



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS  
AISLADOS DE *Clusia flava* CONTRA *Trypanosoma  
cruzi***

Tesis que presenta:

**MARÍA MAGDALENA URIBE FLORES**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)**

**Mérida, Yucatán, México**

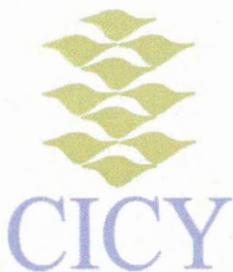
**Febrero 2014**





CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis titulado **Actividad de metabolitos secundarios aislados de *Clusia flava* contra *Trypanosoma cruzi*** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, en la opción de Biotecnología perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

---

Dr. Felipe Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México; febrero de 2014



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales y de Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping, fluid strokes that form a complex, somewhat abstract shape. The signature is written over a horizontal line.

Nombre: María Magdalena Uribe Flores



## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a CONACYT por la beca otorgada número 410043/265004 para que pueda llevar a cabo mis estudios de maestría y desarrollar este proyecto. De igual manera, agradezco al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por las instalaciones prestadas y las oportunidades de crecimiento.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez por la atención y dedicación que me prestó durante el desarrollo de mi proyecto, a los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Marcela Gamboa Angulo y la Dra. Rubí Gamboa León por sus conocimientos, opiniones y consejos otorgados al proyecto.

Le doy las gracias al M. en C. Luis W. Torres Tapia por el apoyo otorgado en el laboratorio de Química de Productos Naturales y a la QFB Carely Arjona Ruiz por toda la ayuda prestada en el laboratorio de Parasitología del Centro de Investigación Regional Dr. Hideyo Noguchi.

Un agradecimiento al M. en C. Salvador Elías Castell González por sus consejos y ayuda intelectual prestada durante mis estudios de maestría y en la elaboración de mi tesis. También, agradezco a mis compañeros de laboratorio y amigos de maestría por sus consejos y por la motivación que me dieron. Y, finalmente, a mis familiares y amigos que me apoyaron durante este tiempo para continuar con mis estudios.



RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA .....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
2.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA .....	4
2.2 DATOS ESTADÍSTICOS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	7
2.3 CICLO DE VIDA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	10
2.4 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS .....	11
<b>3. PRODUCTOS NATURALES PARA EL CONTROL DE <i>T. CRUZI</i>.....</b>	<b>14</b>
3.1 TRABAJOS PREVIOS DE <i>CLUSIA FLAVA</i> .....	19
3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE <i>CLUSIA FLAVA</i> .....	19
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	21
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>22</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>22</b>
CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS ACTIVOS DE <i>CLUSIA FLAVA</i> .....	299
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>299</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>333</b>
2.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES .....	33
2.2 COLECTA DE MATERIAL VEGETAL, SECADO Y MOLIENDA .....	333
2.3 EXTRACCIÓN CON METANOL.....	344
2.4 PARTICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO .....	344
2.5 FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA AL VACÍO (CLV).....	366
2.6 AISLAMIENTO DE CFH-22b1 .....	377
2.7 AISLAMIENTO DE CFH-24d1 .....	377

2.8 AISLAMIENTO DE CFH-37b1 .....	388
2.9 AISLAMIENTO DE CFH-41d1 .....	399
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
3.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	40
3.2 FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA AL VACÍO (CLV).....	40
3.2.1 REPETICIÓN DEL FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS ACTIVOS POR CLV.....	43
3.3 COMPUESTO CFH-22b1 .....	52
3.4 COMPUESTO CFH-24d1 .....	577
3.5 COMPUESTO CFH-37b1 .....	60
3.6 COMPUESTO CFH-41d1 .....	66
<b>4. REFERENCIAS .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE CLUSIA FLAVA CONTRA TRYPANOSOMA CRUZI.....</b>	<b>73</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>73</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>73</b>
2.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES .....	73
2.2 BIOENSAYOS DE INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....	74
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>75</b>
3.1 BIOENSAYOS DE INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES HEXÁNICA, DICLOROMETÁNICA Y DE ACETATO DE ETILO .....	75
3.2 BIOENSAYOS DE INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> CONTRA <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> DE LAS FRACCIONES DE LA CLV .....	76
3.3 BIOENSAYO DE INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> CONTRA <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> (CEPA Z17) DE ESCUALENO .....	77
3.4 BIOENSAYO DE INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> CONTRA <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> CEPA H1.....	788
<b>4. REFERENCIAS .....</b>	<b>799</b>
<b>CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>81</b>
<b>1. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>81</b>
<b>2. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>83</b>

Índice de Figuras	
Figura 1. Tripomastigote de <i>T. cruzi</i> en sangre periférica (Tanowitz <i>et al.</i> , 1992).....	5
Figura 2. Riesgo de transmisión natural para la enfermedad de Chagas (Dumonteil <i>et al.</i> , 2004). .....	7
Figura 3. Representación geográfica de la enfermedad de Chagas en México de 1982 a 2002 (Instituto Nacional de Salud Pública, 2003). .....	9
Figura 4. Ciclo de infección de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Fuente: Centers for Disease Control and Prevention, 2010.....	11
Figura 5. (a) Nifurtimox y (b) Benznidazol (Lamas <i>et al.</i> , 2006). .....	12
Figura 6. Efectos secundarios durante el tratamiento con benznidazol y nifurtimox (Sosa-Estani <i>et al.</i> , 2012). .....	13
Figura 7. <i>Clusia flava</i> en su hábitat natural.....	20
Figura 8. Distribución de <i>Clusia flava</i> en la Península de Yucatán. Fuente: Flora Digital: Península de Yucatán, 2010.....	21
Figura 9. Esquema de particiones de hexano, diclorometano y acetato de etilo a partir del extracto metanólico.....	35
Figura 10. Placas cromatográficas con diferentes sistemas del extracto CFH-2a. ....	41
Figura 11. Placa resumen de la separación de CFH-2a en el sistema Hx/An (1:1). ....	43
Figura 12. Placa resumen de la separación por segunda vez de CFH-2a mediante una CLV en el sistema Hx/An (1:1). .....	45
Figura 13. CCD de CFH-3b de la segunda CLV utilizando el sistema hexano al 100%.....	46
Figura 14. Cromatograma de escualeno (CFH-3b1a).....	47
Figura 15. Cromatograma de escualeno (CFH-3b1b). .....	47
Figura 16. Patrón de fragmentación del escualeno de la base NIST del CG-EM (a) y patrón de fragmentación de CFH-3b1b (b). .....	49
Figura 17. Estructura del escualeno (CFH-3b1b).....	49
Figura 18. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de escualeno (CFH-3b1b); 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> . .....	50
Figura 19. Patrón de fragmentación de 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno de la base NIST (a) y patrón de fragmentación del 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno en CFH-3b1a (b). ..	51
Figura 20. Estructura del 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno (CFH-3b1a).....	51
Figura 21. Placa cromatográfica de CFH-22b1 en un sistema Hx/An (7:3). .....	52
Figura 22. Cromatograma de gases del compuesto CFH-22b1. ....	52

Figura 23. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del compuesto CFH-22b1; 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> .....	53
Figura 24. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto CFH-22b1; 150 MHz, CDCl <sub>3</sub> . ....	54
Figura 25. Espectro de HSQC del compuesto CFH-22b1. ....	56
Figura 26. Espectro de HMBC del compuesto CFH-22b1.....	57
Figura 27. Propuesta del compuesto CFH-22b1-2. ....	57
Figura 28. Placa cromatográfica de CFH-24d1 en el sistema Hx/An (8:2) corrida tres veces. ....	58
Figura 29. Cromatograma de gases del compuesto CFH-24d1. ....	58
Figura 30. Cromatograma de gases acoplado a masas de CFH-24d1. ....	59
Figura 31. Comparación del patrón de fragmentación de CFH-24d1 (a) y patrón de fragmentación del β-sitosterol de la base de datos NIST (b). ....	60
Figura 32. Estructura química del β-sitosterol. ....	60
Figura 33. Placa cromatográfica del compuesto CFH-37b1 en sistema Hx/An (8:2) corrida dos veces.....	61
Figura 34. Cromatograma de gases acoplado a masas del compuesto CFH-37b1.....	61
Figura 35. Comparación del patrón de fragmentación del pico con una proporción de 33.31% (a) con el patrón de fragmentación de α-amirina (b). ....	62
Figura 36. Comparación del patrón de fragmentación del pico con una proporción de 64.14% (a) con el patrón de fragmentación de β-amirina (b). ....	63
Figura 37. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de α- y β-amirina (CFH-37b1); 150 MHz, CDCl <sub>3</sub> . ....	64
Figura 38. Estructuras de α-amirina (A) y de β-amirina (B). ....	66
Figura 39. Placa cromatográfica de CFH-41d1 corrida dos veces en el sistema Hx/An (8:2). ....	66
Figura 40. Cromatograma de gases acoplado a masas del compuesto CFH-41d1.....	67
Figura 41. Comparación del patrón de fragmentación del compuesto CFH-41d1 (a) con el patrón de fragmentación del ácido hexadecanoico (b) en su espectro de masas.....	68
Figura 42. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto ácido hexadecanoico (CFH-41d1); 150 MHz, CDCl <sub>3</sub> . ....	69
Figura 43. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del ácido hexanoico (CFH-41d1); 600 MHz, CDCl <sub>3</sub> .....	69
Figura 44. Estructura del ácido hexadecanoico. ....	70
Figura 45. Cuadro sinóptico resumiendo el trabajo realizado en la presente tesis. ....	83

## Índice de Tablas

Tabla 1. Casos reportados de enfermedad de Chagas en México de 1991 a 2002 (Instituto Nacional de Salud Pública, 2003).....	8
Tabla 2. Productos naturales aislados con actividad antiprotozoaria. ....	15
Tabla 3. Porcentajes de inhibición de <i>T. cruzi</i> realizados en junio de 2011. ....	19
Tabla 4. Compuestos naturales reportados de <i>Clusia flava</i> .....	30
Tabla 5. Rendimiento de los extractos de <i>Clusia flava</i> . ....	40
Tabla 6. Sistemas y fracciones obtenidas de la purificación de CFH-2a en una CLV.....	40
Tabla 7. Sistemas y fracciones obtenidas de la purificación de CFH-2a por segunda vez mediante una CLV.....	43
Tabla 8. Comparación de señales de carbono de betulina y CFH-22b1-1 (datos en ppm). .....	54
Tabla 9. Comparación de señales de carbono de $\alpha$ -amirina y $\beta$ -amirina (datos en ppm). .	64
Tabla 10. Porcentajes de inhibición del extracto metanólico (CFH-1a) y las fracciones hexánica (CFH-2a), diclorometánica (CFH-2b), de acetato de etilo (CFH-2c) y la fracción acuosa (CFH-2d) de hojas de <i>C. flava</i> .....	76
Tabla 11. IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) del extracto metanólico y la fracción hexánica de hojas de <i>C. flava</i> . .....	76
Tabla 12. Porcentajes de inhibición de <i>T. cruzi</i> de las fracciones de la CFH-2a. ....	77
Tabla 13. IC <sub>50</sub> de los extractos metanólico (CFH-1a) y la fracción hexánica (CFH-2a) de hojas de <i>C. flava</i> , y compuestos aislados de la fracción hexánica. ....	78



## RESUMEN

El mal de Chagas es causado por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual ocasiona afecciones al corazón e incluso puede causar la muerte. La enfermedad se distribuye desde Canadá hasta Argentina y Chile. Actualmente, en el mercado sólo hay dos medicamentos disponibles para tratarla, nifurtimox y benznidazol; por otro lado, los compuestos alopurinol, itraconazol y fluconazol se encuentran en pruebas clínicas y no se ha desarrollado una vacuna para la prevención de esta enfermedad. Debido a la falta de eficiencia y efectividad de los medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, es necesaria la búsqueda de nuevos productos naturales que puedan ser desarrollados como nuevos fármacos, para lo cual las plantas medicinales representan una fuente prometedora.

El objetivo de este estudio fue encontrar metabolitos secundarios con actividad tripanocida del extracto metanólico de hojas de *Clusia flava*. La fracción hexánica resultante de la partición del extracto metanólico mostró tener una buena actividad contra epimastigotes de *T. cruzi* ( $IC_{50} = 15.33 \mu\text{g/mL}$  a las 72 horas); de la purificación de esta fracción se obtuvieron fracciones más activas con 100% de inhibición a las 24 h a una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  (CFH-3a y CFH-3b). De dichas fracciones, se detectó a CFH-3b como la más activa, con un porcentaje de inhibición de 62.01% a las 48 h a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  y de la cual se obtuvo el compuesto escualeno con un  $IC_{50} = 9.702 \mu\text{g/mL}$ . De otras fracciones se obtuvieron los compuestos CFH-22b1, CFH-24d1 ( $\beta$ -sitosterol), CFH-41d1 (ácido hexadecanoico) y la mezcla CFH-37b1 ( $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina), los cuales presentaron una actividad moderada contra *T. cruzi*.

**ABSTRACT**

The parasitic Chagas' disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, which is of great importance in America because it causes disorders in the heart and may cause death. The disease is distributed from Canada to Argentina and Chile. In the market there are only two drugs available for the treatment of the disease, nifurtimox and benznidazole; only allopurinol, itraconazole and fluconazole are in clinical trials, and a vaccine for the prevention of this disease has not yet been developed. Due to the lack of efficient and effective medications available for the treatment of Chagas' disease, the search for new natural products is necessary, especially from medicinal plants, which can be developed as new drugs. This study sought to find secondary metabolites with trypanocidal activity from *Clusia flava*. The hexane extract had greater activity against epimastigotes of *T. cruzi* ( $IC_{50} = 15.33 \mu\text{g/mL}$  after 72 hours) and from this extract more active fractions were obtained with 100% of inhibition at 24 h at a concentration of 500  $\mu\text{g/mL}$  (CFH-3a y CFH-3b). From these fractions, CFH-3b was determined as the most active at a concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$  with a percentage of inhibition of 62.01% at 48 h and from which was extracted the compound squalene with a  $IC_{50} = 9.7 \mu\text{g/mL}$ . Within other active fractions other compounds were obtained, such as CFH-22b1, CFH-24d1 ( $\beta$ -sitosterol), CFH-41d1 (hexadecanoic acid), and the mixture CFH-37b1 ( $\alpha$ - and  $\beta$ -amyryn), also showing certain activity against *T. cruzi*.

## CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL PROBLEMA

### 1. INTRODUCCIÓN

El mal de Chagas es la enfermedad parasitaria de mayor importancia en América Latina, tanto por el índice de mortalidad que provoca, así como por el gasto económico que implica el tratamiento de la enfermedad. Por sí sola supera a todas las otras enfermedades parasitarias y se ubica como la tercera enfermedad infecciosa de importancia en la región después del SIDA y la tuberculosis. Esta enfermedad presenta tres fases clínicas, de las cuales únicamente la primera que es la fase aguda es curable; dicha fase dura de una a dos semanas (Rassi Jr *et al.*, 2010). Entre 30-40% de los infectados progresan a la etapa crónica de la enfermedad, y en un periodo de entre 5 a 20 años después de haber adquirido la infección desarrollan enfermedad cardiovascular (cardiomiopatía) o síndrome de megavísceras. La esperanza de vida para estos casos crónicos se reduce entre 5 y 10 años de vida una vez que logran el diagnóstico clínico. La etapa crónica se manifiesta durante el período más productivo de la vida, entre los 35 y 55 años de edad, y requiere del empleo de terapias de soporte costosas, tales como el implante de marcapasos y el trasplante cardíaco en el caso de la cardiomiopatía dilatada (Instituto Nacional de Salud Pública, 2003).

El protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la cual provoca muchas afecciones del corazón en Latinoamérica. Dicha enfermedad ya se ha encontrado distribuida en Canadá, Estados Unidos, Europa, Japón y Australia debido a la migración de la gente (Navarro *et al.*, 2012).

El protozoario posee un amplio rango de hospederos: bovinos, bisontes, búfalos de agua y antílopes, cuyo grado de infección se ha relacionado con la distribución de los vectores de acuerdo a la temperatura y altitud del hábitat. La transmisión natural de dicho protozoario está asociada con un insecto de la familia Reduviidae, que deposita excreciones que contienen tripomastigotes metacíclicos que contaminan el sitio de la picadura (Rodríguez-Vivaz *et al.*, 2003; Sosa-Jurado, 2004).

Existen dos medicamentos en el mercado para tratar la enfermedad de Chagas, nifurtimox y benznidazol. Ambos medicamentos deben ser ingeridos por largos periodos de tiempo para llegar a su dosis efectiva y son menos efectivos en la fase crónica. Dichos medicamentos causan reacciones adversas: los efectos secundarios que causa el benznidazol son dermatitis alérgica, neuropatía periférica, anorexia, pérdida de peso e insomnio; mientras que los efectos secundarios de nifurtimox son polineuropatía, anorexia, pérdida de peso, náusea, vómito, dolor de cabeza, mareo o vértigo (CDC, 2010). Debido a la falta de medicamentos eficientes y efectivos en el mercado para tratar la tripanosomiasis americana es necesaria la búsqueda de nuevos productos naturales, que pueden ser desarrollados como nuevos fármacos para lo cual las plantas medicinales representan una fuente prometedora. En estudios reportados se demostró que el extracto metanólico de las hojas de la planta *Clusia flava* tiene actividad contra *Leishmania mexicana* con un  $IC_{50} = 32 \mu\text{g/mL}$  (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007) y en otros estudios realizados en el Laboratorio de Productos Naturales del CICY se mostró una actividad prometedora contra *T. cruzi*; así, con base en estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue aislar metabolitos responsables de la actividad observada contra *T. cruzi*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA

La enfermedad de Chagas, denominada también tripanosomiasis americana, se caracteriza por ser una infección que cursa clínicamente a partir de una forma aguda hasta llegar a la cronicidad, con un periodo asintomático que puede durar varios años. Tiene como agente causal al protozoario flagelado *T. cruzi* (Figura 1), transmitido principalmente por insectos hematófagos de la familia Reduviidae a los mamíferos incluyendo al hombre (Zavala-Velázquez, 2003). En áreas urbanas los hospederos más importantes son los perros, las gallinas y los humanos (Gurtler *et al.*, 1998; Dumonteil, 1999).



Figura 1. Tripomastigote de *T. cruzi* en sangre periférica (Tanowitz *et al.*, 1992).

La Norma Oficial Mexicana (NOM-032-SSA2-2010) define a la enfermedad de Chagas como la enfermedad causada por el protozoario *T. cruzi*, transmitido entre animales y humanos por triatomíneos o chinches besuconas, siendo los principales transmisores las siguientes especies: *Triatoma dimidiata*, *T. barberi*, *Rhodnius prolixus*, *Dipetalogaster maxima* y el complejo *T. phyllosoma*, aunque todas las chinches hematófagas pueden transmitir el *T. cruzi*.

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas podemos encontrar una lesión inflamatoria, conocida como chagoma, en el sitio de entrada del parásito. La inflamación se expande y se puede llegar a observar una linfadenopatía. Dentro de las células del sistema mononuclear fagocítico ocurre la multiplicación del parásito, la destrucción de células y la reinfección. La mayoría de las personas presentan síntomas leves, pero los niños y, menos frecuentemente, adultos pueden desarrollar síntomas a partir de 1 o 2 semanas de estar en contacto con el vector, siendo la duración de la fase inicial es de 4 a 8 semanas. Al momento de la inoculación se pueden presentar algunos signos que incluyen un edema palpebral unilateral (signo de Romaña) y conjuntivitis. Los síntomas que se pueden presentar son fiebre, hepatoesplenomegalia, náuseas, vómito, diarrea, erupciones, anorexia, lasitud, e irritación meníngea; los infantes infectados de manera congénita presentan fiebre, hepatoesplenomegalia y anemia. Hay una fase indeterminada donde no

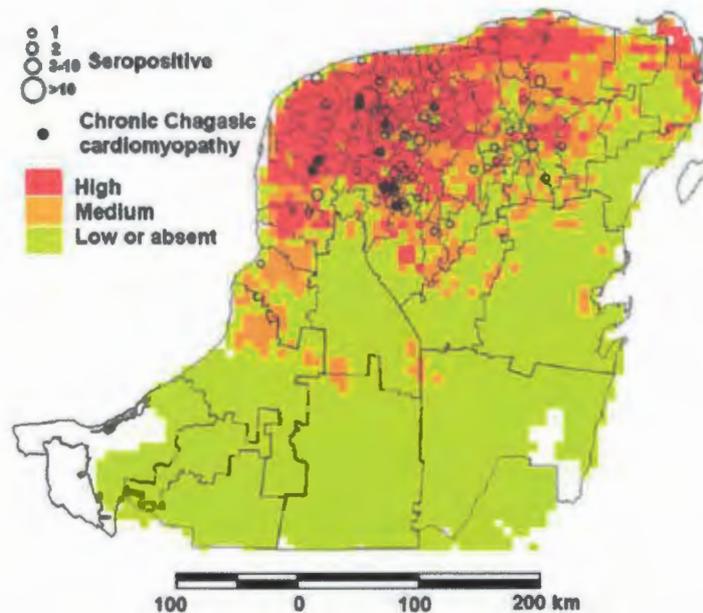
hay síntomas ni parásitos en la sangre, pero persisten anticuerpos contra el parásito. En la fase crónica de Chagas se pueden presentar arritmias, episodios tromboembólicos o insuficiencia cardiaca congestiva. La cardiomiopatía dilatada es una manifestación importante de la enfermedad de Chagas que ocurre años después de la fase aguda. También se puede llegar a presentar disfunción del sistema nervioso autónomo (Rassi Jr *et al.*, 2010).

La cardiomiopatía dilatada que se presenta en la fase crónica de la enfermedad de Chagas llega a causar la muerte de las personas infectadas; se desarrolla en un 30-40% de los individuos infectados 10-30 años después de la fase aguda (Rassi Jr *et al.*, 2010). Debido a que el tratamiento con los medicamentos existentes no detienen el progreso de la cardiomiopatía dilatada, los trastornos del corazón sólo pueden ser tratados sintomáticamente (Cunha-Neto *et al.*, 1996). La mayoría de las muertes provocadas por la infección con *T. cruzi* son como consecuencia de insuficiencia cardiaca durante la fase crónica; en menor proporción hay muertes registradas debido a complicaciones durante la fase aguda (Tarleton *et al.*, 1997).

Las primeras evidencias de la existencia en el estado de Yucatán del parásito y de su existencia en vectores surgen en 1940 con los informes de Eugenio Palomo y Luis Mazzotti. No es sino hasta 1964 cuando Biagi y Tay notifican de nuevo la existencia de *T. cruzi* en nuestro medio al encontrarlo en un pequeño número de triatomas capturadas en Chichen Itzá y Mérida. En 1972 se lleva a cabo la primera investigación formal sobre la enfermedad de Chagas demostrándose una prevalencia de 11.2% (Zavala-Velázquez, 2003).

Se ha demostrado que el principal vector de la enfermedad de Chagas en la península de Yucatán es *T. dimidiata*, comúnmente llamado "pic" en idioma maya, el cual se encuentra más ampliamente distribuido en el norte de la península y presenta mayor riesgo de transmisión de *T. cruzi* en los meses de abril a junio (Dumonteil *et al.*, 2002). El riesgo de infección natural de la enfermedad de Chagas se define como la proporcional a la abundancia de *T. dimidiata* infectada. Los riesgos de transmisión natural son muy altos en la mayor parte del estado de Yucatán, así como en las regiones norte de los estados de Campeche y Quintana Roo. Por el contrario, el sur de Campeche y de Quintana Roo

parecen tener niveles bajos de riesgo de transmisión natural (Dumonteil *et al.*, 2004) (Figura 2).



**Figura 2.** Riesgo de transmisión natural para la enfermedad de Chagas. En la figura se muestran los riesgos de transmisión natural en tres colores diferentes, desde bajo hasta alto. Los círculos blancos y negros indican la localización de los casos seropositivos y cardiopatía chagásica reportados, respectivamente; el tamaño del círculo blanco es proporcional al número de casos (Dumonteil *et al.*, 2004).

## 2.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2013 estimó que la enfermedad de Chagas afecta entre 7-8 millones de personas. Más de un 30% de las personas en etapa crónica desarrollan alteraciones cardíacas y más del 10% desarrolla alteraciones digestivas y/o neurológicas.

A continuación, en la Tabla 1, se muestran los casos reportados de la enfermedad de Chagas en México, remarcando el número de casos en la fase aguda y en la fase crónica de 1991 a 2002. De igual manera, se muestra un mapa de México en el cual se presenta geográficamente la distribución y prevalencia de la enfermedad de Chagas de 1982 a 2002 (Figura 3).

**Tabla 1.** Casos reportados de enfermedad de Chagas en México de 1991 a 2002 (Instituto Nacional de Salud Pública, 2003).

Año	Etapa clínica	
	Aguda	Crónica
1991	24	4
1992	6	2
1993	3	4
1994	11	2
1995	26	10
1996	27	5
1997	26	0
1998	19	4
1999	28	21
2000	17	7
2001	7	4
2002	7	0
<b>Total</b>	<b>201</b>	<b>63</b>



**Figura 3.** Representación geográfica de la enfermedad de Chagas en México de 1982 a 2002 (Instituto Nacional de Salud Pública, 2003).

Los estados de la República Mexicana con la mayor incidencia en 2006 fueron Morelos con 63 casos y una tasa de 3.63 por cada 100,000 habitantes; Quintana Roo con 27 casos y una tasa de 2.39 por 100,000 habitantes; Veracruz 141 casos y una de tasa de 1.93 por cada 100,000 habitantes; Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Colima, Chihuahua, Hidalgo, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas no presentaron casos durante este año. El estado de Yucatán presentó menos de 20 casos reportados (Secretaría de Salud, 2008). En total, hubo 400 casos reportados en 2006 en toda la República Mexicana, 480 en 2007 y 576 en 2008 (Secretaría de Salud, 2008). Sin embargo, estos datos probablemente no representan la situación real de la prevalencia de infección por *T. cruzi* ya que en su mayoría sólo son reportados casos a partir de donaciones de sangre.

Se detectó en 2004 un número estimado de casos seropositivos en madres y recién nacidos en Canadá, Estados Unidos y en México, donde se tuvieron 40,539 madres seropositivas y 2,028 recién nacidos infectados de 3,572,017 casos analizados (Buekens *et al.*, 2008). De 2006 a 2007 se estudió la seroprevalencia en áreas endémicas de Argentina, Bolivia, Honduras y México en donde se observó en Santa Cruz (Bolivia) una seroprevalencia de 28.8%, en Tucumán (Argentina) de 6.6%, en Intibucá (Honduras) de 4.4%, y en Celaya y Mérida (México) de 0.8%, de un total de 2,495 mujeres participantes, siendo la prevalencia media de 5.5% (Sosa-Estani *et al.*, 2008). En Mérida, Yucatán se analizaron 35 perros y sus dueños (75 personas) y se obtuvo un porcentaje de

seropositividad de 34% en perros y de 8% en sus dueños (Jiménez-Coello *et al.*, 2010). En un estudio actual se encontró la seroprevalencia total de dos comunidades rurales en Yucatán con 0.4% en niños y con 2.3% en las madres (Gamboa-León *et al.*, 2014, en publicación).

### 2.3 CICLO DE VIDA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

En el ciclo de vida complejo de *T. cruzi* hay al menos tres formas morfológicas que se pueden identificar: tripomastigotes (forma extracelular sin división) y amastigotes (forma intracelular replicativa), las cuales se encuentran en los hospederos mamíferos, y las formas epimastigotes, que se dividen en el intestino medio de los insectos de la familia Reduviidae. Después de que el insecto vector toma sangre infestada con tripomastigotes, el parásito se transforma en epimastigote y se multiplica en el intestino medio del insecto (Figura 4). Después de 3 a 4 semanas, se presentan tripomastigotes metacíclicos infecciosos en el intestino medio del vector. Los tripomastigotes son depositados a través de la picadura del insecto, que pueden ser fagocitados por macrófagos o pueden penetrar directamente en la célula, donde se transforman en amastigotes intracelulares.

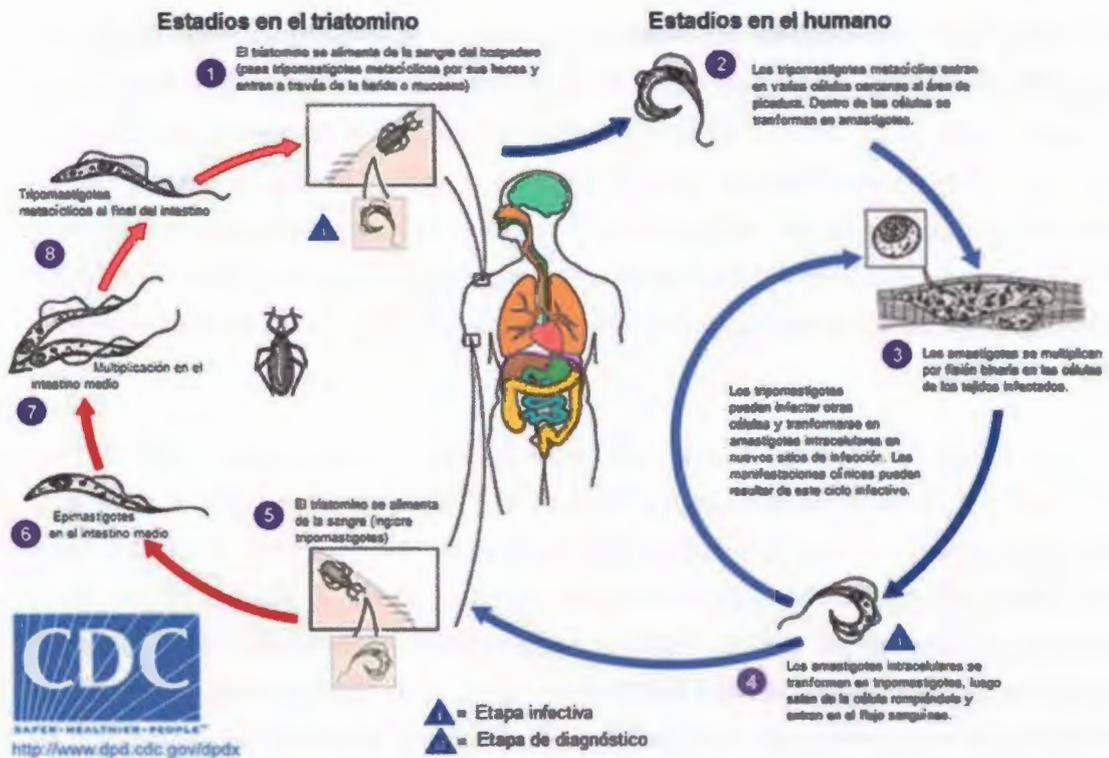


Figura 4. Ciclo de infección de *Trypanosoma cruzi*. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention, 2010.

## 2.4 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Nifurtimox y benznidazol, los dos medicamentos disponibles para el tratamiento de *T. cruzi*, reducen efectivamente la severidad de la enfermedad de Chagas aguda, pero no se aplican ampliamente en la terapia de infecciones crónicas; benznidazol tiene un IC<sub>50</sub> de 1.97 µg/mL (Dardonville *et al.*, 2009) y nifurtimox presenta un IC<sub>50</sub> de 0.91 µg/mL (Santos *et al.*, 2012). De manera comercial, el laboratorio Roche distribuye al benznidazol con los nombres de Radanil® (Argentina) y Rochagan® (Brasil) y el laboratorio Bayer distribuye al nifurtimox con el nombre de Lampit®. Ambos deben ser tomados por periodos extensos y pueden causar efectos secundarios severos. Se ha utilizado nitrofurano (nifurtimox) en la fase aguda, desapareciendo la parasitemia a los 10 días así como la sintomatología (Zavala-Velázquez, 2003). Ninguno de los dos medicamentos está certificado en Europa y Estados Unidos. Estas limitaciones marcan la necesidad de búsqueda de nuevos

compuestos que sean efectivos y puedan reemplazar a estos medicamentos. Aunque se han realizado muchos estudios *in vitro* e *in vivo* y muchos compuestos prometedores se han identificado, sólo tres componentes (alopurinol, itraconazol y fluconazol) han avanzado a las pruebas clínicas (Romanha *et al.*, 2010). Gracias al avance de los conocimientos en la fisiología y bioquímica del parásito, se han podido desarrollar nuevos enfoques para la quimioterapia tales como la biosíntesis de los esteroides e inhibidores del metabolismo de los pirofosfatos, los cuales se encuentran en fase preclínica (Urbina y Docampo, 2003).

En la fase aguda es muy útil el nifurtimox (3-metil-4-[(5-nitrofurfurilideno) amino] tiomorfolina-1,1-dióxido), un derivado del nitrofurano (Figura 5a). En adultos se administra una dosis de 7 a 10 mg por Kg de peso por día (máximo 700 mg al día). En los menores de 15 años, que toleran más el medicamento, la dosis es de 15 mg por Kg de peso, repartidos en tres tomas diarias, durante sesenta días consecutivos. En los casos indeterminados menores de 18 años es útil el nifurtimox a las dosis citadas, para prevenir posibles complicaciones que se presentan en la fase crónica. En casos graves también ha mostrado ser eficaz el benznidazol (*N*-bencil-2-nitroimidazolylacetamide), un derivado del 2-nitroimidazol (Figura 5b) en dosis de 5 mg por Kg de peso al día en todas las edades, repartidas en dos tomas diarias durante treinta días ininterrumpidos. Debe existir vigilancia médica estrecha, en pacientes con antecedentes de daño hepático, renal, pulmonar y hematopatías (NOM-032-SSA2-2010; Lamas *et al.*, 2006).

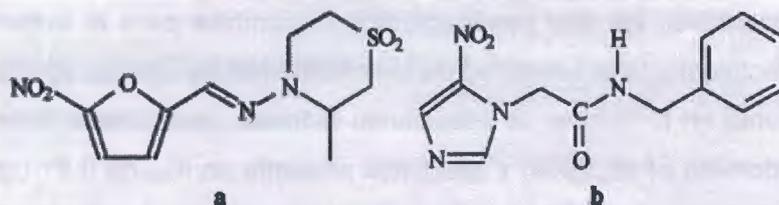


Figura 5. (a) Nifurtimox y (b) Benznidazol (Lamas *et al.*, 2006).

Los efectos secundarios que provoca el tratamiento con benznidazol son dermatitis alérgica, neuropatía periférica, anorexia, pérdida de peso e insomnio. Mientras que entre los efectos secundarios de nifurtimox se encuentra polineuropatía, anorexia, pérdida de peso, náusea, vómito, dolor de cabeza y mareo o vértigo. Las contraindicaciones del

tratamiento incluyen daños severos al hígado y los riñones (CDC, 2010) como se ve en la Figura 6.

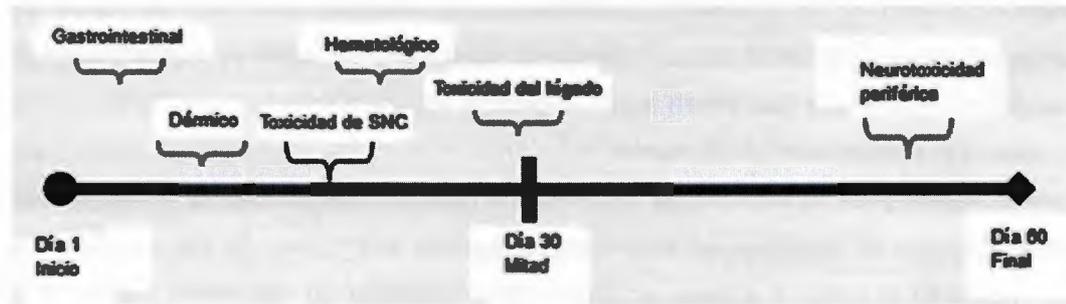


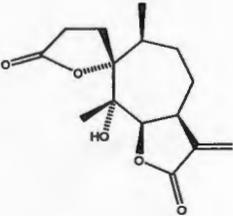
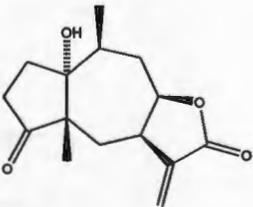
Figura 6. Efectos secundarios durante el tratamiento con benznidazol y nifurtimox (Sosa-Estani *et al.*, 2012).

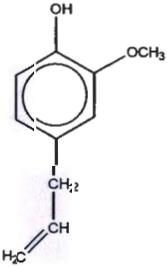
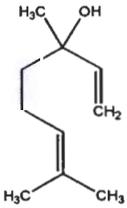
En México se llevan a cabo esfuerzos para obtener recursos adicionales que ayuden a controlar y prevenir esta enfermedad. Ya que no se cuenta con una cura eficiente, se ha establecido el control de vectores de *T. cruzi* como una estrategia para disminuir los casos de infección (Villar, 2001). Entre los resultados obtenidos hasta el momento se encuentran: la inclusión de la enfermedad de Chagas como reporte obligatorio en el Sistema Único de Vigilancia Epidemiológica a partir del año 2003; la aceptación y publicación de la Norma Oficial Mexicana para la Vigilancia Epidemiológica, Prevención y Control de las Enfermedades Transmitidas por Vectores (NOM-032-SSA2-2010); la disposición de benznidazol para tratar todos los casos agudos reportados al programa; elaboración y difusión de materiales de consulta accesibles a todos los médicos de la República Mexicana; además se están retomando los estudios entomológicos para llevar a cabo una estratificación real por áreas de riesgo, de tal manera que se intensifiquen las actividades de control vectorial con uso racional de insecticidas y mejoramiento de vivienda y se está intensificando la vigilancia en los Centros Estatales de Transfusión Sanguínea a fin de que se aplique el tamizaje de manera obligatoria para *T. cruzi*, tal como lo dispone la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SSA2-1993 "Para la Disposición de Sangre Humana y sus Componentes con Fines Terapéuticos" (Secretaría de Salud, 2002).

### 3. PRODUCTOS NATURALES PARA EL CONTROL DE *T. CRUZI*

Los productos naturales provenientes de plantas son una fuente muy importante para nuevos medicamentos. En 2002 el 26% de los medicamentos vendidos eran derivados de productos naturales (Butler, 2004), y se espera que en los próximos años llegue a aumentar el número de medicamentos disponibles en el mercado que sean derivados de productos naturales. Gracias al descubrimiento de productos naturales se pueden sustituir numerosos medicamentos que tienen muchos efectos secundarios en las personas, como es el caso del benznidazol y nifurtimox, ayudando a que los tratamientos sean más efectivos y menos prolongados. Entre los métodos para el descubrimiento de productos naturales útiles en la medicina se encuentra el estudio biodirigido de los compuestos activos, mediante el cual se pueden analizar varios extractos de diferentes plantas e ir fraccionando dichos extractos hasta encontrar el o los compuestos responsables de la actividad. A continuación se muestra la Tabla 2 en la que se enlistan algunos productos naturales que han sido aislados de plantas y que han tenido actividad antiprotozoaria.

**Tabla 2. Productos naturales aislados con actividad antiprotozoaria.**

Planta	Compuesto	Estructura	Forma biológica	Actividad	Referencia
<i>Ambrosia tenuifolia</i> (partes aéreas)	Psilostachyin (Lactona sesquiterpénica)		<i>T. cruzi</i> (epimastigote)	IC <sub>50</sub> de 1.22 µg/mL a las 72 h	Sülsen <i>et al.</i> , 2008
			<i>Leishmania mexicana</i> (promastigote)	IC <sub>50</sub> de 0.12 µg/mL a las 120 h	
<i>Ambrosia tenuifolia</i> (partes aéreas)	Peruvin (Lactona sesquiterpénica)		<i>T. cruzi</i> (epimastigote)	IC <sub>50</sub> de 1.65 µg/mL a las 72 h	Sülsen <i>et al.</i> , 2008
			<i>Leishmania mexicana</i> (promastigote)	IC <sub>50</sub> de 0.39 µg/mL a las 120 h	
<i>Syzygium aromaticum</i> (botones secos del clavo)	Aceite esencial	NA	<i>T. cruzi</i> (epimastigote)	IC <sub>50</sub> de 99.5 µg/mL a las 24 h	Santoro <i>et al.</i> , 2007
			<i>T. cruzi</i> (tripomastigote)	IC <sub>50</sub> de 57.5 µg/mL a las 24 h	

			<i>T. cruzi</i> (epimastigote)	IC <sub>50</sub> de 246 µg/mL a las 24 h	
			<i>T. cruzi</i> (tripomastigote)	IC <sub>50</sub> de 76 µg/mL a las 24 h	
	Eugenol (alilbenceno)				
<i>Ocimum basilicum</i> (hojas e inflorescencias)	Aceite esencial	NA	<i>T. cruzi</i> (epimastigote)	IC <sub>50</sub> de 102 µg/mL a las 24 h	Santoro <i>et al.</i> , 2007
	Linalool (monoterpeno)		<i>T. cruzi</i> (tripomastigote)	IC <sub>50</sub> de 467.5 µg/mL a las 24 h	
			<i>T. cruzi</i> (epimastigote)	IC <sub>50</sub> de 162.5 µg/mL a las 24 h	
			<i>T. cruzi</i> (tripomastigote)	IC <sub>50</sub> de 264 µg/mL a las 24 h	

*Achillea millefolium* Aceite esencial NA  
(planta entera)

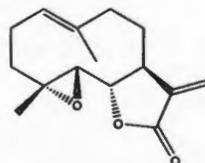
*T. cruzi* (epimastigote) IC<sub>50</sub> de 145.5 µg/mL a las 24 h Santoro *et al.*, 2007

*T. cruzi* (tripomastigote) IC<sub>50</sub> de 228 µg/mL a las 24 h

*Eugenia uniflora* Extracto etanólico NA  
(hojas)

*T. cruzi* (epimastigote) EC<sub>50</sub> de 62.76 µg/mL a las 72 h Santos *et al.*, 2012

*Tanacetum parthenium* (partes aéreas) Partenólido (Lactona sesquiterpénica)

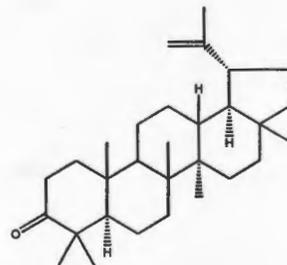


*T. cruzi* (epimastigote) IC<sub>50</sub> de 0.5 µg/mL a las 96 h Izumi *et al.*, 2008

*Serjania yucatanensis* (hojas) Extracto etanólico NA

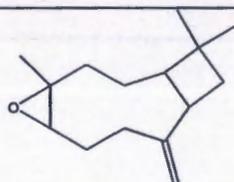
*T. cruzi* (epimastigote) IC<sub>100</sub> de 100 µg/mL a las 48 h Polanco-Hernández *et al.*, 2012

Lup-20(29)-en-3-ona



*T. cruzi* (tripomastigote) IC<sub>50</sub> de >100 µg/mL a las 48 h

Óxido de  $\beta$ -  
Cariofileno

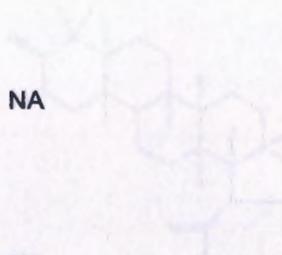


*T. cruzi*  
(tripomastigote)

IC<sub>50</sub> de >100  
 $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h

Mezcla de Lup-  
20(29)-en-3-ona y  $\beta$ -  
Cariofileno

NA



*T. cruzi*  
(tripomastigote)

IC<sub>50</sub> de 80.3  
 $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h

*Bouyeria pulchra* Extracto etanólico NA  
(hojas)

*T. cruzi* (epimastigote) IC<sub>100</sub> de 100  $\mu\text{g/mL}$  a las 48 h Polanco-Hernández *et al.*, 2012

### 3.1 TRABAJOS PREVIOS DE *CLUSIA FLAVA*

Peraza-Sánchez *et al.* (2007) realizaron un escrutinio de la actividad de varias plantas contra *Leishmania mexicana*; en el análisis probaron el extracto metanólico de las hojas de *C. flava* teniendo un IC<sub>50</sub> de 32 µg/mL. A partir de este resultado se realizó un estudio en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. en junio de 2011 en el que se probaron los extractos de metanol (CFH-1a) y las fracciones de hexano (CFH-2a), diclorometano (CFH-2b) y de acetato de etilo (CFH-2c) contra epimastigotes de *T. cruzi* (Tabla 3).

**Tabla 3.** Porcentajes de inhibición de *T. cruzi* realizados en junio de 2011.<sup>a</sup>

Horas	Control	CFH-1a	CFH-2a	CFH-2b	CFH-2c
0	0	0	0	0	0
24	0	20	16	21	17
48	0	26	36	28	30
168	0	51	86	56	53

<sup>a</sup> Concentración de 500 µg/mL

En dicho estudio se observó que la actividad se concentró más en la fracción hexánica (CFH-2a) de las hojas de *C. flava*, por lo cual se cree que dicha fracción debe contener metabolitos con actividad contra *T. cruzi*.

### 3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *CLUSIA FLAVA*

La clasificación taxonómica de *C. flava* es la siguiente de acuerdo a Tropicos, 2012:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Rosanae

Orden: Malpighiales

Familia: Clusiaceae

Género: *Clusia*

Especie: *Clusia flava* Jacq.

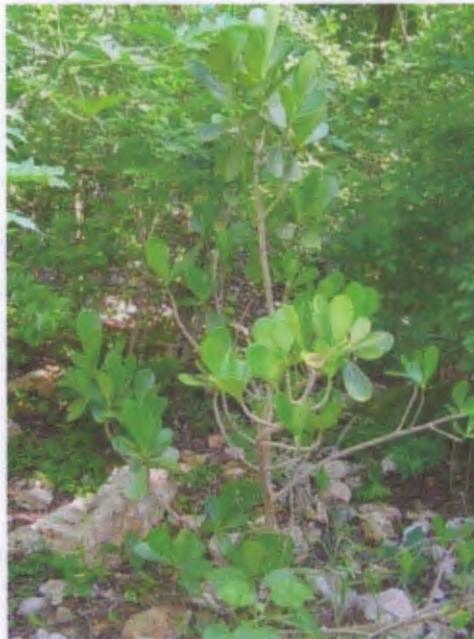
**Sinónimos:**

*Clusia suborbicularis* Lundell

*Clusia utilis* S.F. Blake

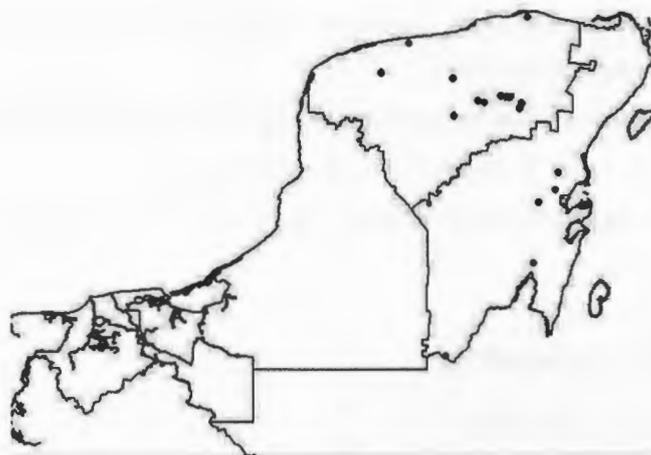
**Nombres comunes:** *chuunup, k' an chuunup*

*Clusia flava* (Figura 7) es un arbusto o árbol pequeño, que en ocasiones se presenta como epífita, con una altitud de 3-12 m. Dentro de los hábitats donde la podemos encontrar están la selva mediana subcaducifolia, selva baja caducifolia, sabana, vegetación acuática (frecuentemente creciendo en cenotes). El clima donde crece es cálido subhúmedo.



**Figura 7.** *Clusia flava* en su hábitat natural.

La especie se encuentra distribuida en México en los estados de Campeche, Chiapas, Morelos, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Figura 8). En cuanto a su distribución general la encontramos desde Centroamérica hasta Costa Rica y Las Antillas.



**Figura 8.** Distribución de *Clusia flava* en la Península de Yucatán. Fuente: Flora Digital: Península de Yucatán, 2010.

Entre los usos que se le da a esta planta encontramos la construcción, para estampar huipiles y medicinal (dolores de cabeza, carminativo, heridas, sífilis). Ocasionalmente, se planta como sombracedero para el ganado (Flora Digital: Península de Yucatán, 2010; Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

#### **4. HIPÓTESIS**

Las hojas de *Clusia flava* contienen metabolitos secundarios que poseen actividad biológica contra *Trypanosoma cruzi*.

#### **5. OBJETIVOS**

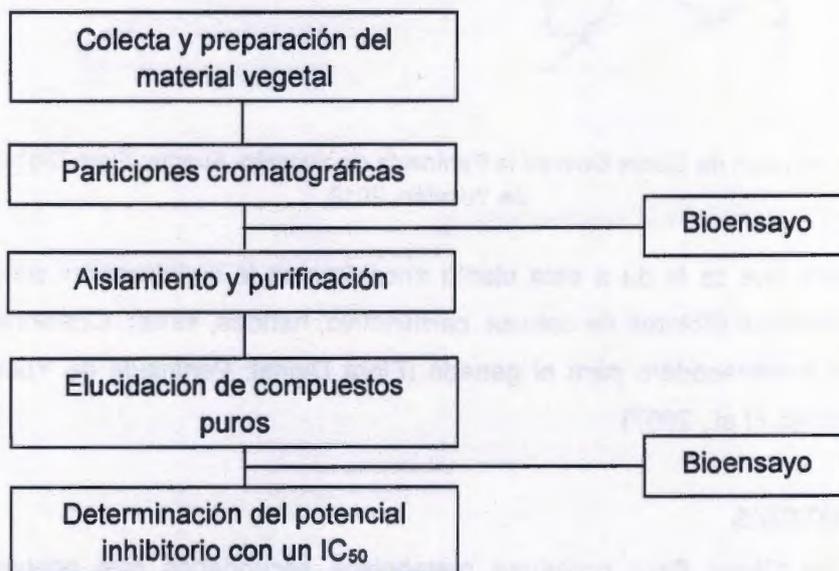
##### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la actividad contra *Trypanosoma cruzi* de compuestos purificados de las hojas de *Clusia flava*.

## 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto metanólico y sus fracciones mediante una partición cromatográfica.
- Seleccionar mediante un bioensayo de inhibición a la fracción o fracciones más activas.
- Purificar las fracciones con mayor porcentaje de inhibición de *Trypanosoma cruzi* mediante técnicas cromatográficas.
- Elucidar las estructuras de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones activas utilizando técnicas de espectroscopía y espectrometría.
- Determinar el IC<sub>50</sub> de la actividad contra *T. cruzi* de los metabolitos secundarios aislados y purificados.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. REFERENCIAS

- Buekens, P.; Almendares, O.; Carlier, Y.; Dumonteil, E.; Eberhard, M.; Gamboa-Leon, R.; James, M.; Padilla, N.; Wesson, D.; Xiong, X. Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North America: why don't we do more? *Maternal and Child Health Journal*, 2008, 12, 283-286.

- Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, **2004**, *67*, 2141-2153.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **2010**. Parasites – American trypanosomiasis. Disponible en: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/> (Tomado el 1 de diciembre, 2011).
- Cunha-Neto, E.; Coelho, V.; Guilherme, L.; Fiorelli, A.; Stolf, N.; Kalil, J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clone in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *The Journal of Clinical Investigation*, **1996**, *98*, 1709-1712.
- Dardonville, C.; Fernández-Fernández, C.; Gibbons, S.; Jagerovic, N.; Nieto, L.; Ryan, G.; Kaiser, M.; Brun, R. Antiprotozoal activity of 1-phenethyl-4-aminopiperidine derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2009**, *53*, 3815-3821.
- Dumonteil, E. Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública de México*, **1999**, *41*, 322-327.
- Dumonteil, E.; Gourbière, S.; Barrera-Pérez, M.; Rodríguez-Félix, E.; Ruiz-Piña, H.; Baños-Lopez, O.; Ramirez-Sierra, M. J.; Menu, F.; Rabinovich, J. E. Geographic distribution of *Triatoma dimidiata* and transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* in the Yucatan Peninsula of Mexico. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **2002**, *67*, 176-183.
- Dumonteil, E.; Gourbière, S. Predicting *Triatoma dimidiata* abundance and infection rate: a risk map for natural transmission of Chagas disease in the Yucatan Peninsula of Mexico. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **2004**, *70*, 514-519.
- Flora Digital: Península de Yucatán. **2010**. *Clusia flava*. Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales disponible en: [http://www.cicy.mx/sitios/Flora%20Digital/ficha\\_virtual.php?especie=1173](http://www.cicy.mx/sitios/Flora%20Digital/ficha_virtual.php?especie=1173) (Tomado el 9 de noviembre, 2011).
- Gamboa-León, R.; Buekens, P.; Dumonteil, E.; Ramirez-Gonzalez, C.; Pacheco-Tucuch, F.; O'Shea, M.; Rosecrans, K.; Pippitt, J. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* among mothers and children in rural Mayan communities and associated reproductive outcomes. **2014**, En publicación.

- Gurtler, R. E.; Cohen, J. E.; Cecere, M. C.; Lauricella, M. A.; Chuit, R.; Segura, E. L. Influence of humans and domestic animals on the household prevalence of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans* populations in northwest Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **1998**, *58*, 748-758.
- Instituto Nacional de Salud Pública. Iniciativa para la vigilancia y el control de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana. **2003**. Pp. 82-85
- Izumi, E.; Morello, L. G.; Ueda-Nakamura, T.; Yamada-Ogatta, S. F.; Dias-Filho, B. P.; Garcia-Cortez, D. A.; Piloto-Ferreira, I. C.; Morgado-Diaz, J. A.; Nakamura, C. V. *Trypanosoma cruzi*: Antiprotozoal activity of parthenolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz Bip. (Asteraceae, Compositae) against epimastigote and amastigote forms. *Experimental Parasitology*, **2008**, *118*, 324-330.
- Jiménez-Coello, M.; Guzmán-Marín, E.; Ortega-Pacheco, A.; Acosta-Viana, K. Y. Serological survey of American trypanosomiasis in dogs and their owners from an urban area of Mérida Yucatán, México. *Transboundary and Emerging Diseases*, **2010**, *57*, 33-36.
- Lamas, M. C.; Villaggi, L.; Nocito, I.; Bassani, G.; Leonardi, D.; Pascutti, F.; Serra, E.; Salomón, C. J. Development of parental formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, *307*, 239-243.
- Liu, Z.L.; Chu, S.S.; Liu, Q.R. Chemical composition and insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* of the essential oils of *Artemisia capillaries* and *Artemisia mongolica*. *Molecules*, **2010**, *15*, 2600-2608.
- Navarro, M.; Navaza, B.; Guionnet, A.; López-Vélez, R. Chagas disease in Spain: Need for further public health measures. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, **2012**, *6*, doi:10.1371/journal.pntd.0001962.
- NOM-032-SSA2-2010. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector. Publicada en el Diario Oficial de la Federación.
- Oliveira, C. M. A.; Porto, A. M.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A. J. Floral resins of *Clusia* spp.: Chemical composition and biological function. *Tetrahedron Letters*, **1996**, *37*, 6427-6430.

- Organización Mundial de la Salud. 2013. Chagas disease (American trypanosomiasis).  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (Tomado el 8 de diciembre, 2013).
- Peraza-Sánchez, S. R.; Cen-Pacheco, F.; Noh-Chimal, A.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Dumonteil, E.; García-Miss, M. R.; Mut-Martín, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatán peninsula. *Fitoterapia*, 2007, 78, 315-318.
- Polanco-Hernández, G.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Acosta-Viana, K.; Chan-Bacab, M. J.; Sagua-Franco, H.; González, J.; Osorio-Rodríguez, L.; Moo-Puc, R. E.; Peña-Rodríguez, L. M. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatan Peninsula. *Parasitology Research*, 2012, 110, 31-35.
- Polanco-Hernández, G.; Escalante-Erosa, F.; García-Sosa, K.; Chan-Bacab, M. J.; Sagua-Franco, H.; González, J.; Osorio-Rodríguez, L.; Peña-Rodríguez, L. M. Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 2012, DOI 10.1007/s00436-012-2861-6.
- Rassi Jr, A.; Rassi, A. y Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet*, 2010, 375, 1388-1402.
- Rodríguez-Vivaz, R. I.; Quifones-Avila, F.; Ramirez-Cruz, G. T.; Ruiz-Piña, H. Presencia del género *Trypanosoma* en la garrapata *Boophilus microplus* en el trópico mexicano. *Revista Biomédica*, 2003, 14, 29-33.
- Romanha, A.J.; Lisboa de Castro, S.; Correia-Soeiro, M. N.; Lannes-Vieira, J.; Ribeiro, I.; Talvani, A.; Bourdin, B.; Blum, B.; Olivieri, B.; Zani, C.; Spadafora, C.; Chiari, E.; Chatelain, E.; Chaves, G.; Calzada, J. E.; Bustamante, J. M.; Freitas-Junior, L. H.; Romero, L. I.; Bahia, M. T.; Lotrowska, M.; Soares, M.; Andrade, S. G.; Armstrong, T.; Degraive, E.; Andrade, Z. A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2010, 105, 233-238.
- Santoro, G. F.; Cardoso, M. G.; Guimaraes, L. G. L.; Mendonca, L. Z.; Soares, M. J. *Trypanosoma cruzi*: Activity of some essential oils from *Achillea millefolium* L.,

- Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Experimental Parasitology*, **2007**, *116*, 283-290.
- Santos, K. K.A.; Matias, E. F.F.; Tintino, S. R.; Souza, C. E.S.; Braga, M. F.B.M.; Guedes, G. M.M.; Rolón, M.; Vega, C.; Rojas de Arias, A.; Costa, J. G.M.; Menezes, I. R.A.; Coutinho, H. D.M. Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Experimental Parasitology*, **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.019>
- Secretaría de Salud. La enfermedad de Chagas en México: Situación de *Rhodnius prolixus*. **2002**. Pp. 12-16.
- Secretaría de Salud. **2008**. Incidencia de la enfermedad de Chagas en la República Mexicana en los últimos 20 años. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem42/pdf/edit4208.pdf> (Tomado el 9 de junio, 2012).
- Secretaría de Salud. **2008**. Programa de acción específico 2007-2012. Otras enfermedades transmitidas por vector. <http://www.cenave.gob.mx/progaccion/ETV.pdf> (Tomado el 28 de diciembre, 2011).
- Sosa-Estani, S.; Colantonio, L.; Segura, E. L. Therapy of Chagas Disease: Implications for levels of prevention. *Journal of Tropical Medicine*, **2012**, doi:10.1155/2012/292138.
- Sosa-Estani, S.; Gamboa-León, M. R.; del Cid-Lemus, J.; Althabe, F.; Alger, J.; Almendares, O.; Cafferata, M. L.; Chippaux, J. P.; Dumonteil, E.; Gibbons, L.; Padilla-Raygoza, N.; Schneider, D.; Belizán, J. M.; Buekens, P.; Working Group. Short Report: Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and México. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **2008**, *79*, 755-759.
- Sosa-Jurado, F.; Zumaquero-Ríos, J. L.; Reyes, P. A.; Cruz-García, A.; Guzmán-Bracho, C.; Monteón, V. M. Factores bióticos y abióticos que determinan la seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en el municipio de Palmar de Bravo, Puebla, México. *Salud Pública de México*, **2004**, *46*, 39-48.
- Sülßen, V. P.; Frank, F. M.; Cazorla, S. I.; Anesini, C. A.; Malchiodi, E. L.; Freixa, B.; Vila, R.; Muschietti, L. V.; Martino, V. S. Trypanocidal and leishmanicidal

- activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2008**, *52*, 2415-2419.
- Tanowitz, H. B.; Kirchoff, L. V.; Simon D.; Morris, S. A.; Weiss, L. M.; Wittner, M. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews*, **1992**, *5*, 400-419.
- Tarleton, R. L.; Zhang, L.; Downs, M. O. Autoimmune rejection of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Immunology*, **1997**, *94*, 3932-3937.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. **2012**. *Clusia flava* Jacq. <http://www.tropicos.org/Name/7800685> (tomado el 9 de junio, 2012).
- Urbina, J. A.; Docampo, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS in parasitology*, **2003**, *19*, 495-501.
- Villar, J. C. Commentary: Control of Chagas' disease: let's put people before vectors. *International Journal of Epidemiology*, **2001**, *30*, 894-895.
- Zavala-Velázquez, J. E. 2003. La enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán, México. *Revista Biomédica*, **2003**, *14*, 35-43.



## CAPÍTULO II. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS ACTIVOS DE *CLUSIA FLAVA*

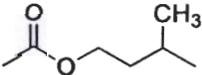
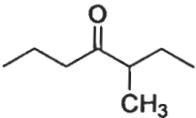
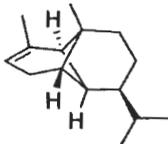
### 1. INTRODUCCIÓN

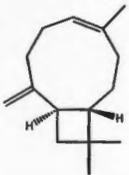
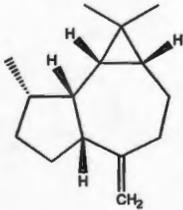
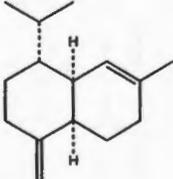
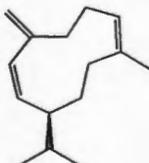
Las plantas han formado la base de los sistemas de la medicina tradicional que se han usado por muchos años en países como India o China. Este sistema se ha seguido utilizando formando una parte importante del cuidado de la salud de muchas personas en el mundo (Newman *et al.*, 2000). A partir de estas plantas se pueden obtener extractos, fracciones o compuestos mediante la utilización de técnicas cromatográficas para su posterior análisis en diferentes pruebas biológicas. A partir de estos productos naturales se pueden obtener medicamentos con menos efectos secundarios y mayor efectividad.

Se ha elegido a la planta *C. flava* ya que en estudios previos reportados en la literatura se observó que el extracto metanólico de las hojas tiene actividad contra *Leishmania mexicana* (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007) y en estudios previos realizados en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. mostró porcentajes de inhibición mayores al 50% después de los 7 días a una concentración de 500 µg/mL, revelando así una actividad prometedora contra *T. cruzi*.

De *C. flava* se ha encontrado la presencia de derivados de ácidos grasos como acetato de 3-metil-butilo (acetato de isoamilo) y 3-metil-4-heptanona, la cual le atribuye un olor similar al plátano. Los alcanos que se han aislado son el decano, undecano, tridecano y pentadecano; se han aislado terpenos como  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, alloaromadendreno,  $\gamma$ -muroleno, germacreno D, biciclogermacreno, (*E, E*)- $\alpha$ -fameseno y  $\delta$ -cadineno (Nogueira *et al.*, 2001). También se ha aislado la epicatequina (Barrios-Chica *et al.*, 1991). En la Tabla 4 se muestran los compuestos encontrados en *C. flava* con su actividad biológica reportada.

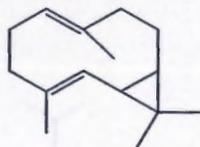
**Tabla 4.** Compuestos naturales reportados de *Clusia flava*.

Nombre	Tipo de compuesto	Estructura	Actividad	Referencia
Acetato de isoamilo	Éster		Característico olor a plátano	Nogueira <i>et al.</i> , 2001
3-metil-4-heptanona	Cetona		Característico olor a plátano	Nogueira <i>et al.</i> , 2001
Decano	Alcano		Antimicrobiana; irritante	Wang <i>et al.</i> , 2011; Kjaergaard <i>et al.</i> , 1989
Undecano	Alcano		Antimicrobiana	Wang <i>et al.</i> , 2011
Tridecano	Alcano		Antimicrobiana; irritación dérmica	Wang <i>et al.</i> , 2011; Muhammad <i>et al.</i> , 2005
Pentadecano	Alcano		Antimicrobiana	Xiangwei <i>et al.</i> , 2006
$\alpha$ -Copaeno	Sesquiterpeno		Feromona para orden Díptera	Shelly, 2001

$\beta$ -Cariofileno	Sesquiterpeno		Antimicrobiana; anestésico; citoprotector gástrico y anti-inflamatorio	Tabanca <i>et al.</i> , 2001; Ghelardini <i>et al.</i> , 2001; Tambe <i>et al.</i> , 1996
$\alpha$ -Humuleno	Sesquiterpeno		Antimicrobiana; Anti-inflamatorio	Ho <i>et al.</i> , 2009; Fernandes <i>et al.</i> , 2007
Allo-aromadendreno	Sesquiterpeno		Antimicrobiana	Yasni <i>et al.</i> , 2009
$\gamma$ -Muroloeno	Sesquiterpeno		Antimicrobiana	Gudzic <i>et al.</i> , 2002
Germacreno D	Sesquiterpeno		Antimicrobiana; insecticida	Tabanca <i>et al.</i> , 2001; Liu <i>et al.</i> , 2010

Bicido-germacreno

Sesquiterpeno



Antimicrobiana

Tabanca *et al.*, 2001

(*E, E*)- $\alpha$ -farneseno

Sesquiterpeno

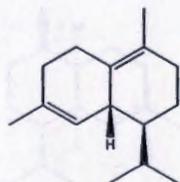


Feromona para *Cydia pomonella*  
(polilla del manzano)

Yan *et al.*, 2003

$\delta$ -Cadineno

Sesquiterpeno

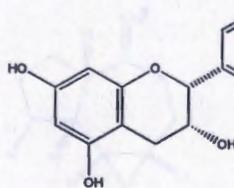


Antimicrobiana

Ho *et al.*, 2009

Epicatequina

Flavanol



Hipotensora; *Trypanosoma cruzi*  
( $IC_{50}$  >90  $\mu\text{g/mL}$ ), *T. brucei*  
*rhodesiense* ( $IC_{50}$  21.2  $\mu\text{g/mL}$ ) y *L.*  
*donovani* ( $IC_{50}$  >30  $\mu\text{g/mL}$ )

Barrios-Chica *et al.*, 1991; Tasdemir *et al.*, 2006

Se han evaluado las hojas de *C. flava* en un estudio de actividad anti-HIV-1 RT, dando un porcentaje de inhibición de 1.0%, por lo que no presentó una actividad significativa para la elucidación del compuesto activo (Huerta-Reyes *et al.*, 2004). De igual manera, se ha evaluado la actividad acaricida de *C. flava* contra las larvas de la garrapata bovina *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, las hojas tuvieron un porcentaje de inhibición de 8.9%, la corteza del tallo un 44.9% y las raíces un 26.1%, no teniendo estos resultados una actividad significativa (Rosado-Aguilar *et al.*, 2010).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. PROCEDIMIENTOS GENERALES

Los disolventes utilizados en este estudio son grado reactivo y destilados en el laboratorio. Para realizar la cromatografía de capa delgada se utilizaron placas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> de soporte de aluminio de 20 × 20 marca Merck. Se usó gel de sílice de la marca Sigma-Aldrich para las columnas cromatográficas con un tamaño de poro de 60Å, con malla de 70-230 y de 230-400. Para la recuperación de los disolventes y concentración de las muestras se utilizó un evaporador rotatorio Büchi 461 y un R-151. Las placas cromatográficas se observaron bajo luz UV de longitudes de onda 365 y 254 nm en un Chromato-Vue® C-75 y fueron reveladas con ácido fosfomolibdico. Las muestras se disolvieron con ayuda de un sonicador Cole-Parmer®. Para analizar la pureza de las muestras se usó un cromatógrafo de gases de Agilent Technologies modelo 7890A con un detector FID usando nitrógeno como gas acarreador. Los espectros de masas fueron obtenidos en un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector selectivo de masas 5975B, de marca Agilent Technologies, con un puerto de inyección *split/splitless*. Para los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-<sup>1</sup>H) y de carbono 13 (RMN-<sup>13</sup>C) se usó un equipo Bruker-Avance 400 de 400 MHz en la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) y un equipo Varian-Agilent 600 MHz en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Mérida).

### 2.2 COLECTA DE MATERIAL VEGETAL, SECADO Y MOLIENDA

Se llevó a cabo la colecta de la parte aérea de la planta *C. flava* alrededor del cenote Xtojil, a 1 Km al sur del poblado de "Libre Unión" camino a Yaxcabá el 6 de octubre de

2011 con ayuda de un taxónomo de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. El número de voucher asignado fue PSimá-3040. En este estudio sólo se usaron las hojas ya que esta parte de la planta resultó activa en un bioensayo contra *L. mexicana*, parásito perteneciente a la misma familia de *T. cruzi* (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

Las hojas se secaron a temperatura ambiente por una semana; durante este tiempo las hojas fueron removidas una vez al día para que el secado fuera uniforme y para evitar la formación de hongos. Posteriormente, las hojas fueron transferidas a la Unidad de Recursos Naturales donde se pusieron a secar a 50-60 °C por 4 días en una cámara de secado. Una vez secas, se prosiguió a la molienda de manera manual, obteniéndose un peso seco de 1,437.7 g.

### **2.3 EXTRACCIÓN CON METANOL**

Se colocó la planta triturada en un recipiente de vidrio y se le agregó 5 litros de metanol y se dejó en maceración por dos días; el disolvente fue recuperado en un evaporador rotatorio y reutilizado para llevar a cabo dos maceraciones adicionales. El lixiviado recuperado fue depositado en un recipiente Pyrex y se dejó secar en la campana. Se obtuvo el extracto metanólico seco (CFH-1a). La muestra fue recuperada en un frasco de vidrio.

### **2.4 PARTICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO**

Se redisolvió la muestra de CFH-1a en 150 mL de metanol y se le agregó 450 mL de agua destilada creando así una disolución hidroalcohólica metanol-agua (1:3). El volumen total de la disolución fue de 600 mL.

Posteriormente se realizaron particiones cromatográficas con hexano (CFH-2a). La primera partición fue en una proporción 2:1, por lo que se agregó 1,200 mL de hexano en un embudo de separación. Después se recuperó el disolvente en un evaporador rotatorio y se prosiguió a realizar dos particiones más con hexano en una relación 1:1. De igual manera se realizaron tres repeticiones de las particiones con diclorometano (CFH-2b) y acetato de etilo (CFH-2c) en proporciones 2:1, 1:1 y 1:1, y al final de las particiones se obtuvo una fracción acuosa (CFH-2d) como se muestra en la Figura 9. El extracto

metanólico y sus respectivas fracciones (hexano, diclorometano, acetato de etilo y la fase acuosa) se evaluaron mediante un bioensayo de inhibición contra *T. cruzi* para determinar la fracción más activa (Capítulo III).

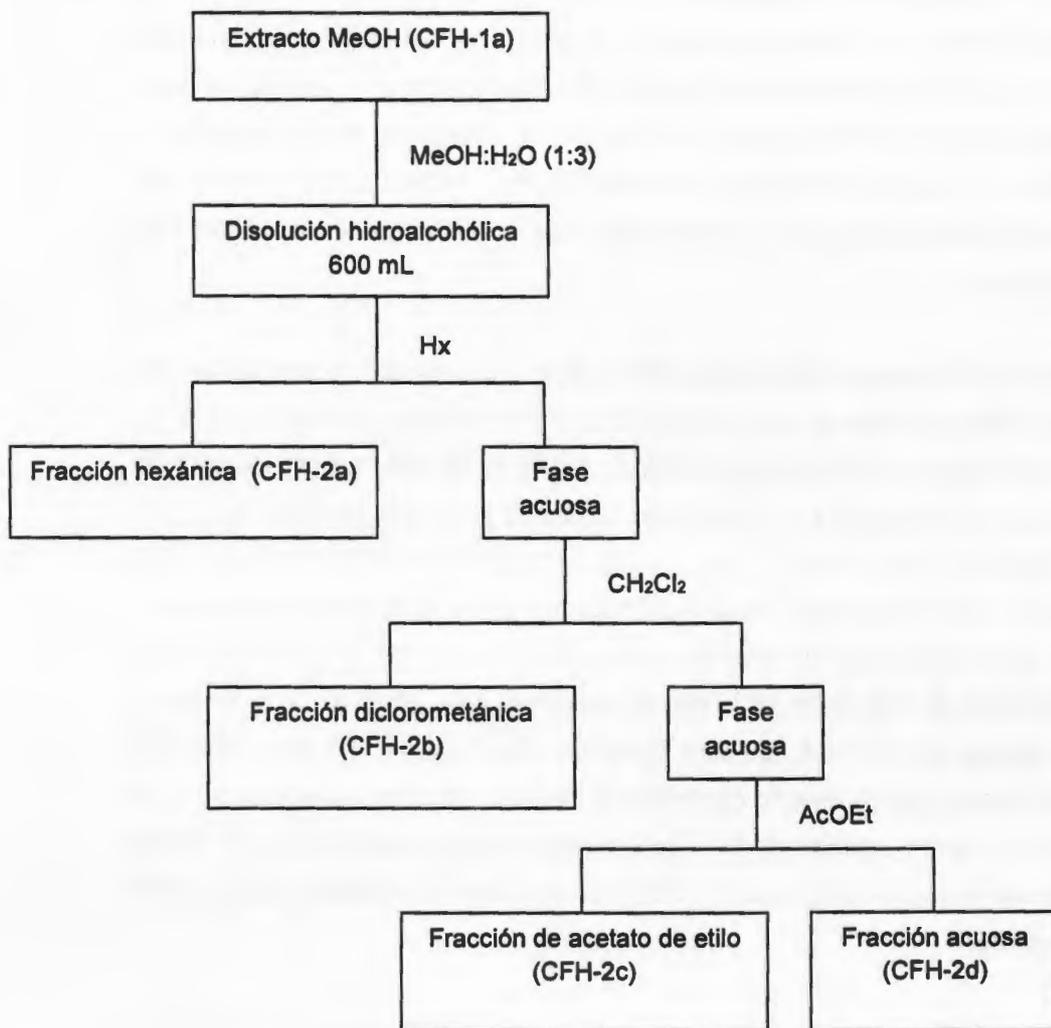


Figura 9. Esquema de particiones de hexano, diclorometano y acetato de etilo a partir del extracto metanólico.

## 2.5 FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA AL VACÍO (CLV)

Como resultado de los bioensayos (Capítulo III) se determinó a la fracción hexánica (CFH-2a) como la más activa contra *T. cruzi*; esta fracción se sometió a una CLV (6 cm de diámetro × 5 cm de altura) con la finalidad de separar los metabolitos secundarios de acuerdo a su polaridad. Las fracciones fueron reunidas de acuerdo a sus perfiles cromatográficos de CCD en diez fracciones finales (CFH-3a a CFH-3j) y concentradas al vacío en un evaporador rotatorio Büchi. Las fracciones obtenidas fueron secadas a temperatura ambiente y se determinó su peso total. Se llevó a cabo una evaluación de cada una de las fracciones obtenidas en un bioensayo de inhibición de *T. cruzi* (como se explica en el capítulo III).

Para el cuerpo de la columna se utilizó gel de sílice grado TLC estándar, 2-25  $\mu\text{m}$ , tamaño de poro de 60 Å. Para la cabeza se utilizaron 10 g de la muestra CFH-2a diluida en diclorometano y se mezcló con 20 g de gel de sílice, malla de 70-230, tamaño de poro de 60 Å, para columna cromatográfica. Los sistemas utilizados se muestran en la tabla 6, el volumen de las fracciones fue de 250 mL. Se realizó una repetición de la CLV usando las mismas condiciones con 15 g de la muestra CFH-2a. De estas fracciones se obtuvo un compuesto puro (CFH-3b1b) con un 99% de similitud en el patrón de fragmentación con 2,6,10,15,19,23-hexametil, 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno de acuerdo a la base de datos NIST del equipo de CG-EM, también conocido como escualeno; Se obtuvieron 209.7 mg de escualeno, que es de una consistencia aceitosa de color amarillo-rojizo. De otra fracción, CFH-3b1a, se pudo observar la presencia de otro compuesto con un patrón de fragmentación de 95% de similitud con 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno de acuerdo a la base de datos NIST.

**Compuesto CFH-3b1 (Escualeno):**  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ ; líquido de color amarillo-rojizo.  $R_f$ : 0.77 en el sistema Hx (100%). RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.52 (18H, s), 1.60 (6H, s), 1.92 (12H, m), 1.98 (8H, m), 5.03 (6H, m). EI-MS (70 eV)  $m/z$  (int. rel.): 410  $[\text{M}]^+$ , 367 (1), 341 (3), 137 (15), 95 (17), 69 (100), 41 (25).

### 2.6 AISLAMIENTO DE CFH-22b1

Se usó 50.3 mg de la fracción CFH-6g que proviene de la fracción CFH-3h de la segunda CLV como se indica en el apartado 2.5 de este mismo capítulo; la fracción fue separada mediante una columna (1.2 cm de diámetro × 17.5 cm de altura) con Sephadex LH-20 y eluida con el sistema Hx/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (2:1:1), obteniéndose las fracciones finales CFH-21a y CFH-21b. De estas dos fracciones se purificó la fracción CFH-21b (6.5 mg) utilizando una columna (1.2 cm de diámetro × 17.5 cm de altura) empacada con Sephadex en MeOH, de la cual se obtuvo el compuesto CFH-22b1 (4.9 mg). Este compuesto es un polvo de color amarillo, no se observa a luz UV y es soluble en cloroformo.

Se analizó la pureza del compuesto CFH-22b1 en el cromatógrafo de gases con una temperatura inicial de 170 °C por 4 minutos, una rampa de 20 °C/min hasta llegar a 300 °C, 300 °C por 12 minutos usando una columna HP-5 y con 300 °C en el inyector. Posteriormente, se le realizaron estudios de resonancia magnética de protón y carbono en los cuales se encontraron la presencia de dos compuestos, un triterpeno de tipo lupano (CFH-22b1-1) en menor proporción y otro compuesto en mayor proporción (CFH-22b1-2).

**Compuesto CFH-22b1-2:** C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>8</sub>; polvo de color amarillo. R<sub>f</sub>: 0.28 en el sistema Hx/An (8.5:1.5). RMN-<sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.86 (2H, dd), 3.70 (3H, s), 3.84 (6H, s). RMN-<sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 43.1, 52.0, 52.0, 53.2, 73.3, 170.2, 173.8.

### 2.7 AISLAMIENTO DE CFH-24d1

Se separó la fracción CFH-3g (230.4 mg) de la primera CLV en una columna (2.5 cm de diámetro × 48 cm de altura) empacada con Sephadex en MeOH en la que se obtuvieron nueve fracciones (CFH-13a a CFH-13i). La fracción CFH-13f (30.7 mg) se separó en una columna de gravedad (1 cm de diámetro × 43 cm de altura) empacada con gel de sílice malla 230-400 utilizando el sistema Hx/An (9:1); se obtuvieron fracciones de la CFH-14a a la CFH-14l. Se tomó 139.2 mg de la fracción CFH-13g y se purificaron por una columna (1 cm de ancho × 28 cm de altura) empacada con gel de sílice de malla 70-230, siendo los sistemas utilizados Hx/An (9:1) y Hx/An (8:2); se obtuvieron fracciones de la CFH-16a a la CFH-16ñ. La fracción CFH-16b fue separada en una columna de Sephadex (1.2 cm de

diámetro × 17.5 cm de altura) en el sistema Hx/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (2:1:1) donde se obtuvieron las fracciones CFH-18a y CFH-18b. Se juntaron las fracciones CFH-16a, 16b, 16c, 16d, 18a y 18b debido a que presentaban similitud en la placa cromatográfica y se nombró a esta fracción CFH-16-18 (53.3 mg); dicha fracción fue purificada en una columna de gravedad (1 cm de ancho × 33 cm de altura) empacada con gel de sílice malla 230-400, usándose el sistema Hx/An (9:1); en dicha columna se obtuvo el compuesto CFH-24d1 (3.4 mg) como un polvo blanco y que es soluble en cloroformo. Se inyectó al cromatógrafo de gases, usando como temperatura inicial 170 °C por 4 minutos, siguió una rampa de 20 °C/min hasta llegar a los 300 °C, que se mantuvo por 12 minutos; se usó una columna HP-5 y la temperatura en el inyector era de 300 °C. De acuerdo al patrón de fragmentación, tiene un 98% de similitud con 22,23-dihidrostigmasterol también conocido como β-sitosterol.

**Compuesto CFH-24d1 (β-sitosterol):** C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O; polvo de color blanco. R<sub>f</sub>: 0.28 en el sistema Hx/An (9:1). EI-MS (70 eV) *m/z* (int. rel.): 414 [M]<sup>+</sup> (60), 399 (24), 396 (31), 381 (23), 273 (14), 255 (18), 105 (35), 43 (100).

## 2.8 AISLAMIENTO DE CFH-37b1

La fracción CFH-3f (3.8 g) se separó en una columna flash utilizando una columna empacada hasta 33 cm con gel de sílice de 230-400 y un sistema CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/An (9:1), obteniéndose nueve fracciones, de la CFH-34a a la CFH-34i. Se tomó 712.5 mg de la fracción CFH-34c y se pasaron a través de una columna empacada de Sephadex en EtOH hasta 22.5 cm de altura, obteniéndose seis fracciones, de la CFH-36-1a a la CFH-36-1f. De estas fracciones se purificó la fracción CFH-36-1c en una columna flash empacada hasta 30 cm de altura con gel de sílice con el sistema Hx/An (8:2); de esta columna se obtuvo 209 mg del compuesto CFH-37b1, el cual presentaba la apariencia de un polvo blanco.

La fracción CFH-37b1 se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a masas, usando una temperatura inicial de 140 °C por 4 minutos, siguió una rampa de 10 °C/min hasta llegar a los 300 °C, la cual se mantuvo por 30 minutos. Se observó la presencia de dos compuestos en un proporción de 64.14% y de 33.31%, que de acuerdo al patrón de

fragmentación se trata de  $\beta$ -amirina con un 86% de similitud y de  $\alpha$ -amirina con un 93% de similitud, respectivamente. Dichos compuestos se terminaron de identificar con un estudio de RMN- $^{13}\text{C}$ .

**$\alpha$ -amirina:**  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ; polvo de color blanco.  $R_f$ : 0.33 en el sistema Hx/An (9:1). EI-MS (70 eV)  $m/z$  (int. rel.): 426  $[\text{M}]^+$  (4), 218 (100), 189 (17), 95 (17), 69 (16), 43 (11).

**$\beta$ -amirina:**  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ ; polvo de color blanco.  $R_f$ : 0.33 en el sistema Hx/An (9:1). EI-MS (70 eV)  $m/z$  (int. rel.): 426  $[\text{M}]^+$  (16), 257 (6), 218 (100), 189 (39), 161 (19), 135 (33), 95 (34), 55 (27).

### 2.9 AISLAMIENTO DE CFH-41d1

Se tomó 61.1 mg de CFH-34h (apartado 2.8) y se separó en una columna empacada hasta 27 cm de altura con Sephadex hasta en MeOH; se obtuvieron dos fracciones, CFH-40a y CFH-40b. La fracción CFH-40b se volvió a poner en la columna de Sephadex en MeOH y se obtuvo 2.9 mg del compuesto CFH-41d1 con apariencia de polvo blanco.

El compuesto CFH-41d1 se inyectó al cromatógrafo de gases acoplado a masas y se determinó, con un 94% de similitud en el patrón de fragmentación con la base de datos NIST, que se trataba del compuesto conocido como ácido hexadecanoico. De igual manera, su estructura fue corroborada con estudios de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$ .

**Compuesto CFH-41d1 (ácido hexadecanoico):**  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ ; Sólido blanco;  $R_f$ : 0.30 en el sistema Hx/An (8.5:1.5). RMN- $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.81 (3H, t,  $J = 7.0$  Hz), 1.19 (25H, m), 1.56 (2H, q,  $J = 7.0$  Hz), 2.28 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz). RMN- $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.5 (1-COOH), 33.8 (C-2), 31.9 (C-3), 29.7 (C-4), 29.7 (C-5), 29.6 (C-6), 29.6 (C-7), 29.6 (C-8), 29.6 (C-9), 29.4 (C-10), 29.3 (C-11), 29.2 (C-12), 29.0 (C-13), 24.7 (C-14), 22.7 (C-15), 14.1 (C-16). EI-MS (70 eV)  $m/z$  (int. rel.): 256  $[\text{M}]^+$  (29), 213 (26), 129 (44), 97 (21), 73 (100), 55 (74).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El peso total de las hojas secas obtenidas de *C. flava* fue de 1,437.7 g. A partir de este material se realizó la extracción con metanol obteniéndose un extracto metanólico de color oscuro muy viscoso y con un peso de 365.7 g. Este extracto metanólico se sometió a una serie de particiones con hexano, diclorometano y acetato de etilo, obteniéndose fracciones con rendimientos variados (Tabla 5). Se obtuvo un mayor rendimiento de la fracción diclorometánica. La fracción más activa contra *T. cruzi* (Capítulo III) fue la fracción hexánica, la cual presentó el menor rendimiento de todas las fracciones, con un 12.91%.

Tabla 5. Rendimiento de los extractos de *Clusia flava*.

Material	Peso (g)	Rendimiento (%)
Extracto metanólico (CFH-1a)	365.7	25.44*
Fracción hexánica (CFH-2a)	47.2	12.91**
Fracción diclorometánica (CFH-2b)	125.5	34.32**
Fracción de acetato de etilo (CFH-2c)	58.8	16.08**
Fracción acuosa (CFH-2d)	83.05	22.71**

\*Porcentaje basado en el peso de las hojas secas

\*\*Porcentaje basado en el peso del extracto metanólico

#### 3.2 FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS ACTIVOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA AL VACÍO (CLV)

Se realizaron placas cromatográficas del extracto CFH-2a que resultó más activo en el bioensayo de inhibición (Capítulo III) para establecer el sistema a emplear en la cromatografía líquida al vacío. En la Figura 10 se observan los sistemas eluidos en placa de CCD.

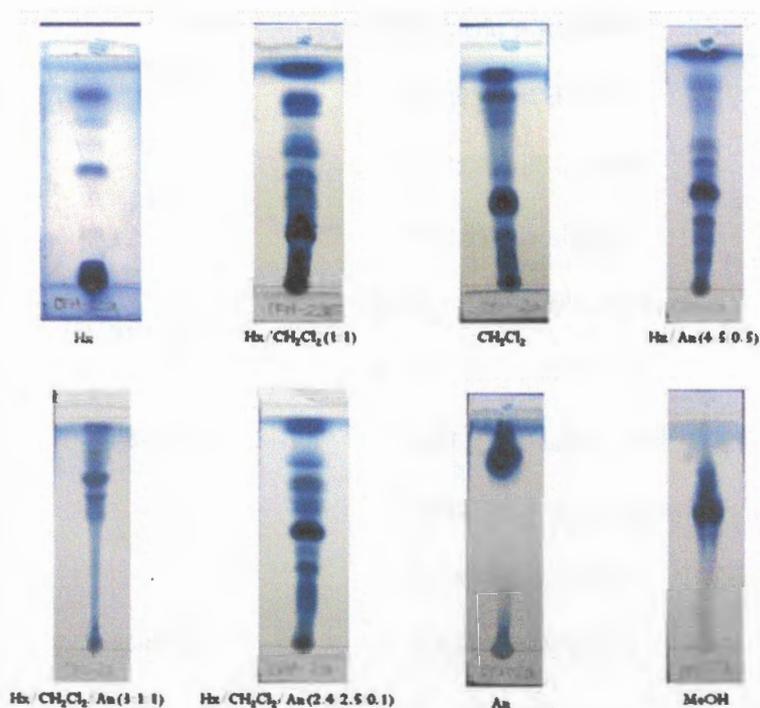


Figura 10. Placas cromatográficas con diferentes sistemas del extracto CFH-2a.

En la CLV se obtuvieron 10 fracciones reunidas de acuerdo al patrón que presentaron en la distribución de metabolitos (Figura 11). A continuación en la Tabla 6 se muestran los sistemas que se usaron, las fracciones finales y el peso de las fracciones reunidas.

Tabla 6. Sistemas y fracciones obtenidas de la purificación de CFH-2a en una CLV.

Número de fracción	Sistemas	Fracciones finales	Peso (g)
1A	Hx	CFH-3a	0.4593
1B	Hx	CFH-3b	0.1226
2	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (230:20)	CFH-3c	0.0914

---



---

3	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (200:50)		
4	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (175:75)	CFH-3d	0.9262
5	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (150:100)		
6	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (125:125)	CFH-3e	1.8264
7A	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (125:115:10)		
7B	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (125:115:10)	CFH-3f	3.7961
8	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (75:165:10)	CFH-3g	0.2304
9	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (25:215:10)		
10	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (240:10)	CFH-3h	0.3297
11	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (200:50)	CFH-3i	0.5737
12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (150:100)		
13	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (100:150)		
14A	An		
14B	An	CFH-3j	2.5626
15	An/EtOH (125:125)		
16	EtOH		

---

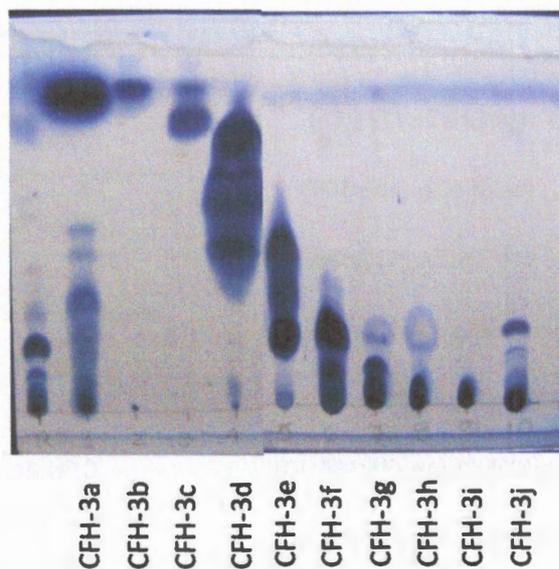


Figura 11. Placa resumen de la separación de CFH-2a en el sistema Hx/An (1:1).

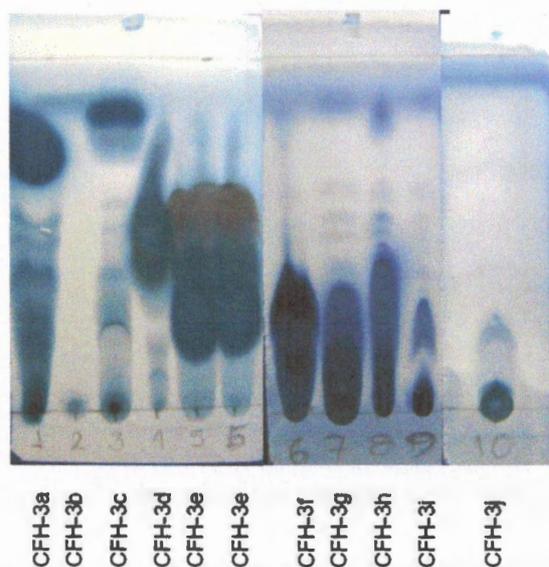
### 3.2.1 REPETICIÓN DEL FRACCIONAMIENTO DE EXTRACTOS ACTIVOS POR CLV

La segunda CLV mostró similitud con la primera, los metabolitos se distribuyeron de manera semejante. Es por ello que se reunieron las fracciones de la misma manera en que se reunieron las fracciones de la primera CLV (Tabla 6) como se muestra en la placa resumen de la Figura 12. En la Tabla 7 se pueden observar los rendimientos de las fracciones.

Tabla 7. Sistemas y fracciones obtenidas de la purificación de CFH-2a por segunda vez mediante una CLV.

Número de fracción	Sistemas	Fracciones finales	Peso (g)
1A	Hx	CFH-3a	0.5095
1B	Hx	CFH-3b	0.2097
2	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (230:20)	CFH-3c	0.0581

3	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (200:50)	CFH-3d	1.811
4	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (175:75)		
5	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (150:100)	CFH-3e	3.8703
6	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (125:125)		
7A	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (125:115:10)	CFH-3f	7.1029
7B	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (125:115:10)		
8	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (75:165:10)	CFH-3g	0.8007
9	Hx/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (25:215:10)	CFH-3h	0.8435
10	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (240:10)		
11	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (200:50)	CFH-3i	1.9669
12	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (150:100)		
13	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /An (100:150)		
14A	An	CFH-3j	3.8768
14B	An		
15	An/EtOH (125:125)		
16	EtOH		



**Figura 12.** Placa resumen de la separación por segunda vez de CFH-2a mediante una CLV en el sistema Hx/An (1:1).

De acuerdo a los bioensayos realizados con las fracciones de CFH-2a (Capítulo III), las fracciones más activas son CFH-3a, CFH-3b y CFH-3h. Como se observa en las figuras 19 y 20, CFH-3a y CFH-3b comparten metabolitos por lo que se deduce que la actividad es debida a un metabolito en común. Se decidió trabajar con CFH-3b ya que presenta mayor pureza; al correr en CCD se observó que corría sólo una mancha (Figura 13). Es por ello que se analizaron las muestras de CFH-3b de la primera y segunda CLV con un cromatógrafo de gases acoplado a masas (CG-EM); dichas fracciones se renombraron como CFH-3b1a (de la primera CLV) y CFH-3b1b (de la segunda CLV).



**Figura 13.** CCD de CFH-3b de la segunda CLV utilizando el sistema hexano al 100%.

Las fracciones CFH-3b1a y CFH-3b1b fueron diluidas en diclorometano y analizadas en un CG-EM. En el cromatograma de CFH-3b1a se puede observar la presencia de dos picos (Figura 14), uno en mayor proporción (31.669% del total) con un tiempo de retención (Tr) de 16.687 minutos y otro pico (18.353% del total) con un Tr de 5.851 minutos. En el cromatograma de CFH-3b1b (Figura 15) se puede observar la presencia de un pico mayoritario (73.305% del total) con un Tr de 16.715 minutos, por lo que dicho compuesto debe poseer la actividad contra *T. cruzi* como lo muestra la fracción. De acuerdo a esto, la fracción CFH-3b1b es la más pura por lo que el compuesto se probó en un bioensayo de inhibición contra *T. cruzi* (Capítulo III). El compuesto con tiempo de retención de 16.687 minutos presentó un patrón de fragmentación (Figura 16) con un 99% de similitud con el compuesto 2,6,10,15,19,23-hexametil,2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, también conocido como escualeno (Figura 17). De dicho compuesto se obtuvo 209.7 mg y es de color amarillo-rojizo con una consistencia aceitosa.

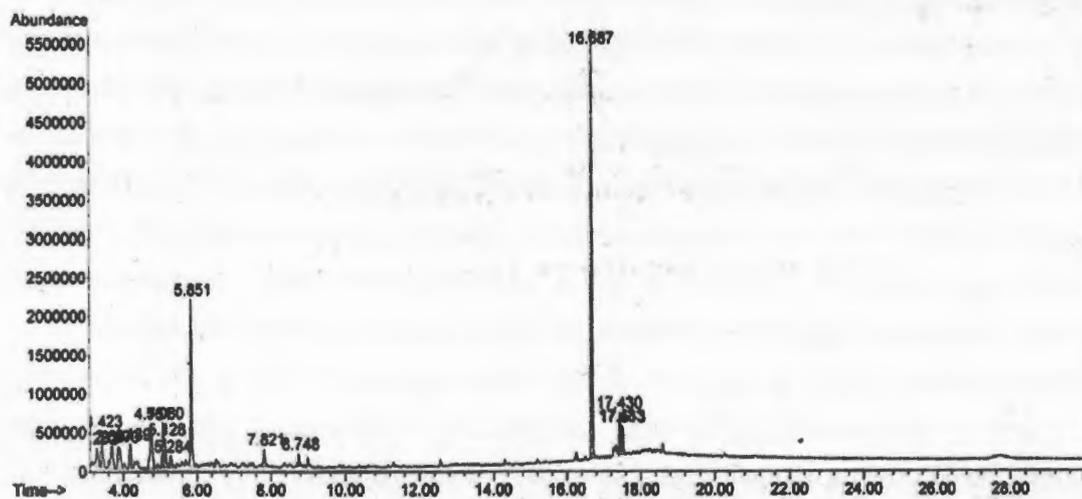


Figura 14. Cromatograma de escualeno (CFH-3b1a).

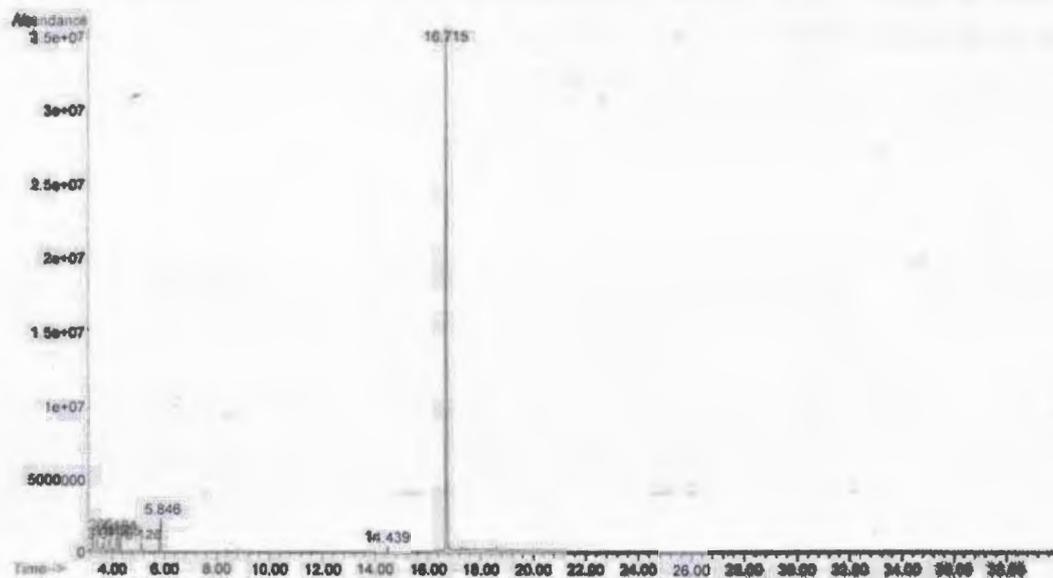


Figura 15. Cromatograma de escualeno (CFH-3b1b).

El escualeno (Figura 17) es un triterpeno poli-insaturado que contiene seis unidades de isopreno y es un precursor bioquímico del colesterol y otros esteroides. Se distribuye

ampliamente en la naturaleza, especialmente en las aceitunas, aceite de hígado de tiburón, salvado de arroz y germen de trigo. Se le ha atribuido las propiedades de inhibir el desarrollo de varios tumores y como antioxidante (Harivardhan-Reddy and Couvreur, 2009). De acuerdo al patrón de fragmentación, el escualeno tiene un peso molecular de 410 uma (Figura 16), donde el pico más abundante ( $m/z$  69) corresponde a la pérdida de una unidad de isopreno, acompañado por un ión a  $m/z$  341, mientras que el ion a  $m/z$  367 se formó por pérdida de un propil de masa 43 (Oyugi *et al.*, 2011). La estructura del escualeno fue corroborada por un análisis de RMN- $^1\text{H}$  en la que se ven las señales de los grupos metilo a  $\delta$  1.52 y 1.60, así como de los grupos metileno a  $\delta$  1.92 y 1.98 (Figura 18). Sin embargo, se pueden observar otras señales que no pertenecen a la estructura del escualeno lo cual indica que la muestra se encuentra con trazas de otros compuestos.

El escualeno no había sido reportado en *C. flava*, por lo que es un hallazgo importante, pero sí se encuentra reportado en otras especies del género *Clusia*, como en *C. coclensis*, *C. liesneri*, *C. multiflora*, *C. osseocarpa*, *C. peninsulae*, *C. stenophylla* y *C. triflora* (Medina *et al.*, 2006).

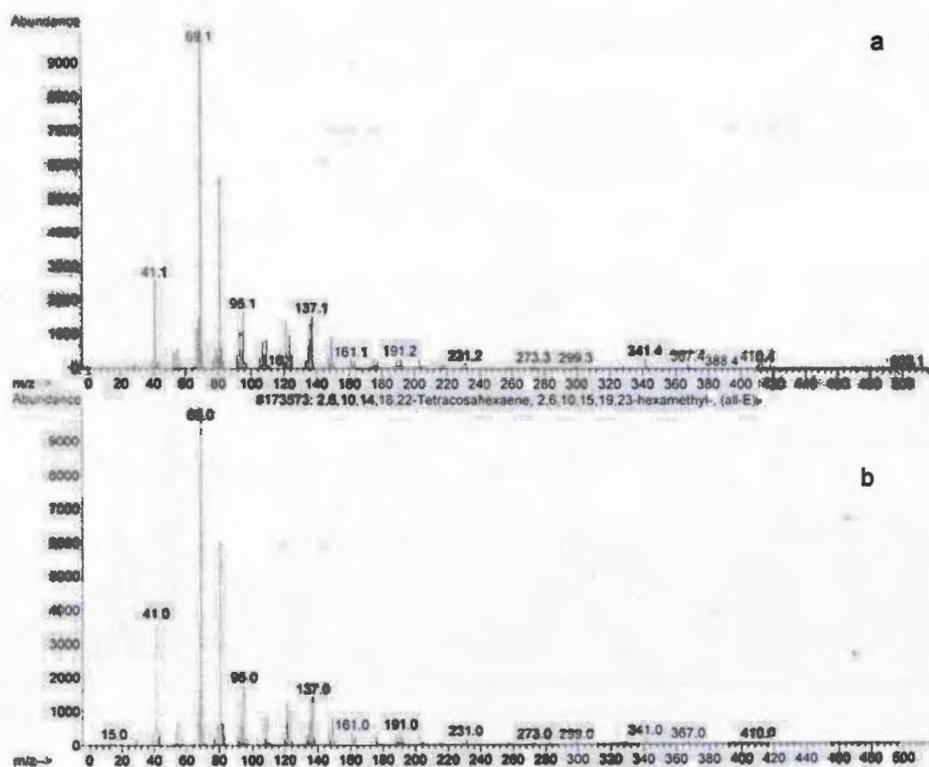
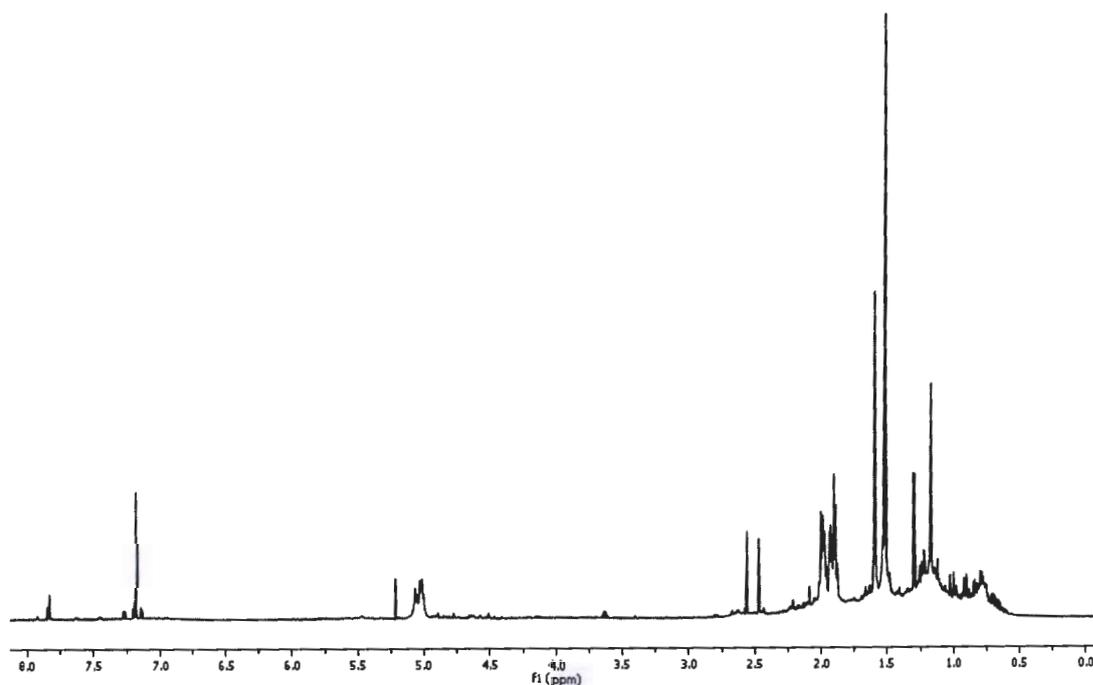


Figura 16. Patrón de fragmentación del escualeno de la base NIST del CG-EM (a) y patrón de fragmentación de CFH-3b1b (b).



Figura 17. Estructura del escualeno (CFH-3b1b).



**Figura 18.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de escualeno (CFH-3b1b); 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>.

En el cromatograma de CFH-3b1a se observa otro pico predominante con un Tr de 5.851 minutos; el patrón de fragmentación del espectro de masas de este pico (Figura 19) fue comparado con la base de datos NIST y se encontró similitud de 95% con el compuesto nombrado como 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno (Figura 20), compuesto que no había sido reportado en *C. flava* y por lo tanto enriquece el conocimiento fitoquímico de esta planta.

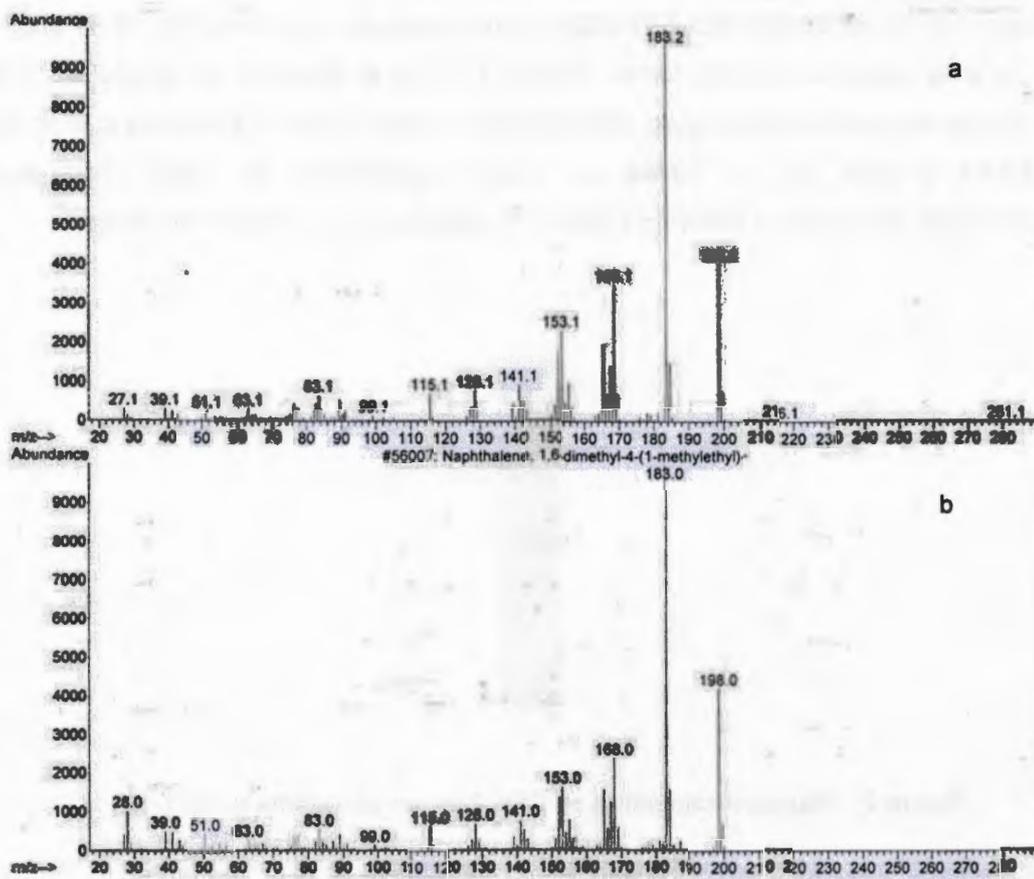


Figura 19. Patrón de fragmentación de 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno de la base NIST (a) y patrón de fragmentación del 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno en CFH-3b1a (b).

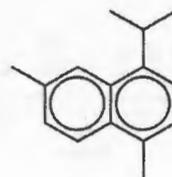


Figura 20. Estructura del 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno (CFH-3b1a).

### 3.3 COMPUESTO CFH-22b1

Se obtuvo 4.9 mg del compuesto CFH-22b1, como polvo de color amarillo, no se observa a luz UV y se disuelve en cloroformo (Figura 21). En el espectro de gases se puede observar que se encuentra casi puro obteniéndose un pico a los 4.04 minutos con un área de 43.81% (Figura 22) y trazas en menor proporción de otros compuestos. Posteriormente, se mandó a RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C disuelto en cloroformo deuterado.



Figura 21. Placa cromatográfica de CFH-22b1 en un sistema Hx/An (7:3).

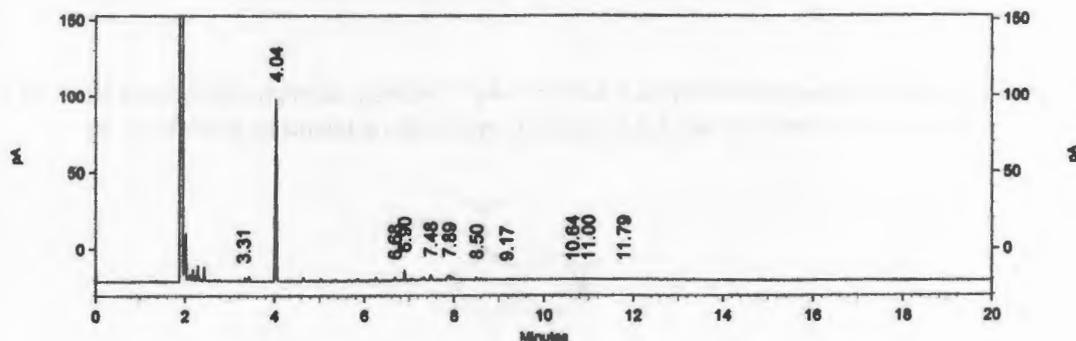


Figura 22. Cromatograma de gases del compuesto CFH-22b1.

En el espectro de protón (Figura 23) se puede observar la presencia de un triterpeno de tipo lupano (CFH-22b1-1) debido a seis señales características de metilos a  $\delta$  0.75, 0.82, 0.93, 0.96, 0.97 y 1.25. Además, se puede ver la presencia de un metilo exocíclico más

desprotegido a  $\delta$  1.69 y un protón base de alcohol a  $\delta$  3.19. La mayoría de las señales del espectro de carbono (Figura 24) de este compuesto son similares a las señales de carbono que se reportan del compuesto betulina de acuerdo a Kuo-Ching *et al.* (2004) (Tabla 8); sin embargo, hay otras señales que difieren de las reportadas por lo que no se trata del compuesto betulina pero sí de un triterpeno similar de tipo lupano.

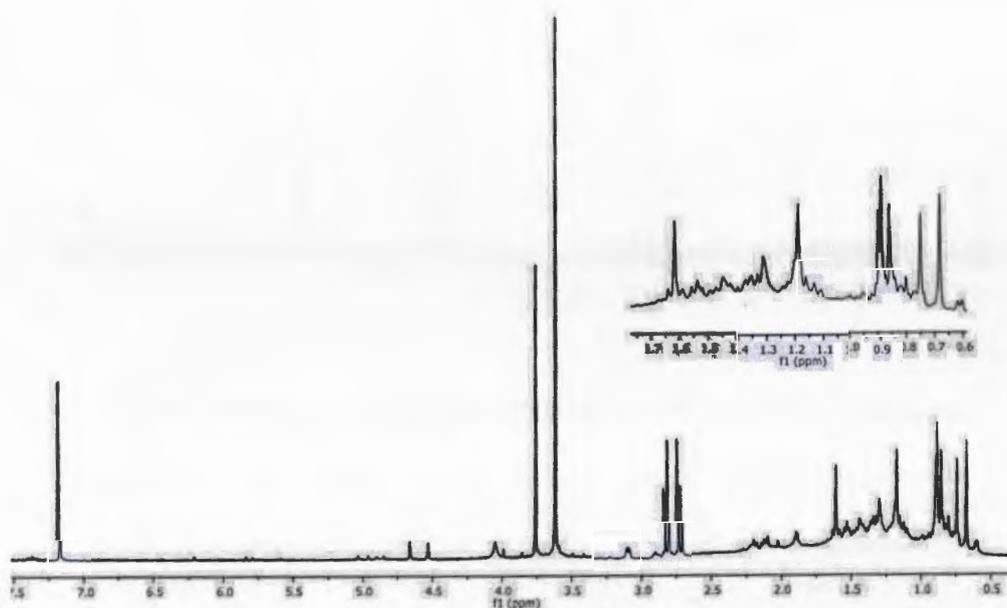


Figura 23. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto CFH-22b1; 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>.

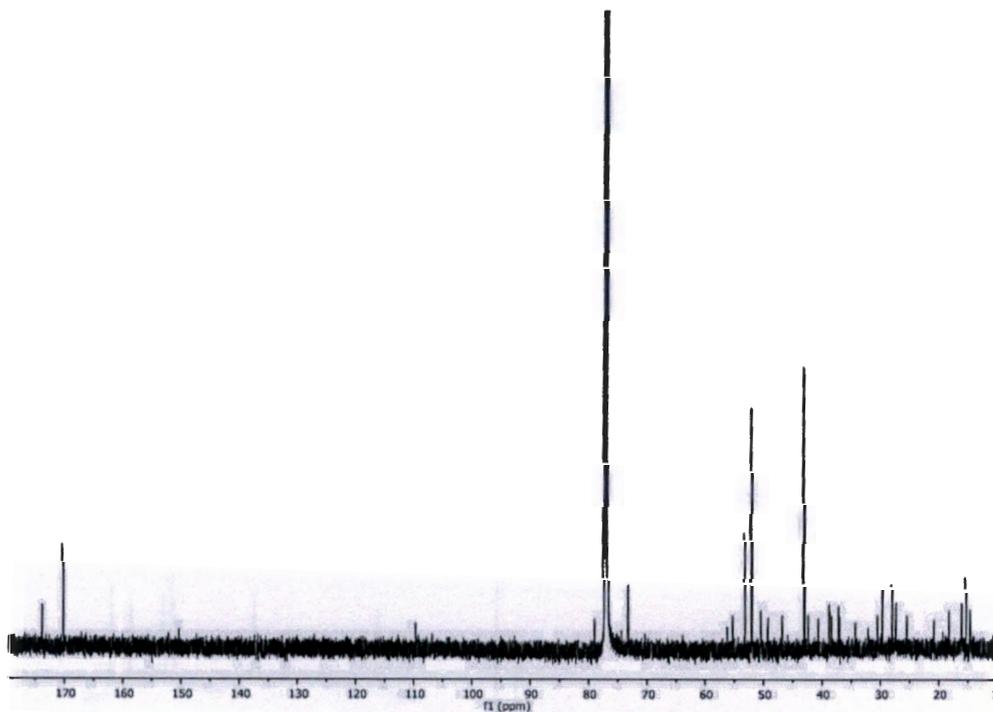


Figura 24. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto CFH-22b1; 150 MHz, CDCl<sub>3</sub>.

Tabla 8. Comparación de señales de carbono de betulina y CFH-22b1-1 (datos en ppm).

Carbono	CFH-22b1-1	Betulina (Kuo-Ching et al., 2004)
1	38.7	38.4
2	27.9	27.1
3	79.0	78.8
4	38.8	38.6
5	55.3	55.0
6	18.2	18.1
7	37.0	34.0

8	40.7	40.7
9	50.5	50.1
10	37.2	36.9
11	20.8	20.6
12	25.5	24.9
13	38.3	37.1
14	42.4	42.5
15	27.4	26.8
16	30.5	28.9
17	46.0	47.6
18	49.2	48.5
19	46.8	47.6
20	150.4	150.3
21	32.1	29.5
22	34.3	33.7
23	29.7	27.8
24	15.3	15.1
25	16.0	15.7
26	16.1	15.9
27	14.7	14.5
28	56.3	60.3
29	109.7	109.5



También se presentan otras señales más intensas que las señales del triterpeno, lo que indica la presencia de otro compuesto (CFH-22b1-2) a  $\delta$  3.70 y 3.84 indicando la presencia de tres grupos metoxilo, lo cual se corrobora en el espectro de carbono (Figura 24) con dos señales a  $\delta$  52.0 y 53.2; dichas señales del espectro de protón correlacionan con las del espectro de carbono, tal como se aprecia en el espectro de HSQC (Figura 25). También se pueden observar dos señales a  $\delta$  173.8 y 170.2, las cuales pertenecen a dos grupos carbonilo, de los cuales el carbonilo a  $\delta$  170.2 se encuentra cercano a los dos grupos metoxilo a  $\delta$  3.70 y el carbonilo a  $\delta$  173.8 sólo se encuentra cerca del metoxilo a  $\delta$  3.84 como se aprecia en el espectro de HMBC (Figura 26). De acuerdo con estas señales se propone la estructura de la Figura 27, en la que se muestra un carbono cuaternario con una señal a  $\delta$  73.3 al cual están unidos los dos grupos carbonilo y un metoxilo. Se aprecia un  $\text{CH}_2$  a  $\delta$  43.1 cuyos protones se acoplan entre sí formando una señal de doble de dobles a  $\delta$  2.86, y su carbono se encuentra unido a un grupo alcohol.

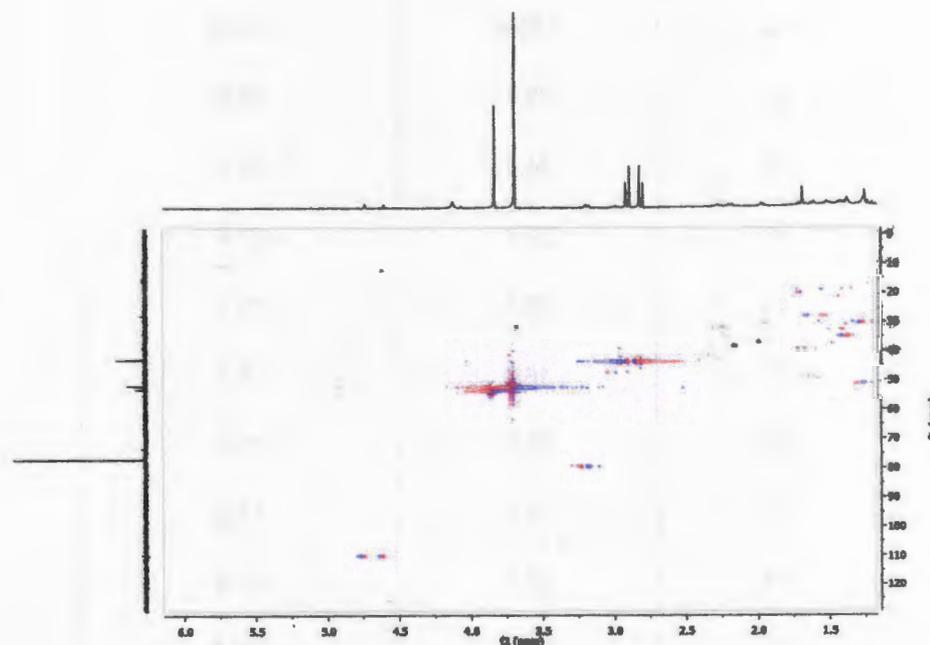


Figura 25. Espectro de HSQC del compuesto CFH-22b1.

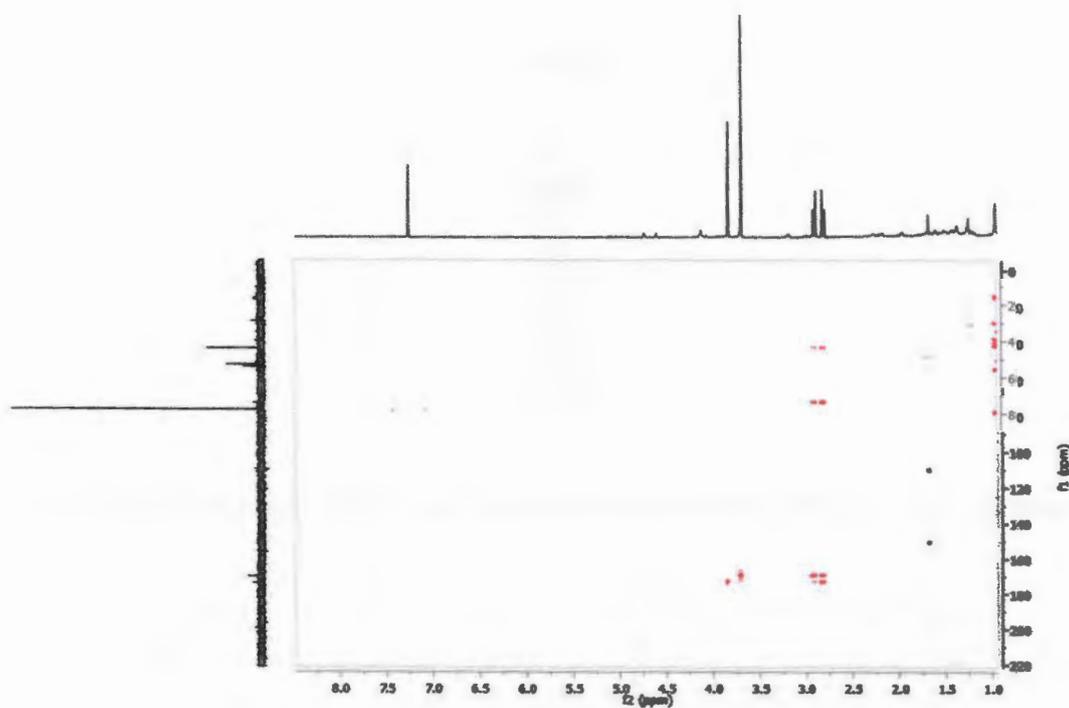


Figura 26. Espectro de HMBC del compuesto CFH-22b1.

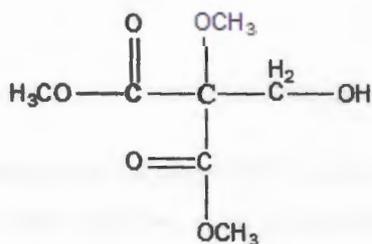


Figura 27. Estructura propuesta del compuesto CFH-22b1-2.

### 3.4 COMPUESTO CFH-24d1

Se obtuvo 3.4 mg del compuesto CFH-24d1 (Figura 28), como un polvo blanco que se disuelve en cloroformo. Se inyectó al CG y en el cromatograma se observó que el compuesto no se encontraba limpio al tener un pico con un área de 30.51% a un Tr = 8.05 min y una impureza con un área de 22.38% a un Tr = 16.96 min (Figura 29).



Figura 28. Placa cromatográfica de CFH-24d1 en el sistema Hx/An (8:2) corrida tres veces.

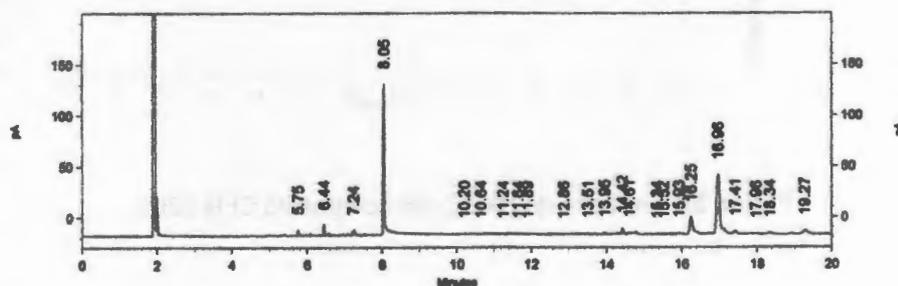


Figura 29. Cromatograma de gases del compuesto CFH-24d1.

Debido a la presencia de la impureza, se inyectó a un cromatógrafo de gases acoplado a masas para determinar la naturaleza del pico predominante. En el espectro de masas se observa el pico predominante con un Tr de 14.060 min y un porcentaje de área de 63.8% y el pico de la impureza con un Tr de 13.557 min y un porcentaje de área de 18.1% (Figura 30). Al analizar el patrón de fragmentación del compuesto CFH-24d1 se encontró una similitud del 98% con el patrón de fragmentación de la base de datos NIST correspondiente a 22,23-dihidroestigmasterol también conocido como  $\beta$ -sitosterol (Figura 31) que es el fitoesterol más predominante y más distribuido en plantas. Se puede ver el ión molecular a  $m/z$  414, el ión más abundante corresponde a  $m/z$  43 (pico padre), también se observa el pico a  $m/z$  399 que corresponde a la pérdida de un metilo, el pico a  $m/z$  396 que corresponde a la pérdida de agua, el pico a  $m/z$  273 que es debido a la

pérdida de la cadena lateral de 141 uma, y el pico a  $m/z$  255 que corresponde a la pérdida de la cadena lateral más agua de 159 uma (Daly *et al.*, 1983). En la Figura 32 se muestra la estructura química del  $\beta$ -sitosterol.

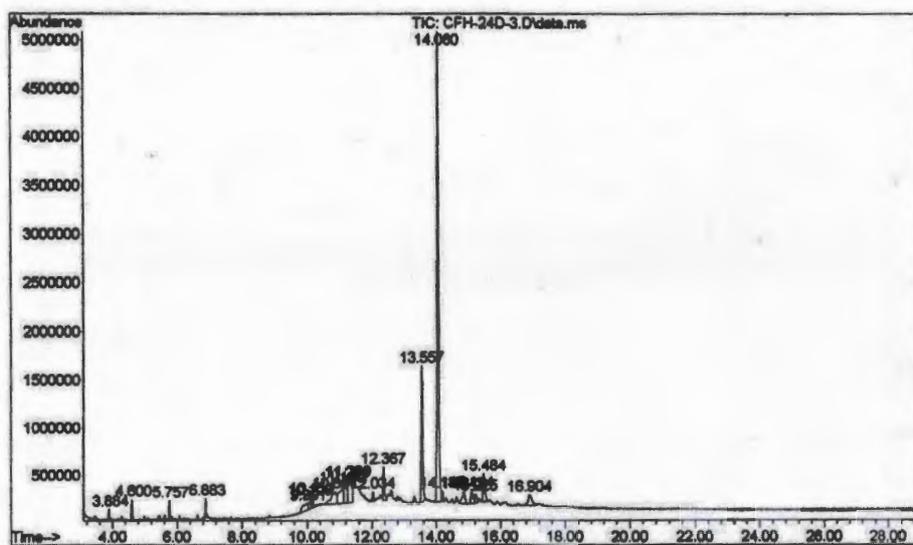


Figura 30. Cromatograma de gases acoplado a masas de CFH-24d1.

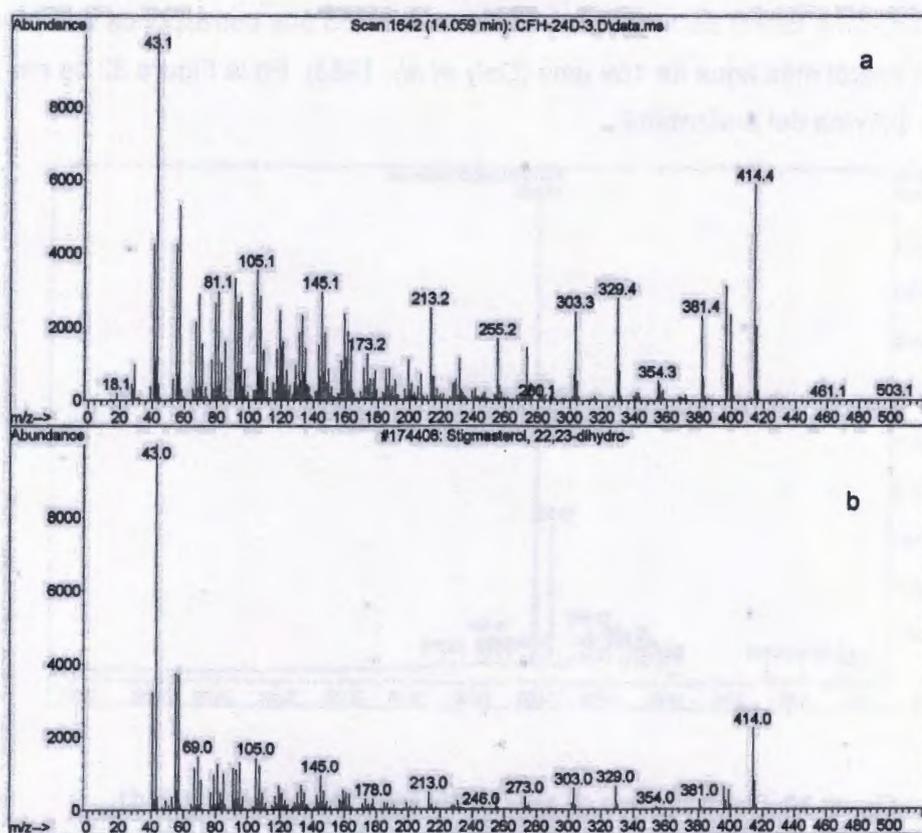


Figura 31. Comparación del patrón de fragmentación de CFH-24d1 (a) y patrón de fragmentación del  $\beta$ -sitosterol de la base de datos NIST (b).

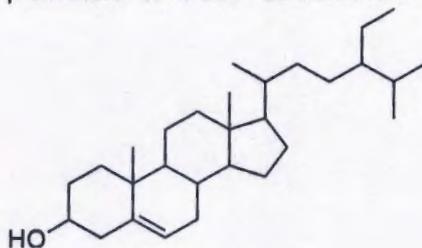


Figura 32. Estructura química del  $\beta$ -sitosterol.

### 3.5 COMPUESTO CFH-37b1

Se obtuvo 209 mg del compuesto CFH-37b1 (Figura 33), se trata de un polvo blanco que se puede observar a luz UV de onda larga de color azul y se disuelve en cloroformo y diclorometano. De acuerdo con el cromatograma (Figura 34) se puede observar la

presencia de dos compuestos en una proporción de 64.14% y de 33.31%, así como una pequeña traza en mucho menor proporción. De acuerdo al patrón de fragmentación por EM, los compuestos son  $\alpha$ -amirina (33.31%) con un Tr de 21.079 min y  $\beta$ -amirina (64.14%) con un Tr de 21.410, dichos compuestos presentaron un porcentaje de similitud de 93 y 86%, respectivamente. En el patrón de fragmentación de  $\alpha$ -amirina (Figura 35) se puede observar el ión molecular a  $m/z$  426 y el pico más abundante a  $m/z$  218 que corresponde a la pérdida de un fragmento  $C_{16}H_{26}$ . El patrón de fragmentación es similar para el compuesto  $\beta$ -amirina (Figura 36).



Figura 33. Placa cromatográfica del compuesto CFH-37b1 en sistema Hx/An (8:2) corrida dos veces.

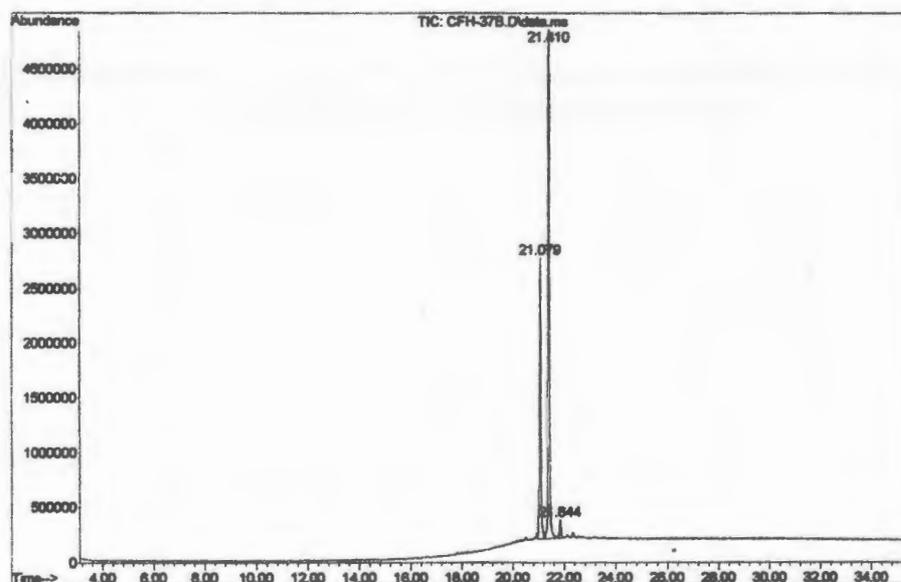


Figura 34. Cromatograma de gases acoplado a masas del compuesto CFH-37b1.

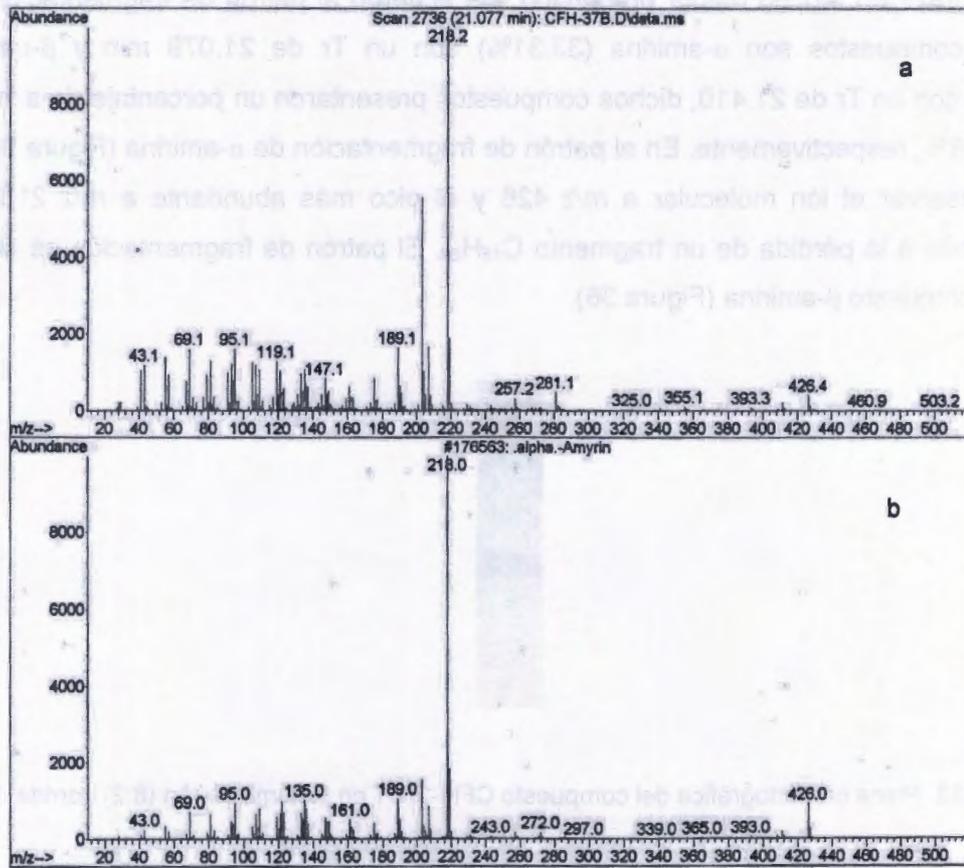


Figura 35. Comparación del patrón de fragmentación del pico con una proporción de 33.31% (a) con el patrón de fragmentación de  $\alpha$ -amirina (b).

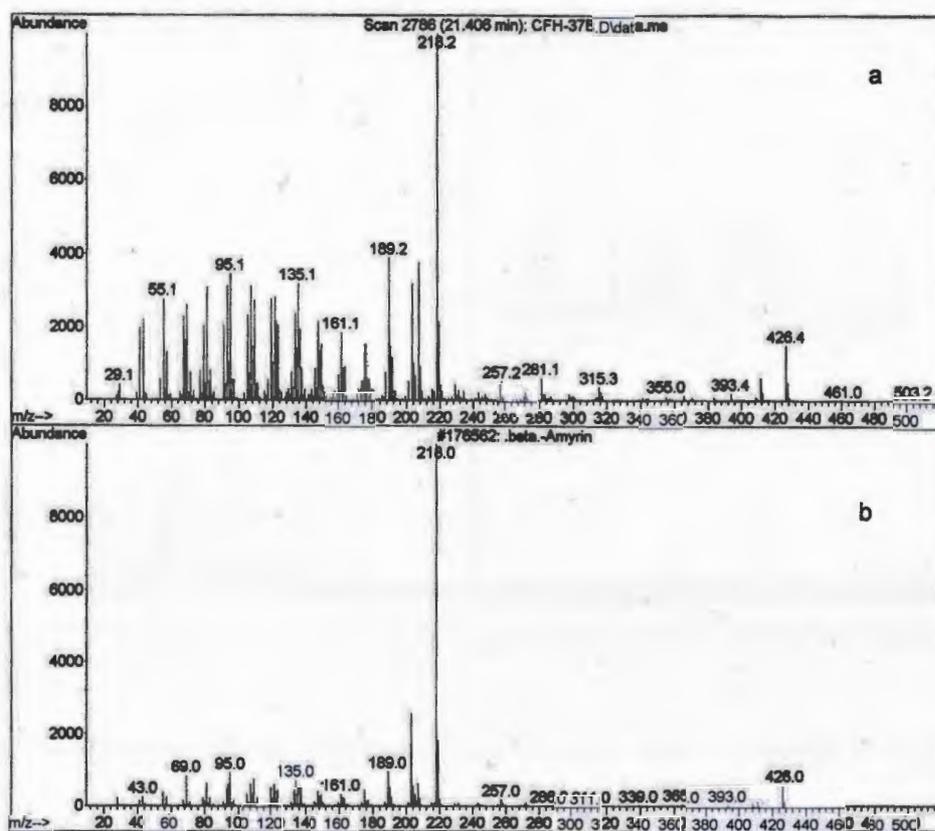


Figura 36. Comparación del patrón de fragmentación del pico con una proporción de 64.14% (a) con el patrón de fragmentación de  $\beta$ -amirina (b).

De igual manera se realizó un análisis de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 37) en el cual se puede corroborar la presencia de los dos compuestos mediante una comparación de sus señales de carbonos (Tabla 9) con las señales reportadas previamente (da Paz-Lima *et al.*, 2004). En la Figura 37 se pueden observar las estructuras de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina.

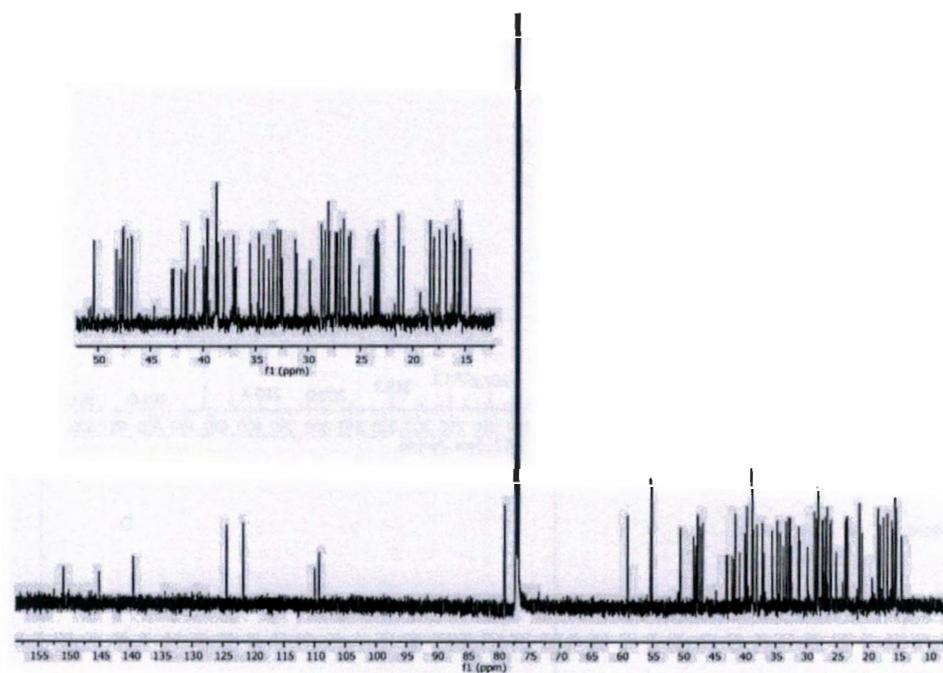


Figura 37. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina (CFH-37b1); 150 MHz, CDCl<sub>3</sub>.

Tabla 9. Comparación de señales de carbono de  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina (datos en ppm).

C	$\alpha$ -amirina	$\alpha$ -amirina (da Paz-Lima <i>et al.</i> , 2004)	$\beta$ -amirina	$\beta$ -amirina(da Paz-Lima <i>et al.</i> , 2004)
1	38.7	38.7	38.6	38.7
2	27.2	27.2	27.3	27.3
3	78.9	78.3	79.0	79.0
4	38.8	38.7	38.8	38.8
5	55.2	55.2	55.3	55.3
6	18.3	18.3	18.4	18.5
7	32.9	32.9	32.6	32.8

8	40.0	40.0	38.8	38.8
9	47.7	47.7	47.6	47.7
10	36.9	36.9	38.0	37.6
11	23.4	23.3	23.5	23.6
12	124.4	124.3	121.7	121.8
13	139.6	139.3	145.2	145.1
14	42.1	42.0	41.7	41.8
15	28.7	28.7	26.1	26.2
16	26.6	26.6	26.9	27.0
17	33.7	33.7	32.5	32.5
18	59.1	58.9	47.2	47.4
19	39.6	39.6	46.8	46.9
20	39.6	39.6	31.1	31.1
21	31.2	31.2	34.7	34.8
22	41.5	41.5	37.2	37.2
23	27.9	28.1	28.1	28.2
24	15.7	15.6	15.5	15.5
25	15.6	15.6	15.6	15.6
26	16.8	16.8	16.8	16.9
27	23.2	23.3	25.9	26.0
28	28.1	28.1	28.3	28.4
29	17.4	17.4	33.3	33.3

30	21.4	21.3	23.7	23.7
----	------	------	------	------

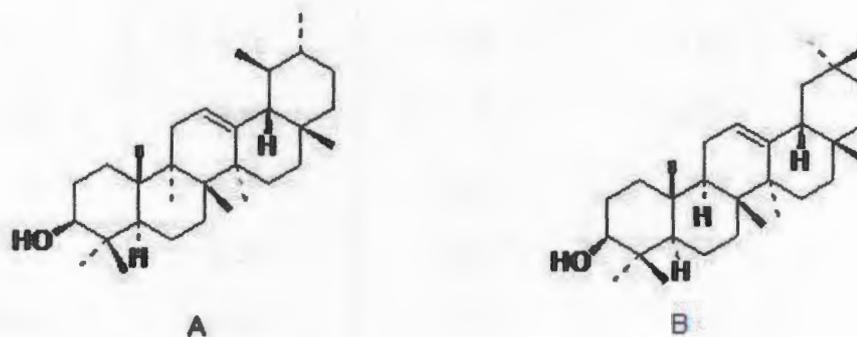


Figura 38. Estructuras de  $\alpha$ -amirina (A) y de  $\beta$ -amirina (B).

### 3.6 COMPUESTO CFH-41d1

Se obtuvo 2.9 mg del compuesto CFH-41d1 (Figura 39), se trata de un polvo blanco que no se ve bajo luz UV (254 y 365 nm) y que se disuelve en cloroformo y diclorometano. De acuerdo al cromatograma (Figura 40) se observa la presencia de un pico mayoritario con una pequeña traza, dicho pico presenta un Tr de 16.239 minutos. El patrón de fragmentación del compuesto en su espectro de masas (Figura 41) presentó un 94% de similitud con el compuesto conocido como ácido hexadecanoico. En dicho espectro de masas se puede observar el ión molecular a  $m/z$  256, con un pico base a  $m/z$  73.1 que corresponde a la pérdida de un fragmento  $C_3H_5O_2$ . Dicha estructura se corroboró con los estudios de RMN- $^1H$  y de RMN- $^{13}C$ .



Figura 39. Placa cromatográfica de CFH-41d1 corrida dos veces en el sistema Hx/An (8:2).

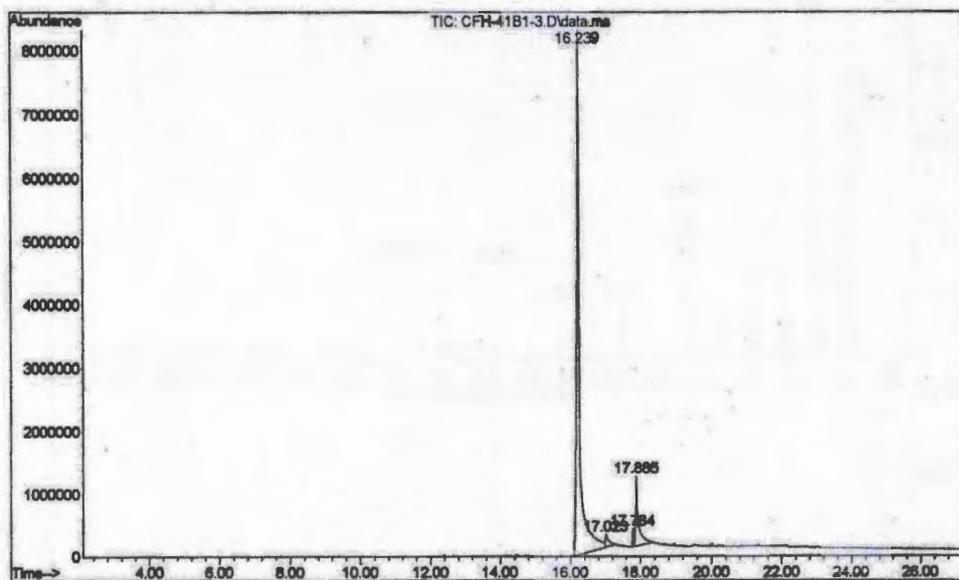
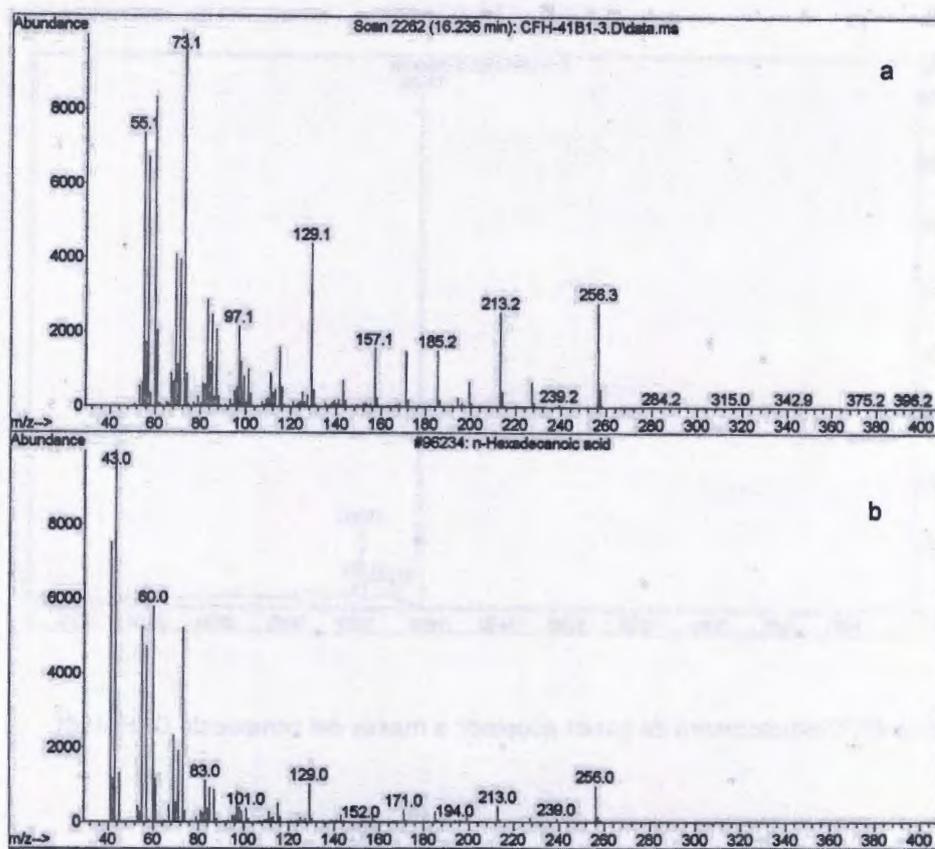


Figura 40. Cromatograma de gases acoplado a masas del compuesto CFH-41d1.



**Figura 41.** Comparación del patrón de fragmentación del compuesto CFH-41d1 (a) con el patrón de fragmentación del ácido hexadecanoico (b) en su espectro de masas.

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 42) se puede observar una señal a  $\delta$  178.5 la cual corresponde al carbonilo del ácido carboxílico, de igual manera se puede observar en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Figura 43) la presencia de un triplete a  $\delta$  2.28 el cual integra para 2H y se encuentra desplazado debido a la cercanía que tiene con el carbonilo del ácido carboxílico (H-2); se observa también una señal quintuplete a  $\delta$  1.56 debida a los protones H-3; asimismo, se puede ver una señal triplete a  $\delta$  0.81 del metilo terminal H-16. En el espectro de carbono se puede observar fácilmente la presencia de los 16 carbonos que pertenecen a la estructura del ácido hexadecanoico entre  $\delta$  14.1 y  $\delta$  31.9 correspondientes a los metilenos de la cadena alifática. En la Figura 44 se puede observar la estructura del ácido hexadecanoico.

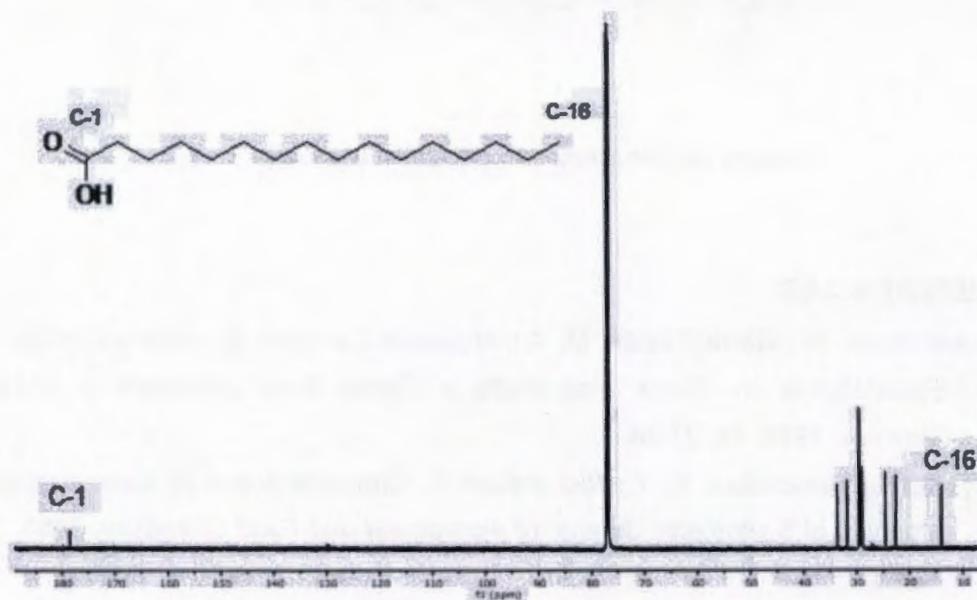


Figura 42. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C del compuesto ácido hexadecanoico (CFH-41d1); 150 MHz, CDCl<sub>3</sub>.

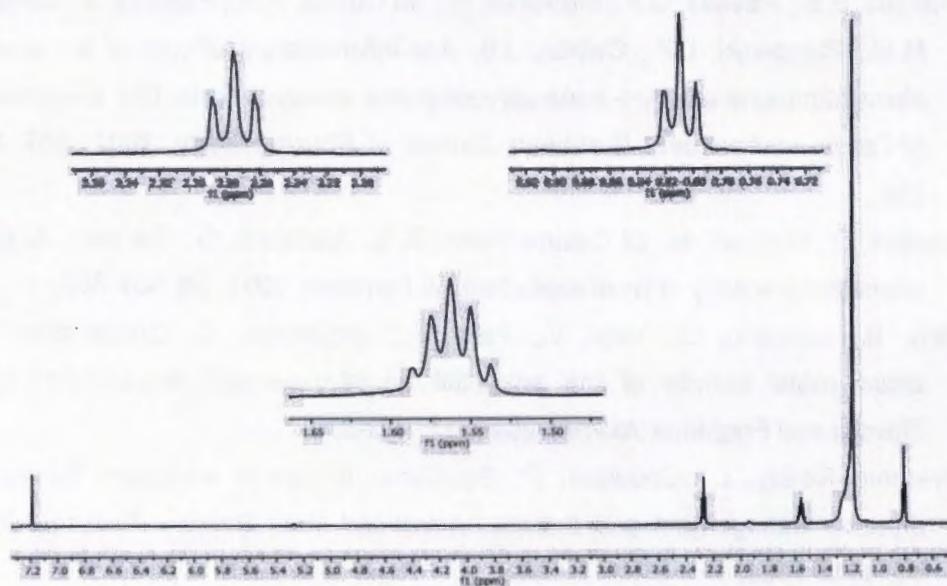


Figura 43. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del ácido hexanoico (CFH-41d1); 600 MHz, CDCl<sub>3</sub>.



Figura 44. Estructura del ácido hexadecanoico.

#### 4. REFERENCIAS

- Barrios-Chica, M.; Calvo-Pineda, M. A.; Arguedas-Campos, E.; Castro-Castillo, O. Epicatequina en *Clusia stenophylla* y *Clusia flava*. *Ingeniería y Ciencia Química*, **1991**, *13*, 27-28.
- Daly, G. G.; Finocchiaro, E. T.; Richardson, T. Characterization of some oxidation products of  $\beta$ -sitosterol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1983**, *31*, 46-50.
- Da Paz-Lima, M.; de Campos-Braga, P. A.; Lopes-Macedo, M.; da Silva, M. F. das G. F.; Ferreira, A. G.; Fernandes, J. B.; Vieira, P. C. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications. *Journal of the Brazilian Chemistry Society*, **2004**, *15*, 385-394.
- Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; da Cuhha, F.M.; Ferreira, J.; Campos, M.M.; Pianowski, L.F.; Calixto, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology*, **2007**, *569*, 228-236.
- Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Di Cesare Mannelli, L.; Mazzanti, G.; Bartolini, A. Local anaesthetic activity of  $\beta$ -caryophyllene. *Il Farmaco*, **2001**, *56*, 387-389.
- Gudzik, B.; Djokovic, D.; Vajs, V.; Palic, R.; Stojanovic, G. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum maculatum* Crantz. *Flavour and Fragrance Journal*, **2002**, *17*, 392-394.
- Harivardhan-Reddy, L.; Couvreur, P. Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2009**, *61*, 1412-1426.

- Ho, C. L.; Wang, E. I.; Lee, P. Y.; Su, Y. C. Composition and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Litsea nakaii* from Taiwan. *Natural Products Community*, **2009**, *4*, 865-868.
- Huerta-Reyes, M.; Basualdo, M. del C.; Lozada, L.; Jimenez-Estrada, M.; Soler, C.; Reyes-Chilpa, R. HIV-1 Inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **2004**, *27*, 916-920.
- Kuo-Ching, K.; Yu-Ling, H.; I-Hsin, L.; Li-Kang, H.; Yuan-Shiun, C. Flavone Glycosides from *Strobilanthes formosanus*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, **2004**, *51*, 199-2004.
- Kjaergaard, S.; Molhave, L.; Pedersen O.F. Human reactions to indoor air pollutants: *n*-decane. *Environment International*, **1989**, *15*, 473-482.
- Medina, E.; Aguiar, G.; Gómez, M.; Aranda, J.; Medina, J. D.; Winter, K. Taxonomic significance of the epicuticular wax composition in species of the genus *Clusia* from Panama. *Biochemical Systematic and Ecology*, **2006**, *34*, 319-326.
- Muhammad, F.; Monteiro-Riviere, N.A.; Riviere, J.E. Comparative *in vitro* toxicity of tropical JP-8 jet fuel and its individual hydrocarbon components: identification of tridecane and tetradecane as key constituents responsible for dermal irritation. *Toxicologic Pathology*, **2005**, *33*, 258-266.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M.; The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, **2000**, *17*, 215-234.
- Nogueira, P. C. de L.; Bittrich, V.; Shepherd, G. J.; Lopes, A. V.; Marsaioli, A.J. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). *Phytochemistry*, **2001**, *56*, 443-452.
- Oyugi, D. A.; Ayorinde, F. O.; Gugssa, A.; Allen, A.; Izevbogie, E. B.; Eribo, B.; Anderson, W. A. Biological activity and mass spectrometric analysis of *Vernonia amygdalina* fractions. *Journal of Bioscience and Technology*, **2011**, *2*, 287-304.
- Peraza-Sánchez, S. R.; Cen-Pacheco, F.; Noh-Chimal, A.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Dumonteil, E.; García-Miss, M. R.; Mut-Martín, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatán peninsula. *Fitoterapia*, **2007**, *78*, 315-318.
- Rosado-Aguilar, J. A.; Aguilar-Caballero, A. J.; Rodriguez-Vivas, R. I.; Borges-Argaez, R.; García-Vázquez, Z.; Méndez-González, M. Screening of the

- acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) by larval immersion test. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **2010**, *12*, 417-422.
- Shelly, T. E. Exposure to  $\alpha$ -copaene and  $\alpha$ -copaene-containing oils enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **2001**, *94*, 497-502.
- Tabanca, N.; Demirci, F.; Ozek, T.; Tumen, G.; Baser, K. H. C. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum × dolichosiphon* P.H. Davis. *Chemistry of Natural Products*, **2001**, *37*, 238-241.
- Tambe, Y.; Tsujiuchi, H.; Honda, G.; Ikeshiro, Y.; Tanaka S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene,  $\beta$ -caryophyllene. *Planta Medica*, **1996**, *62*, 469-470.
- Tasdemir, D.; Kaiser, M.; Brun, R.; Yardley, V.; Schmidt, T. J.; Tosun, F.; Rüedi, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2006**, *50*, 1352-1364.
- Wang, J.; Liu, H.; Gao, H.; Zhao, J.; Zhou, L.; Han, J.; Yu, Z.; Yang, F. Antimicrobial and antioxidant activities of the flower essential oil of *Halimodendron halodendron*. *Natural Products Community*, **2011**, *6*, 1749-1753.
- Xiangwei, Z.; Xiaodong, W.; Yang, Z.; JiaKuan, C. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Sagittaria trifolia*. *Chemistry of Natural Products*, **2006**, *42*, 520-522.
- Yan, F.; Bengtsson, M.; Makranczy, G.; Löfqvist, J. Roles of  $\alpha$ -farnesene in the behaviors of codling moth females. *Z.Naturforsch*, **2003**, *58*, 113-118.
- Yasni, S.; Syamsir, E.; Direja, E. Antimicrobial activity of black cumin extracts (*Nigella sativa*) against food pathogenic and spoilage bacteria. *Microbiology Indonesia*, **2009**, *3*, 146-150.

## **CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *CLUSIA FLAVA* CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI***

### **1. INTRODUCCIÓN**

Debido a los múltiples efectos secundarios y a la baja disponibilidad que presentan los medicamentos que existen actualmente para tratar la enfermedad de Chagas, la principal forma de prevención que existe actualmente es el control del vector. De igual manera, se están llevando a cabo programas de educación sobre el vector y salud, análisis de la sangre proporcionada por donadores, acondicionamiento de hogares en lugares con alta incidencia y aplicación de insecticidas en lugares donde se han reportado casos (Rassi *et al.*, 2010). Sin embargo, todas estas acciones no son suficientes para controlar la enfermedad de Chagas ni para ayudar en el tratamiento efectivo de las personas ya infectadas.

Gracias al descubrimiento de productos naturales se pueden sustituir numerosos medicamentos que tienen muchos efectos secundarios en las personas, como es el caso del benznidazol y nifurtimox, ayudando a que los tratamientos sean más efectivos y menos prolongados. Dentro de los métodos para el descubrimiento de productos naturales útiles en la medicina se encuentra el estudio biodirigido de los compuestos analizados de varios extractos y fracciones de diferentes plantas hasta encontrar el compuesto o los compuestos con la actividad buscada. Dichos estudios se realizan primero *in vitro* para poder analizar qué extractos o fracciones muestran mayor actividad y observar el comportamiento del cultivo de parásitos ante ellos. En este estudio se utilizó la forma de epimastigote de *T. cruzi* debido a la facilidad de su cultivo y mantenimiento y a su utilidad como indicador de citotoxicidad (Croft y Brun, 2003). Si la actividad mostrada por las fracciones o compuestos puros se considera efectiva entonces se prosigue al análisis en pruebas *in vivo*.

### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES**

Para el cultivo de *Trypanosoma cruzi* se utilizaron placas de cultivo de 96 pozos, tubos Falcon Corning de 50 mL, frascos (flask) de cultivo Nunclon® de 50 mL, una campana de

extracción Nuairé™ clase II y tipo A/B3, microscopio óptico Motic® B3 profesional, Contador Fisher, cámara de Neubauer Marienfeld® de 0.0025mm<sup>2</sup>, pipetas Rainin Pipet Lite de 20 y 1,000 µL, y una incubadora en la que se mantienen los cultivos a 28 °C. Se compró un estándar de escualeno proporcionado por Sigma-Aldrich para corroborar la actividad del compuesto.

## 2.2 BIOENSAYOS DE INHIBICIÓN *IN VITRO* DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Tripomastigotes sanguíneos de la cepa Z17 y H1 se aislaron a partir de un ratón infectado y se cultivaron en un medio NNN (de Novy, MacNeal y Nicolle) para que pasen al estadio de epimastigote, y posteriormente en medio LIT (Albesa y Eraso, 1981). El cultivo *in vitro* de los parásitos se realizó en frascos estériles de cultivos celulares en volúmenes de 4,500 µL de medio LIT, complementado con 500 µL de suero fetal bovino, 5 µL de hemina y 20 µL de estreptomicina y penicilina. Para mantener los cultivos en fase logarítmica de crecimiento, se realizaron resiembras de los parásitos en medio LIT preparado fresco. Los epimastigotes se cultivaron en fase logarítmica contados con una cámara de Neubauer y el inóculo se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^5$  tripomastigotes/100 µL con medio fresco.

Los bioensayos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la literatura (Leon-Deniz *et al.*, 2009). Se colocaron 100 µL de inóculo ( $1 \times 10^5$  tripomastigotes) en placas de 96 pozos conteniendo 100 µL del extracto a concentraciones de 500 µg/mL e incubados a 28 °C. Los extractos se disolvieron en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se diluyeron en medio de cultivo fresco. Los epimastigotes móviles fueron contados con ayuda de una cámara de Neubauer después de 48 horas y 7 días de incubación a 28 °C. Como control de inhibición se utilizó alopurinol debido a que ha mostrado buena actividad contra *T. cruzi* y es fácil de conseguir. Se consideraron como control negativo de inhibición a los pozos con parásitos y medio de cultivo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición con respecto al control. Para determinar el IC<sub>50</sub> de los compuestos se realizaron los conteos de los parásitos a las 72 horas y los datos se analizaron en el programa GraphPad Prism 5.

Estos experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad Autónoma de Yucatán bajo la supervisión de la Dra. Rubí Gamboa León.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 BIOENSAYOS DE INHIBICIÓN *IN VITRO* DE *TRYPANOSOMA CRUZI* DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES HEXÁNICA, DICLOROMETÁNICA Y DE ACETATO DE ETILO

Se determinó la actividad de los extractos de *C. flava* obteniendo primero sus porcentajes de inhibición a una concentración de 500 µg/mL utilizando la cepa Z17 (Tabla 10). Dichos resultados presentaron algunas diferencias con los resultados previamente obtenidos en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del CICY (Tabla 3, capítulo 1). El porcentaje de inhibición del extracto metanólico (CFH-1a) fue de 42.94% mientras que en el primer estudio fue de 51.00%; el porcentaje de inhibición de la fracción hexánica (CFH-2a) aumentó significativamente a 100% a los siete días, siendo esta la fracción más activa. El porcentaje de inhibición de la fracción diclorometánica (CFH-2b) y la fracción de acetato de etilo (CFH-2c) no aumentó de manera significativa y el porcentaje de la fracción acuosa (CFH-2d) fue aumentando paulativamente, pero sin exhibir una alta inhibición del parásito. Dichas diferencias en los porcentajes de inhibición de los estudios hechos puede deberse a las diferencias en las fechas de colecta, ya que el primer estudio se realizó con material vegetal colectado en agosto de 2005 y el estudio actual se hizo con material vegetal colectado en octubre de 2011. Debido a que la fracción con mayor actividad tripanocida fue la hexánica se determinó su  $IC_{50}$  (Tabla 11), de igual manera se determinó el  $IC_{50}$  del extracto metanólico. Dichos resultados son favorecedores ya que el extracto metanólico tuvo un  $IC_{50}$  menor a 100 µg/mL y la fracción hexánica tuvo un valor mucho menor (15.33 µg/mL), lo que indica que al ir fraccionando la actividad tripanocida va aumentando. De igual forma, se puede ver que la actividad de la fracción hexánica (CFH-2a) es mucho mayor que la actividad que presenta el alopurinol (control de inhibición), lo que indica que dicha fracción tiene una actividad prometedora.

**Tabla 10.** Porcentajes de inhibición del extracto metanólico (CFH-1a) y las fracciones hexánica (CFH-2a), diclorometánica (CFH-2b), de acetato de etilo (CFH-2c) y la fracción acuosa (CFH-2d) de hojas de *C. flava*.

Tiempo	CFH-1a	CFH-2a	CFH-2b	CFH-2c	CFH-2d
48 h	36.41	63.89	15.03	13.4	-1.54
7 días	42.94	100	19.24	25.13	18.82

**Tabla 11.** IC<sub>50</sub> (µg/mL) del extracto metanólico y la fracción hexánica de hojas de *C. flava*.

Tiempo	CFH-1a	CFH-2a	Alopurinol
72 h	62.10	15.33	36.36

### 3.2 BIOENSAYOS DE INHIBICIÓN *IN VITRO* CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI* DE LAS FRACCIONES DE LA CLV

Las fracciones de la fracción hexánica activa (CFH-2a) se evaluaron a una concentración de 500 µg/mL (Tabla 12) y a partir de las 48 h se pudo observar un porcentaje de inhibición de 100% en las fracciones CFH-3a y CFH-3b, por lo que es probable que estas dos fracciones compartan algún metabolito que proporcione la actividad contra *T. cruzi*. Las demás fracciones tienen porcentajes de inhibición menores a CFH-3a y CFH-3b pero sí presentaron una inhibición cercana o mayor a 50% contra *T. cruzi* a las 48 h. Después de CFH-3a y CFH-3b, las fracciones más activas a las 48 h fueron CFH-3e (36.01 %), CFH-3g (45.63 %), CFH-3h (99.17 %) y CFH-3j (69.61 %).

Posteriormente, las fracciones CFH-3a y CFH-3b se evaluaron a 100 µg/mL para determinar la fracción más activa (Tabla 12). Los resultados muestran que a partir de las 48 h la fracción CFH-3b es más activa con un porcentaje de inhibición de 62.01% mientras que CFH-3a presentó una inhibición de 50.51%. Debido a esto y a que presentaba menor complejidad en CCD, se decidió seguir trabajando con la fracción CFH-3b.

Tabla 12. Porcentajes de inhibición de *T. cruzi* de las fracciones de la CFH-2a.

Fracción	48 h	7 días
CFH-3a <sup>a</sup>	100	100
CFH-3b <sup>a</sup>	100	100
CFH-3c <sup>a</sup>	11.71	30.14
CFH-3d <sup>a</sup>	17.41	56.33
CFH-3e <sup>a</sup>	36.01	96.18
CFH-3f <sup>a</sup>	18.31	91.34
CFH-3g <sup>a</sup>	45.63	89.17
CFH-3h <sup>a</sup>	99.17	100
CFH-3i <sup>a</sup>	21.16	83.03
CFH-3j <sup>a</sup>	69.61	100
CFH-3a <sup>b</sup>	50.51	80.56
CFH-3b <sup>b</sup>	62.01	95.12

<sup>a</sup> Concentración de 500 µg/mL

<sup>b</sup> Concentración de 100 µg/mL

### 3.3 BIOENSAYO DE INHIBICIÓN *IN VITRO* CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI* (CEPA Z17) DE ESCUALENO

El compuesto escualeno (CFH-3b1b) no había sido evaluado contra *T. cruzi*, sólo se había probado contra otros protozoarios mostrando una actividad baja; contra *Entamoeba histolytica* tuvo un IC<sub>50</sub> de 270.1 µg/mL y contra *Giardia lamblia* un IC<sub>50</sub> de 99.1 µg/mL (Calzada, 2005). En el presente trabajo el escualeno se aisló de las hojas de *C. flava* y se evaluó contra *T. cruzi* de la cepa Z17 mostrando un efecto altamente inhibitorio, con un IC<sub>50</sub> de 9.7 µg/mL, siendo una actividad más alta con respecto a *E. histolytica* y *G. lamblia*.

De acuerdo a Calderón *et al.* (2006) dicha actividad es considerada como alta, ya que proponen que un IC<sub>50</sub> menor a 10 µg/mL es una actividad alta, de 10 a 20 µg/mL es una actividad media y mayor a 20 µg/mL es una actividad baja.

Para corroborar la actividad del escualeno, se volvió a realizar un bioensayo para obtener su IC<sub>50</sub> utilizando una muestra del compuesto escualeno previamente aislado en una tesis de licenciatura en el laboratorio en junio de 2010. Dicho compuesto tuvo un IC<sub>50</sub> de 14.17 µg/mL, dicho valor se considera como una actividad media. A diferencia del primer resultado, este valor puede haber variado debido al tiempo de almacenamiento, sin embargo la actividad del escualeno sigue siendo mucho mayor que la actividad del alopurinol (control de inhibición, IC<sub>50</sub> = 36.36 µg/mL).

### 3.4 BIOENSAYO DE INHIBICIÓN *IN VITRO* CONTRA *TRYPANOSOMA CRUZI* CEPA H1

Conforme se realizaban los bioensayos de inhibición, la cepa Z17 disminuyó en número de epimastigotes flagelados y se presentaron grandes cantidades de rosetas. Es por ello que se utilizó la cepa H1, que se encontraba disponible en el laboratorio. Para corroborar la actividad de las hojas de *C. flava* contra *T. cruzi* se realizó una repetición de los bioensayos utilizando ahora la cepa H1 (Tabla 13).

**Tabla 13.** IC<sub>50</sub> de los extractos metanólico (CFH-1a), de la fracción hexánica (CFH-2a) de hojas de *C. flava* y compuestos aislados de la fracción hexánica.

Extracto/fracción/compuesto	IC <sub>50</sub>
CFH-1a	>100 µg/mL
CFH-2a	9.49 µg/mL
Estándar Escualeno*	78.60 µg/mL
Escualeno (CFH-3b1b)**	10.2 µg/mL
CFH-22b1	17.21 µg/mL

CFH-37b1 ( $\alpha$ - y $\beta$ - amirina)	37.69 $\mu\text{g/mL}$
CFH-41d1 (ácido hexadecanoico)	13.33 $\mu\text{g/mL}$
Alopurinol	33.30 $\mu\text{g/mL}$

\*Estándar de escualeno obtenido de Sigma-Aldrich

\*\*Escualeno aislado en el laboratorio

La actividad del extracto metanólico disminuyó notablemente mientras que la actividad de la fracción hexánica (CFH-2a) aumentó entrando en el rango de actividad alta de acuerdo a Calderón *et al.* (2006). El estándar de escualeno presentó una actividad baja lo que nos indica que la actividad del escualeno aislado en este trabajo puede ser debido a la presencia de un compuesto traza que se encontró al analizar el compuesto en el cromatógrafo de gases acoplado a masas y que se trata del compuesto conocido como 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno. De los demás compuestos, CFH-22b1 y el ácido hexadecanoico presentan una actividad moderada pero al mismo tiempo significativa, debido a estos resultados se corrobora que en las hojas de *Clusia flava* hay presencia de compuestos activos contra *T. cruzi*.

#### 4. REFERENCIAS

- Albesa, I; Eraso, A. J.; Primary isolation of *Trypanosoma cruzi* using hemoculture: effect of media composition on epimastigote differentiation. *Revista Argentina de Microbiología*, 1981, 13, 53-58.
- Calderón, A. I.; Romero, L. I.; Ortega-Barría, E.; Brun, R.; Correo, M. D.; Gupta, M. P. Evaluation of larvicidal and *in vitro* antiparasitic activities of plants in a biodiversity plot in the Altos de Campana National Park, Panama. *Pharmaceutical Biology*, 2006, 44, 487-498.
- Calzada, F. Additional antiprotozoal constituents from *Cuphea pinetorum*, a plant used in Mayan traditional medicine to treat diarrhea. *Phytotherapy Research*, 2005, 19, 725-727.
- Croft, S. L.; Brun, R. *In vitro* and *in vivo* models for the identification and evaluation of drugs active against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Drugs against parasitic*

*diseases: R&D methodologies and issues. Discoveries and drug development*, **2003**, sección III, 165-175.

León-Deniz, L. V.; Dumonteil, E.; Moo-Puc, R.; Freile-Pelegrin, Y. Antitrypanosomal *in vitro* activity of tropical marine algae extracts. *Pharmaceutical Biology*, **2009**, *47*, 864-871.

Rassi Jr, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas disease. *Lancet*, **2010**, *375*, 1388-1402.

## CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES

### 1. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

*Clusia flava* presenta actividad antiprotozoaria contra *Trypanosoma cruzi*. El extracto metanólico presenta un  $IC_{50}$  aceptable a las 72 h de 62.10  $\mu\text{g/mL}$ , siendo una actividad prometedora ya que da pauta a que conforme se vaya fraccionando el  $IC_{50}$  va a ir disminuyendo, por lo tanto serán más activas las fracciones y compuestos. Una vez que se fraccionó el extracto metanólico se pudo observar que la actividad tripanocida está presente en la fracción hexánica (CFH-2a), la cual presentó un  $IC_{50}$  de 15.33  $\mu\text{g/mL}$  a las 72 h por lo que esta fracción contiene los metabolitos más activos contra *T. cruzi*.

La fracción hexánica (CFH-2a) se purificó hasta 10 fracciones, de las cuales las fracciones CFH-3a y CFH-3b resultaron más activas a las 48 h a una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  (porcentaje de inhibición de 100%). De estas dos fracciones se determinó a CFH-3b como la más activa a las 48 h a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  (porcentaje de inhibición de 62.01%). En la fracción CFH-3b se encontró un compuesto relativamente puro, el escualeno (CFH-3b1b), el cual presentó una actividad alta con un  $IC_{50}$  de 9.7  $\mu\text{g/mL}$  contra la cepa Z17; al repetir el bioensayo contra *T. cruzi*, se observó una actividad del escualeno de 14.17  $\mu\text{g/mL}$ , la cual se considera como actividad media. Se repitió el bioensayo utilizando un estándar de escualeno contra la cepa H1 de *T. cruzi* dando una actividad baja con un  $IC_{50}$  de 78.60  $\mu\text{g/mL}$ , debido a esto se deduce que la actividad observada del escualeno obtenido en este trabajo fue potencializado por la presencia de un compuesto traza, 1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno, el cual podría estar ayudando a la actividad del escualeno; este compuesto no había sido reportado en *C. flava* por lo que forma parte del enriquecimiento del conocimiento fitoquímico de la planta.

Los demás metabolitos encontrados en las hojas de *C. flava* no han sido reportados en la literatura, por lo que dicho estudio enriquece el conocimiento fitoquímico de la planta. Entre estos compuestos se encuentran la  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina (CFH-37b1),  $\beta$ -sitosterol (CFH-24d1), ácido hexadecanoico (CFH-41d1), un triterpeno de tipo lupano (CFH-22b1-1) y la propuesta de un compuesto con clave CFH-22b1-2. Dichos compuestos también presentan una actividad moderada contra *T. cruzi*, teniendo más actividad CFH-22b1 y el

ácido hexadecanoico. Esto demuestra que las hojas de *Clusia flava* presentan compuestos activos contra *Trypanosoma cruzi*, y que le otorgan la actividad tanto a la fracción hexánica como al extracto metanólico.

El aislamiento de metabolitos de *C. flava* resultó muy complicado debido a que presenta una gran cantidad de metabolitos minoritarios que pueden ser interesantes de analizar, pero que se encuentran en pequeña proporción, lo cual dificulta su aislamiento en cantidades suficientes para poder realizar pruebas espectroscópicas. De igual manera, el rendimiento de las fracciones va disminuyendo conforme se van trabajando en más columnas cromatográficas, por lo cual se recomienda iniciar el trabajo con una cantidad mayor a 1.5 Kg de material vegetal. De igual manera, es recomendable usar columnas empacadas con Sephadex LH-20 o columnas flash para su aislamiento, debido a que las fracciones que se obtienen de las hojas de esta planta presentan una gran cantidad de metabolitos con polaridad semejante.

A continuación en la Figura 45 se presenta un cuadro sinóptico en el que se resume las fracciones con las que se trabajaron en este trabajo y a partir de las cuales se obtuvieron los compuestos presentados. De igual manera, se presenta la actividad contra *T. cruzi* de la cepa H1 que mostraron el extracto metanólico (CFH-1a), la fracción hexánica (CFH-2a) y los compuestos obtenidos.

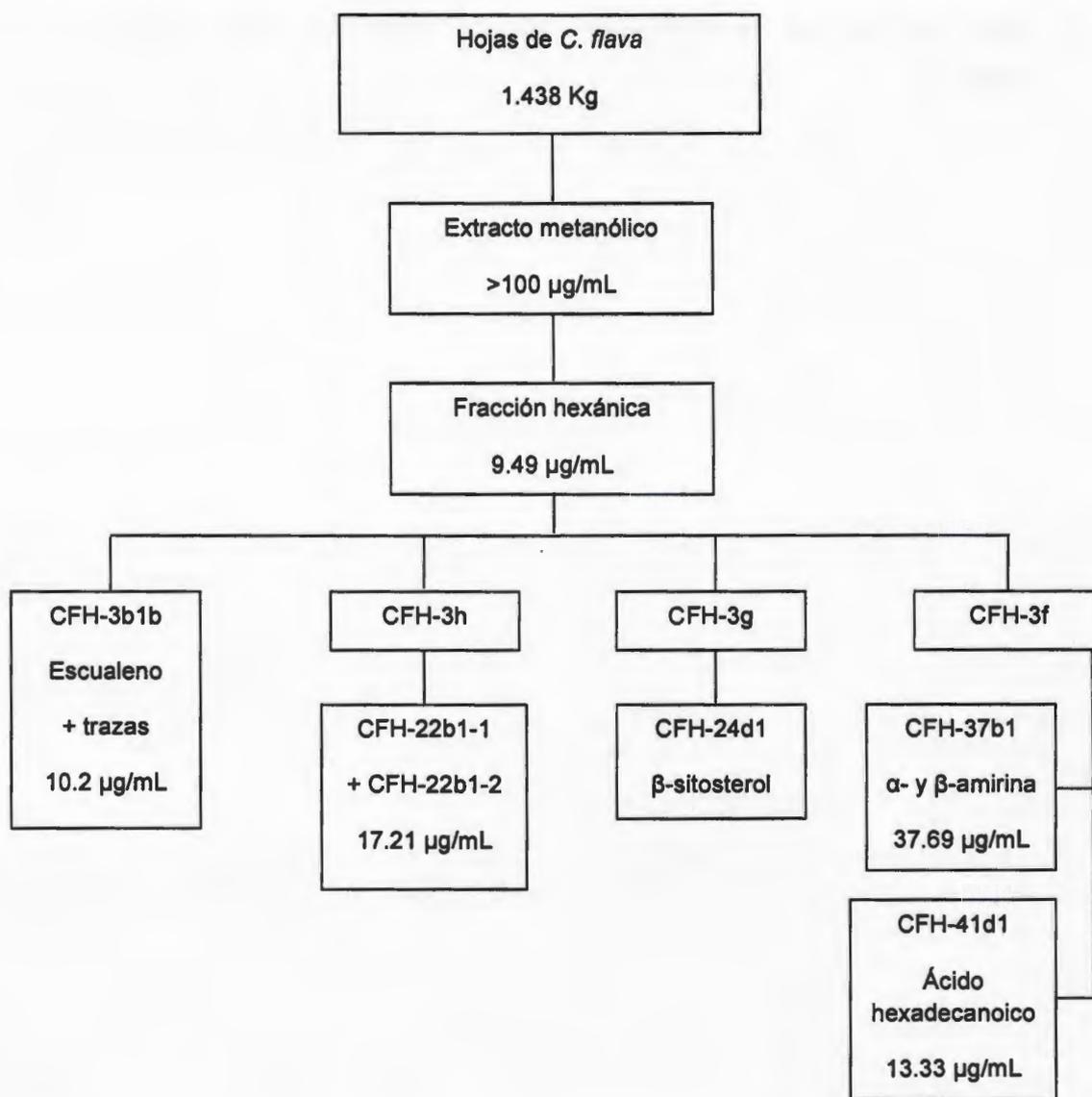


Figura 45. Cuadro sinóptico resumiendo el trabajo realizado en la presente tesis.

## 2. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios *in vivo* del extracto metanólico y la fracción hexánica contra *T. cruzi* en ratones.
- Continuar con la búsqueda de metabolitos secundarios de *C. flava* mayoritarios y minoritarios para el enriquecimiento del conocimiento fitoquímico de la planta.

- Probar la actividad de la fracción hexánica contra el parásito *Leishmania mexicana*.

