

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA.



Tesis:

“Evaluación de actividad tripanocida (*Trypanosoma cruzi*) del extracto metanólico de hojas maduras de *Moringa oleifera* (moringa) Lam.”

Presentado por:

Cornejo Rivas, Pamela Michelle

CR11014

Para optar al título de:

Licenciada en Biología.

ASESORES:

- Lic. Jairo Galileo Marroquín Elías (interno).
Docente Escuela de Biología.
Facultad de Ciencias Naturales.
- Lic. Marvin Stanley Rodríguez Aquino (externo).
Investigador CENSALUD.
Universidad de El Salvador.

Ciudad Universitaria, octubre de 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA.



Tesis:

“Evaluación de actividad tripanocida (*Trypanosoma cruzi*) del extracto metanólico de hojas maduras de *Moringa oleifera* (moringa) Lam.”

Presentado por:

Cornejo Rivas, Pamela Michelle

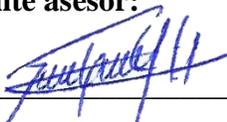
CR11014

Para optar al título de:

Licenciada en Biología.

Docente asesor:

Lic. Jairo Galileo Marroquín Elías

_____ 

Asesor externo:

Lic. Marvin Stanley Rodríguez Aquino

_____ 

Ciudad Universitaria, octubre de 2023

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA.**



Tesis:

“Evaluación de actividad tripanocida (*Trypanosoma cruzi*) del extracto metanólico de hojas maduras de *Moringa oleifera* (moringa) Lam.”

Presentado por:

Cornejo Rivas, Pamela Michelle
CR11014

Para optar al título de:

Licenciada en Biología.

TRIBUNAL CALIFICADOR:

Docente asesor:

Lic. Jairo Galileo Marroquín Elías

Jurado Externo:

Lic. Oscar Guillermo Meléndez Sandoval

Jurado Externo:

Lic. Wilber Alexander Alvarado Osegueda

Ciudad Universitaria, octubre de 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

AUTORIDADES

MSc. Roger Arias
RECTOR

PhD. Raúl Azcúnaga
VICERRECTOR ACADÉMICO

Ing. Juan Rosa Quintanilla
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

MSc. Francisco Antonio Alarcón Sandoval
SECRETARIO GENERAL

Lic. Rafael Humberto Peña
FISCAL GENERAL

Lic. Ernesto Américo Hidalgo Castellanos
DECANO INTERINO

MSc. Zoila Virginia Guerrero
VICEDECANO

Lic. Jaime Humberto Salinas
SECRETARIO

Lic. Milagro Elizabeth Salinas Delgado
DIRECTORA INTERINA ESCUELA DE BIOLOGÍA

CONTENIDO

Dedicatoria	9
Agradecimientos.....	10
Resumen	11
1. Introducción	12
2. Objetivos	14
2.1 General.....	14
2.2 Específicos.....	14
3. Marco teórico.....	15
3.1 Generalidades	15
3.2 Vector. <i>Triatoma dimidiata</i>	16
3.3 Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
3.3.1 Epidemiología	20
3.3.2 Epidemiología en El Salvador.....	22
3.4 Transmisión.....	24
3.4.1 Transmisión vectorial.....	24
3.4.2 Transmisión por transfusión sanguínea	24
3.4.3 Transmisión materno-fetal o vertical.....	24
3.4.4 Transmisión oral	25
3.5 Fases de la enfermedad de Chagas.....	25
3.5.1 Fase aguda	25
3.5.2 Fase crónica asintomática o indeterminada	25
3.5.3 Fase crónica.....	26
3.6 Diagnóstico	26
3.6.1 Examinación al microscopio.....	26
3.6.2 Microhematocrito.....	26
3.6.3 Prueba de Strout.....	26
3.6.4 Serología	26
3.6.5 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	27
3.7 Tratamiento.....	27
3.7.1 Compuestos nitros heterocíclicos.....	28
3.7.2 Inhibidores del ergosterol	30
3.7.3 Fármacos naturales.....	31
3.7.4 Dosis.....	31
3.7.5 Efectividad del tratamiento	32
3.7.6 Efectos secundarios provocados por el tratamiento	33
3.8 <i>Moringa</i>	34
3.8.1 Descripción botánica	34
3.8.2 Usos etnobotánicos.	36
3.8.3 Actividad biológica de “ <i>moringa</i> ”.....	37
3.8.4 Componentes activos.....	39
3.8.5 Ensayo de viabilidad celular – cultivo <i>in vitro</i>	42
3.8.6 Solvente (metanol).....	43
3.8.7 Dimetil Sulfoxido (DMSO).....	43
4. Metodología	45
4.1 Colecta de material vegetal.....	45
4.1.1 Materiales y equipo, fase de campo	45
4.2 Identificación botánica.....	46

4.3	<i>Obtención de extracto</i>	46
4.3.1	<i>Porcentaje de rendimiento de extracto.</i>	47
4.4	<i>Preparación de soluciones de trabajo</i>	48
4.4.1	<i>Benznidazol (control positivo)</i>	48
4.4.2	<i>Diluciones de extracto metanólico de hojas de “moringa”</i>	48
4.4.3	<i>Control interno</i>	48
4.5	<i>Preparación de curva de crecimiento.</i>	48
4.6	<i>Evaluación actividad tripanocida</i>	48
4.7	<i>Análisis fitoquímico</i>	52
4.8	<i>Materiales y equipo; fase de laboratorio.</i>	52
4.9	<i>Procesamiento de datos</i>	53
6.	<i>Resultados</i>	54
6.1	<i>Especie vegetal</i>	54
6.2	<i>Extracto</i>	54
6.3	<i>Análisis fitoquímico</i>	55
7.	<i>Discusión</i>	60
8.	<i>Conclusiones</i>	64
9.	<i>Recomendaciones</i>	65
10.	<i>Referencias bibliográficas</i>	66
11.	<i>Anexos</i>	74

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1: Condiciones de vivienda donde puede ser encontrado el vector de la enfermedad de Chagas, Triatoma dimidiata.. Fotografías propias.</i>	16
<i>Figura 2. Distribución de los principales vectores de Trypanosoma cruzi en el continente americano (Sosa-Estani & Segura, 2015).</i>	17
<i>Figura 3. Ciclo de vida y formas de T. cruzi. (Cura, 2014).</i>	19
<i>Figura 4. Distribución geográfica aproximada de las UTD de T. cruzi en los ciclos de transmisión doméstico y selvático (Zingales et al., 2012).</i>	20
<i>Figura 5. Flujo de migraciones de América Latina hacia regiones no endémicas para la enfermedad de Chagas (Schmunis, 2007).</i>	21
<i>Figura 6. Mapa de prevalencia de la enfermedad Chagas en Centroamérica (WHO, 2015).</i>	22
<i>Figura 7. Triatoma dimidiata.</i>	23
<i>Figura 8. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en El Salvador (Banco de sangre, donaciones de sangre por departamento) (Sasagawa et al., 2014b).</i>	24
<i>Figura 9. Rol del glutatión y tripanotión en el metabolismo de los fármacos antichagásicos nifurtimox y benznidazol (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011).</i>	29
<i>Figura 10. Flor de “moringa”. Fotografía propia.</i>	35
<i>Figura 11. Diversidad de productos comercializados en El Salvador. (Moringa Oleífera El Salvador).</i>	37
<i>Figura 12. Descripción del principio del ensayo de viabilidad celular (Promega, 2017).</i>	42
<i>Figura 13. Descripción general del ensayo CellTiter-Glo(Promega, 2017).</i>	43
<i>Figura 14. Imagen satelital de sitio de colecta.</i>	45
<i>Figura 15. Marcha de obtención de extracto metanólico. Elaboración propia.</i>	47
<i>Figura 16. Número de parásitos vrs. Luminiscencia emitida por los parásitos (menos valor de luminiscencia de medio LIT).</i>	50
<i>Figura 17. Marcha de trabajo de ensayo de viabilidad in vitro. Elaboración propia.</i>	51
<i>Figura 18. Voucher de identificación del museo del Plan de La Laguna.</i>	54
<i>Figura 19. Actividad tripanocida presentada en número de parásitos sobrevivientes.</i>	57
<i>Figura 20. Viabilidad de parásitos fármacos versus extracto “moringa”.</i>	58
<i>Figura 21. Mortalidad de parásitos fármacos versus extracto “moringa”.</i>	59

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación taxonómica de Triatoma dimidiata.</i>	17
<i>Tabla 2. Clasificación taxonómica del parásito Trypanosoma cruzi.</i>	18
<i>Tabla 3. Listado de fármacos y sus mecanismos de acción que actúan sobre amastigotes de T. cruzi (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011).</i>	28
<i>Tabla 4. Tratamiento con Benznidazol en El Salvador.</i>	32
<i>Tabla 5. Tratamiento con Nifurtimox en El Salvador.</i>	32
<i>Tabla 6. Clasificación taxonómica de Moringa oleifera Lam.</i>	35
<i>Tabla 7. Actividades biológicas presentes en “moringa” (Asensi et al., 2017).</i>	39
<i>Tabla 8. Resultados fitoquímicos de “moringa”</i>	55
<i>Tabla 9. Lectura de control interno de muestras.</i>	55
<i>Tabla 10. Lectura de luminiscencia de curva de crecimiento.</i>	56
<i>Tabla 11. Lecturas de luminiscencia de Benznidazol y extracto de “moringa”</i>	56
<i>Tabla 12. Número de parásitos sobrevivientes.</i>	56
<i>Tabla 13. Promedio de número de parásitos sobrevivientes.</i>	57
<i>Tabla 14. Porcentaje de viabilidad de parásitos.</i>	58
<i>Tabla 15. Porcentaje de mortalidad de parásitos.</i>	58

DEDICATORIA

A la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme culminar este largo trayecto; por darme la fuerza cada día; proveer los recursos, darme inteligencia y sabiduría; y rodearme de personas idóneas que han sido inspiración y apoyo, sin ninguna de ellas nada hubiese sido posible. Gracias a mis padres Jorge y Patty, Rebe, Jos, a mis abuelos, a toda mi familia que me brindaron todo el apoyo incondicional en todos estos largos años; gracias por hacerme sonreír en los momentos más difíciles, por enseñarme que la vida está llena de tropiezos y triunfos; pero lo importante es con quien se camina, gracias por ser mis compañeros de viaje, ya que sin su apoyo este trabajo nunca hubiese llegado a su fin.

A mis asesores Lic. Stanley Rodríguez por creer en mi, impulsarme a lograr una de mis mayores y más anheladas metas, forjándome un futuro como profesional, por los consejos, regaños, enseñanzas y permitirme ser parte de y Lic. Jairo Martínez, por su compromiso, dirección y apoyo continuo; a ambos por su tiempo, dedicación para poder culminar este proyecto por su capacidad para guiar mis ideas pues ha sido un aporte invaluable.

A CENSALUD, a PhD. Willber Castro (Director del centro) con quien estaré eternamente agradecida porque me ha abierto sus puertas y permitir desarrollarme profesionalmente; por facilitarme los Laboratorios para el desarrollo de esta tesis; gracias a la Cooperación Japonesa (JICA) por la confianza en mi trabajo, por el apoyo con reactivos y equipo y permitirme trabajar en sus proyectos de investigación que me han dejado mucho conocimiento; gracias al Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, por permitirme realizar mis extractos y análisis fitoquímicos en su laboratorio, quisiera agradecer encarecidamente al Dr. Marvin Núñez y Lic. Ulises Castillo por su tiempo y paciencia para guiarme en el procesamiento y análisis de mis resultados, MSc. Amy Morán por sus consejos y observaciones.

Gracias al equipo de CICES por colaborar en el procesamiento de resultados; al Jardín Botánico de la Laguna por la identificación Botánica, a mis compañeros de laboratorio Kevin y Rafa quienes han sido parte fundamental y apoyo en todo momento.

A mis amigos que dedicaron su tiempo en escucharme y acompañarme en el proceso, quienes siempre tuvieron palabras de ánimo, tomaron su tiempo en dar ideas y aportar nuevas ideas; gracias, Mauri, Fer, Yuca, Hugo, Jocelyn, Katie Lynn, Rubén, Jonathan, Melissa, Gabriel y Eduardo. Infinitas gracias a todos por creer en mí, y no dejarme nunca.

RESUMEN

La “moringa” posee propiedades terapéuticas que se han comprobado mediante diversos estudios. Para este estudio se evaluó su actividad tripanocida (ante *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas) mediante un extracto metanólico de hojas maduras. Se realizó una prueba *in vitro* del extracto de “moringa” para determinar actividad tripanocida. El extracto mostró una actividad similar al Benznidazol contra epimastigotes de la cepa Brenner de *T. cruzi* en la concentración de 10mg/mL mostró el 27% de mortalidad mientras Benznidazol presentó 26% a la concentración de 10mM. Se encontraron varios metabolitos secundarios en el extracto, incluidos terpenoides, saponinas, antraquinonas, flavonoides y compuestos fenólicos. Aunque los resultados son prometedores, se sugiere realizar más estudios con otras cepas de parásitos y estudios complementarios para validar los resultados.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es reconocida como una de las enfermedades tropicales más desatendidas en el mundo, asociadas a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda, con millones de personas alrededor del mundo en riesgo de adquirir la enfermedad (Cedillos, R. Sasagawa, E. Romero, E. Ramos, 2011). En El Salvador muchas familias no poseen acceso a saneamiento y habitan en condiciones de hacinamiento (Rodrik & Kennedy, 2008); lo cual facilita el desarrollo y reproducción de las chinches (*Triatoma dimidiata*), vectores de la enfermedad de Chagas. Dicha enfermedad tiene especial interés para la comunidad científica debido al impacto multifactorial y existe un especial interés en el desarrollo de fármacos seguros que conlleven a una mejor calidad de vida para los pacientes.

Se utilizan únicamente dos fármacos (Nifurtimox y Benznidazol), ambos poseen eficacia limitada pues son ineficientes para tratar la enfermedad en estado crónico y producen efectos adversos como vómito, anorexia, dermatopatías alérgicas, insomnio, linfadenopatías, dolor muscular, depresión de la médula espinal (Valencia et al., 2014), por lo que es necesario desarrollar tratamientos asequibles, de administración en periodos cortos, con mayor efectividad en los diferentes estadios del parásito (*T. cruzi*), se necesitan fármacos con mejores índices de selectividad y menores efectos colaterales (Bernacchi et al., 2002). Esto ha dado lugar a numerosos estudios sobre la relación de efectividad tripanocida con respecto a principios activos extraídos de plantas y su actividad en el desarrollo y sobrevivencia de tripomastigotes de *T. cruzi*.

La búsqueda de tratamientos alternativos para diversas enfermedades ha abierto camino al estudio de plantas con potencial terapéutico. *Moringa oleifera*, comúnmente llamada “moringa” o “teberinto”, posee diversos usos etnobotánicos como actividad antifúngica, antiparasitaria (Asensi et al., 2017), bactericida (Talreja, 2010), agro fertilizante (Canett R, Arvayo K, 2014), permite el mejoramiento del sistema inmunológico (Monteiro et al., 2021), posee actividad nutricional (Moyo et al., 2011; Muhammad et al., 2016), entre otros. Desde años atrás se están desarrollando investigaciones científicas para validar los usos populares, mediante estudios fitoquímicos (Cabrera-Carrión et al., 2017; Monteiro et al., 2021),

toxicológicos (Ambi et al., 2011a; Aremu et al., 2018), farmacológicos (Kou et al., 2018; A. Kumar et al., 2019), *in vitro* (Luqman et al., 2012), inmunológicos (Eze, 2013), entre otros.

Es necesario comprender la farmacocinética y farmacodinamia de los tratamientos antiparasitarios sintéticos con el fin de emular sus actividades y desarrollar tratamientos naturales (a base de “moringa”), seguros, asequibles y viables para tratar la infección por *Trypanosoma cruzi*; por ello en este estudio se evaluó la actividad tripanocida de un extracto metanólico de “moringa”.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad tripanocida del extracto metanólico obtenido a partir de las hojas maduras de *Moringa oleifera* “moringa” en condiciones de laboratorio, mediante una prueba *in vitro* para determinar su uso como medicamento alternativo y/o complementario de la enfermedad de Chagas.

2. OBJETIVOS

2.1 General

- Evaluar la actividad Tripanocida del extracto metanólico de hojas maduras de *Moringa oleifera* “moringa” (Lam).

2.2 Específicos

- Identificar la actividad tripanocida del extracto metanólico de hojas maduras de *Moringa oleifera* “moringa”.
- Comparar la actividad tripanocida del extracto metanólico de hojas maduras de *Moringa oleifera* “moringa” versus Benznidazol (fármaco de referencia para la enfermedad de Chagas), mediante ensayo de viabilidad celular.
- Determinar los componentes activos de *Moringa oleifera* “moringa” mediante un estudio fitoquímico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades

Las enfermedades desatendidas afectan a los grupos vulnerables de las clases socioeconómicas más bajas que tienen acceso limitado a la atención médica y viven en áreas rurales remotas en países tropicales/subtropicales de ingresos bajos y medianos o en áreas urbanas de países endémicos y no endémicos.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una zoonosis producida por un protozoo tripanosomátido llamado *Trypanosoma cruzi*; dicha enfermedad es transmitida a un amplio rango de animales domésticos y salvajes por insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* con más de 156 diferentes especies de insectos triatominos vectores conocidos como chinches (Dye-Braumuller et al., 2021); estos adquieren el parásito al succionar sangre de seres humanos o animales con parásitos circulantes. Entre los reservorios identificados se encuentran armadillos, tucacanes, ratones, ratas, ardillas, murciélagos frutícolas, perros, gatos, burros y cerdos; algunos de estos mamíferos domésticos están en contacto directo con los vectores (chinches) y permanecen en la habitación humana por lo que incrementan la posibilidad de contagio. (Jiménez-Coello et al., 2012) (**Figura 1**).

La enfermedad de Chagas es considerada el problema más grave dentro de las enfermedades parasitarias en América Latina con un impacto socioeconómico mayor a los efectos combinados de todas las otras infecciones parasitarias, esto es debido a su prolongada cronicidad, al ser considerada dentro de las primeras causas de enfermedad y mortalidad parasitaria (Rassi et al., 2010) y su costo económico estimado de US \$ 1.200 millones al año solo en América Latina (Bruce L; M Bacon, Kristina; Bottazzi, 2013) (Moreno, 2017). La carga económica tiene un costo global de aproximadamente \$7 mil millones de la atención sanitaria. En los países endémicos, una persona con la enfermedad de Chagas representa un costo aproximado de \$3500 a lo largo de su vida en gastos de asistencia médica y se calcula que un paciente pierde lo equivalente a más de tres años de vida productiva en función a su afección (Chaves et al., 2017).



Figura 1: Condiciones de vivienda donde puede ser encontrado el vector de la enfermedad de Chagas, *Triatoma dimidiata*. A: aves y sus nidos (lugar habitual donde puede encontrarse “chinchas”) B: casa de bahareque, en sus grietas habitan las chinchas C: mascotas, reservorio del parásito, también pueden padecer la enfermedad de Chagas D: cocina común en casa rural E: pante de leña F: “chinche” *Triatoma dimidiata*, vector del parásito *Trypanosoma cruzi*. Fotografías propias.

3.2 Vector: *Triatoma dimidiata*

Los vectores del parásito *T. cruzi* son conocidos comúnmente como triatomíneos, insectos hematófagos del orden hemíptera (chinchas), familia Reduviidae, conocido comúnmente como “chinche besucona” (tabla 1) y se encuentran distribuidos geográficamente en diversas zonas (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.) (Sosa-Estani & Segura, 2015). En países de América Central como Nicaragua, Honduras y Guatemala donde *Rhodnius prolixus* ha sido eliminado, *T. dimidiata* se ha convertido en el principal objetivo por erradicar. Actualmente en El Salvador el único vector es la chinche *Triatoma dimidiata*. Una de las particularidades de esta especie, es que sus ninfas se camuflan con la tierra en el suelo de las viviendas (Moreno, 2017).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Triatoma dimidiata*.

Reino:	Animalia
Phylum:	Arthropoda
Clase:	Insecta
Orden:	Hemíptera
Familia:	Reduviidae
Género:	<i>Triatoma</i>
Especie:	<i>dimidiata</i>

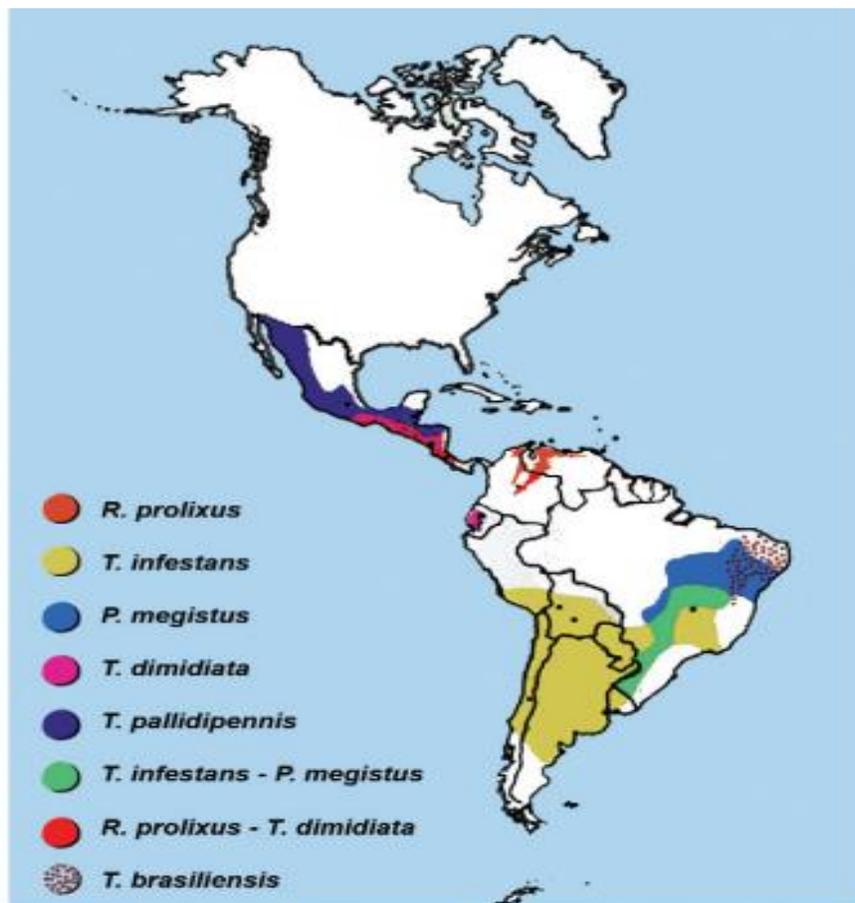


Figura 2. Distribución de los principales vectores de *Trypanosoma cruzi* en el continente americano (Sosa-Estani & Segura, 2015).

3.3 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*.

El agente causal de la enfermedad de Chagas es el parásito *Trypanosoma cruzi*; tiene un ciclo de vida complejo que involucra la infección de vertebrados y la transmisión por insectos vectores. Este parásito pasa por 3 estadios morfológicos principales (**Figura 3**). Se describen a continuación (Cura, 2014):

Tabla 2. Clasificación taxonómica del parásito *Trypanosoma cruzi*.

Reino:	Protista
Phylum:	Sarcomastigophora
Sub-phylum:	Mastigophora
Clase:	Zoomastigophorea
Orden:	Kinetoplastida
Sub-orden:	Trypanosomatina
Familia:	Trypanosomatidae
Género:	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero:	<i>Schizotrypanum</i>
Especie:	<i>cruzi</i>

- **Epimastigote:** presenta forma elongada (20 - 40 x 2 μm) con el origen del flagelo próximo y por delante del núcleo. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos, y constituye una de las formas proliferativas del parásito. Es la forma que más fácilmente se cultiva “*in vitro*”.
- **Tripomastigote:** presenta forma elongada (20 - 25 μm) con el kinetoplasto situado por detrás del núcleo. El flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior, y crea la imagen de una membrana ondulante. Es la forma infectiva y no tiene capacidad replicativa. Este estadio se encuentra en la circulación del mamífero (Tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico).

- **Amastigote:** presenta forma esférica u ovalada (2 - 4 μm), que carece de flagelo libre. Es el estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero.

Cuando un triatomino infectado ingiere sangre de huéspedes humanos susceptibles, produce deyecciones (defeca). El prurito ocasionado por la picadura del insecto induce al individuo a rascarse; son estos tripomastigotes metacíclicos encontrados en las heces del vector los que ingresan al huésped vertebrado a través de las micro laceraciones generadas por la comezón o a través de las mucosas (Sanabria, 2015).

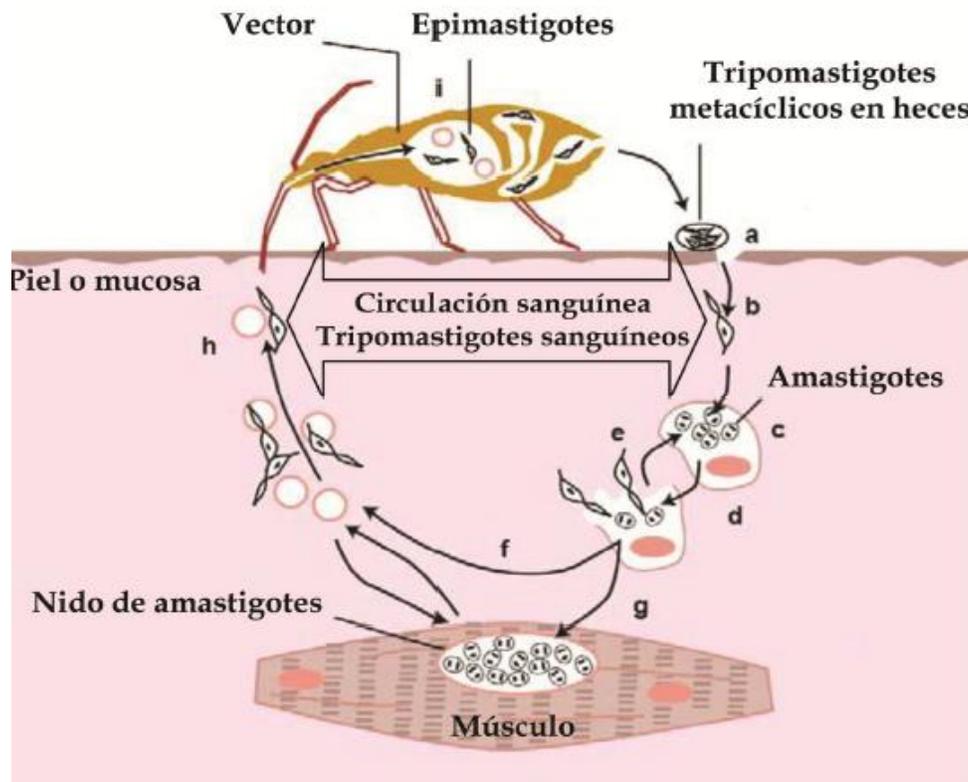


Figura 3. Ciclo de vida y formas de *T. cruzi*. Durante la succión de sangre, el vector infectado deposita sus heces conteniendo formas tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* sobre la piel o mucosas (a). Las mismas penetran por heridas (b), infectan a la célula hospedera, se diferencian a formas amastigotas y se multiplican (c). Posteriormente, se diferencian a formas tripomastigotes, que se vuelven al torrente sanguíneo (e, f), que pueden formar nidos en los tejidos (g, rediferenciándose a amastigotas replicativos) o ser succionadas durante la alimentación de un nuevo vector, cerrando el ciclo de vida (h)(Cura, 2014).

T. cruzi es genéticamente diverso y comprender la estructura poblacional de este parásito es importante debido a su asociación con la transmisión y los ciclos de la enfermedad. Actualmente, *T. cruzi* se divide en seis unidades de tipificación discretas (DTUs), TcI-TcVI, con diferente prevalencia según a la región geográfica. La DTU TcI prevalece en entornos domésticos que tienen un mayor riesgo de transmisión por medio del vector; la infección humana con TcI se concentra en el norte de América del Sur y en Centroamérica, y se asocia con la miocardiopatía chagásica, mientras que las DTU TcII, V y VI prevalecen en el sur de América del Sur (**Figura 4**) (Zingales et al., 2012).

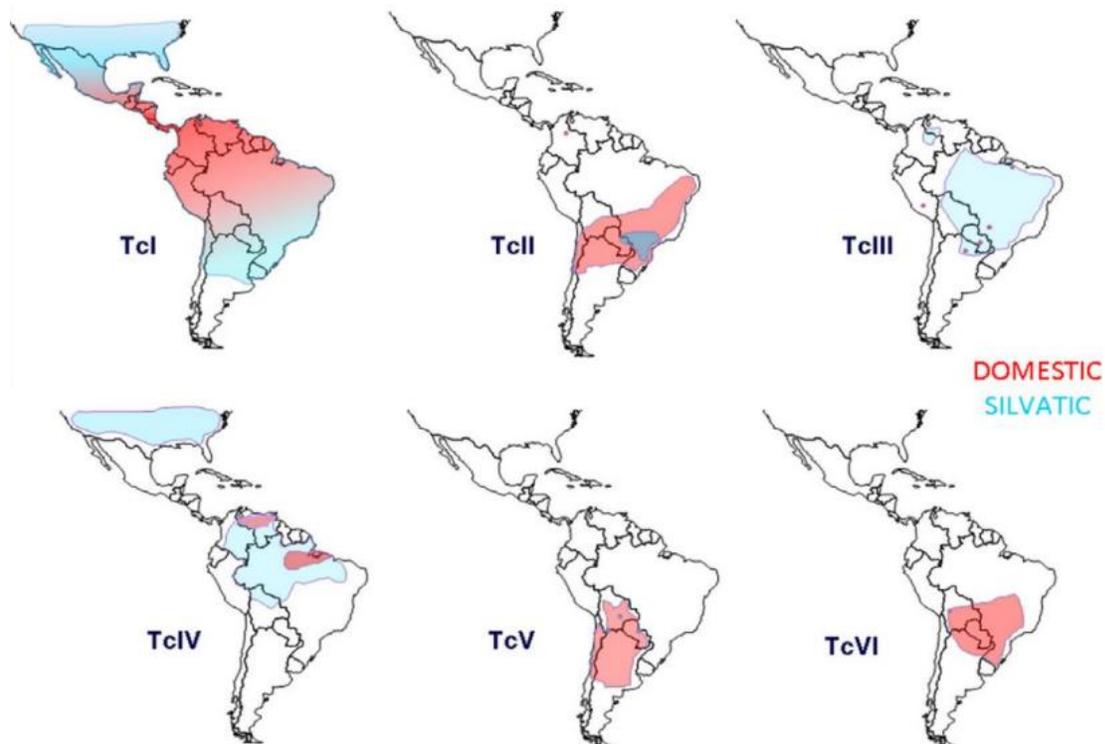


Figura 4. Distribución geográfica aproximada de las UTD de *T. cruzi* en los ciclos de transmisión doméstico y selvático (Zingales et al., 2012)

3.3.1 Epidemiología

Se calcula que cerca de 70 millones de personas alrededor del mundo están en riesgo de infectarse y hay un promedio de 30 mil casos nuevos anuales por todas las formas de transmisión (World Health Organization., 2015). Se estima que, del total infectados, aproximadamente 50,000 morirán cada año (Sasagawa et al., 2014a). Según estimaciones, 12 millones de personas tienen la enfermedad de Chagas, de esas personas aproximadamente entre un 20 y un 30% desarrollará la enfermedad grave (Murcia et al., 2013).

En los países endémicos, una persona con la enfermedad de Chagas representa un costo aproximado de \$3500.00 a lo largo de su vida en gastos de asistencia médica y se calcula que un paciente pierde lo equivalente a más de tres años de vida productiva en función a su afección (Chaves et al., 2017).

La migración rural-urbana ha cambiado la epidemiología de la enfermedad de Chagas. En los últimos decenios, el número de donantes con serología positiva ha sido muy elevado en los países endémicos; dicha transmisión no se limita a los países en los que la enfermedad es endémica; por lo tanto, la migración de personas infectadas por *T. cruzi* plantea un problema de salud pública, incluso en países en los que no hay transmisión vectorial del parásito. La (Figura 5) muestra la dimensión de la expansión de la infección por *T. cruzi* en países no endémicos debida a las migraciones de individuos infectados (Schmunis, 2007), en el caso de la región Centroamericana, El Salvador presenta las tasas más altas de casos agudos, según un estudio realizado entre los años 2000 al 2017 como se puede ver en la (Figura 6) donde se presenta un mapa de la prevalencia de la enfermedad, indicando un 1.3% de prevalencia para El Salvador en contraste al menor porcentaje de la región de 0.2% para Costa Rica (Peterson, Yoshioka, et al., 2019).

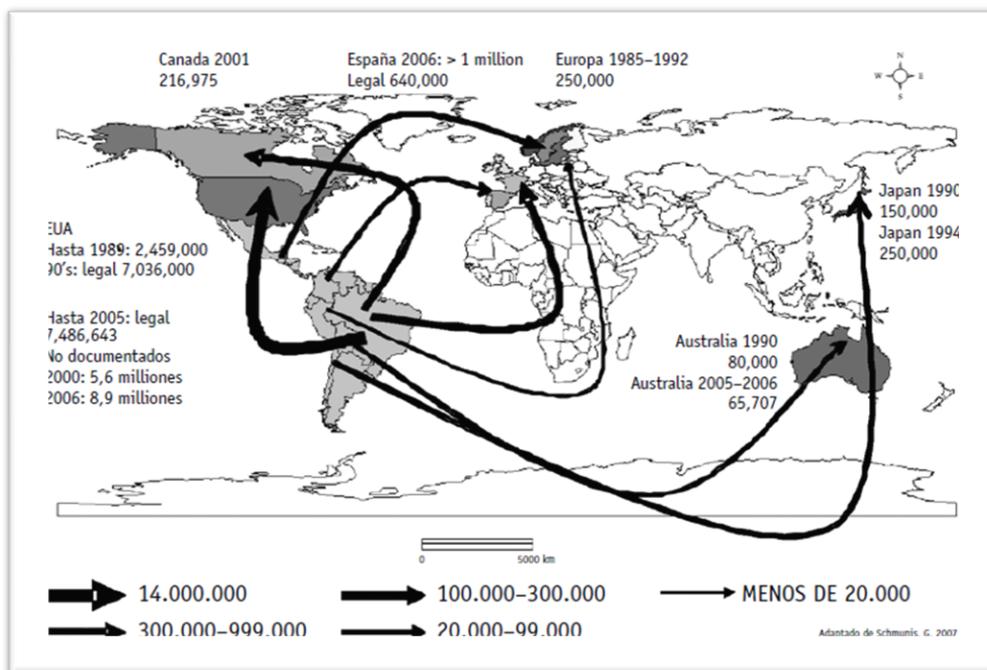


Figura 5. Flujo de migraciones de América Latina hacia regiones no endémicas para la enfermedad de Chagas (Schmunis, 2007).

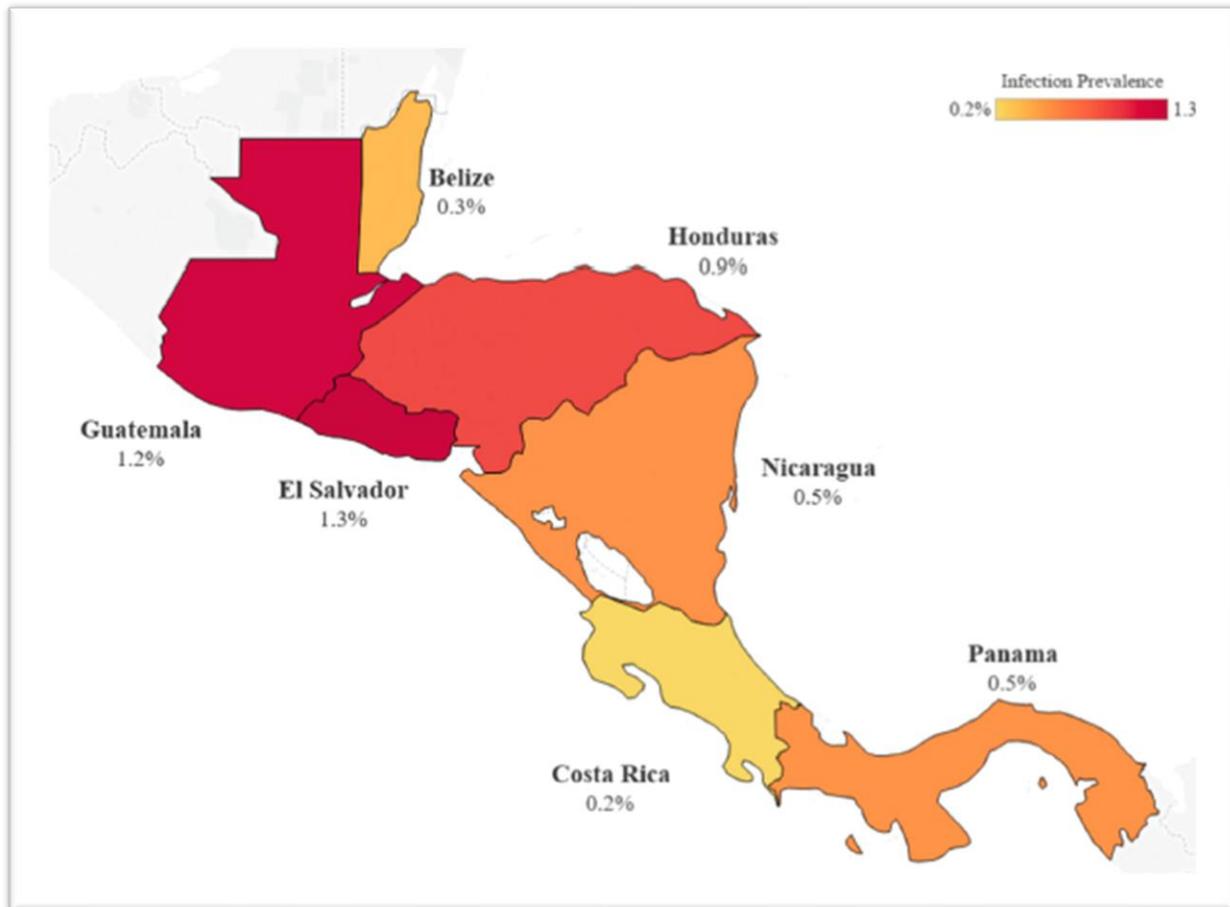


Figura 6. Mapa de prevalencia de la enfermedad Chagas en Centroamérica (WHO, 2015).

3.3.2 Epidemiología en El Salvador

Según datos del MINSAL, la enfermedad de Chagas constituye un problema importante de salud pública debido a la frecuencia de casos agudos usualmente asintomáticos y casos crónicos que se manifiestan por miocarditis chagásica, paro cardíaco y la muerte (Cedillos, R. et al., 2011).

Una investigación realizada en El Salvador estimó que un 39% de la población se encontraba en riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas debido a las condiciones de las viviendas (Cedillos, R. et al., 2011). Para el periodo de 2001-2012 el MINSAL reportó 731 casos agudos; sin embargo, se dificulta realizar estimaciones concretas sobre el total de personas infectadas debido que solo del 1-2% de los portadores presentan síntomas (Sasagawa et al., 2014a).



Otra investigación realizada en el periodo del 2001 al 2011, donde se analizaron 885.187 muestras de sangre recolectadas en los bancos de sangre del MINSAL, Cruz Roja, Instituto Salvadoreño del Seguro Social y el Hospital Militar; se encontraron 21.693 casos de infecciones relacionadas con transfusiones de sangre (Sasagawa et al., 2014b); otro estudio reportó que hasta el año 2011 habían 232,000 habitantes infectados y se reportaron 2500 casos nuevos por transmisión vectorial por el vector *Triatoma dimidiata* con una tasa de prevalencia anual de 3,372 (Cedillos, R. et al., 2011); **(Figura 7)**.

Figura 7. Triatoma dimidiata.

En el año 2012 se recolectaron 94,494 muestras provenientes de los bancos de sangre, de las cuales 1,431 dieron positivo a la infección de Chagas, lo cual corresponde al 1.5%, es decir, el doble de la prevalencia de sífilis, lo que indica que el índice de la enfermedad de Chagas en El Salvador es el más alto en Centro América y sobrepasa a la de VIH, hepatitis B y C y sífilis (Raquel, Peñate; Katty, 2013) y es el principal motivo de descarte de unidades de sangre en los bancos de sangre (Rodríguez & Cisneros, 2016). En El Salvador existe un Programa Nacional de control de la enfermedad pero se enfocan mayormente en erradicar el vector (*Triatoma dimidiata* “chinche picuda”) y mejorar el diagnóstico temprano de la enfermedad mediante cribado en bancos de sangre; a pesar de ello no se cuenta con un programa eficiente para abastecer el medicamento (benznidazol), el cual no es de venta libre y es distribuido únicamente por MINSAL a través de las Unidades de Salud, dicha entidad no posee la capacidad de suplir la demanda del tratamiento para los pacientes diagnosticados con Chagas. En la actualidad, en El Salvador se utiliza únicamente el benznidazol como tratamiento y éste presenta diversos problemas latentes como la toxicidad del fármaco tripanocida reflejado mediante los efectos secundarios visibles en la mayoría de los pacientes; además del desarrollo de resistencia por parte de los parásitos.

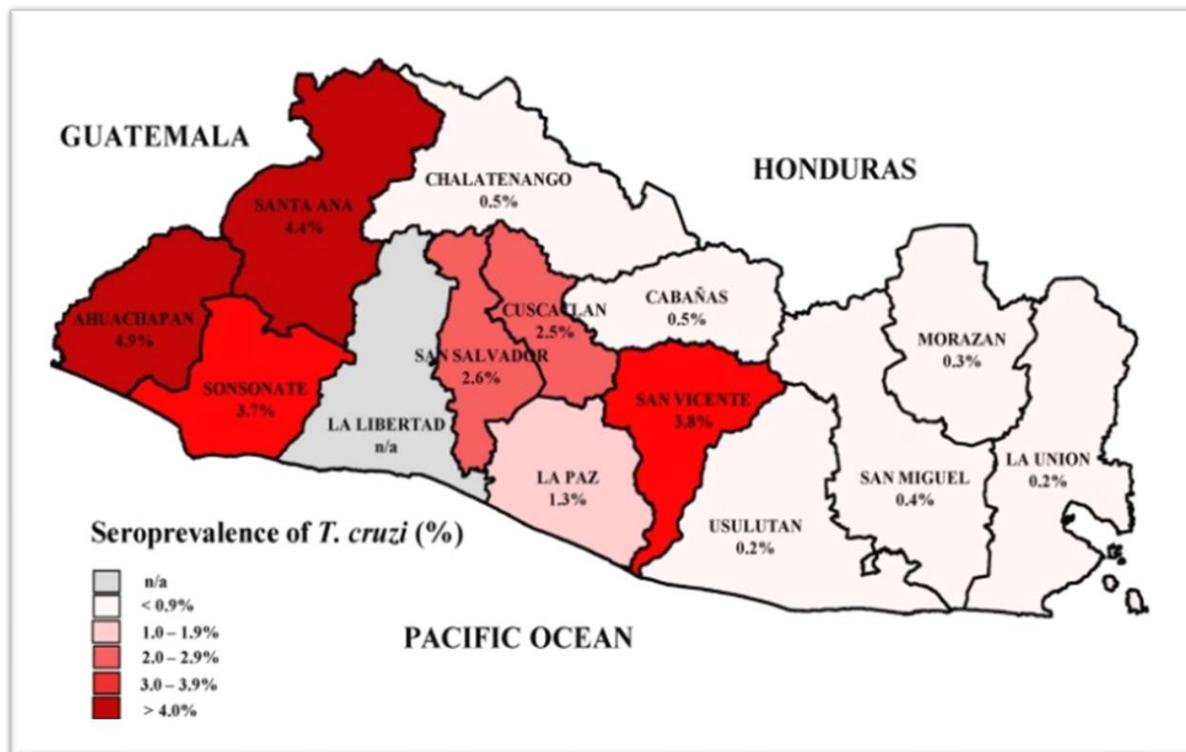


Figura 8. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en El Salvador (Banco de sangre, donaciones de sangre por departamento) (Sasagawa et al., 2014b).

3.4 Transmisión

3.4.1 Transmisión vectorial

Es el mecanismo más común para la adquisición de *T. cruzi* (Rassi et al., 2010). En esta vía de transmisión los parásitos presentes en las heces del insecto hematófago penetran por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz (Cura, 2014).

3.4.2 Transmisión por transfusión sanguínea.

La población de riesgo está constituida, principalmente, por los individuos poli-transfundidos (pacientes hemofílicos y sometidos a diálisis) (Cura, 2014).

3.4.3 Transmisión materno-fetal o vertical.

Da lugar a la infección congénita; una embarazada puede transmitir el parásito en cualquier estadio de la infección y en cualquier momento del embarazo (incluso durante el parto) y en sucesivos embarazos (García-bujalance & Gastañaga, 2013).

3.4.4 Transmisión oral

Es producida por el consumo de alimentos contaminados con triatominos o sus heces, o por la ingestión de carne cruda de hospedadores mamíferos infectados. Se considera que esta vía es causante de la enfermedad de Chagas cuando se demuestra más de un caso agudo de enfermedad febril vinculada a un alimento sospechoso, en ausencia de otra causa aparente (Cura, 2014).

3.5 Fases de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas se caracteriza por tener 3 fases que pueden ser diagnosticada por medio de diversas técnicas. Las fases de la enfermedad son:

3.5.1 Fase aguda

Según los lineamientos técnicos para la prevención, vigilancia y control de enfermedades transmitidas por vectores de El Salvador; se debe considerar en fase aguda de la enfermedad a toda persona con fiebre de grado variable, acompañado de malestar general, hepatoesplenomegalia y linfadenopatía, con presencia o no de reacción inflamatoria en el sitio de la infección “Chagoma”, edema unilateral de ambos párpados “Signo de Romaña”, y antecedente de haber estado expuesto a los factores de riesgo, picadura de chinche, o con una primera prueba parasitológica positiva (Ministerio de Salud de El Salvador, 2020). Comprende desde el momento de la inoculación del parásito hasta cuatro meses posteriores y tiene presencia de una elevada parasitemia. Posee una tasa de letalidad del 2 al 7%; puede presentarse con manifestaciones sistémicas comunes a otras enfermedades como fiebre, edema, adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia. La fiebre es frecuente, irregular, pero puede ser continua y alta. Se acompaña de anorexia, astenia, mialgias, cefalea y, ocasionalmente, artralgias. El cuadro febril suele persistir por un periodo de dos a cuatro semanas (Cura, 2014).

3.5.2 Fase crónica asintomática o indeterminada

Se caracteriza por una baja parasitemia y por la presencia de anticuerpos de clase IgG anti-antígenos de *T. cruzi* detectables con facilidad y ausencia de signos y síntomas (Kasper et al., 2016). Aproximadamente, un 70% de los pacientes permanece en dicha fase durante toda su vida con exámenes radiográficos y electrocardiográficos normales (Cura, 2014).

3.5.3 Fase crónica

Los pacientes en dicho estado pueden poseerlo en un lapso de 10 a 30 años hasta presentar manifestaciones clínicas como problemas cardiacos, digestivos o ambas que pueden producir incluso la muerte. Un 75 % de los pacientes desarrolla problemas cardíacos, 25% presentan megacolon o megaesófago y la forma neuronal es menos frecuente y se asocia a estados de inmunodepresión como por ejemplo la coinfección con VIH/SIDA o tratamiento con inmunosupresores (García-bujalance & Gastañaga, 2013).

3.6 Diagnóstico

3.6.1 Examinación al microscopio

Se realiza buscando la motilidad del parásito en la sangre no coagulada del paciente, y es viable solo en la fase aguda, cerca de 2 semanas posterior a la picadura del triatomino; dicha técnica permite la detección en más de 60% de los casos en dicha fase; y para facilitar la observación del parásito microscópicamente en un frotis sanguíneo se puede utilizar la tinción de Giemsa.

3.6.2 Microhematocrito

Es una técnica utilizada para el diagnóstico de Chagas cuando se dispone de poca cantidad de sangre. En la interfase entre los hematíes y el plasma se encuentra la capa leucocitaria en la que se pueden observar los movimientos de los parásitos. Si la observación la realiza personal experto la sensibilidad puede ser de un 85 % (Flores-Chávez et al., 2009).

3.6.3 Prueba de Strout

Consiste en concentrar los parásitos en muestras de sangre de los pacientes. Se realiza una observación del sedimento en fresco o bien después de realizar un frotis y teñirlo con Giemsa (Flores-Chávez et al., 2009).

3.6.4 Serología

Existe un amplio número de pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, se diferencian entre sí por el principio de la técnica o los antígenos que utilizan. Los tests convencionales son los que emplean como antígeno la totalidad del parásito. La prueba IgG se basa en la determinación de inmunoglobulinas específicas de la clase G totales IgG anti-*T. cruzi*; otras pruebas son inmunofluorescencia indirecta (IFI): permite determinar la

presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* mediante una reacción antígeno-anticuerpo; hemoaglutinación indirecta (HAI): reacción de glóbulos rojos sensibilizados con *T. cruzi* que entran en contacto con anticuerpos específicos del parásito que produce o no aglutinación; ensayos inmunoenzimáticos (ELISA): permite observar anticuerpos anti-inmunoglobulinas ligados a enzimas (Ministerio de Salud de El Salvador, 2020).

3.6.5 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La prueba es utilizada por su especificidad y sensibilidad por lo que puede utilizarse en cualquier fase de la enfermedad sin importar si hay baja parasitemia. La PCR utiliza cebadores los cuales permiten la replicación de la cadena de ADN; en el caso de Chagas se utilizan cebadores para su diagnóstico; entre algunos se encuentran TcZ1/TcZ2 las cuales amplifican el fragmento de 195 pb del ADN satelital con una banda de 188pb, y los cebadores S35/S36 y 121/122, que amplifican segmento de región variable del ADN del kinetoplasto con una banda de 330 pb. Se aplica tanto a ADN obtenido de cepas en cultivo como al extraído a partir de vectores infectados natural y experimentalmente (Silber et al., 1997), dicha técnica permite conocer la variabilidad genética entre cepas del parásito.

3.7 Tratamiento

La farmacoterapia actual para la enfermedad de Chagas se limita escasamente a dos fármacos; el nifurtimox y el benznidazol ambos con efectos secundarios (Brunton, L. et al., 2019); ambos fármacos son nitros heterocíclicos: el benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) y el nifurtimox (3-metil-4-(5'nitrofurfurilidenamina)-tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (Cançado, 1999). El grupo nitro de ambos fármacos antichagásicos es reducido a radicales libres o metabolitos electrofílicos por la citocromo P450 y microreductasas relacionadas de *T. cruzi* (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011).

A través de los años se han desarrollado fármacos antichagásicos de prueba con diferentes vías de acción, los cuales se enlistan a continuación:

Tabla 3. Listado de fármacos y sus mecanismos de acción que actúan sobre amastigotes de *T. cruzi* (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011).

Fármaco	Mecanismo de acción
Alopurinol	Inhibidor de la síntesis de proteínas y purinas
Itraconazol y Posaconazol	Inhibición de la síntesis de ergosterol
Butionina-Sulfaximina (BSO)	Inhibe el metabolismo del tripanotión
Cruzipaina, Miltafosina	Inhibe las proteasas de cisteína (CPI) Inhibe la biosíntesis de fosfatil colina (PC) Inhibición de las metil carboxipeptidas(*)
Alcaloides del boldo y plantas con isoquinolinas	Inhiben la cadena respiratoria
Nifurtimox	Producción de radicales libres: aniones super óxido, peróxido de hidrógeno y metabolitos electrofílicos
Benznidazol	Inhibe la síntesis de proteínas y la cadena respiratoria

3.7.1 Compuestos nitros heterocíclicos

El tratamiento basado en Nifurtimox (Laboratorio Bayer), fue aprobado para el uso contra la enfermedad de Chagas en el año 1965 (Werner Apt B. et al., 2008); actúa en la vía de reducción del grupo nitro para generar radicales nitroanión, los cuales reaccionan para producir metabolitos reducidos de oxígeno altamente tóxicos para *T. cruzi*; mientras que el benznidazol (Laboratorios Roche en 1972, Rochagan® y Radanil®) actúa en la vía de un mecanismo de estrés reductivo, el cual involucra la modificación covalente de macromoléculas por intermediarios de nitro reducción (Apt, 1999). Los radicales libres derivados del nifurtimox pueden seguir un proceso de oxidorreducción cíclico en presencia de oxígeno originando H₂O₂ por la acción previa de la dismutasa superóxido (SOD). El oxígeno producido, los radicales libres y metabolitos electrofílicos se unen a macromoléculas intracelulares dañándolas. En el parásito, el tripanotión (T(SH)₂) y glutatión (GSH) neutralizan los metabolitos derivados del nifurtimox y benznidazol mediante conjugación originando conjugados fármacos-tiol que posteriormente son metabolizados hacia mercapturatos en el hospedero mamífero. Los radicales libres son neutralizados por oxidación de GSH o T(SH)₂ reducidos. La tripanotión reductasa reduce a la tripanotión oxidada (T(S)₂) (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011); a continuación, se presenta el mecanismo de acción de ambos fármacos (Figura 9).

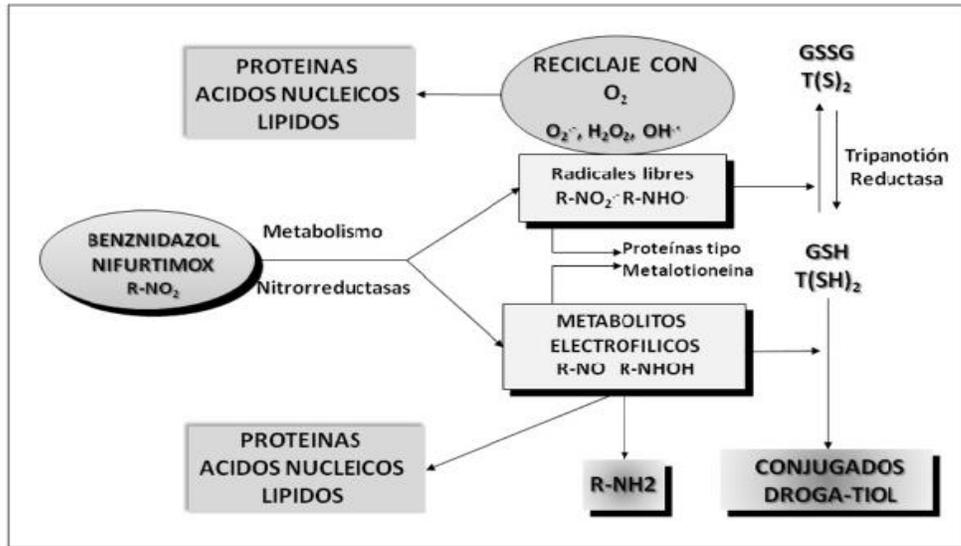


Figura 9. Rol del glutatión y tripanotión en el metabolismo de los fármacos antichagásicos nifurtimox y benznidazol (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011).

Los protozoarios poseen diferentes vías metabólicas esenciales ausentes en los seres humanos, lo cual representan blancos farmacológicos ideales. Es el caso de la vía del tripanotión y la tripanotión reductasa son sistemas únicos en los protozoos kinetoplastidos que reemplazan el glutatión y la glutatión reductasa intracelular, mecanismo principal del sistema tiol-redox (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011), desempeña actividades protectoras contra el estrés oxidativo, mediante la renovación del NADPH dependiente de especies de tiol.

Los compuestos oxidativos son producidos por la enzima superóxido dismutasa, la cual es responsable de la reducción de los grupos nitro; dichos radicales en presencia de hierro forman un fuerte radical hidroxilo oxidante e incrementan la producción de especies reactivas de oxígeno, que generan un estrés oxidativo en el parásito; sin embargo, el efecto oxidativo nocivo generado por estos compuestos no se limita al parásito, sino que afecta en igual proporción a las células de los mamíferos, lo que produce efectos adversos de estos medicamentos (Sánchez et al., 2016).

3.7.2 Inhibidores del ergosterol

Varios compuestos de azol se han utilizado con éxito en medicina humana y veterinaria. Estos fármacos interfieren con la síntesis de esteroides y, junto con otros compuestos nitrogenados heterocíclicos, pertenecen al grupo de fármacos que inhiben la síntesis de ergosterol. *T. cruzi* contiene ergosterol, cuya síntesis es bloqueada por agentes antifúngicos sin afectar al huésped humano que contiene colesterol. El colesterol difiere del ergosterol por la presencia de 24 grupos metilo y dobles enlaces en A7 y A22. Las tres enzimas que permiten la metilación y los dobles enlaces del ergosterol no tienen contrapartida en los mamíferos con relación a la síntesis de colesterol (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011).

Varios productos azólicos se han estudiado como tratamientos para la enfermedad de Chagas, como el ketoconazol, itraconazol, fluconazol y posaconazol (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011). Los mecanismos de acción de los azoles incluyen el bloqueo de la síntesis de ergosterol, el cual es un compuesto esencial para la supervivencia del parásito, a través de enlaces covalentes u otras interacciones entre intermediarios nitroreductores y otros compuestos celulares. (Sánchez et al., 2016).

El itraconazol y ketoconazol inhiben la síntesis del ergosterol de *T. cruzi*; los antimicóticos evitan su síntesis y no afectan el huésped humano que tiene colesterol. Inhiben la citocromo P450 dependiente de la lanosterol 14 de metilasa, con lo cual disminuye la síntesis de ergosterol (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011).

Itraconazol: es un derivado sintético del imidazol. Estudios realizados en adultos demostraron una eficiencia en 20% de los casos, con 50% de mejoría de las alteraciones electrocardiográficas. Debe ser usado por períodos prolongados. Produce reacciones adversas de tipo idiopáticas, como la insuficiencia hepática, las que deben ser monitorizadas (2008).

Alopurinol: Inhibidor de la síntesis de purinas; no es eficaz en el tratamiento de la fase aguda. Se ha usado en pacientes sometidos a trasplante cardíaco con buena tolerancia. No se ha empleado en niños (Werner Apt B., et al 2008).

3.7.3 Fármacos naturales.

Los fármacos extraídos de plantas o sintetizados a partir de prototipos vegetales constituyen una excelente opción, ya que ofrecen una importante plataforma para identificar y desarrollar drogas sinérgicas contra enfermedades de génesis compleja como el Chagas (Dancey & Chen, 2006). Algunos productos bloquean la cadena respiratoria del parásito como los alcaloides del “boldo” (arbusto de la familia Monimiaceae) y naftoquinonas extraídas de *Calceolaria sessilis*; otros inhiben la respuesta del *T. cruzi* mediante estrés oxidativo originando radicales superóxido. Los triterpenos de *Arrabidaea triplenervia* y sus derivados, así como diterpenos, la komariviquinone y terpenoides aislados de *Pinus oocarpa*, poseen acción sobre epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*; sin embargo, en la mayoría no se conoce el mecanismo de acción de estos productos. Gran parte de ellos tienen efecto sobre epimastigotes y otros sobre amastigotes de cultivos. Ninguno se ha utilizado en estudios clínicos. (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011).

3.7.4 Dosis

La dosis oral recomendada para el benznidazol es de 5 a 7 mg/kg/ día en 2 o 3 tomas durante 60 días en adultos; en niños de 1 a 10 años se administran 10 mg/kg de peso al día en 2 dosis durante 60 días. En el tratamiento con nifurtimox, la dosis diaria aconsejada para el adulto es de 8 a 10 mg/kg, para los adolescentes es de 12,5 a 15 mg/kg y para los niños de 1 a 10 años es de 15 a 20 mg/kg. El fármaco se administra por vía oral en 4 tomas diarias durante 90 a 120 días (Murcia et al., 2013).

En El Salvador el tratamiento debe administrarse bajo los lineamientos descritos en los “Lineamientos Técnicos para la Prevención, Vigilancia y Control de Enfermedades transmitidas por vectores y zoonosis”, de acuerdo con la cual, la duración del tratamiento debe ser de sesenta días y debe suministrarse en todos los casos agudos; en los casos crónicos debe realizarse una evaluación clínica previa al tratamiento; en ambos casos el médico debe informar el riesgo de la aparición de efectos secundarios (Ministerio de Salud de El Salvador, 2020)

El tratamiento aprobado por el MINSAL es Nifurtimox o Benznidazol en el segundo o tercer nivel de atención según su disponibilidad; el medicamento debe ser estrictamente supervisado; previo al inicio del tratamiento se debe solicitar examen de hemoglobina,

hematocrito, leucograma, plaquetas, nitrógeno ureico, creatinina, proteínas séricas, aminotransferasas, bilirrubina, examen general de orina y radiografía de tórax; las dosis se presentan en las siguientes tablas (Ministerio de Salud de El Salvador, 2020):

Tabla 4. Tratamiento con Benznidazol en El Salvador.

Etapas de Vida	Benznidazole (Tableta de 100 miligramos) Dosis
Niños hasta 12 años	5 – 10 mg/kg/día (divididos en dos dosis) Cada 12 horas por 60 días
Adultos	5 – 7 mg/kg/día (divididos en dos dosis) Cada 12 horas por 60 días (Dosis máxima 400 mg/día)

Tabla 5. Tratamiento con Nifurtimox en El Salvador.

Etapas de vida	Nifurtimox (Tableta de 120 miligramos) Dosis
Niños (menores 40 kg)	15 – 20 mg/kg/día (divididos en tres dosis) Cada 8 horas por 60 días
Adolescentes (40 – 60 kg)	12.5 – 15 mg/kg/día (divididos en tres dosis) Cada 8 horas por 60 días
Adultos (mayores 60 kg)	8 – 10 mg/kg/día (divididos en tres dosis) Cada 8 horas por 60 días

3.7.5 Efectividad del tratamiento

Es importante mencionar que la efectividad del tratamiento puede verse afectada por: fase de la enfermedad, con 70% de los pacientes considerados recuperados en la fase aguda y sólo 20% en la fase crónica; estado fisiológico, inmunológico, edad de los pacientes, efectos colaterales de los medicamentos, falta de cumplimiento del tratamiento y expresión de resistencia a los compuestos por parte del parásito (López Antuñano, 1997); hay información que indica que la eficacia de estas drogas varía según el área geográfica, con *T. cruzi* I predominando en América Central y norte de Sur América y *T. cruzi* II en el resto de Sur América y probablemente debido a diferencias en la susceptibilidad de la droga entre diferentes cepas de *T. cruzi* (Muñoz A., Santaniello A., Pereira A., Yannuzzi J., 2012).

Se han utilizado diversas dianas moleculares para tratar de identificar potenciales moléculas con propiedades antiparasitarias; por ello se han desarrollado diversos estudios sobre la

eficacia de la terapia tripanocida que indican una alta tasa de efectos secundarios; alrededor de 30% de los pacientes infectados crónicamente tratados con benznidazol muestran algún efecto secundario y 16% de los tratamientos se descontinúan por esa razón (OMS, 2005). El itraconazol, otro agente evaluado en un experimento clínico, posee un mejor perfil de seguridad, pero un efecto tripanocida más débil (Fragata Filho et al., 1993).

3.7.6 Efectos secundarios provocados por el tratamiento

Las propiedades farmacológicas como el metabolismo en humanos, mecanismo de acción y efectos adversos no han sido estudiados en detalle. En especial, la información disponible sobre la farmacocinética en humanos (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de estas drogas es rudimentaria en el mejor de los casos y virtualmente inexistente en poblaciones especiales como niños, ancianos y mujeres embarazadas o lactantes (Arce, 2012).

Se ha evidenciado la aparición de efectos adversos hasta en el 50% de los pacientes tratados con benznidazol, siendo la más frecuente la dermatitis asociada a hipersensibilidad (Sánchez et al., 2016); otros efectos adversos son: neuropatía periférica, granulocitopenia (Murcia et al., 2013), erupción cutánea que aparece entre los 7-10 días de tratamiento, edema generalizado, fiebre, adenopatías, mialgia, artralgia, depresión de la médula ósea con trombocitopenia, púrpura, polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica (Werner Apt B., et al., 2008); y algunos de los efectos secundarios habituales del nifurtimox son: dolor abdominal, anorexia, náusea, vómito y pérdida de peso; las posibles reacciones neurológicas son: inquietud, desorientación, pérdida de memoria, insomnio, espasmos, parestesias, polineuritis, convulsiones, que desaparecen al reducir la dosis o suspender el tratamiento (Murcia et al., 2013), epigastralgia y está contraindicado en mujeres embarazadas, pacientes con insuficiencia renal y hepática (Werner Apt B et al., 2008).

Algunos pacientes tratados con benznidazol muestran un perfil de citoquinas regulado a la baja, tanto en inmunidad innata como en inmunidad adquirida, lo que demuestra el efecto inmunomodulador del benznidazol; estas citoquinas proinflamatorias tienen un papel fundamental en la aparición de las complicaciones de la parasitosis, tales como la miocarditis (Sánchez et al., 2016).

3.8 Moringa

3.8.1 Descripción botánica

Es una de las 13 especies identificadas de la familia *Moringaceae* perteneciente al género *Moringa* (

Tabla 6). Es un árbol caducifolio, presenta rápido crecimiento aproximadamente 3m en su primer año, puede alcanzar los 5m en condiciones ideales Es un árbol pequeño o mediano, varía en altura de 5 a 10 m. Florece a los siete meses de su plantación, sus flores son fragantes, de color blanco o blanco crema, de 2,5 cm de diámetro; posee vainas color marrón, triangulares, de 30 a 120 cm de largo por 1,8 cm de ancho, cada una contiene aproximadamente veinte semillas incrustadas en la médula; las semillas son de color marrón oscuro. Se identifica por las hojas pinnadas, vaina larga y leñosa que al madurar se abre en tres válvulas que contienen las semillas con tres alas (Olson, 2011). Es un cultivo originario del norte de la India, que actualmente abunda en todo el trópico, puede ser propagado por medio de semillas o por reproducción asexual (estacas), aún en suelos pobres; soporta largos períodos de sequía y crece bien en condiciones áridas y semiáridas, por lo que se considera una especie resistente que requieren poca atención hortícola con crecimiento rápido (Folkard & Folkard 1996) , presenta adaptación a diferentes condiciones edafo-climáticas, por lo que constituye una opción para la alimentación, sobre todo en los países tropicales (CONABIO, s/f); crece mejor bajo el clima insular tropical y es abundante cerca de lechos arenosos de ríos y arroyos; crece bien en los trópicos húmedos o las tierras secas calientes, tolera un amplio rango de precipitaciones, con precipitaciones mínimas anuales estimadas en 250 mm y máximas en más de 3000 mm y un pH de 5.0–9.0 (Upadhyay et al., 2015).



Figura 10. Flor de “moringa”. Fotografía propia.

Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Moringa oleifera* Lam

Reino:	<i>Plantae</i>
Phylum:	Tracheobionta
Sub-phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Magnolopsida
Orden:	Dilleniidae
Sub-orden:	Capparales
Familia:	Moringaceae
Género:	<i>Moringa</i>
Especie:	<i>oleifera</i>

3.8.2 Usos etnobotánicos.

La existencia de plantas con potencial terapéutico constituye una alternativa farmacológica de marcado interés en el tratamiento de muchas enfermedades (Zavala et al., 2010). Según Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005) se estima que más del 80 % de la población mundial, principalmente de países en vías de desarrollo, utiliza la medicina tradicional como parte de su atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales comprenden el uso de extractos de plantas o sus principios activos.

Fue introducida en América Central en los años 1920 como planta ornamental; sus propiedades medicinales se encuentran en los manuscritos hindúes que se remontan al año 150 a.C. Desde 1998, la Organización Mundial de la Salud ha promovido la implementación de la moringa como una alternativa a los suministros de alimentos para el tratamiento de la desnutrición (Domínguez, 2017).

Entre los usos medicinales que se le atribuyen se encuentra el tratamiento de enfermedades de los ojos y de la piel, dolor de cabeza, hemorroides, anti-helminfos, cálculos renales, artritis (V. Kumar, 2013) fiebres de la malaria o fiebres tifoideas, otitis, hiperglucemia, hipertensión, parasitosis intestinales, anemias (Sanjay & Dwivedi, 2015), actividad antihipertensiva, diurética, hipocolesterolemiante, antiulcerosa, hepatoprotectora, antitumoral, antibacteriana, también se usa como fertilizante, agente de limpieza, combustible biológico (biogás, biodiesel), clarificador de miel y del jugo de la caña de azúcar, disminuye la genotoxicidad del arsénico y otros metales pesados, cuyos mecanismos de acción carcinogénica están relacionados con especies reactivas de oxígeno (Bravo, 2016).

En algunos países de Latinoamérica, se utiliza para tratar gripe, tos, cólico, flatulencias, gastritis, dolor de cabeza, comezón (Velázquez-Zavala et al., 2016), arteriosclerosis, isquemia, cáncer, y cataratas (Verma et al., 2009). En El Salvador es común encontrar a la venta en mercados o tiendas de medicamentos tradicionales; cápsulas de hojas pulverizadas de “moringa”, hojas pulverizadas para preparar infusiones, semillas secas para infusiones, hojas frescas para consumo en ensaladas, planta fresca para cultivo, en la industria cosméticas para combatir problemas de acné, entre otros usos (**Figura 11**).



Figura 11. Diversidad de productos comercializados en El Salvador. (Moringa Oleífera El Salvador).

3.8.3 Actividad biológica de “moringa”.

La actividad antifúngica de extractos alcohólicos de las semillas y las hojas contra dermatofitos como *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* fue demostrada por (Chuang et al., 2007); el extracto acuoso de las hojas inhibe el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Walter et al., 2011). Otros estudios han demostrado que los extractos preparados con hojas, semillas, corteza y flores de la planta tienen actividad antimicrobiana (Nepolean et al., 2009a); las vainas inmaduras actúan como estimulantes cardíacos y circulatorios, antiépiléptica, antiinflamatoria, antiulcente, antiespasmódica, antioxidante, antidiabéticas, hepatoprotectoras, antibacterianas, antifúngicas; los extractos de flores poseen actividad antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *anti-antifungica* contra *C. albicans* (Talreja, 2010), el extracto de la cáscara de vaina posee actividad contra *S. aureus*, *S. epidermis*, *S. thyphimurium* y *E. coli* (Arora et al., 2013) mientras el extracto etanólico se comprobó que tiene actividad contra aislados de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureu*, y *Estreptococo* (Nepolean et al., 2009b).

Un estudio de toxicidad de la fracción soluble de cloroformo del extracto etanólico de las raíces de “moringa” en ratas Long Evans, resultó con exámenes bioquímicos, hematológicos e histopatológicos normales, ni presentaron cambios en la estructura celular luego de haberles administrado intraperitonealmente, el extracto en dosis de 200 mg/kg de peso corporal/día durante 7 días (Nikkon et al., 2009).

Otro estudio sobre evaluación de toxicidad aguda del extracto etanólico y acuoso de corteza de “moringa” en ratas Wistar; en la dosis límite de 5000 mg/kg de peso corporal administrada durante 14 días, no se observó ningún efecto adverso en el peso corporal y el peso interno del órgano en comparación con el grupo de control, tampoco hubo alteraciones en los parámetros bioquímicos (Lambole, 2011). La evaluación de toxicidad del polvo de hojas secas de “moringa” en ratas albinas Wistar mostró degeneración y necrosis celular en muestras de tejido de hígado; sin embargo, dichos cambios no se adjudican a las hojas; más bien se deben a la presencia de metales presentes en las hojas debido a una posible contaminación por la zona de recolección de las muestras; por lo tanto el uso de las hojas secas tanto como alimento y medicina puede continuar siempre y cuando su uso no sea prolongado (Ambi et al., 2011b).

Las hojas frescas contienen menos nutrientes en comparación con las secas; las hojas secas contienen 17 veces el Ca de la leche, diez veces la vitamina A de las zanahorias, 15 veces el K de los plátanos y 25 veces el hierro de las espinacas, 27,2 % (proteína) o 0,58–0,73 g de proteína/g, 5,9 % de humedad, 17,1 % de grasa, 38,6 % de carbohidratos, aminoácidos esenciales y carotenoides (Muhammad et al., 2016).

A continuación, se presenta un cuadro resumen con diversos estudios realizados con diferentes estructuras morfológicas de la “moringa” y los efectos causados (Tabla 7).

Tabla 7. Actividades biológicas presentes en “moringa” (Asensi et al., 2017).

Parte del árbol	Efecto descrito	Tipo de estudio
Semillas	Antiinflamatorio en colitis ulcerosa	In vivo (rata)
Hoja	Antioxidante en esteatosis hepática	In vivo (ratón)
Hoja	Antioxidante directo e indirecto	In vitro (hepatocitos ratón)
Corteza	Inmunomodulador/antiinflamatorio vascular	In vitro (monocitos humanos)
Hojas	Antiinflamatorio vascular	In vitro (macrófagos ratón)
Semilla	Antioxidante hepático en dietas grasas	In vivo (ratón) e in vitro (hepatocitos ratón)
Semilla	Control de la diabetes mellitus tipo 1	In vivo (rata)
Hoja	Control de la diabetes mellitus tipo 2	In vivo (humanos)
Hoja	Protector en intoxicación por arsénico	In vivo (ratón)
Hoja	Disminuye la fatiga muscular	In vivo (ratas)
Semilla y vaina	Antimicrobiano bacterias multirresistentes	Cultivo (Gram+ y Gram-)
Semilla	Antimicrobiano en biofilms	Biofilms
Hoja	Antimicrobiano bacterias multirresistentes	Cultivo (Gram-)
Hoja, semilla, tallo, vaina y flores	Antimicrobiano (<i>Vibrio spp.</i> y <i>E. coli</i>)	En agua contaminada
Semilla	Antimicrobiano (<i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>)	En agua contaminada
Hoja	Antiséptico de manos (<i>E. coli</i>)	In vivo (humanos)

3.8.4 Componentes activos.

3.8.4.1 Fenol

Está constituido por un anillo aromático que se une a un grupo hidroxilo. En los últimos años ha aumentado el interés por los compuestos fenólicos debido a su contribución a la salud; la ingesta de ellos en la dieta habitual puede ayudar a atenuar enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer que se asocian con el estrés oxidativo (Joaquin Martínez, 2020). El género *Moringa* tiene una alta actividad antioxidante principalmente debido a su alto contenido de polifenoles bioactivos.

3.8.4.2 Cumarinas

Posee un anillo aromático unido a un heterociclo con oxígeno. Entre sus propiedades están la actividad antioxidante y antibacteriana (Joaquin Martínez, 2020).

3.8.4.3 Flavonoides

La estructura básica de los flavonoides consta de tres anillos: un anillo aromático, un anillo fenólico y el anillo heterocíclico. Ofrecen a las plantas protección frente a patógenos, herbívoros y a la radiación ultravioleta. Poseen propiedades antioxidantes y quelantes de metales; además de ser capaces de prevenir el daño producido por los radicales.

Fisicoquímicamente el almacenamiento, luz, oxígeno, pH, temperatura y oscuridad son factores que provocan variaciones significativas en la actividad antioxidante, especialmente el oxígeno y la luz, que generan degradación severa de los flavonoides, sin embargo, son estables ante la luz en alimentos crudos debido a la protección que les proporciona la matriz vegetal, mientras que en alimentos procesados sufren fotodegradación (Joaquín Martínez, 2020).

Anteriormente se mencionaron algunos de las propiedades terapéuticas que han sido estudiadas de diferentes partes de *M. oleifera*, por lo tanto, es importante conocer los compuestos específicos presentes en las plantas, a los cuales se le atribuyen dichas propiedades.

Algunos metabolitos secundarios que se encuentran en *M. oleifera* son (Ascencio, 2012):

- **Fenoles:** Son compuestos hidroxilados.
- **Taninos:** actúan como barrera por su sabor amargo.
- **Cumarinas:** inhiben el crecimiento de hongos y son tóxicas para nemátodos, ácaros e insectos.
- **Terpenos:** Son los principales constituyentes de los aceites esenciales y actúan como repelentes e inhibidores de la alimentación y la oviposición.
- **Glicósidos cianogénicos.** Al hidrolizarse liberan cianuro, por lo que son tóxicos y repelentes.
- **Compuestos azufrados.** Poseen con acción insecticida y nematicida.
- **Flavonoides:** Son los compuestos que dan color a plantas y flores, a ellos pertenece la rotenona, y actúan como inhibidores enzimáticos y repelentes.
- **Alcaloides:** Son el grupo más diverso de metabolitos secundarios, con muy variados efectos tóxicos; a ellos pertenece la nicotina.

Se han identificado metabolitos secundarios en diversas partes de la “moringa” como taninos, saponinas, polifenoles, flavonoides como el campferol, quercetina, mirecetina, isoramnetina, glucósidos de campferol, quercetina y rutinósidos; malonilglucósidos, isocianatos, esteroides, glucoesteroides, ácidos grasos, glucósidos cardíacos, glucósidos fenólicos (Talreja, 2010),

Niazinina A [1; O-metil 4-[(L-rhamnosiloxy) tiocarbamato (E)] y niazimicina [2; O-etil 4-[(L-rhamnosyloxy) benzylo] tiocarbamato (E)] (Faizi S, Siddiqui B, Saleem R, Siddiqui S, 1992), ácido 3-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, epicatequina y ácido o-cumárico (Muhammad et al., 2016); análisis fitoquímicos muestran que posee un alto contenido en minerales como Calcio, Cobre, Hierro, Potasio, Magnesio y Zinc, y es una buena fuente de proteínas, vitaminas, β -caroteno, aminoácidos y varios compuestos fenólicos (Holguín, 2016). Posee un alto contenido de Vitamina C, el cual facilita la conversión del colesterol en ácidos biliares, por lo tanto, reduce los niveles de colesterol en la sangre; posee propiedades antioxidantes, protegiendo al cuerpo de los efectos perjudiciales de los radicales libres, contaminantes y toxinas (Padayachee & Baijnath, 2019), además contiene vitamina E que funciona como agente antioxidante, está involucrada en la modulación de la expresión génica, la inhibición de la proliferación celular, la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos y la regulación de la masa ósea, mientras la tiamina, riboflavina y niacina presentes en las hojas actúan como cofactores de muchas enzimas involucradas en el metabolismo de los nutrientes y la producción de energía (Leone et al., 2015).

Estudios de espectrometría de fluorescencia de rayos X de dispersión de energía (EDXRF) de las hojas frescas de “moringa” realizados por Ambi et al., (2011b) y (Holguín, 2016), mostraron que la planta es rica en Calcio, Hierro y Potasio, además reportan que las hojas secas al aire contienen Azufre, Cloro Calcio, Potasio, Azufre, Cromo, Manganeso, Estroncio, Rubidio, Zirconio y Molibdeno.

Investigadores realizaron estudios en las hojas secas y en polvo de *Moringa oleifera* en el cual se caracterizaron varios constituyentes químicos. La muestra de polvo de hoja examinada contiene 28.7% de proteína cruda, 7.1% de grasa, 10.9% de ceniza, 44.4% de carbohidratos, 3.0 mg de calcio y 103.1 mg de hierro por 100 g, 20.7 mg de taninos /g, 17 mg de nitrato /g, 10.5 mg de oxalato /g, 161 μ g de β -caroteno /g y 47 μ g de luteína /g mientras el extracto seco 22.6% de fibra, 2.73% de ceniza, 3.78% de proteína, 9.53% de azúcares totales, 0.00746% de calcio, 0.0549 % de hierro, y 0,0468% de catequinas / flavonoides totales (0,0323% de epicatequina) (Stohs & Hartman, 2015).

3.8.5 Ensayo de viabilidad celular – cultivo *in vitro*

El ensayo de viabilidad celular es un método para determinar el número de células viables en un cultivo *in vitro*, mediante la cuantificación de la cantidad de ATP presente, lo que indica la presencia de células metabólicamente activas; la cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo; la lisis celular y la generación de la señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra (**Figura 12**). El ensayo proporciona una forma sensible y rápida para medir el número de células viables en un cultivo celular y permite también cuantificar efectos citotóxicos de tratamientos experimentales.

El ensayo de luminiscencia utiliza un reactivo llamado CellTiter-Glo 2.0 (**Figura 13**); Figura 13 se basa en las propiedades de una enzima llamada luciferasa termoestable patentada (luciferasa recombinante Ultra-Glo™), la enzima cataliza la oxidación del sustrato luciferina para generar un "tipo de resplandor" o Señal luminiscente (Promega, 2017)

De acuerdo con la reacción de la luciferasa para este ensayo: la mono oxigenación de luciferina es catalizada por luciferasa en presencia de Mg^{2+} , ATP, que es contribuido por células viables y oxígeno molecular (Promega, 2017).

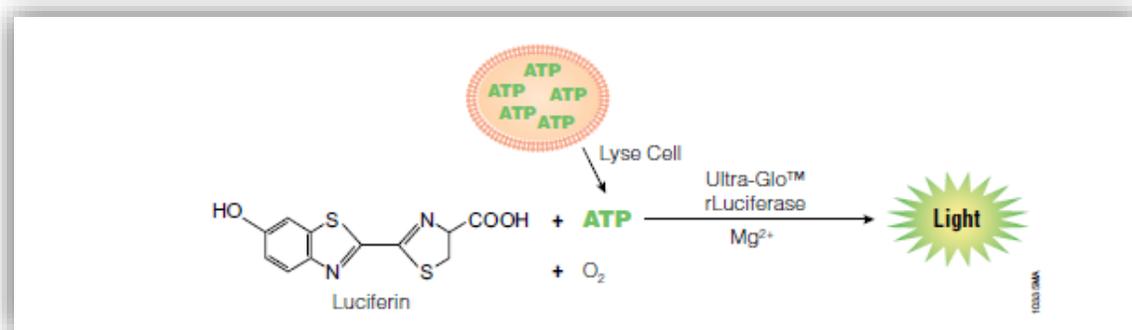


Figura 12. Descripción del principio del ensayo de viabilidad celular (Promega, 2017).

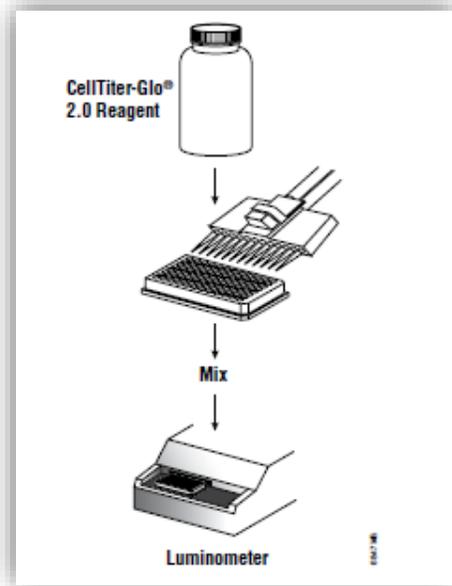


Figura 13. Descripción general del ensayo CellTiter-Glo (Promega, 2017).

3.8.6 Solvente (metanol).

El metanol, fórmula semidesarrollada $\text{CH}_3\text{-OH}$, posee un punto de ebullición de 65°C ; es un alcohol de cadena lineal alifática, es además un disolvente prático lo que indica que es una molécula muy polar, contiene protones H^+ ácidos que forman puentes de hidrógeno con los solutos. En comparación con otros solventes por ejemplo respecto al etanol es menos polar, pero es más polar que el agua. La alta polaridad permite extraer mayor cantidad de fitocompuestos. Es miscible en agua, alcoholes, ésteres, cetonas y muchos otros solventes. . También se usa en la producción de formaldehído, ácido acético, cloro metanos, metacrilato de metilo, metilaminas, dimetil tereftalato y como solvente o anticongelante en pinturas en aerosol, pinturas de pared, limpiadores para carburadores, y compuestos para limpiar parabrisas de automóviles (WIKIPEDIA, 2023).

3.8.7 Dimetil Sulfóxido (DMSO).

El DMSO (CH_3SOCH_3) es un líquido orgánico sin color que contiene sulfóxido, usado como disolvente orgánico industrial, como criopreservante y como un medicamento (reduce el dolor y la inflamación); tiene la capacidad de atravesar rápidamente la epidermis y las

membranas celulares por lo que es utilizado como vehículo fármacos o venenos. El Metanol está presente de forma natural en el ser humano, los animales y las plantas. Es un elemento constitutivo natural en la sangre, orina, la saliva y el aire expirado. Se ha descrito una concentración media de Metanol en orina de 0,73 mg/litro (intervalo de 0,3-2,61 μ g/litro) en individuos no expuestos y una gama de 0,06 a 0,32 μ g/litro en el aire expirado (Sierralta, 2014).

4. METODOLOGÍA

4.1 Colecta de material vegetal

Las hojas de “moringa” fueron colectadas en la Finca Angelita El Recuerdo, Cantón Loma del Muerto, municipio de Sonsonate, Departamento de Sonsonate. Georreferencia latitud 13.749625°, longitud -89.726973°; altitud de 435msn (**Figura 14**); en el mes de marzo de 2021 para su identificación botánica (taxonómica), posteriormente en el mes de julio 2021 fue llevado al laboratorio de productos naturales para la elaboración de extracto. Las hojas fueron colectadas de árboles maduros, a una altura media de la planta de 2 a 5m, según lo descrito por (Cabrera-Carrión et al., 2017) (**anexo 1**); pues indican que la mayor concentración de metabolitos secundarios se encuentra en dichas hojas. Las hojas colectadas fueron almacenadas frescas en papel periódico para su transporte hacia el laboratorio.

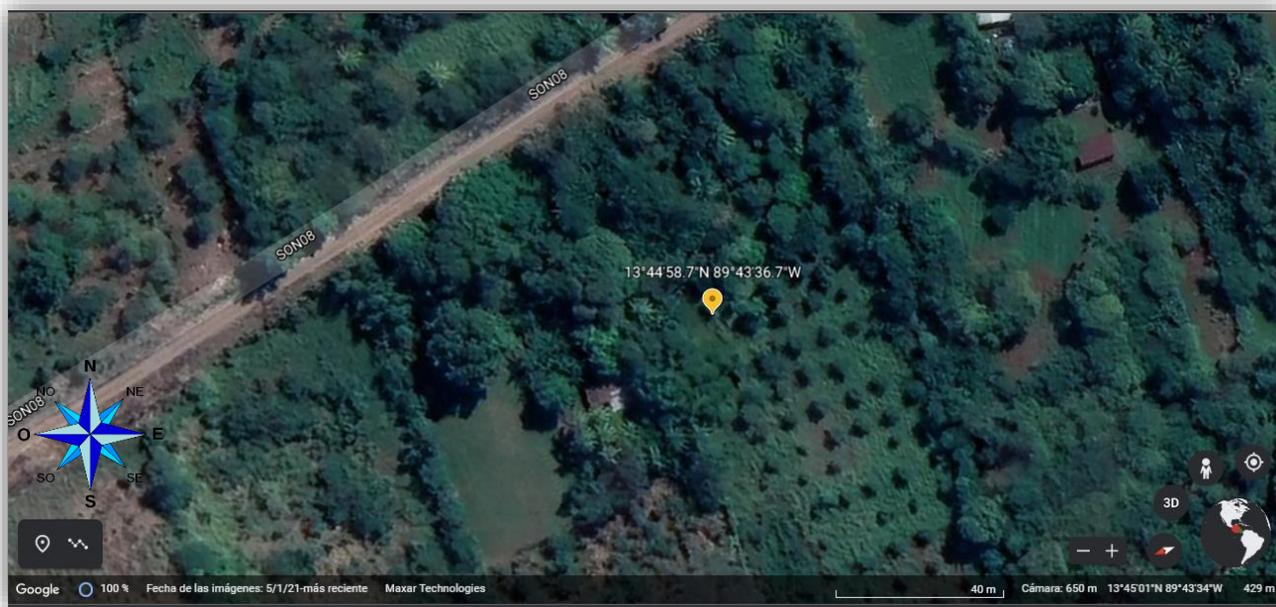


Figura 14. Imagen satelital de sitio de colecta.

4.1.1 Materiales y equipo, fase de campo

- Guantes de jardinería.
- Cuerda de poliestireno de 10 metros.
- Navaja pequeña.
- Machete.
- Prensa de madera para muestras vegetales.
- Marcador.
- GPS.
- Papel Kraft o periódico.
- Bolsa de plástico jardinera.
- Tijera para podar
- Caja de plástico

4.2 Identificación botánica

Una muestra del material vegetal fue llevado al Jardín Botánico de La Laguna, para su identificación taxonómica; donde se asignó un voucher de identificación. Se colectó una muestra de 35cm de longitud aproximadamente que incluía hojas, vainas y flores. La muestra fresca fue extendida sobre un papel periódico (**anexo 2**) para que absorbiera toda la humedad y colocada en prensa botánica por 3 días. La identificación botánica resume que es *Moringa oleifera*. Además de la colecta se registraron datos de: nombre común (“moringa”, “teberinto”), fecha y lugar de colecta, nombre de personas que realizaron la colecta, geo referencia.

4.3 Obtención de extracto

Las hojas frescas colectadas fueron llevadas al laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia de la universidad de El Salvador con latitud 13,7177437° y longitud -89,201128°; y fueron secadas a 40°C en estufa de aire circulante (BIOBASE, Modelo BOV-V225F) (**Figura 15 A**) por 72 h. Las hojas secas (**anexo 3**) se trituraron en un Molino de cuchillas con un tamiz de 2mm (Thomas- Wiley, Modelo 4, Marca Thomas Scientific) (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**B**). Se pesaron 50g de material seco (**Figura 15 C**) y se colocó 500mL de metanol absoluto (solvente) (**anexo 4**); relación 1:10p/v. Se dejó en reposo por 10 días a temperatura ambiente (promedio de 30 °C) (**Figura 15 D**), luego se filtró con papel filtro y se rotaevaporó a presión reducida de 250Pa en rotavapor (Yamato Scientific Co., Ltd., Japón modelo RE801) (**Figura 15 E**); posteriormente con una pipeta de transferencia limpia se depositó el extracto en un frasco de vidrio estéril (**anexo 5**); se realizaron lavados con diclorometano y se colocó el balón en ultrasonicador (VWR, EE.UU., modelo 97043-988, frecuencia de funcionamiento a 35kHz) por 90 minutos a 25°C, para recolectar la mayor proporción de extracto que estaba depositado en las paredes del balón; luego se colocó en una campana de desecación por 72h; y finalmente se pesó (**Figura 15 F**). Se obtuvieron 7.2688g de extracto metanólico seco.



Figura 15. Marcha de obtención de extracto metanólico. Elaboración propia.

4.3.1 Porcentaje de rendimiento de extracto.

Hace referencia a la cantidad de extracto obtenido en relación con la cantidad de materia prima utilizada para su elaboración. Para el extracto de “moringa” se utilizó 50g de material seco y se obtuvo 7.2688g de extracto; dando como resultado un porcentaje de rendimiento de 14.54%. A continuación, se presenta la fórmula utilizada:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{peso neto de extracto seco}}{\text{peso de material seco}} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{7.2688\text{g}}{50\text{g}} \times 100$$

$$\% \text{ de rendimiento} = 14.5376$$

4.4 Preparación de soluciones de trabajo.

Todas las soluciones de trabajo se prepararon con DMSO (dimetilsulfóxido) como vehículo. La metodología para evaluación de viabilidad celular fue la utilizada según (Castillo et al., 2021), bajo el marco del proyecto SATREPS- Chagas, patrocinado por la Cooperación Japonesa (en ejecución). Las concentraciones utilizadas han sido desarrolladas para el proyecto en ejecución.

4.4.1 Benznidazol (control positivo).

Se prepararon 2 concentraciones de Benznidazol: 10mM, 1.25 mM

4.4.2 Diluciones de extracto metanólico de hojas de “moringa”.

Se prepararon 2 concentraciones de extracto metanólico: 10 mg/ml y 1 mg/ml.

4.4.3 Control interno.

Medio de cultivo LIT (Liver infusion tryptose) sin parásitos más la solución a ensayar. Se utilizó un control interno para el control positivo que incluye medio de cultivo más control positivo y un control interno para el extracto que incluye medio de cultivo más extracto.

4.5 Preparación de curva de crecimiento.

Parásitos: Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* cepa CL-Brenner; a concentración inicial de 9×10^5 epimastigotes de *T. cruzi*/mL, provenientes de cultivo celular, provistos por CICES (Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador). Luego se realizaron diluciones descendentes de (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 epimastigotes de *T. cruzi*/mL).

4.6 Evaluación actividad tripanocida

Para la evaluación de actividad tripanocida del extracto metanólico de hojas de “moringa”, se utilizó el ensayo de viabilidad celular por el método de luminiscencia de punto final con el equipo Biotek, synergy HTX multi-mode reader.

Los parásitos fueron cultivados en medio LIT. Las soluciones de extracto y benznidazol fueron disueltas en Dimetil sulfóxido (DMSO), cada muestra fue evaluada por triplicado (tanto controles como sustancia evaluada).

Se realizó la lectura de luminiscencia emitida por los parásitos (en medio LIT) sin la presencia de los fármacos o el extracto. Se realizaron mediciones de cinco concentraciones de parásitos ($9 \times 10^5 - 9 \times 10^1$), con el fin de realizar una curva de crecimiento del número de parásitos presentes en los diferentes pocillos, con el fin de ver el comportamiento de los parásitos. Se realizaron tres lecturas y se calcularon los promedios de dichas lecturas; también se calculó la desviación estándar y los porcentajes de la desviación; además se calculó el valor del promedio de luminiscencia producida por los parásitos menos el valor de luminiscencia del medio LIT (27), que indica el valor del número de parásitos menos la luminiscencia producida por el medio.

La curva de crecimiento se realizó para poder obtener un parámetro de comparación entre la cantidad de parásitos viables y la luminiscencia producida por la presencia de dichos parásitos. Entre mayor sea la cantidad de parásitos viables, mayor es la lectura de luminiscencia.

Se obtuvo el valor del coeficiente de Pearson para obtener el parámetro del comportamiento del crecimiento de los parásitos en el medio de cultivo versus el valor de lectura de luminiscencia; para ello se utilizaron los valores de número de parásitos presentes en los pocillos de la curva de crecimiento (concentraciones de parásitos de $9 \times 10^5 - 9 \times 10^1$) y los valores de Luminiscencia emitida por los parásitos menos el valor de luminiscencia emitida por el medio LIT; esto con el fin de evaluar si existe correlación entre ambas variables.

A continuación, se presenta la gráfica de número de parásitos *Trypanosoma cruzi* menos el valor de la luminiscencia del medio LIT **Figura 16**:

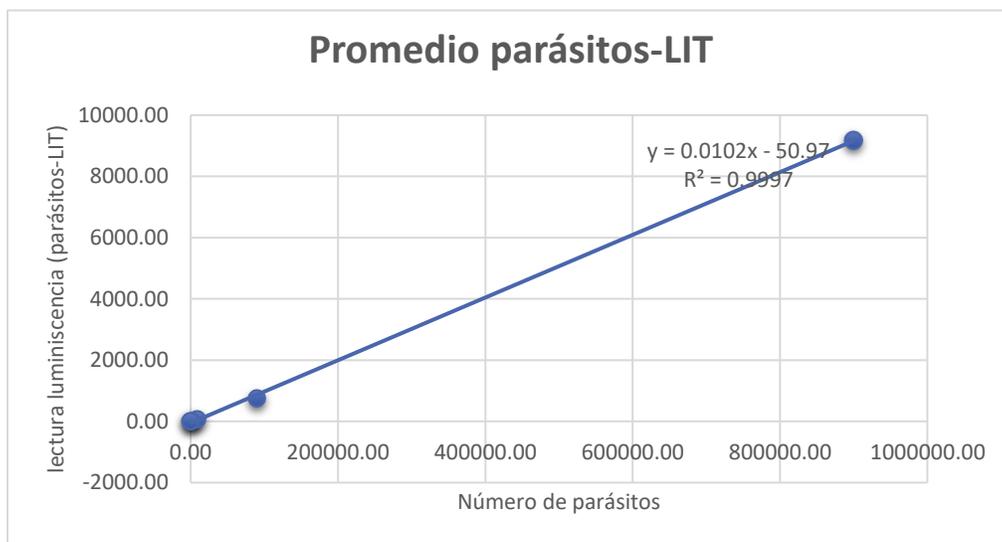


Figura 16. Número de parásitos vs. Luminiscencia emitida por los parásitos (menos valor de luminiscencia de medio LIT).

Al graficar los valores se obtuvieron los valores de “Y” y los valores de constante “CTE” siguientes:

Y	CTE
0.0102	50.97

A continuación, se presentan el valor de coeficiente de correlación de Pearson:

- Valor de Coeficiente de correlación Pearson = 0.9995084
- Valor de Coeficiente de correlación Pearson ≈ 1
- Valor de coeficiente de correlación = 1; indica correlación directa perfecta.
- $R^2 = \text{Coeficiente de correlación Pearson}^2$
- $R^2 = 1^2$
- $R^2 = 1$

La intensidad lumínica observada, es directamente proporcional al número de parásitos viables en el medio y esto se deduce a partir del coeficiente de Pearson (0.9995) observado. Una vez obtenidos los valores de las constantes, del control interno y de la curva de crecimiento, se realizaron lecturas de luminiscencia del fármaco control y del extracto de “moringa”; indicando la luminiscencia emitida únicamente por las sustancias, esas lecturas

fueron restadas posteriormente. Se realizaron tres lecturas de cada concentración de las sustancias evaluadas. La concentración stock de parásitos utilizada: 9×10^5 .

La marcha de trabajo se detalla a continuación **Figura 17**:

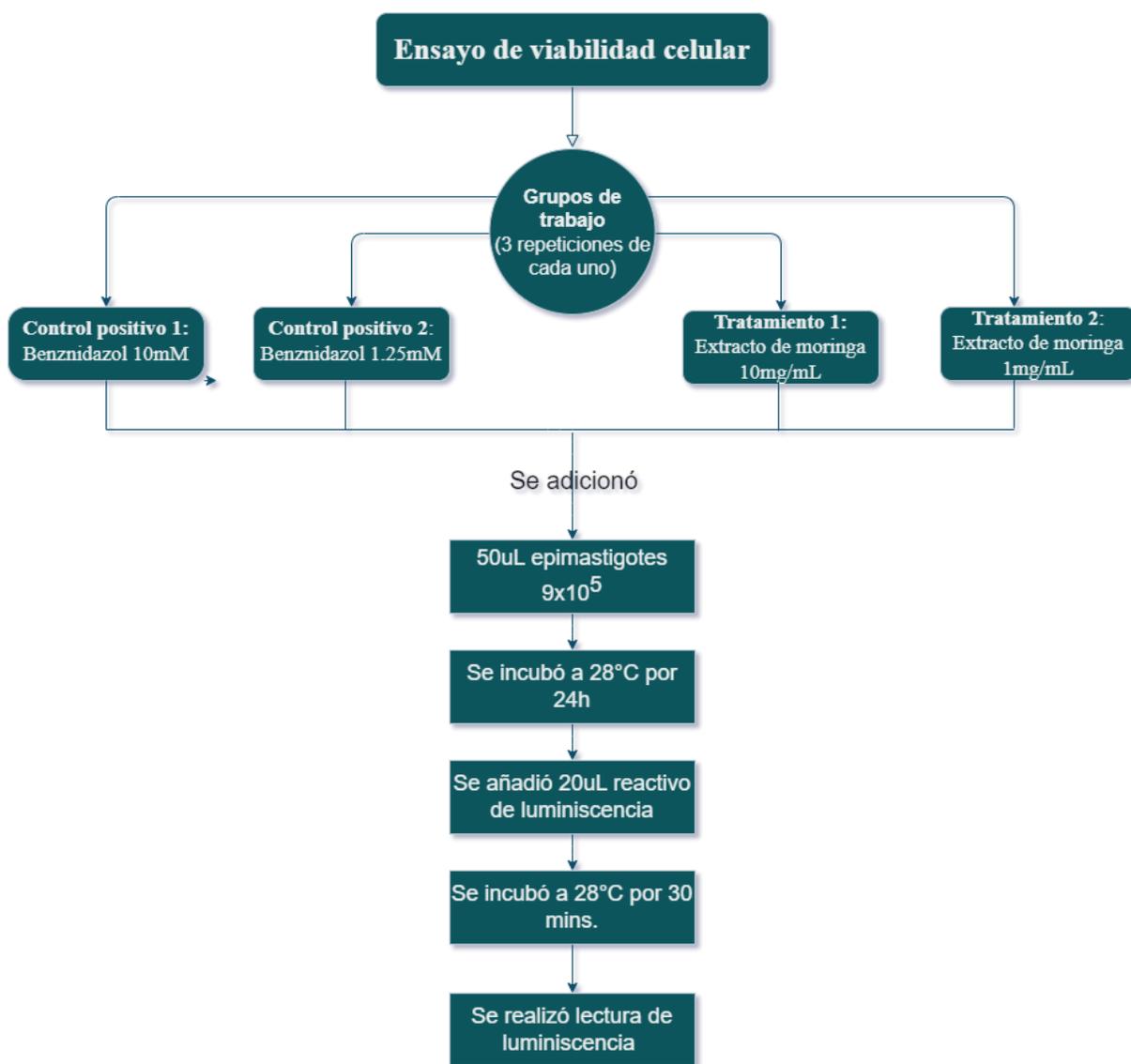


Figura 17. Marcha de trabajo de ensayo de viabilidad in vitro. Elaboración propia.

- Se colocó en una placa blanca PE Optiplate de 384 pocillos medio LIT a cada pocillo.
- A los pocillos del control positivo se agregó 50µL de las dos concentraciones de Benznidazol (10mM y 1.125mM), ambas concentraciones fueron añadidas por triplicado).
- A los pocillos del extracto evaluado, se agregó 50µL de las dos concentraciones (10mg/mL y 1mg/mL) de extracto metanólico de “moringa”, por triplicado.
- El control interno solo contenía medio LIT sin parásitos.
- Luego de adicionado el extracto y Benznidazol (control positivo), se agregó 50µL de solución de aislado de epimastigotes a una concentración de 9×10^5 parásitos/mL a cada pocillo; exceptuando los pocillos que contienen el control interno.
- Posteriormente se incubó la placa a 28°C por 24 horas.
- Luego de la incubación, se agregó 20µL del reactivo de luminiscencia (CellTiter-Glo, Promega G7570) a cada pocillo.
- Se incubó la placa por 15-30 min a 28 °C.
- Se midió la luminiscencia de la placa en el luminómetro (synergy HTX multi-mode reader) con agitación orbital de 2 minutos, temperatura de incubado a 28°C y un tiempo de integración de 1 segundos.

4.7 Análisis fitoquímico.

Se tomó una muestra de 50mL del extracto para realizar el análisis fitoquímico; se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia mediante cromatografía de capa fina.

4.8 Materiales y equipo; fase de laboratorio.

- | | |
|-----------------------------|---|
| • Agua destilada. | • Campana de desecación. |
| • Agitador de vidrio. | • Cámara de Flujo Laminar. |
| • Algodón. | • Centrífuga. |
| • Balanza Analítica. | • Cuaderno de laboratorio. |
| • Balanza granataria. | • Diclorometano. |
| • Balón volumétrico 1000mL. | • Dimetil sulfóxido. |
| • Beaker 100mL. | • Estufa de aire circulante (BIOBASE, Modelo BOV-V225F) |
| • Beaker de 1000mL. | • Embudo de vidrio. |
| • Benznidazol. | |

- Erlenmeyer 500ml.
- Éter etílico.
- Frascos de vidrio de 10mL.
- Gasa estéril.
- Gradilla para muestras.
- Guantes de nitrilo o látex.
- Incubadora.
- Juego de Micropipetas.
- Laptop.
- Luminómetro Biotek, synergy HTX multi-mode reader.
- Marcador permanente.
- Mascarillas.
- Metanol absoluto.
- Medio de cultivo LIT.
- Microscopio.
- Mortero y pistilo de porcelana.
- Molino de cuchillas con un tamiz de 2mm (Thomas- Wiley, Modelo 4, Marca Thomas Scientific).
- Papel Parafilm
- Papel toalla.
- Papel plastificado.
- Papel Whatman.
- Pipetas de transferencia.
- Placa blanca PE Optiplate de 384 pocillos
- Probeta 100mL.
- Probeta de 500mL.
- Puntas 0.1- 10 µl.
- Puntas 10-200 µl.
- Rotavapor (Yamato Scientific Co., Ltd., Japón modelo RE801).
- Solución salina.
- Ultrasonicador (VWR, EE. UU., modelo 97043-988)
- Viñetas.
- Vórtex.

4.9 Procesamiento de datos

Se realizó un análisis descriptivo de lecturas de luminiscencia de las curvas de crecimiento del parásito y en el ensayo de viabilidad celular para los diferentes grupos de tratamiento.

6. RESULTADOS

6.1 Especie vegetal.

La muestra recolectada de la especie vegetal de “moringa” contenía flores, vainas y hojas; fue colectada en la finca “Angelita El Recuerdo”, ubicada en el municipio de Sonsonate, departamento de Sonsonate y fue llevada al herbario del Jardín Botánico donde fue identificada y se le asignó un número de voucher **Figura 18**.

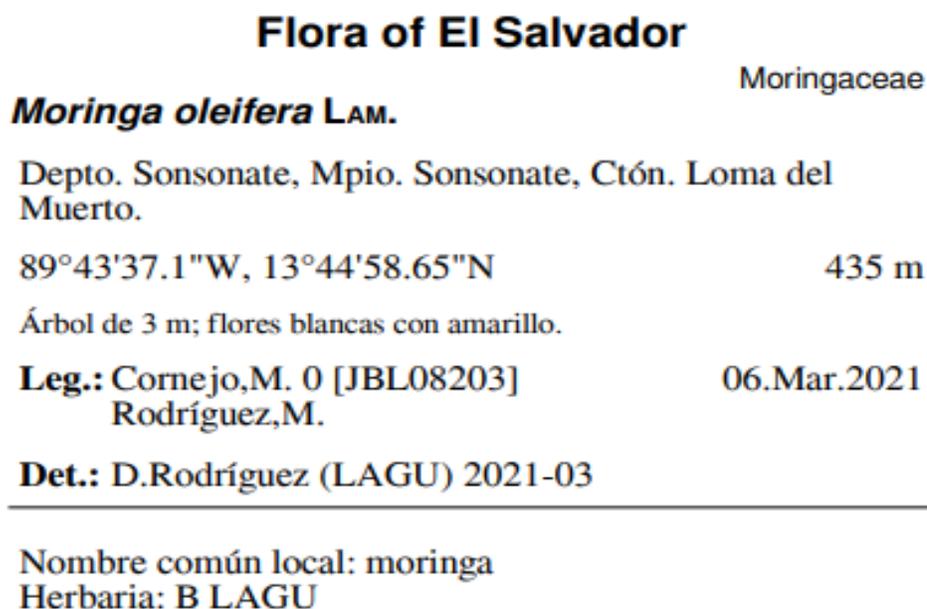


Figura 18. Voucher de identificación del museo del Plan de La Laguna.

6.2 Extracto

El extracto metanólico de “moringa” se realizó en una proporción 1:10 (soluto: solvente) lo que permitió lograr una buena disolución sin saturar el solvente, con el fin de evitar la presencia de soluto sin disolver que conlleva a metabolitos sin disolver y con ello dar un reporte erróneo del análisis fitoquímico.

El porcentaje de rendimiento del extracto reportado es de 14.5376%.

6.3 Análisis fitoquímico.

En el análisis fitoquímico de “moringa” se evidenció la presencia de siete metabolitos secundarios que se enlistan en **Tabla 8** y (**anexo 6**):

Tabla 8. Resultados fitoquímicos de “moringa”.

Metabolito secundario		Resultado
Terpenoides	Vainillina/ CCF	+
Saponinas	Espuma/ Tubo de ensayo	+
Antraquinonas	Bornträger/ CCF	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet/ CCF	+
Flavonoides	AlCl ₃ / CCF	+
Compuestos fenólicos	FeCl ₃ / CCF	+
Cumarinas	KOH/ CCF	+

Se realizó la lectura de luminiscencia producida por el medio de cultivo LIT, la cual se realiza para usarse como control interno; dicho valor (promedio) se resta al valor de luminiscencia emitida por los parásitos en la curva de crecimiento **Tabla 9**.

Tabla 9. Lectura de control interno de muestras.

Luminiscencia LIT (control interno)			promedio
33	27	21	27

A continuación, se muestran las lecturas de luminiscencia de la curva de crecimiento de parásitos en medio LIT en concentraciones de 9×10^1 a 9×10^5 parásitos; cada concentración de parásitos fue realizada por triplicada y se calculó el promedio. Además, se restó el valor de lectura del control interno (27) **Tabla 10**.

Tabla 10. Lectura de luminiscencia de curva de crecimiento.

# parásitos	Repetición			Lectura Promedio	% Desviación	Desviación Estándar	Luminiscencia de parásitos menos luminiscencia LIT (27)
	1	2	3				
9X10 ⁵	9827	9328	9075	9201.50	1.94	178.90	9174.50
9X10 ⁴	897	703	719	773.00	13.93	107.68	746.00
9X10 ³	94	115	77	85.50	14.06	12.02	58.50
9X10 ²	30	24	28	29.00	4.88	1.41	2.00
9X10 ¹	32	29	27	28.00	5.05	1.41	1.00

La siguiente tabla muestra los valores de lectura de luminiscencia emitida por control positivo (Benznidazol) y del extracto de “moringa” **Tabla 11**.

Tabla 11. Lecturas de luminiscencia de Benznidazol y extracto de “moringa”.

	Benznidazol				Moringa		
	Repetición				Repetición		
	1	2	3		1	2	3
10 mM	6727	6679	6869	10mg/mL	6296.2146	6658.7736	7021.3326
1.25 mM	8857	8405	8350	1mg/mL	6644.9118	7037.4384	7429.965

Para calcular el valor de número de parásitos se sumó el valor de la constante obtenida mediante la gráfica de la curva de crecimiento (50.97) y luego se dividió por el valor de $Y=0.0102$. La **Tabla 12** muestra el número de parásitos sobrevivientes en cada repetición y la **Tabla 13** muestra los promedios de parásitos sobrevivientes en cada concentración evaluada.

Tabla 12. Número de parásitos sobrevivientes.

Concentración	Benznidazol			Concentración	Moringa		
	Repetición				Repetición		
	1	2	3		1	2	3
10 mM	662513.40	657807.52	676434.97	10mg/mL	620279.54	655824.54	691369.54
1.25 mM	871336.93	827023.20	821631.05	1mg/mL	654465.54	692948.54	731431.54

Tabla 13. Promedio de número de parásitos sobrevivientes.

Concentración	Promedio de parásitos		Desviación Std.		% Desviación	
	Benznidazol	"moringa"	Benznidazol	"moringa"	Benznidazol	"moringa"
10 mM/ 10mg/mL	665585.29	655824.54	9686.22	35545.00	1.46	5.42
1.25 mM/ 1mg/mL	839997.06	692948.54	27274.70	38483.00	3.25	5.55

La gráfica siguiente (**Figura 19**) muestra la actividad tripanocida, es decir el número de parásitos sobrevivientes ante la presencia de Benznidazol y el extracto metanólico de “moringa”.

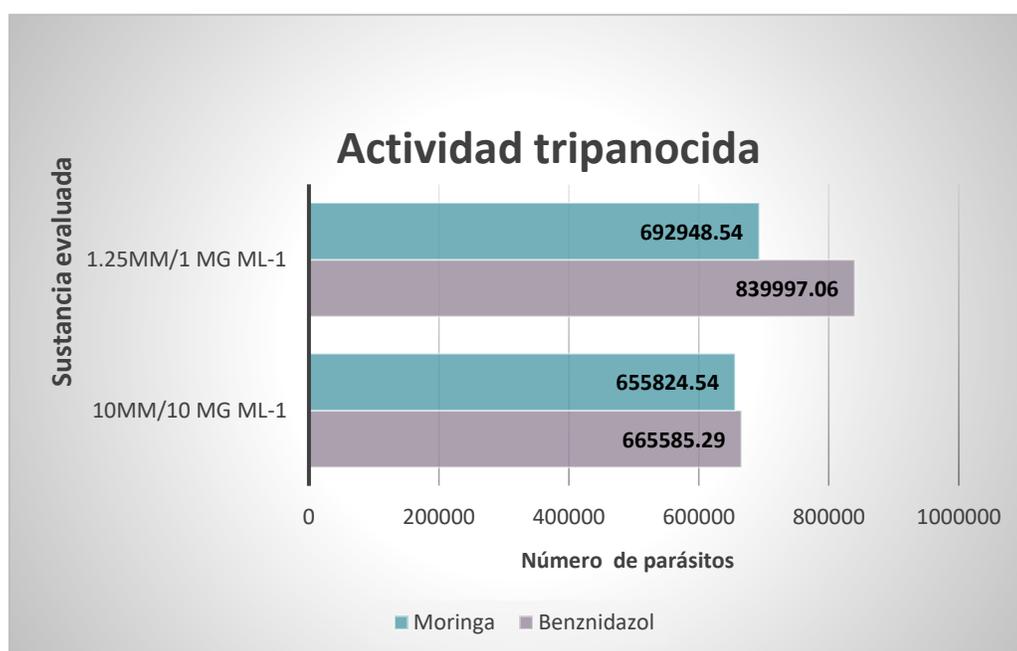


Figura 19. Actividad tripanocida presentada en número de parásitos sobrevivientes.

La Viabilidad fue expresada en porcentaje de parásitos vivos. Indica el número de parásitos vivos según cada fármaco entre la concentración máxima de parásitos (9×10^5) $\times 100$, los porcentajes se muestran en la **Tabla 14** y se han representado en la gráfica **Figura 20**.

Tabla 14. Porcentaje de viabilidad de parásitos.

	Porcentaje		Desviación	
	Benznidazol	"moringa"	Benznidazol	"moringa"
10mM/10mg/mL	73.95	72.87	1.08	3.95
1.25 mM/1mg/mL	93.33	76.99	3.03	4.28

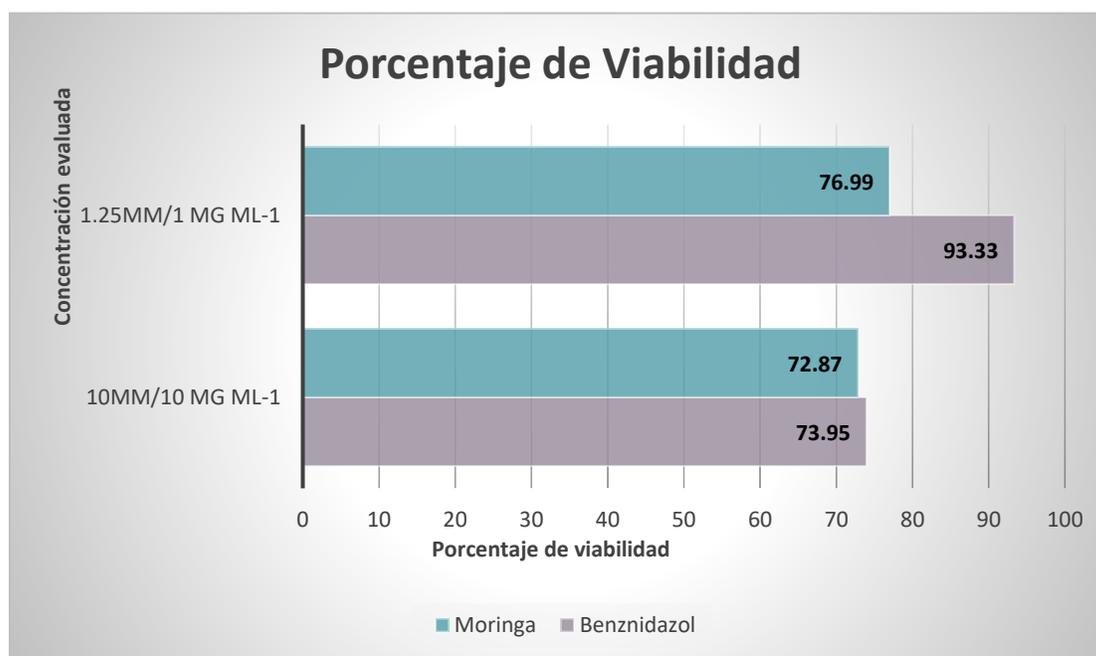


Figura 20. Viabilidad de parásitos fármacos versus extracto "moringa".

El porcentaje de mortalidad de parásitos se calculó restando el porcentaje de parásitos sobrevivientes al cien por ciento; esto con el fin de facilitar la comprensión de actividad tripanocida del extracto en términos de porcentaje. Para ello los porcentajes se muestran en la **Tabla 15** y se han presentado en el gráfico **Figura 21**.

Tabla 15. Porcentaje de mortalidad de parásitos.

Mortalidad	Promedio		Desviación	
	Benznidazol	"moringa"	Benznidazol	"moringa"
10 mM/ 10 mg mL ⁻¹	26.05	27.13	1.08	3.95
1.25 mM/ 1 mg mL ⁻¹	6.67	23.01	3.03	4.28

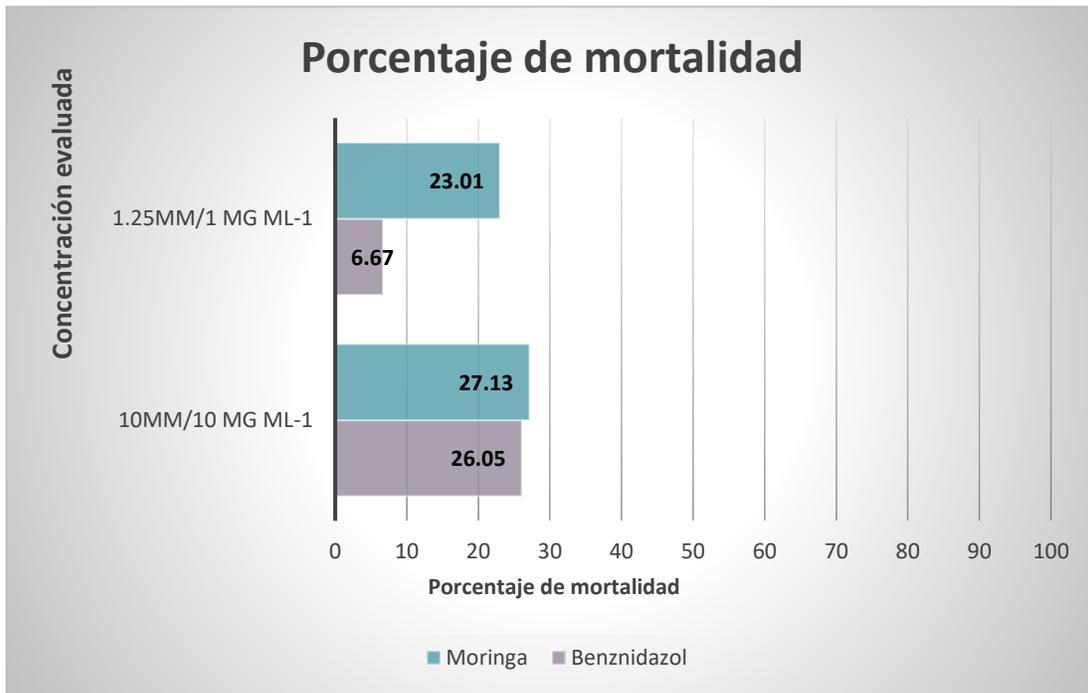


Figura 21. Mortalidad de parásitos fármacos versus extracto “moringa”.

7. DISCUSIÓN

El análisis fitoquímico cualitativo del extracto metanólico de hojas de *Moringa oleifera* utilizado en este estudio indicó la presencia de flavonoides, saponinas, terpenos, antraquinonas, sesquiterpenlactonas, compuestos fenólicos y cumarinas; esto está en línea con estudios previos donde se ha utilizado metanol como solvente (Aremu et al., 2018) y etanol (Nepolean et al., 2009b), donde se reportaron flavonoides (Aremu et al., 2018; Nepolean et al., 2009a), saponinas (Aremu et al., 2018; Nepolean et al., 2009a), terpenos (Nepolean et al., 2009a) y compuestos fenólicos (Aremu et al., 2018); mientras en los mismos estudios reportan metabolitos secundarios que no encontramos en este estudio como carbohidratos (Aremu et al., 2018), taninos, esteroides y glicósidos (Aremu et al., 2018; Nepolean et al., 2009a), lo anterior indica que si bien es cierto el solvente utilizado influye en los metabolitos que se pueden encontrar; en el caso de “moringa” tanto el etanol como metanol permiten tener resultados similares en cuanto al tamizaje fitoquímico.

Nuestro extracto elaborado con hojas maduras y metanol como solvente permitió evidenciar componentes como los compuestos fenólicos quienes se conocen por su capacidad antioxidante. Los extractos de hojas maduras presentan una alta actividad antioxidante contra los radicales libres y previenen el daño oxidativo debido al enriquecimiento de polifenoles (Kou et al., 2018; Sreelatha & Padma, 2009), también se ha observado el efecto de eliminación de radicales libres en extractos metanólico de hojas tiernas de “moringa” (Fitriana et al., 2016); de manera general los extractos preparados con hojas de “moringa” y metanol como solvente permiten evidenciar metabolitos con potencial terapéutico tripanocida.

Los nutrientes aportados por la “moringa” mejoran el sistema inmunológico y el metabolismo humano en la lucha contra patógenos (Monteiro et al., 2021), además posee altas cantidades de terpenos que han sido postulados como opciones terapéuticas con menores efectos adversos y mayor efectividad tripanocida; estos compuestos son fundamentales en algunas especies de plantas debido a que son usadas como mecanismo de defensa contra herbívoros y microorganismos que pueden ser potencialmente patógenos (Borges et al., 2012); por otro lado las sesquiterpenlactonas han presentado actividades biológicas con aplicaciones

terapéuticas, entre ellos, anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiana y antiprotozoaria (Sánchez et al., 2016); dos de los metabolitos obtenidos en nuestro análisis fitoquímico a los que se le podría atribuir la actividad tripanocida del extracto. En este sentido, el uso de extractos a partir de “moringa” representaría una fuente renovable para la extracción de este tipo de compuestos y su explotación comercial futura.

El estudio reveló que las hojas maduras de *Moringa oleifera* presentan actividad tripanocida *in vitro* similar al Benznidazol; siendo los porcentajes de mortalidad de epimastigotes de *T. cruzi* del 27% (10mg/mL de extracto de “moringa”) y 26% (10mM de Benznidazol). En un estudio realizado en el 2014, se analizó la actividad tripanocida de extractos acuosos y metanólicos de *Moringa stenopetala* contra *Trypanosoma brucei*, *T. congolense*, *T. cruzi* y *T. rhodesiense*, los cuales presentaron desde moderada hasta alta actividad tripanocida en modelos *in vivo* (Kifleyohannes et al., 2014); investigadores realizaron un análisis histopatológico para evaluar la toxicidad del extracto metanólico de hojas de “moringa” y éste no demostró alteraciones provocadas por el extracto, por el contrario el estudio reflejó actividad tripanocida ante *Trypanosoma brucei*, demostrando que el extracto es un potente agente mejorador que reduce la degeneración neuronal y congestión en el cerebro y el bazo de las ratas infectadas con *T. brucei*; mitigando así la patogenicidad de la tripanosomiasis (Aremu et al., 2018); indica baja toxicidad adjudicada a los diversos extractos obtenidos de diversas partes anatómicas de la “moringa”.

Para este estudio, el Benznidazol mostró una actividad relativamente baja en el análisis *in vitro*, con un valor de viabilidad celular (indica el porcentaje de parásitos vivos) de 73.95% en la concentración más alta de 10mM y 93.33% de viabilidad celular para la concentración de 0.25mM; investigadores reportaron que el Benznidazol no fue efectivo (>400 µM) eliminando cepas de *T. cruzi in vitro* (Sepúlveda-Robles et al., 2019).

Las diferencias en las tasas de seroconversión pueden explicarse por varias razones; algunos investigadores han reportado que existen diferencias en los resultados terapéuticos según la zona geográfica evaluada (Yun et al., 2009), una explicación se basa en la presencia de diferentes linajes de parásitos en diferentes regiones geográficas, predominando TcI en humanos, reservorios y vectores en Centroamérica, Colombia y Venezuela mientras TcII,

TcV y TcVI son más comunes en América del Sur (Padilla et al., 2017). Un estudio reportó pacientes infectados con el linaje *T. cruzi I* que no respondieron al tratamiento mientras los que respondieron positivamente a la terapia eran del linaje *T. cruzi II* (Werner Apt & Inés Zulantay, 2011) sugiriendo que el linaje TcI es resistente al tratamiento lo cual pareciera indicar que el parásito ha adquirido cierta resistencia natural contra el Benznidazol; estos hallazgos parecieran demostrar un patrón de ineficacia del Benznidazol al momento de tratar infecciones de *T. cruzi* linaje TcI y explicar la baja tasa de eficiencia en la respuesta al tratamiento en los pacientes agudos de El Salvador pues estudios indican que en Latinoamérica predomina el linaje TcI; entonces comprender los linajes del parásito ayuda a comprender la eficiencia de los tratamientos.

La actividad tripanocida de nuestro estudio fue evaluada en la forma celular epimastigote del parásito *T. cruzi*; Santos et al. (2014) determinó que el limoneno (terpeno), posee actividad tripanocida *in vitro* en las formas extracelulares de *T. cruzi* mayormente en epimastigotes con una IC₅₀ 33,7 µg/mL y para tripomastigotes CI₅₀ 14,1 µg/mL indicando un uso de mayor concentración de extracto para la forma celular tripomastigotes. Otro estudio *in vitro* analizó 4 componentes derivados de terpenos con actividad contra epimastigotes de *T. cruzi* midiendo el efecto inhibitor de diferentes concentraciones que oscilan entre 1 y 100 mM en el crecimiento *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi* de los cuales dos compuestos tuvieron una actividad ligeramente superior con (IC₅₀ 6.10 y 7.98 mM), con respecto al encontrado para Benznidazol (IC₅₀ 15,89 mM) (Ramírez-Macías et al., 2012); este comportamiento descrito hace varias décadas menciona que la forma biológica del parásito de una misma cepa presenta distinta susceptibilidad (Muñoz A., Santaniello A., Pereira A., Yannuzzi J., 2012); los resultados presentados por Santos y Ramírez concuerdan con nuestros resultados en los cuales el extracto metanólico de “moringa” presentó un mayor efecto tripanocida respecto al Benznidazol. Otro estudio evaluó una combinación limoneno (terpeno) + Benznidazol, el cual mostró el mayor efecto sinérgico frente a los tres estadios parasitarios (Moreno, 2017), de acuerdo con lo anterior las interacciones farmacológicas encontradas entre los terpenos y Benznidazol resultan promisorias tomando en cuenta que el uso de múltiples fármacos con diferentes modos de acción potenciaría el tratamiento en los cuales el sinergismo farmacológico presenta un aumento de la eficacia terapéutica, involucra la disminución de

las dosis aplicadas (para reducir efectos adversos) y retraso en el desarrollo de resistencias por parte del parásito. En nuestro estudio se evidenció la presencia de terpenos; compuestos a los que se puede atribuir la actividad tripanocida reportada.

Previamente se ha observado que la cantidad, concentración y tipo de compuestos fitoquímicos encontrados, varía según el tipo de muestra vegetal (raíz, hoja, semillas, corteza, flor, fruto) y el tipo de solvente con la que se prepare el extracto, sin embargo esto no es suficiente para explicar la discrepancia de los metabolitos reportados en los estudios; haría falta un análisis de otras metodologías de extracción, uso de diferentes solventes, diferente zona geográfica y condiciones climáticas del material vegetal recolectado para poder explicar la diferencias de los resultados fitoquímicos obtenidos respecto a otros autores y con ello la presencia de metabolitos con actividad tripanocida.

A pesar de que se evidenció actividad tripanocida en el extracto metanólico de “moringa”; es importante hacer énfasis que la evaluación tripanocida fue realizada en el extracto completo; lo cual limita inferir el metabolito que presenta mejores resultados los cuales podrían variar si se realiza la evaluación de la actividad con cada uno de los metabolitos y brindar resultados concluyentes y con porcentajes de mortalidad de parásitos mayores.

8. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación muestran que el extracto metanólico de "moringa" posee actividad tripanocida contra el parásito *Trypanosoma cruzi* cepa Brenner CL, DTU TcVI, específicamente ante la forma celular epimastigotes.

En comparación al Benznidazol, el extracto metanólico de "moringa" posee actividad tripanocida similar en las concentraciones evaluadas en el estudio mediante el ensayo de viabilidad celular de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

El análisis fitoquímico del extracto reveló la presencia de siete metabolitos, aunque no se puede atribuir específicamente a alguno de ellos la actividad biológica del extracto. Los resultados de este estudio sugieren que el extracto metanólico de "moringa" podría ser una fuente promisoría de compuestos bioactivos con actividad tripanocida contra *T. cruzi*.

9. RECOMENDACIONES

- Realizar futuros estudios donde se evalúe el extracto metanólico de “moringa” a diferentes concentraciones, en otras cepas de diferente DTU y fases de desarrollo del parásito, tanto *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, para conocer más a fondo su potencial terapéutico tripanocida.
- Preparar extractos con otros solventes para comparar la actividad tripanocida de la "moringa" y conocer más a fondo su potencial terapéutico.
- Realizar diferentes análisis que permitan identificar las distintas moléculas presentes en la “moringa” y verificar su posible actividad terapéutica.
- Mejorar los protocolos de evaluación de metabolitos con potencial terapéutico de plantas medicinales para identificar y caracterizar los compuestos presentes y permitan brindar información para el desarrollo de nuevos medicamentos
- Ejecutar estudios de actividad tripanocida de plantas salvadoreñas que hayan sido reportadas previamente por su uso etnobotánico antiparasitario para evaluar su potencial terapéutico e identificar nuevas fuentes de compuestos con actividad tripanocida.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ambi, A. A., Abdurahman, E. M., Katsayal, U. A., Sule, M. I., Pateh, U. U., & Ibrahim, N. D. G. (2011a). Toxicity Evaluation of Moringa Oleifera Leaves. *International Journal of Pharmaceutical Research and Innovation*, 4(3317), 22–24.
- Apt, W. (1999). Tratamiento De La Enfermedad De Chagas. *Revista de la Asociación Médica Argentina*, 78, 84–91. <https://doi.org/10.4067/s0716-07201999000300007>
- Arce, L. B. (2012). *Propiedades qlectroquímicas de fármacos antichagásicos: Benznidazol*. 0–2.
- Aremu, A., Kingsley, E. I., Talha, B. K., Akeem, A. O., Ibrahim, R. A., Jimoh, A. G., & Yusuf, S. K. (2018). Methanolic leaf extract of Moringa oleifera improves the survivability rate, weight gain and histopathological changes of Wister rats infected with Trypanosoma brucei. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.04.006>
- Arora, R., Malhotra, P., Sharma, A., Haniadka, R., Yashawanth, H. S., & Baliga, M. S. (2013). Medicinal Efficacy of Indian Herbal Remedies for the Treatment of Arthritis. En *Bioactive Food as Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases* (1a ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397156-2.00250-7>
- Ascencio, J. (2012). *Evaluación de la actividad insecticida y repelente del extracto obtenido a partir de la semilla de Annona diversifolia (anona) sobre el Zabrotes subfasciatus (gorgojo común del frijol)*.
- Asensi, G. D., Manuela, A., Villadiego, D., & Berruezo, R. (2017). *Moringa oleifera: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos*. 67(2).
- Bernacchi, A. S., Franke De Cazzulo, B., Castro, J. A., & Cazzulo, J. J. (2002). Trypanocidal action of 2,4-dichloro-6-phenylphenoxyethyl diethylamine hydrobromide (Lilly 18947) on Trypanosoma cruzi. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(5), 399–404.
- Borges, A. R., Aires, J. R. de A., Higino, T. M. M., Medeiros, M. das G. F. de, Citó, A. M. das G. L., Lopes, J. A. D., & Figueiredo, R. C. B. Q. de. (2012). Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Experimental Parasitology*, 132(2), 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.003>
- Bravo, V. P. (2016). *Caracterización de aceites de las semillas de Moringa oleifera a partir de la extracción por diferentes métodos Characterisation of Moringa oleifera' s oils from different extraction methods. XVIII* (11). <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.54324>
- Bruce L; M Bacon, Kristina; Bottazzi, M. E. J. H. P. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational Simulation Models. *Essential Mathematics for Market Risk Management*, 13(4), 291–307. <https://doi.org/10.1002/9781118467213.ch22>

- Brunton, Laurence; Hilal Dandan, Randa; Knollman, B. (2019). Bases Farmacológicas de la Terapéutica. En *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*.
- Cabrera-Carrión, J. L., Jaramillo-Jaramillo, C., Dután-Torres, F., Cun-Carrión, J., García, P. A., & de Astudillo, L. R. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. En función de su edad y altura. *Bioagro*, 29(1), 53–60.
- Cançado, J. R. (1999). Criteria of Chagas Disease Cure. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(SUPPL. 1), 331–335. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700064>
- Canett R, Arvayo K, R. (2014). *Aspectos tóxicos más relevantes de Moringa oleifera y sus posibles daños*. 36–43.
- Castillo, U. G., Komatsu, A., Martínez, M. L., Menjívar, J., Núñez, M. J., Uekusa, Y., Narukawa, Y., Kiuchi, F., & Nakajima, J. (2021). Anti - trypanosomal screening of Salvadoran flora. *Journal of Natural Medicines*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11418-021-01562-6>
- Cedillos, R. Sasagawa, E. Romero, E. Ramos, H. (2011). La enfermedad de Chagas en El Salvador, evolución histórica y desafíos para el control / Organización Panamericana de la Salud (OPS). En *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Chaves, G. C., Arrieche, M. A. S., Rode, J., Mechali, D., Reis, P. O., Alves, R. V., Stobbaerts, E., Aguilar, N. G., & Ribeiro, I. (2017). Estimación de la demanda de medicamentos antichagásicos: Una contribución para el acceso en América Latina. *Revista Panamericana de Salud Pública /Pan American Journal of Public Health*, 41(1), 1–8. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2017.45>
- Chuang, P. H., Lee, C. W., Chou, J. Y., Murugan, M., Shieh, B. J., & Chen, H. M. (2007). Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology*, 98(1), 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.11.003>
- CONABIO. (s/f). Fuente: *Wikipedia (ES)*. <https://www.naturalista.mx/taxa/165529-Moringa-oleifera>
- Cura, C. (2014). *Desarrollo, estandarización y aplicación de tipificación molecular de poblaciones de Trypanosoma cruzi de muestras clínicas, vectores y reservorios de la enfermedad de Chagas*.
- Dancey, J. E., & Chen, H. X. (2006). Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(8), 649–659. <https://doi.org/10.1038/nrd2089>
- Domínguez, J. A. (2017). Simposio argentino de farmacobotánica. *Dominguezia*, 33(1).
- Dye-Braumuller, K. C., Waltz, H., Lynn, M. K., Klotz, S. A., Schmidt, J. O., Romero, A., Rodriguez Aquino, M. S., Palacios Valladares, J. R., Cornejo Rivas, P. M., & Nolan, M. S. (2021). A southwestern United States pilot investigation of triatomine–mite prevalence. *Insects*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/insects12090811>

- Eze, C. (2013). Immunologic effects of *Moringa oleifera* methanolic leaf extract in chickens infected with Newcastle disease virus (kudu 113) strain. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(31), 2231–2237.
<https://doi.org/10.5897/ajpp2013.3471>
- Faizi S, Siddiqui B, Saleem R, Siddiqui S, A. K., and G. A. (1992). *Isolation and Structure Elucidation of Novel Hypotensive Agents, Niazinin A, Niazinin 6, Niazimicin and Niaziminin A + B from Moringa oleifera: The First natural I y occu rri ng Th ioca rbamates*. 63, 3237–3241.
- Fitriana, W. D., Ersam, T., Shimizu, K., & Fatmawati, S. (2016). Antioxidant activity of *Moringa oleifera* extracts. *Indonesian Journal of Chemistry*, 16(3), 297–301.
<https://doi.org/10.22146/ijc.21145>
- Flores-Chávez, M., de Fuentes, I., Gárate, T., & Cañavate, C. (2009). Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1157/13111835>
- Folkard, G., & Folkard, G. (1996). *Moringa oleifera un árbol con enormes*. 8(3).
- Fragata Filho, A. A., Luquetti, A. O., Prata, A., Rassi, A., Gontijo, E. D., Ferreira, H. de O., Cançado, J. R., Coura, J. R., Andrade, S. G., Macedo, V., Amato Neto, V., Oliveira Junior, W. de, & Brener, Z. (1993). Etiological treatment of Chagas disease. Consensus and divergence. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 61(4), 201–202.
- García-bujalance, S., & Gastañaga, T. (2013). *Control de la infección por Trypanosoma cruzi / Enfermedad de Chagas en gestantes Latinoamericanas y sus hijos*. 26(3), 253–260.
- Holguín, N. (2016). *Evaluación in vitro de actividad inhibitoria de extractos de Moringa oleifera Lam. contra Fusarium oxysporum f. sp. Evaluación in vitro de actividad inhibitoria de extractos de Moringa oleifera Lam. contra Fusarium oxysporum f. sp.*
- Jiménez-Coello, M., Acosta-Viana, K. Y., Guzman-Marin, E., & Ortega-Pacheco, A. (2012). American Trypanosomiasis Infection in Fattening Pigs from the South-East of Mexico. *Zoonoses and Public Health*, 59(SUPPL.2), 166–169.
<https://doi.org/10.1111/zph.12016>
- Joachin Martínez, E. A. (2020). *Determinación de la actividad antioxidante y fenoles totales en el kino de Eucalyptus citriodora (Myrtaceae)*. 4(1), 1–23.
- Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Loscalzo, J., & Larry, J. (2016). Harrison. Principios de Medicina Interna 19a edición Vol. 2. En *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 2).
- Kifleyohannes, T., Terefe, G., Tolossa, Y. H., Giday, M., & Kebede, N. (2014). Effect of crude extracts of *Moringa stenopetala* and *Artemisia absinthium* on parasitaemia of mice infected with *Trypanosoma congolense*. *BMC Research Notes*, 7(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-390>
- Kou, X., Li, B., Olayanju, J. B., Drake, J. M., & Chen, N. (2018). Nutraceutical or pharmacological potential of *Moringa oleifera* Lam. *Nutrients*, 10(3).
<https://doi.org/10.3390/nu10030343>

- Kumar, A., Kumar, H., Tshabalala, T., Kumar, R., Gupta, A., Ndhlala, A. R., & Pandey, A. K. (2019). South African Journal of Botany Phytochemical, nutraceutical and pharmacological attributes of a functional crop *Moringa oleifera* Lam: An overview. *South African Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.017>
- Kumar, V. (2013). *Moringa oleifera* or *sahijan*: a miracle plant of medicinal value. 140–144.
- Lambole, V. & K. U. (2011). *Phytochemicals and acute toxicity of Moringa oleifera barks in rats*. 548–553.
- Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 12791–12835. <https://doi.org/10.3390/ijms160612791>
- López Antuñano, F. J. (1997). Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública de México*, 39(5), 463–471. <https://doi.org/10.1590/s0036-36341997000500009>
- Luqman, S., Srivastava, S., Kumar, R., Maurya, A. K., & Chanda, D. (2012). Experimental assessment of *Moringa oleifera* leaf and fruit for its antistress, antioxidant, and scavenging potential using *in vitro* and *in vivo* assays. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/519084>
- Ministerio de Salud de El Salvador. (2020). *Lineamientos técnicos para la prevención, vigilancia y control de enfermedades transmitidas por vectores y zoonosis*.
- Monteiro, E. W. de S., Medeiros, T. D. S., Soares, N. R. M., Arraes, D. R. dos S., Costa, M. K. V. da, Ferreira, A. M. de S. D., Queiroz, G. A. de, Farias, A. L. F., Cantuária, P. de C., & Almeida, S. S. M. da S. de. (2021). Estudo Fitoquímico Do Extrato Etanólico Das Folhas De *Moringa Oleifera* Lam. *PLANTAS MEDICINAIS DO ESTADO DO AMAPÁ: DOS RELATOS DA POPULAÇÃO À PESQUISA CIENTÍFICA*, 137–152. <https://doi.org/10.37885/210504518>
- Moreno, M. (2017). *CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA Y CITOTÓXICA DE ACEITES ESENCIALES DE LIPPIA ALBA Y SUS TERPENOS BIOACTIVOS SOBRE TRYPANOSOMA CRUZI*.
- Moyo, B., Masika, P. J., Hugo, A., & Muchenje, V. (2011). Nutritional characterization of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African Journal of Biotechnology*, 10(60), 12925–12933. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1599>
- Muhammad, H. I., Asmawi, M. Z., & Khan, N. A. K. (2016). A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on *Moringa oleifera* Lam. in tropical and sub-tropical regions. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(10), 896–902. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.08.006>
- Muñoz A., Santaniello A., Pereira A., Yannuzzi J., Dí. B. Z. y A. de N. B. (2012). Susceptibilidad *in vitro* a Nifurtimox y Benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por

- mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, 71(1), 14–22.
- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(SUPPL.1), 26–34. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70111-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70111-3)
- Nepolean, P., Anitha, J., & Renitta, R. E. (2009a). Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lamk. *Current Biotica. Nepolean P., Anitha J., and Renitta R.E*, 3(1)(1), 33–39.
- Nepolean, P., Anitha, J., & Renitta, R. E. (2009b). Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lamk. *Current Biotica. Nepolean P., Anitha J. and Renitta R.E*, 3(1)(1), 33–39.
- Nikkon, F., Hasan, S., Salam, K. A., Mosaddik, M. A., Khondkar, P., Haque, M. E., & Rahman, M. (2009). Benzylcarbamothioethionate from root bark of *Moringa oleifera* Lam. and its toxicological evaluation. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 8(2), 130–138.
- Olson, M. E. (2011). *Moringa oleifera: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas Moringa oleifera: a multipurpose tree for the dry tropics*. 1071–1082.
- OMS. (2005). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. *Grupo de Trabajo Científico, OMS*, 1–96.
- Padayachee, B., & Baijnath, H. (2019). South African Journal of Botany An updated comprehensive review of the medicinal, phytochemical, and pharmacological properties of *Moringa oleifera*. *South African Journal of Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.08.021>
- Padilla, C. P., Alvarado, U., Ventura, G., Luna-Caipo, D., Suárez, M., Tuñoque, J. R., Ruelas-Llerena, N., Fachín, L. A., Huiza, A., Gonzáles, L., Carranza, J. C., Vallejo, G. A., & Cáceres, A. G. (2017). Identifying *Trypanosoma cruzi* discreet typing units in triatomines collected in different natural regions of Perú. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 37, 167–179. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i0.3559>
- Peterson, J. K., Hashimoto, K., Yoshioka, K., Dorn, P. L., Gottdenker, N. L., & Caranci, A. (2019). *Chagas Disease in Central America: Recent Findings and Current Challenges in Vector Ecology and Control*.
- Peterson, J. K., Yoshioka, K., Hashimoto, K., Caranci, A., Gottdenker, N., Monroy, C., Saldaña, A., Rodriguez, S., Dorn, P., & Zúniga, C. (2019). Chagas Disease Epidemiology in Central America: an Update. *Current Tropical Medicine Reports*, 6(2), 92–105. <https://doi.org/10.1007/s40475-019-00176-z>
- Promega. (2017). CellTiter-Glo 2.0 Assay - Technical Manual. En *Promega*.
- Ramírez-Macías, I., Marín, C., Chahboun, R., Messouri, I., Olmo, F., Rosales, M. J., Gutierrez-Sánchez, R., Alvarez-Manzaneda, E., & Sánchez-Moreno, M. (2012). In vitro and in vivo studies of the trypanocidal activity of four terpenoid derivatives against

- Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(3), 481–488. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0471>
- Raquel, Peñate; Katty, G. (2013). La enfermedad de chagas como problema de salud pública a través del tamizaje de los casos positivos de infección por *Trypanosoma cruzi* en los donantes de los cinco bancos de sangre de la zona metropolitana de san salvador. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rodríguez, C., & Cisneros, S. (2016). *Factores de riesgo, nivel de conocimiento e incidencia de la enfermedad de Chagas en donantes del banco de sangre del hospital regional ISSS de Santa Ana en el periodo de enero a junio*.
- Rodrik, D., & Kennedy, J. F. (2008). *Medición multidimensional de la pobreza. El Salvador*.
- Rojas, J., Ronceros, S., Palacios, O., & Sevilla, C. (2017). Efecto anti-*Trypanosoma cruzi* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (hierba luisa) en ratones Balb/c. *Anales de la Facultad de Medicina*. <https://doi.org/10.15381/anales.v73i1.803>
- Salas Sierralta, M. C. (2014). *Evaluación de la genotoxicidad utilizando el ensayo cometa en linfocitos humanos expuestos adiferentesconcentraciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO)*.
- Sanabria, M. (2015). Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXXI*, 616, 539–544.
- Sánchez, E., Vélez, M. C., Restrepo, M., Marín, J. S., & Gallego, D. (2016). Tripanosomiasis americana, una mirada desde el tratamiento. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(1), 39. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i1.11551>
- Sanjay, P., & Dwivedi, K. N. (2015). Shigru (*Moringa Oleifera* Lam.): A Critical Review. *International Journal of Ayurveda and Pharmaceutical Chemistry*, 3(1), 217–227.
- Sasagawa, E., Guevara de Aguilar, A. V., Hernández de Ramírez, M. A., Romero Chévez, J. E., Nakagawa, J., Cedillos, R. A., Misago, C., & Kita, K. (2014a). Acute chagas disease in El Salvador 2000-2012 - Need for surveillance and control. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(2), 256–258. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140416>
- Sasagawa, E., Guevara de Aguilar, A. V., Hernández de Ramírez, M. A., Romero Chévez, J. E., Nakagawa, J., Cedillos, R. A., Misago, C., & Kita, K. (2014b). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors in El Salvador between 2001 and 2011. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 1029–1036. <https://doi.org/10.3855/jidc.4035>
- Sasagawa, E., Guevara de Aguilar, A. V., Hernández de Ramírez, M. A., Romero Chévez, J. E., Nakagawa, J., Cedillos, R. A., Misago, C., & Kita, K. (2014c). Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors in El Salvador between 2001 and 2011. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 1029–1036. <https://doi.org/10.3855/jidc.4035>
- Sasagawa, E., Guevara de Aguilar, A. V., Hernández de Ramírez, M. A., Romero Chévez, J. E., Nakagawa, J., Cedillos, R. A., Misago, C., & Kita, K. (2014d). Prevalence of

- Trypanosoma cruzi infection in blood donors in El Salvador between 2001 and 2011. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(8), 1029–1036. <https://doi.org/10.3855/jidc.4035>
- Schmunis, G. A. (2007). The globalization of Chagas disease. *ISBT Science Series*, 2(1), 6–11. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2007.00052.x>
- Sepúlveda-Robles, O., Espinoza-Gutiérrez, B., Gomez-Verjan, J. C., Guzmán-Gutiérrez, S. L., De Ita, M., Silva-Miranda, M., Espitia-Pinzón, C. I., Fernández-Ramírez, F., Herrera-Salazar, A., Mata-Rocha, M., Ortega-Hernández, A., & Reyes-Chilpa, R. (2019). Trypanocidal and toxicological assessment in vitro and in silico of three sesquiterpene lactones from Asteraceae plant species. *Food and Chemical Toxicology*, 125(2019), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.023>
- Silber, A. M., Búa, J., Porcel, B. M., Segura, E. L., & Ruiz, A. M. (1997). Trypanosoma cruzi: Specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Experimental Parasitology*, 85(3), 225–232. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.4141>
- Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of Moringa oleifera leaves in two stages of maturity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 303–311. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0>
- Stohs, S. J., & Hartman, M. J. (2015). Review of the safety and efficacy of Moringa oleifera. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796–804. <https://doi.org/10.1002/ptr.5325>
- Talreja, T. (2010). Screening of Crude Extract of Flavonoids of Moringa oleifera against Bacterial and Fungal Pathogen. *Journal of Phytology*, 2(11), 31–35.
- Upadhyay, P., Mk, Y., S, M., Sharma P., & Purohit S. (2015). Moringa oleifera: A review of the medical evidence for its nutritional and pharmacological properties. *Int J Res Pharm Sci*, 5(2), 12–16.
- Valencia, L., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Echeverri, F., Arango, G. J., Vélez, I. D., & Triana, O. (2014). Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica*, 31(4), 552. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.426>
- Velázquez-Zavala, M., Ignacio E. Peón-Escalante, Zepeda-Bautista, R., & Jiménez-Arellanes, M. A. (2016). *Moringa (Moringa oleifera Lam.): potential uses in agriculture, industry and medicine*. 22(Apa 6), 95–116. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.07.018>
- Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., & Rao, C. V. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of Moringa oleifera leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2196–2201. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.005>
- Walter, A., Samuel, W., Peter, A., & Joseph, O. (2011). Antibacterial activity of Moringa oleifera and Moringa stenopetala methanol and n-hexane seed extracts on bacteria implicated in water borne diseases. *African Journal of Microbiology Research*, 5(2), 153–157. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.457>
- Werner Apt, B., & Inés Zulantay, A. (2011). Update on the treatment of Chagas' disease. *Revista Médica de Chile*, 139(2), 247–257.

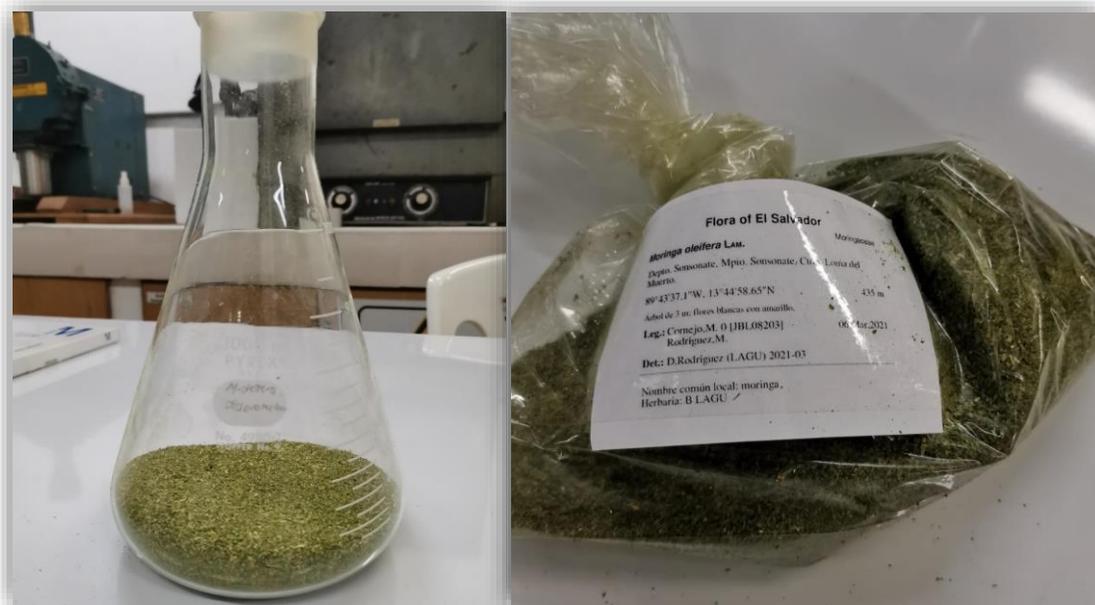
- Werner Apt B., Ingrid Heitmann G., M. Isabel Jercic L., L. J. M., & Patricia Muñoz C. del V., Isabel Noemí H., Ana M. San Martín V., Jorge Sapunar P., M. T. H. e I. Z. A. (2008). Tratamiento antiparasitario en la enfermedad de Chagas. *Enferm. emerg*, 25(5), 10–13.
- WHO. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*, 90(6), 33–43.
- WIKIPEDIA. (2023). Obtenido de <https://es.wikipedia.org/wiki/Metanol>
- World Health Organization. (2015). *Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates*. *Wkly. Epidemiol.* <http://www.who.int/wer>
- Yun, O., Lima, M. A., Ellman, T., Chambi, W., Castillo, S., Flevaud, L., Roddy, P., Parreño, F., Viñas, P. A., & Palma, P. P. (2009). Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-Year experience of Médecins Sans Frontières. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000488>
- Zavala, C. D., Carrillo I, M. L., Alvarado S, B., & Sánchez Ch, A. O. (2010). Evaluación de la toxicidad aguda de un extracto alcohólico de hojas de hojaseñ (Flourensia cernua). *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*.
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

11. ANEXOS

Anexo 1. Colecta de muestra de “moringa” en finca “Angelita El Recuerdo”.



Anexo 2. Muestra de “moringa” para identificación botánica.



Anexo 3. Hojas secas trituradas de “moringa”.



Anexo 4. Hojas de “moringa” con metanol (solvente), para preparación de extracto.



Anexo 5. Preparación de extracto, en instalaciones de Laboratorio de Productos Naturales Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

INFORME DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO

1. Datos generales

Nombre del producto:	“Moringa”	Nombre científico:	<i>Moringa oleifera</i> Lam.
Lote:	N/A	Familia botánica:	Moringaceae
Descripción:	Hojas bipinnadas de color verde	No. Análisis:	LIPN-9/Septiembre/21
Organización:	N/A	Fecha de análisis:	13-14/09/2021

2. Análisis de metabolitos secundarios

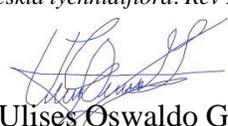
Preparación del extracto: Extracto seco preparado en rotaevaporador, procedente de una maceración de las hojas con metanol.

Metabolito secundario		Resultado
Terpenoides	Vainillina/ CCF	++
Saponinas	Espuma/ Tubo de ensayo	+
Antraquinonas	Bornträger/ CCF	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet/ CCF	+
Flavonoides	AlCl ₃ / CCF	+
Compuestos fenólicos	FeCl ₃ / CCF	+
Cumarinas	KOH/ CCF	+

CCF: Cromatografía de capa fina; ++: Presencia notoria; +: Presencia.

Referencias:

- Lock de Ugaz, Olga. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de Productos Naturales. Segunda Ed., Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial, Perú 1994.
- Mejía J.C., Vásquez S., Salazar R., Muñoz L., Ulises G. Castillo, Paz-Gonzales A. D., Rivera G., Núñez M. J., Moreno M. A. and Kennedy M. L. Analgesic activity and phytochemical profile of aqueous, ethanol and dichloromethane extracts of *Persea schiedeana* leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2021; 12(8): 4167-4173.
- Guerra, R., Gómez, L.J., Ulises G. Castillo, Toloza, G., Sánchez, J.P., Avalos N., Mejía, J.G., Núñez M. J., Moreno, M.A. Efecto analgésico, caracterización fitoquímica y análisis toxicológico del extracto etanólico de *Pereskia lychnidiflora*. *Rev Perú Med Exp Salud Publica*. 2018;35(4):581-9.


Licdo. Ulises Oswaldo Guardado.
Analista fitoquímico


Dr. Marvin Núñez.
Coordinador del Laboratorio de
investigación en Productos Naturales

Anexo 6. Resultados de análisis fitoquímico, Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.