



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

CARACTERIZACIÓN DE *Artemisia annua* CULTIVADA BAJO CONDICIONES
AMBIENTALES TÍPICAS DEL NORESTE VENEZOLANO Y EVALUACIÓN DE SU
ACCIÓN SOBRE EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*
(Modalidad: Tesis de Grado)

YUSMARIS JOSEFINA CARIACO SIFONTES

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2013

CARACTERIZACIÓN DE *Artemisia annua* CULTIVADA BAJO CONDICIONES
AMBIENTALES TÍPICAS DEL NORESTE VENEZOLANO Y EVALUACIÓN DE SU
ACCIÓN SOBRE EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi*

APROBADO POR:

Dra. Mariolga Berrizbeitia
Asesora

Dr. José Imery
Coasesor

ÍNDICE

	Pág
LISTA DE TABLAS.....	VI
.....	
LISTA DE FIGURAS.....	VII
.....	
RESUMEN.....	IX
.....	
INTRODUCCIÓN.....	1
.....	
METODOLOGÍA.....	8
.	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES.....	38
.	
RECOMENDACIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
...	
APÉNDICES	

DEDICATORIA

A

Dios, por ofrecerme grandes oportunidades y difíciles momentos de los cuales aprender, así como por poner en mi camino a excelentes personas que me han ayudado a forjar quien soy hoy.

Mis padres Leyda Sifontes y Antonio Cariaco, por levantar a una familia teniendo limitados recursos, este logro es suyo.

Mis hermanos Eduardo, Yilmarys y Antonio, por todo su cariño, los quiero.

Mis amigas María Alejandra, Mairelis, Rafela, Adriana y Dayana compañeras, cómplices y confidentes, las adoro chicas.

Mi novio Jesús, mi amor y mi mejor amigo, te amo.

Mis asesores Mariolga Berrizbeitia y José Imery, por fomentar en mí el razonamiento, la curiosidad científica y la búsqueda incesante de conocimiento, los admiro.

Mi abuela Juana, nunca vi a una planta marchitar bajo tu cuidado, ahora espero estés en los jardines de Dios, te extraño.

AGRADECIMIENTOS

A

La Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, la Casa más alta.

Los profesores Mariolga Berrizbeitia y José Imery por su amistad y consejos acerca de la vida, por invertir su tiempo en mi trabajo, por su constante aporte de conocimientos y ayuda, sin los cuales habría sido imposible la culminación de este trabajo. Así mismo, les agradezco al señor Ricardo Morgado y la señora Wendy Ozols por su cortesía y comprensión.

El Postgrado de Biología Aplicada, y muy especialmente a la Lcda. Dairene Moreno, Lcda. Mayelis González, Sra. Luz Coronado, MSc. Jessica Rodríguez, MSc. Noris García, infinitísimas gracias por su ayuda y amistad.

La MSc. Zulay Simoni, por su disposición y colaboración.

La profesora Carmen Alfonsi por su colaboración en el análisis estadístico.

El personal del Herbario Isidro Ramón Bermúdez Romero, por su colaboración.

El Dr. Pierre Lutgen, por haber facilitado las semillas y hojas de *A. annua*, sin este valioso aporte este trabajo no habría podido llevarse a cabo.

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Pruebas de viabilidad realizadas a las semillas de <i>Artemisia annua</i>	17
2. Porcentajes de concentración inhibitoria del crecimiento de los aislados utilizados de <i>Trypanosoma cruzi</i> (CHHP y RG1) a las diferentes concentraciones de la infusión de <i>Artemisia annua</i>	33
3. Análisis de varianza multifactorial para la densidad celular de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> , bajo acción de las infusiones de <i>Artemisia annua</i>	35

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Histograma de frecuencias del número de plántulas nuevas de <i>Artemisia annua</i> por día, sembradas en arena.....	18
2. Desarrollo de <i>Artemisia annua</i> durante el ensayo de germinación en arena.	19
3. Semillas de <i>Artemisia annua</i> provenientes de Luxemburgo, junto con restos de flores, hojas y materia vegetal secos.....	21
4. Semillas de <i>Artemisia annua</i> durante el proceso de germinación <i>in vitro</i> sobre papel de filtro.....	22
5. Plantas de <i>Artemisia annua</i> en etapa de germinación y desarrollo foliar.....	23
6. Longitudes de los folíolos principales en la hoja de <i>Artemisia annua</i> en la novena semana de crecimiento, al final de la etapa de ramificación.....	24
7. Plantas de <i>Artemisia annua</i> en etapa de brote floral y de floración.....	26
8. Flores de <i>Artemisia annua</i> con aquenios formados en maduración.....	26
9. Actividad de la infusión de <i>Artemisia annua</i> cultivada en Cumaná a distintas concentraciones, sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado RG1)	27
10. Curva dosis-respuesta para la determinación de la concentración inhibitoria del 50,00% y de la concentración mínima inhibitoria de la infusión de <i>Artemisia annua</i> cultivada en Cumaná, sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado RG1) a 7 días post-tratamiento.....	28
11. Actividad de la infusión de <i>Artemisia annua</i> cultivada en Luxemburgo a	

distintas concentraciones, sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado RG1)	29
12. Curva dosis-respuesta para la determinación de la concentración inhibitoria del 50,00% y de la concentración mínima inhibitoria de la infusión de <i>Artemisia annua</i> cultivada en Luxemburgo, sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado RG1) a 7 días post- tratamiento.....	29
13. Actividad de la infusión de <i>Artemisia annua</i> cultivada en Cumaná a distintas concentraciones, sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado CHHP)	30
14. Curva dosis-respuesta para la determinación de la concentración inhibitoria del 50,00% y de la concentración mínima inhibitoria de la infusión de <i>Artemisia annua</i> cultivada en Cumaná, sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado CHHP) a 7 días post-tratamiento.....	30
15. Actividad de la infusión de <i>Artemisia annua</i> cultivada en Luxemburgo a distintas concentraciones, sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado CHHP).....	31
16. Curva dosis-respuesta para la determinación de la concentración inhibitoria del 50,00% y de la concentración mínima inhibitoria de la infusión de <i>Artemisia annua</i> cultivada en Luxemburgo, sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> (aislado CHHP) a 7 días post- tratamiento.....	32
17. Cambios morfológicos de los epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en cultivos con infusiones de <i>Artemisia annua</i> (400X)	34

RESUMEN

En esta investigación se caracterizaron semillas de *A. annua* enviadas desde Luxemburgo, y las plantas que resultaron de su siembra en Cumaná; así mismo, se evaluó la acción de esta planta sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* usando dos tipos de infusiones: una preparada con hojas de plantas cultivadas en Cumaná y otra con hojas provenientes de Luxemburgo, ambas a concentraciones de 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00; 3,00% p/v de *A. annua*; sobre dos aislados de *T. cruzi*: RG1 y CHHP, durante 7 días, en cada uno de los cuales se determinó la densidad celular de los parásitos. Las semillas de *A. annua* recibidas poseían un porcentaje de humedad de $9,68 \pm 1,06\%$, germinación *in vitro* de $3,66 \pm 1,53\%$, peso promedio de cada semilla de $42,50 \pm 1,90 \mu\text{g}$ y longitud promedio de $0,84 \pm 0,13 \text{ mm}$; al sembrar en arena su desarrollo fue escaso y su floración prematura (a los 34 días), además no soportaron el proceso de trasplante; en cambio, en tierra abonada se logró un mejor desarrollo; sin embargo, produjeron botones florales a los 28 días posteriores a la siembra. Las plantas bajo estudio tuvieron una altura máxima de 45,00 cm, presentaron hojas primero dentadas, luego bipinatisectas y finalmente tripinatisectas de hasta 13,00 cm de longitud, tallos de hasta 5,00 mm de diámetro, los cuales en la fase temprana de crecimiento son lisos y en la ramificación estriados, e inflorescencias plurifloras, cuyos capítulos presentaron 4,00 mm de altura y 6,00 mm de diámetro aproximadamente. Se encontró que las infusiones de *A. annua* tuvieron un efecto antiproliferativo, dosis dependiente sobre ambos aislados de *T. cruzi*, resultando ser más potente la acción de la infusión preparada con hojas provenientes de Luxemburgo, que la que fue preparada con hojas de plantas cultivadas en Cumaná. Ampliando y profundizando los estudios acerca del tema, éstas infusiones de *A. annua* podría convertirse en una nueva alternativa terapéutica para la infección por *T. cruzi*.

INTRODUCCIÓN

Artemisia annua L. es una planta de la familia Asteraceae que ha sido usada en China desde hace más de 2 000 años para el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo las parasitarias (Mucciarelli y Maffei, 2002). El compuesto activo de la planta es la artemisinina, la caracterización de sus efectos fueron iniciados por científicos chinos, convirtiendo estos estudios en valiosos avances en el control de diversas enfermedades, en especial de la malaria (Klayman, 1985).

El primer registro de las propiedades benéficas de esta planta, conocida en China como Qing Hao, datan del año 168 A.C, en un reporte titulado: “Recetas para 52 clases de enfermedades”, en el cual se describe como medicina para el tratamiento de las hemorroides; y la primera sugerencia de sus propiedades antimaláricas se encontraron en un documento de Ge Hong (281–340 D.C.), donde se describe la forma de preparación del tratamiento para la fiebre causada por malaria, tomando un puñado de la planta y empapándolo en dos litros de agua, para luego colar el líquido y beberlo en su totalidad. En la década de 1960 ocurrió la rápida expansión de parásitos maláricos multiresistentes, llevando a la creación del Programa 523, en el cual científicos chinos experimentaron con muestras de plantas tradicionales de ese país; hasta que a principios de la década de 1970 se llevó a cabo el aislamiento y caracterización del compuesto activo de *A. annua* (Li *et al.*, 2006).

A. annua está ampliamente distribuida en zonas templadas y subtropicales del mundo, conjuntamente, se han iniciado cultivos experimentales en muchos países en los cuales esta planta no es nativa. Siendo originaria de China, crece principalmente en Asia y Europa; no obstante, también lo hace en la región mediterránea, países de África del Norte, Canadá y Estados Unidos (Ferreira *et al.*, 1997; Organización Mundial de la Salud, 2006a). En Latinoamérica, se sabe que se desarrolla en Argentina, Brasil y Colombia (Spegazzini y Najera, 1989; De Magalhães *et al.*, 2006). En Venezuela, son pocos los trabajos encontrados que describan el cultivo de esta planta; sin embargo,

Vivas (1997) logró el desarrollo de ésta en San Antonio de los Altos, estado Miranda, bajo condiciones de umbráculo.

La planta presenta una alta adaptabilidad, con proclividad por las condiciones solares, bajo esta circunstancia produce una mayor cantidad de compuestos activos y aceites esenciales, que cuando se desarrolla en la sombra (Acosta *et al.*, 2011). La temperatura para la germinación de las semillas está por encima de 7°C, mientras que para su crecimiento se requieren temperaturas que oscilan entre 20 y 25°C y suelos con pH entre 4,50 y 8,50; en cuanto a la altitud a la cual se desarrolla, ésta varía dependiendo del país (Ferreira *et al.*, 1995; Organización Mundial de la Salud, 2006a).

A. annua es una hierba anual, de días cortos con un fotoperíodo de aproximadamente 13,50 horas, erecta, con una altura que puede variar entre 0,50 y 2,00 m, aunque se han encontrado más pequeñas. Las hojas son aromáticas con rangos entre 2,50 y 5,00 cm de longitud, bipinatisectas o tripinatisectas; presenta inflorescencias en capítulos dispuestos en amplias panojas, con brácteas orbiculares formando el involucre; estas pequeñas flores amarillas pueden ser de dos tipos: las periféricas pistiladas (femeninas) y las del disco hermafroditas (bisexuales), con ovarios uniloculares que generan aquenios glabros, ligeramente nervados; *A. annua* se propaga a través de semillas y su polinización se lleva a cabo a través del viento o insectos. Su ciclo de crecimiento, desde la siembra hasta la senescencia consiste en seis etapas, llamadas fases de germinación y desarrollo foliar, ramificación, brote floral, floración, fructificación y muerte de la planta. La duración de cada período de crecimiento de *A. annua* varía con la fuente de las semillas, técnicas, lugar y condiciones de cultivo (Spegazzini y Najera, 1989; Ferreira *et al.*, 1995; Ferreira y Janick, 1996; Organización Mundial de la Salud, 2006a).

El componente activo de los extractos de *A. annua* es la artemisinina, una lactona sesquiterpenoide que traspasa las membranas biológicas con facilidad. Además de este compuesto, la planta es rica en esteroides, cumarinas, purinas, terpenoides y flavonoides, de los cuales los sesquiterpenoides, ácido dihidroartemisínico, ácido artemisínico y

artesanato son los más importantes, encontrándose éstos en las hojas y en menor cantidad en inflorescencias de la planta (Luo y Shen, 1987). En cuanto a la cosecha de *A. annua*, Woerdenbag *et al.*, (1994) aseguran que se debe llevar a cabo antes de la floración (durante los 4 a 6 meses posteriores a la siembra), pues justo antes de ésta el contenido de aceites esenciales y artemisinina alcanza su máximo. El contenido de artemisinina de *A. annua* silvestre ha sido descrito variando desde 0,01% hasta 1,00%, dependiendo de la fuente y condiciones de cultivo de la planta (Trigg, 1989; Delabays *et al.*, 1993).

El mecanismo de acción antiparasitario de la artemisinina, que se conoce actualmente es el que ésta ejerce sobre especies de *Plasmodium*, el cual implica dos etapas: una de activación, en la cual el hierro contenido dentro del parásito, producto de la degradación de la hemoglobina, cataliza la degradación del puente endoperóxido de la artemisinina, produciendo radicales libres altamente reactivos; y una de alquilación, en la que los radicales libres generados en la activación forman un enlace entre la artemisinina y las proteínas parasitarias o con la hemozoína (pigmento parasitario), causando daños en la membrana, reducción de la actividad citocromo-oxidasa y de la síntesis proteica del parásito, llevando a la muerte del mismo (Meshnick, 1994; Wright y Warhurst, 2002).

Recientemente, debido a la necesidad de aumentar la producción de artemisinina, se identificaron en el mapa genético de la planta las regiones del genoma que afectan componentes relacionados con el rendimiento de la artemisinina, como son la arquitectura de la planta, el área de las hojas, cantidad de tricomas por área de hoja, entre otros (Graham *et al.*, 2010). La concentración de artemisinina y otros compuestos producidos por la planta se ve afectada por la nutrición del sustrato donde se desarrollan las mismas, siendo de vital importancia la fertilización con nitrógeno, potasio y fósforo principalmente; así como también por la temperatura a la cual se propagan las plantas, a este respecto Ferreira *et al.* (1995) afirman que las altas temperaturas ambientales provocan una disminución en las concentraciones de artemisinina (Ferreira, 2007; Davies *et al.*, 2009).

Los componentes químicos de *A. annua* pueden extraerse de diferentes maneras, entre ellas se encuentran la preparación de infusiones y la extracción con solventes orgánicos como éter de petróleo, cloroformo y hexano, pudiendo obtenerse a través de este procedimiento 95,00 a 98,00% de la artemisinina y sus precursores; sin embargo, el método más usado actualmente para la extracción total de artemisinina es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Räth *et al.*, 2004; Ferreira, 2007).

La Organización Mundial de la Salud, recomienda el uso de terapias basadas en la combinación de derivados de la artemisinina con otros medicamentos antimaláricos como lumefantrina, amodiaquina, mefloquina y sulfadoxina-pirimetamina, sumado a esto, algunos autores defienden el uso de las terapias basadas en píldoras de artemisinina o sus derivados, por tratarse de una fuente pura de estos compuestos; por el contrario, otros alegan que la infusión de *A. annua* resulta ser más efectiva debido a la sinergia que presenta la artemisinina con compuestos como los flavonoides y la curcumina presentes en la planta (Arrow *et al.*, 2005; Organización Mundial de la Salud, 2006b; Lutgen, 2009).

Existen algunos estudios soportan el hecho de que las infusiones son más efectivas que las monoterapias, entre estos se encuentra el estudio de Mueller *et al.* (2000), quienes demostraron que la infusión de *A. annua* es efectiva en el tratamiento de la malaria al encontrar que su administración a pacientes diagnosticados con dicha enfermedad, disminuía considerablemente la parasitemia al cuarto día de iniciado el tratamiento; de igual modo, observaron que en otro grupo de pacientes sometidos al tratamiento con la infusión se atenuaban de manera significativa signos y síntomas como fiebre, dolor de cabeza, escalofríos, vértigo, artralgia, entre otros; así como también concluyeron en su investigación que la biodisponibilidad de la artemisinina proveniente de infusiones, podía exceder la de las tabletas de artemisinina pura. Posteriormente, Räth *et al.* (2004) determinaron que la artemisinina derivada de la infusión de *A. annua* se absorbía rápidamente, observando la concentración plasmática máxima a los 30 minutos después de la administración; en contraste, la concentración máxima de artemisinina en el

plasma, luego de ingerir tabletas de este compuesto ocurre aproximadamente a las 3,00 horas (Organización Mundial de la Salud, 2006b).

Muchos de los compuestos extraídos de *A. annua* tienen propiedades antimaláricas, siendo la artemisinina la más activa; por ello, es posible que la mezcla de constituyentes encontrados en la infusión intervenga para que la producción de resistencia a estos compuestos sea menos probable, en comparación con la monoterapia representada por un simple agente encontrado en los derivados químicos de la artemisinina (Krishna *et al.*, 2004; Biesen, 2010). Entre estos constituyentes con actividad antimalárica se encuentra el arteéter, el cual es un derivado de la artemisinina que combinado con la curcumina aumentó considerablemente el número de días de supervivencia de ratones infectados con *Plasmodium berghei* en comparación con el compuesto puro (Nandakumar *et al.*, 2006).

Wright *et al.* (2010) compararon la concentración de artemisinina extraída a través de métodos antiguos chinos como el remojo y el machacamiento de hojas frescas, con la preparación de infusiones de hierba seca proveniente de *A. annua*; encontrando que los métodos antiguos eran más eficaces en la producción de extractos ricos en artemisinina; y Restrepo *et al.* (2011) estudiaron la utilidad de *A. annua* como tratamiento de la leishmaniasis, sin encontrar efectos de la infusión *in vitro*, aunque encontraron efectividad con las fracciones purificadas de la planta.

Los estudios científicos acerca de esta planta se han centrado, mayormente, en la lucha contra la malaria a nivel mundial, siendo probado su potente efecto antimalárico (Arrow *et al.*, 2005; Carmargo *et al.*, 2009). La artemisinina y sus derivados muestran eficacia contra diversos parásitos, para los cuales existen algunas teorías sobre cómo este compuesto actúa sobre ellos, tales son: *Trypanosoma* spp., inhibiendo la actividad de las bombas ATPasa dependientes de calcio en sus membranas; *Leishmania* spp., induciendo apoptosis; *Toxoplasma gondii* y *Schistosoma japonicum* (el mecanismo de acción sobre estos dos últimos aún es desconocido). De igual forma, se ha demostrado que los

distintos extractos y componentes de *A. annua* poseen actividad antibacterial; provocan efectos antiinflamatorios semejantes al del diclofenac sódico; afectan la viabilidad de células cancerígenas y presentan poder tóxico sobre hierbas monocotiledoneas y dicotiledóneas, demostrando así su poder herbicida (Yang y Liew, 1993; Bagchi *et al.*, 1997; Bhakuni *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2006; Mishina *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2007; Lutgen y Michels, 2008; De Oliveira *et al.*, 2009; Swapnadeep *et al.*, 2009; Michaelis *et al.*, 2010; Restrepo *et al.*, 2011).

T. cruzi es un protozoo flagelado causante de la enfermedad de Chagas, la cual es endémica en diferentes regiones de Latinoamérica, entre ellas Venezuela, país donde ésta enfermedad presenta una prevalencia de aproximadamente 8,90% (Feliciangeli, 2009). Esta infección se transmite a través de las deyecciones de triatominos, en las cuales se encuentra el agente infectante. El triatomo al alimentarse en un mamífero defeca y los parásitos pasan al torrente circulatorio a través de las mucosas o escoriaciones producidas por el rascado. Este parásito, durante su ciclo de vida, puede presentarse bajo la forma de epimastigote en el triatomo, amastigote y tripomastigote sanguíneo en los tejidos y la sangre del hombre, respectivamente; siendo la fase de epimastigote y amastigote en la cual *T. cruzi* se multiplica mediante fisión binaria (Hómez *et al.*, 2007).

El tratamiento sintomático contra la tripanosomiasis o infección por *T. cruzi* está restringido principalmente hacia dos drogas de limitada efectividad y alta toxicidad: benznidazol y nifurtimox, produciendo este último más efectos nocivos que el primero. Estos medicamentos tienen una efectividad de hasta 80,00% en pacientes tratados en fase aguda; sin embargo, más del 80,00% de los pacientes tratados en fase crónica no son curados parasitológicamente con dichos compuestos (Rodríguez, 2005). Entre las desventajas de la administración de estos medicamentos se encuentran, su elevado costo, difícil disponibilidad, administración por largos períodos de tiempo (60 días), resistencia observada en algunas cepas del parásito y las reacciones adversas, entre las que se encuentran: náuseas, anorexia, vómitos, pérdida de peso, temblores, polineuropatías, eritema, dermatopatías alérgicas, insomnio, linfadenopatías, dolor muscular, depresión de

la médula espinal, entre otros (Laplumé *et al.*, 1982; Castro y Díaz, 1988).

Se ha demostrado la resistencia tanto *in vivo* como *in vitro* de algunas cepas de *T. cruzi* contra nifurtimox y benznidazol (Filardi y Brener, 1987). De este hecho, nace la necesidad de encontrar nuevas herramientas terapéuticas contra la enfermedad, constituyendo las de origen herbal una buena alternativa gracias a su baja toxicidad y eficientes resultados. En este sentido, se ha probado el efecto de sesquiterpenos de lactonas (al igual que la artemisinina) aislados de la misma familia que *A. annua* (Asteraceae) como la dehidrozaluzanina C, aislado de la planta *Munnozia maronii*, que inhibe el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi in vitro*; y el philostachyin y peruvín extraídos de *Ambrosia tenuifolia*, los cuales mostraron una marcada actividad antitripanomicida (Fournet *et al.*, 1993; Sülsen *et al.*, 2008).

En los últimos años, los esfuerzos científicos relacionados con *A. annua* se han centrado mayormente en el uso de esta planta como tratamiento contra la malaria, quizás por esta razón existen pocas investigaciones en las que se evalúe la acción de los extractos de esta hierba sobre *T. cruzi*; la más destacada es la de Mishina *et al.* (2007), en la cual se comprobó, mediante ensayos *in vitro*, la inhibición que ejercen la artemisinina y sus derivados purificados, sobre cepas de *T. cruzi* y *T. brucei rhodesiense*.

Debido a las múltiples aplicaciones clínicas presentadas por *A. annua* y al reciente descubrimiento de la sinergia que presenta la artemisinina con otros compuestos presentes en esta prometedora hierba, se llevó a cabo su caracterización morfológica y la evaluación de la acción antiparasitaria *in vitro* de su infusión sobre epimastigotes de *T. cruzi*, siendo la presente investigación pionera en este tema en Venezuela.

METODOLOGÍA

Obtención de las semillas de *A. annua*

Las semillas que se utilizaron en esta investigación y las muestras de material foliar de la cosecha luxemburguense, fueron enviadas desde la Organización no Gubernamental “Iwerliewen” de Luxemburgo, por el Dr. Pierre Lutgen.

Determinación de la calidad de las semillas

Determinación del porcentaje de humedad de las semillas

Se pesaron en una balanza analítica 250 semillas, este peso representó el peso húmedo de las mismas. Seguidamente, estas semillas se llevaron a una estufa a 105°C por 24,00 horas; luego se pesaron nuevamente, obteniéndose su peso seco. Este ensayo se realizó por triplicado y se obtuvo el porcentaje de humedad según la fórmula utilizada por Cordero (2002), la cual se describe a continuación:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso húmedo}} \times 100$$

Peso de cada semilla

A partir del ensayo anterior se calculó el peso de cada semilla dividiendo su peso húmedo entre el número de éstas (250) obteniendo así el peso promedio de cada semilla.

Determinación del porcentaje de germinación *in vitro* o germinación fisiológica

Se tomaron tres placas de Petri (previamente esterilizadas a 121°C y 15,00 atm, durante 15 minutos) a cada una de las cuales se les colocó un círculo de papel de filtro, sobre el cual se esparcieron de manera uniforme 100 semillas, luego se humedeció el papel periódicamente con agua destilada hasta que las semillas germinaron. Se consideró que las semillas habían germinado cuando apareció la radícula del embrión; entonces, se obtuvo el porcentaje de germinación fisiológica a través de la siguiente fórmula, descrita por Sandoval (2009):

$$\text{Porcentaje de germinación} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de semillas germinadas}}{\text{n}^\circ \text{ de semillas iniciales}} \times 100$$

Definición del área y condiciones ambientales de cultivo

El cultivo de *A. annua* se llevó a cabo en un clima típico del noreste de Venezuela, específicamente en un área de bosque muy seco tropical dentro de Cumaná. Esta ciudad se encuentra en las coordenadas 10°27'00" de latitud Norte y 64°10'48" longitud Oeste, a una altitud que va de 0-5 metros sobre el nivel del mar (msnm), cuenta con temperaturas promedio de 26°C y extremas de 17°C y 35°C; humedad relativa del 76,00%, con extremas que van de 40,00 a 100%; y precipitaciones medias anuales de 375,00 mm, con extremas de 106,00 mm y 852,00 mm (Vila, 1965; Grases *et al.*, 2004).

Cultivo de *A. annua* bajo condiciones de vivero

Germinación en arena

El cultivo se inició sembrando en 10 bandejas de fondo agujereado, y que contenían arena de río (cernida, lavada y esterilizada en una estufa a 105°C durante 30 minutos), 1 000 semillas en cada una, con el objeto de probar este sustrato como medio de germinación para *A. annua*. Para ello, se mezcló cada grupo de 1 000 semillas con aproximadamente 200,00 cm³ de arena fina, esta mezcla permitió su diseminación uniforme en la superficie de la arena.

Se utilizó el método de siembra superficial, es decir, a poca profundidad de la superficie del sustrato, al cual se le extrajo una capa de arena de aproximadamente 1,00 cm de espesor; entonces se le trazaron líneas paralelas, en las cuales deberían emerger las plántulas una vez germinadas. Sobre cada una de estas líneas se depositaron las semillas que fueron mezcladas con arena; luego se cubrieron con el sustrato extraído inicialmente y finalmente se regaron con agua destilada. Estas bandejas fueron regadas cada 2 días con agua destilada y se observó la aparición de signos de germinación agronómica, caracterizada por la aparición de brotes vegetativos en la superficie del sustrato (Díaz, 2002; Kulkarni, 2002; Laskowski y Bautista, 2002; Laughlin *et al.*, 2002).

Germinación en tierra abonada

Se utilizaron cajas de germinación, conteniendo tierra compostada a base de caña de azúcar y tierra rica en humus, a las cuales se les agregaron las semillas de *A. annua* mezcladas con arena fina esparciéndose de manera uniforme en la superficie del germinador, luego se cubrieron con una capa de 1,00 cm de profundidad con el mismo sustrato. Estos germinadores se regaron cada dos días (Laughlin *et al.*, 2002).

Trasplante

Cuando las plantas alcanzaron la firmeza suficiente o unos 10,00 cm de altura aproximadamente se trasplantaron a vasos plásticos agujereados en el fondo; los cuales tenían partes iguales dos tipos de sustrato: arena fina del mismo tipo donde germinaron las semillas y tierra compostada. Según Liersch *et al.* (1986) este proceso es el mejor método de establecimiento para *A. annua*.

Caracterización de atributos morfológicos de *A. annua*

Las semillas de *A. annua* provenientes de Luxemburgo y las plantas que emergieron a partir de ellas, bajo condiciones de vivero, fueron objeto de una detallada observación en cuanto a su morfología a lo largo del ciclo de vida. Para ello, se evaluaron las siguientes características:

Características de las semillas provenientes de Luxemburgo: forma, color y tamaño; este último fue medido utilizando el software SigmaScan Pro version 5.0.

Etapas de germinación y desarrollo foliar

Días hasta la germinación agronómica: se registró como el número de días, hasta la aparición del primer brote vegetativo en la superficie del sustrato.

Días hasta la aparición del primer par de hojas: se registró como el número de días, hasta la aparición de las hojas que aparecen luego de las cotiledóneas.

Características de las hojas: forma, color y dimensiones.

Características del tallo: diámetro, textura, color y longitud desde el cuello hasta el ápice

de la hoja más alta.

Etapa de ramificación

Características de las hojas: forma, color, olor y dimensiones.

Características del tallo: diámetro, textura, color y longitud desde el cuello hasta el ápice de la hoja más alta.

Etapa de brote floral

Días hasta la floración: se registró como el número de días, hasta la aparición de los primeros brotes florales.

Etapa de floración

Características de las inflorescencias: forma, color y tamaño.

Etapa de fructificación

Características del fruto: formación de aquenios.

Etapa de marchitamiento

Días hasta el marchitamiento: se registró como el número de días, desde la siembra hasta la senescencia de la planta.

Cosecha y secado de *A. annua*

Durante la cosecha se obtuvo el material foliar de la planta necesario para preparar las infusiones que fueron usadas *in vitro* sobre epimastigotes de *T. cruzi*. La colecta se realizó cuando las plantas alcanzaron la etapa de brote floral, que antecede a la floración, en la cual se alcanza la máxima concentración de artemisinina y otros compuestos activos (Ferreira *et al.*, 1995). Las hojas de la planta se cortaron desde la base, como lo recomienda la Organización Mundial de la Salud (2006a), se depositaron en un recipiente agujereado, luego se taparon con una malla y se colocaron en la oscuridad; éstas hojas se movieron diariamente con el fin de obtener un secado uniforme.

Macerado del material foliar

Una vez que las hojas de *A. annua* se secaron completamente, se trituraron y el material obtenido se guardó en bolsas herméticas y posteriormente almacenó a temperatura ambiente en un lugar libre de humedad hasta el momento de su uso (Organización Mundial de la Salud, 2006a).

Obtención de los aislados de *T. cruzi*

Como material biológico para este estudio, se utilizaron formas epimastigotes de *T. cruzi* de los aislados RG1 y CHHP; ambos son aislados autóctonos extraídos de heces de triatomos infectados en los estados venezolanos Sucre y Vargas, respectivamente. Estos son mantenidos mediante pasajes mensuales en cuñas de agar sangre en el Laboratorio de Inmunoparasitología del Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCA-UDO) y luego adaptadas al medio de cultivo axénico.

Producción de los cultivos axénicos de la forma epimastigotes de *T. cruzi*, aislados RG1 y CHHP

Las formas epimastigotes del *T. cruzi* de los aislados RG1 y CHHP, se cultivaron *in vitro* a 27°C en frascos para cultivo celular, empleando para ello medio de cultivo “Liver Infusion Tryptose” (LIT) (Difco ®) (20,00 g), triptosa (5,00 g), NaCl (4,00 g), KCl (0,40 g), Na₂HPO₄ (8,00 g) y dextrosa (2,00 g) en un litro de agua destilada a pH 7,40 esterilizado sólo por filtración utilizando membranas de acetato de celulosa de 0,22 µm (Millipore®) y suplementado con 10,00% de suero fetal bovino, 1,00% de penicilina/estreptomicina y 25,00 mg de hemina disuelta en una mezcla v/v de agua destilada y trietanolamina. La colecta de los parásitos se realizó durante la fase logarítmica de crecimiento exponencial (aproximadamente al séptimo día de cultivo) (Berrizbeitia *et al.*, 2004).

Preparación de la infusión de *A. annua*

Se prepararon dos tipos de infusión: una con hojas secas provenientes de la planta

cultivada en Cumaná y otra con hojas secas provenientes de plantas cultivadas en Luxemburgo. Se siguió el protocolo descrito por R ath *et al.* (2004), con algunas modificaciones.

Las infusiones se prepararon para obtener concentraciones de 0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00 y 3,00% p/v de hojas secas de *A. annua* en medio de cultivo LIT. Para ello se procedió de la siguiente manera: en primer lugar, se pesaron las cantidades de las hojas maceradas de *A. annua* necesarias para obtener las diferentes concentraciones de la infusión, las cuales se depositaron en pequeños vasos plásticos, previamente identificados. Luego se repartieron 20,00 ml del medio en seis vasos de precipitado de 50,00 ml de capacidad, el medio se calentó hasta casi llegar a la ebullición. Después cada volumen del medio de cultivo LIT caliente se agregó sobre el peso correspondiente de las hojas de la planta. Las infusiones se dejaron reposar por 10 minutos para luego ser filtradas usando un colador de tela, con la finalidad de remover las hojas.

Los medios de cultivo a diferentes concentraciones p/v de *A. annua*, se trasladaron al cuarto de cultivo donde, en una campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad, se esterizaron por filtración, utilizando filtros de 0,20 μm (Milipore®) unidos a una jeringa. Seguidamente, cada una de estas infusiones en medio LIT, se suplementó con 10,00% de suero fetal bovino, 1,00% de penicilina/estreptomicina y 25,00 mg de hemina disuelta en una mezcla v/v de agua destilada y trietanolamina. Una vez preparadas las infusiones se procedió a iniciar los cultivos de *T. cruzi*.

Determinación de las concentraciones efectivas de infusión de *A. annua* sobre epimastigotes de *T. cruzi*

Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi*, mantenidos en fase de crecimiento exponencial a 27 C, en medio LIT. Los cultivos se iniciaron ajustando los cultivos a una densidad celular de 2×10^6 parásitos/ml en las diferentes concentraciones p/v de la infusión de *A. annua* (0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00 y 3,00%). Los experimentos se realizaron por duplicado para cada aislado con infusiones preparadas con ambas plantas (cultivadas en

Cumaná y cultivadas en Luxemburgo) y se incluyó un cultivo control, el cual estuvo exento del tratamiento con *A. annua*.

La respuesta cualitativa de los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* a las proporciones de la infusión de *A. annua* se evaluó directamente al microscopio óptico, cada 24,00 horas, donde se observó cualitativamente la morfología y movilidad de los epimastigotes de *T. cruzi*. Así mismo se determinó la densidad celular de los cultivos tratados y no tratados, contando los parásitos viables en una cámara de Neubauer, en diluciones adecuadas en buffer fosfato salino pH 7,40.

Viabilidad celular

La viabilidad celular de los cultivos tratados y no tratados, se realizó por el método de exclusión del colorante azul de tripano (Kucsera *et al.*, 2000), el cual se basa en la capacidad que tienen las membranas celulares intactas de eliminar rápidamente cualquier colorante.

El conteo de parásitos viables se realizó mezclando volúmenes iguales del colorante azul de tripano (0,50%), y de los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* tratados y no tratados con la infusión de *A. annua*, luego de incubar esta mezcla aproximadamente 2 minutos, se observó al microscopio óptico para hacer el conteo en cámara de Neubauer y así determinar la densidad celular de los cultivos. Cuando los parásitos se teñían de color azul, esto significaba que se encontraban no viables; en cambio, los que permanecían sin teñir eran los que presentan su membrana celular sin daños y por tanto se encontraban viables (Kucsera *et al.*, 2000).

Se calcularon varios índices de inhibición, según las formulas descritas por Simoni (2007), como se detalla a continuación:

Factor de crecimiento

Los factores de crecimiento (FC) de los cultivos controles y de los tratados con las

diferentes concentraciones p/v de la infusión (0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00 y 3,00%) de *A. annua*, se estimaron mediante la siguiente fórmula:

$$FC = \frac{DCf}{DCi}$$

Donde:

DCf: densidad celular al final del tratamiento.

DCi: densidad celular al inicio del tratamiento.

Concentración inhibitoria

La concentración Inhibitoria (CI) del crecimiento de los epimastigotes se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$CI = \left[1 - \left(\frac{FCt}{FCc} \right) \right] \times 100$$

Donde:

FCt: Factor de crecimiento del cultivo tratado.

FCc: Factor de crecimiento del cultivo control

Concentración inhibitoria del 50,00%

La concentración inhibitoria del 50,00% (CI_{50}) es la concentración de la infusión de la planta capaz de eliminar la mitad de los epimastigotes tratados en relación al máximo crecimiento obtenido por el cultivo control, en un período de tiempo determinado:

$$CI_{50} = \frac{1}{2} FC_{Cm\acute{a}x}$$

Concentración mínima inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la mínima concentración de la infusión de la planta capaz de inhibir el crecimiento del 100% de los parásitos sin que ocurra muerte

celular en un período de tiempo determinado:

$$CMI = \frac{DCf}{DCi} = 1$$

Análisis de resultados

Para comparar el efecto de la concentración de la infusión de *A. annua* sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, se aplicó un análisis de varianza multifactor, y para conocer las diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento se les aplicó una prueba *a posteriori* de rangos múltiples de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 1979). Adicionalmente, se presentaron los resultados dispuestos en tablas; y figuras que muestran los atributos morfológicos de la planta. Para el análisis de los resultados se utilizó el programa estadístico Statgraphics versión 4.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se presentan los resultados de las pruebas de viabilidad de las semillas de *A. annua* provenientes de Luxemburgo, éstas presentaron un bajo porcentaje de humedad, lo cual indica según lo descrito por la Organización Mundial de la Salud (2006a), que las semillas con un contenido de agua inferior a 13,00%, deben ser almacenadas por un período no mayor a 4 meses, ya que después de este tiempo pierden de forma considerable su viabilidad. Del mismo modo, el porcentaje de germinación *in vitro*, también fue bajo si se compara con las altas tasas de germinación encontradas por Li *et al.* (2012), en otras especies de Artemisia: 99,60%, 96,60% y 88,00% para *A. sieversiana*, *A. wudanica* y *A. halodendron*, respectivamente; quizás esto se deba a que en dicha investigación se usaron semillas frescas, recién colectadas; mientras que se desconoce la fecha de colecta de las semillas usadas en el presente estudio.

En relación al peso por semilla obtenido en esta investigación, concuerda con el estudio de Jiang *et al.* (2010) en el cual establecieron que 1 000 semillas de plantas control de *A. annua* silvestre pesaron $47,90 \pm 0,50$ mg. Igualmente concuerda con los datos registrados por la Organización Mundial de la Salud (2006a), la cual expresa que el peso aproximado de 1 000 semillas corresponde con 0,03 g. Estas semillas son muy livianas si se contrastan con las de *Ambrosia artemisiifolia* (otra Asteraceae), cuyas semillas pesan entre 1,72 y 3,60 mg (Fumanal *et al.*, 2007).

Tabla 1. Pruebas de viabilidad realizadas a las semillas de *Artemisia annua*.

Pruebas de viabilidad	Promedio	Desviación estándar	Límite inferior	Límite superior
Porcentaje de humedad (%)	9,68	1,06	8,91	10,90
Porcentaje de germinación <i>in vitro</i> (%)	3,67	1,53	2,00	5,00
Peso de cada semilla (μ g)	42,50	1,90	40,40	44,00

Rojas y Aristizábal (2011), asocian, de manera proporcional, al contenido de agua de

diversas semillas con el tamaño de las mismas; el bajo contenido de agua, peso y longitud diminuta, posiblemente influyen en la viabilidad disminuida presentada por las semillas de *A. annua*. Quizás para compensar este hecho, la planta produce gran cantidad de aquenios por capítulo, como un mecanismo de supervivencia en esta especie. En base a los datos ya expuestos, se deduce que las semillas usadas en esta investigación tuvieron una limitada viabilidad, hecho que quizás afectó el desarrollo de las plantas, y pudiera atribuirse a la naturaleza misma de las semillas o al tiempo que tenían de colectadas, el cual se desconoce.

En cuanto al cultivo en arena, se pudo observar que las semillas de *A. annua* germinaron, agronómicamente, desde el tercer hasta el octavo día después de la siembra, presentándose el mayor número de brotes al quinto día (Figura 1).

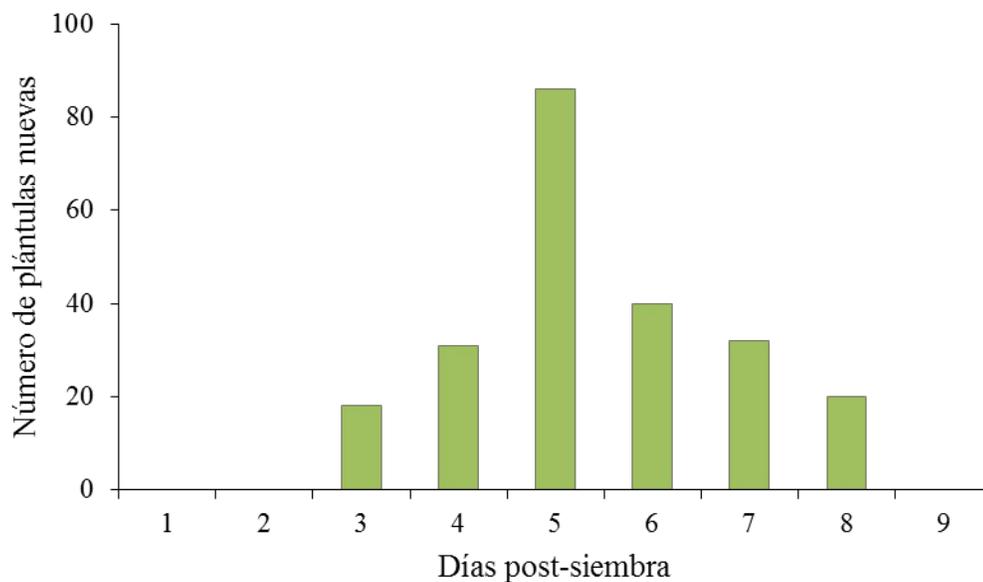


Figura 1. Histograma de frecuencias del número de plántulas nuevas de *Artemisia annua* por día, sembradas en arena.

Las plantas sembradas en arena, se desarrollaron lenta y débilmente, asimismo manifestaron floración prematura al día 34 después de la siembra inicial, cuando aún estaban muy pequeñas, presentando alturas entre cinco a diez cm aproximadamente. Éstas se trasplantaron, pero no respondieron de manera favorable a este proceso, casi

todas las plantas desarrollaron botones florales o se marchitaron (Figura 2). Müller y Brandes (1997), también obtuvieron resultados desfavorables en relación a la siembra de *A. annua* en suelos arenosos, al obtener plantas que no superaban los 23 cm de altura en este sustrato.

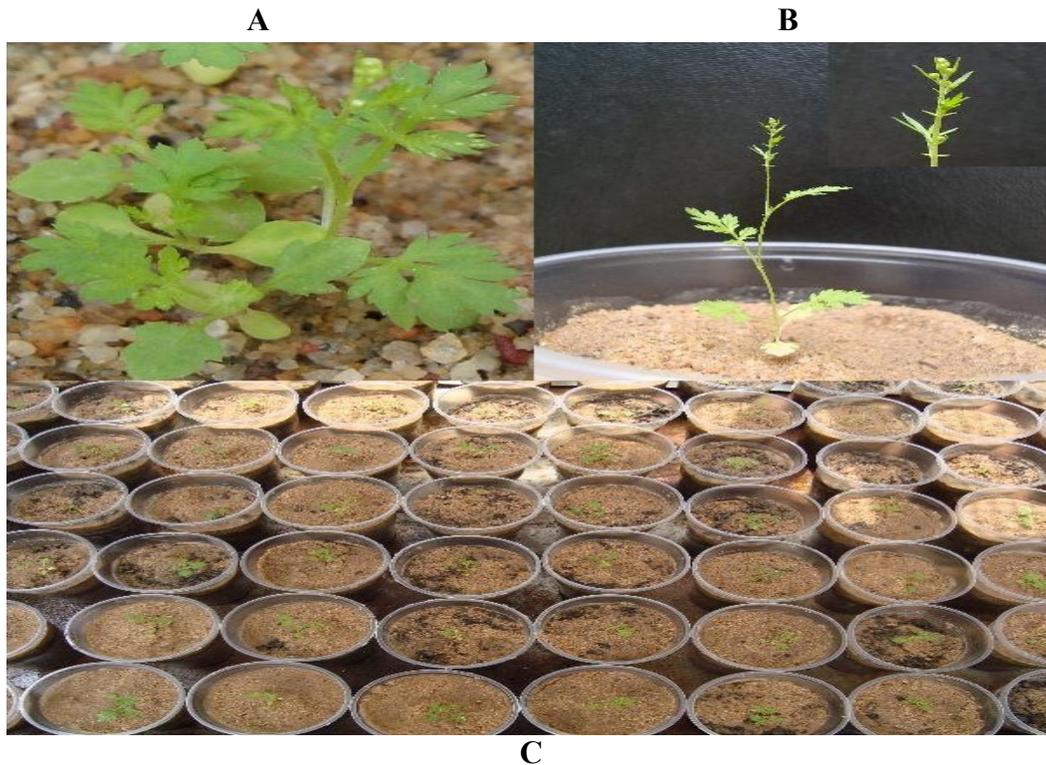


Figura 2. Desarrollo de *Artemisia annua* durante el ensayo de germinación en arena. A: planta con desarrollo de brotes florales prematuros a los 34 días post-siembra; B: planta con brotes florales luego del trasplante; C: plántulas trasplantadas.

Debido al escaso desarrollo obtenido por las plantas en suelos arenosos, se prosiguió a realizar la siembra de las semillas de *A. annua* utilizando tierra abonada (constituida por compost de caña de azúcar y humus). De esta forma se logró que las plántulas se desarrollaran de forma más adecuada, lo cual permitió la caracterización morfológica de esta planta y la obtención de la biomasa necesaria para la realización de los ensayos *in vitro* que se llevaron a cabo en esta investigación. Müller y Brandes (1997), encontraron, al igual que en la presente investigación, que las semillas de *A. annua* germinaron al mismo tiempo en distintos tipos de suelo, de igual forma, sus plantas alcanzaron longitudes significativamente mayores en suelos francos que en arenosos.

Al igual que los resultados obtenidos al trasplantar las plantas cultivadas inicialmente en suelos arenosos, este proceso tampoco tuvo éxito con las plantas obtenidas en suelos abonados, ya que éstas también florecieron de manera prematura o murieron. Por lo tanto, y a pesar de que Liersch *et al.* (1986) han afirmado que el trasplante es el mejor método de establecimiento para esta planta, se prefirió no utilizar este paso, para que las plantas de *A. annua* crecieran un poco más en las bandejas de germinación y así obtener la mayor cantidad de hojas posible para realizar los estudios *in vitro* de *A. annua* vs. *T. cruzi*.

En base a lo observado en los distintos procedimientos de siembra, se puede concluir que el método de mezclado de las semillas para la dispersión de las mismas en el sustrato es efectivo a la hora de mantener a las plantas a distancias favorables para su desarrollo, siempre y cuando se combinen en proporciones adecuadas. Sembrar las semillas a poca profundidad fue idóneo para que las mismas, siendo tan pequeñas, sucumbieran en menor proporción a los efectos del riego; en este sentido, Laughlin *et al.* (2002) obtuvieron una buena emergencia y establecimiento de estas plantas al sembrar las semillas a una profundidad de 5,00 mm.

En cuanto al tipo de suelo, las plantas de *A. annua* que se usaron no han sido adaptadas a climas tropicales como el venezolano y crecen mejor en tierra fertilizada; el compost a base de caña de azúcar fue muy útil en lo que respecta al mantenimiento de la humedad en los germinadores, pues este absorbe agua por más tiempo, favoreciendo el crecimiento de esta planta que posee gran necesidad de agua. Quizás la floración prematura se haya ocasionado gracias a la cantidad de horas luz que recibieron las plantas, ya que esta especie tiene un requerimiento de fotoperíodo de 13,50 horas, mayor al que se presenta en Venezuela (aproximadamente de 12,00 horas de luz), sumado a las altas temperaturas ambientales registradas en la ciudad de Cumaná (hasta 35°C) (Vila, 1965; Ferreira *et al.*, 1995, Segnini *et al.*, 2009).

Los atributos morfológicos de las plantas de *A. annua* desarrolladas durante esta investigación, se pueden resumir de la siguiente manera:

Las semillas provenientes de Luxemburgo y que fueron utilizadas en esta investigación, a pesar de ser diminutas, presentaron una alta variabilidad en cuanto a su tamaño, teniendo una longitud promedio de $0,84 \pm 0,13$ mm (rango: 0,64-1,09 mm), a simple vista presentaron una forma piriforme y un color blanco grisáceo, al realizar la observación bajo la lupa presentaban un color ámbar y textura con ranuras a lo largo de su eje longitudinal (Figura 3). La Organización Mundial de la Salud (2006a) confirman estos datos, expresando que las semillas de *A. annua* tienen aproximadamente 1,00 mm de longitud, son de color marrón amarillento y tienen superficie marcada por líneas verticales, estas semillas son muy pequeñas si se comparan con las de Ambrosia (3,50 mm), un género muy parecido y cuyas semillas también varían mucho en su tamaño (Lewis, 1973).



Figura 3. Semillas de *Artemisia annua* provenientes de Luxemburgo, junto con restos de flores, hojas y materia vegetal secos. Flechas: semillas.

Durante el proceso de germinación *in vitro*, se realizaron observaciones que complementan la información obtenida durante el cultivo, en la figura 4A, se aprecia

como emerge la radícula del embrión, estructura que luego va a dar origen a las raíces de la planta; seguidamente en las figuras 4B y 4C se observa la elongación del hipocótilo o tallo de la plántula, y la elevación de los cotiledones que salen de la cubierta de la semilla, que se transformarán en las hojas cotiledóneas (fuente de energía de la plántula mientras desarrolla hojas verdaderas).



Figura 4. Semillas de *Artemisia annua* durante el proceso de germinación *in vitro* sobre papel de filtro. A: aparición de la radícula (r) del embrión; B: elongación del hipocótilo (h) y C: salida de los y cotiledones (c) para formar las hojas cotiledóneas. Las figuras B y C son fotografías de la misma plántula tomada desde enfoques distintos.

Las germinación agronómica en la tierra abonada se presentó a los 3-8 días post-siembra, al igual que en el ensayo en arena. Las plántulas resultantes tuvieron alturas de aproximadamente 5,00-10,00 mm, presentaron un par de hojas cotiledóneas verdes, redondeadas, de bordes enteros y 4 mm de longitud, las cuales aparecieron entre los 7-15 días después de la siembra, las primeras hojas verdaderas también surgieron en par y se mostraron verdes, dentadas, de unos 10,00 mm de longitud, luego fueron apareciendo de manera alterna, estas hojas cambiaron desde una forma dentada hasta obtener formas bipinaseptinadas y luego tripinaseptinadas de hasta 3,50 cm de longitud, con largos pecíolos. En cuanto al tallo de las plantas, durante la primera semana presentaron un aspecto débil, diámetro de 1,00-2,00 mm, textura lisa con pequeños tricomas, color verde más claro que el de las hojas, y la longitud desde el cuello hasta el ápice de la hoja más alta de 4,50 cm a las 4 semanas (Figura 5).

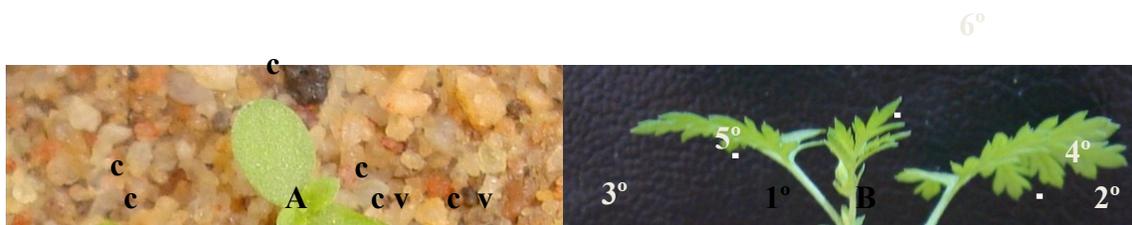




Figura 5. Plantas de *Artemisia annua* en etapa de germinación y desarrollo foliar. A: plántulas en etapa de germinación, nótese las hojas cotiledóneas (c) y las hojas verdaderas (v); B: Planta en etapa de desarrollo foliar, donde se aprecia la aparición de las primeras hojas verdaderas en par (1°) y de las siguientes de manera solitaria y alterna (2°, 3°, 4°, 5° y 6°).

Según la Organización Mundial de la Salud (2006a), en Kenya y en la República Unida de Tanzania, la germinación de las semillas ocurre 4-10 días después de la siembra, en Chongqing (China) y Vietnam, a los 7-10 días, y en Guangxi (China), a los 8-16 días; siendo semejantes la fecha de germinación obtenida en la presente investigación.

Algunas plantas no llegaron a emitir ramas, sin embargo, de la cuarta a la novena semana post-siembra las plantas que sí lo hicieron presentaban hojas claramente tripinaseptinadas, de colores que iban del verde manzana al verde oscuro en su superficie adaxial, con pequeños y cortos tricomas, que Spegazzini y Najera (1989), describen de dos tipos: tector pluricelular flageliforme y glandular pluricelular biseriado. Las hojas en esta etapa son fuertemente aromáticas, y a las 10 semanas después de la siembra presentaban 12,00-13,00 cm de longitud desde la base del pecíolo hasta el ápice foliar. En cuanto a las medidas de los folíolos principales, éstas se especifican en la Figura 6. Cuando las plantas empezaron a ramificarse, sus tallos presentaron un diámetro de 2,00-4,00 mm, estriaciones longitudinales, seguían siendo de color verde

claro y alcanzaron alturas de hasta 45,00 cm, medidos desde el cuello hasta el ápice de la hoja más alta.

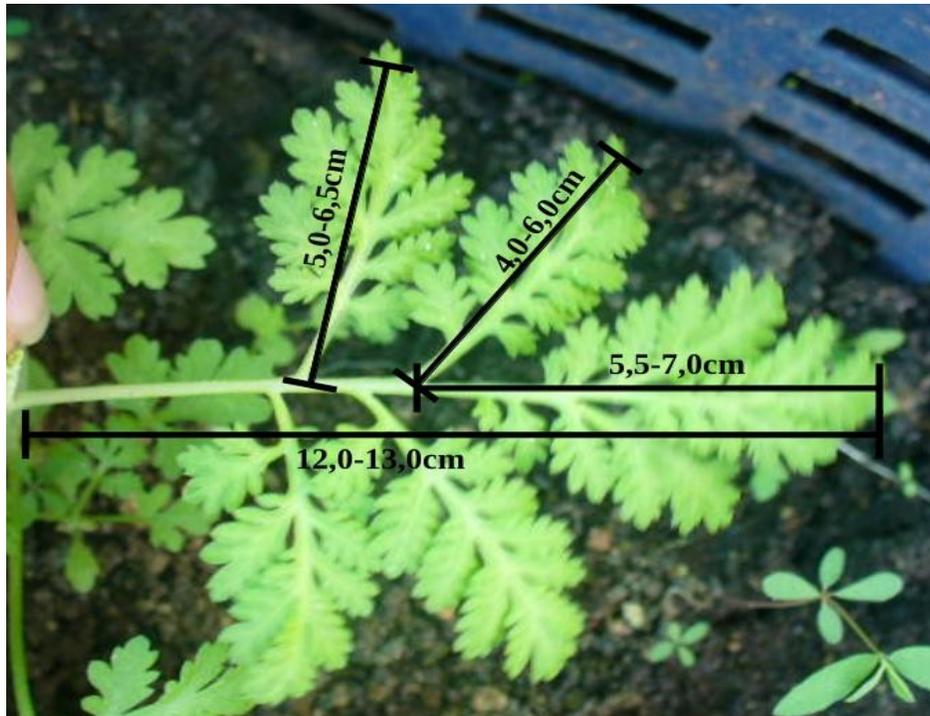


Figura 6. Longitudes de los folíolos principales en la hoja de *Artemisia annua* en la novena semana de crecimiento, al final de la etapa de ramificación.

En contraste con nuestros resultados, Jiang *et al.*, (2010), obtuvieron plantas de 1,28 m de altura, con hojas de 7,70 cm de largo, en promedio y tallos de 1,60 cm de diámetro, en Shanghai (China), evidentemente más desarrolladas que las plantas obtenidas en el presente estudio; y Vivas (1997) en San Antonio de los Altos (Venezuela), cultivó plantas con una amplia variedad de medidas, con alturas que iban de 21,00 a 115,00 cm, y hojas de 4,00 a 33,00 cm de longitud. El hecho de que esta planta se haya desarrollado de manera satisfactoria en otra región venezolana, puede significar que el fotoperíodo no fue el factor determinante en el resultado de los cultivos realizados en el presente trabajo, sino más bien la altitud o las temperaturas ambientales, considerando el hecho de que San Antonio de los Altos es una zona que se encuentra por encima de los 1 300 msnm y cuyas temperaturas van de 10 a 28°C, es decir, se encuentra en condiciones muy

distintas a las de Cumaná, que se sitúa a apenas 5 msnm y registra temperaturas más altas (entre 17 y 35°C) (Vila, 1965; Gutiérrez y Padrón, 2009).

El momento más apropiado para la colecta de las hojas con fines terapéuticos, es la etapa de brote floral, justo antes de la floración; cuando comienzan a aparecer los primeros botones que darán origen a las flores, según la literatura es en esta etapa cuando la concentración de artemisinina alcanza su máximo (Ferreira *et al.*, 1995).

En la presente investigación las plantas más precoces iniciaron la etapa de brote floral a partir de la cuarta semana, es decir, 28 días después de la siembra, las demás entraban en esta etapa eventualmente. Los botones florales fueron precedidos por hojas bandera de al menos 2,00 cm de longitud (Figura 7). En la base peciolar de estas hojas se erigían pequeños botones florales, que posteriormente con la aparición de sucesivos brotes de manera alterna, formaron racimos. Estos racimos llegaron a tener hasta más de 150 brotes. Además, luego de iniciado el brote floral, la producción de biomasa foliar cesa gradualmente, esto podría atribuirse al hecho de que la planta concentra energía en la formación de flores y frutos; sin embargo, el crecimiento longitudinal sólo se detuvo al comenzar la floración, situación que concuerda con las experiencias en China, Vietnam y la República Unida de Tanzania; donde el desarrollo longitudinal cesó entre los 165 a 210 días después del trasplante, coincidiendo con el inicio de la floración (Organización Mundial de la Salud, 2006a).

La etapa de floración en el presente trabajo se inició a partir de la novena semana de crecimiento y se caracterizó por el desarrollo de los botones florales a inflorescencias plurifloras, con unos 1,50 cm de longitud medidos desde la base del pedicelo, cuyos capítulos presentaron 4,00 mm de diámetro y 6,00 mm de altura, aproximadamente. Los capítulos recubiertos por verdes brácteas (Figura 7), se componen de flores amarillas muy pequeñas, hermafroditas las centrales y femeninas las periféricas, estas flores producían un fino polen amarillo. Ferreira y Janick (1996), también describen a las flores como pequeños capítulos con flores de color amarillo; sin embargo, y en contraste

con los resultados del presente estudio, reportan capítulos de 2,00-3,00 mm de diámetro; de igual manera la Organización Mundial de la Salud (2006a) reporta que las flores de *A. annua* presentan numerosos capítulos de 2,00-2,50 mm de diámetro.



Figura 7. Plantas de *Artemisia annua* en etapa de brote floral y de floración. A: brotes foliares junto a hojas bandera. B: inflorescencias.

La Organización Mundial de la Salud (2006a), describe que el fruto de *A. annua* es un aquenio con una semilla única en su interior. En la presente investigación, la mayoría de las plantas bajo caracterización, no llegaban a producir frutos, esto pudo deberse a la falta de polinización a través del viento o insectos; sin embargo, las plantas que si lo hicieron mostraron aquenios lisos, verde amarillentos, cuya maduración daría origen a semillas (Figura 8).



Figura 8. Flores de *Artemisia annua* con aquenios formados en maduración. El marchitamiento de las plantas tuvo lugar a partir de la doceava semana de

crecimiento. Cabe destacar que no todas las plantas que llegaron a esta etapa, cumplieron su ciclo de vida completo; muchas de ellas no emitieron ramas, otras florecieron pero posiblemente por falta de polinización no fructificaron y por tanto no produjeron semillas, así como otras que si cumplieron con su ciclo de vida completo.

Una vez logrado el cultivo de la planta en condiciones ambientales típicas del noreste venezolano, se probaron diferentes infusiones a diferentes concentraciones de p/v de hojas secas de *A. annua* sobre epimastigotes de *T. cruzi*. En la presente investigación las infusiones de *A. annua*, preparadas con hojas provenientes de Luxemburgo y con las hojas de plantas cultivadas en Cumaná, estado Sucre, tuvieron un efecto antiproliferativo dosis-dependiente sobre ambos aislados de *T. cruzi*.

En la figura 9 se puede apreciar que la infusión de *A. annua*, cultivada en Cumaná produjo una disminución de la tasa de crecimiento de los epimastigotes del aislado RG1 en todas las concentraciones ensayadas, con respecto al control, siendo 2,00 y 3,00% las proporciones en donde se observó desde las 24,00 horas de exposición a los componentes presentes en la infusión de *A. annua*, muy poco crecimiento de los epimastigotes, en el medio de cultivo axénico.

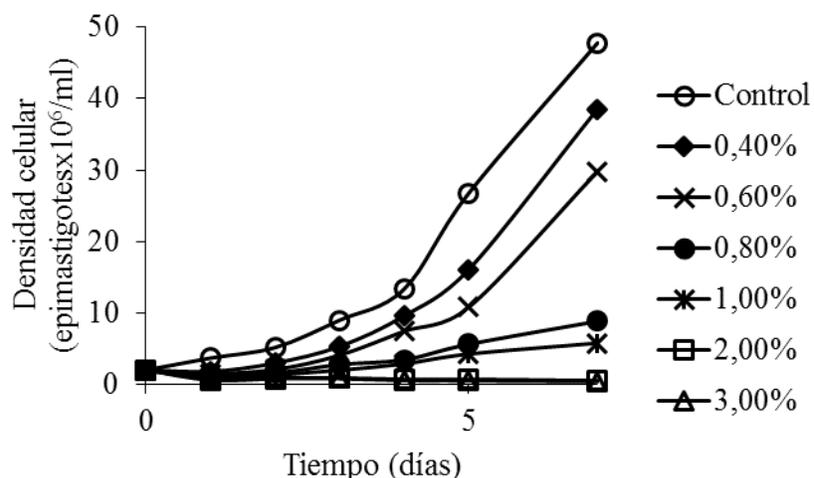


Figura 9. Actividad de la infusión de *Artemisia annua* cultivada en Cumaná a distintas concentraciones, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado RG1).

De esta manera para el día 7 a las concentraciones de 2,00 y 3,00% se había producido la

inhibición total de la proliferación de los parásitos. Así mismo, se observó una disminución del crecimiento del aislado RG1 de *T. cruzi* a medida que se aumentaban las diferentes concentraciones p/v de la infusión de *A. annua* (0,40; 0,60; 0,80; 1,00; 2,00 y 3,00%). La CMI y la CI_{50} , se obtuvieron por extrapolación en la gráfica, obteniéndose los valores de 1,60% y 0,65%, de concentraciones p/v de infusión de la planta, respectivamente (Figura 10).

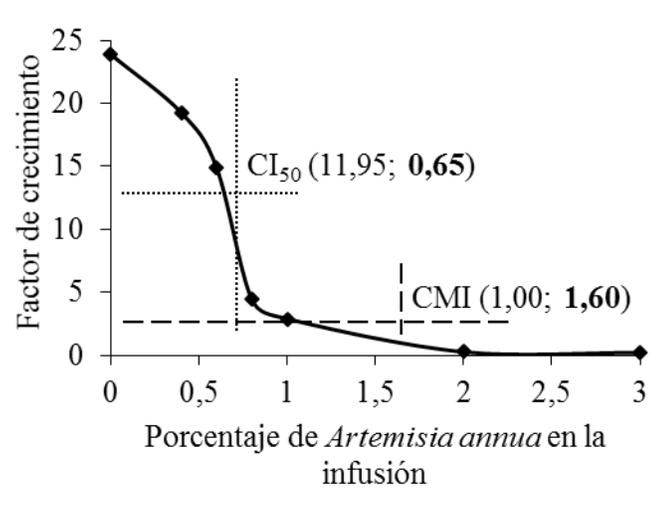


Figura 10. Curva dosis-respuesta para la determinación de la concentración inhibitoria del 50,00% y de la concentración mínima inhibitoria de la infusión de *Artemisia annua* cultivada en Cumaná, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado RG1) a 7 días post-tratamiento.

El efecto antiproliferativo de las diferentes concentraciones p/v de infusión de *A. annua* cultivada en Luxemburgo sobre el aislado RG1 de epimastigotes de *T. cruzi* fue mayor (Figura 11), debido a que se observa una notable disminución de la densidad celular de los parásitos con la infusión 0,40% p/v de *A. annua*, con respecto al control. Igualmente a partir de la concentración 0,60% p/v de la infusión de la planta y después de las 24,00 horas de incubación se pudo observar poco crecimiento parasitario. La inhibición casi total del crecimiento parasitario se observó a las concentraciones de 2,00 y 3,00% a los 7 días de exposición. La CMI y la CI_{50} , se obtuvieron por extrapolación en la gráfica, obteniéndose los valores de 0,62% y 0,25%, de concentraciones p/v de infusión de la planta, respectivamente (Figura 12). Siendo estos valores mucho menores a los

observados con la infusión preparada a partir de las hojas cultivadas en Venezuela, sobre el mismo aislado (RG1) (Figura 11).

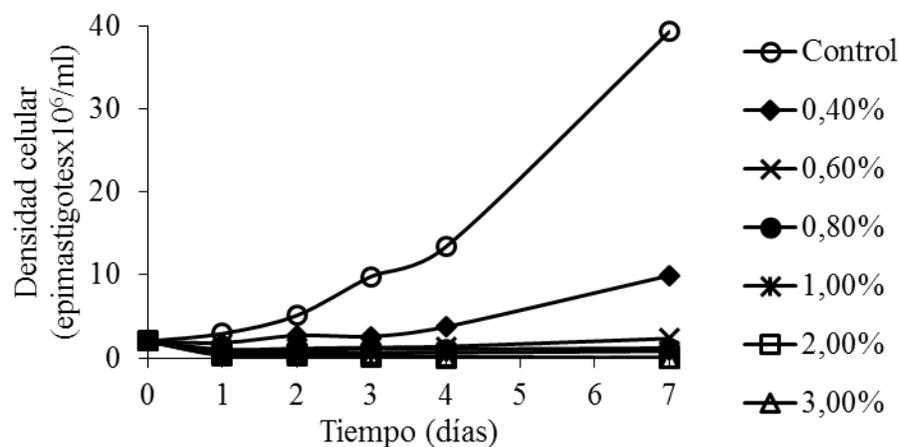


Figura 11. Actividad de la infusión de *Artemisia annua* cultivada en Luxemburgo a distintas concentraciones, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado RG1).

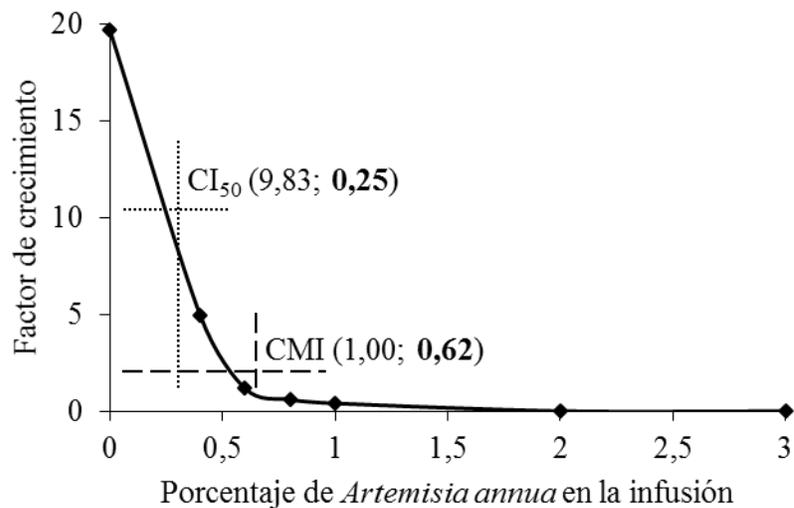


Figura 12. Curva dosis-respuesta para la determinación de la concentración inhibitoria del 50,00% y de la concentración mínima inhibitoria de la infusión de *Artemisia annua* cultivada en Luxemburgo, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado RG1) a 7 días post-tratamiento.

En la Figura 13 se observa que la infusión de *A. annua*, cultivada en Cumaná ocasionó igualmente una disminución gradual de la densidad celular de los epimastigotes de *T. cruzi*, del aislado CHHP en todas las concentraciones ensayadas, con respecto al control,

siendo la concentración de 3,00% donde se obtuvo el mayor efecto de la inhibición del crecimiento parasitario. La CMI y la CI_{50} se obtuvieron por extrapolación en la gráfica, obteniéndose los valores de 1,30% y 0,40% (Figura 14), de concentraciones p/v de infusión de la planta, respectivamente, siendo éstos menores a los encontrados con el aislado RG1 con las infusiones preparadas de las hojas cultivadas en Luxemburgo (Figura 15).

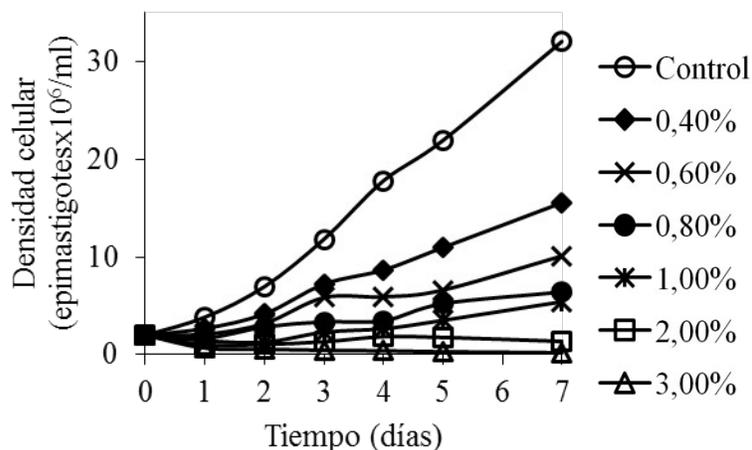


Figura 13. Actividad de la infusión de *Artemisia annua* cultivada en Cumaná a distintas concentraciones, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado CHHP).

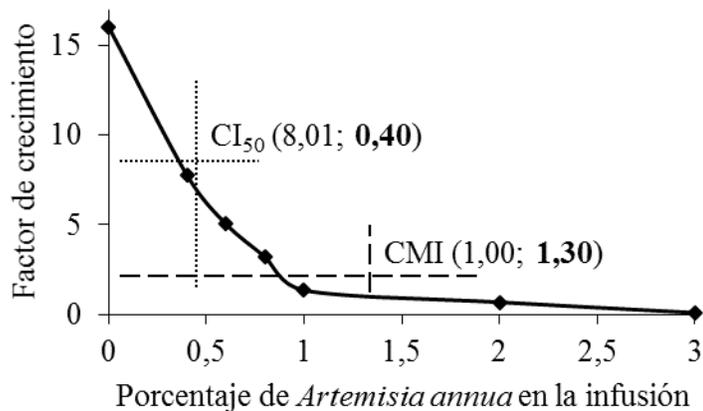


Figura 14. Curva dosis-respuesta para la determinación de la concentración inhibitoria del 50,00% y de la concentración mínima inhibitoria de la infusión de *Artemisia annua* cultivada en Cumaná, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado CHHP) a 7 días post-tratamiento.

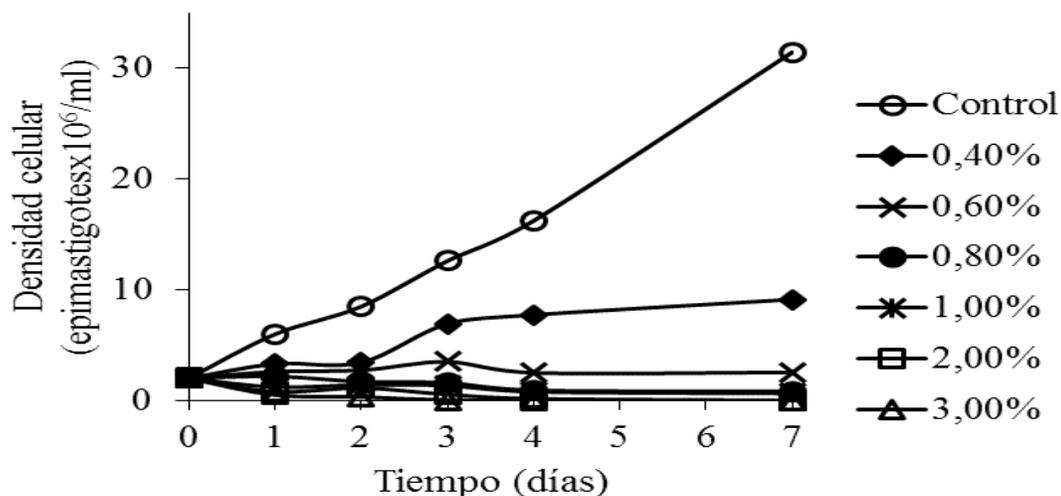


Figura 15. Actividad de la infusión de *Artemisia annua* cultivada en Luxemburgo a distintas concentraciones, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado CHHP).

Al igual que lo observado con el aislado RG1 de *T. cruzi*, la infusión preparada con hojas de Luxemburgo tuvo un efecto más potente en la inhibición del crecimiento con el aislado CHHP de *T. cruzi*, la cual se observó a partir de las 24,00 horas de incubación, siendo las concentraciones de 1,00; 2,00 y 3,00% de la planta las que tuvieron un mayor efecto en la inhibición de la densidad celular parasitaria (Figura 15). La CMI y la CI_{50} , se obtuvieron por extrapolación en la gráfica, obteniéndose los valores de 0,63% y 0,28%, de concentraciones p/v de infusión de la planta, respectivamente (Figura 16), siendo éstos menores a los encontrados con el aislado CHHP con las infusiones preparadas de las hojas cultivadas en Cumaná (Figura 16).

No se encontraron referencias bibliográficas en las que se haya valorado el efecto de la infusión de la planta sobre epimastigotes de *T. cruzi*; sin embargo, Mishina *et al.* (2007) probaron el efecto de la artemisinina y algunos de sus derivados sobre dos especies de *Trypanosoma*, encontrando CI_{50} que iban de 13,40 a 23,30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ para *T. cruzi*, y 15,70 a 22,50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ para *T. brucei rhodesiense*; sin embargo, si se ha probado el efecto de la infusión de *A. annua* sobre *Plasmodium*, tal es el caso de Rocha *et al.* (2012), quienes evaluaron el efecto de infusiones de dicha planta cultivada en distintas regiones de Brasil sobre cepas de *Plasmodium falciparum*, alcanzando CI_{50} de 0,11 a 0,40 μl de

infusión/ml.

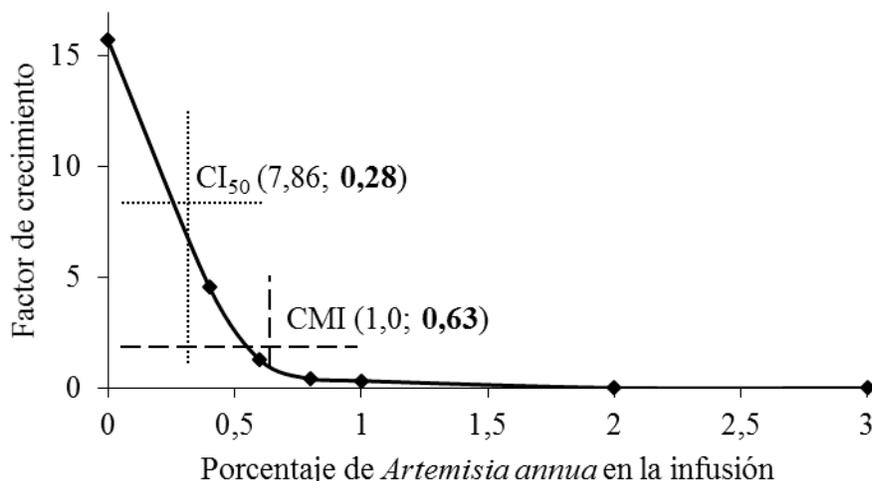


Figura 16. Curva dosis-respuesta para la determinación de la concentración inhibitoria del 50,00% y de la concentración mínima inhibitoria de la infusión de *Artemisia annua* cultivada en Luxemburgo, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (aislado CHHP) a 7 días post-tratamiento.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la concentración inhibitoria (CI) del crecimiento de los aislados CHHP y RG1 de *T. cruzi* a diferentes concentraciones de la infusión de *A. annua* cultivada en Venezuela y Luxemburgo, en donde se puede observar que la CI fue mayor para ambos aislados cuando se utilizaron las infusiones preparadas a las menores concentraciones de la planta cultivada en Luxemburgo, pero la CI se igualó para el origen de la planta a medida que aumentó la concentración de la infusión. No obstante, al comparar la CI efectuada por la infusión proveniente de la planta cultivada en Cumaná sobre los dos diferentes aislados de *T. cruzi* (RG1 y CHHP), se puede apreciar que ésta fue mayor en el aislado CHHP. Sin embargo, en este caso la CI se igualaba a medida que aumentaba la concentración de la infusión. En relación a la CI que efectuaron las infusiones de *A. annua* cultivada en Luxemburgo sobre los dos aislados de *T. cruzi* (RG1 y CHHP), estas no presentaron diferencias y los valores de CI fueron muy similares en los dos aislados a las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 2. Porcentajes de concentración inhibitoria del crecimiento de los aislados

utilizados de *Trypanosoma cruzi* (CHHP y RG1) a las diferentes concentraciones de la infusión de *Artemisia annua*.

Concentraciones de la infusión de <i>Artemisia annua</i> (%)	Aislado CHHP		Aislado RG1	
	Infusión de <i>A. annua</i> cultivada en Luxemburgo (CI)	Infusión de <i>A. annua</i> cultivada en Cumaná (CI)	Infusión de <i>A. annua</i> cultivada en Luxemburgo (CI)	Infusión de <i>A. annua</i> cultivada en Cumaná (CI)
0,40	70,99	51,49	70,24	19,37
0,60	91,98	68,47	94,10	37,65
0,80	97,45	79,96	97,05	81,54
1,00	98,02	91,57	97,96	88,28
2,00	100,00	95,75	100,00	98,95
3,00	100,00	99,37	100,00	99,20

CI: porcentaje de concentración inhibitoria; %: porcentaje.

De igual forma, se apreció que a mayor concentración de la planta en los medios de cultivo, al igual que a mayor número de días de exposición a la misma; los epimastigotes perdieron gradualmente su movilidad, así como también cambiaron su morfología desde la típica forma fusiforme, pasando por una forma alargada y angosta, para finalmente perder el flagelo y adoptar una morfología redondeada, casi circular (Figura 17). De manera análoga a la presente investigación, Blanco *et al.* (1983), encontraron que los epimastigotes de *T. cruzi* presentaron reducción de la movilidad, así como alteraciones morfológicas (la mayoría de los parásitos adoptaron formas redondeadas) al ser tratados con gopipol, un compuesto aislado de la planta de algodón. Del mismo modo, en la investigación de Santoro *et al.* (2007), se demostró que los aceites esenciales del tomillo (*Thymus vulgaris* L.) y el orégano (*Origanum vulgare* L.) son eficaces contra epimastigotes de *T. cruzi*, y a través de microscopía electrónica de transmisión observaron que los extractos de estas plantas produjeron alteraciones estructurales en el parásito, principalmente agrandamiento del citoplasma.

El análisis de varianza multifactorial reveló que el efecto sobre la densidad celular de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* fue ejercido de manera altamente significativa ($p=0,00$) por el tipo de infusión, la concentración de la misma y el tiempo de exposición de los epimastigotes de *T. cruzi* en el medio LIT que contenía la infusión de *A. annua*.

Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la acción de las infusiones sobre los distintos aislados, lo que indicó que las infusiones preparadas con las plantas de *A. annua* cultivadas en Cumaná y Luxemburgo ejercieron similar efecto antiproliferativo en ambos aislados de *T. cruzi* evaluados (RG1 y CHHP) (Tabla 3).

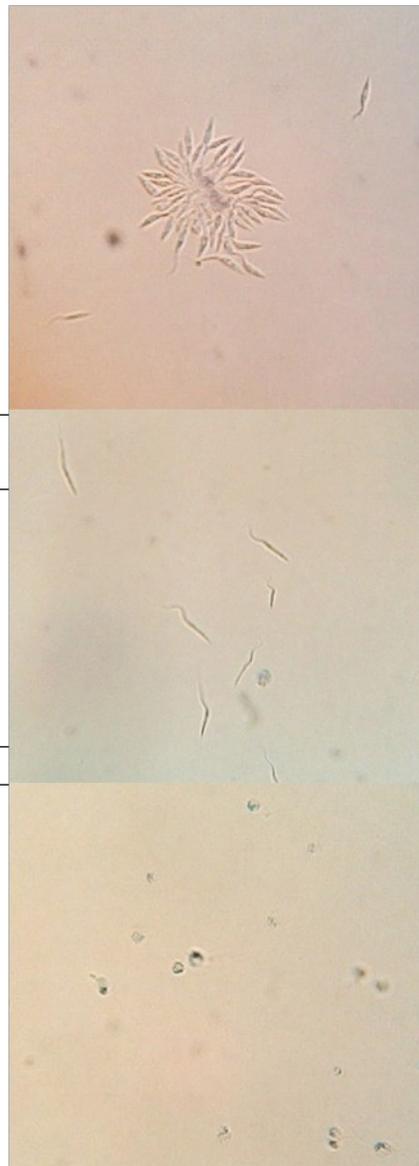
Figura 17. epimastigotes de con infusiones de fusiforme (A) en alargada (B) y forma *Artemisia annua*.

Tabla 3. Análisis densidad celular *Trypanosoma* infusiones de

Fuentes de variación
Efectos principales
A: Infusión
B: Concentración
C: Aislado
D: Tiempo
Residual
Total (corregido)

(*): Denota (p<0,05); F: prueba de

El análisis a rangos múltiples infusión de *A. provenientes de efecto en la*



Cambios morfológicos de los *Trypanosoma cruzi* en cultivos *Artemisia annua* (400X). Forma medio sin *Artemisia annua*, forma redondeada (C) en medios con de varianza multifactorial para la de epimastigotes de *cruzi*, bajo acción de las *Artemisia annua*.

	Cuadrado medio	F	P
	2,13883	23,28	0,0000*
	3,85605	41,97	0,0000*
B	0,298008	3,24	0,0737
	0,577797	6,29	0,0000*
	0,0918797		

diferencias estadísticas significativas Fisher; P: probabilidad.

posteriori, según la prueba de de Bonferroni, mostró que la *annua* preparada con hojas Luxemburgo tuvo un mayor inhibición de los parásitos, que

la infusión hecha con hojas provenientes de Cumaná. Referente a la concentración se observó la formación de dos grupos homogéneos, lo que indica que hubo diferencias significativas en la densidad celular de epimastigotes de *T. cruzi*, en casi todas las

concentraciones ensayadas con respecto al control (menos entre 0,40% y el control). Igualmente, se presentaron diferencias significativas entre las concentraciones 0,40; 0,60%; 0,80%; 1,00% y 2,00% con respecto a la concentración 3,00%. En cuanto al tiempo de incubación de los cultivos en la infusión de *A. annua*, se encontraron diferencias significativas entre los días 0, 1, 2 y 3 con respecto al día 7, lo cual hace pensar que los primeros días del tratamiento son claves en la inhibición activa de los epimastigotes de *T. cruzi*.

El mayor efecto antiproliferativo de los epimastigotes de *T. cruzi* que ejerció las infusiones preparadas con la planta proveniente de Luxemburgo, con respecto a la planta cultivada en Cumaná, pudo deberse a distintos factores, como la distinta producción de aceites esenciales de ambas plantas. Se desconoce la composición de los metabolitos expresados por las plantas cultivadas en Cumaná; sin embargo, se ha comparado la distribución de metabolitos de *A. annua* cultivada en Luxemburgo con muestras de la planta proveniente de distintos países, encontrando que, si bien, no es la más rica en artemisinina, si lo es en aceites esenciales (1,8 cineol, limoneno, terpineol, entre otros) y scopoletina, compuestos que junto a los flavonoides y cumarina pudieran potenciar el efecto de la artemisinina (Lutgen, 2011). Otros aspectos que pudieron influir son las diferentes condiciones ambientales en las que se desarrollaron las plantas. En Cumaná se alcanzan temperaturas de 35°C, casi el doble de la temperatura máxima de Luxemburgo (17°C) (Vila, 1965; Servicio Meteorológico de Luxemburgo, 2012). En relación a este tema, Ferreira *et al.* (1995) sostienen que las elevadas temperaturas ambientales producen una disminución en las concentraciones de artemisinina. Sumado a esto, se ha demostrado que el contenido de artemisinina en *A. annua* varía dependiendo de estas condiciones entre 0,02% y 1,10%. Otros autores han comprobado que la producción de artemisinina por la planta está sujeta a control genético. Actualmente se ha desarrollado, para la producción comercial de artemisinina, un híbrido de la planta denominado *Artemis*, del cual se han obtenido rendimientos de hasta del 1,40% de artemisinina a partir de hojas secas de la planta (Ferreira *et al.*, 1995; Delabays *et al.*, 2001; Organización Mundial de la Salud, 2006a; Graham *et al.*, 2010).

Las infusiones de *A. annua* resultaron eficaces en la inhibición de los epimastigotes de *T. cruzi* durante los 7 días de tratamiento, este hecho sugiere que los demás compuestos presentes en la infusión, pudieran actuar sinérgicamente para ejercer su acción antiproliferativa, pues se ha comprobado que la artemisinina contenida en la infusión muestra pérdida de sus efectos luego de las 24,00 horas de exposición, de esta forma se afianza la teoría de que las infusiones de *A. annua* no son monoterapias de artemisinina, sino una politerapia de sustancias que actúan juntas (Lutgen y Michaels, 2008; Lutgen, 2009). A este respecto, Liu *et al.* (1992) demostraron que los flavonoides presentes en la planta no presentan un efecto antimalárico, pero si un efecto potenciador de la actividad de la artemisinina, y Nandakumar *et al.* (2006) comprobaron el efecto sinérgico entre el arteether y la curcumina.

La acción de la infusión de esta planta depende de los efectos sinérgicos de 36 flavonoides, 29 sesquiterpenos y una variedad de aceites naturales (Willcox *et al.*, 2004). Como se ha demostrado previamente, en algunos casos aislar un sólo componente o la búsqueda de un principio activo, en un producto natural, demuestra que la eficacia del producto herbal se debe a la sinergia de sus constituyentes. Este es el caso de la raíz de ortiga (*Urtica dioica*), usada de forma tradicional en el tratamiento del cáncer de próstata, se ha demostrado que su acción se debe a la sinergia entre el efecto antiproliferante de un grupo de isolectinas llamadas *Urtica dioica* agglutin (UDA) y el efecto antiinflamatorio de polisacaridos aislados de la raíz (Wagner, 2006).

En cuanto a la aparición de cepas resistentes con el uso de la infusión, hay menos probabilidades de que se presente si consideramos que el té en sí, es una combinación de varias sustancias con poder antiparasitario comprobado. En un estudio realizado en Uganda, se administraron infusiones de *A. annua* a individuos con malaria, encontrando que redujeron significativamente el riesgo de sufrir reincidencia en nueve meses, en un 55,00%; la investigación mencionada expone que dadas las bajas concentraciones de artemisinina en las infusiones usadas, el efecto protector podría atribuirse a un grupo de

flavonoides inmunomoduladores presentes en las mismas (Ogwang *et al.*, 2012). El efecto antiproliferativo de la infusión sobre los parásitos podría disminuir con la separación en fracciones o con el aislamiento de las moléculas en la suspensión (Campos *et al.*, 2005). Además, se ha comprobado que la absorción de la artemisinina presente en la infusión se absorbe más rápido que aquella presente en las cápsulas o tabletas y por lo tanto, la biodisponibilidad de ésta en el té o infusión es mayor (Räth *et al.*, 2004).

Aunque son pocos los trabajos acerca de la acción de *A. annua* sobre *T. cruzi*, anteriormente muchos investigadores han evaluado el efecto de numerosas plantas medicinales tradicionales contra este parásito, tal es el caso de Luize *et al.* (2005) quienes encontraron que las especies usadas en la medicina tradicional brasileña: *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla*, *Piper regnellii* Miq., *Tanacetum parthenium* y *Tanacetum vulgare* L. mostraron efectos significativos tanto para epimastigotes de *T. cruzi* como para promastigotes de *Leishmania amazonensis*. Por su parte Muñoz *et al.* (2010), evaluaron el potencial tripanocida de extractos etanólicos de 4 plantas medicinales bolivianas, encontrando que *Anacardium occidentale* y *Bowdichia virgilioides* fueron activos *in vitro*, mas no *in vivo*. Del mismo modo, en Perú Rojas *et al.* (2010), comprobaron la inhibición del desarrollo de epimastigotes de *T. cruzi* por parte de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Aloysia triphylla* (cedrón), así como la no toxicidad de estas plantas sobre células mamíferas. Similarmente, se ha probado el efecto tripanocida de algunas plantas colombianas sobre epimastigotes (*Cuatresia riparia*, *Larnax sachapapa*, *Solanum laevigatum*, *S. nematorhachis*, *S. psychotrioides* y *Acnistus arborecens*) tripomastigotes (*S. nematorhachis*, *S. psycotroides* y *L. sachapapa*) y amastigotes (*Hieronyma antioquiensis*) de *T. cruzi* (Valencia *et al.*, 2011). Todos estos esfuerzos demuestran un gran potencial de nuevas alternativas, de origen natural, para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren nuevas perspectivas de investigación sobre la acción tripanocida de *A. annua* sobre *T. cruzi* y ofrecen una nueva alternativa

terapéutica para el tratamiento de la infección por este parásito, en especial la preparación de infusiones, pues resultan ser una opción accesible, de bajo costo, fácil de preparar y administrar. Mejorando las condiciones de cultivo de *A. annua*, o ensayando su cultivo en zonas más altas y templadas del oriente venezolano, pudiera, producirse a gran escala esta poderosa fuente medicinal en Venezuela.

CONCLUSIONES

Las semillas de *A. annua* provenientes de Luxemburgo tuvieron una viabilidad reducida.

Las plantas de *A. annua* cultivadas en la ciudad de Cumaná, se desarrollaron pobremente en comparación con lo reportado en otros países.

Las semillas de *A. annua* necesitan sembrarse a poca profundidad del suelo, ya que su germinación es activada en gran manera por la luz solar. Del mismo modo, se necesita constante humedad del sustrato para la germinación y crecimiento de esta especie que, se desarrolla bien en suelo a base de humus y compost de caña de azúcar, siendo este último útil por su fertilidad y capacidad de retención de agua.

El proceso de trasplante no favoreció a la producción de biomasa de la planta *A. annua*, lo cual no es propicio para la obtención de hojas con fines terapéuticos con potencial anti-*T. cruzi*.

Las infusiones de *A. annua* ejercieron un efecto antiproliferativo dosis-dependiente sobre diferentes aislados de epimastigotes de *T. cruzi*.

La infusión de *A. annua* preparada con hojas provenientes de Luxemburgo tiene un efecto antiproliferativo más efectivo sobre los dos aislados de *T. cruzi* evaluados.

El efecto antiproliferativo de *A. annua* sobre epimastigotes de *T. cruzi* depende del tipo de infusión, la concentración la misma y el tiempo al cual los parásitos estén expuestos a la infusión.

RECOMENDACIONES

El cultivo de *A. annua* en condiciones climáticas del noreste venezolano requiere de una previa tropicalización o adaptación de las plantas a estas condiciones, para que puedan alcanzar mayor altura y producir más biomasa.

La implementación de sistemas de lámparas para acortar el fotoperíodo de las plantas así como sistemas de riego programado mejoraría en gran manera el cultivo de grandes cantidades de esta planta medicinal.

Se recomienda seguir las investigaciones acerca de la acción de esta planta sobre *T. cruzi*, ya que existen muy pocos estudios acerca de la misma y sus infusiones pueden constituir una buena alternativa terapéutica en el tratamiento de la infección por este parásito. Siendo ya comprobada la acción de las infusiones de *A. annua* sobre el parásito *in vitro* sería conveniente realizar estudios *in vivo* en animales de experimentación y comparar el efecto de la infusión con la acción de los compuestos activos de la planta purificados sobre animales infectados con *T. cruzi*.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, L.; Hechevarría, I. y Rodríguez, C. 2011. Influencia de las condiciones de cultivo y del momento óptimo de cosecha en *Artemisia annua* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1): 105-114.
- Arrow, K.; Gelband, H. y Jamison, D. 2005. Making antimalarial agents available in Africa. *New England Journal of Medicine*, 353(4): 333-335.
- Bagchi, G.; Jain, D. y Kumar, S. 1997. Arteether: a potent plant growth inhibitor from *Artemisia annua*. *Phytochemistry*, 45(6): 1131-1133.
- Berrizbeitia, M.; Ndao, M.; Gottschalk, M.; Aché, A.; Vásquez, F.; Lacouture, S.; Mehudy, M. y Ward, B. 2004. Development and comparison of an enzyme immunoassays for diagnoses of Chagas disease using fixed forms of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes) and assessment of antigen stability for the three assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4): 1766-1769.
- Bhakuni, R.; Jain, D.; Kumar, S. y Sharma, R. 2001. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*, 80: 35-48.
- Biesen, C. 2010. The rise to prominence of *Artemisia annua* L. - the transformation of a Chinese plant to a global pharmaceutical. *African Sociological Review*, 14(2): 24-46.
- Blanco, A.; Aoki, A.; Montamat, E. y Rovai, L. 1983. Effect of gossypol upon motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 30: 648-651.
- Campos, F.; Januário, A.; Rosas, L.; Nascimento, S.; Pereira, P.; França, S.; Coreiro, M.; Toldo, M. y Albuquerque, S. 2005. Trypanocidal activity of extracts and fractions of *Bertholletia excelsa*. *Fitoterapia*, 76: 26-29.
- Carmargo, L.; Oliveira, S.; Basano, S. y Garcia, C. 2009. Antimalarials and the fight against malaria in Brazil. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 5: 311-317.
- Castro, J. y Díaz, E. 1988. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against american trypanosomiasis (Chagas disease). *Biomedical and Environmental Sciences*, 1(1): 19-33.
- Cordero, C. 2002. Radiosensibilidad en tres especies de *Cucurbitaceae*: *Citrullus lanatus* L; *Cucumis sativus* L; *Cucumis melo* L. Trabajo de pregrado. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.
- Davies, M.; Atkinson, C.; Burns, C.; Woolley, J.; Hipps, N.; Arroo, R.; Dungey, N.;

Robinson, T.; Brown, P.; Flockart, I.; Hill, C.; Smith, L. y Bentley, S. 2009. Enhancement of artemisinin concentration and yield in response to optimization of nitrogen and potassium supply to *Artemisia annua*. *Annals of Botany*, 104: 315-323.

Delabays, N.; Benakis, A. y Collet, G. 1993. Selection and breeding for high artemisinin (Qinghaosu) yielding strains of *Artemisia annua* L. *Acta Horticultura*, 330: 203-207.

Delabays, N.; Simonnet, X. y Gaudin, M. 2001. The genetics of artemisinin content in *Artemisia annua* L. and the breeding of high yielding cultivars. *Current Medicinal Chemistry*, 8(15): 795-1801.

De Magalhães, P.; Figueira, G.; Rehder, V.; Sartoratto, A. y Vaz, A. 2006. Agronomic and chemical evaluation of a hybrid of the antimalarial species *Artemisia annua* L. for São Paulo state regions. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8: 199-200.

De Oliveira, T.; Oliveira, D.; Rostkowska, C.; Ribeiro, S.; Ferro, E.; Magalhães, P. y Mineo, J. 2009. *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia annua* L. on susceptibility to infection in experimental models *in vitro* and *in vivo*. *Experimental Parasitology*, 122(3): 233-241.

Díaz, L. 2002. Estudio cromosómico y determinación de los efectos de la colchicina sobre la germinación y fase inicial del desarrollo en *Annona muricata* L. (*Annonaceae*). Trabajo de pregrado. Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela.

Feliciangeli, D. 2009. Control de la enfermedad de Chagas en Venezuela. Logros pasados y retos presentes. *Interciencia*, 34(6): 393-399.

Ferreira, J. 2007. Nutrient deficiency in the production of artemisinin dihydroartemisinic acid, and artemisinic acid in *Artemisia annua* L. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 55: 1686-1694.

Ferreira, J. y Janick J. 1996. Distribution of artemisinin in *Artemisia annua*. En: *Progress in new crops*. Janick, J. (ed). ASHS Press. Arlington, VA. Págs. 579-584. <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/V3-578.html>> (04/04/2010)

Ferreira, J.; Simon, J. y Janick, J. 1995. Developmental studies of *Artemisia annua*: Flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions, *Planta Medica*, 61: 167-170.

Ferreira, J.; Simon, J. y Janick, J. 1997. *Artemisia annua*: Botany, horticulture, pharmacology. *Horticulture Reviews*, 19: 319-371.

Filardi, L. y Brener, Z. 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 755-759.

Fournet, A.; Muñoz, V.; Roblot, F.; Hocqueniiller, R.; Cavé, A. y Gantier, J. 1993. Antiprotozoal activity of dehydrozalanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae). *Phytoteraphy Research*, 7: 111-115.

Fumanal, B.; Chauvel, B.; Sabatier, A. y Bretagnolle, F. 2007. Variability and Cryptic Heteromorphism of *Ambrosia artemisiifolia* Seeds: What Consequences for its Invasion in France?. *Annals of Botany*, 100(2): 305-313.

Graham, I.; Besser, K.; Blumer, S.; Branigan, C.; Czechowski, T.; Elias, L.; Guterman, I.; Harvey, D.; Isaac, P.; Khan, A.; Larson, T.; Li, Y.; Pawson, T.; Penfield, T.; Rae, A.; Rathbone, D.; Reid, S.; Ross, J.; Smallwood, M.; Segura, V.; Townsend, T.; Vyas, D.; Winzer, T. y Bowles, D. 2010. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin. *Science*, 327: 328-331.

Grases, J.; Malaver, A.; Montes, L.; Gonzalez, M.; Herrera, C.; Acosta, L.; Lugo, M.; Madriz, J.; Hernández, J. y Vargas, R. 2004. Amenazas naturales y vulnerabilidad en Cumaná. *Instituto De Materiales y Modelos Estructurales*, 42(3): 57-80.

Gutiérrez, E. y Padrón, R. 2009. Centro virtual de meteorología. Clima de los Altos Mirandinos. <http://met.ivic.gob.ve/clima_AM.html> (03/11/2012).

Hómez, J.; Soto, R.; Tarazón, S.; Méndez, H. y Mármol, P. 2007. *Parasitología*. Undécima edición. Editorial de la Universidad del Zulia. Maracaibo.

Jiang, L.; Liu, H.; Wang, J.; Tan, F.; Zhao, K.; Wu, X.; Zhu, H.; Tang, K. y Tang, X. 2010. Characterization and comparison of three transgenic *Artemisia annua* varieties and wild-type variety in environmental release trial. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(24): 2719-2728.

Klayman, D. 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 228: 1049-1055.

Krishna, S.; Uhlemanna, A. y Haynes, R. 2004. Artemisinins: mechanisms of action and potential for resistance. *Drug Resistance Updates*, 7: 233-244.

Kucsera, J.; Yarita, K.; Takeo, K. 2000. Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *Journal of Microbiological Methods*, 41(1): 19-21.

Kulkarni, R. 2002. *Artemisia pallens*. En: *Artemisia. Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*. Wright, C. (ed). Taylor & Francis. Londres. Págs. 119-137.

Laplumé, H.; Barousse, A. y Cabrera, H. 1982. Efectos indeseables de nifurtimox y benznidazol. *Medicina (Buenos Aires)*, 42: 223.

Laskowski, L. y Bautista, D. 2002. Efecto de la escarificación y profundidad de siembra

- sobre la germinación y emergencia de *Malpighia emarginata* DC. *Bioagro*, 14(2): 77-83.
- Laughlin, J.; Heazlewood, G. y Beattie, B. 2002. Cultivation of *Artemisia annua* L. En: *Artemisia. Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*. Wright, C. (ed). Taylor & Francis. Londres. Págs.159-195.
- Lewis, A. 1973. Ragweed control techniques: effect on old-field plant populations. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 100(6): 333-338.
- Li, X.; Jiang, D.; Zhou, Q. y Oshida, T. 2012. Comparison of seed germination of four *Artemisia* species (Asteraceae) in northeastern Inner Mongolia, China. *Journal of Arid Land* , 4(1): 36-42.
- Li, Y. ; Huang, H. y Wu, Y. 2006. Qinghaosu (artemisinin) - a fantastic antimalarial drug from a traditional chinese medicine. En: *Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products*. Fang, W. y Liang, X. (eds). Wiley Interscience. New Jersey. Pags. 183-239.
- Liersch, R.; Soicke, H.; Stehr, P. y Tullner, H. 1986. Formation of artemisinin in *Artemisia annua* during one vegetation period. *Planta Medica*, 7: 387-390.
- Liu, K.; Yang, S.; Roberts, S.; Elford, B. y Phillipson, J. 1992. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cells Reports*, 11: 637-640.
- Luize, P.; Tiunan, T.; Morello, L.; Maza, P.; Ueda-Nakamura, T.; Dias, B.; Garcia, D.; Palazzo, J. y Nakamura, C. 2005. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(1): 85-94.
- Luo, X. y Shen, C. 1987. The chemistry, pharmacology and clinical application of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives. *Medicinal Research Reviews*, 7: 29-52.
- Lutgen, P. 2009. La tisane d'*artemisia annua*, une puissante polythérapie!. Résultats scientifiques et nouvelles pistes de recherche dans 2ème congrès “Maladies tropicales, aspects humanitaires et scientifiques” <http://www.aliai.lu/YT2010/wp-content/uploads/2009/06/revue_tisane.pdf> (12/04/2011)
- Lutgen, P. 2011. La familia de las artemisias ofrece una politerapia poderosa contra las enfermedades tropicales y la disentería. *Biomédica*, 31(3): 206-208.
- Lutgen, P. y Michels, B. 2008. Bactericidal properties of *Artemisia annua* tea and dosimetry of artemisinin in water by fluorescence under UV light. *Revue Technique Luxembourgeoise*, 2: 73-78.
- Meshnick, S. 1994. The mode of action of antimalarial peroxides. *Transactions of Royal*

Society of Tropical Medicine and Hygiene, 11: 31-32.

Michaelis, M.; Kleinschmidt, M.; Barth, S.; Rothweiler, F.; Geiler, J.; Breitling, R.; Mayer, B.; Deubzer, H.; Witt, O.; Kreuter, J.; Doerr, H.; Cinatl, J. y Cinatl, J. 2010. Anti-cancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 79(2): 130-136.

Mishina, Y.; Haynes, R.; Krishna, S. y Meade, J. 2007. Artemisinins inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* *in vitro* growth. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 1852-1854.

Mucciarelli, M. y Maffei, M. 2002. Introduction to the genus. En: *Artemisia. Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*. Wright, C. (ed). Taylor & Francis. Londres. Págs. 1-50.

Mueller, M.; Karhagomba, I.; Hirt, H. y Wemakor, E. 2000. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 487-493.

Müller, M. y Brandes, D. 1997. Growth and development of *Artemisia annua* L. on different soil types. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, 27: 453-460.

Muñoz, V.; Duchén, E.; Wagner, F.; Ferreira, M.; Serna, E.; Torrez, S.; Yaluff, G.; Ayaviri, M. y Vera, N. 2010. Actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo* de extractos etanólicos de algunas plantas medicinales bolivianas. *BIOFARBO*, 18(1): 69-75.

Nandakumar, D.; Nagaraj, V.; Vathsala, P.; Rangarajan P. y Padmanaban, G. 2006. Curcumin-artemisinin combination therapy for malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5): 1859-1860.

Ogwang, P.; Ogwal, J.; Kasasa, S.; Olila, D.; Ejobi, F.; Kabasa, D. y Obua, C. 2012. *Artemisia annua* L. infusion consumed once a week reduces risk of multiple episodes of malaria: a randomised trial in a Ugandan community. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3): 445-453.

Organización Mundial de la Salud. 2006a. Monography on good agricultural and collection practices of *Artemisia annua* L. Geneva: World Health Organization Publication.

Organización Mundial de la Salud. 2006b. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: World Health Organization Publication.

Räth, K.; Taxis, K.; Walz, G.; Gleiter, C.; Li, S. y Heide, L. 2004. Pharmacokinetic study of artemisinin after oral intake of a traditional preparation of *Artemisia annua* L. (annual wormwood). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(2): 128-132.

- Restrepo, A.; Muñoz, D.; Upegui, Y.; Lutgen, P.; Vélez, I. y Robledo, S. 2011. Utilidad de *Artemisia annua* como tratamiento en leishmaniasis cutánea, estudios *in vitro* e *in vivo*. *Biomédica*, 31(3): 412.
- Rocha, L.; De Magalhães, P.; Farias, M.; Costa, M.; Maia, F.; Hidalgo, A.; Pohlit, A. y Ribeiro, P. 2012. *In vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* Welch field isolates to infusions prepared from *Artemisia annua* L. cultivated in the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(7): 859-866.
- Rodríguez, A. 2005. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(2): 123-133.
- Rojas, A. y Aristizábal, I. 2011. Efecto del contenido de humedad sobre propiedades físicas de la semilla de Vitabosa (*Mucuna deeringiana*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía de Medellín*, 64(1): 5961-5971.
- Rojas, J.; Solís, H. y Palacios, O. 2010. Evaluación *in vitro* de la actividad anti *Trypanosoma cruzi* de aceites esenciales de diez plantas medicinales. *Anales de la Facultad de Medicina*, 71(3): 161-165.
- Sandoval, M. 2009. Control biológico de *Colletotrichum fusarioides* O'Gara, patógeno de semillas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) con *Trichoderma* Rifai. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(2): 104-109.
- Santoro, G.; Cardoso, M.; Guimarães, L.; Salgado, A.; Menna-Barreto, R. y Soares, M. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, 100(4): 783-790.
- Segnini, M.; Medina, J.; Marcano, S. y Finol, H. 2009. Alteraciones ultraestructurales de los hepatocitos de *Caquetaia kraussii* (pisces: Cichlidae) debido a la atrazina. *Acta Microscópica*, 18(2): 81-84.
- Sen, R.; Bandyopadhyay, S.; Dutta, A.; Mandal, G.; Ganguly, S.; Saha, P. y Chatterjee, M. 2007. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Medical Microbiology*, 56(9): 1213-1218.
- Servicio Meteorológico de Luxemburgo. 2012. Climatology. Information on the climate in Luxembourg in 2011. Le gouvernement du grand-duché de Luxembourg. http://www.meteolux.lu/IMG/pdf/Re_sume_climatologique_2011_WMO_06590_TA_R_R.pdf (07/09/2012).
- Simoni, Z. 2007. Estudio del efecto de la combinación de 22-hidrazona-imidazolin-z-il-5-colesta-3β-oly [Cu(dppZ)₂(NO₃)₂] NO₃ sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*. Trabajo de Maestría. Postgrado en Biología Aplicada.

Universidad de Oriente, Cumaná.

Sokal, J. y Rohlf, J. 1979. *Biometría, principios y métodos estadísticos aplicados a la investigación biológica*. Hermann Blume Ediciones. Barcelona, España.

Spegazzini, E. y Najera, M. 1989. *Artemisia annua* L. (Compositae- Anthemideae). Aspectos farmacognósticos. *Acta Farmacologica Bonuerense*. 8(2): 95-100.

Sülsen, V.; Frank, F.; Cazorla, S.; Anesini, C.; Malchiodi, E.; Freixa, B.; Vila, R.; Muschietti, L. y Martino, V. 2008. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7): 2415-2419.

Swapnadeep, P.; Jain, D. y Joshi, S. 2009. Comparison of antiinflammatory activity of *Artemisia annua* leaves extracts obtained through conventional and new method. *Journal of Pharmacy Research*, 2(1): 1-5.

Trigg, P. 1989. Qinghaosu (artemisinin) as an antimalarial drug. *Economic and Medicinal Plant Research*, 3: 19-55.

Valencia L.; Muñoz D.; Robledo S.; Echeverri F.; Arango G.; Vélez I. y Triana O. 2011. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica*, 31(4): 552-559.

Vila, M. 1965. *Aspectos geográficos del estado Sucre*. Corporación Venezolana de Fomento. Serie "Monografías Estadales". Caracas.

Vivas, R. 1997. Determinación y aislamiento de artemisinina en *Artemisia annua* L. cultivada en Venezuela. Trabajo de pregrado. Escuela de Química, Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Wagner, H. 2006. Futuro en la investigación en Fitoterapia: tendencias y retos. *Revista de Fitoterapia*, 6(2): 101-117.

Willcox, M.; Bodeker, G.; Bourdy, G.; Dhingra, V.; Falquet, J.; Ferreira, J.; Graz, B.; Hirt, H.; Hsu, E.; Magalhães, P.; Provendier, D. y Wright, C. 2004. *Artemisia annua* as a traditional herbal antimalarial. En: Willcox, M.; Bodeker, G. y Rasoanaivo, P. (Eds.), *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. CRC Press. Boca Raton. Págs. 43-59.

Woerdenbag, H.; Pras, N.; Chan, N.; Bang, B.; Bos, R.; Van Uden, W.; Van, Y.; Boi, N.; Batterman, S. y Lugt, C. 1994. Artemisinin, related sesquiterpenes, and essential oil in *Artemisia annua* during a vegetation period in Vietnam. *Planta Medica*, 60: 272-275.

Wright, C.; Linley, P.; Brun, R.; Wittlin, S. y Hsu, E. 2010. Ancient chinese methods are remarkably effective for the preparation of artemisinin-rich extracts of qing hao with

potent antimalarial activity. *Molecules*, 15: 804-812.

Wright, C. y Warhurst, D. 2002. The mode of action of artemisinin and its derivatives. En: *Artemisia. Medicinal and aromatic plants - Industrial profiles*. Wright, C. (ed). Taylor & Francis. Londres. Págs. 249-288.

Xiao, S.; Chollet, J.; Utzinger, J.; Dong, Y.; Matile, H.; Jinyan, M. y Tanner, M. 2001. Artemether administered together with haemin damages schistosomes *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(1): 67-71.

Yang, D. y Liew, F. 1993. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*, 106: 7-11.

APÉNDICES



Figura 1. Bandejas de germinación conteniendo tierra abonada, en la cual se sembraron las semillas de *A. annua*.

Tabla 1. Resumen estadístico del análisis de varianza multifactorial aplicado a la densidad celular de epimastigotes de *T. cruzi* bajo la acción de infusiones de *A. annua*.

Nivel	Contaje	Media	Error estándar	Límite inferior	Límite superior
Gran media	162	0,294814			
INFUSIÓN					
Cumaná	84	0,410335	0,0330727	0,344979	0,47569
Luxemburgo	78	0,179293	0,0346309	0,110858	0,247728
CONCENTRACIÓN (%p/v)					
Control	24	0,912468	0,0618734	0,790198	1,03474
0,40	24	0,653553	0,0618734	0,531283	0,775822
0,60	24	0,453414	0,0618734	0,331144	0,575683
0,80	24	0,2709	0,0618734	0,14863	0,39317
1,00	24	0,145779	0,0618734	0,0235097	0,268049
2,00	22	-0,0746039	0,064873	-0,202801	0,0535933
3,00	20	-0,297813	0,0683309	-0,432844	-0,162783
AISLADO					
RG1	81	0,251924	0,0337703	0,185189	0,318658
CHHP	81	0,337704	0,0337703	0,270969	0,404438
TIEMPO (días)					
0	28	0,30103	0,0572837	0,18783	0,41423
1	28	0,116498	0,0572837	0,00329813	0,229698
2	28	0,204117	0,0572837	0,0909174	0,317317
3	28	0,261698	0,0572837	0,148498	0,374898
4	26	0,319792	0,059678	0,201861	0,437723
7	24	0,565748	0,0623736	0,44249	0,689006

(*) Denota diferencia estadística ($p < 0,05$).

Tabla 2. Prueba de rangos múltiples de Bonferroni para tipo de infusión de *A. annua* que ejercen su acción sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

Infusión	Contaje	Media LS	Grupos homogéneos
Luxemburgo	78	0,179293	X
Cumaná	84	0,410335	X
Contraste	Diferencia	+/- Límites	
Cumaná-Luxemburgo	*0,231042	0,0941879	

(*) Denota diferencia estadística ($p < 0,05$).

Tabla 3. Prueba de rangos múltiples de Bonferroni para concentración de las infusiones

de *A. annua* que ejercen su acción sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

Concentración (%p/v)	Contaje	Media LS	Grupos homogéneos
3,00	20	-0,297813	X
2,00	22	-0,0746039	XX
1,00	24	0,145779	XX
0,80	24	0,2709	XX
0,60	24	0,453414	XX
0,40	24	0,653553	XX
Control	24	0,912468	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
0 - 0,40	0,258915	0,270506
0 - 0,60	*0,459054	0,270506
0 - 0,80	*0,641567	0,270506
0 - 1,00	*0,766688	0,270506
0 - 2,00	*0,987072	0,276586
0 - 3,00	*1,21028	0,283709
0,40 - 0,60	0,200139	0,270506
0,40 - 0,80	*0,382652	0,270506
0,40 - 1,0	*0,507773	0,270506
0,40 - 2,00	*0,728157	0,276586
0,40 - 3,00	*0,951366	0,283709
0,60 - 0,80	0,182513	0,270506
0,60 - 1,00	*0,307634	0,270506
0,60 - 2,00	*0,528018	0,276586
0,60 - 3,00	*0,751227	0,283709
0,80 - 1,00	0,125121	0,270506
0,80 - 2,00	*0,345504	0,276586
0,80 - 3,00	*0,568714	0,283709

(*) Denota diferencia estadística ($p < 0,05$).

Tabla 4. Prueba de rangos múltiples de Bonferroni para aislado de *T. cruzi* bajo acción

de las infusiones de *A. annua*.

Aislado	Contaje	Media LS	Grupos homogéneos
RG1	81	0,251924	X
CHHP	81	0,337704	X
Contraste	Diferencia		+/- Limites
RG1-CHHP	-0,08578		0,0941233

(*) Denota diferencia estadística ($p < 0,05$).

Tabla 5. Prueba de rangos múltiples de Bonferroni para tiempo de exposición de los epimastigotes de *T. cruzi* bajo acción de las infusiones de *A. annua*.

Tiempo (días)	Contaje	Media LS	Grupos homogéneos
1	28	0,116498	X
2	28	0,204117	X
3	28	0,261698	X
0	28	0,30103	X
4	28	0,319792	XX
7	28	0,565748	X
Contraste	Diferencia	+/- Límites	
0 - 1	0,184532	0,241706	
0 - 2	0,0969129	0,241706	
0 - 3	0,0393322	0,241706	
0 - 4	-0,018762	0,24631	
0 - 7	*-0,264718	0,251575	
1 - 2	-0,0876192	0,241706	
1 - 3	-0,1452	0,241706	
1 - 4	-0,203294	0,24631	
1 - 7	*-0,44925	0,251575	
2 - 3	-0,0575806	0,241706	
2 - 4	-0,115675	0,24631	
2 - 7	*-0,361631	0,251575	
3 - 4	-0,0580942	0,24631	
3 - 7	*-0,30405	0,251575	
4 - 7	-0,245956	0,256002	

(*) Denota diferencia estadística ($p < 0,05$).