



**UNL**

Universidad  
Nacional  
de Loja

# Universidad Nacional De Loja

Facultad de la Salud Humana

Carrera de Laboratorio Clínico

## Actividad citotóxica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi*

Trabajo de Integración Curricular previa a la  
obtención del título de Licenciada en  
Laboratorio Clínico

Autor:

Maritza Dayanara Maldonado Pineda

Director:

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

Loja-Ecuador

2023

Loja, 29 de mayo del 2023

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana,

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de elaboración del Trabajo de Integración Curricular denominado: **Actividad citotóxica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi***, previo a la obtención del título de **Licenciada en Laboratorio Clínico**, de la autoría de la estudiante **Maritza Dayanara Maldonado Pineda**, con **cédula de identidad Nro. 0706338704**, una vez que el trabajo cumple con todos los requisitos exigidos por la Universidad Nacional de Loja y ha sido culminado y aprobado. Por lo tanto, otorgo mi autorización para la presentación del mismo en su debida sustentación y defensa.



Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, M. Sc

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

### **Autoría**

Yo, **Maritza Dayanara Maldonado Pineda**, declaro ser la autora del presente Trabajo de Integración Curricular y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos y acciones legales, por el contenido del mismo. Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación de mi Trabajo de Integración Curricular, en el Repositorio Digital Institucional- Biblioteca Virtual.

**Firma:**



**Cédula de identidad:** 0706338704

**Fecha:** 8 de junio del 2023

**Correo electrónico:** maritza.d.maldonado@unl.edu.ec

**Teléfono:** 0986191333

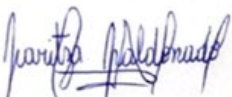
### Carta de autorización del estudiante

Yo, **Maritza Dayanara Maldonado Pineda**, declaro ser la autora del presente Trabajo de Integración Curricular denominado: **Actividad citotóxica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi***, como requisito para optar por el título de **Licenciada en Laboratorio Clínico**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido en el Repositorio Institucional.

Los usuarios podrán consultar el contenido de este trabajo en el Repositorio Institucional, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tengan convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia del trabajo de Integración Curricular que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los ocho días del mes de junio de dos mil veintitrés.

Firma: 

Autora: Maritza Dayanara Maldonado Pineda

Cédula de identidad: 0706338704

Dirección: Av. Manuel Monteros y Alfredo Mora Reyes

Correo electrónico: maritza.d.maldonado@unl.edu.ec

Teléfono: 0986191333

#### Datos complementarios

Director de Trabajo de Integración Curricular: Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc

## **Dedicatoria**

Al culminar uno de mis objetivos que me propuse en la vida, con dedicación, sacrificio y paciencia, dedico este logro a **DIOS** por siempre permanecer conmigo en cada paso que doy, por darme fuerzas y nunca abandonarme. A Santa Rita de Casia por socorrerme en momentos en los que pensaba desistir. A mis padres; Segundo Maldonado y Flor María Pineda, que supieron apoyarme en cada paso de mi carrera, a mis tres hermanas y en especial a mi hermana Verónica del Cisne Maldonado Pineda, que ha sido mi compañera e impulso para seguir adelante, también quiero dedicarle este trabajo a mi abuelito Segundo “mi estrella del cielo” y a todos quienes de una u otra manera brindaron su absoluto apoyo.

Pues a ellos es a quienes dedico este logro por su apoyo incondicional,

Maritza Dayanara Maldonado Pineda

## **Agradecimiento**

En este espacio quiero dar mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, Facultad de la Salud Humana y en especial a la Carrera de Laboratorio Clínico en donde me forme profesionalmente, a mis docentes que supieron brindarme conocimientos para realizarme en mi vida profesional.

Al Dr. Luis Morocho Yaguana, docente de la carrera y director del Trabajo de Integración Curricular que, con su dedicación y motivación, supo guiarme para culminar mis estudios, por ello mi gratitud.

Mi agradecimiento a la Universidad técnica Particular de Loja y al cuerpo docente del departamento de química de dicha institución por prestarme sus instalaciones y equipos; en especial al Dr. Luis Cartuche Flores por guiarme en el manejo y uso del espectrofotómetro.

Maritza Dayanara Maldonado Pineda.

## Índice de contenidos

Carátula.....	i
Certificación del Trabajo de Integración Curricular .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Dedicatoria .....	v
Agradecimiento .....	vi
Índice de contenidos .....	vii
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de anexos.....	x
Glosario de abreviaturas .....	xi
1.    Título.....	1
2.    Resumen.....	2
2.1.    Abstract.....	3
3.    Introducción .....	4
4.    Marco Teórico.....	7
4.1.    Leishmaniasis .....	7
4.1.1.    Antecedentes .....	7
4.1.2.    Agentes Etiológicos.....	7
4.1.3.    Aspectos epidemiológicos .....	8
4.1.4.    Morfología.....	8
4.2.    Ciclo de vida del parásito .....	8
4.3.    Leishmania Visceral .....	9
4.3.1.    Patología y patogenia .....	9
4.3.2.    Sintomatología .....	9
4.3.3.    Diagnóstico.....	9
4.4.    Leishmaniasis tegumentaria americana (LTA).....	10

4.4.1.	Patología y patogenia .....	10
4.4.2.	Sintomatología .....	10
4.5.	Leishmania difusa .....	10
4.5.1.	Diagnóstico.....	10
4.6.	Factores de riesgo .....	11
4.6.1.	Condiciones socioeconómicas.....	11
4.6.1.	Malnutrición.....	11
4.6.2.	Movilidad de la población.....	11
4.6.3.	Cambios ambientales.....	11
4.6.4.	Cambio climático .....	11
4.7.	Actividad leishmanicida de plantas medicinales .....	12
4.7.1.	Género Plumbago .....	12
4.7.2.	Clasificación botánica .....	13
4.7.3.	Características generales .....	13
4.7.4.	Plumbago scandens L. ....	13
4.8.	Quinonas y naftoquinonas .....	14
4.9.	Plumbagina .....	15
4.10.	Técnicas de evaluación de actividad citotóxica.....	15
4.10.1.	Técnica de Resazurina.....	15
4.10.2.	Técnica de XTT.....	15
4.10.3.	Técnica de MTT.....	16
5.	Metodología .....	17
5.1.	Tipo de estudio .....	17
5.2.	Área de estudio .....	17
5.3.	Universo.....	17



5.4.	Muestra .....	17
5.5.	Criterios de inclusión.....	17
5.6.	Criterios de exclusión .....	17
5.7.	Equipos y Materiales .....	17
5.7.1.	Fase Pre-Analítica .....	17
5.7.2.	Fase analítica .....	18
5.7.3.	Fase Post-Analítica.....	19
5.7.4.	Fuentes de información .....	19
6.	Resultados .....	20
7.	Discusión.....	23
8.	Conclusiones .....	25
9.	Recomendaciones.....	26
10.	Bibliografía .....	27
11.	Anexos .....	32

### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Resultado del porcentaje de inhibición de parásitos.....	20
<b>Tabla 2.</b>	Resultado del porcentaje de inhibición del AE de <i>P.scandens</i> L.....	21
<b>Tabla 3.</b>	Resultado del porcentaje de inhibición de la AmB.....	22
<b>Tabla 4.</b>	Consideraciones del movimiento flagelar.....	66
<b>Tabla 5.</b>	Lecturas de absorbancias y cálculos de inhibición del AE, según la fórmula.....	67
<b>Tabla 6.</b>	Promedio de Absorbancias y porcentaje de inhibición del aceite.....	68
<b>Tabla 7.</b>	Lecturas de absorbancias y cálculos de inhibición de la AmB, según la fórmula ...	69
<b>Tabla 8.</b>	Promedio de Absorbancias y porcentaje de inhibición de la AmB.....	70
<b>Tabla 9.</b>	Reporte de resultados por el espectrofotómetro EPOCH <sub>2</sub> (Biotek).....	71
<b>Tabla 10.</b>	Promedio de absorbancias del reporte de resultados.....	72

## Índice de figuras

<b>Figura N° 1.</b> Estructura de naftoquinonas .....	14
<b>Figura N° 2.</b> Estructura química de plumbagina .....	15

## Índice de gráficos

<b>Grafico N°1.</b> Representación gráfica del porcentaje de inhibición del AE.....	68
<b>Grafico N°2.</b> Representación gráfica del porcentaje de inhibición de la AmB.....	70

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.-</b> Certificado de permiso del Laboratorio .....	33
<b>Anexo 2.-</b> Protocolo para la preparación de medio de cultivo (NNN).....	34
<b>Anexo 3.-</b> Protocolo para la preparación de medio de cultivo <i>Drosophila</i> .....	37
<b>Anexo 4.-</b> Protocolo de extracción de aceite esencial de <i>P.scandens</i> L.....	40
<b>Anexo 5.-</b> Protocolo para el recuento de parásitos en cámara de Neubauer.....	43
<b>Anexo 6.-</b> Protocolo para la preparación de la solución salina fosfatada.....	48
<b>Anexo 7.-</b> Protocolo para la preparación del MTT.....	52
<b>Anexo 8.-</b> Protocolo para la preparación del dodecilsulfato sódico o SDS.....	55
<b>Anexo 9.-</b> Protocolo para la preparación de la solución de AmB (fármaco de referencia)..	58
<b>Anexo 10.-</b> Protocolo para realizar el ensayo del MTT.....	61
<b>Anexo 11.-</b> Consideraciones del movimiento flagelar de parásitos.....	66
<b>Anexo 12.-</b> Cálculos de inhibición parasitaria del aceite.....	67
<b>Anexo 13.-</b> Cálculos de inhibición parasitaria de la Anfótericina B.....	69
<b>Anexo 14.-</b> Resultado de absorbancias, por el espectrofotómetro EPOCH <sub>2</sub> (Biotek).....	71
<b>Anexo 15.-</b> Promedio de absorbancias del ensayo del MTT del AE y AmB.....	72
<b>Anexo 16.-</b> Difusión de resultados.....	73
<b>Anexo 17.-</b> Registro de asistencia de estudiantes, difusión de resultados .....	74
<b>Anexo 18.-</b> Registro de asistencia de docentes, difusión de resultados.....	75
<b>Anexo 19.-</b> Evidencias fotográficas.....	77
<b>Anexo 20.-</b> Certificado de pertinencia.....	79
<b>Anexo 21.-</b> Certificado del Herbario “Reinaldo Espinoza”de la UNL.....	80
<b>Anexo 22.-</b> Certificado de traducción.....	81

## Glosario de abreviaturas

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OPS:** Organización Panamericana de la Salud

**LC:** Leishmaniasis cutánea

**LV:** Leishmaniasis visceral

**NNN:** Novy, Mc Neal, Nicolle

**AE:** Aceite esencial

**AmB:** Anfotericina B

*L:* *Leishmania*

*V:* *viannia*

**SFBi:** Suero fetal bovino inactivado

**LTA:** Leishmaniasis tegumentaria americana

**MTT:** bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-difeniltetrazolio

**PBS:** Solución salina fosfatada

## **1. Título**

Actividad citotóxica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi*

## 2. Resumen

La *Leishmaniasis*, es una enfermedad infecciosa del hombre causada por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, transmitida al hombre por la picadura de insectos infectados, presenta dos estadios; intracelular o amastigote y extracelular o promastigote. Sus manifestaciones clínicas son la leishmaniasis cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). Para el tratamiento de la infección se utilizan los antimoniales pentavalentes, como el antimoniato de meglumina (Glucantime®) y estibogluconato de sodio (Pentostam®).

En medicina tradicional se utilizan plantas medicinales para tratar esta enfermedad, sin entero conocimiento sobre sus beneficios y mecanismos de acción, siendo una de ellas *Plumbago scandens* L. (*Plumbaginaceae*), como alternativa contra la leishmaniasis.

El presente trabajo de integración curricular se planteó la evaluación citotóxica del aceite esencial de *P. scandens* L. obtenido por arrastre de vapor en promastigotes de *L. naiffi* por método colorimétrico del MTT, leído a una absorbancia máxima de 570 nm de longitud de onda que fueron calculadas por la fórmula de porcentaje de inhibición. El fármaco de referencia y control positivo en este estudio fue la AmB. Se redactó los protocolos correspondientes para la evaluación citotóxica en especies de leishmania; los resultados mostraron que el AE inhibe al parásito en un 77,99% en la concentración de 120 µg/ml. El comportamiento de la AmB resultó ser llamativo; sin embargo, presentó una inhibición del parásito menor al 50%; los resultados fueron socializados a estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

**Palabras clave:** *Leishmania naiffi*, aceite esencial, citotoxicidad, *Plumbago scandens* L, MTT.

## 2.1. Abstract

*Leishmaniasis* is an infectious disease of man caused by flagellated protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted to man by the bite of infected insects, it presents two stages; intracellular or amastigote and extracellular or promastigote. Its clinical manifestations are cutaneous (LC), mucocutaneous (CML) and visceral leishmaniasis (VL) leishmaniasis. Pentavalent antimonials such as meglumine antimonate (Glucantime®) and sodium stibogluconate (Pentostam®) are used to treat the infection.

In traditional medicine, medicinal plants are used to treat this disease, without full knowledge of their benefits and mechanisms of action, one of them being *Plumbago scandens* L. (*Plumbaginaceae*), as an alternative against leishmaniasis.

The present work of curricular integration considered the cytotoxic evaluation of the essential oil of *P. scandens* L. obtained by steam entrainment in promastigotes of *L. naiffi* by the MTT colorimetric method, read at a maximum absorbance of 570 nm of wavelength that were calculated by the percent inhibition formula. The reference drug and positive control in this study was AmB. The corresponding protocols for the cytotoxic evaluation in leishmania species were drafted; the results showed that the AE inhibits the parasite by 77.99% in the concentration of 120 µg/ml. The behavior of the AmB turned out to be striking; however, it presented a parasite inhibition of less than 50%; the results were socialized to students and teachers of the Clinical Laboratory career of the National University of Loja.

**Key words:** *Leishmania naiffi*, essential oil, cytotoxicity, *Plumbago scandens* L, MTT.

### 3. Introducción

La *Leishmaniasis* es una enfermedad infecciosa del hombre producida por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, forma parte de la antropozoonosis que se trasmite al hombre por la picadura de insectos infectados del género *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). El ciclo de vida del parásito comprende el paso de un hospedero vertebrado a un invertebrado o viceversa, con dos formas morfológicas principales; intracelular o amastigote en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedero vertebrado y la forma extracelular promastigote en el tracto intestinal de los flebótomos (Fraga et al., 2021).

Esta infección se presenta en dos formas principales: leishmaniasis cutánea (LC) y leishmaniasis visceral (LV). La cutánea consta de tres tipos: cutánea, mucocutánea y cutánea difusa; la *L. naiffi* y *L. trópica* causantes de LC y *L. infantum* y *L. donovani* causantes de LV, con un cuadro clínico extenso de lesiones que pueden ser mortales (Abdellahi et al., 2022).

La leishmaniasis, es considerada por la OMS como una de las nueve enfermedades tropicales más relevantes a nivel mundial, debido a su morbilidad y mortalidad, actualmente se cree que existen alrededor de 1,5 a 2 millones de nuevos casos por año (OMS, 2022).

En el ciclo de vida, el parásito es inoculado en forma de promastigote, fagocitados por macrófagos y se convierten en amastigotes generando manifestaciones clínicas (Dahal et al., 2021).

Existen otros métodos de transmisión que pueden ser por contacto sexual, transfusión sanguínea y por inoculación accidental debido a un pinchazo o lesión con material contaminado por el parásito (promastigote metacíclico) (Dahal et al., 2021).

La leishmaniasis está dentro de las enfermedades olvidadas debido a los pocos avances investigativos que se dan en el diagnóstico, tratamiento y control, situación que se dificulta en regiones que poseen un alto índice de pobreza, malnutrición, desplazamiento de población y falta de saneamiento de vivienda; además, por factores de riesgo como cambios climáticos, deforestación, urbanización e incluso por conflictos de movimientos políticos y narcotráfico (López et al., 2015).

Es una enfermedad endémica, que afecta a sesenta países alrededor del mundo, que pertenecen a América Central, América del Sur, India, Oriente Medio, Norte de África y el Sur de Europa. El 90% de los casos de LC se presenta en ocho países que son Afganistán, Pakistán,

Siria, Arabia Saudita, Argelia, Irán, Brasil y Perú; sin embargo, el gran número de casos de leishmaniasis visceral se encuentra en la India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil (Toalombo-Espín y Coque-Procel, 2021).

*Leishmaniasis* representa un problema de salud pública en Ecuador, que está presente en 22 de las 24 provincias del país. Se identificaron 9 agentes causantes de leishmaniasis cutánea humana (LC) y mucocutánea (LMC), los cuales son: (*L.*) *amazonensis*, *L.(L) leishmania mexicana*, *L.(L) major-like*, *L.(Viannia) naiffi*, *braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V) panamensis*, *L.(V.) lainsoni* y *leishmania shawi*; 8 especies son causantes de LC y LMC en el país; tales como: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L.lainsoni*, *L.naiffi*, *L. amazonensis*, *L.mexicana*, *L. major-like* (Abdellahi et al., 2022).

Desde el punto de vista morfológico, es difícil distinguir las lesiones causadas por las diferentes especies de leishmania; sin embargo, se acepta que la *L.(V.) brasiliensis*, es la más agresiva. Las partes del cuerpo más afectadas son las que se encuentran descubiertas, como la cara, miembros superiores e inferiores y en muy rara vez se encuentran lesiones en la palma de las manos, pies o cuero cabelludo (Abdellahi et al., 2022).

Los tratamientos para los casos de leishmaniasis no son fáciles de establecer, ya que no todos los fármacos tienen efectividad contra este parásito, debido a su viabilidad en sus cepas, por lo que es imposible que un único medicamento, sea efectivo para tratar la leishmaniasis en todas sus formas clínicas; además, otro problema frecuente es lo doloroso de los tratamientos para combatir esta enfermedad. La OMS ha mejorado de forma significativa el acceso a estos medicamentos, beneficiando a países como Ecuador, Perú, entre otros (Hidalgo Solís et al., 2021).

Los medicamentos de primera línea para el tratamiento son los antimoniales pentavalentes, N-metilglucamina y estibogluconato de sodio; su composición química es muy similar, no obstante, su toxicidad y eficacia se derivan de la cantidad de antimonio que poseen, los de segunda línea anfotericina B y pentamidina actúan si los antimoniales de primera línea no presentan un mejor índice terapéutico, por ello se cree que en algunos casos el parásito no es eliminado totalmente del cuerpo (Solís et al., 2021).

Por lo que nos preguntamos ¿por qué la leishmaniasis es tan difícil de tratar? La respuesta a esta interrogante probablemente está en las complejas interacciones que se dan entre el parásito y el sistema inmune del ser humano, además de las distinciones en el tratamiento con los



antimoniales, cuando el fármaco se administra en dosis más bajas y se da una combinación con otros fármacos, lo que conlleva a una mala absorción y distribución de los mismos (Hernández, 2020).

Por esta razón, se han propuesto alternativas en el control de la enfermedad, siendo una de ellas la medicina tradicional, con la utilización de las propiedades curativas de las plantas, que poseen constituyentes químicos y metabolitos secundarios; ya sea en forma de extractos o aceites esenciales. Es así que, en los últimos 26 años, de 1010 nuevas sustancias aprobadas para el manejo clínico de diferentes enfermedades, 490 (48,5%) son de origen natural, siendo una de ellas *Plumbago scandens* L. (*Plumbaginaceae*), alternativa principal para actuar contra leishmaniasis (Ríos et al., 2008).

Según estudios realizados por el Centro de Investigación Científica de Yucatán, la plumbagina, una naftoquinona y su derivado, 2-metoxi-1,4-naftoquinona, aislada de especies del género *Plumbago*, tuvo efecto leishmanicida mediante la inhibición de la enzima tripanotona reductasa (Tryr), el mecanismo de acción de la plumbagina se basa en generar radicales libres de oxígeno, que atacan al mecanismo de defensa de los parásitos (García et al., 2017).

El presente Trabajo de Integración Curricular, tuvo como objetivos: redactar un protocolo para la evaluación de actividad citotóxica en especies de *Leishmania*; determinar si el aceite esencial de *Plumbago scandens* L., presenta actividad contra promastigotes de *Leishmania naiffi*, por medio de la técnica del MTT, ensayo colorimétrico que se basa en la reducción de este compuesto por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, mostrando un cambio en la coloración de amarillo a azul-violeta que indica la viabilidad del microorganismo al metabolizar el MTT. Los resultados mostraron que el aceite esencial inhibe al parásito en un 77,99% en la concentración de 120 µg/ml, al mismo tiempo que la AmB causó inhibición del parásito en menos del 50%. Finalizado el Trabajo de Integración Curricular, los resultados obtenidos fueron socializados a estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

## 4. Marco Teórico

### 4.1. Leishmaniasis

Es una enfermedad transmitida por vectores que posee más de 30 especies diferentes del género *Leishmania*, familia *Trypanosomatidae*, forma parte de la antropozoonosis que llega al hombre a través de la picadura de insecto hembra del género *Phlebotomus* (viejo mundo), *Lutzomyia* (nuevo mundo), con un cuadro clínico extenso de lesiones cutáneas hasta infecciones viscerales mortales (Abdellahi et al., 2022).

La *Leishmania*, desde su reservorio es establecida por roedores salvajes y cánidos, entre otros, produciendo una infección cutánea (Abdellahi et al., 2022).

Desde su entrada los protozoos se trasladan por los macrófagos a órganos ricos en tejido retículo endotelial, médula ósea, hígado, bazo y ganglios linfáticos, produciendo un cuadro de leishmaniasis visceral provocado por hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e hipergammaglobulinemia afectando el estado general del paciente. La LC y LMC conllevan dificultades respiratorias, llagas en la piel o úlcera cutánea, congestión, goteo, hemorragia nasal, pérdida de peso, entre otros (Abdellahi et al., 2022).

#### 4.1.1. Antecedentes

La LC es la más conocida desde la antigüedad, tanto en el viejo mundo y el nuevo mundo, descrita por árabes desde el siglo XX y simbolizada en “vasos de cerámica” de culturas preincas. La forma visceral o Kalazar, fue la segunda en aparecer; mientras que, el primer caso de LC y LMC en Ecuador fue reportado en la costa ecuatoriana, provincia de Esmeraldas. En 1989 en Paute-Azuay a la LC se la conocía como “nigua de ratón” (Toalombo-Espin y Coque-Procel, 2021).

#### 4.1.2. Agentes Etiológicos

Los protozoos son la causa principal de la infección, corresponden a la familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*, tienen numerosas especies y subespecies con una morfología idéntica, que interfieren en su ubicación geográfica, comportamiento biológico, molecular e inmunológico. El género *Leishmania*, se clasifica en dos subgéneros *Leishmania* (L.) y *Viannia* (V.), esto de acuerdo al sitio de desarrollo en el intestino del díptero trasmisor (Becker et al., 2019).

La *Leishmania* se ubica en el área suprapilórica (próxima a la probóscide) del insecto; y el subgénero *Viannia* se ubica en el intestino medio y posterior (Becker et al., 2019).

#### **4.1.3. Aspectos epidemiológicos**

La Leishmaniasis es endémica, cerca de 350 millones de personas habitan en regiones expuestas a contraer la infección (OPS, 2019).

La LV prevalece un 90% en Brasil, India, Sudán, Etiopía y Kenia. En Región de las Américas existen tres casos de leishmaniasis: LC, LMC y LV, desde el Sur de EE. UU hasta el Norte de Argentina, a excepción de Chile (OPS, 2019).

Se han identificado las formas LC y LMC, presente en 22 de las 24 provincias del Ecuador; mientras que, en la provincia de Loja, se han notificado 14 casos de leishmaniasis (MSP, 2022).

#### **4.1.4. Morfología**

Las características morfológicas de leishmania dependen del ciclo de vida del parásito, con dos fases o estadios: intracelular o amastigote en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedero vertebrado, célula pequeña, redondeada, sin flagelo externo, con 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diámetro, al momento de teñir con Wright y Giemsa, se observa una membrana citoplasmática, que le sirve de sostén y envoltura, citoplasma azul claro y núcleo; la forma extracelular o promastigote en el tracto intestinal de los flebótomos, posee forma alargada, con flagelo externo (anteronuclear) que se forma del cuerpo basal ubicado por delante del cinetoplasto, puede alcanzar una longitud de 15 a 20  $\mu\text{m}$  y de ancho de 1 a 3  $\mu\text{m}$ , se localiza en macrófagos de huéspedes vertebrados (Toalombo-Espin y Coque-Procel, 2021).

### **4.2. Ciclo de vida del parásito**

El ciclo de vida empieza cuando la mosca hembra, toma sangre para alimentarse e ingiere macrófagos con amastigotes presentes en la piel de un hospedero previamente infectado que puede ser de un humano u otro mamífero, roedor o un cánido. La transformación de amastigote a promastigote ocurre dentro de las 24 a 48 horas en el interior del insecto vector, éste se replica en el intestino y migra a la faringe y al esófago. La mosca infectada pica a un nuevo hospedero e inocula entre 10 a 100 promastigotes, que viven en el interior de los macrófagos y de las células dendríticas del hospedero, que son dos tipos de células especializadas del sistema inmune, en donde se transforma en amastigotes y nuevamente se repite el ciclo (Sánchez et al., 2018).

### **4.3. Leishmania Visceral**

Se denomina visceral o Kalazar, también identificada como “fiebre negra”, es la más agresiva y la menos frecuente, cerca del 90% de los casos ocurren en Bangladesh, Nepal, India, Sudán y Brasil (Ching Chacón et al., 2022).

Existen seis especies como agentes de LV, las más importantes pertenecen al complejo *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) chagasi*, estas dos últimas indistinguibles entre sí. Se han descrito casos de LV causadas por *L. (L.) trópica* en el Viejo Mundo; *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) amazonensis* en el Nuevo Mundo. *L. (L.) donovani* es el agente más importante en Asia y África, y *L. (L.) infantum* predomina en el Mediterráneo europeo, en tanto que *L. (L.) chagasi* en las Américas (Ching Chacón et al., 2022).

#### **4.3.1. Patología y patogenia**

En la LV, los parásitos se localizan en los macrófagos de los órganos principales del hígado, bazo, ganglios linfáticos y médula ósea, generando hipergammaglobulinemia, hiperpigmentación melánica, pancitopenia con anemia, neutropenia, trombocitopenia asociada a la esplenomegalia, alteraciones de la función hepática, hiperbilirrubinemia e hipoalbuminemia (Botero y Restrepo, 2012).

#### **4.3.2. Sintomatología**

Presenta dos estadios de infección, sintomática y asintomática; en la primera, la *L. infantum* es frecuente en niños, en pacientes con sida y otras inmunodeficiencias, el cuadro clínico es de gravedad; pues, se presenta de semanas a meses, provocando hepatoesplenomegalia, pancitopenia, visceromegalia. En pacientes asintomáticos, no se presenta visceromegalia; sin embargo, se considera positiva (Aronson et al., 2020).

#### **4.3.3. Diagnóstico**

Se confirma por observación microscópica del parásito, mediante tinción de Wright, Giemsa y hematoxilina-eosina; otros métodos que fortalecen al diagnóstico, es la búsqueda de formas de amastigotes en el sistema retículo-endotelial, núcleo y cinetoplasto; una vez identificado el parásito se cultiva en medios enriquecidos; medio NNN y *Drosophila Schneider*, se deja actuar, y pasado los 6 días se observa al microscopio formas flageladas de promastigotes móviles; además, se puede identificar al parásito mediante pruebas sensibles; Prueba de ELISA, detecta antígenos en la orina empleando la proteína recombinante rk39, hemaglutinación indirecta, entre otras (Botero y Restrepo, 2012; Ching Chacón et al., 2022).

#### **4.4. Leishmaniasis tegumentaria americana (LTA)**

La LTA, es conocida desde la época precolombina con lesiones cutáneas y mucosas; con tres formas clínicas: cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. En el año 2020 se registra 1,5 millones de casos presentes en 88 países, ocupando el sexto lugar del mundo y el segundo en enfermedades parasitarias; el grupo etario vulnerable se presenta en adultos jóvenes de 20 a 59 años del género masculino; quienes, prefieren el tratamiento médico farmacológico del servicio público (Abdel et al., 2020).

##### **4.4.1. Patología y patogenia**

Presenta reacción inflamatoria en el tejido conectivo formando una pápula, provoca necrosis y úlcera dérmica; presenta núcleo y cinetoplasto distinta de otros parásitos. En la dermis presenta lesión ulcerativa y cordón epitelial; en la mucosa muestra reacciones infiltrativas y ulcerativas; mientras que en la difusa hay ausencia de necrosis, granulomas permitiendo que los parásitos se reproduzcan en los macrófagos (Arenas y Guzmán, 2019; Botero y Restrepo, 2012).

##### **4.4.2. Sintomatología**

La LTA presenta manifestaciones clínicas en piel y mucosas, por lo que dependerá de caracteres biológicos de especie y subespecie de *leishmania*; así mismo, del comportamiento del vector y hospedero (Arenas y Guzmán, 2019).

#### **4.5. Leishmania difusa**

Es una infección crónica asintomática sin úlceras, con engrosamiento cutáneo, pápulas y nódulos presentes en la cara y extremidades; sin embargo, su aparición no es común (Rabes et al., 2019).

##### **4.5.1. Diagnóstico**

Actualmente el diagnóstico depende de la clínica y de los nuevos avances tecnológicos de la ciencia médica para tratar al paciente (Nava et al., 2021).

Cuando hay sospecha de leishmaniasis, el paciente presentará una serie de características clínicas o epidemiológicas, que se detectarán mediante pruebas que ayudan al diagnóstico; con métodos directos como el frotis o extendido en donde se considera positivo cuando se encuentra uno o más amastigotes y negativo cuando carece de amastigotes, después de haber recorrido un mínimo de 100 campos, por tal motivo se repite la prueba para confirmar el diagnóstico y si el resultado es negativo se realiza biopsia (OMS, 2022).

Otro método es el cultivo *in vitro*, así como, medio bifásico NNN, Schneider *Drosophila*, los cuales resultan más efectivos (Abadías-Granado et al., 2021).

En métodos indirectos, se realiza la prueba de Montenegro, evalúa la exposición o el contacto previo con el parásito, pero no permite identificar si se trata de una infección pasada o actual; la prueba serológica IFI y ELISA, tiene un uso limitado, en pacientes inmune-suprimidos, el resultado puede ser no reactivo (OPS, 2019).

## **4.6. Factores de riesgo**

### **4.6.1. Condiciones socioeconómicas**

La leishmaniasis afecta a poblaciones vulnerables, está asociada a malas condiciones y falta de saneamiento de vivienda (alcantarillado expuesto, gestión de residuos) que pueden dar origen al desarrollo de flebótomos que afectan a la población humana o aglomeraciones (Cardona-Arias et al., 2017; López et al., 2015).

#### **4.6.1. Malnutrición**

La mala alimentación, falta de proteínas, hierro, vitamina A y zinc incrementan el riesgo frente a infecciones de Kalazar; asimismo patógenos, infecciones asintomáticas e incluso enfermedades graves (Nweze et al., 2020).

#### **4.6.2. Movilidad de la población**

Factor que permite que los microorganismos se adapten a cambios ambientales e intervengan en el diagnóstico y tratamiento patológico; así mismo, epidemias, desplazamiento de personas no inmunizadas a lugares previamente expuestos; es decir, buscan zonas en donde habita el flebótomo, lo que da lugar a un aumento acelerado de contagios (Azim et al., 2021; OPS, 2019).

#### **4.6.3. Cambios ambientales**

Los cambios de ambiente, la urbanización y las aglomeraciones influyen en la incidencia de *Leishmaniasis*.

#### **4.6.4. Cambio climático**

Es un factor energético de leishmaniasis, dado que perjudica a diferentes aspectos epidemiológicos, tales como cambio de temperatura, precipitación y humedad. La variación de temperatura puede afectar a insectos (flebótomos) y a promastigotes de leishmania que se transmite a zonas donde la enfermedad no era endémica (OMS, 2022).

#### **4.7. Actividad leishmanicida de plantas medicinales**

Los antimoniales pentavalentes, fármacos de primera línea en leishmania fueron desarrollados hace más de 70 años y ya no son efectivos debido a la fármaco-resistencia que ha formado el parásito, además se presenta en elevados costos y en ocasiones el paciente no tiene acceso a los sistemas de salud; no pueden usarse en personas que padecen, tuberculosis, insuficiencia renal, hepática o cardíaca. La administración del medicamento es por vía parenteral, provoca severos efectos secundarios en el tratamiento, como reacciones de hipersensibilidad, cefaleas, dolor abdominal, fiebre, mialgias y otras más graves son las alteraciones electrocardiográficas, elevación de las transaminasas, pancreatitis y neuropatía periférica (Orozco-Martínez et al., 2020).

Los avances investigativos en medicamentos para tratar enfermedades parasitarias como leishmaniasis han sido escasos, debido a que estos padecimientos se presentan en países en vías de desarrollo y a las industrias farmacéuticas no les produce ganancias porque tienen que desarrollar medicamentos de bajos costos para que sea accesible a la población de condición socioeconómica baja, una opción para los fármacos sintéticos es la búsqueda de moléculas activas en fuentes naturales como las plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de la leishmaniasis, por su uso ancestral y su contenido de compuestos (Orozco-Martínez et al., 2020).

Peraza-Sánchez, describe la evaluación *in vitro* de los extractos metanólicos de 18 plantas medicinales, en las que incluye la plumbagina, naftoquinona aislada de *Plumbago scandens L.*, que resultó activo contra promastigotes y amastigotes intracelulares de varias cepas de leishmania, retardando el desarrollo de *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*, obteniendo mejor resultado que el tratado con Glucantime® (fármaco de referencia); además, se realizaron experimentos con otras especies de leishmania en la que tuvo efecto citotóxico (Orozco-Martínez et al., 2020).

##### **4.7.1. Género *Plumbago***

Es una especie silvestre, conocida como celestina o jazmín azul de la familia *Plumbaginaceae*, constituido por más o menos 20 especies de arbustos y herbáceas perennes originarias de regiones con clima templado y tropical. El nombre genérico, establecido por Linneo, deriva del vocablo latino plumbum (plomo), lo que indica que proviene de especies no definidas, a las que se utilizaba para remedios efectivos contra envenenamientos producidos por el metal; mientras que, el epíteto específico de la planta deriva del latín *Scando*, trepar, por su hábito trepador (Chávez-Salazar, 2019).

#### 4.7.2. Clasificación botánica

- **Reino:** *Plantae*
- **División:** *Magnoliophyta*
- **Clase:** *Magnoliophyta*
- **Orden:** *Plumbaginales*
- **Familia:** *Plumbaginaceae*
- **Género:** *Plumbago* (Chávez-Salazar, 2019).

#### 4.7.3. Características generales

El género *Plumbago* de la familia *Plumbaginaceae*, cuenta con 20 especies fanerógamas nativas de regiones con clima cálido-tropical; incluye herbáceas y arbustos; flores blancas prolongadas que se abren en una corola formada por 5 pétalos. En Ecuador se distribuyen por: Galápagos, Guayaquil, Tungurahua, Loja, Palanda, Catacocha, Zamora, Manabí y Esmeraldas (Abbas et al., 2021).

#### 4.7.4. *Plumbago scandens* L.

Planta medicinal con grandes cantidades de plumbagina, de la familia *Plumbaginaceae*, posee 12 géneros, de 400 a 500 especies.

- a) **Nombre científico:** *Plumbago scandens* L.
- b) **Sinonimia:** *P. zeylanica*
- c) **Sinonimia popular:** cola de iguana, hierba de pescado, hierba de la culebra, hierba del alacrán,
- d) **Botánica y ecología:** planta sub-arbustiva, de 1 a 3m de altura, trepadora cuando posee soporte; hojas más anchas que largas; flores en ramilletes, cambian de color blanco a rojas cuando se secan, tienen una apariencia de trompetitas prolongadas. Planta originaria de indias occidentales, se adapta en climas cálido-tropical del mundo, crece a orillas de caminos y en bosque tropical caducifolio (pérdida de hojas) y matorral xerófilo (semidesierto) (Astudillo-Sánchez et al., 2019).
- e) **Etnobotánica y antropología:** se aplica para tratar verrugas, dolor de articulaciones, heridas, picaduras y raspaduras. Las partes de la planta se puede utilizar como cremas, pastas, extractos e infusiones (Orozco-Martínez et al., 2020).



f) **Composición Química:** contiene grasa sólida, aceite esencial, cera vegetal, resina ácida soluble en éter, glucosa, hidratos de carbono y clorofila (Orozco-Martínez et al., 2020).

#### 4.8. Quinonas y naftoquinonas

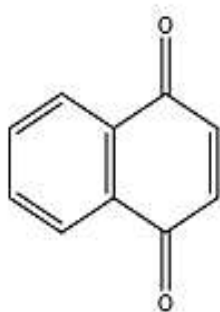
Las quinonas son compuestos presentes en la naturaleza, se forman de compuestos aromáticos, posee propiedades químicas que permiten interactuar mediante la formación de enlaces covalentes, transfiriendo electrones en reacción oxido-reducción; resultando una estructura cíclica diona conjugada con características altamente tóxicas (Gómez et al., 2021).

Dentro de las quinonas están las naftoquinonas, que forman parte de los metabolitos secundarios, se encuentran en los vegetales como pigmentos glicosilados, almacenados en las vacuolas de las plantas (Gómez et al., 2021).

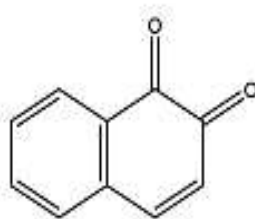
Las naftoquinona contiene propiedades de óxido-reducción y ácido-base, además de una amplia gama de actividad biológica ya que se han utilizado como antifúngicos, antimaláricos, antiparasitarios, entre otros (Gómez et al., 2021).

La estructura 1,4-naftoquinonas, al igual que las quinonas, poseen una alta reactividad de grupos carbonilos, por lo que facilita reacciones tipo redox en las que acepta electrones que son conocidas por alterar la función mitocondrial y la inhibición respiratoria mediante la intervención del complejo citocromo bc1; tiene como característica estructural 2 grupos carbonilos en la posición 1-4 y en menor frecuencia en 1-2 o 1-3 en el anillo del naftaleno (figura N°1); sin embargo, la naturaleza tiene grupos hidroxilo o metilo como sustitución (Gómez et al., 2021).

**Figura N°1.** Estructura de naftoquinonas



**1,4- naftoquinona**



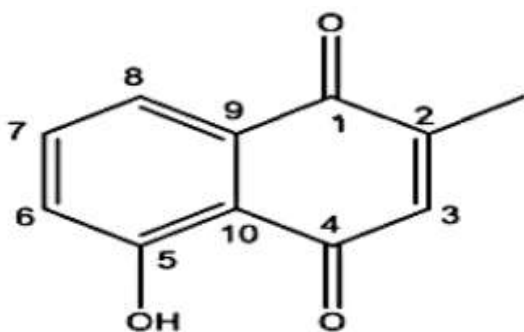
**1,2-naftoquinona**

(Gómez et al., 2021)

Dentro de la familia de las quinonas están las naftoquinona; las cuales, han demostrado ser importantes en antimaláricos, anticancerígenos y antifúngicos, pues han sido parte de distintos experimentos; sin embargo, la quinona puede actuar como electrófilo y dar reacción con diferentes blancos biológicos en varias especies de mamíferos e incluso a humanos (Gómez et al., 2021).

## 4.9. Plumbagina

Figura N° 2. Estructura química de plumbagina



(Gómez et al., 2021)

Su estructura, 2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona; se encuentra en hojas, corteza y raíces de especies de género *Plumbago*, *Drosera* y *Diopyros*; la planta establece una antimutagenicidad, principalmente en pacientes que padecen líneas celulares con cáncer, *in vivo* e *in vitro*; así como, leucemia, cáncer de próstata, seno, ovario, entre otros (Gómez et al., 2021).

## 4.10. Técnicas de evaluación de actividad citotóxica

### 4.10.1. Técnica de Resazurina

Compuesto azul no fluorescente, que se reduce a un colorante rojo fluorescente llamado resofurina, gracias a la transferencia electrónica mediada por enzimas mitocondriales. Permite cuantificar las células vivas de una muestra y controlar la citotoxicidad celular. La detección de esta reacción se realiza empleando un lector de fluorescencia, con una longitud de onda de excitación de 530 a 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. La reducción de la resazurina se correlaciona con el número de organismos vivos con actividad metabólica. Es un ensayo rápido, confiable, sensible, seguro y económico (Saenz-Muñoz, 2021).

### 4.10.2. Técnica de XTT

Es una prueba sensible, similar al ensayo del MTT, sin embargo, no es necesario disolverlo por ser una prueba directa y accesible. Es una sal inicialmente amarilla que al reducirse se transforma en formazán insoluble en agua y no es tóxico por sí mismo. El formazán es proporcional a la biomasa de bacterias vivas; además, detecta la supervivencia y citotoxicidad por presencia o ausencia de enzimas mitocondriales que disminuyen las sales de tetrazolium a compuestos de formazán, las mismas que dejan de generarse cuando las células mueren. Esta variación colorimétrica se mide en un lector de absorbancia, a longitud de onda de 450nm y una longitud de onda de referencia de 630nm. Los resultados mejoran cuando se tiene un aceptor intermedio de electrones, como el PMS (Bonilla et al., 2019).

#### 4.10.3. Técnica de MTT

La actividad citotóxica del aceite esencial de *P.scandens* L., se realiza por medio del MTT, ensayo colorimétrico que al reducirse el compuesto cambia de color, de amarillo a azul-violeta o formazán, mediante la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (Constante-Catuto, 2020).

Compuesto que experimenta un cambio de coloración, de amarillo (familia de sales de tetrazolio) y al reducirse el MTT se convierte en un compuesto de la familia de formazanos, de color azul-violeta e insoluble al agua, para así diferenciar la funcionalidad mitocondrial de células tratadas (Constante-Catuto, 2020).

La conversión del MTT solo se realiza en células vivas; pues este, compuesto se ha establecido para medir la supervivencia y proliferación celular ya que la cantidad resultante de formazán es proporcional al número de células vivas y para cuantificarlo se lo disuelve en solvente orgánico como el SDS, utilizado para disolver cristales de formazán dadas por la reducción del MTT. La determinación del porcentaje de inhibición, se realiza luego de realizar el ensayo y de leer las absorbancias a una longitud de onda de 570 nm (Acosta-Torres y Rodríguez-Torres, 2019).

Para el cálculo del porcentaje de inhibición, se toma en cuenta las absorbancias problema (**Ap**), blancos (**Ab**) y controles (**Ac**) del ensayo, mediante la siguiente fórmula:

$$\%AP = 100 - \left[ \frac{Ap - Ab}{Ac - Ab} \right] * 100$$

## 5. Metodología

### 5.1. Tipo de estudio

El presente Trabajo de Integración Curricular, tuvo un enfoque cuantitativo y experimental.

### 5.2. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio del Centro de Diagnóstico Médico de la Facultad de la Salud Humana, perteneciente a la Universidad Nacional de Loja, ubicada en la Av. Manuel Ignacio Monteros, tras el Hospital Isidro Ayora, Loja.

### 5.3. Universo

El presente estudio se trabajó con cultivos de *Leishmania naiffi*, en medio bifásico NNN.

### 5.4. Muestra

Estuvo constituida por muestras de promastigotes de *Leishmania naiffi*.

### 5.5. Criterios de inclusión

- Promastigotes de *Leishmania naiffi*, en fase logarítmica de reproducción
- Promastigotes cultivados *in-vitro* viables y sin contaminación microbiológica

### 5.6. Criterios de exclusión

- Cultivos en los cuales existan cambios morfológicos en el promastigote
- Cultivos con promastigotes muertos

### 5.7. Equipos y Materiales

#### 5.7.1. Fase Pre-Analítica

Solicitud de permiso del laboratorio (ver anexo 1)

## Materia prima

### Colecta de la planta

*P. scandens* L, se recolectó en julio del 2022 en el cantón Palanda, provincia de Zamora Chinchipe (Ecuador), a 119,7 Km de la ciudad de Loja (4°38'59''S 79°07'56''O). Se recolectó partes aéreas: tallos y hojas para su proceso; se preservó una muestra para su identificación en el Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja por el taxónomo Nelson Jaramillo Díaz, quien logró identificar que se trataba de *P. scandens* L. por sus notables características; el espécimen botánico se registra en el herbario con número de colección N°01EC2022.

- **Parásitos**

### Promastigotes de *Leishmania naiffi*

La cepa de *L. naiffi*, fue otorgada por el Instituto Oswaldo Cruz, con el código 10CL2021, actualmente se encuentra en el Centro de Diagnóstico Médico, conservada en medio NNN (Ver anexo 2).

Se utilizó el medio Schneider Drosophila (Gibco®-Lot# Rnbk7605), como suplemento para el medio NNN, convirtiéndolo en medio bifásico (Ver anexo 3).

#### **Obtención del aceite esencial (AE) de *Plumbago scandens* L.**

El AE de *P. scandens* L., se obtuvo mediante arrastre de vapor con las partes aéreas de la planta (tallos y hojas). La purificación del AE, se realizó por columna, utilizando como eluyente una mezcla de hexano C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>: acetato de etilo 80/20 ml. La purificación por cromatografía en columna con silicagel 60 (0,063-0,200 mm, Merck ®) y como eluyente una mezcla de hexano con aceite, máxima recuperación de 30°C y 0°C de refrigerante (ver anexo 4).

Para realizar el ensayo de actividad citotóxica, se preparó ocho concentraciones de AE, disuelto en acetona; partiendo de 120 µg/ml hasta 0,9 µg/ml con diluciones de 1:2, hasta 1:256.

#### **5.7.2. Fase analítica**

##### **Preparación de la suspensión de parásitos para el ensayo en medio Drosophila**

Para el cultivo axénico de promastigotes de *L. naiffi* se utilizó el medio Schneider Drosophila, suplementado con suero SFB inactivado al 20%, gentamicina 200 µg/ml y 2% de orina estéril de hombre adulto, se incubó a 28°C y al cuarto día se utilizó para el ensayo del MTT (Ver anexo 10).

##### **Cuantificación de parásitos en cámara de Neubauer**

El recuento de promastigotes de *L. naiffi*, crecimiento en fase logarítmica  $4 \times 10^4$  promastigotes/ml, se realizó antes de iniciar el ensayo de actividad citotóxica, permitiendo verificar el crecimiento y el número de parásitos adecuados para realizar el ensayo (Ver anexo 5)

##### **Preparación de solución, solvente y fármaco de referencia AmB**

Solución PBS a un pH de 7,2- 7,6; disuelve la solución del MTT (Ver anexo 6).

Dodecilsulfato sódico o SDS, disuelve cristales de formazán (Ver anexo 8)

AmB (Fármaco de referencia y control positivo), 8 diluciones seriadas de 1:2 (2µg/ml) hasta la dilución de 1:256 (0,01µg/ml) (Ver anexo 9).

##### **Ensayo de actividad antiparasitaria**

Se realizó la preparación del medio de cultivo de parásitos en masa (inóculo de  $4 \times 10^4$  promastigotes/ml), se dejó actuar durante cuatro días de crecimiento llegando a un volumen final de 13 ml de la suspensión (Ver anexo 5).

Mediante la lectura de la placa de 96 pocillos a una longitud de onda de 570 nm, en el espectrofotómetro EPOCH2 (Biotek), se obtuvo las absorbancias por la reacción metabólica del MTT (Ver anexo 14).

### **5.7.3. Fase Post-Analítica**

Se calculó el % de inhibición, de acuerdo con la fórmula descrita realizando cálculos de la inhibición parasitaria, con las absorbancias problema ( $A_p$ ), blancos ( $A_b$ ) y controles ( $A_c$ ) (Ver anexo 12 y 13).

Según la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[ \frac{[A_p - A_b]}{A_c - A_b} 100 \right]$$

### **5.7.4. Fuentes de información**

El presente Trabajo de Integración Curricular obtuvo fuentes de información de documentos tales como: libros, revistas científicas, documentos de instituciones públicas y privadas, informes técnicos, manuales, entre otros.

## 6. Resultados

Resultado del ensayo de la actividad citotóxica del aceite esencial de *P. scandens* L.

**Tabla 1.**

Resultado del porcentaje de inhibición de parásitos.

<i>Actividad citotóxica del aceite esencial de P. scandens L. en L. naiffi expresada como porcentaje de inhibición.</i>								
	% inhibición del crecimiento de parásitos							
Diluciones seriadas	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
	(1:2)	(1:4)	(1:8)	(1:16)	(1:32)	(1:64)	(1:128)	(1:256)
Concentraciones µg/ml	120	60	30	15	7,5	3,75	1,87	0,9
Absorbancias	0,39	0,43	0,44	0,45	0,48	0,54	0,66	0,69
Porcentaje de inhibición (%)	77,99	72,90	71,35	68,95	65,61	56,14	38,71	34,48

### Interpretación

Se prepararon ocho diluciones seriadas con factor de dilución 1:2. En la tabla 1, se presenta cada dilución con su respectiva concentración, absorbancias y porcentaje de inhibición.

En la concentración de 120 µg/ml muestra el porcentaje de inhibición más efectivo del aceite de 77,99% y en la concentración de 0,9 µg/ml muestra el menor porcentaje de inhibición de 34,48%; obsérvese que, a menor absorbancia, mayor porcentaje de inhibición y a mayor absorbancia, menor porcentaje de inhibición; relación que se muestra en todas las concentraciones. La reacción del MTT, se basa en la intensidad de color o formazán cuando se expone a células viables, puesto que, a menor color, mayor porcentaje de inhibición y a mayor color, menor porcentaje de inhibición (Ver anexo 19, Ilustración 5).

Para demostrar que los porcentajes de inhibición corresponden a los resultados otorgados por la lectura en el espectrofotómetro de 570 nm de onda, se observó al microscopio las ocho concentraciones del aceite esencial y de la anfotericina B. (Ver tabla 2 y 3).

**Tabla 2.**

Resultado del porcentaje de inhibición del AE de *P.scandens* L.

**Actividad citotóxica del aceite esencial de *P. scandens* L. en *L. naiiffi* expresada como porcentaje de inhibición.**

Concentraciones $\mu\text{g/ml}$	Microscopía							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	120	60	30	15	7,5	3,75	1,87	0,9
Porcentaje de inhibición%	77,99	72,90	71,35	68,95	65,61	56,14	38,71	34,48
PV	-	-	-	+	+	+	++	++
Microscopia PM	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	++

**Nota:** PV, promastigotes vivos; PM, promastigotes muertos; -, <10 p/c(parásitos por campo); +, 10-20 p/c; ++,20-40 p/c; +++,40-60 p/c; +++++,>60 p/c

### Interpretación

Para confirmar las lecturas proporcionadas por el espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm, se observó en el microscopio la placa de 96 pocillos antes y después del ensayo para control de calidad (sin contaminación) y demostrar que los porcentajes de inhibición corresponden a cada una de las ocho concentraciones; mientras que, en los promastigotes vivos se consideró el movimiento flagelar (Ver anexo 11).

En las concentraciones más altas y efectivas del aceite de 120  $\mu\text{g/ml}$ , 60  $\mu\text{g/ml}$  y 30  $\mu\text{g/ml}$ , no se observó movimiento flagelar del promastigote. A partir de la concentración de 15  $\mu\text{g/ml}$ ; 7,5  $\mu\text{g/ml}$  y 3,75  $\mu\text{g/ml}$ , se observó movimiento flagelar lento y sin desplazamiento. En la concentración de 1,87  $\mu\text{g/ml}$  y 0,9  $\mu\text{g/ml}$ , se observó movimiento flagelar progresivo lento; obsérvese que, el reporte de la presente tabla, está dada por la observación en el microscopio y el movimiento flagelar de los parásitos observados por cada concentración.



**Tabla 3.**

Resultado del porcentaje de inhibición de la AmB.

<i>Actividad del fármaco de referencia Anfotericina B (AmB) y control positivo, expresada como porcentaje de inhibición.</i>								
Concentraciones $\mu\text{g/ml}$	Microscopía							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,01
<b>Absorbancias</b>	0,680	0,694	0,708	0,716	0,749	0,762	0,764	0,758
<b>Porcentaje de inhibición%</b>	45,28	42,88	40,49	39,17	33,47	31,18	30,84	31,87
<b>Microscopia</b>	<b>PV</b>	++	++	++	++	++	++	++
	<b>PM</b>	++	++	++	++	++	++	++

**Nota:** PV, promastigotes vivos; PM, promastigotes muertos; ++, 20-40 p/c (parásitos por campo)

### Interpretación

Se prepararon ocho diluciones seriadas con factor de dilución 1:2. En la tabla 3, se presentan las ocho concentraciones de la AmB, con sus respectivas absorbancias, porcentajes de inhibición y reporte obtenido de la observación microscópica.

En la concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$  y 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , muestran porcentaje de inhibición más efectivo del fármaco de 45,28%, 42,88%, y 40,49%; obsérvese que, a menor absorbancia, mayor porcentaje de inhibición y a mayor absorbancia, menor porcentaje de inhibición; relación que se muestra hasta la concentración de 0,03  $\mu\text{g/ml}$ .

En la concentración de 0,01  $\mu\text{g/ml}$ , muestra un porcentaje de inhibición de 31,87%, con absorbancia mayor a la esperada, esto debido a que la AmB es un fármaco fotosensible por lo que los valores no representan una línea de tendencia (Ver gráfico 2).

Además, se observó en el microscopio las ocho concentraciones de la AmB, antes y después del ensayo para control de calidad (sin contaminación) y demostrar que los porcentajes de inhibición sean menores al 50%; se consideró el movimiento flagelar de los promastigotes vivos. Se reportó en todas las concentraciones, lo siguiente: parásitos muertos de 20 a 40 parásitos por campo, y parásitos vivos de 20 a 40 parásitos por campo, con movimiento flagelar progresivo lento (Ver anexo 11).

## 7. Discusión

En salud pública, la leishmaniasis representa una problemática con dos a tres millones de personas afectadas anualmente. En Ecuador, constituye una tasa nacional de 6000 casos por cada cien mil habitantes, afectando a 22 de las 24 provincias y últimamente a la provincia de Loja (MSP, 2022).

En los últimos años se ha demostrado que las plantas poseen metabolitos secundarios con actividad leishmanicida, entre los cuales se menciona a *P.scandens* L, especie que contiene quinonas y plumbagina, compuesto citotóxico con actividad antiparasitaria contra *Leishmania* por la inhibición de la enzima tripanotona reductasa (Tryr) (García et al., 2017).

Los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Integración Curricular, son únicos, pues, se ha realizado búsqueda bibliográfica de diferentes fuentes de información digitales tales como libros, revistas científicas, documentos de instituciones públicas y privadas, informes técnicos, manuales; entre otros; que fueron publicados en idioma español, inglés y portugués, ingresando palabras claves, tales como: *Leishmania naiffi*, aceite esencial, citotoxicidad, *Plumbago scandens* L, ensayo del MTT, actividad leishmanicida. Es importante mencionar que, mediante la búsqueda bibliográfica antes mencionada, no hay evidencias relacionadas específicamente a la citotoxicidad del aceite de *P. scandens* L. en *Leishmania naiffi*. Únicamente, se encontró evidencia en documentos que muestran actividad antiparasitaria con especies diferentes de *Leishmania*, utilizando aceites esenciales, extracto etanólicos, entre otros, los mismos que fueron obtenidos de raíces, tallos, hojas, flores y frutos; sin embargo, coinciden en el uso de los metabolitos secundarios de la planta (Domínguez et al., 2023).

La plumbagina, naftoquinona aislada de especies del género *Plumbago* en forma de extracto, reportó actividad ( $IC_{50}$ ) en concentraciones 0,42 y de 1,1  $\mu\text{g/ml}$  contra amastigotes de *L. donovani* y *L.amazonensis*. Estudio *in vivo* mostró que la plumbagina resultó activa contra amastigotes de *L. amazonensis* y promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* mostrando valores de  $CI_{90} = 5 \mu\text{g/ml}$ . La plumbagina es conocida por demostrar acción contra leishmania mediante la inhibición de la enzima tripanotona reductasa (tryr), enzima esencial para la supervivencia del parásito cuando este presenta estrés oxidativo. El extracto etanólico de hojas y tallos de *P.scandens*. L (*Plumbaginaceae*) inhibió el crecimiento en promastigotes de *L.amazonensis* en un 88% a 100  $\mu\text{g/ml}$ , a la misma concentración el crecimiento

de amastigotes fue inhibida en un 61% (Chan, 2018; González et al., 2012; Jiménez et al., 2014; Paiva et al., 2003).

Según (Puchaicela y Morocho, 2018); el AE de *Plumbago scandens* L. extraído de las partes aéreas (tallos y hojas) de la planta, obtuvo efecto leishmanicida sobre promastigotes de *L. major like*, en las concentraciones de 120 µg/ml y 60 µg/ml con porcentaje de inhibición de 80,7% y 85,1%.

En virtud que una buena cantidad de estudios utilizan extractos, forma concentrada de la planta; podríamos inferir que dentro de estas propiedades hay cantidades de ácidos grasos (aceite esencial) con actividad leishmanicida, lo que validaría el presente Trabajo de Integración Curricular. Además, confirma que las plantas poseen sustancias y metabolitos secundarios que pueden actuar sobre leishmaniasis. Esta especie herbaria podría servir para síntesis de nuevos fármacos como alternativa para el tratamiento de esta enfermedad, o en la elaboración de cremas, pastas, extractos e infusiones para su uso; así mismo, para futuras investigaciones que aporten a la ciencia, y que permitan con formas accesibles y efectivas ayudar a la sociedad. Ante lo enunciado, el presente Trabajo de Integración Curricular es una innovación dentro del campo científico.

En medicina tradicional, el uso de plantas medicinales constituye una fuente importante para el desarrollo de nuevos fármacos contra la leishmaniasis, por lo que existen razones que justifican el interés de los países en vías de desarrollo en usar productos derivados de las plantas; debido a que los medicamentos o fármacos de primera línea no son efectivos por la fármaco-resistencia que ha desarrollado el parásito. Los costos son elevados y en ocasiones el paciente no tiene acceso a los sistemas de salud, no pueden usarse en personas que padecen tuberculosis, insuficiencia renal, hepática o cardíaca. La administración del medicamento es por vía parenteral provoca severos efectos secundarios en el tratamiento, generando reacciones de hipersensibilidad, cefaleas, dolor abdominal, fiebre, mialgias y otras más graves son las alteraciones electrocardiográficas, elevación de las transaminasas, pancreatitis y neuropatía periférica. La mayoría de pacientes afectados no tienen acceso a los medicamentos recomendados por lo que necesitan medicina tradicional y natural para aliviar los síntomas de las enfermedades que los azotan. Sin embargo, se necesita que estas plantas sean evaluadas para asegurar la efectividad y seguridad de las mismas (Monzote, 2010).

## 8. Conclusiones

- Se redactó los protocolos correspondientes para realizar la evaluación de la actividad citotóxica en especies de leishmania (Ver anexo10).
- Según la metodología aplicada en el presente Trabajo de Integración Curricular, los resultados sugieren que la planta *P. scandens* L. en forma de aceite esencial, tiene actividad citotóxica en promastigotes de *L. naiffi*, más efectivo en la concentración de 120 µg/ml con porcentaje de inhibición de 77,99%, y menos efectivo en la concentración de 0,9 µg/ml con porcentaje de inhibición de 34,48%; misma relación obtenida en la observación microscópica. Ante el comportamiento de la AmB, resultó ser llamativo debido a que es un fármaco fotosensible y los valores no representan una línea de tendencia; sin embargo, los resultados mostraron una eliminación de parásitos menor al 50%, misma relación obtenida en la observación microscópica.
- Se realizó la difusión de resultados del Trabajo de Integración Curricular a los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico (Ver anexo 16 y 18).

## 9. Recomendaciones

- Al realizar el ensayo, en la repartición de medios de los 96 pocillos, se recomienda dejar una fila de pocillos vacíos entre el AE de cuatro repeticiones y el fármaco de referencia AmB de tres repeticiones, lo que ayudará a evitar contaminación entre medios.
- Para evitar contaminación en el medio NNN, se recomienda utilizar de manera alternada los antibióticos de gentamicina y estreptomina con penicilina.
- Antes de realizar el ensayo, se recomienda tener en cuenta el espectrofotómetro con la longitud de onda establecida, generalmente a 570 nm y verificar a que otra longitud de onda se puede cuantificar la solución del MTT para realizar el ensayo.
- Al realizar la práctica de purificación del AE, en donde se manipula hexano, sustancia volátil altamente inflamable que afecta a la salud; se recomienda implementar en todo momento medidas de bioseguridad, tales como uso de mascarilla de gases, utilización de cámara extractor de gases, además, de procurar que los espacios sean ventilados.

## 10. Bibliografía

- Abadías-Granado, I., Diago, A., Cerro, P. A., Palma-Ruíz, A. M., & Gilaberte, Y. (2021). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 112(7), 601–618. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2021.02.008>
- Abbas, R. Z., Abbas, A., Raza, M. A., Mahmood, M. S., Imran, M., Khan, M. K., Rafay, M., & Hussain, K. (2021). Potencial terapéutico de plantas medicinales contra la Leishmaniasis: Un problema de salud pública. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 20(2), 123–131. <https://doi.org/10.37360/BLACPMA.21.20.2.10>
- Abdel, K., Hernández, D., Hidalgo, O., Hidalgo, S., Lorenzo, C., Hung, F., & Bastidas, G. A. (2020). Características clínicas-epidemiológicas y conocimiento sobre la leishmaniasis tegumentaria americana en una población de Carabobo. Venezuela. *Revista Peruana de Investigación En Salud*, 4(1), 09–16. <https://doi.org/10.35839/REPIS.4.1.478>
- Abdellahi, L., Irají, F., Mahmoudabadi, A., & Hejazi, S. H. (2022, January 1). Vaccination in Leishmaniasis: A Review Article. *Iranian Biomedical Journal*, 26(1), 1–35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34952558/>
- Arenas, R., Guzmán, R., Botero, D., & Restrepo, M. (2019). Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento, 7e. In *McGraw Hill Medical* (7th ed., pp. 315–335). <https://booksmedicos.org/parasitosis-humana-botero-5a-edicion/>
- Aronson, N., Herwaldt, B., Libman, M., Pearson, R., Lopez-Velez, R., Weina, P., Carvalho, E. M., Ephros, M., Jeronimo, S., & Magill, A. (2020, December 15). Diagnosis and Treatment of. *Clinical Infectious Diseases*, 63(12), E202–E264. <https://doi.org/10.1093/CID/CIW670>
- Astudillo-Sánchez, E., Pérez, J., Troccoli, L., & Aponte, H. (2019). Composition, structure and plant diversity of the Loma Alta Communal Ecological Reserve, Santa Elena, Ecuador. In *Revista Mexicana de Biodiversidad* (Vol. 90, Issue 3, pp. 1–23). Instituto de Biología, UNAM. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2871>
- Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Kobe, L., & Ruiz, J. (2019). Parasitología médica, 5e. In *McGraw Hill* (5e ed., Vol. 2, Issue Becker, I., Salaiza, N., Aguirre, M., Kobe, L., Ruiz, J. (2019). Leishmaniasis. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2754&sectionid=231293833>, p. 439). 2019.
- Bonilla, J. A., Mesón, M. G., & Cartín, W. (2019). Modificación de un método colorimétrico que

- usa XTT, Para La determinacion de linfoproliferación. 2020, 19–25.  
<https://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v14n1-2/art4.pdf>
- Botero, D., & Restrepo, M. (2012). Parasitosis humanas. In *Corporación para investigaciones Biológicas* (5th ed., pp. 315–335). <https://booksmedicos.org/parasitosis-humana-botero-5a-edicion/>
- Cardona-Arias, A., Patiño-Martinez, D., & López-Carvajal, L. (2017). Evaluaciones económicas en leishmaniasis cutánea: Revisión sistemática de literatura. *Scielo*, 1–4.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2011-21062017000200052](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-21062017000200052)
- Chan, M. (2018). Estudio del efecto de la variabilidad geográfica sobre la actividad leishmanicida en poblaciones de *Urechites andrieuxii* Muell. Arg existentes en la Península de Yucatán. In *Maestría en ciencias y biotecnología de plantas* (1st ed., pp. 13–14). 11 de diciembre 2018.  
[https://www.google.com/search?q=plumbagina+inhibicion+de+parasitos+leishmania&rlz=1C1CHBF\\_esEC1038EC1038&oq=plumbagina+inhibicion+de+parasitos+leishmania&aqs=chrome.69i59j33i160.11642j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8](https://www.google.com/search?q=plumbagina+inhibicion+de+parasitos+leishmania&rlz=1C1CHBF_esEC1038EC1038&oq=plumbagina+inhibicion+de+parasitos+leishmania&aqs=chrome.69i59j33i160.11642j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8)
- Chávez-Salazar, G. (2019). *Plumbago scandens* L. [Instituto de biología]. In *UNAM*.  
<https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:23504>
- Ching Chacón, A., Villalobos Romero, B., & Jiménez Vargas, M. F. (2022). Leishmaniasis: evaluación clínica y diagnóstico. *Revista Medica Sinergia*, 7(4), e781.  
<https://doi.org/10.31434/rms.v7i4.781>
- Constante-Catuto, C. (2020). Estandarización de un método *in vitro* para medir la viabilidad de bacterias patógenas de *Penaeus vannamei* adaptando el ensayo de reducción del MTT [Escuela superior politécnica del litoral]. In 2020.  
[http://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/2020/Publicaciones/tesis/20\\_20\\_Constante\\_Carla\\_proyecto\\_integrador.pdf](http://www.cenaim.espol.edu.ec/sites/cenaim.espol.edu.ec/files/2020/Publicaciones/tesis/20_20_Constante_Carla_proyecto_integrador.pdf)
- Dahal, P., Singh-Phulgenda, S., Maguire, B. J., Harriss, E., Ritmeijer, K., Alves, F., Guerin, P. J., & Olliaro, P. L. (2021). Visceral leishmaniasis in pregnancy and vertical transmission: A systematic literature review on the therapeutic orphans. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 15, Issue 8). Public Library of Science.  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0009650>
- Domínguez, M., Maldonado, M., Pinchevsky, C., Torres, T., Bravo, S., & Cobos, V. (2023). Evaluación clínica y manejo diagnóstico de la Leishmaniasis Cutánea . Presentación de caso

y revisión de la literatura Clinical evaluation and diagnostic management of Cutaneous Leishmaniasis . Case presentation and literature review . *Ciencia Latina Internacional*, 7(2), 4859–4874. [https://doi.org/https://doi.org/10.37811/cl\\_rcm.v7i2.5689](https://doi.org/https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i2.5689)

- Fraga, J., Montalvo, A., Der, G. Van, Jean-Claude, D., Requena, J., Deborggraeve, S., Buscher, P., & Ilse, M. (2021). Aportes a la evolución y clasificación taxonómica de los géneros de importancia médica de la familia Trypanosomatidae basado en el análisis filogenético del gen de la proteína de choque térmico 70. In *Scielo* (1st ed.). Departamento de Biología Molecular. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2304-01062021000100025](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-01062021000100025)
- García-contreras, R., & Acosta-torres, L. (2019). Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas. *2019, October*, 03-2018-082312291200–01. <https://doi.org/doi.org/10.1186/1743-8977-7-22>.
- García, M., Scull, R., Satyal, P., Setzer, W. N., & Monzote, L. (2017). Chemical Characterization, Antileishmanial Activity, and Cytotoxicity Effects of the Essential Oil from Leaves of *Pluchea carolinensis* (Jacq.) G. Don. (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, 31(9), 1419–1426. <https://doi.org/10.1002/ptr.5869>
- Gómez, A. R. Q., Brígido, H. P. C., Vale, V. V., Correa-Barbosa, J., Percário, S., & Dolabela, M. F. (2021). Antimalarial potential of quinones isolated from plants: an integrative review. *Research, Society and Development*, 10(2), 34. <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I2.12507>
- González, Ligas, L., Flores, N., López, L., & Bermúdez, L. (2012). Naftoquinonas : de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas*, 14(2), 48–56
- Hernández, S. (2020, April). *Estrategias de evasión y agresión que utilizan las leishmanias para sobrevivir y dañar al hospedador*. 16. [https://www.racve.es/files/2020/12/Santiago-Hernandez\\_Leishmaniasis.pdf](https://www.racve.es/files/2020/12/Santiago-Hernandez_Leishmaniasis.pdf)
- Hidalgo Solís, M. J., Viquez Redondo, K. F., & Barrantes Valverde, S. M. (2021). Leishmaniasis cutánea. *Revista Medica Sinergia*, 6(5), e674. <https://doi.org/10.31434/rms.v6i5.674>
- Horovitz, S. (2018). Extracción de aceites esenciales a través de arrastre con vapor; manual de laboratorio. In *2018* (p. 7). <https://quimicafacil.net/manual-de-laboratorio/extraccion-aceites-esenciales-arrastre-vapor/>
- Jiménez, M. A., Alamilla, L., & Gutiérrez, G. (2014). Mexican medicinal plants as source of active



compounds against leishmaniasis. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 45(2), 19–30.

- López, K., Tartaglino, C., Steinhorst, I., Santini, M., & Salomón, D. (2015). Factores de riesgo, representaciones y prácticas asociadas con la leishmaniasis visceral humana en un foco urbano emergente en Posadas, Argentina-Biomédica. *Biomedica*, 1–5.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2953>
- MSP. (2022). Subsecretaria de vigilancia de la salud pública dirección nacional de vigilancia epidemiológica enfermedades transmitidas por vectores. In *Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica* (p. 6). 2022. [https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/08/Vectores-SE\\_31.pdf](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2022/08/Vectores-SE_31.pdf)
- Nava, G., Tirado-Sánchez, A., Fernández-Figueroa, E. A., Sánchez-Montes, S., Becker, I., & Bonifaz, A. (2021, March 22). Efficacy of iniquimod 5% cream as first-line management in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54(23), 2021. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0305-2020>
- Nweze, J. A., Nweze, E. I., & Onoja, U. S. (2020). Nutrition, malnutrition, and leishmaniasis. In *Nutrition* (Vol. 73, p. 110712). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110712>
- OMS. (2022). *Leishmaniasis*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- OPS. (2019). Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis. *Elsevier*, 1, 54. <https://doi.org/10.37774/9789275320631>
- Orozco-Martínez, J., Lira-Saade, R., Jiménez-Estrada, M., Ávila-Acevedo, J. G., Serrano-Parrales, R., & Hernández-Delgado, T. (2020, March 30). Plantas medicinales de Oaxaca, México: Etnobotánica y actividad antibacteriana. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 19(2), 221–235. <https://doi.org/10.37360/BLACPMA.20.19.2.14>
- Paiva, S., Silva, S., Figueiredo, M., & Coelho, M. (2003). Plumbaginales: A pharmacological approach. *Floresta e Ambiente*, 10(1), 98–99.  
<https://www.floram.org/article/588e2203e710ab87018b45f6/pdf/floram-10-1-98.pdf>
- Puchaicela, J., & Morocho, L. (2018). *Actividad leishmanicida del aceite esencial de Plumbago scandens L. en promastigotes de Leishmania major like*.  
<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21017/1/TESIS%20JORGE%20PUCH>

AICELA.pdf

Rabes, R., Artigao-Baquero, F., & García, M. (2019, April). Leishmaniasis cutánea. *Scielo*, 12(46).  
[https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322010000300009](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322010000300009)

Saenz-Muñoz, B. (2021). *Evaluación del metabolismo de la Resazurina en función de la forma y tamaño de esferoides tumorales orales* [El bosque].  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.005>

Sánchez, E. L., Santafé, G. G., Torres, O. L., Muñoz, D. L., & Robledo, S. M. (2018). Compuestos sintéticos del tipo de estirilquinolinas con actividades leishmanicida y citotóxica. *Biomédica*, 34(4), 605–611. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2299>

## **11. Anexos**

## Anexo 1: Certificado de permiso del Laboratorio.



unl

Universidad  
Nacional  
de Loja

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Facultad  
de la Salud  
Humana

Of. Cir. Nro. 0540 -CLC-FSH-UNL-2022  
Loja, 06 de julio de 2022

Doctor  
Santos Amable Bermeo Flores, Mg. Sc..  
**DECANO DE LA FACULTAD DE LA SALUD HUMANA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA.**  
Ciudad. –

### De mi consideración:

Por medio del presente, me dirijo a usted con la finalidad de expresarle un cordial y respetuoso saludo, deseándole éxito en el desarrollo de sus delicadas funciones. Aprovecho la oportunidad para solicitarle de la manera más respetuosa se digne conceder su autorización a la Srta. **MARITZA DAYANARA MALDONADO PINEDA**, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja, para el procesamiento de muestras en el Laboratorio del Centro de Diagnóstico Médico y el Laboratorio de Química; el cual me servirá de ayuda para cumplir con el trabajo de investigación denominado **"ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL ACEITE ESENCIAL DE PLUMBAGO SCANDENS L. EN LEISHMANIA NAIFFI"**, trabajo que lo realizará bajo la supervisión del Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, docente de la Carrera.

Aprovecho la oportunidad para expresar mis sentimientos de consideración y estima personal e institucional.

Atentamente,




Escaneado por:  
SANDRA  
ELIZABETH  
FREIRE CUESTA

Dra. Esp. Sandra Freire Cuesta,  
**DIRECTORA DE LA CARRERA DE  
LABORATORIO CLÍNICO-FSH. UNL.**

Referencia: Correo electrónico  
Anexo: Archivo Secretaría de la Carrera  
Elaborado por: María del C. Salazar L.

**Anexo 2.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo Novy, Nicolle y McNeal (NNN)**


 <p><b>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación de medios NNN</b></p>	<p><b>Anexo: N° 2</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 1/3</p>

- 1. Objetivo:** Preparar, elaborar el medio NNN.
- 2. Alcance:** Dirigido a docentes, técnico docente y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. Fundamento:** Es un medio bifásico que en concentraciones adecuadas permite el crecimiento de parásitos, consiste en Agar cerebro-corazón, suplementado con antibiótico de gentamicina y sangre desfibrinada de conejo.

**4. Descripción del procedimiento:**

**Material biológico:** 20 ml de sangre desfibrinada de conejo

- Agar base: Agar cerebro-corazón
- 1 ml de solución de gentamicina 40 mg/2 ml (6 ml solución salina +2 ml de gentamicina)
- Penicilina-Estreptomicina 200 µg/100 ml (10.000 unidades de Penicilina / 10 mg Estreptomicina), Marca Sigma-Aldrich, Lot#0000155850
- Solución de Locke
- Lámpara de alcohol
- Tubos plásticos cónicos tapa rosca (estériles)
- Matraz de 250 ml estéril
- Agua destilada
- Pipeta serológica estéril
- Pro-pipeta estéril
- Gradillas

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación de medios de NNN</b></p>	<p><b>Anexo: N° 2</b></p>
<p><b>Área: Laboratorio Clínico</b></p>		<p><b>N° páginas: 2/3</b></p>

**Equipos:**

- Autoclave
- Cabina de bioseguridad
- Estufa
- Balanza analítica
- Baño maría

**5. Procedimiento**

- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, visor).
- Colocar luz UV por 30 minutos en cabina de bioseguridad.
- Desinfectar el sitio de trabajo con etanol al 70%.
- Consideraciones en el manejo de la balanza analítica:
  - Encender la balanza analítica
  - Colocar un vaso de precipitados o aguja de reloj del tamaño y volumen adecuados para la cantidad que se va a pesar, poner a "0" (tarar).
  - Anadir la cantidad de sustancia necesaria hasta el peso previsto.
  - Apagar la balanza analítica y limpiar si es necesario
- Pesar 5,2 g de Agar cerebro-corazón y disolver en 86 ml de agua destilada, calentar hasta su ebullición, sellar y autoclavar por 15 minutos a 121 °C.
- Dejar enfriar el Agar hasta que se encuentre a un aproximado de ≈50°C.
- Agregar 15 ml de sangre desfibrinada de conejo en un matraz con perlas de vidrio e inactivar a baño maría (56°C por 30 minutos).
- Agregamos 1 ml de gentamicina o 2 ml de estreptomicina-penicilina.
- Mezclar y dispensar en los tubos tapa rosca, dejar enfriar los medios para que se solidifiquen en posición inclinado.



**Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico**

**Protocolo para la preparación de  
medios de NNN**

**Anexo: N° 2**

**Área:** Laboratorio Clínico

**N° páginas:** 3/3

- Solidificado el medio dejarlo en refrigeración durante 10 minutos a 4°C.
- Suplementar el medio NNN con solución de Locke e incubar a 37°C por 24 horas, no debe haber crecimiento.
- Refrigerar el medio hasta el momento de su uso.

Nota: Para la preparación de la solución de Locke, tomar en cuenta lo siguiente: Cloruro de sodio 8.0 g, Cloruro de calcio 0,2 g, Cloruro de potasio 0,2g, Cloruro de magnesio 0,01 g, Fosfato dibásico de sodio 2,0 g, Bicarbonato de sodio 0,4 g, Fosfato monobásico de potasio 0,3 g. Disolver en ese orden todas las sales mencionadas en 1000 ml de agua destilada, hervir 10 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y filtrar para remover el sedimento formado. Esterilizar a 15 libras de presión y 121°C durante 15 min. Guardar en frascos tapado y rotulado. (Girard, 2014)


## 6. REFERENCIAS

Girard, R. (2014). Técnicas para Laboratorios y Diagnóstico de las Enfermedades Infecciosas. *Manual De Parasitología*, 1(3), 01(21).pp. [http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/flash/files/res/downloads/page\\_0021.pdf%0Ahttp://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/pdf/ManualParasitologia3.pdf%0Acamilaestela12@yahoo.com](http://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/flash/files/res/downloads/page_0021.pdf%0Ahttp://www.bvs.hn/Honduras/Parasitologia/ManualParasitologia/pdf/ManualParasitologia3.pdf%0Acamilaestela12@yahoo.com)

OMS. (2011). Manual de Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis. In *Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis*. OPS. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/10102>

<b>Elaborado por:</b>	Maritza Dayanara Maldonado Pineda
<b>Revisado y Aprobado por:</b>	Dr. Luis Morocho Yaguana.

### Anexo 3.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo Drosophila

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b> <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación de medio de cultivo Drosophila</b></p>	<p><b>Anexo: N° 3</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 1/3</p>

- 1. Objetivo.** Preparar, elaborar el medio Drosophila
- 2. Alcance:** Dirigido a docentes, técnico docente y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. Fundamento:** El medio Drosophila Schneider, medio líquido, diseñado originalmente para el cultivo de células S<sub>2</sub> de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Es un medio empleado en el cultivo de leishmania, suplementado con SFB inactivado (complemento con portadores quelantes, posee nutrientes lábiles y neutraliza sustancias tóxicas); solución de gentamicina y orina estéril de hombre adulto.
- 4. Descripción del procedimiento:**

#### **Materiales y reactivos**

- Medio Schneider Drosophila
- 10 ml SFBi (inactivado) 30 min a 56°C a baño maría
- 1 ml de solución de gentamicina 40 mg/2 ml (6 ml solución salina +2 ml de gentamicina)
- 2 ml de orina estéril de hombre adulto
- 10 Tubos plásticos cónicos tapa rosca estériles
- Lámpara de alcohol
- Gradilla
- Probeta de 50 ml estéril
- Vaso de precipitación 50 ml estéril
- Jeringuilla de 50 ml estéril





**Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico**

**Protocolo para la preparación de  
medio de cultivo Drosophila**

**Anexo: N° 3**

**Área:** Laboratorio Clínico

**N° páginas:** 2/3

- Jeringuilla de 3 ml estéril
- Aguja calibre 16 estéril
- Filtros para jeringuilla (PES polietersulfona, diámetro de 30 mm x 0,22 µm p/jeringuilla)

**Equipos:**

- Cámara de bioseguridad
- Autoclave
- Estufa
- Balanza analítica
- Baño María

**Procedimiento:**

- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, visor)
- Colocar luz UV por 30 minutos en cabina de bioseguridad
- Desinfectar el sitio de trabajo con etanol al 70%.
- Preparar los materiales y reactivos con el que se va a trabajar
- Añadir en una probeta de 50 ml, lo siguiente:
  - 10 ml de SFB inactivado por 30 min a 56°C a baño maría.
  - 1 ml de una solución de 200 µg/ml de gentamicina.
  - 2 ml de orina estéril de hombre adulto y completar 37 ml con Schneider Drosophila, hasta llegar a la marca de 50 ml
- Se coloca en un vaso de precipitados todo el medio y aspiramos con la jeringuilla de 50 ml.



Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico

**Protocolo para la preparación de  
medio de cultivo Drosophila**

**Anexo: N° 3**

**Área:** Laboratorio Clínico

**N° páginas:** 3/3


- Para esterilizar el medio colocamos el filtro para jeringuilla y dispensamos en 10 tubos a razón de 5 ml.
- Incubar a 37°C por 24 horas y refrigerar a 8°C hasta el momento de su uso.
- Revisar la transparencia de los tubos preparados con el medio Drosophila antes y después de su uso y conservar el color.

**REFERENCIAS**

- Puchaicela Quirola, J. (2018). *Protocolo para la preparación de medio de cultivo Drosophila*. Universidad Nacional de Loja. Loja. Obtenido de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21017/1/TESIS%20JORGE%20PUC%20HAICELA.pdf>
- Heredia, N. S., Ávila, A. S., Velásquez, L. E., Heredia, N. S., Ávila, A. S., & Velásquez, L. E. (2018). *In vitro* culture of L3 larvae of nematodes obtained from the African giant snail *Lissachatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) in Santa Fe de Antioquia. *Biomédica*, 38, 24–29. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i3.3408>
- Montealegre, I. A. (2016). Importancia de los medios de cultivo en el diagnóstico de Leishmaniasis. *Revista Médica Experimental*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/316650873\\_Importancia\\_de\\_los\\_medios\\_de\\_cultivo\\_en\\_el\\_diagnostico\\_de\\_leishmaniasis](https://www.researchgate.net/publication/316650873_Importancia_de_los_medios_de_cultivo_en_el_diagnostico_de_leishmaniasis)

<b>Elaborado por:</b>	Maritza Dayanara Maldonado Pineda
<b>Revisado y Aprobado por:</b>	Dr. Luis Morocho Yaguana.

#### Anexo 4.- Protocolo de extracción de aceite esencial de *P. scandens* L.

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b> <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo de extracción de aceite esencial</b></p>	<p><b>Anexo: N° 4</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 1/3</p>

- 1. Objetivo:** Obtener aceite esencial por arrastre de vapor
- 2. Alcance:** Dirigido a docentes, técnico docente y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. Fundamento:** El aceite esencial es definido como el producto obtenido a partir de una materia prima natural de origen vegetal. La destilación por arrastre de vapor es el método más común para obtención de aceites esenciales. Se trata de un proceso de separación, que con el uso de vapor de agua se logra vaporizar los compuestos volátiles del material vegetal. El AE, tiene punto de ebullición elevados, muy por encima del punto de ebullición del agua, además forman un sistema binario de dos líquidos inmiscibles, cuyo comportamiento está determinado por la ley de Dalton de las presiones parciales.

#### 4. Materiales:

**Material biológico:** Planta *Plumbago scandens* L: partes aéreas (tallos y hojas)

- Mechero de bunsen
- Trípode de acero
- Recipiente
- Equipo de destilación por arrastre de vapor:



(Horovitz, 2018)



**Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico**

**Protocolo de extracción de aceite  
esencial**

**Anexo: N° 4**

**Área:** Laboratorio Clínico

**N° páginas:** 2/3

**Equipos:**

- Refrigeradora

**Procedimiento:**

- Separar las partes aéreas de la planta (tallos y hojas), e introducirlos en el equipo de destilación.
- Iniciar el proceso de extracción aplicando calor al generador de vapor, este se suministra a través de un mechero a gas, a medida que se genera vapor en el equipo de destilación.
- El vapor es conducido a través del destilador y se calienta progresivamente.
- Esperar a que se genere la destilación (líquido), y almacenarlo en un recipiente de vidrio ámbar que debe ser refrigerado para evitar el traspaso de luz.
- Para evaluar la pureza del AE, se realizó mediante un embudo de separación con el solvente hexano  $C_6H_{14}$  que permite la separación, purificación del material vegetal.
- La purificación por cromatografía en columna con silicagel 60 (0,063-0,200 mm, MERCK ®) y como eluyente una mezcla de hexano, el producto obtenido se conservó en un balón aforado, en refrigeración y protegido de la luz.



Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico

Protocolo de extracción de aceite  
esencial

Anexo: N° 4

Área: Laboratorio Clínico


N° páginas: 3/3

## REFERENCIAS


- Horovitz, S. (2018). Extracción de aceites esenciales a través de arrastre con vapor; manual de laboratorio. In 2018 (p. 7). <https://quimicafacil.net/manual-de-laboratorio/extraccion-aceites-esenciales-arrastre-vapor/>
- Casado, I. (2018). Optimización de la extracción de Aceites Esenciales por destilación en Corriente de Vapor. *Universidad Politécnica de Madrid*, 1, 84. <https://bit.ly/3ObkF1a>
- Patiño, L., Saavedra, A., & Martínez, J. (2014). Extracción por arrastre de vapor de aceite esencial del romero. *Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, Sucre-Bolivia*, 3(3), 239–252. [http://handbook.usfx.bo/nueva/Dicyt/Handbooks/Ciencias Tecnol%F3gicas y Agrarias\\_2/Ciencias Tecnol%F3gicas y Agrarias\\_Handbook\\_VolII/PAPERS\\_25/art15.pdf](http://handbook.usfx.bo/nueva/Dicyt/Handbooks/Ciencias_Tecnol%F3gicas_y_Agrarias_2/Ciencias_Tecnol%F3gicas_y_Agrarias_Handbook_VolII/PAPERS_25/art15.pdf)

<b>Elaborado por:</b>	Maritza Dayanara Maldonado Pineda
<b>Revisado y Aprobado por:</b>	Dr. Luis Morocho Yaguana.

## Anexo 5. Protocolo para el recuento de parásitos en cámara de Neubauer

 <p>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico</p>	<p>Protocolo para el recuento de parásitos en Cámara de Neubauer</p>	<p>Anexo: N° 5</p>
<p>Área: Laboratorio Clínico</p>		<p>N° páginas: 1/4</p>

- 1. Objetivo.** Realizar el recuento de parásitos y ver su viabilidad en el cultivo.
- 2. Alcance:** Dirigido a docentes, técnico docente y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. Fundamento:** El recuento se lo realiza para conocer el número de parásitos que se encuentran aproximadamente en el medio de cultivo y se lleva a cabo con la cámara de Neubauer o hematocímetro, instrumento utilizado en cultivo celular o medio de cultivo líquido, consta de dos placas de vidrio, entre las cuales se puede alojar el volumen con ayuda del cubreobjetos.
- 4. Materiales:**
  - **Material biológico:** Promastigotes de *Leishmania* cultivados en medio líquido (Drosophila, SFBi, orina estéril, gentamicina)
  - Pipetas automáticas 10-100 µl.
  - Cámara de Neubauer o hematocímetro
  - 1mg de azul de toluidina
  - 10 ml de agua destilada
  - Puntas estériles 10-100 µl.
  - espátula
  - **Equipos**
  - Cámara de Bioseguridad
  - Microscopio óptico
  - Balanza analítica

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación del PBS (Solución salina fosfatada)</b></p>	<p><b>Anexo: N° 5</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 3/4</p>

### 5. Procedimiento:

- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, visor)
- Colocar luz UV por 30 minutos en cabina de bioseguridad
- Desinfectar el sitio de trabajo con etanol al 70%.
- Preparar los materiales y reactivos con el que se va a trabajar
- Con ayuda de la probeta medir 1000 ml de agua destilada y colocar en un vaso de precipitados de 1000 ml.
- Consideraciones en el manejo de la balanza analítica:
  - Encender la balanza analítica
  - Colocar un vaso de precipitados o aguja de reloj del tamaño y volumen adecuados para la cantidad que se va a pesar, poner a “0” (tarar).
  - Anadir la cantidad de sustancia necesaria hasta el peso previsto
  - Apagar la balanza analítica y limpiar si es necesario
- Se toma en cuenta las consideraciones del manejo de la balanza se pesa lo siguiente:
- Preparar azul de toluidina de la siguiente manera: Pesar 1 mg de azul de toluidina y disolver en 10 ml de agua destilada.
- Coloque el objetivo de 10x en el trayecto óptico del microscopio en campo iluminado.
- Estime el volumen de la suspensión celular de la cual se toma la alícuota para evaluar.



Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico

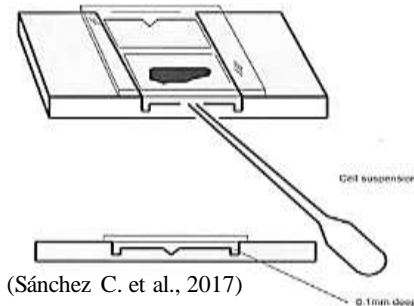
### Protocolo para el recuento de parásitos en Cámara de Neubauer

Anexo: N° 5

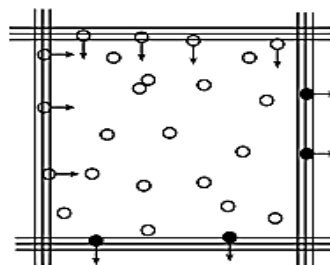
Área: Laboratorio Clínico

N° páginas: 2/4


- Se toma 10  $\mu\text{l}$  del cultivo original de parásitos y se realiza una dilución de 1:10 con agua destilada.
- De la dilución hecha tomamos 10  $\mu\text{l}$  y 1  $\mu\text{l}$  de azul de toluidina para evidenciar la viabilidad. Homogenizar.
- Se coloca la dilución en cada retículo de la cámara para realizar el conteo en los 5 cuadrantes (4 externos y 1 central), dentro y sobre las líneas de la cámara.



- Coloque el hemocitómetro en el microscopio y enfoque con el objetivo de 40x.
- Cuente por separado los parásitos vivos (refringentes) y los muertos (azules) que sean observadas en cada uno de los cuadros por considerar.





 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b> <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para el recuento de parásitos en Cámara de Neubauer</b></p>	<p><b>Anexo: N° 5</b></p>
<p><b>Area: Laboratorio Clínico</b></p>		<p><b>N° páginas: 3/4</b></p>

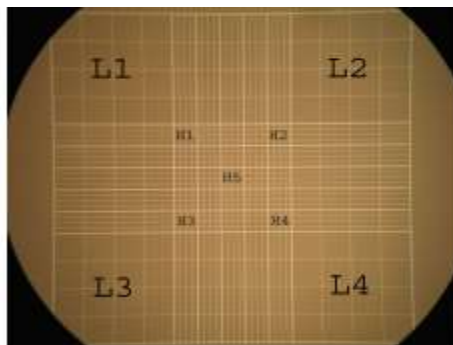
## 6. Cálculo de los resultados

El cálculo de conteo en cámara de Neubauer, se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Células/mm}^3 = (\# \text{ de parásitos contados en 10 cuadrantes de los 2 retículos}) * 10,000 (4 \times 10^4) \dots \dots \dots * (\text{factor de dilución } 1/10) = \text{Número de parásitos/ ml.}$$

**Para ello se toma en cuenta lo siguiente:**

1. Los 5 cuadrados que son los 4 cuadrados externos (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>) y el 1 cuadrado central (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>) por cada lado; es decir, se cuenta en los dos retículos de la cámara de Neubauer, con un total de 10 cuadrados.



(Sánchez C. et al., 2017)

2. El recuento total de parásitos en los 10 cuadrados de los 2 retículos /2 = recuento promedio de la cámara de Neubauer.
3. Se emplea la fórmula ya mencionada y se obtiene, lo siguiente:  
(El número total de parásitos en el medio original es: \_\_\_\_\_ parásitos/ml \* \_\_\_\_\_ (ml volumen de cultivo) = \_\_\_\_\_ Total de parásitos en el medio de cultivo.



Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico

Protocolo para el recuento de  
parásitos en Cámara de Neubauer

Anexo: N° 5

Area: Laboratorio Clínico

N° páginas: 4/4

## 7. REFERENCIAS


Sánchez C., M. C., Vergara U., V., Polo N., L. D., & Álvarez A, A. (2017). Primer acercamiento del estudiante de Microbiología a las técnicas de recuento en superficie, profundidad y cámara De Neubauer. *Mente Joven*, 6, 87–95. [https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente\\_joven.0.2017.3672](https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3672)

Puchaicela Quirola, J. (2018). *Protocolo para el recuento de parásitos en cámara de neubauer*. Universidad Nacional de Loja. Loja. Obtenido de <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21017/1/TESIS%20JORGE%20>


García-contreras, R., & Acosta-torres, L. (2019). Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas. *2019, October*, 03-2018-082312291200–01. <https://doi.org/doi.org/10.1186/1743-8977-7-22>.

<b>Elaborado por:</b>	Maritza Dayanara Maldonado Pineda
<b>Revisado y Aprobado por:</b>	Dr. Luis Morocho Yaguana.

## Anexo 6.- Protocolo para la preparación de la solución salina fosfatada

 <p>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico</p>	<p>Protocolo para la preparación del PBS (Solución salina fosfatada)</p>	<p>Anexo: N° 6</p>
<p>Área: Laboratorio Clínico</p>		<p>N° páginas: 1/ 4</p>

- 1. Objetivo.** Elaborar la solución salina fosfatada o PBS
- 2. Alcance:** Dirigido a docentes, técnico docente y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. Fundamento:** La solución salina fosfatada o tampón fosfato salino, es una solución acuosa y salina que contiene cloruro de sodio NaCl, fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y fosfato de sodio dibásico dodecahidratado  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Su osmolaridad y concentración de iones de Cl, Na y K, es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Mientras que los grupos fosfato mantienen el pH estable, la osmolaridad coincide con la del cuerpo humano (isotónico). Se trata de una solución isotónica, es decir, la concentración de soluto es igual dentro y fuera de la célula; no es tóxica para las células de los mamíferos, y su pH es de 7.4.
- 4. Materiales:**
  - Papel filtro de 90 mm
  - Embudo de filtración estéril
  - Matraz Erlenmeyer estéril de 1000 ml
  - Varilla de agitación estéril
  - Matraz aforado estéril de 1000 ml
  - Vaso de precipitados estéril de 10 ml
  - Vaso de precipitados de 1000 ml
  - Espátula estéril
  - Aguja de reloj estéril

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación del PBS (Solución salina fosfatada)</b></p>	<p><b>Anexo: N° 6</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 2/4</p>

- Agua destilada 1000 ml
- Probeta estéril de 1000 ml
- Frascos de vidrio transparentes estéril de 250 ml
- Pipeta automática estéril de 1-10 µm
- Puntas estériles de 1-10 µm

#### **5. Equipos**


- Cámara de Bioseguridad
- Balanza analítica
- Autoclave
- Agitador magnético
- Pila de agitador magnético estéril
- Peachimetro

#### **6. Reactivos**


- 8g de cloruro de sodio NaCl, Marca (Invitrogen, Lote No. 1213425)
- 0,34g de fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Marca (Merck, Lote No.1342127 A)
- 3,05g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , Marca (Merck, Lote No. 3031465)
- Ácido clorhídrico HCl, 1M
- Hidróxido de sodio NaOH, 10M

#### **7. Procedimiento:**

- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, visor)
- Colocar luz UV por 30 minutos en cabina de bioseguridad

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación del PBS (Solución salina fosfatada)</b></p>	<p><b>Anexo: N° 6</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 3/4</p>

- Desinfectar el sitio de trabajo con etanol al 70%.
- Preparar los materiales y reactivos con el que se va a trabajar
- Con ayuda de la probeta medir 1000 ml de agua destilada y colocar en un vaso de precipitados de 1000 ml.
- Consideraciones en el manejo de la balanza analítica:
  - Encender la balanza analítica.
  - Colocar un vaso de precipitados o aguja de reloj del tamaño y volumen adecuados para la cantidad que se va a pesar, poner a “0” (tarar).
  - Añadir la cantidad de sustancia necesaria hasta el peso previsto.
  - Apagar la balanza analítica y limpiar si es necesario.
- Tomar en cuenta las consideraciones del manejo de la balanza y se pesa lo siguiente:
  - 8g de cloruro de sodio NaCl,
  - 0,34g de fosfato de potasio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,
  - 3,05g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , previamente colocados en un vaso de precipitados de 10 ml.
- Colocar la mezcla de cloruro de sodio, fosfato de potasio monobásico y de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado, sobre el vaso de precipitados de 1000 ml.
- Colocar el vaso de precipitados en el agitador magnético y calentar a  $68^\circ\text{C}$  a 28 rpm para ayudar a la disolución.
- Dispensar la mezcla en el balón de aforo de 1000 ml

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación del PBS (Solución salina fosfatada)</b></p>	<p><b>Anexo: N° 6</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 4/4</p>


- Colocar papel filtro y embudo de filtración en un matraz Erlenmeyer estéril de 1000 ml, ayudarse con el uso de la varilla de vidrio.
- Colocar la mezcla en recipientes estériles de 250 ml.
- Ajustar el pH a 7,4 con 1M HCl o 10M NaOH (según sea necesario) empleando para ello una pipeta, mientras se monitorea el pH añada las soluciones de HCl o NaOH gota a gota.
- Esterilizar la solución salina fosfatada en autoclave, 15 min a 121°C.

## 8. REFERENCIAS


- Fijador, M. O., Santos, C., & Santos, A. (2010). *PREPARACIÓN TAMPÓN FOSFATO*. <https://elaborate.uca.es/wp-content/uploads/2020/03/TAMPON-FOSFATO.pdf>
- Magalhães, W. L. E., Thá, E. L., & Leme, D. M. (2018). Comunicado Técnico 427 - Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. *EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, 1(Dezembro), 10. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191253/1/CT-427-1572-final2.pdf>
- Soluci, L., Amortiguada, S., Pbs, E., Pbs, E., Pbs, E., Pbs, E., & Clorh, A. (2008). Preparación de Phosphate Buffered Saline (PBS). *Creative Commons*, 1(20), 6–8.

<p><b>Elaborado por:</b></p>	<p>Maritza Dayanara Maldonado Pineda</p>
<p><b>Revisado y Aprobado por:</b></p>	<p>Dr. Luis Morocho Yaguana.</p>

**Anexo 7.- Protocolo para la preparación del MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol2-ilo)- 2,5-difeniltetrazol)**

 <b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b> <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b>	<b>Protocolo para la preparación del MTT; (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol2-ilo)- 2,5-difeniltetrazol)</b>	<b>Anexo: N° 7</b>
<b>Área:</b> Laboratorio Clínico		<b>N° páginas:</b> 1/ 3

- 1. Objetivo:** Preparar el reactivo del MTT
- 2. Alcance:** Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes.
- 3. Fundamento:** Es un compuesto de color amarillo, perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua que al reducirse por medio del NADH y NADPH se convierte en azul-violeta (formazán), se utiliza para evaluar la viabilidad celular como función del potencial redox.
- 4. Materiales**
  - Pipeta de 1000 µl
  - Puntas estériles de 10-1000 µl
  - Probeta de 10 ml
  - Recipiente ámbar de 3 ml
  - Luna de reloj de 60 mm
  - Espátula estéril
- 5. Equipos**
  - Agitador mecánico vórtex
  - Balanza analítica
- 6. Reactivos**
  - 5 mg/ml de MTT (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol1-2-il)-2,5- difenil tetrazol), Marca Invitrogen™ V13154
  - PBS 1000 µl
  - 1g de SDS (dodecil sulfato sódico); Marca Invitrogen™ V13154
  - HCl 10 ml a 0,01N

 <p>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico</p>	<p>Protocolo para la preparación del MTT; (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)</p>	<p>Anexo: N° 7</p>
<p>Área: Laboratorio Clínico</p>		<p>N° páginas: 2/ 3</p>

## 7. Procedimiento

- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, visor)
- Colocar luz UV por 30 minutos en cabina de bioseguridad
- Desinfectar el sitio de trabajo con etanol al 70%.
- Preparar los materiales y reactivos con el que se va a trabajar
- Consideraciones en el manejo de la balanza analítica:
  - Encender la balanza analítica.
  - Colocar un vaso de precipitados o aguja de reloj del tamaño y volumen adecuados para la cantidad que se va a pesar, poner a “0” (tarar).
  - Anadir la cantidad de sustancia necesaria hasta el peso previsto
  - Apagar la balanza analítica y limpiar si es necesario ..
- Tomar en cuenta las consideraciones del manejo de la balanza y pesar lo siguiente:
  - 0,01g de reactivo del MTT
- Disolver el compuesto en 1000 µl de PBS (ver anexo 6).
- Colocar la mezcla en un recipiente ambar para evitar el traspaso de luz.
- Colocar el recipiente en el agitador mecánico vórtex para que se disuelva el reactivo del MTT por completo.
- Refrigerar y conservar el recipiente a -20°C.
- Proteger del traspaso de luz hasta el momento de su uso.





Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico

Protocolo para la preparación  
del MTT; (bromuro de 3-(4,5-  
dimetiltiazol2-ilo)-  
2,5-  
difeniltetrazol)

Anexo: N° 7

Área: Laboratorio Clínico


N° páginas: 3/3

## 8. REFERENCIAS


- García-contreras, R., & Acosta-torres, L. (2019). Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas. 2019, October, 03-2018- 082312291200–01. <https://doi.org/doi.org/10.1186/1743-8977-7-22>
- Bonilla, J. A., Mesón, M. G., & Cartín, W. (2019). Modificación de un método colorimétrico que usa XTT, Para La determinacion de linfoproliferación. 2020, 19–25. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v14n1-2/art4.pdf>
- Sánchez, E. L., Santafé, G. G., Torres, O. L., Muñoz, D. L., & Robledo, S. M. (2018). Compuestos sintéticos del tipo de estirilquinolinas con actividades leishmanicida y citotóxica. *Biomédica*, 34(4), 605–611. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2299>
- Puchaicela, J., & Morocho, L. (2018). Actividad leishmanicida del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en promastigotes de *Leishmania major* like. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21017/1/TESIS%20JORGE%20PUCHAICELA.pdf>

<b>Elaborado por:</b>	Maritza Dayanara Maldonado Pineda
<b>Revisado y Aprobado por:</b>	Dr. Luis Morocho Yaguana.

## Anexo 8.- Protocolo para la preparación del dodecilsulfato sódico o SDS


 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b> <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<b>Protocolo para la preparación de dodecilsulfato sódico o SDS</b>	<b>Anexo: N° 8</b>
<b>Área:</b> Laboratorio Clínico		<b>N° páginas:</b> 1/ 3

1. **Objetivo:** Preparar el solvente orgánico SDS
2. **Alcance:** Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes.
3. **Fundamento:** Es un detergente iónico utilizado para desnaturalizar proteínas en hibridación, purificación de ácidos nucleicos y sistemas de buffer de electroforesis. El SDS también se utiliza para disociar complejos de proteínas de ácido nucleico en protocolos de extracción de ADN, para alterar las membranas celulares y para preparar soluciones de pre hibridación y / o hibridación.
4. **Materiales**
  - Luna de reloj estéril de 60 mm
  - Pipeta estéril de 100 ml
  - Agua destilada 100 ml
  - Espátula estéril
  - Probeta estéril de 10 ml
  - Tubo cónico tapa rosca estéril
5. **Equipos**
  - Agitador mecánico vórtex
  - Balanza analítica
6. **Reactivos**
  - 1g de SDS (dodecil sulfato sódico); Marca Invitrogen™ V13154
  - HCl de 10 ml al 0,01N

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación de dodecilsulfato sódico o SDS</b></p>	<p><b>Anexo: N° 8</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 2/ 3</p>

## 7. Procedimiento

- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, visor).
- Colocar luz UV por 30 minutos en cabina de bioseguridad.
- Desinfectar el sitio de trabajo con etanol al 70%.
- Preparar los materiales y reactivos con el que se va a trabajar.
- Consideraciones en el manejo de la balanza analítica:
  - Encender la balanza analítica.
  - Colocar un vaso de precipitados o aguja de reloj del tamaño y volumen adecuados para la cantidad que se va a pesar, poner a “0” (tarar).
  - Anadir la cantidad de sustancia necesaria hasta el peso previsto.
  - Apagar la balanza analítica y limpiar si es necesario.
- Tomar en cuenta las consideraciones del manejo de la balanza y se pesa lo siguiente:
  - 1 g de solvente de SDS.
- Preparar 10 ml de HCl al 10% a 0,01 N, de la siguiente manera:
  - 828 µl de solución de HCl al 10% y llevar a 100 ml de agua destilada.
- Añadir en un tubo tapa rosca de 12 ml, lo siguiente:
  - 10 ml de HCl al 0,01N
  - 1g de SDS
- Agitar la mezcla del solvente y refrigerar a 8°C hasta el momento de su uso.


 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para la preparación de dodecilsulfato sódico o SDS</b></p>	<p><b>Anexo: N° 8</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 3/ 3</p>

## 8. REFERENCIAS

- Lopez-de la Torre, M. F. (2010). *Study of the cellular immune response obtained when Balb/c mouse cells are exposed to extracts from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera** [Guanajuato].  
<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/498/1/185521.pdf>
- Rahn-chique, K., Puertas, A. M., Romero Cano, M. S., & Rojas, C. (2012). La turbidez de una dispersión dodecano / agua. *Interciencia*, 37(8), 582–587.  
<https://www.redalyc.org/pdf/339/33925396004.pdf>

<p><b>Elaborado por:</b></p>	<p>Maritza Dayanara Maldonado Pineda</p>
<p><b>Revisado y Aprobado por:</b></p>	<p>Dr. Luis Morocho Yaguana.</p>

**Anexo. -9 Protocolo para la preparación de la solución de AmB (fármaco de referencia)**

 <b>Universidad Nacional de Loja</b> <b>Facultad de la Salud Humana</b> <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b>	<b>Protocolo para la preparación de la solución de AmB (fármaco de referencia)</b>	<b>Anexo: N° 9</b>
<b>Área:</b> Laboratorio Clínico		<b>N° páginas:</b> 1/3

- 1. Objetivo.** Realizar diluciones seriadas del fármaco de referencia (AmB)
- 2. Alcance:** Dirigido a docentes, técnico docente y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de la Salud Humana de la Universidad Nacional de Loja.
- 3. Fundamento:** Es un antibiótico-antifúngico extraído del *Streptomyces nodosus*, una bacteria filamentosa, obtenido inicialmente en 1955 en el Instituto Squibb, se utiliza para el tratamiento de leishmaniasis y enfermedades micóticas, es un antifungico con actividad parasitaria, presenta variación en función de la especie.


**4. Materiales**

**Soluciones y reactivos:**


- 250 µg/ml de Solución de Anfotericina B de 20 ml, Marca Sigma-Aldrich, Lote#0000121726
- Puntas estériles 10-100 µl.
- Pipetas automáticas 10-100 µl.
- Agua destilada
- 8 microtubos de eppendorf de 2 ml
- Gradilla para eppendorf

**5. Procedimiento:**

- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, visor)
- Colocar luz UV por 30 minutos en cabina de bioseguridad
- Desinfectar el sitio de trabajo con etanol al 70%.
- Preparar los materiales y soluciones con el que se va a trabajar

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para realizar las diluciones de Anfotericina B (fármaco de referencia)</b></p>	<p><b>Anexo: N° 9</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 2/ 3</p>

- Preparar 8 diluciones seriadas de 1/2, con las siguientes concentraciones: (2µg/ml), (1µg/ml), (0,5µg/ml), (0,25µg/ml), (0,125µg/ml), (0,06µg/ml), (0,03µg/ml) y (0,01µg/ml)
- Para realizar las 8 diluciones de la AmB, tomar en cuenta lo siguiente:
- **Preparacion de Solución madre 1:** Medir 80 µl de solución de Anfotericina B (250 µg/ml) + 920 µl de agua destilada y completar hasta 1000 µl.
- Colocar 40 µl. de solución madre 1 en el primer microtubo epperndorf 1, concentración de (2µg/ml).
- **Preparación de solución madre 2:** Medir 160 µl de solución de Anfotericina B + 840 µl de agua destilada y completar hasta 1000 µl.
- Colocar 40 µl de solución madre 2 en el segundo microtubo epperndorf 2 + 40 µl de agua destilada, concentración de (1µg/ml) y colocar en el microtubo epperndorf 2.
- Sacar 40 µl del microtubo epperndorf 2 (mezclar) + 40 µl de agua destilada, concentración de (0,5µg/ml) y colocar en el microtubo epperndorf 3.
- Sacar 40 µl del microtubo epperndorf 3 (mezclar) + 40 µl de agua destilada, concentración de (0,25µg/ml) y colocar en el microtubo epperndorf 4.
- Sacar 40 µl del microtubo epperndorf 4 (mezclar) + 40 µl de agua destilada, concentración de (0,125µg/ml) y colocar en el microtubo epperndorf 5.
- Sacar 40 µl del microtubo epperndorf 5 (mezclar) + 40 µl de agua destilada, concentración de (0,06µg/ml) y colocar en el microtubo

 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para realizar las diluciones de Anfotericina B (fármaco de referencia)</b></p>	<p><b>Anexo: N° 9</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 3/3</p>

epperndorf 6.


- Sacar 40 µl del microtubo epperndorf 6 (mezclar) + 40 µl. de agua destilada, concentración de (0,03µg/ml) y colocar en el microtubo epperndorf 7.
- Sacar 40 µl del microtubo epperndorf 7 (mezclar) + 40 µl. de agua destilada, eliminamos 40 µl y se deja 40 µl del microtubo 8, volumen final de la dilución, concentración de (0,01µg/ml).

## 6. REFERENCIAS

- OMS. (2013). Manual de Diagnóstico y Tratamiento de las Leishmaniasis. In *Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis*. OPS. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/10102>
- OPS, & MPPS. (2019). *Programa de Control de Leishmaniasis; Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control* (OPS; & OMS; (eds.); 1st ed.). 2019. [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51880/9789806678095\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/51880/9789806678095_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

<b>Elaborado por:</b>	Maritza Dayanara Maldonado Pineda
<b>Revisado y Aprobado por:</b>	Dr. Luis Morocho Yaguana.

**Anexo 10.- Protocolo para realizar el ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)- 2,5-difeniltetrazol)**

 <p><b>Universidad Nacional de Loja Facultad de la Salud Humana Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para el ensayo del MTT</b></p>	<p><b>Anexo: N° 10</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 1/6</p>

- 1. Objetivo:** El ensayo del MTT se lo utiliza para determinar la viabilidad o supervivencia de células ante el posible efecto citotóxico de un agente.
- 2. Alcance:** Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes.
- 3. Fundamento:** Es un compuesto de color amarillo, perteneciente a la familia de sales de tetrazolio, soluble en agua que al reducirse se convierte en azul-violeta (formazán), dando como resultado NADH y NADPH. La actividad metabólica del MTT se basa en células que incluyen deshidrogenasas, se considera que la acción se debe principalmente a la succinato deshidrogenasa. Para cuantificar se solubiliza en SDS que permite determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (intensidad de color).

**4. Materiales**


- **Material vivo:** Suspensión de parásitos en medio *Drosophila*  $4 \times 10^4$  promastigotes/ml.

**Sustancia a probar:** Aceite esencial de *Plumbago scanden L.*

**Soluciones y reactivos:**

- 5 mg/ml de solución de MTT (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol) (Ver protocolo 7)
- PBS 1 ml (Ver protocolo 6)
- 1g de SDS (dodecil sulfato sódico) (Ver protocolo 8)
- 10 ml de HCl al 10% 0,01 N
- Pipetas automáticas 1-100  $\mu$ l
- Puntas estériles de 1-100  $\mu$ l



 <p><b>Universidad Nacional de Loja</b>  <b>Facultad de la Salud Humana</b>  <b>Carrera de Laboratorio Clínico</b></p>	<p><b>Protocolo para el ensayo del MTT</b></p>	<p><b>Anexo: N° 10</b></p>
<p><b>Área:</b> Laboratorio Clínico</p>		<p><b>N° páginas:</b> 2/6</p>

- Placa con tapa de 96 pocillos estériles, Marca Corning, NY 14831

**Equipos:**

- Microscopio invertido.
- Espectrofotómetro.
- Incubadora.
- Cabina de flujo laminar

**5. Procedimiento**

1. Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, visor)
2. Colocar luz UV por 30 minutos en cabina de bioseguridad
3. Desinfectar el sitio de trabajo con etanol al 70%.
4. Preparar los materiales y soluciones con el que se va a trabajar
5. Preparar el lugar de trabajo para colocar soluciones, reactivos y medios de cultivo.
6. Tomar una alícuota de cultivo de parásitos  $0,2 \times 10^4$  promastigotes/ml y sembrar en el medio de cultivo Drosophila suplementado, hasta llegar a  $4 \times 10^4$  promastigotes/ml a partir de un cultivo en fase de crecimiento (día tres de cultivo), con volumen final de 14 ml (Ver protocolo 5).
7. Temperar los tubos del medio Drosophila (Ver anexo 3).
8. Incubar los tubos con la siembra a  $25^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.
9. Al cuarto día, el cultivo en masa estará listo para realizar la distribución en la placa de 96 pocillos, de la siguiente manera:
  - En la placa se distribuye de acuerdo a blancos, control y problema:
  - (Blancos), posición 1 y 2, dispensar  $90 \mu\text{l}$ /pocillo, que contienen medio de cultivo Drosophila sin parásitos.
  - (Control), posición 11 y 12, dispensar medio de



Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico

**Protocolo para el ensayo del MTT**

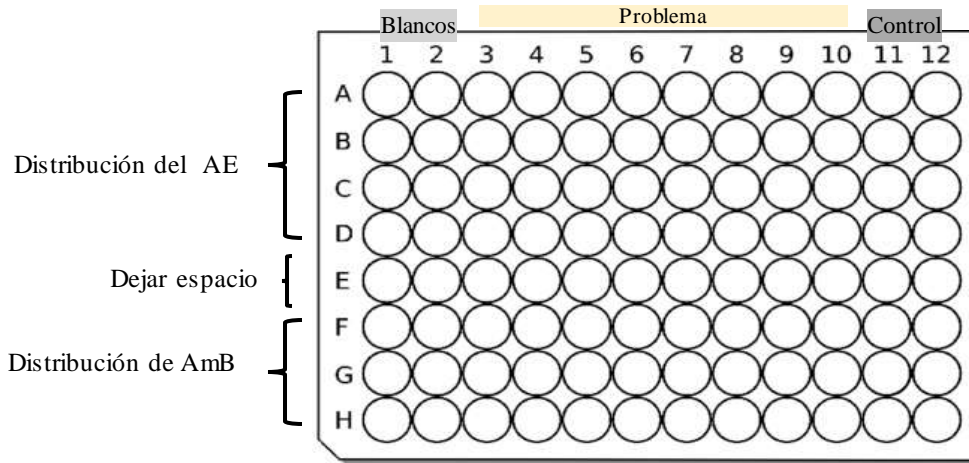
**Anexo: N° 10**

**Área:** Laboratorio Clínico

**N° páginas:** 3/6

cultivo que contiene parásitos en masa.

- (Problema), posición de 3 hasta 10, dispensar 80  $\mu$ l/pocillo que contiene medio de cultivo de parásitos en masa y añadir 10  $\mu$ l/pocillo de AE de *P. scandens* L. producto a ensayar.
- Dejar una fila de pocillos vacíos en la letra E y distribuir en los pocillos de la F a la G la misma cantidad en blancos, control a excepción del problema, distribuir 80  $\mu$ l/pocillo de medio de cultivo de parásitos en masa, y añadir 10  $\mu$ l/pocillo de AmB.
- Incubar la placa de 96 pocillos después de la distribución a 28°C por 24 horas.



*Nota: Las letras son repeticiones y los números la distribución*

10. Pasadas las 24 horas de incubación, se añaden 10  $\mu$ l de solución de MTT a cada pocillo e incubar 35°C por 4 horas, para la reducción del MTT.
11. Transcurrido las 4 horas se añade 100  $\mu$ l de SDS para disolver los cristales de formazán, e incubar nuevamente a 35°C por 4 horas.
12. Finalmente se procede a la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de



Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico

Protocolo para el ensayo del MTT

Anexo: N° 10

Área: Laboratorio Clínico

N° páginas: 4/6

570 nm.

13. Realizar los cálculos con el resultado obtenido de la lectura en el espectrofotómetro, empleando las absorbancias problema, absorbancia blanco y absorbancia control en la fórmula de porcentaje de inhibición.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left[ \frac{[A_p - A_b]}{A_c - A_b} \cdot 100 \right]$$

- En donde:

**A<sub>p</sub>**: Absorbancia problema

**A<sub>b</sub>**: Absorbancia blanco

**A<sub>c</sub>**: Absorbancia control

14. Resultados emitidos por el espectrofotómetro (Ver anexo 14).
15. Promedios de las absorbancias de blancos, control y problema de AE y AmB (Ver anexo 15).
16. Se resumen los cálculos del porcentaje de inhibición del AE (Ver anexo 12),
17. Promedio de absorbancias y porcentaje de inhibición (Ver tabla 4 y 5) y representación gráfica (Ver gráfico 1).
18. Se resumen los cálculos del porcentaje de inhibición de la AmB (Ver anexo 13)
19. Promedio de absorbancias y porcentaje de inhibición (Ver tabla 6 y 7) y representación gráfica (Ver gráfico 2).



Universidad Nacional de Loja  
Facultad de la Salud Humana  
Carrera de Laboratorio Clínico

Protocolo para el ensayo del MTT

Anexo: N° 10

Área: Laboratorio Clínico

N° páginas: 5/6

### BIBLIOGRAFÍA:

- García-contreras, R., & Acosta-torres, L. (2019). Manual para la enseñanza práctica del ensayo MTT para evaluar la citotoxicidad de nanopartículas. 2019, October, 03-2018-082312291200-01. <https://doi.org/doi.org/10.1186/1743-8977-7-22>.
- Puchaicela, J., & Morocho, L. (2018). *Actividad leishmanicida del aceite esencial de Plumbago scandens L. en promastigotes de Leishmania major like*. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/21017/1/TESIS%20JORGE%20PUCHAICELA.pdf>
- Bonilla, J. A., Mesón, M. G., & Cartín, W. (2019). Modificación de un método colorimétrico que usa XTT, Para La determinación de linfoproliferación. 2020, 19-25. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rccm/v14n1-2/art4.pdf>
- Sánchez, E. L., Santafé, G. G., Torres, O. L., Muñoz, D. L., & Robledo, S. M. (2018). Compuestos sintéticos del tipo de estirilquinolinas con actividades leishmanicida y citotóxica. *Biomédica*, 34(4), 605-611. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i4.2299>

<b>Elaborado por:</b>	Maritza Dayanara Maldonado Pineda
<b>Revisado y Aprobado por:</b>	Dr. Luis Morocho Yaguana.

**Anexo 11.-Consideraciones del movimiento flagelar de parásitos**

**Tabla 4.** *Consideraciones del movimiento flagelar.*

<i>Actividad citotóxica del aceite esencial de Plumbago scandens L. en Leishmania naiffi.</i>	
<i>Consideraciones del movimiento flagelar de promastigotes vivos</i>	
Microscopía	
<i>Reporte</i>	<i>Consideración flagelar</i>
	- débiles, sin movimiento y desplazamiento
<b>PV</b>	+ lentos, no desplazamiento y progresión se mueven en su misma posición
	++ Movimiento progresivo lento

**Nota:** PV, promastigotes vivos; -, <10 p/c(parásitos por campo); +, 10-20 p/c; ++, 20-40 p/c

## Anexo 12.- Cálculos de inhibición parasitaria del aceite

**Tabla 5.** Lecturas de absorbancias y cálculos de inhibición del AE, según la fórmula.

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[ \frac{[A_p - A_b]}{A_c - A_b} 100 \right]$$

Concentraciones/Absorbancias	Repeticiones	A-p	A-b	A-c	% inhibición
<b>Concentración 1</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,399	0,237	0,931	76,64
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,387	0,227	0,933	77,34
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,383	0,224	0,928	77,41
	<b>R<sub>4</sub></b>	0,392	0,227	0,929	76,50
<b>Concentración 2</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,410	0,277	0,937	79,85
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,433	0,228	0,933	70,92
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,437	0,227	0,929	70,09
	<b>R<sub>4</sub></b>	0,423	0,228	0,932	72,30
<b>Concentración 3</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,481	0,277	0,937	69,09
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,425	0,227	0,933	71,95
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,441	0,224	0,933	69,39
	<b>R<sub>4</sub></b>	0,399	0,227	0,932	75,60
<b>Concentración 4</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,449	0,279	0,931	73,93
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,441	0,235	0,933	70,49
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,465	0,233	0,932	66,81
	<b>R<sub>4</sub></b>	0,458	0,238	0,929	68,16
<b>Concentración 5</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,476	0,235	0,932	65,42
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,478	0,227	0,932	64,40
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,476	0,224	0,933	64,46
	<b>R<sub>4</sub></b>	0,476	0,227	0,932	64,68
<b>Concentración 6</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,652	0,277	0,933	42,84
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,501	0,227	0,933	61,19
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,505	0,224	0,932	60,31
	<b>R<sub>4</sub></b>	0,512	0,227	0,929	59,40
<b>Concentración 7</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,694	0,235	0,939	34,80
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,655	0,227	0,933	39,38
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,653	0,224	0,928	39,06
	<b>R<sub>4</sub></b>	0,654	0,227	0,929	39,17
<b>concentración 8</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,695	0,235	0,939	34,66
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,696	0,233	0,960	36,31
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,689	0,238	0,938	35,57
	<b>R<sub>4</sub></b>	0,694	0,235	0,939	34,80

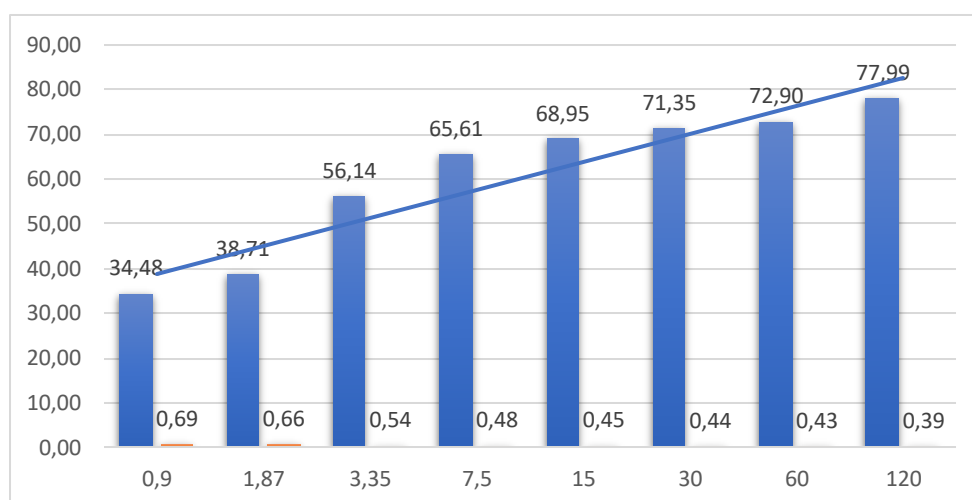
**Nota.** R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>, repeticiones; A-p, absorbancia problema; A-b, absorbancia blanca; A-c, absorbancia control.

**Tabla 6.** Promedio de Absorbancias y porcentaje de inhibición del aceite.

Concentración µg/mL	A-p	A-b	A-c	Porcentaje de inhibición
120	0,390	0,237	0,934	77,99
60	0,426	0,237	0,934	72,90
30	0,437	0,237	0,934	71,35
15	0,453	0,237	0,934	68,95
7,5	0,477	0,237	0,934	65,61
3,35	0,543	0,237	0,934	56,14
1,87	0,664	0,237	0,934	38,71
0,9	0,694	0,237	0,934	34,48

**Nota.** Ap, absorbancia problema; Ab, absorbancia blanco; Ac, Absorbancia control.

**Gráfico 1.** Representación gráfica del porcentaje de inhibición, concentración y promedio de absorbancias del aceite, ubicadas de menor a mayor concentración.



Eje x: Concentraciones / Absorbancias

Eje y: Porcentaje de Inhibición

### Anexo 13.- Cálculos de inhibición parasitaria de la Anfotericina B.

**Tabla 7.** Lecturas de absorbancias y cálculos de inhibición de la AmB, según la fórmula.

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[ \frac{[A_p - A_b]}{A_c - A_b} 100 \right]$$

Concentraciones/Absorbancias	Repeticiones	A-p	A-b	A-c	% inhibición
<b>Concentración 1</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,695	0,360	0,939	42,17
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,646	0,360	0,996	55,06
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,699	0,360	0,938	41,37
<b>Concentración 2</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,695	0,360	0,939	42,17
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,696	0,996	0,996	45,11
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,691	0,938	0,938	40,63
<b>Concentración 3</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,698	0,395	0,939	44,30
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,733	0,333	0,996	39,67
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,693	0,331	0,938	40,36
<b>Concentración 4</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,681	0,335	0,939	42,72
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,743	0,333	0,996	38,16
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,723	0,431	0,938	42,41
<b>Concentración 5</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,781	0,335	0,939	26,16
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,743	0,333	0,996	38,16
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,723	0,431	0,938	42,41
<b>Concentración 6</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,781	0,335	0,939	26,16
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,783	0,333	0,996	32,13
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,723	0,431	0,938	42,41
<b>Concentración 7</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,794	0,335	0,939	24,01
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,776	0,333	0,996	33,18
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,723	0,431	0,938	42,41
<b>concentración 8</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	0,779	0,335	0,939	12,08
	<b>R<sub>2</sub></b>	0,773	0,333	0,996	33,63
	<b>R<sub>3</sub></b>	0,723	0,431	0,938	44,59

**Nota.** R<sub>1</sub>-R<sub>2</sub>, repeticiones; A-p, absorbancia problema; A-b, absorbancia blanca; A-c, absorbancia control.

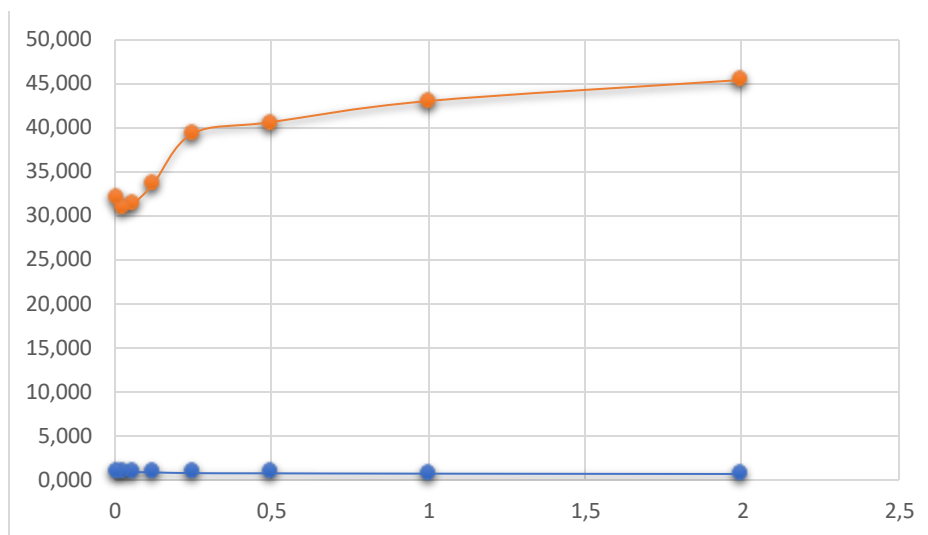


**Tabla 8.** Promedio de Absorbancias y porcentaje de inhibición de la AmB.

<i>Concentración µg/mL</i>	<i>A-P</i>	<i>A-B</i>	<i>A-C</i>	<i>Porcentaje de inhibición</i>
2	0,680	0,360	0,934	45,28
1	0,694	0,360	0,934	42,88
0,5	0,708	0,360	0,934	40,49
0,25	0,716	0,360	0,934	39,17
0,125	0,749	0,360	0,934	33,47
0,06	0,762	0,360	0,934	31,18
0,03	0,764	0,360	0,934	30,84
0,01	0,758	0,360	0,934	31,87

**Nota.** Ap, absorbancia problema; Ab, absorbancia blanco; Ac, Absorbancia control.

**Gráfico 2.** Representación gráfica del porcentaje de inhibición, concentración y promedio de absorbancias de la Anfotericina B, ubicadas de menor a mayor concentración.



Eje x: Concentraciones / Absorbancias  
Eje y: Porcentaje de Inhibición

**Anexo 14.- Absorbancias del ensayo del MTT, por el espectrofotómetro EPOCH<sub>2</sub>**  
(Biotek).

**Longitud de onda:** 570 nm

**Tabla 9.** Reporte de resultados por el espectrofotómetro EPOCH<sub>2</sub> (Biotek).

2.09.1												
C:\User\lecartuche\Desktop\Experiment17_UNL_REPORT_260423.xpt												
C:\User\lecartuche\Desktop\Leishmania_UNL_REPORT_.prt												
Plate 2												
26/4/2023												
15:25:48												
Epoch 2												
18053111												
Reader												
Nunclon 96 round bottom												
Absorbance Endpoint												
Full Plate												
Wavelengths: 570												
Read Speed: Normal, Delay: 100 msec, Measurements/D. 84												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK 1	BLK 1	SPL1:1 1	SPL1:2 2	SPL1:3 3	SPL1:4 4	SPL1:5 5	SPL1:6 6	SPL1:7 7	SPL1:8 8	SPL1:9 9	SPL2:1 10
B	BLK 1	BLK 2	SPL1:7 1	SPL2:1 2	SPL2:1 3	SPL2:7 4	SPL3:1 5	SPL3:4 6	SPL3:7 7	SPL4:1 8	SPL4:4 9	SPL4:7 10
C	BLK 1	BLK 3	SPL1:8 2	SPL2:2 3	SPL2:5 5	SPL2:8 6	SPL3:2 7	SPL3:5 2	SPL3:8 8	SPL4:2 2	SPL4:5 6	SPL4:8 8
D	BLK 1	BLK 4	SPL1:9 9	SPL2:3 3	SPL2:6 6	SPL2:9 9	SPL3:3 3	SPL3:6 6	SPL3:9 9	SPL4:3 3	SPL4:6 6	SPL4:9 9
E												
F	BLK 1	BLK 5	SPL2:1 1	SPL2:4 4	SPL2:7 7	SPL3:1 3	SPL3:4 3	SPL3:7 7	SPL4:1 1	SPL4:4 4	SPL4:7 7	SPL5:1 8
G	BLK 1	BLK 6	SPL2:2 2	SPL2:5 5	SPL2:8 8	SPL3:2 2	SPL3:5 5	SPL3:8 8	SPL4:2 2	SPL4:5 5	SPL4:8 8	SPL5:2 6
H	BLK 1	BLK 7	SPL2:3 3	SPL2:6 6	SPL2:9 9	SPL3:3 3	SPL3:6 6	SPL3:9 9	SPL4:3 3	SPL4:6 6	SPL4:9 9	SPL5:3 4
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK 0,273	BLK 0,222	SPL1:1 0,339	SPL1:2 0,410	SPL1:3 0,481	SPL1:4 0,449	SPL1:5 0,476	SPL1:6 0,652	SPL1:7 0,694	SPL1:8 0,695	SPL1:9 0,935	SPL2:1 0,935
B	BLK 0,227	BLK 0,224	SPL1:7 0,387	SPL2:1 0,433	SPL2:1 0,425	SPL2:7 0,441	SPL3:1 0,478	SPL3:4 0,501	SPL3:7 0,655	SPL4:1 0,696	SPL4:4 0,937	SPL4:7 0,929
C	BLK 0,222	BLK 0,273	SPL1:8 0,383	SPL2:2 0,437	SPL2:5 0,441	SPL2:8 0,465	SPL3:2 0,476	SPL3:5 0,505	SPL3:8 0,653	SPL4:2 0,689	SPL4:5 0,936	SPL4:8 0,936
D	BLK 0,227	BLK 0,227	SPL1:9 0,392	SPL2:3 0,423	SPL2:6 0,399	SPL2:9 0,458	SPL3:3 0,476	SPL3:6 0,512	SPL3:9 0,654	SPL4:3 0,694	SPL4:6 0,929	SPL4:9 0,933
E												
F	BLK 0,347	BLK 0,393	SPL2:1 0,695	SPL2:4 0,695	SPL2:7 0,698	SPL3:1 0,681	SPL3:4 0,781	SPL3:7 0,781	SPL4:1 0,794	SPL4:4 0,779	SPL4:7 0,939	SPL5:1 0,840
G	BLK 0,345	BLK 0,345	SPL2:2 0,646	SPL2:5 0,696	SPL2:8 0,733	SPL3:2 0,743	SPL3:5 0,743	SPL3:8 0,783	SPL4:2 0,776	SPL4:5 0,773	SPL4:8 0,996	SPL5:2 0,996
H	BLK 0,348	BLK 0,384	SPL2:3 0,699	SPL2:6 0,691	SPL2:9 0,693	SPL3:3 0,723	SPL3:6 0,723	SPL3:9 0,723	SPL4:3 0,723	SPL4:6 0,723	SPL4:9 0,938	SPL5:3 0,958

*Nota.* Blanco 1-2; Concentraciones 3 hasta 10; Control 11-12; Repeticiones ABCD-FGH

**Anexo 15.- Promedio de absorbancias del ensayo del MTT, blancos, concentraciones y controles para AE y AmB**

**Tabla 10. Promedio de absorbancias del reporte de resultados**

		Concentraciones ug/mL											
		Blancos		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Controles	
				120	60	30	15	7,5	3,35	1,87	0,9		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,273	0,222	0,399	0,410	0,481	0,449	0,476	0,652	0,694	0,695	0,935	0,935	
B	0,227	0,224	0,387	0,433	0,425	0,441	0,478	0,501	0,655	0,696	0,937	0,929	
C	0,222	0,273	0,383	0,437	0,441	0,465	0,476	0,505	0,653	0,689	0,936	0,936	
D	0,227	0,227	0,392	0,423	0,399	0,458	0,476	0,512	0,654	0,694	0,929	0,933	
E	0,237	0,237	0,390	0,426	0,437	0,453	0,477	0,543	0,664	0,694	0,934	0,933	
	Promedio	0,237									Promedio	0,934	
		Blancos		Concentraciones Anfotericina B							Controles		
				2,0000	1,0000	0,5000	0,2500	0,1250	0,0600	0,0300	0,0100		
F	0,347	0,393	0,695	0,695	0,698	0,681	0,781	0,781	0,794	0,779	0,939	0,840	
G	0,345	0,345	0,646	0,696	0,733	0,743	0,743	0,783	0,776	0,773	0,996	0,996	
H	0,348	0,384	0,699	0,691	0,693	0,723	0,723	0,723	0,723	0,723	0,938	0,958	
	0,3467	0,3740	0,6800	0,6940	0,7080	0,7157	0,7490	0,7623	0,7643	0,7583	0,9577	0,9313	
	Promedio	0,3603									Promedio	0,9445	



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**  
**Anexo 16.- Difusión de resultados**



**Descripción:** Socialización de resultados en el Auditorium "Antonio Peña Celi".de la Facultad de la Salud Humana, el 14 de febrero de 2023. Asisten estudiantes y Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

## Anexo 17.- Registro de asistencia de estudiantes, difusión de resultados



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA  
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

**Tema:** Difusión de resultados de Actividad citotóxica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi*.

**Fecha:** 14 de febrero del 2023

### Registro de asistencia: estudiantes

Nombres y apellidos	Ciclo	Cédula	Firma
Gabriela Mercedes Martínez Luzuriaga	VIII	1105241267	
Mario José Aguilar Albito	VIII	1105120008	
Johanna Michelle Guamán Gacón	VII	1104540958	
Maia José Quezada Marisaca	VII	1150353736	
Stephany Del Cónce Guanca Galarza	VIII	1150064036	
Allison Quezada	VIII	1105857112	
Valeria Ochoa Ramón	VIII	1106249291	
Margoth Salinas	VII	1150495511	
Alex Ochoa	VII	1105710661	
Thalia Vasquez	I	1150493177	
Mayra Medina	I	1105381246	
Jesly Tacuri	I	1105854697	
Marco Jhuaner Uchuan° Nero	I	1150154910	
Jeimy Judith Montaña	I	1105740342	
Aracely Guaman	VIII	1150040960	
Diana Novillo	VIII	1105947301	
Lorena Alejandro	VIII	1104617894	
Marcia Lozano	VIII	1105218844	
Enich Aguilar Ochoa	VI	1150021135	
Ruben Alvarez Peñalero	VIII	1105673410	



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**FACULTAD DE LA SALUD HUMANA**  
**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

**Tema:** Difusión de resultados de Actividad citotóxica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi*.

**Fecha:** 14 de Febrero del 2013

**Registro de asistencia:estudiantes**

Nombres y apellidos	Ciclo	Cédula	Firma
Cristian Garcia Zoto	V	1719078113	
Carlos David Lazo	V	1105823171	
Carlos D. Bustamante A.	V	1105110173	
José Miguel Maza P.	VI	110558483 - 1	
Mario Alejandro Morcayo Morcayo	VI	115073380	
Jomaira Marisol Caero Aulis	VIII	1150436705	
Erika Anabel Arévalo Abad.	VIII	1105996233	
Natalia Georgina betancour medina	VIII	1150582664	
Jonathan Alejandro Paltin Poma	VII	1150237376	
Manuel Eban Quishimbo Ayala	VII	1104446990	
Marlyn Anais Malacatus Bravo	VII	1150075594	
Tanyo Yulisa Agila Cuencas	VII	1150065298	
Mayra Medina	I	1105381246	
Hesly Taquiri	I	1105854697	
Marcos Shuiter Uchuari Negro	I	1150454910	
Jeimy Judith Montano Gonzalez	I	110574032	
Thalia Vasquez-L.	I	1150493177	

Anexo 18.- Registro de asistencia de docentes, difusión de resultados



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
 FACULTAD DE LA SALUD HUMANA  
 CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

**Tema:** Difusión de resultados de Actividad citotóxica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi*.

**Fecha:** 14 de Febrero del 2023

Registro de asistencia: docentes

Nombres y apellidos	Ciclo	Cédula	Firma
Alicia Villavicencio Obando		1104723067	<i>Alicia Villal</i>
Ivanova Zúñiga Román		1900482637	<i>Ivanova</i>
Ma. del Cónce Lucrécia M		1103995062	<i>Ma. del Cónce</i>
Carmen Villauri G	VI	1103457592 -	<i>Carmen Villauri</i>
Angel Guzmán Ramírez	VI	1104490618	<i>Angel Guzmán</i>
Samuel F. delos Rios J	X	1102355797	<i>Samuel F. delos Rios</i>
Luisa Celi Carrión		1104417918	<i>Luisa Celi</i>
Denisse Bermeo Armijos	III	1104882624	<i>Denisse Bermeo</i>



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA  
CARRERA DE LABORATORIO CLINICO**

**Anexo 19.- Evidencias fotográficas**

**Registro de Identificación taxonomía en  
el Herbario Reinaldo Espinoza de la**



*Descripción 1: Planta Plumbago Scandens. L*



*Descripción 2: Preparación del medio de cultivo  
Novy, Nicolle y McNeal (NNN)*



*Descripción 3: Preparación del medio de cultivo  
Schneider Drosophila.*





**Descripción 4:** Promastigotes de *L.naiffi* en medio *Drosophila Schneider*



**Descripción 5:** Placa de 96 pocillos, después del ensayo del MTT, menor coloración mayor inhibición parasitaria, y mayor color, mayor cantidad de parásitos vivos.



**Descripción 6:** Lectura del ensayo de MTT en espectrofotómetro, BioTek-Epoch2

## Anexo 20.- Certificado de pertinencia



UNL

Universidad  
Nacional  
de Loja

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Facultad  
de la Salud  
Humana

Of. Cir. Nro. 2022-0532 -CLC-FSH-UNL  
Loja, 29 de junio de 2022

Señorita  
Maritza Dayana Maldonado Pineda  
**ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DE LA FACULTAD DE  
LA SALUD HUMANA-UNL.**  
Ciudad. –

### De mi consideración:

Por medio del presente, me permito correr traslado el Oficio emitido por el Dr. Luis Morocho Yaguana, docente de la Carrera de Laboratorio Clínico, con respeto a la estructura, coherencia y pertinencia del tema de investigación: "**ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL ACEITE ESENCIAL DE PLUMBAGO SCANDENS L. EN LEISHMANIA NAIFFI**", de su autoría, con la finalidad de que se siga el proceso, quedando aprobado el mismo por parte de esta dependencia; y, se continúe con el proceso correspondiente de conformidad a los Art. 225, 226, 227, 228, 229 y 230 del Reglamento de Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja.

Particular que me permito comunicar para fines legales pertinentes.

Atentamente,



Trasla. digitalizado por:  
SANDRA  
ELIZABETH  
FREIRE CUESTA

Dra. Esp. Sandra Freire Cuesta,  
**DIRECTORA DE LA CARRERA DE  
LABORATORIO CLÍNICO-FSH. UNL.**

Referencia: Correo electrónico  
Anexo: Archivo Secretaría de la Carrera  
Elaborado por: María del C. Salazar L.

## Anexo 21.-Certificado del Herbario “Reinaldo Espinoza” de la UNL



**Universidad Nacional de Loja**  
**Herbario “Reinaldo Espinoza”, LOJA**



Loja, 01 de agosto de 2022.

**Ing. For.**

**Nelson Armando Jaramillo Díaz**  
**TÉCNICO-DOCENTE DEL HERBARIO “REINALDO ESPINOSA” DE LA**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

### **CERTIFICA:**

Certificó que en el Herbario “Reinaldo Espinoza” de la Universidad Nacional de Loja, se realizó el depósito de un espécimen botánico correspondientes al número de colección N° 1, colectado en la provincia de Zamora Chinchipe, cantón Palanda, en el parque central de la ciudad, por parte de la estudiante Maritza Dayanara Maldonado Pineda. Cabe recalcar que este espécimen es parte del estudio del Trabajo de Integración Curricular “Actividad Citotóxica del Aceite Esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi*”.

Debo indicar que los especímenes de interés serán montados e ingresados en la base de datos física y digital del Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja.

Es lo que certifico para los fines pertinentes,



**Nelson Armando Jaramillo Díaz**  
**TÉCNICO-DOCENTE DEL HERBARIO “REINALDO ESPINOSA”-LOJA-**  
Telef.: (+593 7) 2547-275  
E-mail: herbarioloja@unl.edu.ec

## Anexo 22.-Certificado de traducción

Lic. Yanina Guamán

ENGLISH TEACHER

CERTIFICA:

Que el documento aquí compuesto es fiel traducción del idioma español al idioma inglés del resumen del Trabajo de Integración Curricular "Actividad citotóxica del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en *Leishmania naiffi*", autoría de Maritza Dayanara Maldonado Pineda, con número de cédula 0706338704, estudiante de la carrera de Laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja.

Lo certifico en honor a la verdad y autorizo a la interesada hacer uso del presente en lo que a sus intereses convenga

Loja, 15 de marzo de 2023



Lic. Yanina Guamán.

CI: 1900489434