emiliani C. y Reinoso J.A. (1985) **On the active site of β -hexosaminidase from latex of *Ficus glabrata*.** *Phytochemistry*, 24: (4), pp. 659–662.
38. Pandey, A., Germano, S., Osaku, C.A., Rocha, N.S. y Soccol, C.R. (2003). **Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp.* Produced by Solid– State Fermentation.** *Enzyme and Microbial Technology*. 32, 246 – 251.
39. Phillips, Oliver (1990) ***Ficus inspida* (Moraceae): Ethnobotany and Ecology of an Amazonian Anthelmintic, Economic Botany.** *Economic Botany*. 44, 534-536.
40. Quesada Romero LF, Castaño Osorio JC, Bilbao M. (2009) **Efecto antiparasitario de los extractos etanólicosy etéreos de *Ficus obtusifolia* Kunth (Moraceae), frente a parásitos de clase nematodos (*Toxocara catis* y *Toxocara canis*).** *Rev Infecto*. 13 (4), 259-267.
41. Rawlings N.D. y Barrett A.J. (1994) **Families of cysteine peptidases.** En *Methods in Enzymology (Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases)* (Barrett, A.J., ed). 244, 461–486.
42. Robbins B. y Lamson P. (1934) **Further studies on the proteolytic enzyme content of latex from the fig and related trees.**
43. Robbins B.H. (1930) **A proteolytic enzyme in ficin, the anthelmintic principle of *Leche de Higuero*.** *J. Biol. Chem*. 87, 251–257.
44. Sajid M. & J.H. McKerrow (2002) **“Cysteine proteases of parasitic organisms”.** *Mol. Biochem. Parasitol*. 120, 1–21.
45. Sgarbieri, V.C., S.M. Gupte, D.E. Kramer y J.R. Whitaker (1964) *J. Biol. Chem.* **239(2)**, 170-177.
46. Skelton, G.S. (1968) **Papaya proteinases: effect of ascorbic acid on proteolytic activity.** *Enzymology* 35, 275-178.
47. Stepek G., Behnke J.M., Buttle D.J. y Duce I.R. (2004) **Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics?** *TRENDS in Parasitology* 20 (7), 322–327.
48. Vega Mario (2001) **Etnobotánica de la Amazonia Peruana.** Abya-Yala. 1ra Ed. 96-97.
49. Wang, J., X. Wang, S. Jiang et al. 2008. **Cytotoxicity of fig fruit latex against human cáncercells.** *FoodChemToxicol*. 46: 1025–33.
50. Williams D.C. y Whitaker J.R. (1969) **Multiple Molecular Forms of *Ficus glabrata* Ficin. Their Separation and Relative Physical, Chemical, and Enzymatic Properties.** *Plant Physiol*. 44, 1574–1583.
51. Williams D.C., Sgarbieri V.C., y Whitaker J.R. (1968) **Proteolytic Activity in the Genus *Ficus*.** *Plant Physiol*. 43, 1083–1088.

ANEXO 1. CROMATOGRAMAS DE LAS DECOCCIONES DE EVANTA POR HPLC

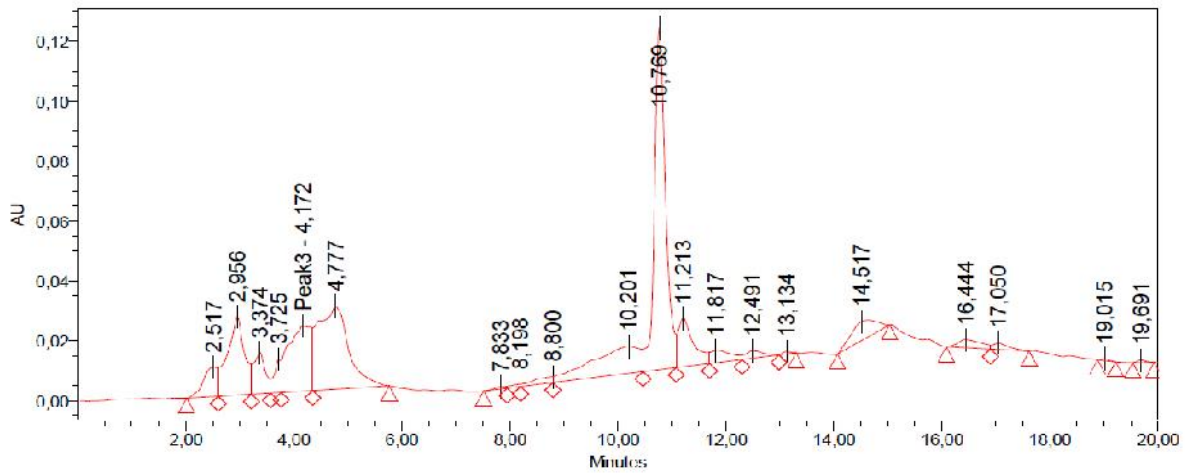
JUNIO



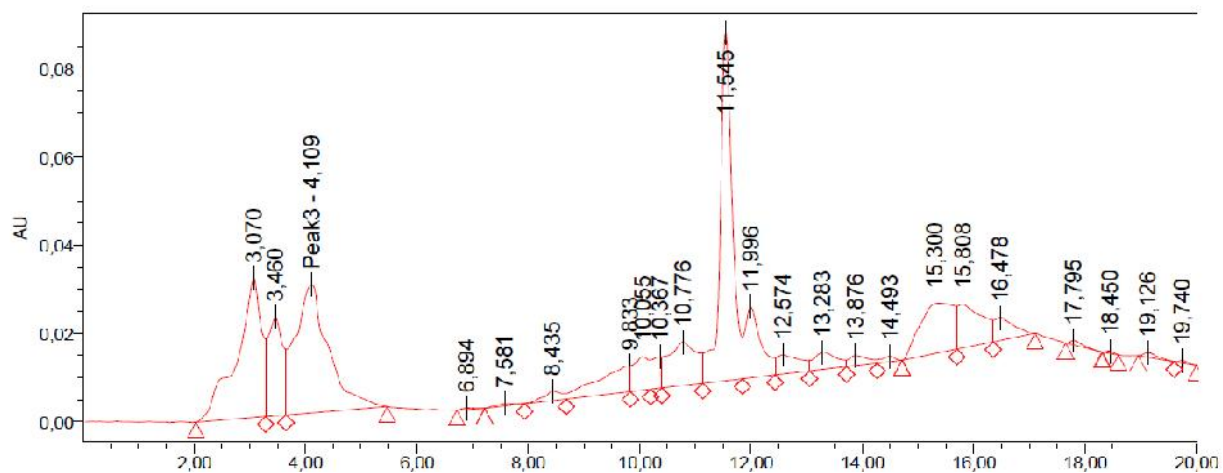
AGOSTO



SEPTIEMBRE



NOVIEMBRE



ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, de años de edad y con C.I....., expedido en, manifiesto que he sido informado sobre los objetivos del Proyecto de Investigación “*DESPARASITACION DE NIÑOS EN ESCUELAS RURALES*” que tiene como fin encontrar un tratamiento alternativo para las parasitosis intestinales. He sido informado sobre los riesgos y beneficios que podría suponer el uso del jarabe a base de EVANTA como tratamiento. Que el tratamiento incluye toma de muestras de heces de acuerdo a tiempos establecidos.

He sido informado de los posibles perjuicios de ambos tratamientos, así mismo se me harán conocer los resultados de las pruebas realizadas con las muestras de mi niño(a) y sobre el seguimiento clínico de la enfermedad de mi hijo/a.

He sido también informado de que los datos personales de mi hijo/a serán manejados confidencialmente y protegidos según las normas vigentes de Bioética. Que la participación de mi niño(a) en el Proyecto es **VOLUNTARIA** y que en cualquier momento, puedo retirar mi consentimiento a que mi niño(a) siga participando del mismo, sin que el tratamiento médico posterior de mi hijo/a se vea afectado.

Por lo tanto OTORGO mi CONSENTIMIENTO para que mi hijo (a) participe en este proyecto.

La Paz,.....de Junio de 2012.

Firma:

Padre/Madre/Tutor:

CI:

Firma:

Firma:

Resp. Toma de Muestra: Investigador Resp:

CI:

CI:

Firma:

Medico Resp.:

CI:

ANEXO 3. FICHA DE DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO

CODIGO

CHARCAS II -Junio 2012

PROYECTO - IDH

DESPARASITACION DE NIÑOS EN ESCUELAS RURALES II

PERTENECIENTE:

EDAD: **SEXO:**

PROCEDENCIA: **RESIDENCIA ACTUAL:**

EXAMEN COPROPARASITOLOGICO DE MONITOREO

FECCHA DE RECEPCION DE LA MUESTRA:

EXAMEN FÍSICO	1ª MUESTRA	2ª MUESTRA	3ª MUESTRA
COLOR:			
ASPECTO:			
RESTOS ALIMENTICIOS			
MOCO:			
SANGRE:			

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA:

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA:

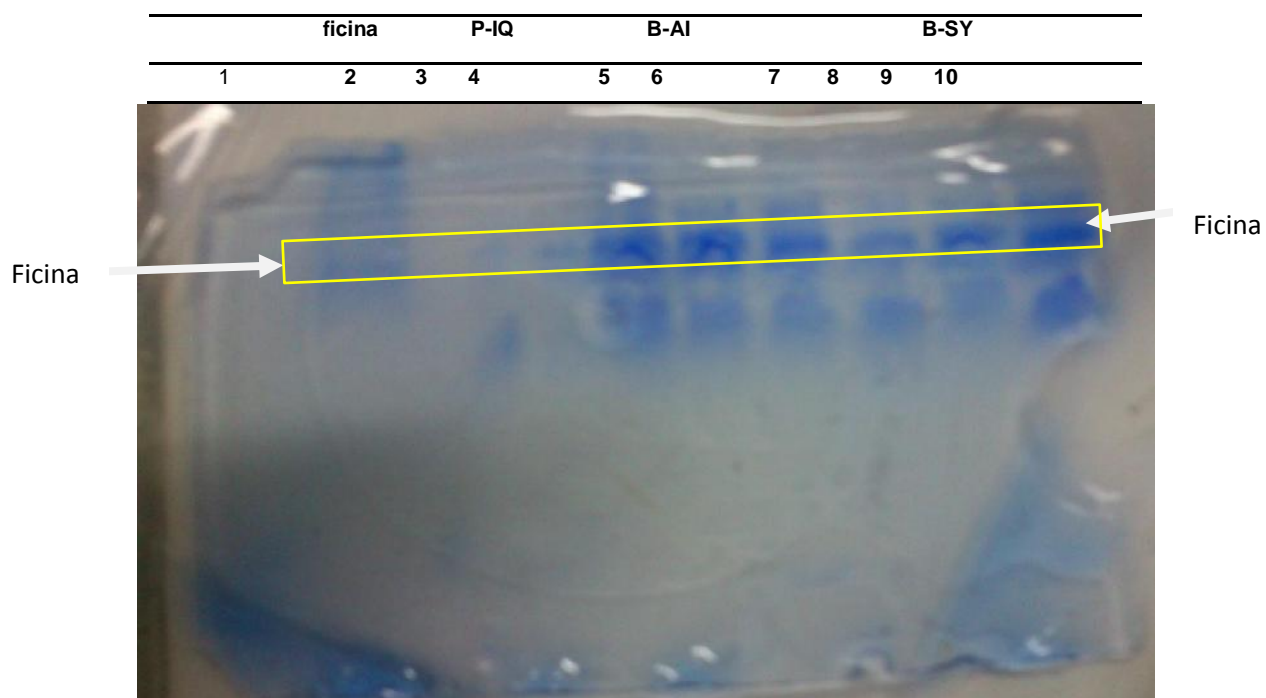
	1ª MUESTRA	2ª MUESTRA	3ª MUESTRA
DIRECTO			
RITCHIE			

ANTECEDENTES DE PARASITOSIS.....

SI

NO

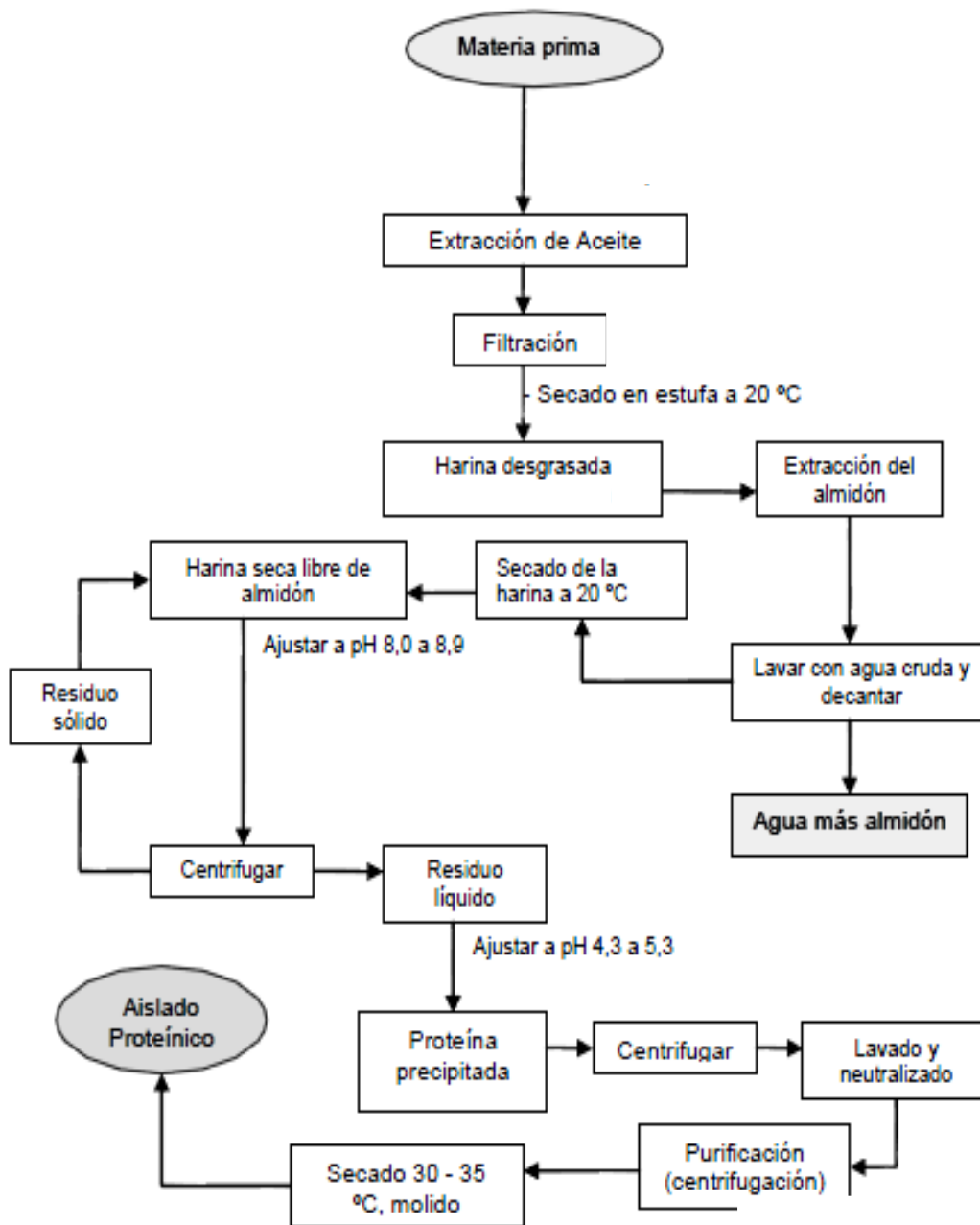
ANEXO 4. FOTOGRAFIA DE LA ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE LAS MUESTRAS DE LATEX DE *Ficus spp.*



Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE. (1) Patrón de masa molar, (2) 20 μg de ficina patrón, (3 y 4) látex de Perú (P-IQ); (5 y 6) muestras látex Provincia Abel Iturralde (B-AI); (7, 8, 9 y 10) látex provincia Sud Yungas (B-SY).

ANEXO 5. METODOS DE EXTRACCION DE PROTEINAS DE SOYA

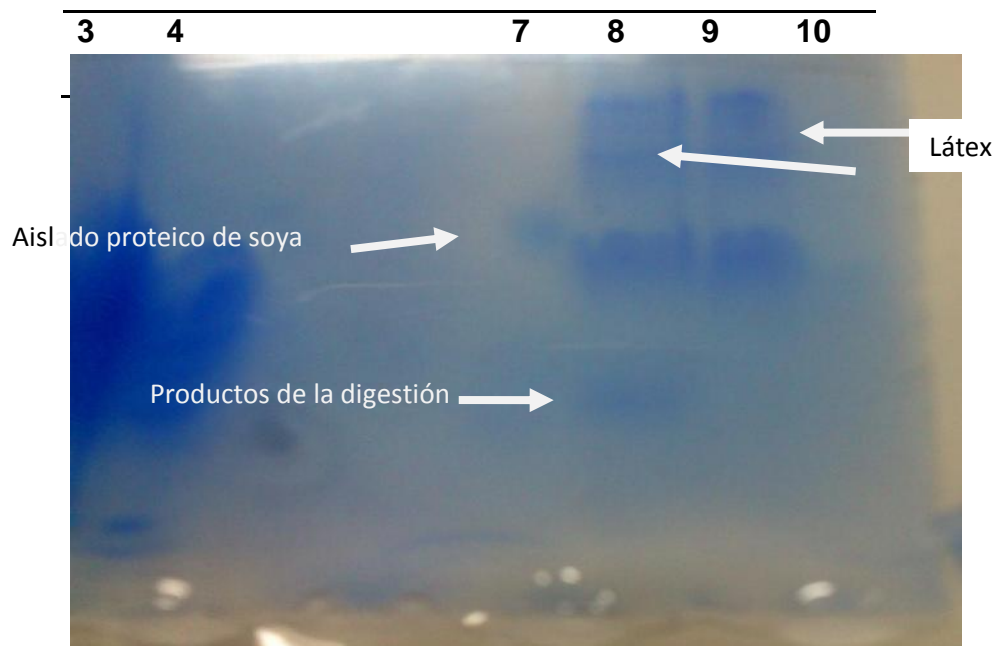
Extracción de proteínas por solubilización alcalina



Extracción acuosa de proteínas

- Poner la harina del cereal con agua destilada en una relación 1:2 p/v.
- Mantener en agitación (100 a 150 r.p.m.) durante 2 horas a 30°C.
- Filtrar y secar a 20°C

ANEXO 6. FOTOGRAFIA DE LA DIGESTION DE PROTEINAS DE SOYA POR EL LATEX DE *Ficus spp.*



Digestión de proteínas vegetales (3, 4) Oxidación de proteínas de Quinua, (7) Concentrado proteico de Soya, (8) aislado proteico digerido por látex de *Ficus spp.*, (9) muestra de látex HER-11.