

Actividad antiplasmodium "in vitro" e "in vivo" de extractos y fracciones a partir de hojas de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) que crece en Perú.

William Sagástegui-Guarniz¹, Lizardo Cruzado Razco², Armando Cuellar-Cuellar³, Carmen Silva C⁴

^{1,2,4}Profesores del Departamento de Farmacología, Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

³Profesor del Departamento de Farmacia, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba. Contacto: wsagastegui@unitru.edu.pe

Recibido: 30-12-2015

Aceptado: 16-01-2015

RESUMEN

En el presente trabajo se evalúa la actividad antiplasmodium de los extractos y fracciones de *Artemisia absinthium* L. "ajeno", tanto *in vitro* como *in vivo*, frente a *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, agentes causantes de la malaria, con el objetivo de encontrar una nueva alternativa de tratamiento para esta enfermedad endémica en el Perú. Se recolectaron hojas de *Artemisia absinthium* L. del Departamento de Cajamarca; que fueron pulverizadas y tratadas con solventes adecuados: Hexano, Acetato de etilo, diclorometano, metanol y agua. Mediante el tamizaje fitoquímico se detecta la presencia de: Alcaloides, antraquinonas, flavonoides, lactonas, compuestos fenólicos, esteroides y triterpenoides. El ensayo "*in vitro*", mostró mayor porcentaje de inhibición de la parasitemia con el extracto de acetato de etilo, frente a ambas cepas de *Plasmodium*. Por cromatografía en columna, se obtuvieron 10 fracciones de este extracto, que en concentraciones de 10, 50 y 100 µg/mL, demostraron un mayor porcentaje de inhibición de la parasitemia (PI) en las fracciones cromatográficas F6 y F8. Se evaluó la actividad antiplasmodium de la fracción F8 en primates de la especie *Aotus nancimae* "Musmuqui" previamente infectados con cepas de *Plasmodium falciparum*, aplicándose dosis de 50.0 mg/Kg de peso, por la vía oral y de 25 mg/Kg de peso, por la vía parenteral. Se obtiene un 75 % de respuesta en ambos ensayos, resultado semejante al grupo control al que se administró 10.0 mg de Artesunato sódico. Se realiza un análisis preliminar de la composición química por cromatografía en capa fina (CCF) y HPLC.

Palabras clave: Antiplasmodium, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, Artemisinina, Sesquiterpenlactonas.

ABSTRACT

The present investigation evaluates the activity over *Plasmodium* parasites of extracts and fractions from the leaves of *Artemisia absinthium* L. "Wormwood", both "*in vitro*" and "*in vivo*" using *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum*, that develop malaria, to find and alternative treatment for this disease endemic in Peru. Plant material of *Artemisia absinthium* L. was collected in the department of Cajamarca, was pulverized after drying and extracted with suitable solvents: hexane, ethyl acetate, dichloromethane, methanol and water, and screened their main phyto-constituents: Positive for: Alkaloids, anthraquinones, flavonoids, lactones, phenolic compounds, sterols and terpenoids. The experiments "*in vitro*" showed the highest percentage of inhibition with the ethyl acetate extract, against both strains of *Plasmodium* evaluated. Column chromatography of the extract allowed 10 fractions, which in concentrations of 10, 50 and 100 µg/ in the case of *Plasmodium vivax* strains, after 72 hours of incubation, showed higher percentage of inhibition with fractions F6 and F8. These fractions were evaluated in primate species *Aotus nancimae* "Musmuqui" previously infected with strains of *Plasmodium falciparum*, using doses of 50.0 mg / kg body weight, orally and 25 mg / kg body weight, by injection. In both groups, 75% of activity was found, similar to control group with 10.0 mg of sodium artesunate. Preliminary phytochemical investigation using qualitative assays, thin layer chromatography (TLC) and HPLC is reported.

Keywords: Antiplasmodium, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, artemisinin, sesquiterpene lactones.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la malaria o paludismo se considera una enfermedad reemergente, constituyendo un importante problema de salud pública. Esto, se debe a que en las últimas cuatro décadas el control de la misma se ha visto limitado por el problema creciente de la resistencia de los parásitos a los antimaláricos convencionales y al surgimiento de la resistencia del mosquito vector a ciertos insecticidas (OSORIO E et al, 2005).

Existen cuatro especies de *Plasmodium* (*P. ovale*, *P. vivax*, *P. falciparum* y *P. malariae*) que producen la malaria en humanos pero sin duda la infección causada por *Plasmodium falciparum* es la más peligrosa, ocasionando la muerte en muchos casos; en el Perú las únicas cepas reportadas son *P. vivax*, *P. falciparum* y escasamente *P. malariae* (GUTIÉRREZ S et al. 2003). Los parásitos se transmiten por mosquitos hembras del género *Anopheles* y tras la picadura, se establece una infección asintomática en células hepáticas, después de un período de incubación de aproximadamente una semana, se liberan hacia la sangre donde se desarrollan y multiplican en el interior de los eritrocitos. El parásito produce proteínas que se transportan y se sitúan en la membrana del eritrocito, tales proteínas hacen que el eritrocito se pegue a las paredes de los vasos sanguíneos originando la obstrucción de los mismos. En la malaria cerebral, una complicación severa de la malaria producida por *P. falciparum*, es el secuestro de eritrocitos infectados en los vasos sanguíneos, que se asocia con una pérdida del conocimiento y la afección resulta letal si no es tratada. Los parásitos de las especies *P. vivax* y *P. ovale*, se caracterizan por presentar la fase de hipnozoito que pueden persistir durante años en el hígado y causar recidivas periódicamente (GONZÁLEZ D. et al. 2005).

En el Reporte Mundial de Malaria 2008 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del Special Programme and Training in Tropical Diseases (TDR), se informa que existen 109 países con malaria endémica, 45 de ellos en la Región de África y el resto en países de Europa, Asia y América del Sur, que representan alrededor del 45% de la población mundial en riesgo de contraer esta enfermedad, según estadísticas existen aproximadamente 247 millones de casos de malaria, entre 3 300 millones de personas en riesgo, produciéndose como resultado casi un millón de muertes al año, principalmente de menores de cinco años (WHO; 2008). Estos niveles de mortalidad y morbilidad por malaria se han incrementado en los últimos tiempos como reflejo del deterioro de la situación económica y socio-política y el flujo de migración hacia y desde los países con malaria endémica, se han descrito además, formas peculiares de transmisión, por transfusión en adictos a las drogas (Steffen R et al. 2001).

En el Perú, si bien la morbimortalidad no alcanza las alarmantes cifras de países africanos y sud asiáticos, su incidencia es también preocupante; habiéndose registrado en los Departamentos de Loreto y San Martín la mayor incidencia de malaria desde 1995 hasta el año 2009, por *P. vivax* y *P. falciparum*, Sin embargo, en los últimos años, se han registrado casos de pacientes infectados con *P. vivax* y *P. falciparum*, en el departamento de Tumbes (1 145 casos), Piura (606 casos) y La Libertad (250 casos) procedentes principalmente de la Provincia de Sánchez Carrión y en los valles de Chao y Virú (INEI, Perú, 2008).

Esta búsqueda de principios activos antimaláricos tienen como base las investigaciones realizadas en la planta *Artemisia annua*, que se iniciaron en 1973, con la utilización del extracto natural, administrado por vía oral a 2 099 enfermos con malaria, bajo un estricto control médico en 12 hospitales: el 98 % de los pacientes se curó de esta enfermedad. En base a estos contundentes resultados se aisló la Artemisinina y cuatro años después se conoció su mecanismo de acción. Esta sustancia sirvió de prototipo para obtener derivados más eficaces, como la Dihidroartemisinina, Arthemeter, Artesunato, y en Agosto del 2004, la Revista Nature, publicó los resultados de un grupo de especialistas en Química, Parasitología, Toxicología y Farmacología, quienes anunciaron la producción sintética de la molécula codificada como OZ 277, quien demostró una eficacia superior al principio activo natural, incluso para curar la malaria cerebral por vía intravenosa (VENNERSTROM L et al, 2004; FÜGI M, et al 2010)

En el Perú, existe una especie de *Artemisia absinthium* L., que ha sido utilizada esporádicamente por algunos pobladores de zonas endémicas para curar la malaria. Esta planta pertenece a la misma familia Asteraceae descrita anteriormente; es también de origen Europeo y posiblemente fue introducida a nuestro país por los españoles en el S. XVI. Se desarrolla generalmente en condiciones semejantes a la

Artemisia annua, y se le encuentra en zonas de la Sierra del Departamento de Cajamarca, aunque también se le encuentra en algunas zonas de la Costa norte del Perú. En esta especie se han encontrado algunos metabolitos como: tuyonas α y β y el alcohol tuyílico libre o combinado con ácido acético e isovaleriánico, la absintina (sustancia amarga), además al cis-epoxiocimeno, acetato de sabinilo, acetato de cis-crisantenilo, el cis-crisantenol, el alcanfor, 1,8-cineol y el acetato de bornilo, así como otros monoterpenos y sesquiterpenos, sin embargo a la fecha no se ha realizado un estudio fitoquímico detallado de todos sus componentes y de la importancia biológica (MOSTACERO J. et al, 2002)

Estos antecedentes justifican la importancia de continuar con las investigaciones en la búsqueda de nuevos principios activos, en plantas medicinales de uso tradicional, que conduzcan a encontrar nuevas alternativas de tratamiento más eficaces, económicas y seguras para combatir esta enfermedad y por ello se desarrolló la presente investigación.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de estudio

Las hojas de *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) "Ajenjo" (Figura 1) se recolectaron en zonas áridas de la Sierra del departamento de Cajamarca; identificada taxonómicamente en el Herbarium Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo, por el Dr. Freddy Peláez Peláez.



Fig. 1. *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) "Ajenjo"

Cepas utilizadas para el ensayo

Se utilizaron cepas de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*, obtenidas de muestras de sangre de pacientes de la ciudad de Tumbes infectados con *Plasmodium vivax* y de Iquitos, infectados con *Plasmodium falciparum*., identificadas por Cruzado Razco, Lizardo, Dr, especialista en enfermedades tropicales.

Animales de experimentación

16 primates de la especie *Aotus nancimae* "Musmuqui", procedentes de zonas boscosas de los ríos Nanay e Itaya, afluentes del Río Amazonas de la Provincia de Iquitos; se utilizaron para la determinación del efecto antiparasitario "in vivo" de las fracciones de los extractos obtenidos de la *Artemisia absinthium* L. Al final del tratamiento los especímenes fueron liberados luego de determinarse su diagnóstico parasitológico negativo.

Tratamiento de la *Artemisia absinthium* L.

Las muestras de hojas se lavaron y secaron a temperatura ambiente y luego se llevó a secado en estufa a 45 °C por 48 horas. Finalmente se pulverizaron las muestras secas con la ayuda de un molino eléctrico y se almacenaron en bolsas de papel hasta su uso.

Obtención de los extractos de las hojas de *Artemisia absinthium* L.

200 gramos de hojas secas y molidas, se colocaron en frascos de boca ancha, con cantidad suficiente de hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua exactamente hasta cubrir las hojas, se

dejó macerar por siete días, a excepción del extracto acuoso, el cual sólo fue llevado a reflujo por 1h. Durante la maceración se agitaron los frascos cada 24 horas.

Cada extracto se filtró obteniéndose dos productos: el marco y el extracto con solvente. El marco se macera 2 veces más con el respectivo solvente y luego los extractos se juntaron y se concentraron con rota vapor Heidolph ® a 37 °C y 5 bar de presión constante. Los extractos secos se obtuvieron mediante desecación por 24 horas utilizando una estufa a 45 °C, para luego ser guardados en refrigeración.

Análisis fitoquímico preliminar

Se realizó según la técnica descrita por LOCK O. 1994 y los ensayos sugeridos por la misma.

Preparación de las dosis de los extractos de las hojas de *Artemisia absinthium* L.

Los extractos de las hojas de *Artemisia absinthium* L. se disolvieron en TWEEN 80 al 0.1%, (a excepción del extracto acuoso que fue disuelto en agua destilada estéril), hasta obtener concentraciones de 0.11mg/mL y 1.1mg/mL; homogeneizándose con ayuda del Sonicador Ultrasonic Bath Instruments® X10 a temperatura de 37° C, para el ensayo “in vitro”.

Cultivo de las cepas de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*. Se realizó según el método de TRAGER Y JENSEN en 1976 evaluándose concentraciones de 10 µg/mL, y de 100 µg/mL.

La evaluación se repitió por 5 veces con cada uno de los cultivos de parásitos y dosis empleada. El ensayo control se realizó con 0.5 mL del vehículo empleado.

La inhibición del crecimiento se determinó contando glóbulos rojos no infectados (GRL) y glóbulos rojos infectados (GRI), para obtener el porcentaje de parasitemia (%P) el cual se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% P = \left(\frac{GRI}{GRL + GRI} \right) \times 100$$

Luego de calcular la parasitemia en grupos testigo y ensayo, se procedió a calcular el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PI) mediante la siguiente fórmula:

$$PI = \left(\frac{\% P_{testigo} - \% P_{ensayo}}{\% P_{testigo}} \right) \times 100$$

Ensayo “in vitro” con las fracciones cromatográficas:

Se realizó con fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo utilizando una columna cromatográfica de 45 cm, con un diámetro de 2,5 cm, empacada con sílica gel G-60 70-230 Mesh (Sigma-Aldrich®), y como fase móvil acetato de etilo/metanol en la proporción de mayor resolución, según ensayos realizados en cromatografía en capa fina (CCF). Se reunieron las fracciones que mostraron igual R_f, se desecaron, y se guardaron en refrigeración para realizar los ensayos de confirmación “in vitro” de la actividad.

Criterio de clasificación del tipo actividad antiplasmodium.

Se realizó según el método descrito por MUÑOZ et al. en el 2000.).

El criterio de evaluación de la actividad antiplasmodium fue la siguiente:

Si a la dosis de 10 µg/mL del extracto, el PI es, mayor o igual que 90%, la actividad antiplasmodium se considera excelente; si es mayor o igual que 50%, la actividad antiplasmodium se considera muy buena; si es mayor o igual que 40%, la actividad antiplasmodium se considera buena; y si es menor de 40% la actividad antiplasmodium se considera débil.

Si a la dosis de 50 µg/mL del extracto, el PI es: mayor o igual a 90%, la actividad antiplasmodium se considera muy buena; si es mayor o igual que 50%, la actividad antiplasmodium se considera buena; y si es menor de 50% la actividad antiplasmodium se considera débil.

Si a la dosis de 100 µg/mL del extracto, el PI es: mayor o igual a 90%, la actividad antiplasmodium se considera buena; si es mayor o igual que 50%, la actividad antiplasmodium se considera débil; y si es menor de 50% la actividad antiplasmodium se considera muy débil.

Evaluación del efecto antiplasmodium "in vivo"

El efecto antiplasmodium "in vivo" se realizó en 16 primates de la especie *Aotus nancymae*, con las fracción F8 que mostró mayor porcentaje de inhibición in vitro.

Estos especímenes fueron divididos en 4 grupos: Grupo 1, Testigo; grupo 2 y 3, Problema; y grupo 4, control. Previamente las fracción se diluyó con TWEEN 80 al 0.1%, hasta obtener una concentración de 1 mg/mL, luego fueron pasados por Filtros Millipore S.A. 67120 Molsheim, de FH 0.45 µm, para obtener compuestos estériles.

Todos los animales fueron infectados previamente con cepas de *P. falciparum*, y luego de 72 horas, se realizó el control de la parasitemia, e inmediatamente se administró a los especímenes del grupo Problema 2, una dosis de 50.0 mg de fracción cromatográfica F8 del extracto acetato de etilo por Kg de peso, por vía oral cada 12 horas por 6 días; al grupo Problema 3, una dosis de 25 mg de Fracción F8 por Kg de peso, por vía intraperitoneal, cada 12 horas y por 6 días; y al grupo 4, control, se les administró 10 mg de Artesunato utilizado como control positivo cada 24 horas por 6 días.

La evaluación de la parasitemia se realizó a los 3, 5 y 9 días después de cada tratamiento, en el Laboratorio Regional de Referencia de Enfermedades Tropicales de la Provincia de Iquitos, Perú.

Métodos de análisis.

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Sistema 1: Fase Móvil: Cloroformo - Metanol 6:4, revelador vainillina (1 %) en ácido sulfúrico a $107^{\circ} \pm 1$ °C durante 2 minutos⁴³.

Sistema 2: Fase Móvil: Diclorometano – Acetona 8:2, revelador vainillina (1 %) en ácido sulfúrico a $107^{\circ} \pm 1$ °C durante 2 minutos⁴⁴.

Cromatografía por HPLC

Se utilizó un equipo cromatográfico AGILENT 1100 Eclipse XD B- equipado con una columna C18, 4,6 x 150 mm, 5 µm; con un detector de 216 nm. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo: agua (60:40), con una velocidad de flujo fue de 0.6 mL por minuto y un volumen de inyección 10 µL. a una temperatura de 40°C.

Análisis de resultados obtenidos

La evaluación de los resultados obtenidos se realizó mediante la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de Mínima Diferencia Significativa (MDS). El análisis se desarrolló utilizando el programa SPSS® ver.19 para Microsoft® Windows.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los diferentes ensayos de identificación química cualitativos realizados en los 5 extractos obtenidos de las hojas de *Artemisia absinthium*, sugieren la posible presencia de esteroides, terpenoides y lactonas en casi todos los extractos, además se detectó la presencia de alcaloides, flavonoides, y compuestos fenólicos (Tabla 1).

Tabla 1. Metabolitos secundarios encontrados en extractos Hexánico, Acetato Etilico, Diclorometano,Metanol y acuoso de *Artemisia absinthium* L. "ajeno", según la técnica descrita por Olga Lockl

Metabolitos secundarios	Prueba	Extracto Hexano	Extracto Acetato Etilo	Extracto <u>Diclorometano</u>	Extracto Metanólico	Extracto Acuoso
Alcaloides	Mayer	-	-	+	+	+
Antraquinonas	<u>Bortranger</u>	-	-	+	-	-
Esteroles y Terpenos	<u>Liebermann - Burchard</u>	+	+	+	+	-
Flavonoides	<u>Shinoda</u>	-	+	+	+	+
Lactonas	<u>Baljet</u>	+	+	+	-	-
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+	+	-	+	-
Cumarinas	Fluorescencia	-	-	-	-	-
Saponinas	<u>Rosset</u>	-	-	-	-	-

+ : Presencia del metabolito secundario

- : Ausencia del metabolito secundario

Teniendo en cuenta los criterios propuestos por Muñoz, et al, para clasificar la actividad antiplasmodium *in vitro* de los extractos de *Artemisia absinthium* L., en base a los valores del porcentaje de inhibición de crecimiento, se encontró que los extractos de acetato de etilo y metanólico mostraron mayor actividad, siendo **excelente** a la concentraciones de 10 ug/mL frente a *P. vivax* y de **muy buena** frente a cultivos de *P. falciparum*; sin embargo a la dosis de 100 ug/mL la actividad fue de **buena** tanto en de *P. vivax* y *P. falciparum*, a excepción del extracto Metanólico que dio actividad débil frente a *P. falciparum* (Tabla 2).

Tabla 2. Relación entre porcentaje de inhibición de crecimiento y el tipo de actividad antiplasmodium de los extractos de *Artemisia absinthium* L. a las concentraciones de 10 y 100 ug/mL aplicadas a cultivos de *P. vivax* y *P. falciparum*.

Parásito	Dosis [ug/mL]	Hexano		<u>Diclorometano</u>		Acetato Etilo		Metanol		Agua	
		PI	Tipo actividad	PI	Tipo actividad	PI	Tipo actividad	PI	Tipo actividad	PI	Tipo actividad
<i>P. vivax</i>	10	81.0149	Muy buena	77.1736	Muy buena	92.0562	Excelente	92.6557	Excelente	81.6084	Muy buena
	100	91.9947	Buena	91.4038	Buena	94.5840	Buena	91.2489	Buena	84.9010	Débil
<i>P. falciparum</i>	10	66.3509	Muy buena	52.05650	Muy buena	89.9146	Muy buena	85.1933	Muy buena	69.9382	Muy buena
	100	83.6886	Débil	84.4762	Débil	91.5607	Buena	61.3938	Débil	74.5211	Débil

PI: Porcentaje de inhibición del crecimiento.

En relación a la actividad antiplasmodium de las fracciones cromatográficas F6 y F8 del extracto Acetato de etilo de *Artemisia absinthium* L. indican un PI de 90,1255; 91,2500 y 90,2024, respectivamente a las concentraciones de 10, 50 y 100 µg/mL; mientras la fracción F8 muestra PI de 91,7351; 90,9441 y 90,0961 a las mismas concentraciones; estos resultados son clasificados como actividad excelente, muy buena y buena (Tabla 3). El análisis estadístico de estas pruebas señalan que existen diferencias significativas entre las fracciones F6 y F8 respecto a las demás fracciones, según las pruebas de ANOVA y la Prueba post hoc.

Tabla 3. Relación entre porcentaje de inhibición de crecimiento y el tipo de actividad antiplasmodium "in vitro" de las fracciones cromatográficas del extracto Acetato etílico de *Artemisia absinthium* L. a las concentraciones de 10, 50 y 100 µg/mL frente a *P. vivax*.

Fracción	10 µg/mL		50 µg/mL		100 µg/mL	
	PI Prom	Tipo de Actividad	PI Prom	Tipo de Actividad	PI Prom	Tipo de Actividad
F01	39.7494	DEBIL	45.2589	DEBIL	64.8195	DEBIL
F02	49.2420	BUENA	66.8276	BUENA	62.1135	DEBIL
F03	44.4505	BUENA	72.1692	BUENA	70.1023	DEBIL
F04	48.1831	BUENA	46.1624	DEBIL	48.1012	MUY DEBIL
F05	82.945	MUY BUENA	73.3470	BUENA	71.2626	DEBIL
F06	90.1255	EXCELENTE	91.2500	MUY BUENA	90.2453	BUENA
F07	49.3744	BUENA	47.7131	DEBIL	51.4514	DEBIL
F08	91.7351	EXCELENTE	90.9441	MUY BUENA	90.0961	BUENA
F09	47.3377	BUENA	62.7984	BUENA	58.3324	DEBIL
F10	83.7543	MUY BUENA	61.6781	BUENA	60.3825	DEBIL

PI: Porcentaje de Inhibición de la Parasitemia

En las figuras 2 y 3 se muestran los análisis microscópicos del patrón positivo infectado del parásito y después del tratamiento donde casi no se observa infección.

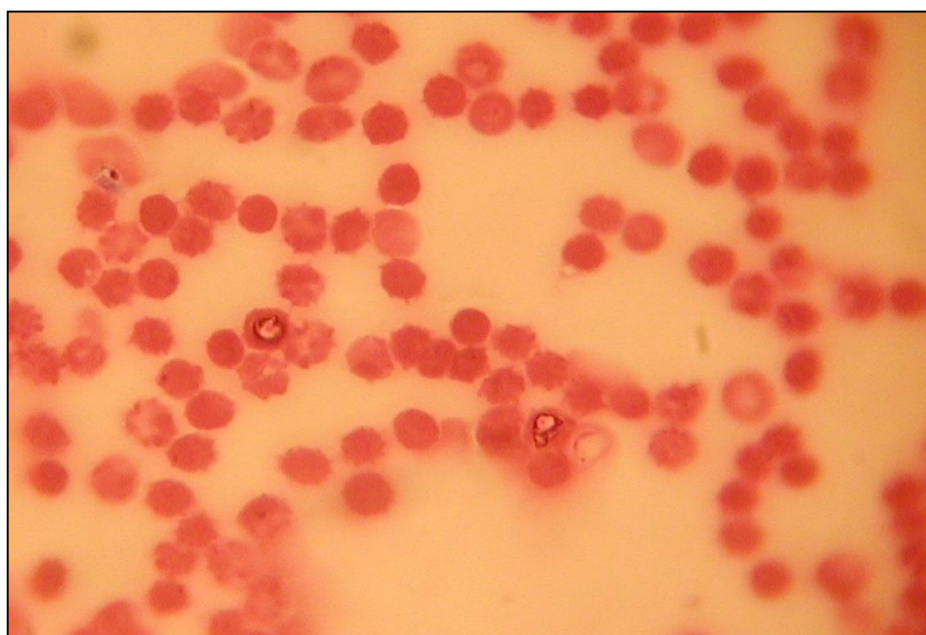


Fig. 2. Microfotografía con presencia de trofozoitos y gametocitos de *Plasmodium falciparum* en medio Waymouth MB 752/1 (Sigma-Aldrich®), Blanco, a las 72 horas a 1000 A, sin tratamiento.

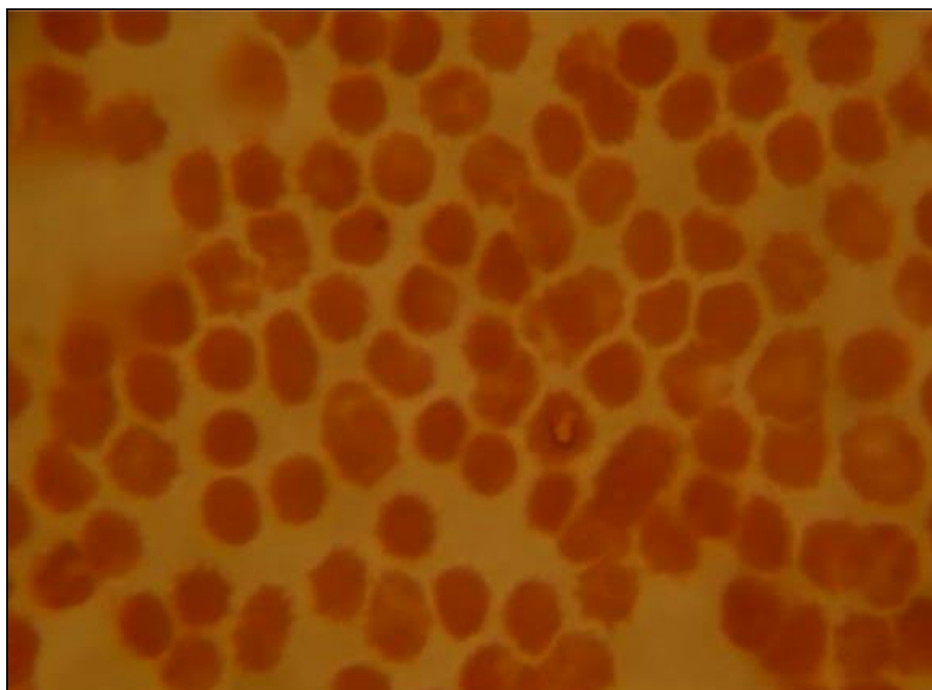


Figura 3. Microfotografía de cultivo casi negativo de *Plasmodium* luego del tratamiento con las fracciones cromatográficas de Acetato de Etilo, a las 72 horas a 1000 A.

En relación al tratamiento *in vivo* a especímenes *Aotus nancimae* previamente infectados con *P. falciparum*, se les aplicó la fracción F8 del extracto estéril de acetato de etilo de *A. absinthium* a la dosis de 50 mg/kg de peso por vía oral y de 25 mg/kg de peso, por la vía intraperitoneal (2 grupos); se observó después de 6 días de tratamiento la ausencia de parasitemia en el 75 % de los especímenes en ambos tratamientos, siendo el resultado semejante en el grupo control 4, al que se le aplicó el medicamento Artesunato en ampolla (Tabla 4)

Tabla 4. Resultados del tratamiento con la fracción F8 de *Artemisia absinthium* L. y Artesunato en ampolla por vía oral y parenteral a especímenes *Aotus nancimae* infectados experimentalmente con *P. falciparum*.

Grupo	Nº de espécimen	Dosis de fracción	1º Control Basal d 0	2º Control d 3	3º Control d 5	4º Control d 9	% ausencia parasitemia
Grupo 1 Testigo	1	0	+	+	+	+	0
	2	0	+	+	+	+	
	3	0	+	+	+	+	
	4	0	+	+	+	+	
Grupo 2 Problema (V.O.)	1	50	+	-	-	-	75
	2	50	+	+	+	+	
	3	50	+	-	-	-	
	4	50	+	-	-	-	
Grupo 3 Problema (V.P.)	1	50	+	-	-	-	75
	2	50	+	-	-	-	
	3	50	+	-	-	-	
	4	50	+	+	+	+	
Grupo 4 Control Artesunato (V.P.)	1	10	+	+	+	+	75
	2	10	+	-	-	-	
	3	10	+	-	-	-	
	4	10	+	-	-	-	

Leyenda:

V.O. = Vía oral

V.P. = Vía parenteral

d = día

En la lectura de los cromatogramas de la fracción F6, F8 y la muestra de referencia de Artesunato utilizando un equipo HPLC Agilent 1100 Eclipse XDB-C18, 4,6 x 150mm, 5µm, se muestra que

aparecen picos con tiempos de retención similares con el patrón de Artesunato, en el cromatograma de la fracción 8, lo cual pudiera sugerir estructuras con relación estructural a la artemisinina en las fracciones evaluadas, lo cual determina un interés especial en continuar los estudios con esta especie que crece en la sierra del Perú para determinar si realmente puede producir estructuras químicas de utilidad para el tratamiento de la malaria . En las Figuras 4, 5, 6 se muestran los resultados de dichos cromatogramas.

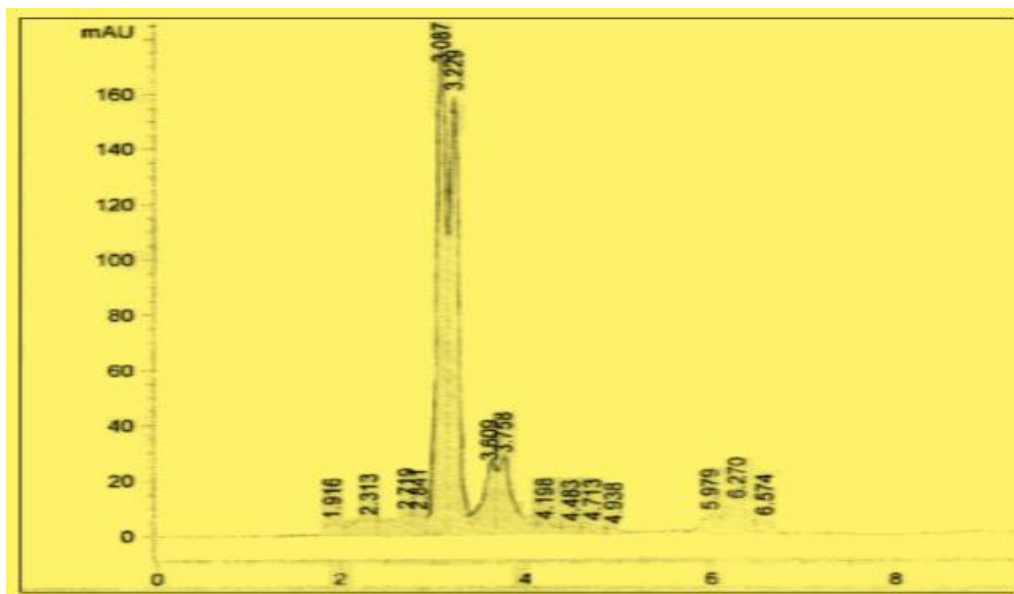


Fig. 4. Cromatograma de la fracción F8 de del extracto de acetato de etilo de *Artemisia absinthium* L.

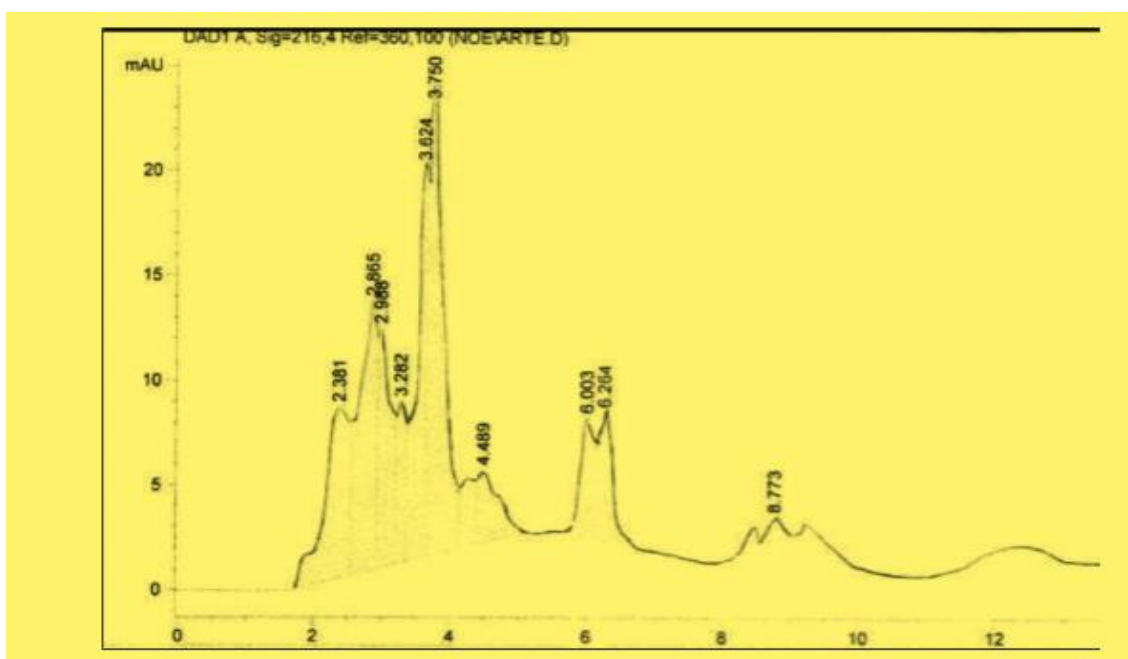


Fig. 5. Cromatograma de la fracción F8 de del extracto de acetato de etilo de *Artemisia absinthium* L.

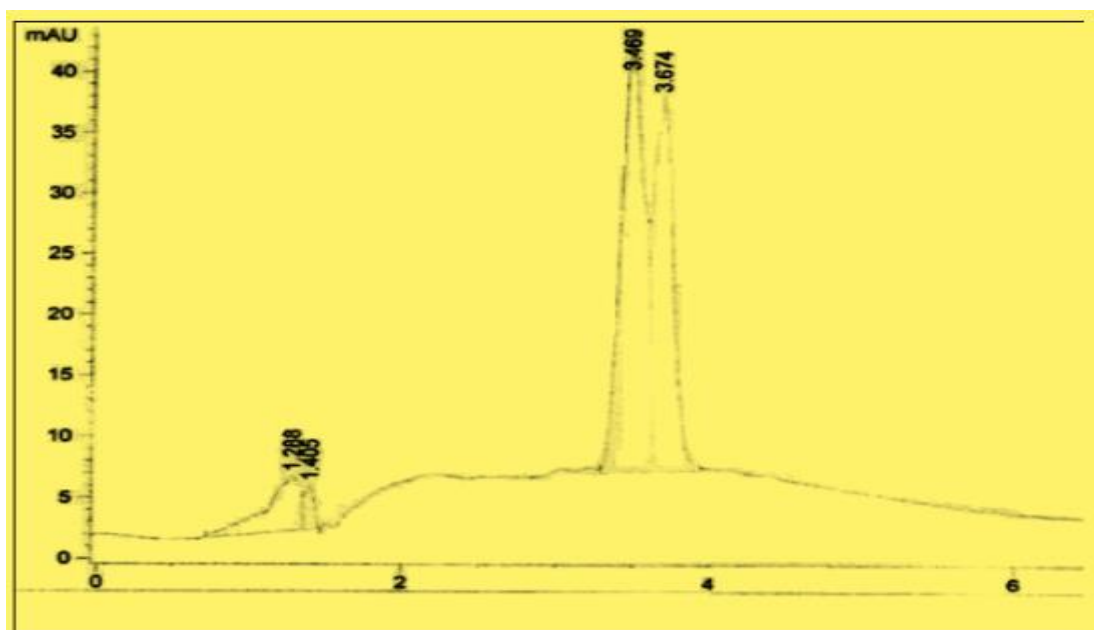


Fig. 6. Cromatograma de la muestra de referencia Artesunato,

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FÜGI M, WITTLIN S, DONG Y, VENNERSTROM J. 2010, Probing the Antimalarial Mechanism of Artemisinin and OZ277 (Arterolane) with non peroxidic isosteres and nitroxyl radicals. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. American Society for Microbiology. Vol. 54, No. 3. p. 1042-1046
- GONZÁLEZ D. 2005. Nuevas dianas Terapéuticas para el tratamiento de la malaria. *Enfermedades Emergentes* 7(1): 40-43.
- GUTIÉRREZ S, Arróspide N. 2003. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el diagnóstico de Malaria. Serie de Normas Técnicas N° 39. Lima: Instituto Nacional de Salud. Perú.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. Información Socio Demográfica. Indicadores de Salud. INEI Perú. [Monografía en Internet] Perú. 2008. [Acceso 8 febrero 2010]. Disponible en: www.inei.gob.pe.
- LOCK O. 1994. Investigación Fitoquímica. Métodos de Estudio de productos Naturales. 2° ed. Lima: Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; p. 284-287.
- MOSTACERO J, MEJÍA F, GAMARRA O. 2002. Taxonomía de las Fanerógamas útiles del Perú. Volumen II. Trujillo: Editora Normas Legales; p. 868-870.
- MUÑOZ V, SAUVAIN M, BOURDY G, ARRÁZOLA S, CALLAPA J, RUIZ G. A. 2000; Search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alteños. Indians. *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 123-131.
- OSORIO E, ARANGO G, GARCÍA E, MUÑOZ K, RUIZ G, GUTIÉRREZ D. 2005. Actividad Anti-plasmódica “in vitro” e Inhibición de la formación de la β -Hematina de Plantas Colombianas de la Familia Annonaceae. *Acta Farm. Bonaerense*; 24 (4): 527-32.
- STEFFEN R., BEHRENS R. 2001. Travelers Malaria. *Parasitology Today*. 8 N°.2, 61-66.

- TRAGER W, JENSEN J. 1976. Human malaria parasites in continuous Culture. *Science*. 193 (4254):673-5.
- VENNERSTROM L, BARNES S, BRUN R, CHARMAN S, CHIU F, CHOLLET J, DONG. 2004. Identification of an antimalarial synthetic trioxolane drug, development candidate. *Nature*. 430:900-904.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Malaria Report 2008. [Monografía en Internet]. Geneva: WHO; 2008 [citado 5 Jul 2010]. Disponible en: <http://www.who.int/malaria/wmr/2008/malaria2008.pdf>.