

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Estudio de *Tridax procumbens* L. para la
obtención de metabolitos con actividad
antiprotozoaria**

**Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Presenta:**

Zhelmy del Rocío Martín Quintal

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2009

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez.

El trabajo fue financiado con el apoyo del proyecto Conacyt, con clave No. 54855, por la International Foundation for Science, proyecto No. F/3278-2F, por el proyecto FOMIX-Yucatán No 66262 y por la beca de doctorado otorgada por el Conacyt (No 185779).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, por la realización de la presente tesis.

El trabajo experimental contó con la colaboración de la Dra. María del Rosario García Miss, de la QFB. Mirza Mut Martín y de la QFB. Abril Matus Moo, del Centro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi, de la Universidad Autónoma de Yucatán.

A la Dra. Rosa Moo Puc y al Dr. Roberto Cedillo Rivera de la Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad, Centro Médico Ignacio García Téllez, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Al MC. Manuel J. Chan Bacab del Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche.

Al Dr. Francisco González Salazar de la División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Monterrey, Nuevo León.

A la Dra. Giulia Getti de la School of Health and Bioscience, University of East London, Londres, Inglaterra.

Al MC. Luis W. Torres Tapia de la Unidad de Biotecnología del CICY, por su apoyo técnico en el trabajo de laboratorio.

A las técnicas QBB. Fabiola Escalante Erosa, QI. Leticia Medina Baizabal y QBB. Karlina García Sosa.

Al H. Comité Revisor de Tesis, integrado por la Dra. Rocío Borges Argáez, Dra. Rubí Gamboa León, Dr. Felipe Barahona Pérez, Dr. Gonzalo Mena Rejón y Dr. Felipe Vázquez Flota.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, por todos sus consejos enseñanzas y su invaluable amistad.

A las Dras. Manuelita Reyes Estebanez y Susana de la Rosa García, por su siempre disposición de ayudar, sus enseñanzas, sus consejos y su amistad.

A todos los integrantes del Grupo de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología, por su amistad.

A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunobiología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi, UADY.

A todos mis profesores y compañeros de posgrado del CICY.

A todas las secretarias de posgrado, por toda su ayuda, especialmente a Landy Rodríguez Solís.

A los integrantes de la Biblioteca del CICY, especialmente a Sergio Pérez.

A los ingenieros del Departamento de Cómputo, Carlos Chuc González y Mauricio Alvarado Sosa.

A mi compañera de viaje QFB. Dafne Domínguez Carmona.

DEDICATORIAS

A mi familia.

A mi madre, María del Rocío Quintal y Centurión, que es la mejor amiga que tengo, que es el pilar de mi vida, gracias por todo tu amor, por la comprensión que me das, por ayudarme a alcanzar todas mis metas.

A mi padre, Gaspar Martín Chan, por la compañía, la ternura y la paciencia que me tienes.

A mi gran amiga, mi hermana, QFB. Trinidad Balam Quintal, por todos los consejos, por todo lo vivido, y por permitirme ser parte de tu familia.

A la QFB. Abril Matus Moo, por su compañerismo, su ayuda y sobre todo por brindarme su amistad.

A mis amigas Aurora, Montserrat y Dafne, del Instituto Alemán, por sus ocurrencias.

A todos los que de una u otra forma han contribuido a la realización de esta tesis.

A mi mejor amigo. Gracias por compartir esta aventura y estar siempre a mi lado.

CONTENIDO

Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Cuadros	xi
Lista de Figuras	xiii
Resumen	xv
Abstract	xvii
Introducción	1
Bibliografía	4
Capítulo 1. Antecedentes	9
1.1. <i>Leishmaniosis</i>	9
1.2. Productos naturales como fármacos	24
1.3. El género <i>Tridax</i>	52
1.4. Objetivo general	61
1.5. Objetivos particulares	61
1.6. Estrategia experimental	63
1.7. Bibliografía	64
Capítulo 2. Materiales y Métodos	77
2.1. Procedimiento general	77
2.2. Material vegetal	78
2.3. Bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	78
2.4. Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular, para las células MDCK y KB	82
2.5. Biensayo de toxicidad de células mononucleares humanas de sangre periférica (CMSP)	82
2.6. Bibliografía	83
Capítulo 3. Purificación e identificación de metabolitos activos de <i>Tridax procumbens</i> L. contra los promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> LV4	83
3.1. Introducción	85
3.2. Estudios preliminares	86
3.3. Procedimiento de extracción a mayor escala: método de partición	88
3.4. Resultados y discusión	92
3.5. Conclusiones	115
3.6. Bibliografía	117

Capítulo 4. Efecto leishmanicida en amastigotes del (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol	121
4.1. Introducción	121
4.2. Materiales y métodos	122
4.3. Resultados y discusión	128
4.4. Conclusiones	140
4.5. Bibliografía	142
Capítulo 5. Diferentes actividades antiprotozoarias de <i>Tridax procumbens</i>	145
5.1. Introducción	145
5.2. Materiales y métodos	146
5.3. Resultados y discusión	149
5.4. Conclusiones	155
5.5. Bibliografía	156
Capítulo 6. Conclusiones generales y perspectivas	159
Anexos	161

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CG	Cromatografía de Gases
CLV	Cromatografía Líquida al Vacío
CMSP	Células Mononucleares Humanas de Sangre Periférica
CSF-M	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos
D.O.	Densidad Óptica
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL	Dosis Letal
DMSO	Sulfóxido de Dimetilo
DPPH	Hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ETS	Enfermedad de Transmisión Sexual
Hx	Hexano
IC	Concentración Inhibitoria
IFN- γ	Interferón Gamma
IS	Índice de Selectividad
IMEPLAM	Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales
IR	Infrarrojo
KB	Línea de Células de Carcinoma Humano Nasofaríngeo
LC	Leishmaniosis Cutánea
LCD	Leishmaniosis Cutánea Diseminada
LCL	Leishmaniosis Cutánea Localizada
LV	Leishmaniosis Visceral
LPS	Lipopolisacárido
MDCK	Madin-Darby Canin Kidney
MeOH	Metanol
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NAPRALERT	Natural Products Alert
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBMC	Células de Sangre Periférica

PPT	Precipitado
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SBF	Suero Bovino Fetal
THP-1	Línea Celular de Macrófagos Derivados de Monocitos Humanos
TMS	Tetrametilsilano
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Ejemplos de plantas autóctonas usadas para el tratamiento de la leishmaniosis	27
Cuadro 2	Especies representativas del género <i>Tridax</i> en México	52
Cuadro 3	Actividad antiprotozoaria de extractos metanólicos de plantas nativas de la Península de Yucatán	58
Cuadro 4	Actividad leishmanicida de extractos metanólicos de plantas nativas de la Península de Yucatán	59
Cuadro 5	Rendimiento de los extractos de <i>T. procumbens</i>	88
Cuadro 6	Peso de las fracciones de TPZ-2a de <i>T. procumbens</i>	89
Cuadro 7	Bioensayos de la actividad contra los promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> LV4 de los extractos de <i>T. procumbens</i>	94
Cuadro 8	Toxicidad contra células adherentes, no adherentes, MDCK y KB	94
Cuadro 9	Comparación de los desplazamientos químicos de los carbonos y de los hidrógenos de TPZ-25d1 con el dideshidrofalcarinol reportado en la literatura	106
Cuadro 10	Actividad antiparasitaria de los policétidos aislados de <i>Cussonia zimmermannii</i>	111
Cuadro 11	Actividad biológica de TPZ-25d1	112
Cuadro 12	Bioensayos de la actividad contra promastigotes de <i>L. mexicana</i> y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> de los extractos de <i>T. procumbens</i>	150
Cuadro 13	Porcentaje de inhibición contra promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. de los extractos obtenidos de <i>T. procumbens</i>	151
Cuadro 14	Bioensayos de la actividad contra promastigotes de <i>L. mexicana</i> y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> del compuesto TPZ-25d1 aislado de <i>T. procumbens</i>	153
Cuadro 15	Actividad biológica de los extractos, fracciones y compuestos puros aislados de <i>T. procumbens</i>	154

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	13
Figura 2	Distribución de leishmaniosis en México	15
Figura 3	Medicamentos usados en el tratamiento de la leishmaniosis	18
Figura 4	Estructuras químicas de la pentamidina y de la anfotericina B	19
Figura 5	Fármacos alternativos para el tratamiento de la leishmaniosis	22
Figura 6	Compuestos en vías de desarrollo con actividad leishmanicida	24
Figura 7	Gráfica del origen de fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) entre 1981 y 2006	25
Figura 8	<i>Tridax procumbens</i> L.	53
Figura 9	Esquema de maceración del material vegetal de <i>T. procumbens</i>	86
Figura 10	Esquema de partición del extracto metanólico de <i>T. procumbens</i>	87
Figura 11	Esquema general de purificación de TPZ-25d1	90
Figura 12	Esquema general de purificación de TPZ-26b1	91
Figura 13	Esquema de fraccionamiento de TPZ-2a	92
Figura 14	Comparación de los porcentajes de inhibición de crecimiento de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> de los extractos	93
Figura 15	Porcentaje de inhibición de crecimiento de las fracciones de TPZ-6a – TPZ-6j	96
Figura 16	Cromatograma de gases de TPZ-6h1	97
Figura 17	Patrón de fragmentación de TPZ-6h1	98
Figura 18	Cromatograma de gases de TPZ-25d1	100
Figura 19	Espectro de IR de TPZ-25d1	101
Figura 20	Espectro de RMN- ¹ H de TPZ-25d1 en CDCl ₃	102
Figura 21	Ampliación del espectro de RMN- ¹ H de TPZ-25d1	103
Figura 22	Espectro de RMN- ¹³ C de TPZ-25d1 a 100MHz en CDCl ₃	104
Figura 23	Biosíntesis de las oxilipinas	108
Figura 24	Cromatograma de gases de TPZ-26b1	113
Figura 25	Patrón de fragmentación de TPZ-26b1	114

Figura 26	Porcentaje de infección de macrófagos derivados de médula ósea con <i>L. mexicana</i> tratados posinfección con TPZ-2a	129
Figura 27	Producción de óxido nítrico por macrófagos derivados de médula ósea activados con diferentes concentraciones de los extractos	131
Figura 28	Actividad antioxidante de los extractos de <i>T. procumbens</i> y la oxilipina	132
Figura 29	Inhibición del crecimiento celular de macrófagos por el método MTT	133
Figura 30	Macrófagos infectados con amastigotes de <i>L. mexicana</i> LV4	134
Figura 31	Efecto de la oxilipina y la anfotericina B contra los amastigotes intracelulares	135
Figura 32	Macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i>	137
Figura 33	Inhibición del crecimiento celular de macrófagos	139
Figura 34	Efecto de la oxilipina en la producción de NO por los macrófagos	140
Figura 35	Porcentaje de células infectadas THP-1	152

Resumen

El valor de las plantas como fuente de agentes medicinales se encuentra asociado a sus constituyentes químicos, específicamente por aquellos metabolitos secundarios que han demostrado poseer actividad biológica. En el reino vegetal se encuentran varias plantas que han sido usadas para el tratamiento de parasitosis, como el paludismo, amibiasis, tripanosomiasis y leishmaniosis, entre otras.

Tomando en cuenta que las plantas ofrecen una alternativa para el aislamiento de metabolitos activos, en este trabajo se estudió el extracto metanólico de la planta *Tridax procumbens* L. el cual presentó actividad antiprotozoaria.

La fracción hexánica activa, resultante de la partición del extracto metanólico, fue purificada hasta obtener el metabolito (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, el cual demostró actividad leishmanicida contra promastigotes de *L. mexicana*. Este compuesto no presentó actividad citotóxica contra las diferentes células evaluadas (MDCK, KB, células adherentes y no adherentes). Por otro lado, el (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol presentó actividad leishmanicida contra los amastigotes intracelulares de *L. mexicana* (LV4), observándose una notable disminución en el porcentaje de infección de macrófagos derivados de médula ósea de ratones tratados con el compuesto sin presentar efecto citotóxico en los macrófagos a las concentraciones leishmanicidas. Lo anterior demuestra que la actividad leishmanicida del metabolito es selectiva contra este parásito y no es debida a una citotoxicidad general. También, de la fracción hexánica, se obtuvo una mezcla de los esteroides conocidos estigmasterol y β -sitosterol y un ácido graso, el ácido palmítico. En su evaluación, ninguno de estos compuestos mostró actividad contra los promastigotes de *L. mexicana*. Sin embargo, el ácido palmítico fue ligeramente activo contra *Giardia lamblia*.

Por otro lado, (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol mostró actividad contra *Trypanosoma cruzi* y moderada actividad contra *G. lamblia*.

Abstract

The value of plants as a source for medicinal agents is associated to their chemical components, specifically by those secondary metabolites that have demonstrated to possess biological activity. In the plant kingdom, there are many plants that have been used for the treatment of parasitism, such as malaria, amebiasis, tripanosomiasis, and leishmaniasis.

Taking into account that plants offer an alternative for the isolation of active metabolites, in this work we have studied the methanol extract of the plant *Tridax procumbens* L., which presented antiprotozoal activity.

The active hexane fraction, resulting from the solvent partition of the methanol extract, was purified until obtaining the metabolite (3S)-16,17-dideshydrofalconol, which demonstrated leishmanicidal activity against promastigotes of *Leishmania mexicana*. On the other hand, this compound did not present cytotoxic activity against different cells evaluated (MDCK, KB, adherent and not adherent cells). (3S)-16,17-Dideshydrofalconol presented leishmanicidal activity against intracellular amastigotes of *L. mexicana* (LV4), producing a remarkable reduction in the percentage of infection of macrophages derived from mice bone marrow treated with this compound without presenting cytotoxic effect at the leishmanicidal concentration. The aforementioned test demonstrated that the leishmanicidal activity of the metabolite is selective against this parasite and it is not due to a general cytotoxicity. Also, from the hexane fraction, a mixture of the well-known sterols β -sitosterol and estigmasterol and the fatty acid palmitic acid were obtained. In their evaluation, these compounds did not show activity against promastigotes of *L. mexicana*. Nevertheless, palmitic acid was slightly active against *Giardia lamblia*.

On the other hand, (3S)-16,17-dideshydrofalconol showed activity against *Trypanosoma cruzi* and moderate activity against *G. lamblia*.

INTRODUCCIÓN

La utilidad de plantas medicinales como recurso para solucionar problemas de salud se conoce desde tiempos remotos y aún en la actualidad es una fuente importante de medicamentos (Anthony *et al.*, 2005; Waizel Bucal & Waizel Haiat, 2005). La medicina tradicional es una realidad presente en todo el mundo; como su nombre lo indica, forma parte del patrimonio cultural de cada país, con prácticas que se han transmitido de una generación a otra desde centenares de años antes del desarrollo de nuestra medicina actual (Morón Rodríguez & Jardines Méndez, 1997).

En México, de las 30,000 especies de plantas conocidas, aproximadamente 3,000 son empleadas comúnmente en la medicina tradicional (Argueta *et al.*, 1994). El Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAM) encontró que más de 2,000 especies botánicas tienen aplicaciones terapéuticas (Ponce *et al.*, 1994).

Muchas de las enfermedades comunes en zonas tropicales son causadas por protozoarios. Estos son organismos unicelulares eucariontes; la mayor parte de ellos tiene vida libre, pero algunos actúan como parásitos adaptándose a las condiciones de vida que le provee su huésped (Tay *et al.*, 2002).

En la medicina tradicional también se conocen remedios a estas enfermedades, preparados a partir de plantas. Según la base de datos NAPRALERT las plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos (amibiasis, tripanosomiasis, paludismo y leishmaniosis), incluyen 152 géneros para el tratamiento del paludismo y 139 géneros que poseen actividad amebicida. Existen más de 20 especies vegetales, de diferentes familias taxonómicas, reportadas como poseedoras de productos con actividad significativa contra diferentes especies de *Leishmania* (Phillipson & Wrigth, 1991; Iwu *et al.*, 1994; De Carvalho *et al.*, 2001).

Los protozoarios del género *Leishmania* causan las leishmaniosis, grupo de enfermedades que cursan como úlceras cutáneas o como graves afectaciones viscerales (Alvar-Ezquerro, 2001). Ocurren dos millones de nuevos casos en el mundo (1.5 millones de leishmaniosis

cutánea y 500,000 de leishmaniosis visceral) al año, aunque se estima que la cifra puede llegar hasta 12 millones. La población en riesgo es de 350 millones (Desjeux, 2004).

México es uno de los 88 países afectados por la leishmaniosis. La forma clínica que ha sido detectada en esta región es la leishmaniosis cutánea localizada, también conocida con el nombre común de úlcera del chiclero, esta fue descrita por primera vez en Yucatán y por ende en México, por Seidelin en 1912. Se le denomina de esta manera por producir lesiones ulcerosas con mucha frecuencia en las orejas de ese tipo de trabajadores, y es causada principalmente por *Leishmania mexicana* (Rodríguez Domínguez, 2002; Velasco Castrejón, 1987).

Actualmente, se desconoce el número de plantas utilizadas para el tratamiento de la leishmaniosis en la República Mexicana. En la medicina tradicional de la península de Yucatán, se reportan algunas especies utilizadas en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea localizada: *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae), *Clusia salvinii* (Guttiferae), *Pentalinon andrieuxii* (Apocynaceae), *Scoparia dulcis* (Scrophulariaceae), *Vitex gaumeri* (Verbenaceae), y *Zamia loddigesii* (Cycadaceae) (Hernández-López, 1999; Chan-Bacab, 2000; Lezama-Dávila *et al.*, 2007). Todas estas plantas están o han sido evaluadas en relación a su composición química y a las propiedades farmacológicas de sus metabolitos secundarios.

En un monitoreo de las plantas utilizadas en la medicina tradicional maya, se encontró que *Tridax procumbens* L. es usada contra la disentería (amibiasis), úlceras crónicas (leishmaniosis) y fiebre (malaria), ya sea aplicada de manera tópica u oral (Cáceres *et al.*, 1998). Esta planta ha sido poco estudiada fitoquímicamente (Gadre & Gabhe, 1988; Verma & Gupta, 1988; Yadava & Saurabh, 1998; Ali *et al.*, 2001; Ali & Jahangir 2002; Akbar *et al.*, 2002; Wen-Hao *et al.*, 2008) y sólo existen algunos reportes de las propiedades farmacológicas de sus extractos orgánicos y acuosos (Diwan *et al.*, 1989; Cáceres *et al.*, 1990; Pathak *et al.*, 1991; Saraf & Dixit 1991; Taylor *et al.*, 1996; Berger *et al.*, 1998; Cáceres *et al.*, 1998; Perumal *et al.*, 1999; Taddei & Rosas-Romero, 2000; Morales *et al.*, 2001; Clarkson *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2004; Hemalatha, 2008; Kale *et al.*, 2008).

Peraza-Sánchez y colaboradores reportaron en 2005 y 2007 que el extracto metanólico de *T. procumbens* presenta importante actividad giardicida y leishmanicida.

Tomando en cuenta las propiedades demostradas de *T. procumbens*, y su potencialidad como agente quimioterapéutico, en esta investigación se efectuó el estudio de esta planta, mediante una purificación biodirigida con la finalidad de aislar y elucidar compuestos con actividad antiprotozoaria, enfocándose principalmente en leishmanicida, así como la evaluación citotóxica, de los mismos, y de las actividades giardicida y tripanocida, los cuales podrían convertirse en modelos químicos y/o medicamentos para el tratamiento de estas enfermedades.

Los resultados obtenidos permitieron establecer que *T. procumbens* produce metabolitos con actividad antiprotozoaria, sin actividad citotóxica a las mismas concentraciones contra los parásitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Akbar, E., Malik, A., Afza, N., Hai, S.M.A. (2002) Flavone glycosides and bergenin derivatives from *Tridax procumbens*. *Heterocycles*, 57, 733-739.
- Ali, M., Ravinder, E. (2001) Ramachandran, R. A new flavonoid from the aerial parts of *Tridax procumbens*. *Fitoterapia*, 72, 313-315.
- Ali, M.S., Jahangir, M. (2002) A bis-bithiophene from *Tridax procumbens* L. (Asteraceae). *Natural Product Letters*, 16, 217-221.
- Alvar-Ezquerria, J.P. (2001) Las Leishmaniasis de la Biología al Control. Centro colaborador de la OMS para leishmaniasis. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España, 17 p.
- Anthony, J.P., Fyfe, L., Smith, H. (2005) Plant active components. A resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, 21, 462-468.
- Argueta Villamar, A. (1994) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomos I y II. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F.
- Berguer, I., Barrientos, A.C., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter C.M., Kubelka, W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 107-115.
- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B., Aguilar, L. (1990) Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders I. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 30, 55-73.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I., Maki, J. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Chan Bacab, M.J. (2000) Estudio del efecto de la variabilidad geográfica sobre la actividad leishmanicida en poblaciones de *Urechites andrieuxii* Muell. Arg. existentes en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas, CICY, Mérida, México, pp. 33-34.
- Clarkson, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M.G., Bhagwandin, N., Smith, P.J., Folb, P.I. (2004) In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native or naturalised in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 177-191.

- De Carvalho, P.B., and Ferreira, E.I. (2001) Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, 72, 599-618.
- Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 305-318.
- Diwan, P.V., Karwande, I., Margaret, I., Sattur, P.B. (1989) Pharmacology and biochemical evaluation of *Tridax procumbens* on inflammation. *Indian Journal of Pharmacology*, 21, 1-7.
- Gadre, A.P., Gabhe, S.Y. (1988) Saturated and unsaturated fatty acids from *Tridax procumbens*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168.
- Hemalatha, R. (2008) Anti-hepatotoxic and anti-oxidant defense potential of *Tridax procumbens*. *International Journal of Green Pharmacy*, 1, 164-169.
- Hernández-López, A.B. (1999) Evaluación de la actividad leishmanicida in vitro de extractos de *Zamia loddigessi* Miq. sobre promastigotes de *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Tesis de Licenciatura. Q.F.B. UADY, Mérida, México, pp. 9.
- Iwu, M.M., Jackson, J.E., Schuter, B.G. (1994) Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today*, 10, 65-68.
- Kale, M.A., Shahi, S.R., Somani, V.G., Shamkuwar, P.B., Dhake, A.S. (2008) Hemostatic activity of the leaves of *Tridax procumbens* Linn. *International Journal of Green Pharmacy*, I January-March, 54-55.
- Lezama-Dávila, C., Isaac-Márquez, A.P., Zamora-Crescencio, P., Úcencalada, M.R., Justiniano-Apolinar, S.Y., Angel-Robles, L.A., Satoskar, A., Hernández-Rivero, L. (2007) Leishmanicidal activity of *Pentalinon andrieuxii*. *Fitoterapia*, 78, 255-257.
- Morales, C., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Villar A.M., Cáceres, A. (2001) Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala. *Il Farmaco*, 56, 523-526.
- Morón Rodríguez, F.J., Jardines Méndez, J.B. (1997) La medicina tradicional en las universidades médicas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1, 35-41.
- 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. (2007) Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Peraza-Sánchez, S.R., Poot-Kantún, S., Torres-Tapia, L.W.; May-Pat, F.; Simá-Polanco, P.; Cedillo-Rivera, R. (2005) Screening of native

- plants from Yucatán for anti-*Giardia lamblia* activity. *Pharmaceutical Biology*, 43, 594-598.
- Perumal Samy, R., Ignacimuthu, S., Patric Raja, D. (1999) Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. *Journal of Ethnopharmacology*, 66, 235-240.
- Phatak, A.K., Saraf, S., Dixit, V.K. (1991) Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens*. Part I. *Fitoterapia*, 62, 307-313.
- Phillipson, J.D. and Wright, C.W. (1991) Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Medica*, 57, 53-59.
- Ponce-Macotela, M., Navarro-Alegría, I., Martínez-Gordillo, M.N., Alvarez-Chacón, R. (1994) Efecto anti-giardiasico *in vitro* de 14 extractos de plantas. *Revista de Investigación Clínica*, 46, 343-347.
- Rodríguez Domínguez, J. (2002) Las enfermedades transmitidas por vector en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 45, 126-141.
- Saraf, S. and Dixit, V.K. (1991) Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens*. Part II. *Fitoterapia*, 62, 534-536.
- Taddei, A., and Rosas-Romero, A.J. (2000) Bioactivity studies of extracts from *Tridax procumbens*. *Phytomedicine*, 7, 235-238.
- Tay, J., Lara, R., Velasco, O., Gutiérrez, M. (2002) *Parasitología Médica*. Editorial México Méndez Cervantes, México, 7a. Edición.
- Taylor, R.S.L., Hudson, J.B., Manandhar, N.P., Towers, G.H.N. (1996) Antiviral activities of medicinal plants of southern Nepal. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 97-104.
- Tiwari, U., Rastogi, B., Singh, P., Saraf, D.K., Vyas, S.P. (2004) Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 113-119.
- Velasco-Castrejo, O. (1987) Las leishmaniasis en México. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 29, 119-126.
- Verma, R.K. and Gupta, M.M. (1988) Lipid constituents of *Tridax procumbens*. *Phytochemistry*, 27, 459-463.
- Waizel Bucal, J. and Waizel Haiat S. (2005) Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias Parte I. *Anales de Otorrinolaringología Mexicana*, 4, 76-87.
- Wen-Hao, C., Xing-Ming, M., Quan-Xiang, W., Yan-Ping, S. (2008) Chemical-constituent diversity of *Tridax procumbens*. *Canadian Journal of Chemistry*, 86, 892-898.
- Yadava, R.N. and Saurabh, K.A (1998) A new flavone glycoside: 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxyflavone-5-O- α -L-rhamnopyranoside from the

leaves of *Tridax procumbens* L. Journal of Asian Natural Products Research, 1, 147-152.

Capítulo 1

Antecedentes

Los parásitos protozoarios se encuentran entre los patógenos con una mayor incidencia a nivel mundial, siendo la causa de algunas de las enfermedades tropicales más devastadoras para el hombre y los animales domésticos, como el paludismo, la amibiasis, la giardiasis, la toxoplasmosis, la tripanosomiasis y la leishmaniosis, que afectan aproximadamente al 25% de la población mundial, provocando pérdida de vidas y de productividad, principalmente en países en desarrollo (Gallagher *et al.*, 1994).

La evaluación científica de las plantas medicinales forma parte de la medicina moderna. Varios compuestos provenientes de plantas han sido y son evaluados en varios laboratorios como potentes agentes antiparasitarios, principalmente contra la malaria (Akedengue *et al.*, 1999).

1.1. LEISHMANIOSIS

Los protozoarios del género *Leishmania* causan las leishmaniosis, un grupo de enfermedades que cursan como úlceras cutáneas o como graves afectaciones viscerales. Entre estas dos manifestaciones extremas de la enfermedad existen diferentes formas clínicas. Existen aproximadamente veinte especies patógenas de *Leishmania* que son transmitidas por la picadura de los insectos dípteros de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (Alvar-Ezquerria, 2001).

La mayoría de las especies son patógenas al hombre y a vertebrados inferiores. Estas especies han sido diferenciadas por medio de estudios genéticos, bioquímicos e inmunológicos (Lezama-Dávila e Isaac-Márquez, 1995; Arias *et al.*, 1996).

La enfermedad, depende de la virulencia propia de cada especie y de la respuesta inmune que establezca cada hospedador. La parasitosis se caracteriza por diversas manifestaciones clínicas, dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante, por lo que han sido clasificadas en (Bray, 1974; Herwald, 1999):

- a) Leishmaniosis visceral, también conocida como “Kala-azar”
- b) Leishmaniosis mucocutánea
- c) Leishmaniosis cutánea, que a su vez se divide en leishmaniosis cutánea difusa y leishmaniosis cutánea localizada

La leishmaniosis visceral o “Kala azar” es la forma clínica más severa de la enfermedad, siendo por lo general mortal si no es tratada. Se caracteriza por la afección de los órganos internos, especialmente el hígado y el bazo, en los que provoca hepatoesplenomegalia. La leishmaniosis mucocutánea a menudo provoca una desfiguración facial causada por la erosión de los sitios mucocutáneos de la boca, la nariz y el tabique nasal. La leishmaniosis cutánea difusa o diseminada se caracteriza por la formación de nódulos, placas o pápulas múltiples, especialmente en la cara y sobre la superficie exterior de los miembros. La leishmaniosis cutánea localizada se caracteriza por la formación de lesiones ulcerosas en la piel, localizadas principalmente en áreas expuestas y con una mayor frecuencia en orejas y cara. La lesión se inicia como una pápula que se convierte paulatinamente en una úlcera subcutánea, en forma de cráter, de bordes elevados y endurecidos. Su curación puede ser espontánea, dejando una cicatriz como evidencia. Cuando la lesión se localiza en el pabellón auricular puede ser deformante, tiende a hacerse crónica, provocando una mutilación severa del cartilago (Berman, 1997; Tay *et al.*, 2002).

Las formas clínicas están en estrecha relación con la especie de *Leishmania* y la respuesta adaptativa, resultado del equilibrio entre la inmunidad celular y humoral. (Murray *et al.*, 2005; Reithinger *et al.*, 2007; Liese *et al.*, 2008).

El diagnóstico de la leishmaniosis suele ser complicado por la variedad de sus síntomas clínicos, pero básicamente se confirma al identificar al parásito, para el cual se emplean diversos métodos ya sea directos (ej. examen microscópico usando tinciones), serológicos

(ej. inmunofluorescencia indirecta) y moleculares (ej. PCR) (Berman 1997; Cuba-Cuba 2000; Cáceres-Rey & Montoya-Piedra, 2002; Davies *et al.*, 2003).

1.1.1. Ciclo biológico

Leishmania es un parásito digénico; realiza parte de su ciclo biológico tanto en el tubo digestivo del vector invertebrado como en las células fagocíticas del hospedador vertebrado. En el invertebrado adopta una forma flagelar (promastigote), y en el vertebrado una forma aflagelar o amastigote dentro de los macrófagos. El promastigote, mide entre 15 y 28 μm de largo, representa la forma que infecta al hombre y a otros huéspedes vertebrados, presenta un núcleo oval en la región central del parásito y un kinetoplasto subterminal en la parte anterior, del cual se origina un flagelo casi de igual tamaño que el cuerpo. El amastigote es la forma parasitaria, y sólo se observa en los tejidos de los vertebrados infectados o en cultivos de tejidos; mide alrededor de 2 a 4 μm de diámetro, es inmóvil, en su citoplasma se observa un núcleo voluminoso y esférico, generalmente excéntrico, y un kinetoplasto de aspecto bacilar, el cual se colorea intensamente con tinción de Giemsa y está asociado a un rudimento de flagelo llamado rizoplasto (Herwaldt, 1999; Hepburn, 2000; Vannier-Santos *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2005).

El ciclo biológico se completa cuando el vector (*Phlebotomus* o *Lutzomyia*); infectado se alimenta de un huésped susceptible e inyecta con su saliva los parásitos que porta. Una vez que el promastigote alcanza los capilares cutáneos del hospedador vertebrado, es fagocitado por el macrófago, en donde pierde su flagelo, se redondea transformándose en amastigote y empieza a dividirse por fisión binaria hasta llenar el citoplasma de la célula, rechazando el núcleo, haciéndola estallar e invadiendo nuevas células. El macrófago trata de eliminar al parásito en la vacuola parasitófora, mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, principalmente óxido nítrico, y con la liberación de hidrolasas lisosomales que se vierten al espacio intravacuolar. Sin embargo, *Leishmania* evade esas reacciones inmunológicas e inespecíficas del macrófago logrando vivir y multiplicarse en su interior. De la eficacia en la respuesta inmune y la virulencia de este

protozoario depende la progresión de la leishmaniosis. Si sobreviven las leishmanias, los monocitos parasitados circulantes pueden ser ingurgitados por otro flebotomo, en cuyo intestino se liberan los amastigotes, que recuperan la forma de promastigotes y, tras varios días, alcanzan la capacidad infectiva, ya en la proximidad de la probóscide, quedando así dispuestos para ser inoculados, con lo que se cierra el ciclo (Fig. 1) (Alvar-Ezquerro, 2001; Tay *et al.*, 2002; Singh 2006; Reithinger *et al.*, 2007)

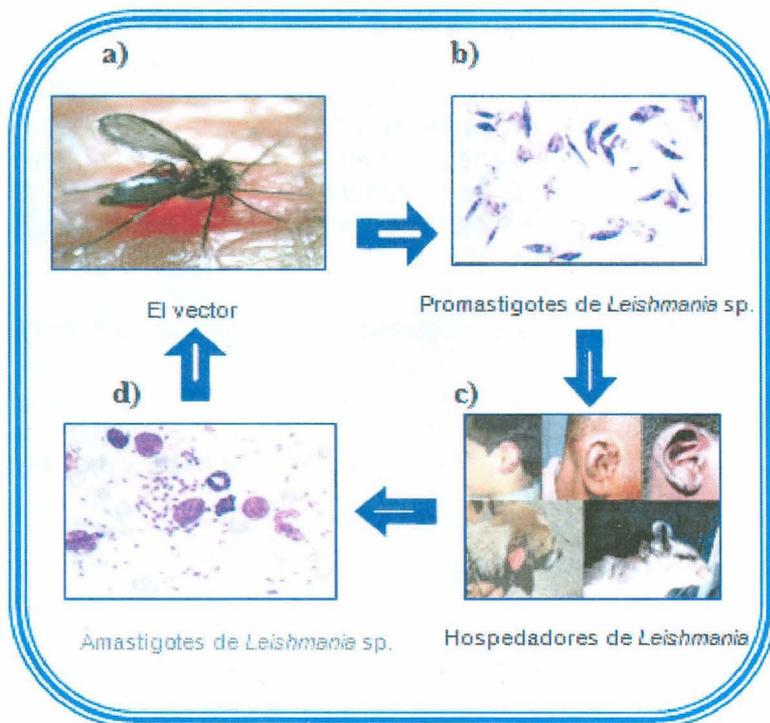


Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* sp. **a)** El vector infectado se alimenta de un huésped susceptible, **b)** los promastigotes son inoculados a **c)** los hospedadores susceptibles, donde son fagocitados por los macrófagos, pierden su flagelo y se redondean transformándose en **d)** amastigotes, los cuales son ingeridos por otro vector, en cuyo intestino se liberan los amastigotes, que recuperan la forma de promastigote y tras varios días alcanzan la capacidad infectiva, quedando así dispuestos para ser inoculados, con lo que se cierra el ciclo (Alvar-Ezquerro, 2001; Tay *et al.*, 2002; Singh, 2006 y Reithinger *et al.*, 2007).

1.1.2. Epidemiología

La leishmaniosis se reporta en 88 países de diversos contextos geográficos de las zonas tropicales y subtropicales. Más del 90% de la leishmaniosis cutánea está reportada en Afganistán, Algeria, Arabia Saudita, Brasil, Irán, Iraq, Siria y Sudán, mientras que más del

90% de los casos de la forma visceral ocurre en poblaciones rurales de Bangladesh, India, Nepal, Sudán y Brasil (Ashford *et al.*, 1992; Desjeux, 2004).

La prevalencia de leishmaniosis es de 12 millones de enfermos, con una incidencia de 1 a 1.5 millones de casos anuales de leishmaniosis cutánea y de 500,000 casos, de leishmaniosis visceral. La población en riesgo es de 350 millones de personas (Desjeux, 2001; Desjeux, 2004).

La prevalencia e incidencia sólo pueden ser estimados de manera tentativa, por ser enfermedades de transmisión rural, localizadas en zonas remotas, y porque en muchos casos no son diagnosticadas por falta de atención médica o por ser asintomáticas. Por otra parte, en el sur de Europa se ha observado un aumento de casos debido a la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Desjeux, 2004).

La leishmaniosis en México se distribuye al menos en 17 entidades, desde Chiapas, Coahuila, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas, Tabasco, Veracruz, y en los estados de la península de Yucatán (Fig. 2) (Velasco-Castrejón, 1987; 1991; Rodríguez-Domínguez 2002).



Figura 2. Distribución de leishmaniosis en México. El asterisco (*) representa el mayor número de casos de leishmaniosis, observándose que estos son los estados de Campeche, Chiapas, Nayarit, Quintana Roo y Tabasco. Mapa tomado del libro de trabajo de: Análisis de leishmaniosis en México. Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniosis visceral en las Américas, Brasilia, Brasil, Becker, 2005.

En México, hasta 1991 sólo se habían notificado cinco casos de LV, todos al suroeste de la ciudad de México (cuenca del río Balsas), en los estados de Guerrero, Morelos y Puebla. Entre 1991 y 1993 se registraron siete casos en el estado de Chiapas. De estos casos, seis se presentaron en menores de 5 años (uno falleció) y el restante, en un adulto de 22 años de edad (Arias, 1996). En 2004 se reportó un caso de un paciente preescolar originario del estado de Guerrero (Romano-Mazzotti *et al.*, 2004). Entre 1952 y 2005 se han registrado un total de 91 casos de LV en México, 78 de los cuales se registraron en Chiapas. Estos datos reflejan la expansión progresiva de esta leishmaniosis en México (Becker *et al.*, 2005). En 2007 se reportó un caso de un paciente preescolar, en el estado de Guerrero (Hernández-Flores *et al.*, 2007).

Leishmania mexicana causa la forma cutánea o “úlceras de los chicleros”, y se presenta principalmente en el sureste de México, en los estados de Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Veracruz, especialmente en los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán. En 1993 se registraron 170 casos en el estado de Nayarit. Durante el período 1987-1989, en el estado de Tabasco se registraron 625 casos, incluidos 18 de leishmaniosis cutánea diseminada (LCD). A partir de 1989 ha aumentado el número de casos en Chiapas (Arias, 1996). De 1995 a 2000 se reportaron casos en 11 estados con presencia regular en ocho de ellos, Campeche, Chiapas, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco y Veracruz (Rodríguez-Domínguez, 2002). En resumen, desde 1981 hasta la semana 40 de 2005, se ha reportado en México un total de 16,532 casos de LCL y 23 de LCD (Becker et al., 2005). En Veracruz, en 2005, se reportó un total de 68 casos confirmados (Pérez-Sánchez, 2007). En el año 2006 se reportó un caso de un paciente de 31 años de edad en el estado de Oaxaca (Rábago et al., 2006).

En México se han reportado 27 casos con leishmaniosis mucocutánea, especialmente en los estados de Oaxaca y Veracruz; se piensa que, además de los casos reales, se han sumado casos de LCL con invasión de mucosas por cercanía. Debido a que en México no existen campañas de detección activa, estos datos representan únicamente una pequeña porción del número total de los pacientes con leishmaniosis existentes en México (Becker et al., 2005).

En estudios epidemiológicos, la leishmaniosis es nueve veces más frecuente en el hombre que en las mujeres, a causa del tiempo de exposición prolongada, debido a sus actividades laborales a la intemperie o rurales, como es el caso de los campesinos, personal militar, ganaderos, chicleros, madereros, exploradores, antropólogos y constructores de carreteras o vías férreas (Frías-Salcedo, 1997; Tay et al., 2002; Marin-Leonett, 2007).

1.1.3. Reservorios

En general, se considera que los roedores silvestres son los reservorios de la leishmaniosis cutánea y que los cánidos silvestres y

domésticos, los de leishmaniosis visceral. Sin embargo, en ciertas regiones endémicas de leishmaniosis cutánea de Argentina, Brasil, Costa Rica, Panamá y Perú, se ha observado perros con lesiones típicas, a los que se les ha aislado el agente etiológico (Velasco-Castrejón, 1987; Tay *et al.*, 2002).

1.1.4. Control

Las medidas de control varían de una zona a otra, según los hábitos de los huéspedes mamíferos y de los flebotomos vectores. La lucha contra la leishmaniosis se dirige en tres direcciones (Benenson, 1997; Chin, 2001 Zorio-Grima, 2005):

- 1) A nivel de vector: tratamiento por insecticidas.
- 2) A nivel de reservorio: collares insecticidas repelentes (deltametrina), pipetas insecticidas aplicadas sobre la piel (permetrina).
- 3) A nivel de pacientes: tratamiento específico.

1.1.5. Tratamiento

El tratamiento de elección de cualquier forma de leishmaniosis son los antimoniales pentavalentes; en el mercado existen dos presentaciones, el antimoniato de meglumina (Glucantime®; Rhône-Poulenc, París) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®; Wellcome, London) (Berman, 1997; Croft *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008) (Fig. 3). El mecanismo de acción de estos dos medicamentos se da por la interferencia con los procesos bioenergéticos de los amastigotes, inhibiendo los procesos de glucólisis y oxidación de ácidos grasos y acompañado de una reducción neta en la producción de ATP y GTP. También se ha descrito la unión inespecífica del antimonio con los grupos sulfhidrilos de las proteínas del parásito (Grimaldi Jr & Tesh, 1993; Balaña-Fouce *et al.*, 1998; Hepburn, 2000; Croft & Yardley, 2002; Mishra *et al.*, 2007). Además de que en algunos países estos fármacos han sido ineficaces aun con terapias prolongadas (Singh & Sivakumar, 2004; Davis & Kedzierski, 2005), también producen efectos secundarios como: nefrotoxicidad, pancreatitis, hipocalcemia, artralgias, náusea, anorexia, vómito, dolor en el sitio de aplicación, alteraciones electrocardiográficas y rara vez la muerte súbita

(Balaña-Fouce *et al.*, 1998; Herwaldt 1999; Hepburn 2000; Singh & Sivakumar 2004; Murray 2005).

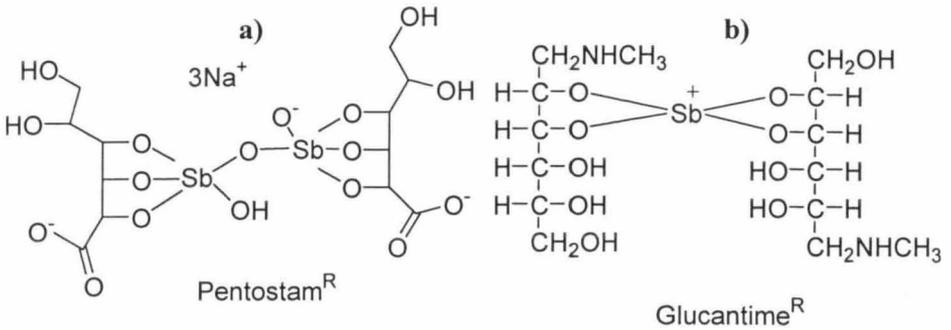


Figura 3. Medicamentos usados en el tratamiento de la leishmaniosis. **a)** Estructura química de Pentostam[®]; **b)** Estructura química de Glucantime[®].

Como medicamentos de segunda línea se utilizan la pentamidina y la anfotericina B (Fig. 4). Ambos son buenas opciones para aquellos pacientes que no pueden recibir antimoniales por contraindicaciones. También son útiles para tratar los casos de fracaso terapéutico (Berman, 1997; Herwaldt, 1999; Piñero *et al.*, 2004; Murray, 2005; Santos *et al.*, 2008).

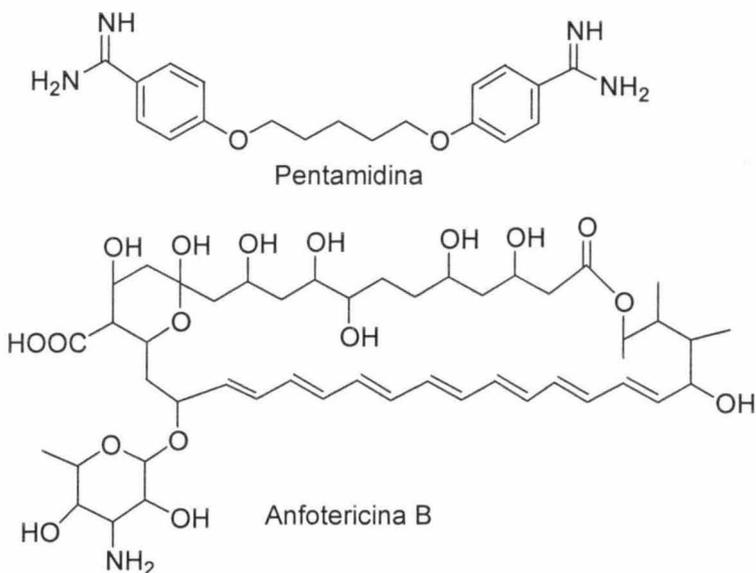


Figura 4. Estructuras químicas de la pentamidina y de la anfotericina B. Medicamentos de segunda línea, para el tratamiento de la leishmaniosis.

La pentamidina (Fig. 4) es un compuesto que pertenece a la familia de las diaminas, es tóxica para diferentes protozoarios, y aunque no se emplea de rutina en el tratamiento de las leishmaniosis, ha mostrado ser especialmente útil en caso de falla en la respuesta a los antimoniales (Bray *et al.*, 2003; Robledo *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2008). Su mecanismo de acción sobre la leishmaniosis aún no es claro. A nivel intracelular, la pentamidina se une al ADN del parásito, pero aún no se ha establecido cómo se lleva al cabo esta unión y su eficacia (Mishra *et al.*, 2007). Se ha sugerido que la pentamidina interfiere también con la captación o la función de las poliaminas (Balaña-Fouce *et al.*, 1998). Entre los efectos adversos asociados con la administración intravenosa de la pentamidina están hipotensión, taquicardia, mareos, vómitos, diarreas y cefaleas. Otras reacciones adversas incluyen eritema, anomalías de la función hepática e hipoglucemia (Berman, 1997; Murray *et al.*, 2005).

La anfotericina B (Fig. 4) es una alternativa al tratamiento habitual con antimoniales, especialmente por la alta resistencia que se reporta en estos últimos (Croft, 2001; Ashutosh & Goyal, 2007), y es un antibiótico poliénico que presenta actividad antifúngica y leishmanicida. Su actividad depende de su afinidad por los esteroides de membrana, específicamente con el ergosterol, que es el principal esteroide en las membranas plasmáticas de los parásitos leishmánicos. Sus efectos se relacionan con la perturbación irreversible de la permeabilidad y el transporte de membrana, formándose poros por donde escapan iones y otras moléculas del citoplasma, afectando así la vida del parásito. La elevada toxicidad de este fármaco se debe a que no sólo afecta los esteroides de la membrana del parásito sino que también, se une a los esteroides de las células de los mamíferos, alterando su permeabilidad. La principal reacción adversa generada por la administración intravenosa de este fármaco se acompaña de fiebre y escalofríos, hipotensión, anemia, hipocalcemia y hepatitis. Su uso es restringido por sus efectos tóxicos, particularmente cardiotoxicidad y nefrotoxicidad (Berman, 1997; Balaña-Fouce *et al.*, 1998; Croft & Yardley, 2002; Blum *et al.*, 2004; Singh & Sivakumar, 2004; Hernández-Flores *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2007).

Otros fármacos que han sido usados como alternativas son:

- Ketoconazol (Fig. 5), azol que también inhibe la síntesis de ergosterol de la membrana del parásito, por reducción del lanosterol. Sus efectos adversos son náusea, dolor de cabeza, fiebre y hepatotoxicidad (Balaña-Fouce *et al.*, 1998; Blum *et al.*, 2004).
- Paramomicina (Fig. 5), antibiótico aminoglicósido que se obtiene de *Streptomyces rimosus*, y actúa sobre el ribosoma bloqueando la síntesis proteica de la *Leishmania* (Berman, 1997; Croft & Yardley, 2002; Croft & Coombs, 2003; Mishra *et al.*, 2007). La paramomicina es un potencial reemplazo a la anfotericina B y al uso de antimoniales en la India (Murray, 2004).
- Miltefosina (Fig. 5), una hexadecil-fosfololina inhibidora de la síntesis de fosfolípidos, originalmente desarrollada para el tratamiento del cáncer. Su alta eficacia demostrada contra *L. panamensis* hace que se considere de primera línea en Colombia, pero es necesario establecer su comportamiento frente a otras especies de leishmanias. Su administración por

vía oral y su excelente perfil de seguridad son ventajas importantes; sin embargo, deben extremarse cuidados para su empleo en mujeres de edad fértil, así como para realizar el tratamiento bajo supervisión que garantice la administración completa, para evitar los fracasos terapéuticos y la eventual generación de resistencia (Blum *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2004; Croft *et al.*, 2006; Soto & Soto, 2006; 2006a; Soto & Toledo, 2007). Entre sus efectos adversos se mencionan náusea, vómitos y diarrea (Murray *et al.*, 2005).

- Sitamaquina (WR6026) (Fig. 5), una aminoquinolina cuyo mecanismo de acción es desconocido, pero se cree que afecta el transporte de electrones en la mitocondria. En un estudio realizado en la India, sitamaquina demostró una gran eficiencia contra LV, y tolerancia elevada (Croft & Coombs, 2003; Singh & Sivakumar, 2004; Jha *et al.*, 2005; Sundar & Chatterjee, 2006).

y el largo período de tratamiento (WHO, 1996; Murria, 2001; Aparicio *et al.*, 2003; Desjeux, 2004; Murray, 2004).

Los agentes físicos, como la crioterapia, que consiste en aplicar nitrógeno líquido de manera local en las lesiones, y la termoterapia, han sido buenas alternativas de manejo para los casos recurrentes (Xaidara *et al.*, 1999); ambas son formas eficaces de acelerar la curación de las úlceras, de acuerdo con los resultados de algunos estudios (Reithinger *et al.*, 2005).

En zonas afectadas por leishmaniosis cutánea, los tratamientos tradicionales incluyen: hierbas, árboles o plantas autóctonas, sustancias químicas y ácidos, antibióticos, azufre, ceniza, tratamientos a base de calor como fósforos encendidos, objetos de metal calientes, baterías, y derivados del petróleo, entre otros. Algunos de esos tratamientos pueden tener eficacia clínica (Vázquez *et al.*, 1991; Weigel *et al.*, 1994; Ortega-Canto *et al.*, 1996).

A pesar de los posibles beneficios terapéuticos, también abundan los efectos secundarios indeseables, por ejemplo, los métodos a base de ácidos fuertes, sustancias cáusticas y objetos de metal calientes pueden provocar cicatrices permanentes aún más graves que las causadas por las úlceras mismas. En casos extremos, estos tratamientos pueden causar necrosis tisular extensa, un mayor riesgo de infección secundaria y un retraso en la curación de las úlceras. Asimismo, la aplicación de sustancias tóxicas como gasolina, queroseno, formalina, mercurio, plomo o blanqueadores clorados a las llagás abiertas, puede estimular la carcinogénesis en individuos susceptibles y provocar defectos congénitos en hijos de mujeres embarazadas (Weigel *et al.*, 1994).

La ausencia de una vacuna efectiva, los serios efectos adversos, la falta de seguridad y el alto costo de los medicamentos, ha motivado la necesidad de la búsqueda de nuevos medicamentos para el tratamiento de la leishmaniosis. En la actualidad existen diferentes productos en vías de desarrollo (Fig. 6), pero hasta la fecha, ninguno de ellos ha demostrado ser efectivo completamente contra todas las especies de *Leishmania*. Estos incluyen el NSC#83633, NSC#13512 y NSC#351520 (Fig. 6) (St. George *et al.*, 2006).

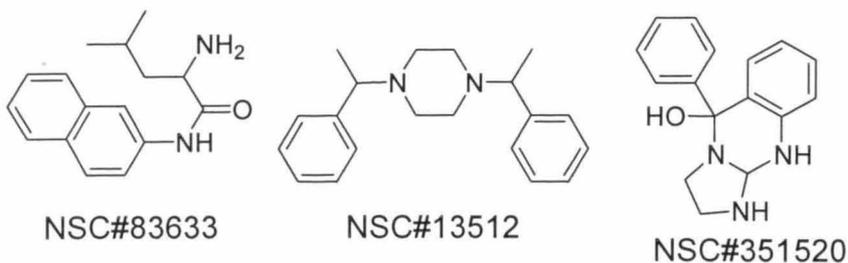
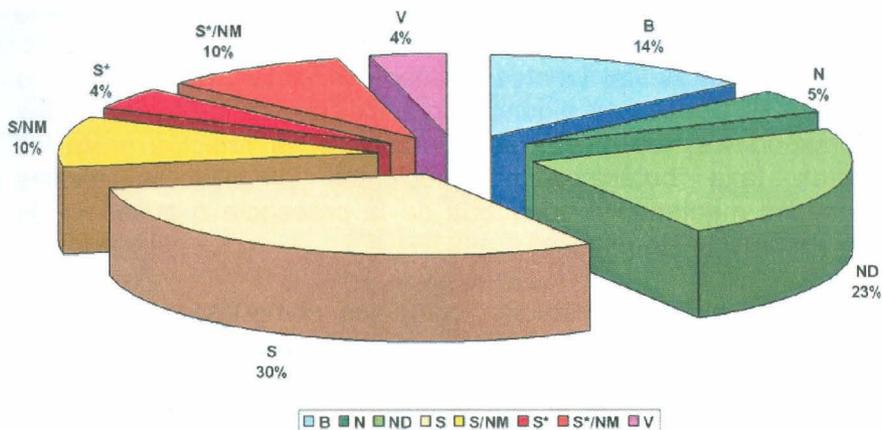


Figura 6. Compuestos en vías de desarrollo con actividad leishmanicida.

1.2 PRODUCTOS NATURALES COMO FÁRMACOS

De los 870 fármacos aprobados entre 1981 y 2006, más del 47% son productos naturales o derivados de los mismos, como se observa en la gráfica (Fig. 7) (Newman & Cragg, 2007). La comercialización de los mismos ha generado importantes ganancias anuales, de alrededor de más de 16 billones de dolares (Harvey, 2000).



- B: De origen biológico
- N: Moléculas naturales no modificadas
- ND: Moléculas derivadas de productos naturales
- S: Sintéticos
- S*: Sintetizadas a partir de un patrón natural
- V: Vacunas
- NM: Productos naturales mimetizados

Figura 7. Gráfica del origen de fármacos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA), entre 1981 y 2006. Gráfica tomada de Newman & Cragg, 2007.

La base de datos NAPRALERT recopila 152 géneros que se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos protozoarios.

Para obtener productos biológicamente activos a partir de plantas existen varias estrategias: aleatoria, fitoquímica, quimiotaxonómica, ecológica y etnobotánica.

La primera estrategia, la aleatoria, está basada en el hecho de que una selección aleatoria, combinada con el análisis de un número adecuado de muestras, dará como resultado la identificación de extractos o productos eficaces en el tratamiento de una enfermedad en particular.

La fitoquímica es el estudio de la distribución de los metabolitos primarios y secundarios en el mundo vegetal y esta distribución es la que guía la búsqueda, no sólo de nuevos compuestos vegetales, sino también de nuevas fuentes de medicamentos. Asimismo, es la clave para el trabajo de algunos botánicos sistemáticos, llamados quimiotaxónomos, los cuales intentan aclarar la relación entre los diferentes taxa botánicos pertenecientes a distintos niveles taxonómicos mediante la búsqueda de la presencia o ausencia de ciertas sustancias fitoquímicas.

Los ecólogos químicos estudian cómo los compuestos biológicos afectan las relaciones entre las plantas y los animales, poniendo especial énfasis en la interacción planta-insecto. Mientras que la etnobotánica se basa en el uso tradicional de las plantas por las poblaciones aborígenes (Martín, 1995; Valencia, 1995).

En la medicina tradicional de diferentes culturas se utilizan plantas autóctonas (Cuadro 1) para el tratamiento de la leishmaniosis (Weigel *et al.*, 1994). En la práctica de la medicina tradicional, el tratamiento de la leishmaniosis consiste en la administración oral de los extractos vegetales para la forma sistémica de la enfermedad y como preparaciones tópicas de los mismos para infecciones cutáneas (Iwu *et al.*, 1994). Tomando en cuenta este conocimiento, y en su búsqueda de nuevos fármacos con mayor efectividad, fácil disponibilidad y baja toxicidad, el programa de enfermedades tropicales de la OMS ha considerado prioritaria e indispensable la investigación de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la leishmaniosis.

Cuadro 1. Ejemplos de plantas autóctonas usadas para el tratamiento de la leishmaniosis. Tomado de Weigel *et al.*, 1994, Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 117, 407.

<i>Nombre común</i>	<i>Nombre científico</i>	<i>Parte usada</i>
Achiote	<i>Bixa orellana</i>	Hojas
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Dientes
Guayaba	<i>Psidium guajava</i>	Jugo, pulpa
Limón	<i>Citrus aurantifolia</i>	Jugo
Mandarina	<i>Citrus reticulata</i>	Jugo
Manzanilla	<i>Matricaria chamomilla</i>	Flor
Naranja	<i>Citrus aurantium</i> <i>C. sinensis</i>	Jugo
Piñón	<i>Pinus sp.</i>	Savia
Plátano	<i>Musa paradisiaca</i>	Cáscara, savia y fruto
Ruda	<i>Ruta graveolens</i>	Hojas
Yerba mora	<i>Sofanum nigra</i>	Frutos, hojas
Zarzaparilla	<i>Smilax sp.</i>	Hojas

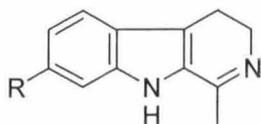
1.2.1 Metabolitos con actividad leishmanicida

La mayoría de los metabolitos aislados e identificados de plantas usadas en el tratamiento de la leishmaniosis son de tipo alcaloide, seguido por los de tipo triterpénico, sesquiterpénico, lactonas misceláneas, quinoides, flavonoides, diterpenos, esteroides, lípidos, iridoides, heterociclos oxigenados, bencenoides, carbohidratos, lignanos, compuestos proteicos, coumarinas, fenilpropanoides, dépsidos, compuestos azufrados y monoterpenos (Phillipson & Wright, 1991; Iwu *et al.*, 1994; Akedengue *et al.*, 1999; Evans 2002; Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001; De Carvalho & Ferreira, 2001; Kayser *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2005; Salem & Werbovetz, 2006; Polonio & Efferth 2008).

Entre los ejemplos de componentes aislados de plantas con actividad leishmanicida considerados en la literatura están los siguientes: alcaloides, terpenos, quinonas, chalconas, compuestos fenólicos y flavonoides, entre otros. A continuación se presenta una breve revisión de ellos a partir de 2001. Los metabolitos se han agrupado en clases para su descripción, incluyendo una breve información de su actividad.

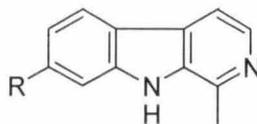
Alcaloides

Entre los alcaloides indólicos reportados por presentar actividad antiprotozoaria está la harmalina (**1**), que es el constituyente principal de varias plantas utilizadas en la medicina tradicional para curar leishmaniosis, entre las que se incluyen *Peganum harmala* y *Pasiflora incarnata*. Otras β -carbolinas como la harmana (**2**) y la harmina (**3**) fueron reportadas como potentes inhibidores de crecimiento de *L. infantum* (CI_{50} entre 0.2 y 1.1 μ M). Por otro lado, harmana también presentó actividad contra los amastigotes de *L. amazonensis* con un $IC_{50} = 24 \mu$ g/mL. Igualmente, estos compuestos y análogos de β -carbolinas, como harmalol (**4**) y harmol (**5**), fueron reportados con actividad antiprotozoaria. El posible mecanismo de acción antiprotozoario de estos compuestos parece estar relacionado con el ADN o por interferir con el metabolismo de aminoácidos aromáticos en el parásito, sin embargo debido a su actividad como inhibidor de la monoaminoxidasa A, produce efectos psicopáticos que impiden su uso como agentes terapéuticos (Di Giorgio *et al.*, 2004; Osorio *et al.*, 2006).



1 R = OCH₃

2 R = OH



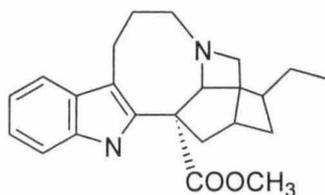
3 R = H

4 R = OCH₃

5 R = OH

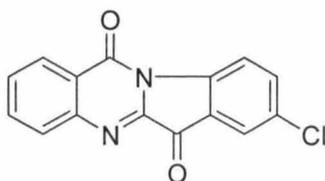
El alcaloide indólico coronaridina (**6**), aislado de la corteza del tallo de *Peschiera australis* (Apocynaceae) demostró actividad inhibiendo 97% de los promastigotes a una concentración de 12 μ g/mL y fue

activa contra los amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* ($CI_{50} = 1.25 \mu\text{g/mL}$), presentando alteraciones en la mitocondria, sugiriendo que el metabolismo energético es afectado. El metabolito a concentraciones de 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ mostró cierta toxicidad contra los macrófagos después de siete días de tratamiento. La capacidad de afectación de la fagocitosis fue del 15% a concentraciones de 20 $\mu\text{g/mL}$, sin embargo la fagocitosis y los macrófagos no fueron afectados a las concentraciones tóxicas del parásito (Delorenzi *et al.*, 2001).



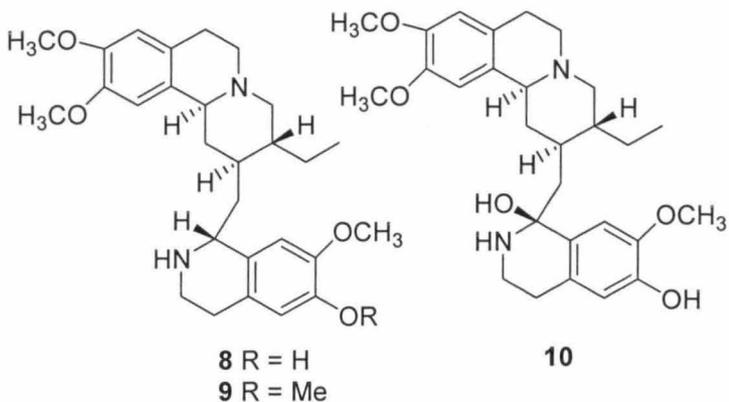
6

El compuesto 4-aza-8-clortriptanthrina (7) análogo de la triptantrina presentó un $CI_{50} = 0.13 \mu\text{M}$, contra los amastigotes axénicos de *L. donovani*, y un $CI_{50} = 8.9 \mu\text{M}$ contra los macrófagos murinos J744 y células neuronales de rata NG-108-15. Desafortunadamente, la actividad contra macrófagos infectados con *Leishmania* todavía no se ha observado en las triptantrinas (Bhattacharjee *et al.*, 2002).

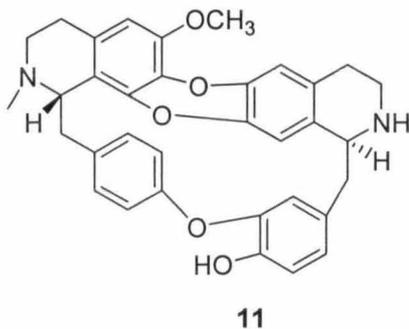


7

La cefaelina (8), aislada de la corteza de las raíces de *Psychotria klugii* (Rubiaceae), exhibió actividad contra los promastigotes de *L. donovani* ($CI_{50} = 0.03 \mu\text{g/mL}$), siendo 193 veces más selectiva contra los parásitos que con las células Vero ($CI_{50} = 5.3 \mu\text{g/mL}$). La isocefaelina (9), aislada de la misma planta, también fue activa ($CI_{50} = 0.45 \mu\text{g/mL}$). La emetina (10), conocida por su actividad leishmanicida, fue más potente que la cefaelina, pero fue 12 veces más tóxica contra las células Vero ($CI_{50} 0.42 \mu\text{g/mL}$) (Muhammad *et al.*, 2003).

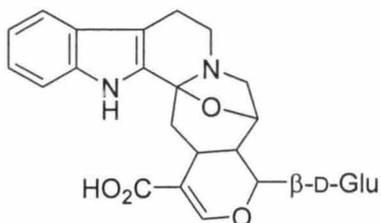


El alcaloide bisbenzylisoquinolínico, cocsolina (**11**), mostró actividad selectiva contra los amastigotes de *L. donovani*, con un $CI_{50} = 12 \mu M$ sin presentar actividad tóxica contra los macrófagos de los hospedadores (Del Rayo Camacho *et al.*, 2002).



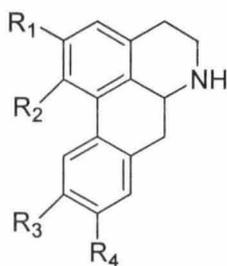
El alcaloide ácido cadambina (**12**) obtenido del árbol endémico de África *Nauclea diderrichii*, usado en la medicina tradicional por poseer actividad antiparasitaria. A pesar de que este alcaloide no presentó una fuerte actividad contra los promastigotes de *L. infantum* ($CI_{50} > 250 \mu M$), sí presentó una importante actividad contra los amastigotes intracelulares con un $CI_{50} = 1.2 \mu M$, y un índice de selectividad $>209 \mu M$; esta actividad podría deberse a la inducción de NO. La infectividad de los promastigotes disminuyó al pre-tratar a los macrófagos 24 h con este alcaloide, por lo que la actividad

también podría ser debida a las interacciones del metabolismo con la membrana (Di Giorgio *et al.*, 2006).



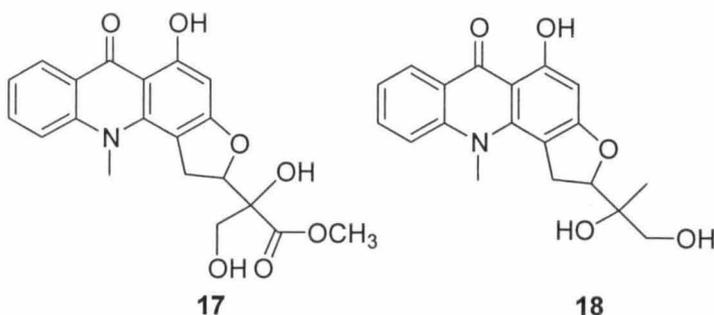
12

Los alcaloides aporfínicos obtenidos de *Guatteria amplifolia* (Annonaceae), la xylopina (**13**) y la norruciferina (**14**), así como los aislados de *G. dumetorum*, la cryptodorina (**15**) y la nornantenina (**16**), demostraron una actividad significativa contra dos especies de *Leishmania*, siendo xylopina y cryptodorina los más activos ambos con un $CI_{50} = 3 \mu M$ contra los promastigotes de *L. mexicana* y de $6 \mu M$ contra *L. panamensis*. El índice de selectividad (IS) mostró que estos compuestos son 37 veces más tóxicos contra los parásitos, que contra los macrófagos (Montenegro *et al.*, 2003).

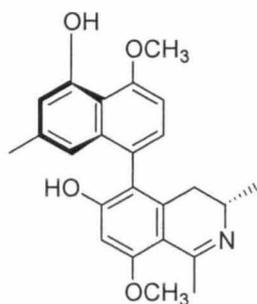


	13	14	15	16
R ₁		OCH ₃		OCH ₃
R ₂		OCH ₃		OCH ₃
R ₃	H	H		
R ₄	OCH ₃	H		

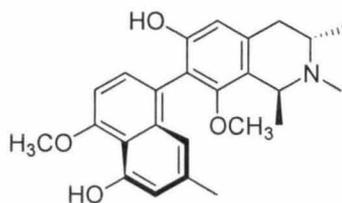
Los compuestos rhodesiacridone (**17**) y la gravacridonediol (**18**), derivados de la acridona, fueron aislados de *Thamnosma rhodesica* (Rutaceae), usada en la medicina tradicional de Zimbabue, inhibiendo un 69 y un 46% a los promastigotes de *L. major* a una concentración de 10 μM , respectivamente. Estos compuestos demostraron una mayor actividad contra las formas de amastigotes, ya que ambos inhibieron en un 90% a 10 μM y alrededor del 50% a 1 μM . Ninguno de ellos mostró toxicidad contra los macrófagos murinos a esas mismas concentraciones (Ahua *et al.*, 2004).



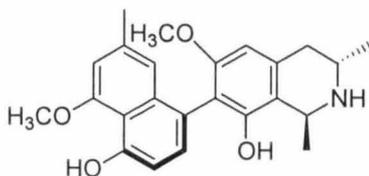
De la especie de África central *Ancistrocladus likoko*, se obtuvo el compuesto ancistrolikokina D (**19**), el cual mostró actividad contra los amastigotes intracelulares con un $\text{CI}_{50} = 5.9 \mu\text{g/mL}$ (Bringmann *et al.*, 2003), mientras que *A. griffithii*, de Asia, se aislaron los compuestos, la ancistrogriffinas A (**20**) y C (**21**), los cuales mostraron actividad leishmanicida con un $\text{CI}_{50} = 3.1$ y 18 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Bringmann *et al.*, 2002).



19

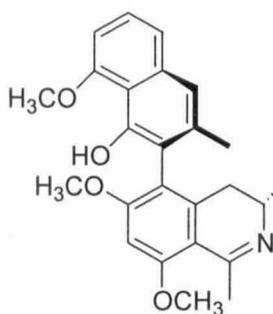


20

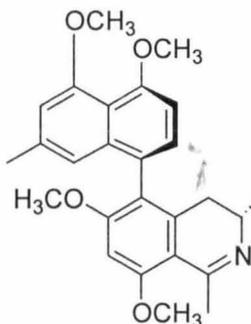


21

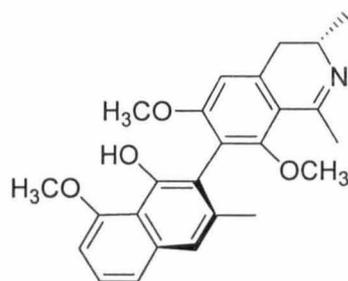
Los compuestos ancistrotanzaninas A (**22**) y B (**23**) fueron aislados de una planta del este de África, *Ancistrocladus tanzaniensis* (Ancistrocladaceae), los cuales mostraron una importante actividad contra *L. donovani*, presentando $CI_{50} = 1.8$ y $1.6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, mientras que ancistrocladidina (**24**), aislada de la misma especie, presentó un $CI_{50} = 2.9 \mu\text{g/mL}$ (Bringmann *et al.*, 2003; 2004;).



22

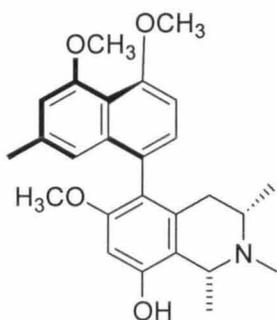


23

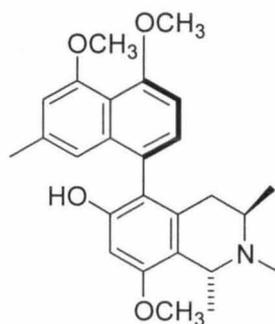


24

De otra especie de *Ancistrocladus*, *A. congolensis*, fueron aislados los compuestos ancistrocongolinas B (**25**) y C (**26**), los cuales exhibieron actividad contra *L. donovani* con un $CI_{50} = 18.8$ y 19.3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y con un $CI_{50} = 33.4$ y >90 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente contra la línea celular L-6 (Bringmann *et al.*, 2002).

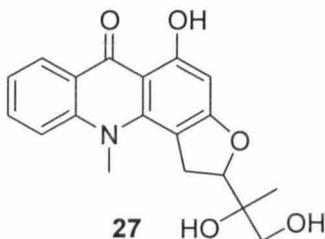


25

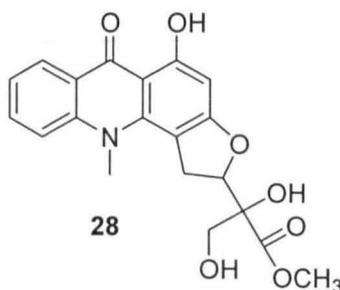


26

De *Thamnosma rhodesica*, se aislaron dos acridonas, el gravacridonediol (**27**) y la rodosiacridona (**28**), los cuales mostraron actividad contra los amastigotes de *L. major* a una concentración de 10 μM inhibiendo en un 90 y 94% respectivamente (Ahua *et al.*, 2004).



27

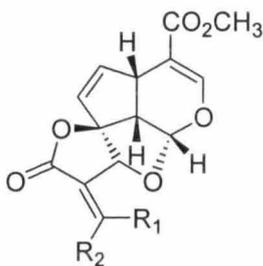


28

Terpenos

Otro grupo de metabolitos que posee actividad leishmanicida son los de tipo terpeno. *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae) es usada como remedio tradicional peruano. De esta planta se aislaron los

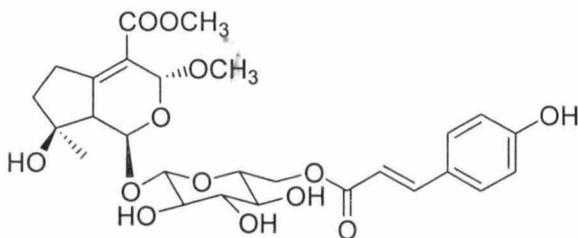
iridoides espirolactonas isoplumericina (**29**) y plumericina (**30**), las cuales mostraron actividad leishmanicida contra los amastigotes axénicos de *L. amazonensis* con un $CI_{50} = 0.28$ y $0.21 \mu M$, respectivamente, ambas fueron evaluadas con macrófagos infectados con *L. amazonensis*, causando plumericina una reducción en la infección de los macrófagos ($CI_{50} = 0.9 \mu M$), similar a la anfotericina B ($CI_{50} = 1 \mu M$), usada como referencia, mientras que isoplumericina no presentó actividad, pero afectó a los macrófagos, lo cual coincide con los ensayos tóxicos reportados, ya que isoplumericina es más tóxica que la plumericina. La diferencia entre ambos metabolitos podría ser debida a la isomería, ya que la orientación del grupo radical podría ser el que influye en la actividad (Castillo *et al.*, 2007).



29 $R_1 = H, R_2 = CH_3$

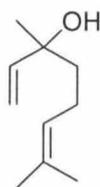
30 $R_1 = CH_3, R_2 = H$

El brunneogaleatósido (**31**), es un iridoide glicosídico, aislado de *Phlomis brunneogaleata* (Lamiaceae), el cual exhibió una buena actividad contra los amastigotes axénicos de *L. donovani* ($CI_{50} = 4.7 \mu g/mL$), mientras que el efecto tóxico a las células L6 fue $> 90 \mu g/mL$ (Kirmizibekmez *et al.*, 2004).



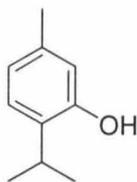
31

El linalool (**32**) es un alcohol terpénico, principal componente de los aceites de *Aniba rosaeodora* y *Cinamomon camphora*, el cual fue encontrado en las hojas *Croton cajucara*. Esta planta es usada en la medicina tradicional de Brasil, su aceite esencial rico en linalool fue evaluado contra promastigotes de *L. amazonensis*, observándose cambios morfológicos, con un $CI_{50} = 0.0083 \mu\text{g/mL}$, y con un $CI_{50} = 0.0087 \mu\text{g/mL}$, para amastigotes. Se observaron cambios en el promastigote, incluyendo la destrucción celular, al ser tratado con $0.015 \mu\text{g/mL}$ de este aceite. No se observaron efectos tóxicos en los macrófagos peritoneales de ratón y de las células Vero, a esta misma concentración. La infección en los macrófagos infectados disminuyó y no presentó efectos citotóxicos contra células de mamíferos (Rosa *et al.*, 2003).



32

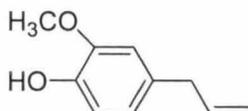
El timol (**33**) es un compuesto usado en la medicina con diferentes actividades. El timol y sus derivados mostraron potencial leishmanicida, ya que la ausencia de toxicidad de estos metabolitos podría facilitar el tratamiento oral con largos períodos (Robledo *et al.*, 2005).



33

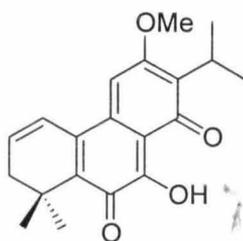
Ocimum gratissimum L. (Lamiaceae) es usada en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo enfermedades de la piel. El eugenol (**34**) es el componente mayoritario de su aceite esencial, el

cual al ser analizado contra *L. amazonensis*, este inhibió su crecimiento tanto en los promastigotes como en los amastigotes, ($CI_{50} = 100$ y $135 \mu\text{g/mL}$ respectivamente), observándose alteraciones en su ultra estructura, sin afectar a los macrófagos a las mismas concentraciones, mientras que la producción de NO fue estimulada (Ueda-Nakamura *et al.*, 2006).

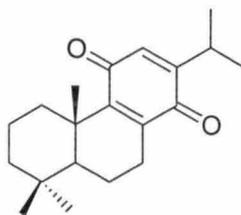


34

De *Salvia silicica* (Lamiaceae) se encontraron dos nuevos diterpenos de tipo abietano, el 7-hidroxi-12-metoxi-20-nor-abietano-1,5(10),7,9,12-pentaen-6,14-diona (**35**) y el abieta-8,12-dien-11,14-diona (12-deoxiroileanona) (**36**), ambos mostraron una apreciable actividad in vitro antileishmanicida contra las formas de promastigote y amastigote de *L. donovani* ($CI_{50} = 0.17$ y $0.12 \mu\text{M}$, respectivamente) y *L. major* ($CI_{50} = 0.29$ y $0.18 \mu\text{M}$, respectivamente), sin embargo la actividad probablemente sea debida a la alta citotoxicidad de estos compuestos (Tan *et al.*, 2002).



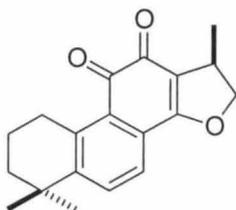
35



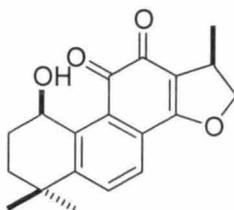
36

Perovskia abrotanoides (Lamiaceae) es una hierba utilizada en el tratamiento de la leishmaniosis, por la medicina tradicional Iraní. De las raíces de esta planta se aislaron cuatro compuestos, el nuevo diterpeno quinoide criptotanshinona (**37**), la 1β -

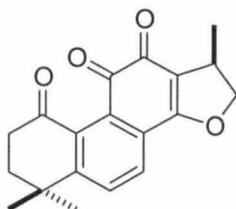
hidroxicriptotanshinona (**38**), la 1-oxocriptotanshinona (**39**) y la 1-oxomiltirona (**40**). Las tanshinonas son 20-norditerpenos con un esqueleto tipo abietano, conteniendo una quinona en el anillo C. Todas exhibieron actividad leishmanicida contra los promastigotes de *L. major*, (CI_{50} = 18.4, 46.7, 25.7, 17.9 μ M, respectivamente), pero también presentaron actividad citotóxica (Sairafianpour *et al.*, 2001).



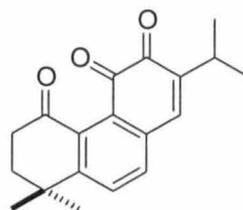
37



38

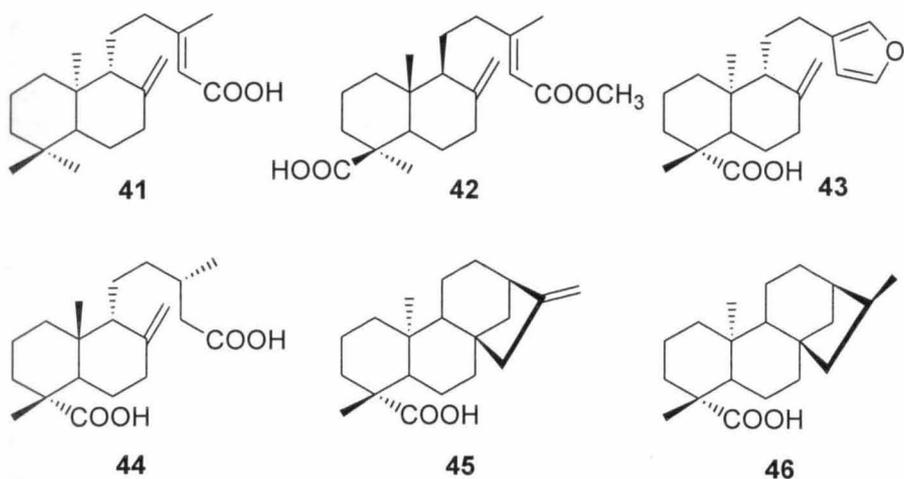


39

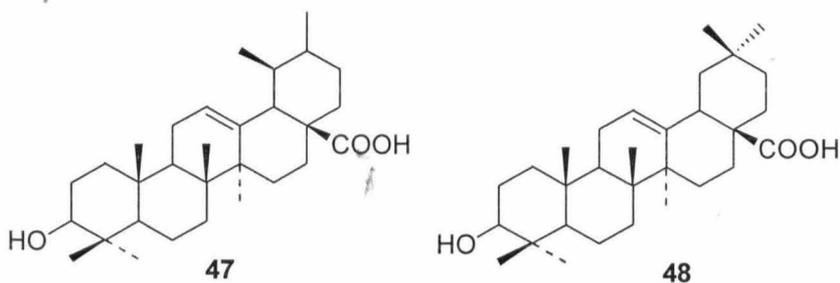


40

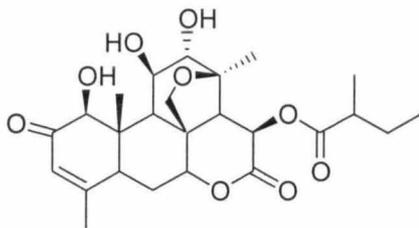
De la planta peruviiana *Copaifera paupera* (Leguminosae), se aislaron diferentes compuestos diterpénicos, como el ácido copálico (**41**), éster 15-metílico del ácido agático (**42**), el ácido poliáltico (**43**), el ácido pinifólico (**44**), el ácido kaurénico (**45**) y el ácido 16 β -kauran-19-oico (**46**), los cuales presentaron una baja actividad contra los promastigotes de *L. braziliensis* con valores de CI_{50} > 100 μ g/mL (Tincusi *et al.*, 2002).



En otro estudio realizado por Torres-Santos *et al.* (2004), se obtuvo de *Pourouma guianensis* (Moraceae), el ácido ursólico (47) y el ácido oleanólico (48), mostrando una alta actividad contra los amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* con un CI_{50} de 27 $\mu\text{g/mL}$ y 11 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La actividad leishmanicida de ambos metabolitos fue debida a la acción directa de estos sobre el parásito y no debida a la activación de NO por los macrófagos (Torres-Santos *et al.* 2004). Existen reportes de que el ácido ursólico carece de citotoxicidad, sin embargo, este metabolito muestra, de una manera muy débil, actividad leishmanicida *in vivo* (Sauvain *et al.*, 1996).

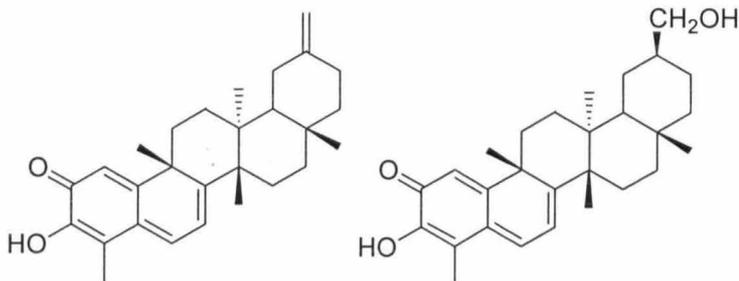


La simalikalactona D (**49**) un quasinoide (decanortriterpenoide) aislado de la corteza de la raíz de *Simaba orinocensis* (Simaroubaceae), presentó una importante actividad contra los promastigotes de *L. donovani*, con un $CI_{50} = 0.035 \mu\text{g/mL}$, siendo aun más activo que la pentamidina y la anfotericina ($CI_{50} = 1.6$ y $1.1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente), además mostró una buena selectividad con un CI_{50} de $2.3 \mu\text{g/mL}$ contra las células Vero (Muhammad *et al.*, 2004).



49

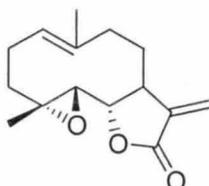
De *Salacia madagascariensis* (Celastraceae), planta usada en la medicina tradicional de África para el tratamiento de la malaria, fiebre y hemorragia, fueron aisladas dos bisnortriterpenquinonas, la isoiguesterina (**50**) y el 20-*epi*-isoiguesterol (**51**). Estos compuestos demostraron poseer actividad leishmanicida contra *L. donovani* con un $CI_{50} = 0.032$ y $0.027 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, mientras que la toxicidad contra la células Vero fue con un $CI_{50} = 1.6$ y $2.1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. La anfotericina B fue usada como control positivo en este ensayo, y fue menos activa que los compuestos con un $CI_{50} = 0.11 \mu\text{g/mL}$ (Thiem *et al.*, 2005).



50

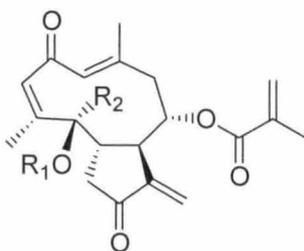
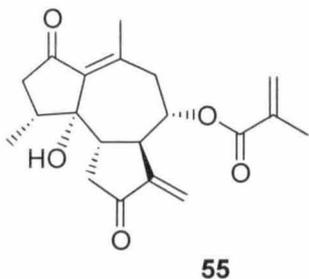
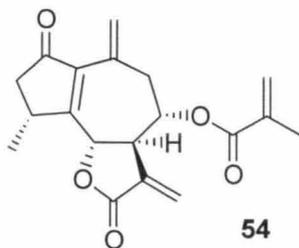
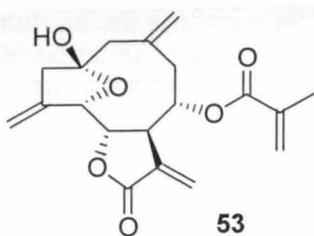
51

El partenólido (**52**), una lactona sesquiterpénica aislada de las partes aéreas de *Tanacetum parthenium* (Asteraceae), mostró una actividad significativa contra los promastigotes de *L. amazonensis* con un $CI_{50} = 0.37 \mu\text{g/mL}$, y un $CI_{50} = 0.81 \mu\text{g/mL}$ contra amastigotes, y este compuesto no fue tóxico contra los macrófagos (Shioji Tiunan *et al.*, 2005).

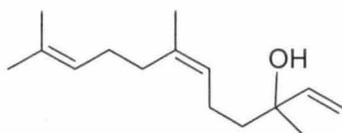


52

De *Elephantopus mollis* se aislaron nuevas lactonas sesquiterpénicas, **53**, **54** y **55**, así como la 5-O-acetylmolephantina (**56**) y la 5-O-n-decanoilmolephantina (**57**) que presentaron actividad contra promastigotes de *L. major* que va desde un rango de $CI_{50} = 0.4$ hasta $0.8 \mu\text{g/mL}$; sin embargo, las lactonas sesquiterpénicas son conocidas por su alta citotoxicidad, por lo que es necesaria la realización de más estudios para determinar si la actividad presentada es debida al efecto leishmanicida o a un efecto citotóxico en general (Fuchino *et al.*, 2001).

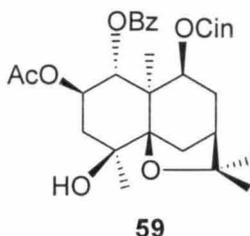


El nerolidol (**58**) es un sesquiterpeno presente en los aceites esenciales de diferentes plantas, el cual presentó actividad contra los promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* ($\text{CI}_{50} = 85 \mu\text{M}$ y $67 \mu\text{M}$, respectivamente) disminuyendo las lesiones aplicado de manera in vivo, sin presentar efecto tóxico aplicado ya sea de manera intraperitoneal o tópica; además, presentó actividad contra los promastigotes de *L. braziliensis* y *L. chagasi* con valores de $\text{CI}_{50} = 74$ y $75 \mu\text{M}$. A pesar de que existen reportes de compuestos que estimulan la producción de NO como el linalool, en este estudio no se detectó esta producción (Arruda *et al.*, 2005).

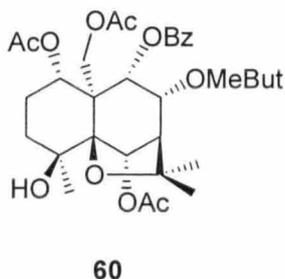


Se aislaron de las raíces de *Maytenus magellanica* y de *M. chubutensis*, (Celastraceae) nuevos sesquiterpenos dihidro- β -agarofuranos, los cuales mostraron una importante actividad revertidora a la resistencia múltiple a fármacos leishmanicida contra

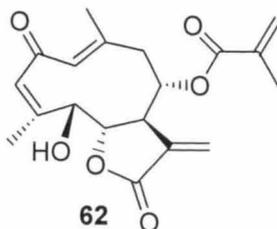
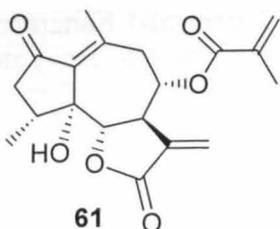
L. trópica (MDR). De estos compuestos, el 2-acetoxi-1-benzoiloxi-9-cinnamoiloxi-4-hidroxi- β -agarofurano (**59**) mostró una potente actividad. A una concentración de 7.5 μM el compuesto producía una reducción en la inhibición de crecimiento en los promastigotes MDR de un 88%, en medio de cultivo que contenía 150 μM de daunomicina (Kennedy *et al.*, 2001).



El compuesto sesquiterpénico agarofurano (**60**) aislado de *Maytenus canariensis*, mostró actividad contra una cepa MDR de *L. major* a una concentración de 10 μM (Perez-Victoria *et al.*, 2001).

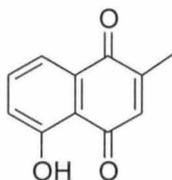


El sesquiterpeno tipo guaianólido (**61**) y el sesquiterpeno germacranólido molephantina (**62**) fueron aislados de *Elephantopus mollis*, los cuales mostraron una potente actividad leishmanicida con valores de $\text{CI}_{50} < 0.1$ a 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La subestructura α -metilén- γ -butirolactona presente en la molécula es esencial para la actividad, ya que juega un papel importante como aceptor de Michael, reaccionando fácilmente con nucleófilos biológicos, tales como enzimas que contienen grupos sulfhidrilos (Fuchino *et al.*, 2001).



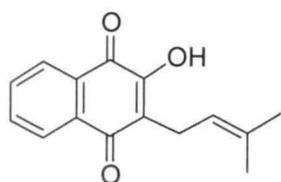
Quinonas

La plumbagina (**63**), aislada de la planta Boliviana *Pera benensis* (Euphorbiaceae), es usada en la medicina tradicional para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea, mostró actividad contra los promastigotes de *L. donovani* con un $CI_{50} = 0.21 \mu\text{M}$ (Hazra *et al.*, 2002).

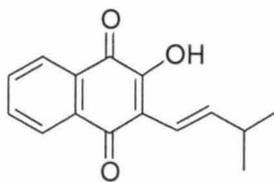


63

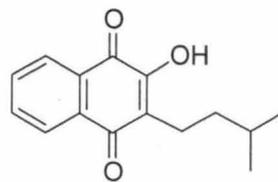
El lapachol (**64**), una hidroxinaftoquinona prenilada obtenida de especies de *Tecoma* (Bignoniaceae), ha sido reportado con diferentes actividades biológicas, siendo activo contra amastigotes de *L. braziliensis*, inhibiéndolo un 89% a concentraciones de 50 $\mu\text{g/mL}$ y sin presentar actividad tóxica contra macrófagos. Aunque no está claro el mecanismo de acción de este metabolito, se sabe que las naftoquinonas interfieren en el metabolismo oxigenado de la células tumorales, bloqueando la respiración celular y generando radicales libres, por lo que la inducción de NO en la actividad contra los amastigotes podría ser debido a esto. Sin embargo, el lapachol no presentó un efecto significativo comparado con el control, la pentamidina, al tratar lesiones de Hamsters, ya que sólo se redujo el 6% de éstas (Teixeira *et al.*, 2001). Por otro lado, los análogos del lapachol, isolapachol (**65**) y dihidrolapachol (**66**), mostraron importante actividad contra los promastigotes de *L. amazonensis* ($CI_{50} = 5.2, 4.4$ y $7.3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) y *L. braziliensis* ($CI_{50} = 11.9, 9.3, 54.0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Lima *et al.*, 2004).



64



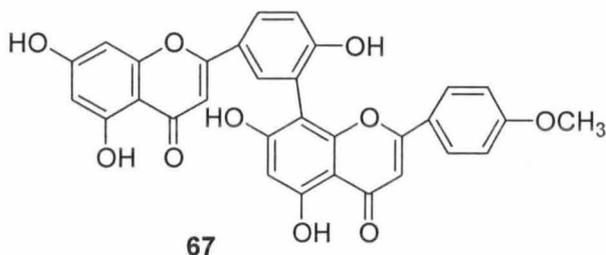
65



66

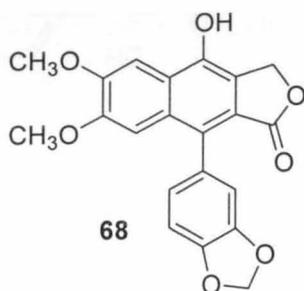
Compuestos fenólicos

Entre los compuestos fenólicos se puede mencionar a la podocarpusflavona A (**67**) aislada de la parte aérea de *Podocalyx loranthoides*, la cual mostró un efecto moderado sobre los promastigotes de *L. mexicana*, produciendo a 100 µg/mL una reducción del 38% (Suárez *et al.*, 2003).



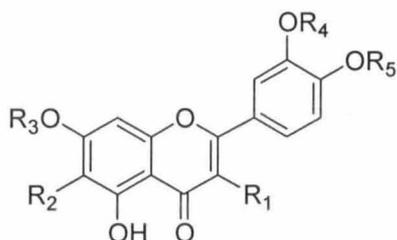
67

La diphillina (**68**), aislada de *Haplophyllum bucharicum* (Rutaceae), planta endémica de Uzbekistán, mostró actividad contra los promastigotes ($CI_{50} = 14 \mu\text{M}$) y contra los amastigotes ($CI_{50} = 0.2 \mu\text{M}$) de *L. infantum*. El mecanismo de acción es debido probablemente a la interferencia en el ciclo celular de la *Leishmania*, así como en la síntesis de proteínas. Al darle un pretratamiento a los macrófagos con el compuesto, dio como resultado una potente inhibición a la internalización de los amastigotes (Di Giorgio *et al.*, 2005).



Flavonoides

Los compuestos luteolin 7-O-β-D-glucopiranosido (**69**) y crisoenol-7-O-β-D-glucopiranosido (**70**) mostraron una potente actividad contra los amastigotes axénicos de *L. donovani* *in vitro* con valores de CI_{50} = 1.1 y 4.1 μg/mL, respectivamente. Estos metabolitos no presentaron toxicidad contra las células L6 (Kirmizibekmez *et al.*, 2004). La quercetina (**71**), en combinación con el estibogluconato de sodio, dio como resultado una gran reducción de la parasitemia con incrementos en los niveles de hemoglobina, por lo que la quercetina es un candidato prometedor a ser usado como coadyuvante para combatir la leishmaniosis visceral asociada con anemia (Sen *et al.*, 2005).

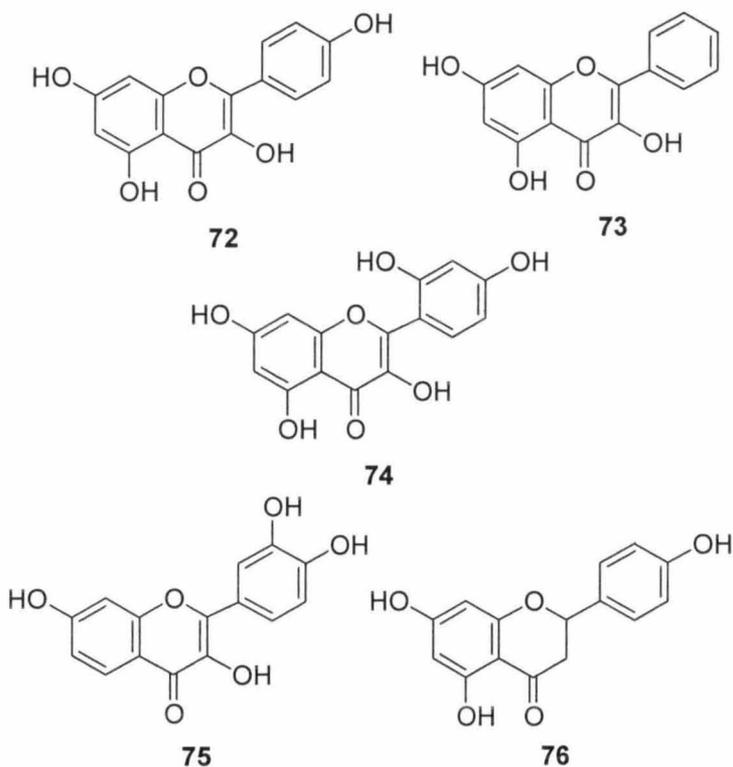


69 $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = H$; $R_3 = Glu$

70 $R_1 = R_2 = R_5 = H$; $R_3 = Glu$; $R_4 = CH_3$

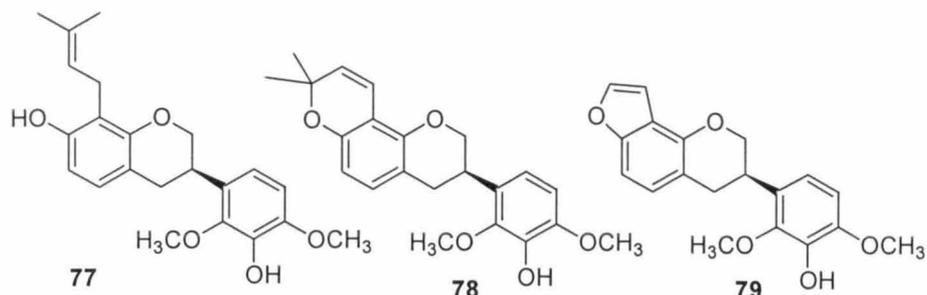
71 $R_1 = OH$, $R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$

Diferentes flavonoides y sus análogos han mostrado actividad leishmanicida como el kaemferol (**72**), la galangina (**73**), la morina (**74**) la fisetina (**75**), y la naringenina (**76**), los cuales presentaron actividad contra *L. donovani* con valores de CI_{50} = 2.9, 1.5, 2.8, 0.6 y 5.0 μg/mL, respectivamente (Tasdemir *et al.*, 2006).

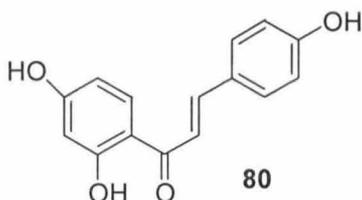


Se aislaron tres isoflavanos de la planta iraní *Smirnowia iranica* (Fabaceae), el 8-prenilmucronulaton (**77**), la gliasperina H (**78**) y la esmiranicina (**79**), los cuales inhibieron a los promastigotes de *L. donovani* con valores de $CI_{50} = 6.9, 25$ y $23 \mu M$, respectivamente. También presentaron actividad contra los promastigotes de *L. infantum* con $CI_{50} = 9, 14$ y $11 \mu M$, respectivamente, y contra los promastigotes de *L. major* $CI_{50} = 7.9, 24$ y $17 \mu M$, respectivamente. Los compuestos no presentaron toxicidad contra macrófagos. La actividad de estos metabolitos es interesante, ya que compuestos con dos anillos aromáticos conectados por un carbono espaciador como las chalconas y las auronas han exhibido actividad leishmanicida. A pesar de presentar importante actividad contra las diferentes especies de promastigotes, estos metabolitos fueron menos activos que la anfotericina B y que muchas auronas y chalconas que han sido reportadas en la literatura con estas actividades. Además, la actividad contra los amastigotes

intracelulares fue considerada baja, con valores de $CI_{50} > 77 \mu M$ (Sairafianpour *et al.*, 2002).

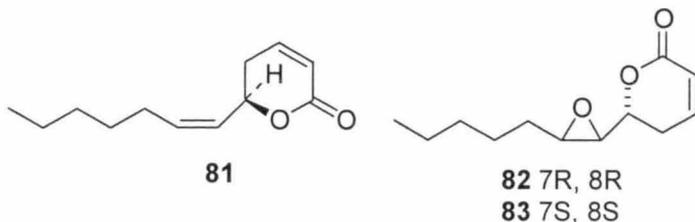


La chalcona isoliquiritigenina (**80**), aislada de las raíces de *Psoralea argyrea* (Fabaceae), presentó actividad contra los amastigotes axénicos de *L. donovani* con un $CI_{50} = 20 \mu M$. La actividad tóxica presentada contra las células Vero y las células PC-3 fue superior a la concentración que inhibió a las amastigotes con $CI_{50} = 65$ y $46 \mu M$, respectivamente, sin embargo el IS solamente fue tres veces mayor en los parásitos sobre las células Vero (Salem & Werbovetz, 2006).

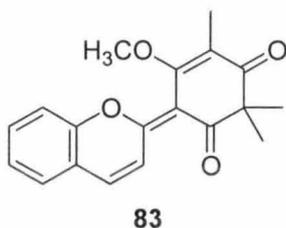


Otros metabolitos

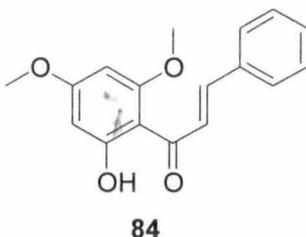
Se preparó una serie de epóxidos de la argentilactona (**81**), originalmente aislada de los rizomas de *Aristolochia argentina* (Annonaceae), como el 6*R*,7*R*,8*R*-argentilactona-7,8-epóxido (**82**) y el 6*R*,7*S*,8*S*-argentilactona-7,8-epóxido (**83**), los cuales mostraron actividad contra *L. amazonensis* con $CI_{50} = 22.3$ y $44.6 \mu g/mL$, respectivamente (Cortés *et al.*, 2006).



La dalrubona (**84**) es un abundante pigmento rojo aislado de *Psoralea polydenius*, el cual mostró actividad selectiva contra los amastigotes de *L. donovani*, con valores de $CI_{50} = 25 \mu\text{g/mL}$. Además, al tratar a los macrófagos infectados con esta especie, a una concentración de $25 \mu\text{g/mL}$, este compuesto redujo al 96% la infección comparado con el control, sin presentar citotoxicidad contra las células hospederas (Salem & Werbovets 2005).

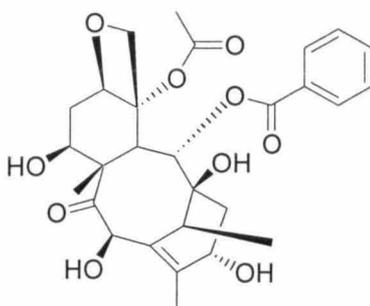


De *Piper rusbyi* (Piperaceae) se aisló la kavapirona (+)-7R,8S-epoxi-5,6-dideshidrokavaina (**84**), la cual presentó actividad contra los promastigotes de *L. braziliensis* con un $CI_{50} = 81.9 \mu\text{M}$ (Flores *et al.*, 2007).



Se aisló de *Taxus baccata* (Taxaceae) la 10-deacetilbacatina III (**85**), la cual mostró actividad contra los amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Este metabolito es el precursor de paclitaxel. La 10-

deacetilbacatina III tuvo una actividad de $CI_{50} = 0.07 \mu M$ y no mostró efecto citotóxico contra los macrófagos a concentraciones mayores de $5 \mu M$. La actividad de este metabolito fue debida probablemente a la estimulación de óxido nítrico por los macrófagos y no a la inhibición de los microtúbulos de polimerización, el cual es el modo de acción de paclitaxel en las células cancerígenas (Georgopoulou *et al.*, 2007).



85

Aun cuando existen más de 239 compuestos de origen natural reportados con actividad leishmanicida contra diferentes tipos de especies de *Leishmania*, la mayor parte de ellos no reúne las características consideradas como esenciales en el desarrollo de nuevos fármacos (Pink *et al.*, 2005) y la mayoría no ha alcanzado la etapa de evaluación clínica debido a que presentan una alta citotoxicidad.

Entre las características esenciales en el desarrollo de nuevos fármacos encontramos: la vía de administración del compuesto, hasta ahora únicamente la berberina, aplicada por vía parenteral, es usada clínicamente para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea (Evans *et al.*, 2002), y el uso de dosis moderadas para obtener la efectividad sin causar efectos secundarios severos. La citotoxicidad es la principal causa que ha evitado el estudio subsecuente de los diferentes metabolitos con actividad leishmanicida. Como ejemplo de esta clase de metabolitos se puede citar a las acetogeninas (Sahpaz *et al.*, 1994). Por otro lado, existen otros metabolitos que carecen de citotoxicidad, sin embargo, estos productos muestran, de una manera muy débil, actividad leishmanicida *in vivo*, entre los que se

puede mencionar el ácido ursólico (Sauvain *et al.*, 1996). La mayor parte de los estudios dirigidos hacia la detección de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida han sido realizados utilizando la forma promastigote del parásito, la cual es fácil de mantener en condiciones *in vitro*. Sin embargo, debido a que el promastigote es la forma infectante, la prueba con promastigotes solamente tiene un valor indicativo de la posible actividad leishmanicida de los metabolitos evaluados. Por esta razón, la evaluación antes mencionada debe ser complementada con una prueba utilizando amastigotes, el cual es el estadio más adecuado para la detección de productos potencialmente leishmanicidas, ya que es el que se encuentra en el vertebrado. Al mismo tiempo, se debe evaluar la actividad citotóxica de los metabolitos en macrófagos no parasitados, con el fin de establecer si la actividad *in vitro* de los metabolitos evaluados se debe a su propiedad citotóxica en general, o estos poseen una actividad selectiva hacia los parásitos de leishmania.

Por todo lo anterior, se requiere sintetizar o aislar compuestos con estructuras novedosas y distintos mecanismos de acción que eventualmente puedan ser desarrollados como nuevos fármacos para combatir estas enfermedades.

Las plantas continúan siendo la fuente más importante de metabolitos bioactivos, porque producen una alta complejidad y variabilidad de metabolitos secundarios (Harvey, 2000).

Mesoamérica es una región geográfica y cultural, particularmente importante en el conocimiento del uso de plantas medicinales. Una de las plantas de uso en la medicina tradicional maya para tratar las enfermedades causadas por protozoarios es *Tridax procumbens* L. (Asteraceae), conocida como hierba del toro (Cáceres *et al.*, 1990).

Debido a la importancia de los productos naturales como fuentes de nuevos agentes quimioterapéuticos, la urgente necesidad para encontrar novedosos tratamientos para curar personas afectadas por protozoarios y a resultados previos (Cáceres *et al.*, 1998; Peraza-Sánchez *et al.*, 2005; Peraza-Sánchez *et al.*, 2007), se ha planteado llevar al cabo el estudio de *T. procumbens* con la finalidad de aislar

compuestos con actividad antiprotozoaria, que podrían convertirse en nuevos modelos químicos y/o medicamentos.

1.3 EL GÉNERO *TRIDAX*

Tridax L. es un género que pertenece a la familia Asteraceae (Compositae), con 27 especies localizadas en Centroamérica y Sudamérica y con un importante número de especies localizadas en México, principalmente en las zonas tropicales (Cuadro 2). En la literatura existe poca información sobre estudios fitoquímicos del género *Tridax*, aunque hay reportes de flavonoides y unos pocos terpenos (Powell 1965; McVaugh, 1984).

Cuadro 2. Especies representativas del género *Tridax* en México.

<i>Especie</i>	<i>Hábitat</i>
<i>T. balbisioides</i> (Kunth) A. Gray	Chihuahua y Durango
<i>T. bicolor</i> A. Gray	Coahuila
<i>T. candidisima</i> A. Gray	San Luis Potosí
<i>T. coronopifolia</i> (Kunth) Hemsl.	Nuevo León y Tamaulipas
<i>T. dubia</i> Rose	Jalisco y Colima
<i>T. erecta</i> A. Gray	Chihuahua
<i>T. mexicana</i> A. M. Powell	Michoacán y Guanajuato
<i>T. procumbens</i> Linnaeus	Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán
<i>T. purpusii</i> Brandegeë	Veracruz y Guerrero
<i>T. trilobata</i> (Cav) Hemsl.	Guanajuato y Michoacán

1.3.1 Descripción botánica de *Tridax procumbens*

Tridax procumbens L. (Fig. 8) es una hierba perenne que puede alcanzar de 15 a 40 cm de altura; los tallos son a veces simples y erectos, frecuentemente ramificados desde la base y postrados; hojas ovadas o lanceoladas aserradas, unduladodentadas o trilobadas, pubescentes que le dan aspecto áspero; las inflorescencias son cabezas solitarias sobre pedúnculos terminales de 10 a 20 cm de largo; corolas con tubos pilosos; lígulas amarillo pálido o blanco cremoso (Argueta-Villamar, 1994).



Figura 8 *Tridax procumbens* L. a) Planta entera de *Tridax procumbens* L.; b) cabeza solitaria sobre pedúnculo; c) hojas lanceoladas aserradas; d) lígulas de color blanco.

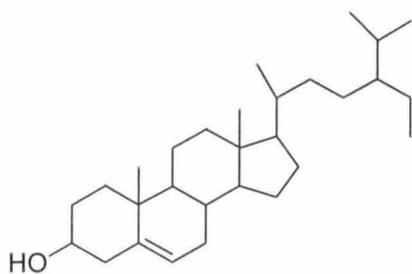
Esta planta es conocida entre los habitantes de la región como “hierba del toro”, “San Juan del Monte”, y en la lengua maya como “ta’ ulum” y “bakenbox” (Martínez, 1979).

1.3.2 Distribución geográfica de *Tridax procumbens*

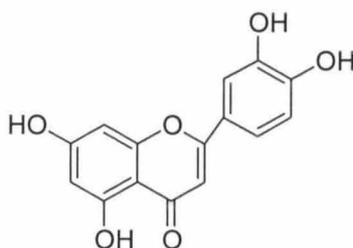
En México está ampliamente distribuida en los estados de Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Tabasco y Yucatán. También se le encuentra en Belice, Costa Rica, Guatemala y Panamá (Powell, 1965; Davidse *et al.*, 1975; Villaseñor, 1989).

1.3.3 Estudio fitoquímico de *Tridax procumbens*

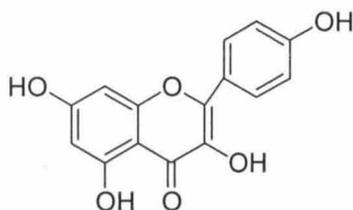
En el género *Tridax* se ha reportado la presencia de ácido fumárico, taninos, triterpenos pentacíclicos y polisacáridos. Específicamente en *T. procumbens* se ha encontrado el β -sitosterol (**86**), la luteolina (**87**) y el kaemferol (**88**) (Akbar *et al.*, 2002).



86



87

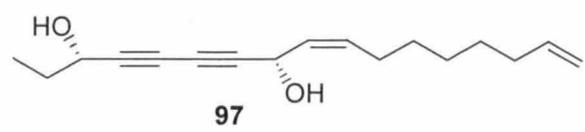
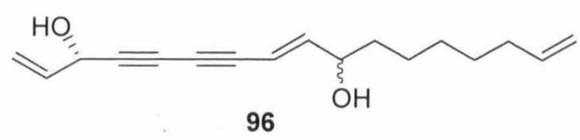
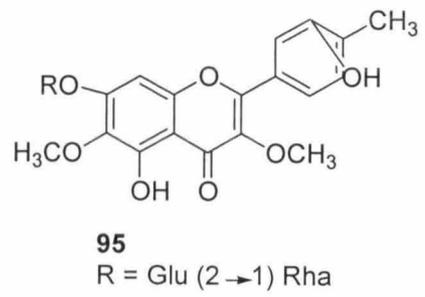
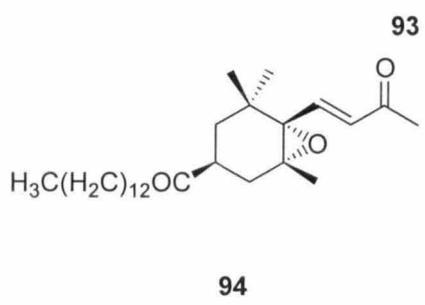
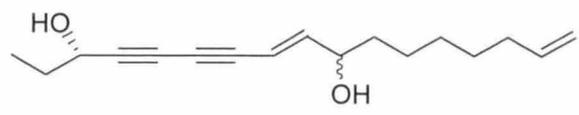
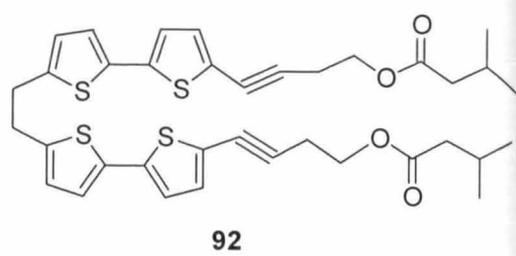
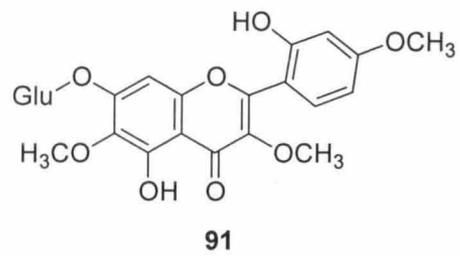
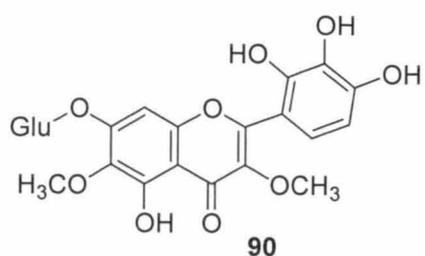
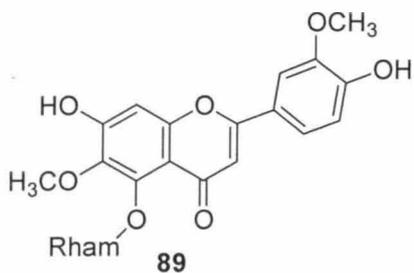


88

También se ha reportado la presencia de hidrocarburos saturados e insaturados (Gadre & Gadre, 1988) y lípidos (Verma & Gupta, 1988).

El flavonoide 3',6-dimetoxi-5,7,4'-trihidroxi-5-O- α -L-rhamnopiranosido (**89**) ha sido aislado de las hojas (Yadava & Saurabh, 1998), y en la parte aérea se ha reportado la presencia del flavonoide 3,6-dimetoxi-5,7,2',3',4'-pentahidroxi-7-O- β -D-glucopiranosido, cuyo nombre común es procumbetina (**90**) (Ali *et al.*, 2001). También del extracto etanólico de la parte aérea fue aislado el compuesto tridaxidona (**91**) (Akbar *et al.*, 2002) y el bisbithiofeno (**92**) (Ali & Jahangir, 2002).

Debido a la poca información fitoquímica de *T. procumbens*, Wen-Hao y colaboradores (2008) realizaron el estudio fitoquímico de esta planta reportando el aislamiento por primera vez del policétido 1,2-dihidro-dendroarboleol B (**93**), de un derivado de la ionona (**94**) y de un diglicósido de flavonol (**95**), así como de dos policétidos conocidos, el dendroarboleol B (**96**) y el dendroarboleol A (**97**), pero hasta la fecha no se han reportado metabolitos de esta planta con actividad antiprotozoaria.



1.3.4 Estudios farmacológicos de *Tridax procumbens*

La mayoría de los estudios farmacológicos de *T. procumbens* ha sido realizado en la India, sin embargo, Cáceres y colaboradores realizaron un monitoreo de las plantas medicinales de la medicina tradicional maya, encontrándose que *T. procumbens* es usada contra la disentería (amibiasis), úlceras crónicas (leishmaniosis) y fiebre (malaria), aplicada por vía tópica u oral. La actividad antiprotozoaria de los extractos etanólico, diclorometánico y acuoso de *T. procumbens* resultaron activos *in vitro* contra los tripomastigotes de *T. cruzi* con un $DL_{50} > 1.0$ ppm. Asimismo, un bioensayo de toxicidad contra *Artemia salina* no demostró actividad (Cáceres, 1998; Berguer *et al.*, 1998). Más aún, el extracto hexánico demostró actividad contra los tripomastigotes de *T. cruzi* con un CI_{90} de 260.3 ± 48.2 $\mu\text{g/mL}$, no presentando toxicidad contra *A. salina* (Berguer *et al.*, 1998).

En otro estudio el extracto metanólico de *T. procumbens* mostró poseer actividad antihepatotóxica, lo cual justifica su uso en las afecciones del hígado (Pathak *et al.*, 1991; Ravikumar *et al.*, 2005; Hemalatha, 2008).

En un monitoreo preliminar neurofisiocofarmacológico de plantas de Guatemala, la administración intraperitoneal de los extractos acuoso y clorofórmico de *T. procumbens* produjo nulos o pequeños efectos en las señales del comportamiento neurológico y autonómico de los ratones (Morales *et al.*, 2001).

El extracto etanólico de partes aéreas secas de *T. procumbens* estimuló el crecimiento del cabello, tanto administrado por vía intragástrica en ratas en dosis de 100 mg/Kg, como aplicado externamente en concentración del 10% (Saraf & Dixit, 1991).

El zumo de hoja fresca de *T. procumbens* administrado por vía intraperitoneal en ratas en la dosis de 1 mL, aceleró el proceso de cicatrización uterina con actividad similar a la dexametasona (Germosén-Robineu, 1995). Otros estudios han reportado que extractos de las hojas presentan actividad hemostática, así como el extracto acuoso de la parte aérea posee efectos inmunomoduladores (Tiwari *et al.*, 2004; Kale *et al.*, 2008;).

Debido a que estos estudios demostraron que los extractos de *T. procumbens* poseen una marcada actividad antiprotozoaria, y sin efectos tóxicos, se realizó un monitoreo en el laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY de *T. procumbens* y otras plantas reportadas en la medicina tradicional maya como poseedoras de actividad antiprotozoaria, obteniéndose los resultados mostrados en los cuadros 3 y 4.

Cuadro 3. Actividad antiprotozoaria de extractos metanólicos de plantas nativas de la península de Yucatán. La potencia se expresa como CI_{50} contra trofozoítos axénicos de *Giardia lamblia* (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005).

<i>Especie botánica</i>	<i>Parte usada</i>	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Hojas	15.55 (15.33 – 15.78)
<i>Cupania dentata</i>	Corteza	7.59 (7.54 – 7.64)
<i>Dyphisa carthagenensis</i>	Hojas	11.53 (11.43 – 11.62)
<i>Dorstenia contrajerva</i>	Planta entera	34.38 (33.47 – 35.34)
<i>Gliricidia sepium</i>	Hojas	62.66 (62.13 – 63.21)
<i>Justicia spicigera</i>	Parte aérea	117.41 (117.00 – 117.79)
<i>Pluchea odorata</i>	Parte aérea	59.81 (59.59 – 60.05)
<i>Spigelia anthelmia</i>	Planta entera	113.27 (112.36 – 114.21)
<i>Tridax procumbens</i>	Planta entera	6.34 (6.17 – 6.50)
<i>Triumfetta semitriloba</i>	Hojas	46.41 (43.16 – 50.16)

^a 95% de intervalo de confianza entre paréntesis.

Cuadro 4. Actividad leishmanicida de extractos metanólicos de plantas nativas de la península de Yucatán (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007).

<i>Especie botánica</i>	<i>Parte usada</i>	<i>CI₅₀ (µg/mL)</i>
<i>Asclepias curassavica</i>	Hojas	99
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Corteza	14
<i>Casimiroa tetrameria</i>	Corteza	120
<i>Clusia flava</i>	Hojas	32
<i>Croton chichenensis</i>	Hojas	>1000
<i>Dorstenia contrajerva</i>	Planta entera	23
<i>Gliricidia sepium</i>	Hojas	>1000
<i>Tridax procumbens</i>	Planta entera	3

En este estudio, los extractos orgánicos de plantas usadas en la medicina tradicional maya se evaluaron en una serie de bioensayos giardicidas y leishmanicidas (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005; 2007). De éstos, *T. procumbens* presentó los mejores resultados con $CI_{50} = 6.34$ y de $3.00 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (el Instituto Nacional del Cáncer [NCI], considera como activos aquellos extractos con valores de $CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$). Tomando como base los estudios realizados a *T. procumbens* y considerando la poca información fitoquímica, en este trabajo se planteó como objetivo principal el aislamiento e identificación de los metabolitos responsables de la actividad leishmanicida, las cuales consisten en: actividad contra los promastigotes y los amastigotes de *L. mexicana*, así como la evaluación de la actividad citotóxica.

Dado que *T. procumbens* presentó actividad giardicida y tripanocida (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005 y Cáceres *et al.*, 1998), los extractos, fracciones y compuestos puros obtenidos en el estudio leishmanicida, serán evaluados en los bioensayos de inhibición de crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia* e inhibición de

crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi*, para saber si los mismos metabolitos podrían ser los responsables de las actividades encontradas en el extracto metanólico (Cuadros 3 y 4).

1.4. OBJETIVO GENERAL

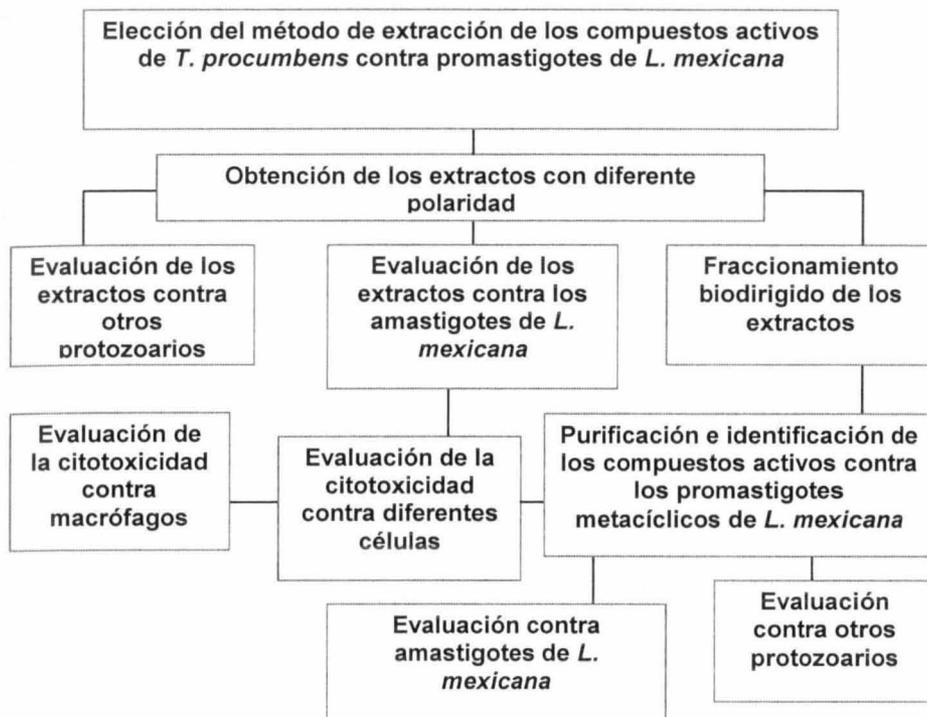
Aislar e identificar metabolitos secundarios con actividad antiprotozoaria producidos por *Tridax procumbens* L.

1.5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Elegir el mejor método de extracción de los compuestos activos con disolventes orgánicos para obtener los extractos de diferente polaridad de *T. procumbens* L. evaluándolos en el bioensayo leishmanicida.
- Evaluar la actividad leishmanicida de los extractos de *T. procumbens* L. utilizando los promastigotes de *L. mexicana*.
- Fraccionar el extracto que presente la mayor actividad leishmanicida ($CI_{50} \leq 50$), por medio de técnicas cromatográficas y evaluar las fracciones en el bioensayo leishmanicida utilizando los promastigotes de *L. mexicana*.
- Aislar y purificar él o los metabolitos de las fracciones activas.
- Elucidar las estructuras químicas de los metabolitos purificados, mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos.
- Evaluar la citotoxicidad de los extractos y del compuesto activo contra dos líneas celulares (MDCK y KB), contra células CMSP y contra macrófagos derivados de médula ósea.
- Evaluar el efecto leishmanicida en amastigotes de *L. mexicana*, de los extractos y del compuesto que resulte activo contra los promastigotes.
- Someter las fracciones y compuestos puros a evaluación antiprotozoaria con parásitos distintos a *L. mexicana*.

1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados se utilizó la siguiente estrategia experimental:



En el capítulo 3 se describe la elección del método de extracción de los compuestos activos, la obtención de los extractos de diferente polaridad, el fraccionamiento, la purificación e identificación de los compuestos activos de *T. procumbens*, su evaluación contra los promastigotes de *L. mexicana*, así como la evaluación de la citotoxicidad contra diferentes células.

La evaluación de los extractos y los compuestos leishmanicidas activos contra los amastigotes intracelulares de *L. mexicana* y de la citotoxicidad contra macrófagos se detallan en el capítulo 4.

Los resultados de las evaluaciones contra otros protozoarios se presentan en el capítulo 5.

1. 7 BIBLIOGRAFÍA

- Ahua, K.M., Ioset, J.R., Ransijn, A., Mauël, J., Mavi, S., Hostettmann, K. (2004) Antileishmanial and antifungal acridone derivatives from the roots of *Thamnosma rhodesica*. *Phytochemistry*, 65, 963-968.
- Akbar, E., Malik, A., Afza, N., Hai, S.M.A. (2002) Flavone glycosides and bergenin derivatives from *Tridax procumbens*. *Heterocycles*, 57, 733-739.
- Akedengue, B., Ngou-Milama, E., Laurens. A.; Hocquemiller, R. (1999) Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite*, 6, 3-8.
- Ali, M.S. and Jahangir, M. (2002) A bis-bithiophene from *Tridax procumbens* L. (Asteraceae). *Natural Product Letters*, 16, 217-221.
- Ali, M., Ravinder, E.; Ramachandran, R. (2001) A new flavonoid from the aerial parts of *Tridax procumbens*. *Fitoterapia*, 72, 313-315.
- Alvar-Ezquerria, J.P. (2001) Las Leishmaniasis de la Biología al Control. Centro colaborador de la OMS para leishmaniasis. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España.
- Aparicio, P., Rodríguez, E., Gárate, T., Molina, R., Soto, A., Alvar, J. (2003) Terapéutica antiparasitaria. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21, 579-594.
- Argueta Villamar, A. (1994) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomos I y II. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F., pp. 505-506 (I), 784 (II).
- Arias, J., Beltrán, F., Desjeux, P., Walton, B. (1996) Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. Cuaderno Técnico No. 44, Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C.
- Arruda, D.C., D'Alexandri, F.L., Katzin, A.M. and Uliana, R.B.S. (2005) Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1679-1687.
- Ashford, R.W., Desjeux, P., deRaadt, P. (1992) Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today*, 8, 104-105.
- Ashutosh, Sundar, S., Goyal, N. (2007) Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 143-153.
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R.M., Cubría, J.C., Ordoñez, D. (1998) The pharmacology of leishmaniasis. *General Pharmacology*, 30, 435-443.

- Becker, I., Carrada Figueroa, G., Gudiño Zayas, M., González, C., Berzunza Cruz, M., Rivas Sánchez, B., Velasco Castrejón, O. (2005) Análisis de leishmaniasis en México. Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis visceral en las Américas, Brasilia, Brasil, 28-33.
- Benenson, A.S. (1997) Manual para el control de las enfermedades transmisibles. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. Edición 16.
- Berguer, I., Barrientos, A.C., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter C.M., Kubelka, W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. Journal of Ethnopharmacology, 62, 107-115.
- Berman, J.D. (1997) Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic development in the last 10 years. Clinical Infectious Diseases, 24, 684-703.
- Bhattacharjee, A. K., Skanchy, D.J., Jennings, B., Hudson, T. H., Brendle, J. J. and Werbovetz, K. A. (2002) Analysis of stereoelectronic properties, mechanism of action and pharmacophore of synthetic indolo[2,1-*b*]quinazoline-6,12-dione derivatives in relation to antileishmanial activity using quantum chemical, cyclic voltammetry and 3-D-QSAR CATALYST procedures. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 10, 1979-1989.
- Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B., Hatz, C. (2004) Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53, 158-166.
- Bray, P.G., Barret, M.P., Ward, S.A., de Koning H.P. (2003) Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. Trends in Parasitology, 19, 232-239.
- Bray, R.S. (1974) Leishmania. Annual Review of Microbiology, 28, 189-217.
- Bringmann, G., Dreyer, M., Faber, J.H., Dalsgaard, P.W., Stærk, D., Jaroszewski, J. W., Ndangalasi, H., Mbago, F., Brun, R., Christensen, S. B. (2004) Ancistrotanzanine C and related 5,1' and 7,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus tanzaniensis*. Journal of Natural Products, 67, 743-748.
- Bringmann, G., Dreyer, M., Faber, J.H., Weihe Dalsgaard, P., Stærk, D., Jaroszewski, J.W., Ndangalasi, H., Mbago, F., Brun, R., Reichert, M., Maksimenka, K. and Christensen, S.B. (2003) Ancistrotanzanine A, the first 5,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloid, and two further,

- 5,8'-linked related compounds from the newly described species *Ancistrocladus tanzaniensis*. *Journal of Natural Products*, 66, 1159-1165.
- Bringmann, G., Messer, K., Brun, R. and Mudogo, V. (2002) Ancistrocongolines A–D, new naphthalisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus congolensis*. *Journal of Natural Products*, 65, 1096-1101.
- Bringmann, G., Saeb, W., Ruckert, M., Mies, J., Michel, M., Mudogo, V., Brun, R. (2003) Ancistrolilikokine D, a 5,8'-coupled naphthylisoquinoline alkaloid, and related natural products from *Ancistrocladus likoko*. *Phytochemistry*, 62, 631-636.
- Bringmann, G., Wohlfarth, M., Rischer, H., Schlauer, J., Brun, R. (2002) Extract screening by HPLC coupled to MS-MS, NMR, and CD: a dimeric and three monomeric naphthylisoquinoline alkaloids, from *Ancistrocladus griffithii*. *Phytochemistry*, 61, 195-204.
- Cáceres Rey, O., Montoya Piedra, Y. (2002) Diseño y evaluación de tres oligonucleótidos para la detección de *Leishmania* por PCR. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19, 109-116.
- Cáceres, A., Cano, O., Samayoa, B.; Aguilar, L. (1990) Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders I. Screening of 84 plants against enterobacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 30, 55-73.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I., Maki, J. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Castillo, D., Arevalo, J., Herrera, F., Ruiz, C., Rojas, R., Rengifo, E., Vaisberg, A., Lock, O., Lemesre, J.-L., Gornitzka, H. and Sauvain. (2007) Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 410-414.
- Chan-Bacab, M.J. and Peña-Rodríguez, L.M. (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, 18, 674-688.
- Chin, J. (2001) El Control de las Enfermedades Transmisibles. Organización Panamericana de la Salud.
- Cortés, M.J., Armstrong, V., Barrero, A.F., Bandoni, A.E., Priestap, H.A., Fournet, A. and Prina, E. (2006) Configuration and leishmanicidal activity of (–)-argentilactone epoxides. *Natural Product Research*, 20, 1008-1014.

- Croft, S. (2001) Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Tropical Medicine and International Health*, 6, 899-905.
- Croft, S. and Coombs, G.H. (2003) Leishmaniasis: current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, 19, 502-508.
- Croft, S.L. and Yardley, V. (2002) Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 319-342.
- Croft, S.L., Seifert, K., Yardley V. (2006) Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, 123, 399-410.
- Cuba Cuba, C.A. (2000) Diagnostico parasitológico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Revista Reruana de Medicina Experimental y salud pública*, 17, 39-52.
- Davidse, G., D'arcy, W.G., Dwyer, J.D., Goldblatt, P. (1975) *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 62, pp 1217-1220.
- Davies, C.R., Kaye, P., Croft, S.L., Sundar, S. (2003) Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, 326, 377-382.
- Davis, A.J. & Kedzierski, L. (2005) Recent advances in antileishmanial drug development. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 6, 163-169.
- De Carvalho, P.B. and Ferreira, E.I. (2001) Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, 72, 599-618.
- Del Rayo Camacho, M., Phillipson, J.D., Croft, S.L., Rock, P., Marshall, S.J., Schiff, P.L., Jr. (2002) *In vitro* activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytotherapy Research*, 16, 432-436
- Delorenzi, J.C., Attias, M., Gattass, C.R., Andrade, M., Rezende, C., Cunha Pinto, A., Henriques, A.T., Bou-Habib, D.C., Saraiva, E.M. (2001) Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1349-1354.
- Desjeux, P. (2001) Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, 190, 77-79.
- Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 305-318.
- Di Giorgio, C. D., Delmas, F., Ollivier, E., Elias, R., Balansard, G., Timon-David, P. (2004) *In vitro* activity of the β -carboline alkaloids harmame, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Experimental Parasitology*, 106, 67-74.

- Di Giorgio, C., Delmas, F., Akhmedjanova, V., Ollivier, E., Bessonova, I., Riad, E. and Timon-David, P. (2005) *In vitro* antileishmanial activity of diphyllin isolated from *Haplophyllum bucharicum*. *Planta Medica*, 71, 366-369.
- Di Giorgio, C., Lamidi, M., Delmas, F., Balansard, G. and Ollivier, E. (2006) Antileishmanial activity of quinovic acid glycosides and cadambine acid isolated from *Nauclea diderrichii*. *Planta Médica*, 72, 1396-1402.
- Evans, W.C. and Sanders, W.B. (2002) Antiprotozoal natural products, in Trease and Evans Pharmacognosy, Wright, C.W. (ed) Edinburgh, U.K., pp. 409.
- Flores, N., Cabrera, G., Jimenez, I.A. (2007) Leishmanicidal constituents from leaves of *Piper rusbyi*. *Planta Médica*, 73, 206-211.
- Frías Salcedo, J. (1997) *Leishmaniasis mexicana*. Consideraciones epidemiológicas, clínicas y terapéuticas para el médico general. *Revista de Sanidad Militar*, 51, 46-51.
- Fuchino, H., Koide, T., Takahashi, M., Sekita, S. and Satake, M. (2001) New sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their leishmanicidal activities. *Planta Medica*, 67, 647-653.
- Gadre, A.P. and Gabhe, S.Y. (1988) Saturated and unsaturated fatty acids from *Tridax procumbens*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 168.
- Gallagher, R.B., Marx, J., Hines, P.J. (1994) *Progress in parasitology*. *Science*, 264, 1827.
- Georgopoulou, K., Smirlis, D., Bisti, S., Xingi, E., Skaltsounis, L., Soteriadou, K. (2007) *In vitro* activity of 10-deacetylbaocatin III against *Leishmania donovani* promastigotes and intracellular amastigotes. *Planta Médica*, 73, 1081-1088.
- Germosén-Robineau, L. (1995) *Hacia una Farmacopea Caribeña. Investigación Científica y Uso Popular de Plantas Medicinales en el Caribe*. Enda-Caribe, Edición Tramil 7, Santo Domingo, pp. 641-643.
- Grimaldi Jr, G. and Tesh, R.B. (1993) Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clinical Microbiology Reviews*, 6, 230-250.
- Harvey, A. (2000) Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Techniques*, 5, 294-300.
- Hazra, B., Sarkar, R., Bhattacharyya, S., Ghosh, P. K., Chel, G., Dinda, B. (2002) Synthesis of plumbagin derivatives and their inhibitory activities against Ehrlich ascites carcinoma *in vivo* and *Leishmania*

- donovani* Promastigotes *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 16, 133-137.
- Hemalatha, R. (2008) Anti-hepatotoxic and anti-oxidant defense potential of *Tridax procumbens*. *International Journal of Green Pharmacy*, 1, 164-169.
- Hepburn, N.C. (2000) Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, 25, 363-370.
- Hernández-Flores, J.J., Morales-Aguirre, J.J., Zamora-Chávez, A. (2007) Leishmaniasis visceral tratada con anfotericina B. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 64, 43-48.
- Herwaldt, B.L. (1999) Leishmaniasis. *The Lancet*, 354, 1191-1199.
- Iwu, M.M., Jackson, J.E., Schuter, B.G. (1994) Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today*, 10, 65-68.
- Jha, T.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Felton, J.M., Sabin, A.J., Horton, J. (2005) A phase II dose-ranging study of sitamaquine for treatment of visceral leishmaniasis in India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 1005-1011.
- Kale, M.A.; Shahi, S.R.; Somani, V.G.; Shamkuwar, P.B.; Dhake, A.S. (2008) Hemostatic activity of the leaves of *Tridax procumbens* Linn. *International Journal of Green Pharmacy*, 1, 54-55.
- Kayser, O., Kiderlen, A.F., Croft, S.L. (2003) Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, 90, 55-62.
- Kennedy, M.L., Cortés-Selva, F., Pérez-Victoria, J.M., Jiménez, I.A., González, A.G., Muñoz, O.M., Gamarro, F., Castanys, S. and Ravelo, A.G. (2001) Chemosensitization of multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4668-4676.
- Kirmizibekmez, H., Çalis, I., Perozzo, R., Brun, R., Dönmez, A., Linden, A., Rüedi, P. and Tasdemir, D. (2004) Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *Planta Medica*, 70, 711-717.
- Lezama-Dávila, C.M. and Isaac-Márquez, A.P. (1995) Inmunobiología de las Leishmaniasis. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales. Universidad Autónoma de Campeche, México.
- Liese, J., Schleicher, U., Bogdan, C. (2008) The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*, 213, 377-387.
- Lima, N.M.F., Correia, C.S., Leon, L.L., Machado, G.M.C., Madeira, M.F., Santana, A.E.G. and Goulart, M.O.F. (2004) Antileishmanial activity of

- lapachol analogues. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 99, 757-761.
- Marin Leonett, M. (2007) Aspectos económicos, culturales y de comportamiento que favorecen la transmisión, y medidas de control, en la leishmaniasis tegumentaria. Revista de la Sociedad Médico Quirúrgica del Hospital de Emergencia Pérez de León, 38, 34-38.
- Martín, G.J. (1995) Etnobotánica. Pueblos y Plantas. Manual de conservación. Editorial Nordan-Comunidad, Uruguay, pp 62-63.
- Martínez, M. (1979) Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México, pp. 211, 434.
- McVaugh, R. (1984) Flora Novo-Galiciana: A descriptive account of the vascular plants of western Mexico. Ed. Ann Arbor, The University of Michigan Press, Michigan, vol. 12, pp 937-949.
- Mishra, J., Saxena, A., Singh, S. (2007) Chemotherapy of leishmaniasis: Past, present and future. Current Medicinal Chemistry, 14, 1153-1169.
- Montenegro, H., Gutiérrez, M., Romero, L.I., Ortega-Barría, E., Capson, T. and Cubilla Ríos, L. (2003) Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with leishmanicidal activity. Planta Médica, 69, 677-679.
- Morales, C., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Villar A.M., Cáceres, A. (2001) Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala. Il Farmaco, 56, 523-526.
- Muhammad, I., Bedir, E., Khan, I., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Takamatsu, S., Pelletier, J. and Walker, L.A. (2004) A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. Journal of Natural Products, 67, 772-777.
- Muhammad, I., Dunbar, D.C., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Bedir, E., Takamatsu, S., Ferreira, D. and Walker, L.A. (2003) Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. Journal of Natural Products, 66, 962-967.
- Murray, H.W. (2001) Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45, 2185-2197.
- Murray, H.W. (2004) Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 71, 787-794.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G. (2005) Advances in leishmaniasis. The Lancet, 366, 1561-1577.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of Natural Products, 70, 461-477.

- Ortega Canto, J., Hoil Santos, J. y Lendechy Grajales, A. (1996) Leishmaniasis en milperos de Campeche (una aproximación médico-antropológica). Folleto de Investigación 5, Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Osorio, E.J., Montoya, G.L., Arango, G.J. (2006) Alkaloidal natural products with antiprotozoal activity. *VITAE*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica (Colombia), 13, 61-84.
- Pathak, A.K., Saraf, S., Dixit, V.K. (1991) Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens*. Part I. *Fitoterapia*, 62, 307-313.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R. and Mut-Martín, M. (2007) Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Peraza-Sánchez, S.R., Poot-Kantún, S., Torres-Tapia, L.W., May-Pat F., Simá-Polanco, P. and Cedillo-Rivera, R. (2005) Screening of native plants from Yucatán for anti-*Giardia lamblia* activity. *Pharmaceutical Biology*, 43, 594-598.
- Pérez Sánchez, E., Hidalgo, L., Gómez Pérez, G., Guzmán Bracho, C. (2007) Nuevo foco de leishmaniasis cutánea localizada en Veracruz. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Epidemiología*, 6, 1-3.
- Perez-Victoria, J. M., Perez-Victoria, F.J., Parodi-Talice, A., Jiménez, I. A., Ravelo, A. G., Castanys, S., Gamarro, F. (2001) Alkyl-Lysophospholipid Resistance in Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* and Chemosensitization by a Novel P-Glycoprotein-Like Transporter Modulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2468-2474.
- Phillipson, J.D. and Wright, C.W. (1991) Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Medica*, 57, 53-59.
- Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M.-A., Bendig, M. (2005) Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 727-740.
- Piñero, J.E., Jiménez, I.A., Valladares, B. and Ravelo, A. (2004) Advances in leishmaniasis chemotherapy and new relevant patents. *Expert Opinion*, 14, 1113-1123.
- Polonio, T., Efferth, T. (2008) Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review), *International Journal of Molecular Medicine*, 22, 277-286.
- Powell, A.M. (1965) Taxonomy of *Tridax* (Compositae). *Brittonia*, 17, 47-96.

- Rábago, J., Sigall, D.A., López, L., Baquera, J., Solloa, M.A., Arenas, R., Jáuregui L. (2006) Leishmaniasis cutánea. Reporte de un caso. *Medicina Interna de México*, 22, 343-346.
- Ravikumar, V., Shivashangari, K.S., Devaki, T. (2005) Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens* against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced hepatitis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 101, 55-60.
- Reithinger, R., Dujardín, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. and Brooker, S. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet*, 7, 581-596.
- Reithinger, R., Mohsen, M., Wahid, M., Bismullah, M., Quinnell, R.J., Davies, C.R., Kolaczinski, J. and David, J.R. (2005) Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 1148-1155.
- Robledo, S., Osorio, E., Muñoz, D., Jaramillo, L.M., Restrepo, A., Arango, G. and Vélez, I. (2005) *In vitro* and *in vivo* cytotoxicities and antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1652-1655.
- Robledo, S.M., Puerta, J.A., Muñoz, D.L., Guardo, M. and Vélez, I.D. (2006) Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (V.) panamensis* en Colombia. *Biomédica*, 26, 188-193.
- Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macedo, R.O. and Barbosa-Filho, J.M. (2005) A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12, 514-535.
- Rodríguez Domínguez, J. (2002) Las enfermedades transmitidas por vector en México. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 45, 126-141.
- Romano-Mazzotti, L., Carreño-Manjarrez, R., Maldonado-Velázquez, R. and Gamboa-Marrufo, J.D. (2004) Leishmaniasis visceral: reporte de un caso. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 61, 341-347.
- Rosa, M.S.S., Mendonça-Filho, R.R., Bizzo, H.R., De Almeida Rodrigues, I., Soares, R.M.A., Souto-Pradón, T., Sales Alviano, C., and Lopes, A.H.C.S. (2003) Antileishmanial activity of a linalool-rich-essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1895-1901.
- Sairafianpour, M., Christensen, J., Særk, D., Budnik, B.A., Kharazmi, A., Bagherzadeh, K. and Jaroszewski. (2001) Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-

- quinones from *Perovskia abrotanoides*: new source of tanshinones. *Journal of Natural Products*, 64, 1398-1403.
- Sairafianpour, M., Kayser, O., Christensen, J., Asfa, M., Witt, M., Særk, D., Jaroszewski, J.W. (2002) Leishmanicidal and Antiplasmodial Activity of Constituents of *Smirnowia iranica*. *Journal of Natural Products*, 65, 1754.-1758.
- Salem, M.M. and Werbovetz, K.A. (2005) Antiprotozoal compounds from *Psoralea polydenius*. *Journal of Natural products*, 68, 108-111.
- Salem, M.M. and Werbovetz, K.A. (2006) Isoflavonoids and other compounds from *Psoralea arborescens* with antiprotozoal. *Journal of Natural Products*, 69, 43-49.
- Salem, M.M. and Werbovetz, K.A. (2006) Natural products from plants as drugs candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 2571-2598.
- Santos, D.O., Coutinho, C.E.R., Madeira, M.F., Bottino, C.G., Vieira, R.T., Nascimento, S.B., Bernardino, A., Bourguignon, S.C., Corte-Real, S., Pinho, R.T., Rodrigues, C.R. and Castro, H.C. (2008) Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, 103, 1-10.
- Saraf, S. and Dixit, V.K. (1991) Hepatoprotective activity of *Tridax procumbens*. Part II. *Fitoterapia*, 62, 534-536.
- Sauvain, M., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J., Gayral, P. and Dedet, J. (1996) Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian Liana *Dolicarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytotherapy Research*, 10, 1-4.
- Sen, G., Mandal, S., Roy, S.S., Mukhopadhyay, S. and Biswas, T. (2005) Therapeutic use of quercetin in the control of infection and anemia associated with visceral leishmaniasis. *Free Radical Biology & Medicine*, 38, 1257-1264.
- Shioji Tiunan, T., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D.A., Dias Filho, B.P., Morgado-Díaz, J.A., De Souza, W. and Vataru Nakamura, C. (2005) Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 176-182.
- Singh, S. (2006) New developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, 123, 311-330.
- Singh, S. and Sivakumar, R. (2004) Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10, 307-315.

- Soto, J. and Soto, P. (2006) Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. *Biomédica*, 26, 194-206.
- Soto, J. and Soto, P. (2006) Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*, 26, 207-217a.
- Soto, J. and Toledo, J. (2007) Oral miltefosine to treat New World cutaneous leishmaniasis. *The Lancet*, 7, 7.
- Soto, J., Arana, B.A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J.C., Diaz, A., Luz, M., Arboleda, M., Berman, J.D., Junge, K., Angel, J. and Sindermann H. (2004) Miltefosine for new World cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 1266-1272.
- St. George, S.S., Bishop, J.V., Titus, R.G. and Selitrennikoff, C.P. (2006) Novel compound active against *Leishmania major*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 474-479.
- Suárez, A.I., Diaz, B., Delle Monache, F. and Compagnone, R.S. (2003) Bioflavonoids from *Podocalyx loranthoides*. *Fitoterapia*, 74, 473-475.
- Sundar, S. and Chatterjee, M. (2006) Visceral leishmaniasis: current therapeutic modalities. *Indian Journal of Medical Research*, 123, 345-352.
- Tan, N., Kaloga, M., Radtke, O.A., Kiderlen, A.F., Öksüz, S., Ulubelen, A. and Kolodziej, H. (2002) Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia silicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*, 61, 881-884.
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., Rüedi, P. (2006) 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*, 50, 1352-1364.
- Tay, J., Lara, R., Velazco, O., Gutiérrez, M. (2002) *Parasitología Médica*. Editorial México Méndez Cervantes, México, 7a. Edición.
- Teixeira, M.J., De Almeida, Y.M., Viana, R.J., Filha, J.G.H, Rodrigues, T.P., Prata Jr, J.R.C., Coêlho, I.C.B., Rao, V.S. and Pompeu, M.M.L. (2001) In vitro and in vivo leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytotherapy Research*, 15, 44-48.
- Thiem, D.A., Sneden, A.T., Khan, S.I. and Tekwani, B.L. (2005) Bishnortriterpenes from *Salacia madagascariensis*. *Journal of Natural Products*, 68, 251-254.
- Tincusi, B.M., Jiménez, I.A., Bazzocchi, I.L., Moujir, L.M., Mamani, Z.A., Barroso, J.P., Ravelo, A.G. and Hernández, B.V. (2002) Antimicrobial

- terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. *Planta Medica*, 68, 808-812.
- Tiwari, U., Rastogi, B., Singh, P., Saraf, D.K. and Vyas, S.P. (2004) Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 113-119.
- Torres-Santos, E.C., Lopes, D., Rodrigues Oliveira, R., Carauta, J.P.P., Bandeira Falcao, C.A., Kaplan, M.A.C. and Rossi-Bergmann, B. (2004) Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, 11, 114-120.
- Ueda-Nakamura, T., Mendonça-Filho, R.R., Morgado-Díaz, J.A., Korehisa Maza, P., Prado Dias Filho, B., Garcia Cortez, D.A., Sales Alviano, D., Rosa, M.S.S., Lopes, A.H.C.S., Sales Alviano, C. and Vataru Nakamura, C. (2006) Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International*, 55, 99-105.
- Valencia, C. (1995) *Fundamentos de Fitoquímica*. Editorial Trillas. México, pp 13-14.
- Vannier-Santos, M.A., Martiny, A. and De Souza, W. (2002) Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 297-318.
- Vázquez, M.L., Kroeger, A., Lipowsky, R. and Alzate, A. (1991) Conceptos populares sobre la leishmaniasis cutánea en Colombia y su aplicabilidad en programas de control. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 110, 402-415.
- Velasco Castrejón, O. (1991) *Las leishmaniasis, con especial referencia a México*. Publicación Técnica del INDRE # 7. Dirección General de Epidemiología. México, D.F.
- Velasco-Castrejón, O. (1987) *Las leishmaniasis en México*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 29, 119-126.
- Verma, R.K. and Gupta, M.M. (1988) Lipid constituents of *Tridax procumbens*. *Phytochemistry*, 27, 459-463.
- Villaseñor, J.L. (1989) *Manual para la identificación de las compositae de la península de Yucatán y Tabasco*. Rancho Santa Ana Botanic Garden, technical report No 4, California, pp 103-104.
- Weigel, M.M., Armijos, R.X., Racines, R.J., Zurita, C., Izurieta R., Herrera, E. and Hinojosa, E. (1994) *La leishmaniasis cutánea en la región subtropical del Ecuador: percepciones, conocimientos y tratamientos populares*. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 117, 400-413.

- Wen-Hao, C., Xing-Ming, M., Quan-Xiang, W. and Yan-Ping, S. (2008) Chemical-constituent diversity of *Tridax procumbens*. Canadian Journal of Chemistry, 86, 892-898.
- WHO/LEISH/96/40. (1996) Suministros de medicamentos, costos y restricciones a la importación. Apéndice 11. p74.
- Xaidara, A., Kakourou, T., Klontza, D., Fletmetakis, A. and Kanavakis, E. (1999) Cutaneous leishmaniasis: response to cryotherapy treatment. European Journal of Pediatrics, 158, 530.
- Yadava, R.N. and Saurabh, K. (1998) A new flavone glycoside: 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxyflavone-5-O- α -L-rhamnopyranoside from the leaves of *Tridax procumbens* L. Journal of Asian Natural Products Research, 1, 147-152.
- Zorio-Grima (2005) La leishmaniasis canina 1ra parte. Panorámica general de la enfermedad. Información Veterinaria. Revista Oficial del Consejo General de Colegios Veterinarios de España., *Junio*, 14-18.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Procedimientos generales

Los disolventes utilizados en el laboratorio fueron de grado industrial, destilados en el laboratorio, y grado reactivo. Para el proceso de secado de los extractos y fracciones y recuperación de disolventes se utilizó un evaporador rotatorio, equipado con un baño de agua a 40 °C, y para la eliminación de disolventes se usó una bomba de alto vacío.

Para el análisis cualitativo por cromatografía en capa delgada (CCD) se emplearon placas cromatográficas con soporte de aluminio impregnadas con gel de sílice 60 F₂₅₄, de 0.20 mm de espesor (Merck), y cortadas en el laboratorio. Los componentes separados por CCD fueron visualizados bajo luz UV de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) y con el uso de agentes reveladores, en particular, una disolución al 4% de ácido fosfomolibdico con trazas de sulfato cérico en H₂SO₄ al 5%. Las placas fueron calentadas con una pistola de aire, para visualizar los metabolitos presentes.

En las purificaciones por cromatografía líquida al vacío (CLV) se utilizó gel de sílice 60 de 200-400 mallas (Aldrich) y la elución se realizó utilizando vacío aplicado en la base de la columna (Coll & Bowden, 1986).

Para la separación de compuestos por diferencia de peso molecular se utilizó el método de permeación en gel, en Sephadex LH-20 (Pharmacia, Fine chemicals, tamaño de partícula 25-100 µm) (Fig. 8). Para hidratar el Sephadex LH-20, se resuspende en metanol durante 24 h, dejándolo en reposo. Para activar la columna se utiliza el sistema de disolventes en el cual se realiza la corrida, pasando un volumen de éste equivalente a tres veces el volumen de la columna.

Para las purificaciones por cromatografía en columna por gravedad (Cannell, 1998), se utilizó gel de sílice de 70-230 mallas (Aldrich) y columnas de diversos diámetros.

El análisis de las muestras por cromatografía de gases (CG) se llevó al cabo utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5890. Las muestras se inyectaron en CH₂Cl₂ o CHCl₃, según el caso, grado analítico (Baker) y las separaciones se realizaron en una columna Ultra 2 (5% difenil, 95% dimetil polisiloxano), con flujo de 1.0 mL/min. Como gas acarreador se usó N₂ y un programa de temperatura inicial de 180 °C, temperatura final de 320 °C y un gradiente de 10 °C/min. Las temperaturas del inyector y detector se mantuvieron a 300 °C. También se utilizó un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un espectrómetro de masas 5975B (CG-EM), marca Agilent Technologies.

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrofotómetro marca Nicolet, modelo Protegé 460. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), tanto de ¹H como de ¹³C, se determinaron en un espectrómetro Bruker Avance 400 (400 MHz), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Las muestras fueron disueltas en CDCl₃ y los desplazamientos (δ) se reportan en partes por millón (ppm).

2.2 Material vegetal

El material vegetal (planta entera de *T. procumbens*) fue colectado en los meses de febrero, marzo y junio del año 2004 en los alrededores del norte de la ciudad de Mérida, cerca del CICY, depositándose una muestra en el herbario de la Unidad de Recursos del Centro, con el número de voucher FMay-1955. Las plantas fueron secadas en un desecador de herbario y posteriormente pulverizadas en un molino de cuchillas, con una malla No. 6.

2.3 Bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*

2.3.1 Material biológico

Parásitos

Para determinar la actividad leishmanicida se utilizó un bioensayo que consistió en la inhibición de crecimiento de promastigotes de *Leishmania* (una adaptación del método de Hocquemiller *et al.*,

1991). Este bioensayo se desarrolló usando cepas de promastigotes de *Leishmania mexicana* [(LV4) MNYC/BZ/62/M379].

Inicialmente los parásitos se cultivaron en el medio TC199 (GIBCO) suplementado con suero bovino fetal descomplementado al 10%, a un pH de 7.4, para obtenerlos en su forma infectante (promastigotes metacíclicos). Los cultivos se mantuvieron en incubación a una temperatura constante de 26 °C durante seis días. Transcurridos los seis días, se lavaron con el medio RPMI-1640 (GIBCO) y se centrifugaron a 850 g (en dos ocasiones) durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el botón de parásitos se resuspendió en 1 mL de medio RPMI-1640 con suero bovino fetal (SBF) al 10% y con la solución P/S la cual consiste en 100 µg/mL de estreptomycin, 100 U/mL de penicilina (GIBCO), 20 mM de piruvato de sodio (GIBCO), 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol (GIBCO), 100 mM de L-glutamina (GIBCO) y 1 g/L de bicarbonato de sodio. De este cultivo se tomaron 10 µL y se agregaron 90 µL de formaldehído al 2% (dilución 1:10), para inmovilizar a los parásitos y poder contarlos en la cámara de Neubauer en la zona de glóbulos blancos con el objetivo de 40× (Morel 1984). Dependiendo del número de promastigotes, se realiza una dilución con RPMI-1640 con SBF al 10% y P/S, para obtener una concentración de 1×10^6 parásitos/mL.

- Cálculos:
Cultivo de promastigotes/mL = (PCN) (10,000) (factor de dilución).
PCN: Parásitos contados en la cámara de Neubauer.
Factor de dilución: 10.

2.3.2 Estandarización de la curva de crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*.

Se realizó la curva de crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana* para determinar la fase de desarrollo a la cual se realizaría el bioensayo; éste se llevó al cabo siguiendo la metodología previamente descrita.

Los conteos de los promastigotes se realizaron cada segundo o tercer día y los resultados obtenidos se graficaron y se analizaron por

medio de un programa estadístico Prisma (Programa GraphPad Software Prism 4). El experimento se realizó por triplicado.

2.3.3 Preparación de los extractos de *T. procumbens*

Los extractos de *T. procumbens* (metanólico, hexánico, diclorometánico y de acetato de etilo) se disolvieron en sulfóxido de dimetilo (DMSO) a una concentración menor al 0.5% y en medio RPMI-1640 suplementado y con P/S y se esterilizaron por filtración en los filtros millipore (0.45 μm , previamente esterilizados) dentro de una campana de flujo laminar categoría II. Las concentraciones utilizadas fueron: 1000, 100, 10, 1.0 y 0.01 $\mu\text{g/mL}$.

Posteriormente, se tomó 100 μL del cultivo de parásitos (10^6 parásitos/mL, es decir 10^5 parásitos/100 μL) y esta suspensión se colocó por triplicado con 100 μL de los extractos a los pozos de las microplacas Costar que se incubaron a 26 °C, durante seis días.

Las concentraciones utilizadas en el bioensayo para las fracciones y compuestos puros fueron menores a las de los extractos, siendo la de las fracciones de 50 $\mu\text{g/mL}$ (obteniéndose sólo el porcentaje de infección) y la de los compuestos puros de 2, 1, 0.5, 0.25 y de 0.125 $\mu\text{g/mL}$ (para la obtención de los CI_{50}).

Por último, los parásitos fueron contados en la cámara de Neubauer y comparados con el control positivo (anfotericina B), a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$; control negativo (DMSO), a una concentración menor al 0.5%; y control del experimento (promastigotes incubados sólo con medio RPMI-1640 suplementado y con P/S).

La concentración máxima de DMSO no fue mayor a 0.5% de la disolución final puesta en los pozos, ya que concentraciones más elevadas afectan el crecimiento de los parásitos.

- Control positivo: Anfotericina B, 2 $\mu\text{g/mL}$.
- Control negativo: DMSO menor a 5%, medio RPMI-1640 suplementado y con P/S.

- Control del experimento: Medio RPMI-1640 suplementado y con P/S sin tratamiento.

El bioensayo se realizó dos veces por triplicado. Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición de crecimiento.

El número de parásitos en presencia de las diferentes concentraciones empleadas de los extractos, fracciones y compuestos se comparó con el número de parásitos presentes en los cultivos sin tratamiento (promastigotes incubados sólo con medio RPMI-1640 suplementado y con P/S, para poder determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento celular (%ICC) y la CI_{50} (concentración del compuesto que inhibe el crecimiento del 50% de los parásitos).

Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición de crecimiento y en algunos casos, como su CI_{50} .

El cálculo del porcentaje de inhibición de crecimiento de los promastigotes se hizo de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 100 - \left[\frac{PF}{PCN} \right] \times 100$$

Donde:

PF = Promedio del número de promastigotes vivos de la fracción.

PCN = Promedio del número de promastigotes vivos del control negativo.

La obtención de los CI_{50} se realizó con el programa estadístico Probit.

Para determinar el CI_{50} se emplearon las medias del porcentaje de inhibición de crecimiento celular, del número de parásitos a las diferentes concentraciones de los compuestos.

Las consideraciones de la actividad de los extractos y compuestos fue determinado de acuerdo con las reglas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI), considerándose un extracto activo a $CI_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$, mientras que una fracción es activa a $CI_{50} \leq 25 \mu\text{g/mL}$, siendo un compuesto puro denominado como activo a $CI_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$. Sin

embargo, Pink y colaboradores (2005) consideran que los compuestos para ser antiprotozoarios deben de tener una $CI_{50} \leq 1$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Incluso, otros autores consideran activos a los compuestos al ser estos comparados con los medicamentos usados como controles.

2.4 Ensayo de MTT para evaluar la viabilidad celular, para las células MDCK y KB

Este ensayo está basado en la reducción del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] a formazán de color violeta por deshidrogenasas mitocondriales activas (principalmente la succinato-deshidrogenasa) únicamente de células viables. El producto generado se solubiliza y se mide la absorbancia a 550-620 nm. Este bioensayo permite estudiar la supervivencia y proliferación celular o la acción de agentes citotóxicos sin emplear radiactividad, a diferencia de los ensayos clásicos de incorporación de timidina tritiada. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983, habiendo sido modificado por Francois Denizot & Rita Lang (1986). La obtención de los CI_{50} se realizó con el programa estadístico Probit.

2.5 Bioensayo de toxicidad de células mononucleares humanas de sangre periférica (CMSP)

Las CMSP's fueron obtenidas mediante el método reportado por Boyum (1976). La obtención de estas células da como resultado las células adherentes (macrófagos) y células no adherentes (linfocitos). La viabilidad celular se determinó por la exclusión del colorante azul de tripano, el cual no penetra a las células vivas. El número total de células y el porcentaje de células viables fueron determinados usando un hematocitómetro bajo microscopía óptica. Se realizaron los bioensayos por quintuplicado y los CI_{50} fueron obtenidos por medio del programa estadístico Probit.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Boyum, A. (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, 5, 9-15.
- Cannell, R.J.P. (1998) *Natural Products Isolation*. Humana Press Totowa, New Jersey., pp. 119, 120, 134 y 135.
- Coll, J.C. and Bowden, B.F. (1986) The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, 49, 934-936.
- Denizot, F. and Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89, 271-277.
- Hocquemiller, R., Cortes, D., Arango, G.J., Myint, S.H. and Cavé, A. (1991) Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpene antiparasitaire. *Journal of Natural Products*, 54, 445-452.
- Morel, C. (1984) *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*. 2a Ed. Río de Janeiro, Fundación Oswaldo Cruz. 19.
- Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M.-A. and Bendig, M. (2005) Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 727-740.

Capítulo 3

Purificación e identificación de metabolitos activos de *Tridax procumbens* L. contra los promastigotes de *Leishmania mexicana* LV4

3.1. INTRODUCCIÓN

Tridax procumbens L. es una planta utilizada en la medicina tradicional maya contra las úlceras crónicas aplicada por vía tópica. Asimismo, ha sido reportada con actividad antiprotozoaria y sin haber presentado algún tipo de toxicidad (Cáceres *et al.*, 1998; Berguer *et al.*, 1998); sin embargo, todos estos estudios han sido analizados a nivel de extracto crudo de la planta. Sólo se han reportado algunos estudios fitoquímicos en *T. procumbens*, como el realizado por Wen-Hao y colaboradores (2008), sin haber sido analizado algún tipo de actividad antiprotozoaria.

Diferentes compuestos que han sido aislados de distintas plantas han mostrado actividad antiprotozoaria (Chan-Bacab & Peña Rodríguez, 2001); sin embargo, esta actividad en algunos casos no ha sido selectiva, es decir el compuesto no sólo afecta a los parásitos sino que afecta también a otro tipo de células, como ha sido el caso de algunas acetogeninas (Sahpaz *et al.*, 1994), lo que resulta en un efecto citotóxico en general.

En este capítulo se describen los estudios preliminares que se realizaron para la obtención del método de extracción de los compuestos activos leishmanicidas, con disolventes orgánicos para obtener los extractos de diferente polaridad de *T. procumbens*, así como la purificación e identificación de los metabolitos del extracto que presentó la mayor actividad leishmanicida, mediante métodos espectrométricos y espectroscópicos, realizándolo de manera biodirigida contra promastigotes de *L. mexicana*, así como la evaluación de la citotoxicidad de los mismos contra diferentes células.

3.2 ESTUDIOS PRELIMINARES

3.2.1 Obtención de extractos por el método de maceración

Se tomaron 100 g del material vegetal para preparar extractos mediante una maceración con los siguientes disolventes: hexano (Hx), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) (Fig. 9).

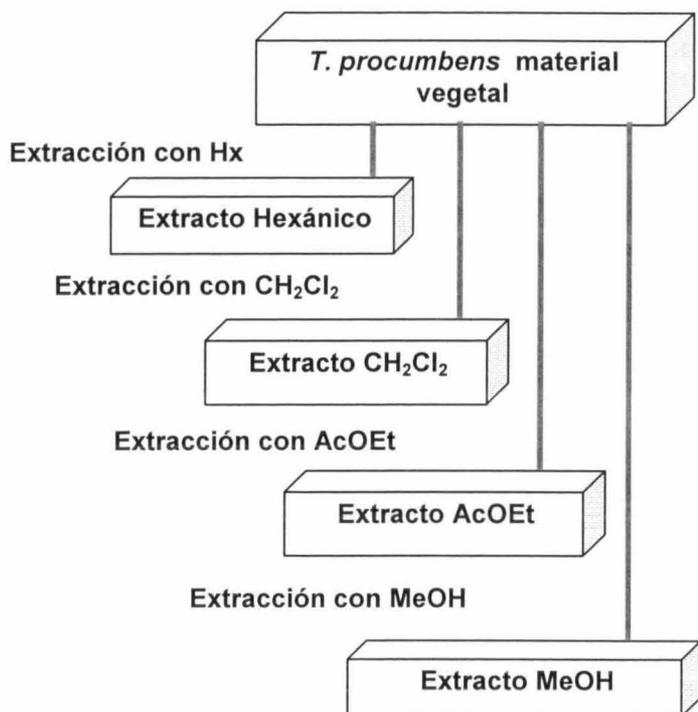


Figura 9. Esquema de maceración del material vegetal de *T. procumbens* para la obtención de los diferentes extractos no polares (Hx), polaridad baja (CH_2Cl_2), mediana polaridad (AcOEt) y polaridad alta (MeOH).

3.2.2 Obtención de extractos por el método de partición

Otra muestra del material vegetal de *T. procumbens* se usó para preparar extractos mediante el esquema de partición: 100 g fueron extraídos con MeOH por maceración, para obtener un extracto crudo metanólico que se redisolvió en una mezcla de MeOH/H₂O (1:3); esta suspensión fue luego sometida a un proceso de partición con disolventes de polaridad ascendente, usando sucesivamente Hx, cloroformo (CHCl₃) y AcOEt (Fig. 10).

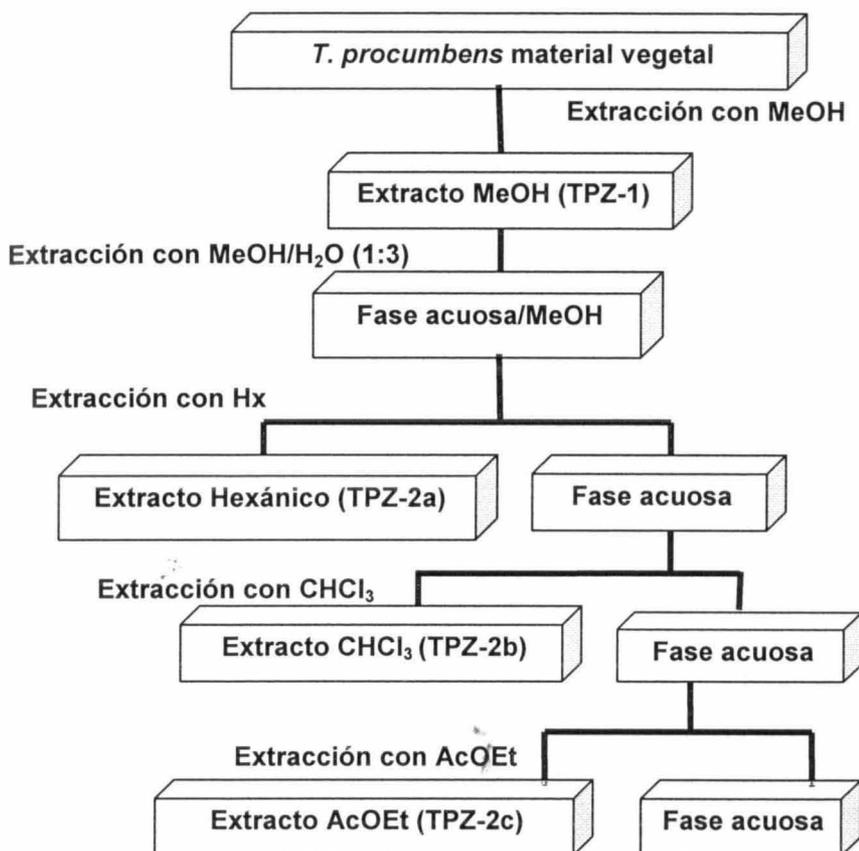


Figura 10. Esquema de partición del extracto metanólico de *T. procumbens* para la obtención de los diferentes extractos no polares (Hx), polaridad baja (CHCl₃), mediana polaridad (AcOEt) y polaridad alta (MeOH).

Alícuotas de los extractos obtenidos por ambas metodologías fueron sometidos al bioensayo *in vitro* contra los promastigotes de *L. mexicana* LV4 (Capítulo 2) a fin de elegir uno de ellos. Según los resultados, el método de extracción líquido-líquido fue el mejor método de separación de los compuestos leishmanicidas activos, por lo que se realizó este método a mayor escala.

3.3 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN A MAYOR ESCALA: MÉTODO DE PARTICIÓN

Una muestra de *T. procumbens* (10 Kg) se repartió en tres lotes y cada uno se maceró con MeOH por separado durante 3 días (3×). Las suspensiones resultantes fueron concentradas y secadas mediante un evaporador rotatorio y en cristalizadores de vidrio al aire libre por varios días, obteniéndose 1 Kg de extracto MeOH total. Alícuotas de 500 g de este extracto se redisolviéron por separado en una mezcla de MeOH/H₂O (1:3) y cada suspensión resultante fue fraccionada mediante una partición con Hx, CH₂Cl₂ y AcOEt, para obtener los extractos de polaridad baja, mediana y mediana-alta, respectivamente.

Los rendimientos de los extractos obtenidos de la planta entera de *T. procumbens* por el método de extracción líquido-líquido se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Rendimiento de los extractos de *T. procumbens*.

<i>Extracto</i>	<i>Peso (gramos)</i>	<i>% rendimiento</i>
Metanólico (TPZ-1)	1000	10
Hexánico (TPZ-2a)	110	1.10
Diclorometánico (TPZ-2b)	50	0.50
Acetato de etilo (TPZ-2c)	37	0.37

3.3.1 Purificación del extracto hexánico TPZ-2a

Una muestra de TPZ-2a (15 g), se fraccionó en una columna líquida al vacío (CLV), de 7 cm de diámetro y 5 cm de altura, con el sistema hexano-acetona de polaridad creciente, recolectando en total 28 fracciones de 400 mL cada una, las cuales fueron analizadas por

cromatografía en capa delgada (CCD), agrupándose en 10 fracciones por su similitud, siendo nombradas como TPZ-6a – TPZ-6j y cuyos pesos se reportan en el cuadro 6. Estas fracciones fueron analizadas en el bioensayo leishmanicida.

Cuadro 6. Peso de las fracciones de TPZ-2a de *T. procumbens*.

<i>Extracto</i>	<i>Peso (gramos)</i>
TPZ-6a	0.064
TPZ-6b	0.077
TPZ-6c	0.345
TPZ-6d	0.173
TPZ-6e	1.725
TPZ-6f	1.612
TPZ-6g	1.560
TPZ-6h	1.385
TPZ-6i	1.574
TPZ-6j	5.221

3.3.2 Precipitación de cristales de la fracción TPZ-6h

En la fracción TPZ-6h se observó la presencia de un precipitado (ppt), que al secarse formó cristales blancos, los cuales se filtraron y se les nombró TPZ-6h1. Esta fracción fue varias veces disuelta y filtrada con metanol frío, obteniéndose cristales aun más blancos, obteniéndose un peso total de 1.5 g, los cuales mostraron un R_f 0.37 correspondiente al estigmasterol.

3.3.3 Purificación de TPZ-6h

La fracción TPZ-6h, que proviene de TPZ-2a, (1.087 g) mostró por CCD la presencia de un componente mayoritario en el sistema Hx/An (80:20), por lo que se fraccionó mediante una columna CLV de 7 cm de diámetro y 5 cm de altura, con los sistemas Hx/CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂/An en polaridad ascendente, obteniéndose 27 fracciones de 250 mL cada una, agrupándose las similares después de ser analizadas por CCD en 7 fracciones (TPZ-24a – TPZ-24g), observándose la presencia de un componente más puro en la fracción TPZ-24d (16.4 mg).

3.3.4 Purificación de TPZ-24d

La fracción TPZ-24d (16.4 mg) se purificó mediante una columna de gravedad de 0.5 cm de diámetro y una altura de 15 cm, con el sistema Hx/AcOEt (85:15), recolectándose 52 fracciones de 0.5 mL y reuniéndose las similares después de analizarse por CCD. Así, se obtuvo el compuesto puro TPZ-25d1 (3 mg), de consistencia aceitosa y de color amarillo.

En la figura 11 se presenta el diagrama general que indica el modo de purificación cromatográfica de TPZ-25d1. Para obtener mayores cantidades de este compuesto, se repitió en tres ocasiones la purificación de la fracción TPZ-2a, hasta obtener 10 mg en total.

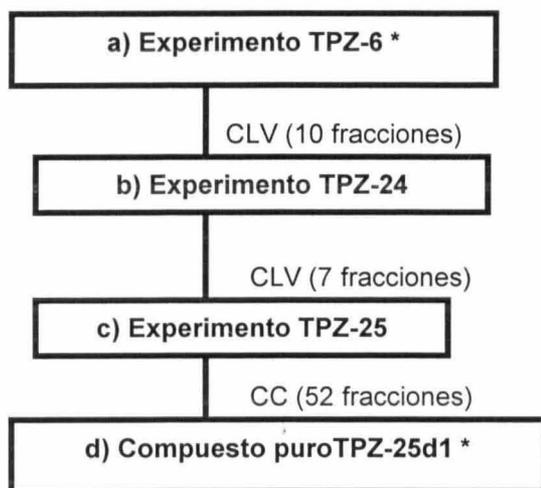


Figura 11 Esquema general de purificación de TPZ-25d1. **a)** Experimento TPZ-6 (fraccionamiento de TPZ-2a), el cual consistió en una CLV en donde se obtuvieron 10 fracciones (TPZ-6a-j). **b)** Experimento TPZ-24 (purificación de TPZ-6h), 7 fracciones (TPZ-24a-g). **c)** Experimento TPZ-25 (purificación de TPZ-24d), realizado con una CC, obteniéndose 52 fracciones. **d)** Compuesto TPZ-25d1, obtenido al reunir las fracciones 11-15 del experimento TPZ-25. El asterisco indica que fueron activos en el bioensayo leishmanicida.

3.3.5 Purificación de TPZ-24b

La fracción TPZ-24b (89.1 mg), obtenida también de TPZ-6h, se purificó mediante una columna de 1 cm de diámetro y 27 cm de altura empacada con Sephadex LH-20, eluida con una mezcla de hexano/ CHCl_3 /MeOH (2:1:1), obteniéndose 40 fracciones, las cuales fueron monitoreadas con CCD y reunidas en tres fracciones nombradas como TPZ-26a – TPZ-26c. En la fracción TPZ-26b se observó un componente mayoritario al que se denominó TPZ-26b1. En la figura 12 se observa el esquema general de purificación de TPZ-26b1.

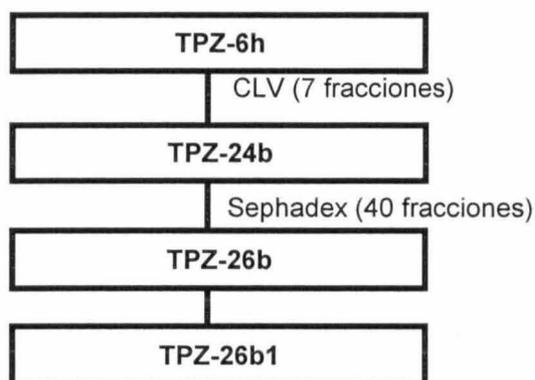


Figura 12. Esquema general de purificación de TPZ-26b1.

En la figura 13 se presenta un esquema general de purificación de los compuestos obtenidos de TPZ-2a.

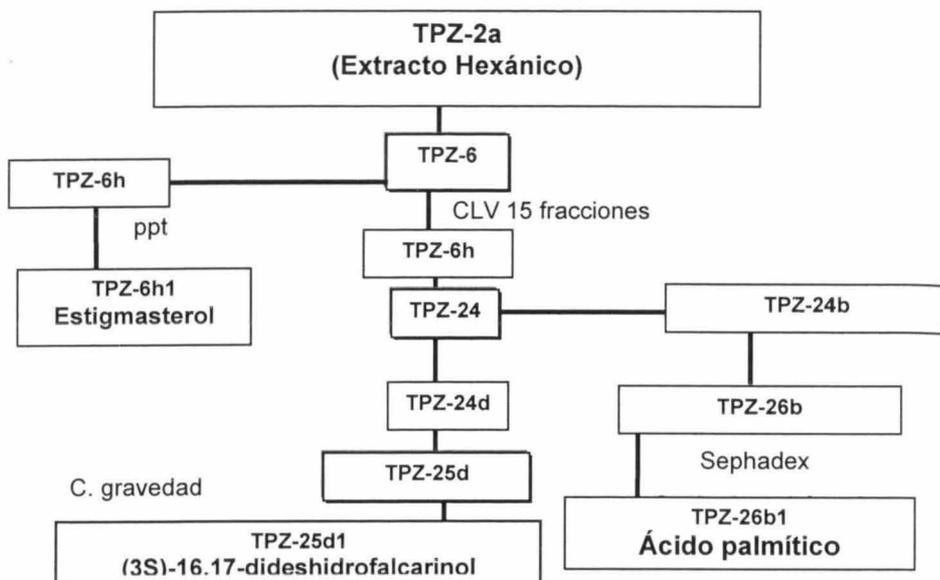


Figura 13. Esquema general del fraccionamiento de TPZ-2a.

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El mejor método de extracción se eligió con base en la extracción de los compuestos activos leishmanicidas. El porcentaje de inhibición de crecimiento de promastigotes causado por los extractos obtenidos, mediante los dos métodos de extracción (extracción líquido-líquido y extracción por maceración), se realizó a una concentración de 1 mg/mL. Con el primer método se observó que la actividad se encontraba en los extractos hexánico y en el diclorometánico, mientras que el extracto de acetato de etilo resultó inactivo. En el método de maceración, se observó actividad en los tres extractos, como puede verse en la figura 14.

Es decir, el mejor método de separación de los compuestos activos resultó ser la de extracción líquido-líquido (partición), ya que los compuestos activos se encuentran en su mayoría en la fracción hexánica (no polar), mientras que la fracción de AcOEt en la cuales los metabolitos son medianamente polares, no presentó actividad.

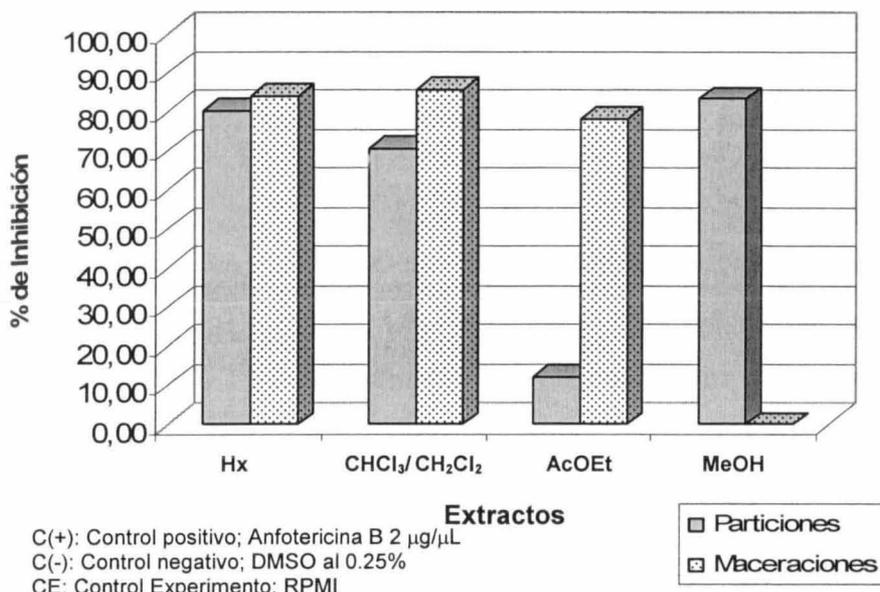


Figura 14. Comparación de los porcentajes de inhibición de crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*, de los extractos obtenidos por extracción líquido-líquido (partición), y por el de extracción por maceración. Extracto hexánico (Hx), extracto clorofórmico (CHCl₃), extracto diclorometánico (CH₂Cl₂), extracto de acetato de etilo (AcOEt) y extracto metanólico (MeOH).

El bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* LV4 mostró que el extracto metanólico (TPZ-1) de *T. procumbens* fue activo con un $CI_{50} = 16.52 \mu\text{g/mL}$, lo cual confirma los resultados obtenidos por Peraza-Sánchez y colaboradores en esta especie (2007).

De las fracciones obtenidas de la partición del extracto metanólico, la no polar (TPZ-2a), resultó activa en el bioensayo leishmanicida con un $CI_{50} = 9.42 \mu\text{g/mL}$, mientras que los extractos de polaridad mediana y mediana-alta al tener un CI_{50} mayor de $100 \mu\text{g/mL}$ no fueron considerados activos [Lo anterior fue determinado de acuerdo con las reglas del Instituto Nacional del Cáncer (NCI)] (Cuadro 7).

Cuadro 7. Bioensayos de la actividad contra los promastigotes de *Leishmania mexicana* LV4 de los extractos de *T. procumbens*.

<i>Extracto</i>	<i>Actividad contra promastigotes</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>
TPZ-1 Ext MeOH	16.52
TPZ-2a Ext Hx	9.42
TPZ-2b Ext CH ₂ Cl ₂	>100
TPZ-2c AcOEt	>100

Debido a que la mayoría de los metabolitos con actividad leishmanicida reportados en la literatura muestran cierta actividad citotóxica colateral, se consideró evaluar este tipo de actividad en los extractos y las fracciones leishmanicidas, evaluándose así a TPZ-1 y TPZ-2a contra células adherentes (macrófagos), no adherentes (linfocitos), células de riñón canino MDCK (Madin-Darby Canin Kidney) y células KB (línea de células de carcinoma humano nasofaríngeo), con los siguientes resultados: la evaluación del extracto metanólico indicó claramente que no hay correlación entre la actividad citotóxica y la actividad leishmanicida detectada, ya que la concentración leishmanicida de este extracto fue $CI_{50} = 16.52 \mu\text{g/mL}$, mientras que las CI_{50} de citotoxicidad de las diferentes células evaluadas fueron superiores (Cuadro 8). Estos resultados coinciden con lo reportado por Cáceres y colaboradores (1998) y Berguer y colaboradores (1998), ya que extractos obtenidos de *T. procumbens* presentaron actividad antiprotozoaria, sin actividad tóxica de los mismos.

Cuadro 8. Toxicidad contra células CMSP (adherentes, no adherentes), MDCK y KB.

<i>Extracto, Fracción</i>	<i>Células adherentes</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>Células no adherentes</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>Células MDCK</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>	<i>Células KB</i> <i>CI₅₀ (µg/mL)</i>
TPZ-1	69	65	1151	58
TPZ-2a	166	117	45	60

Una vez demostrado que la fracción de menor polaridad (TPZ-2a) fue la más activa ($CI_{50} = 9.42 \mu\text{g/mL}$), se realizó su fraccionamiento con una CLV. Las fracciones obtenidas fueron sometidas al bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* LV4, resultando más activas las fracciones TPZ-6f, TPZ-6h y TPZ-6i, con una inhibición de 57.8, 91.3 y 61.3% a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$. Se observó que la fracción hexánica TPZ-2a siguió conservando su actividad, ya que, a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, tiene un porcentaje de inhibición de crecimiento de los promastigotes del 93%. La fracción acuosa no presentó actividad a esa concentración, y tampoco se observó actividad del control negativo (DMSO), ni del estigmasterol (Fig. 15).

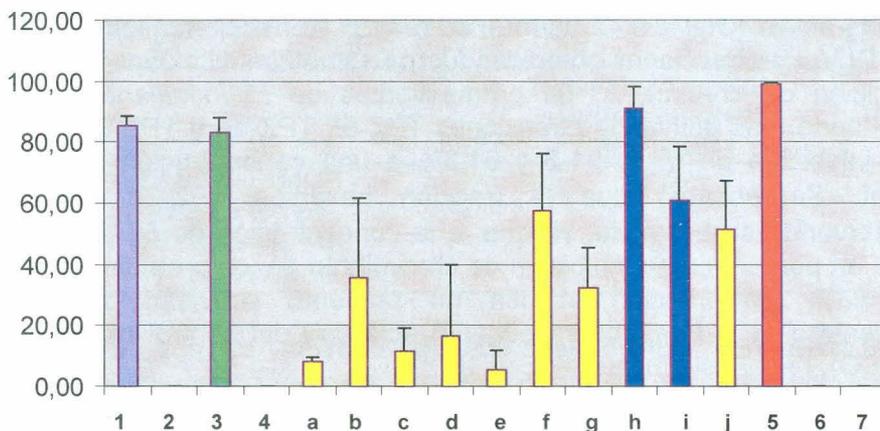


Figura 15. Porcentaje de inhibición de crecimiento de las fracciones TPZ-6a – TPZ-6j. **1)** Extracto MeOH, **2)** Control del experimento (medio), **3)** Extracto Hx, **4)** Extracto acuoso, **5)** Control positivo (anfotericina B), **6)** Control negativo (DMSO), **7)** Estigmasterol. Las letras indican las fracciones de TPZ-6 (**TPZ-6a – TPZ-6j**). La fracción de TPZ-6 que presentó mayor actividad fue la TPZ-6h a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, inhibiendo en un 91.3%, mientras que ni la fracción acuosa ni el control negativo (DMSO) presentaron actividad. Análisis realizado utilizando el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

3.4.1 Identificación de los metabolitos aislados

3.4.1.1 Identificación de la mezcla Estigmasterol y β -Sitosterol (TPZ-6h1)

Una muestra del precipitado recristalizado de TPZ-6h1 se inyectó al cromatógrafo de gases-masas, observándose en el cromatograma dos picos mayoritarios con $t_R = 11.01$ y 12.27 , respectivamente (Fig. 16). Los compuestos se identificaron por comparación de los patrones de fragmentación de sus espectros de masas con los almacenados en la base de datos del detector másico como el estigmasterol (**98**) (Fig 17) y el β -sitosterol (**99**). Esto confirma los reportes previos sobre la presencia de estos metabolitos en *T. procumbens* (Akbar *et al.*, 2002).

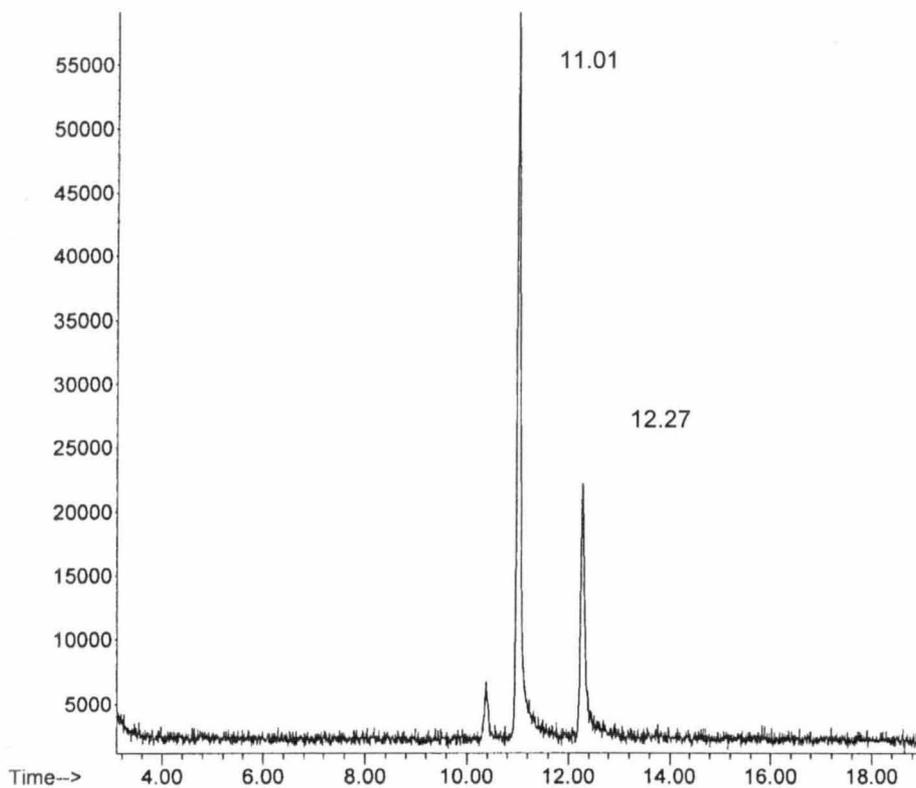


Figura 16. Cromatograma de gases de TPZ-6h1, donde se observan 2 picos con $t_R = 11.01$ y 12.27 para estigmasterol y β -sitosterol, respectivamente.

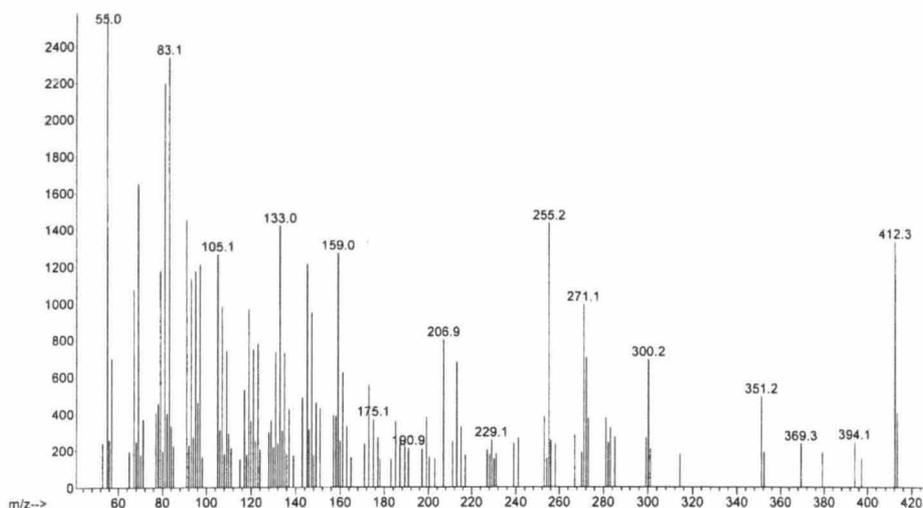
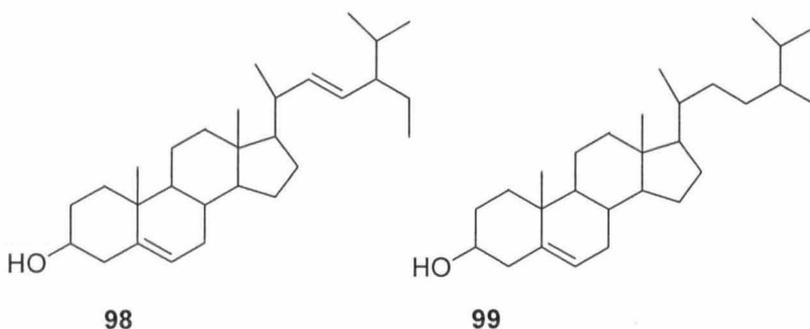


Figura 17. Patrón de fragmentación de TPZ-6h1, con un $t_R = 11.01$, donde se observa el ión molecular m/z 412 (40), correspondiente a la fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$, así como los fragmentos del estigmasterol a m/z 369 (12), 394 (15), 271 (65), 83 (75), 55 (100).



El estigmasterol (24-etil-colest-5,22-dien-3 β -ol) (**98**) y el β -sitosterol (**99**) pertenecen a los esteroides, un subgrupo de esteroides naturales que derivan del colesterol. Poseen un grupo 3-hidroxi y una cadena lateral alifática en C-17, constituida normalmente de 8-10 carbonos. Los esteroides se distribuyen extensamente en los reinos animal y vegetal, como componentes celulares en forma libre o como ésteres glicósidos. El estigmasterol se utiliza como materia prima para la síntesis parcial de hormonas (Waizel-Bucay *et al.*, 2008).

La mezcla estigmasterol y β -sitosterol no presentó algún tipo de actividad contra *L. mexicana*. Sin embargo, no puede descartarse la actividad contra otras especies de *Leishmania*, ya que Torres-Santos y colaboradores (2004) reportaron que esta mezcla inhibe en un 70% a los promastigotes de *L. amazonensis*. Esto podría deberse a la variabilidad de las cepas y su diferente sensibilidad al efecto de los compuestos, así como a las diferentes concentraciones de los esteroides presentes en la mezcla. Además, se ha reportado otro esteroide con actividad leishmanicida, el clerosterol, aislado de las frutas de *Cassia fistula* (Leguminosae). Este metabolito presentó una importante actividad contra los promastigotes y amastigotes de *L. chagasi* (Sartorelli *et al.*, 2007).

3.4.1.2 Identificación de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (TPZ-25d1)

El compuesto TPZ-25d1, aislado de TPZ-2a, se obtuvo como un aceite amarillo, muy lábil a temperatura ambiente y con tendencia a polimerizarse rápidamente, por lo que se tuvo que mantener disuelto en CHCl_3 a bajas temperaturas ($-18\text{ }^\circ\text{C}$). Una muestra de TPZ-25d1 se inyectó al cromatógrafo de gases-masas, observándose en el cromatograma un solo pico con un $t_R = 7.94$, (Fig. 18). Con los estudios espectroscópicos de IR, ^1H - y ^{13}C RMN fue identificado como (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol.

(3S)-16,17-Dideshidrofalcarinol. IR (KBr) λ_{max} 3385, 3078, 2914, 2847, 2253 cm^{-1} ; RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.94 (1H, ddd, $J = 17.0, 10.1, 5.3$, H-2), 5.81 (1H, ddt, $J = 17.0, 10.2, 6.7$, H-16), 5.51 (1H, dtt, $J = 10.5, 7.3, 1.5$, H-10), 5.46 (1H $_{\text{trans}}$, dt, $J = 17.0, 1.1$, H-1), 5.38 (1H, dtt, $J = 10.5, 6.5, 1.5$, H-9), 5.24 (1H $_{\text{cis}}$, dt, $J = 10.1, 1.1$, H-1), 4.99 (1H $_{\text{trans}}$, dq, $J = 17.0, 1.6$, H-17), 4.93 (1H $_{\text{cis}}$, dq, $J = 10.2, 1.0$, H-17), 4.92 (1H, ddd, $J = 6.6, 5.3, 1.1$, H-3), 3.03 (2H, d, $J = 6.5$, H-8), 2.04 (4H, m, H-11, H-15), 1.74 (1H, d, $J = 6.6$, 3-OH), 1.35 (6H, m, H-12, H-13, H-14). RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ 139.0 (C-16), 136.1 (C-2), 132.9 (C-10), 122.0 (C-9), 117.0 (C-1), 114.2 (C-17), 80.2 (C-7), 74.2 (C-4), 71.2 (C-5), 64.0 (C-6), 63.5 (C-3), 33.7 (C-15), 29.0 (C-14), 28.7 (C-12), 28.6 (C-13), 27.1 (C-11), 17.6 (C-8); EIMS m/z 241 $[\text{M} - 1]^+$ (0.6), 227 (0.6), 213 (0.8), 199 (2), 185 (5), 171 (9), 159 (19), 141 (31), 129 (5), 115 (79), 103 (32), 91 (98), 77 (48), 66 (7), 55 (100), 41 (62), 28 (22). Formula molecular: $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}$.

En el cromatograma de gases se observó un solo pico, con un $t_R = 7.94$, indicando su pureza (Fig. 18).

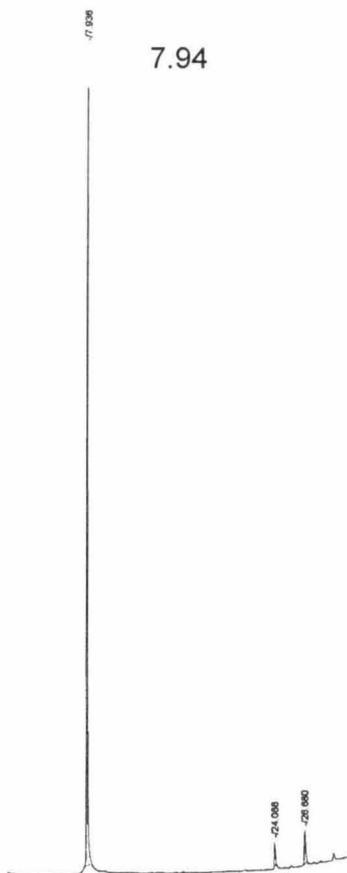


Figura 18. Cromatograma de gases de TPZ-25d1. Se observa un pico mayoritario con $t_R = 7.94$. Las separaciones se realizaron en una columna Ultra 2 (5% difenil, 95% dimetil polisiloxano), con flujo de 1.0 mL/min. Como gas acarreador se usó N_2 y un programa de temperatura inicial de 180 °C, temperatura final de 320 °C y un gradiente de 10 °C/min. Las temperaturas del inyector y detector se mantuvieron a 300 °C.

En el espectro de infrarrojo (IR) de TPZ-25d1 (Fig. 19) se observó una señal ancha a 3385 cm^{-1} , perteneciente a grupos OH; una banda a 3078 cm^{-1} , típica de dobles enlaces C=CH; bandas a $2914\text{-}2847\text{ cm}^{-1}$, debidas a estiramientos CH de los grupos CH_2 ; y una banda a 2253 cm^{-1} típica de grupos $\text{C}\equiv\text{C}$.

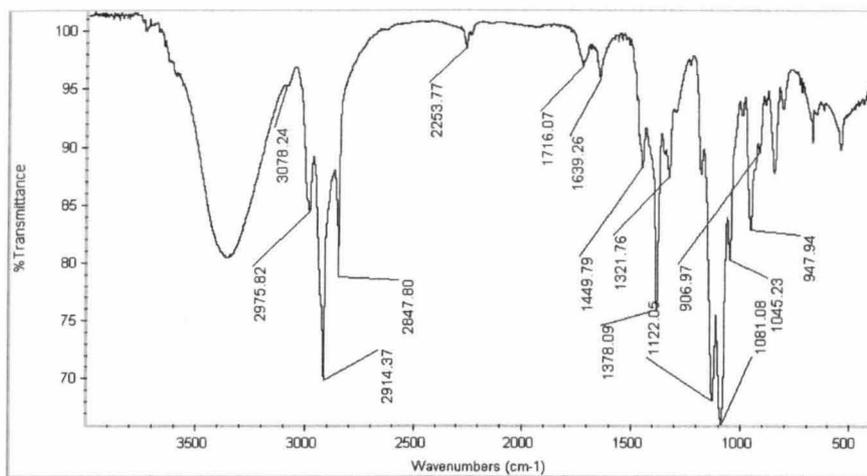


Figura 19. Espectro de IR de TPZ-25d1. En el se observan una señal ancha a 3385 cm^{-1} , perteneciente a grupos OH (no señalada); una banda a 3078 cm^{-1} , típica de dobles enlaces C=CH; bandas a $2914\text{-}2847\text{ cm}^{-1}$, debidas a estiramientos CH de los grupos CH_2 ; y una banda a 2253 cm^{-1} típica de grupos $\text{C}\equiv\text{C}$.

En el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN^{-1}H) de TPZ-25d1 no se observaron señales debidas a protones aromáticos (Fig. 20). El espectro mostró señales para ocho protones olefínicos a δ 5.94, 5.81, 5.51, 5.47, 5.38, 5.23, 4.99 y 4.93 (Fig. 21).

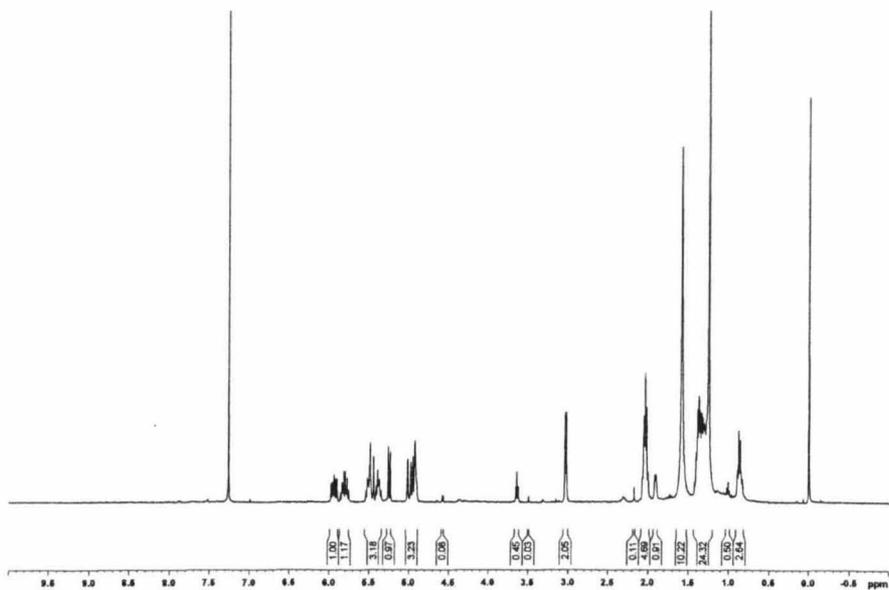


Figura 20. Espectro de RMN- ^1H de TPZ-25d1 en CDCl_3 . En el espectro no se observan señales típicas de grupos aromáticos, cuyos desplazamientos aparecen en la zona comprendida entre 6 a 8 ppm.

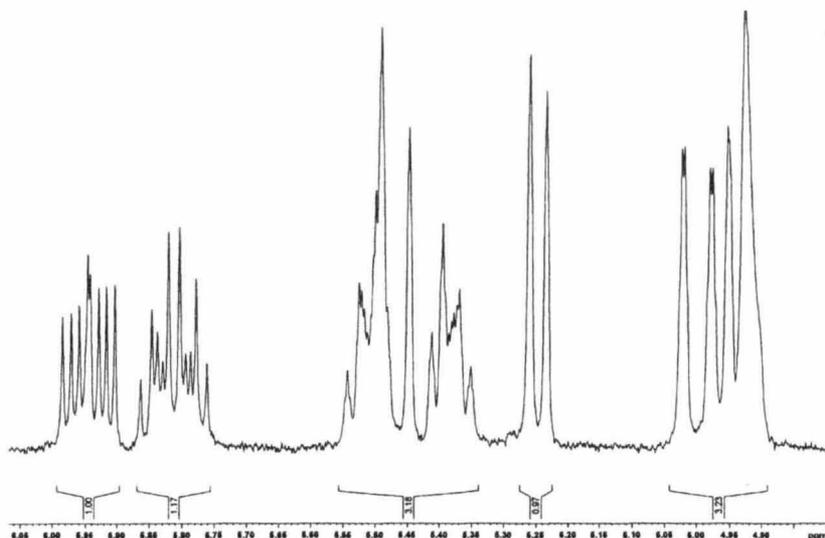


Figura 21. Ampliación del espectro de RMN-¹H de TPZ-25d1. El espectro muestra señales para ocho protones olefínicos a δ 5.94, 5.81, 5.51, 5.47, 5.38, 5.23, 4.99 y 4.93.

Por otro lado, el espectro de RMN-¹³C de TPZ-25d1 (Fig. 22) reveló la presencia de seis carbonos tipo olefínicos a δ 139.0, 136.1, 132.9, 122.0, 117.0 y 114.2, y con los experimentos DEPT-90 y DEPT-135 (no mostrados) se observó la presencia de cuatro carbonos cuaternarios a δ 80.2, 74.2, 71.2 y 64.0 y un oximetino a δ 63.5.

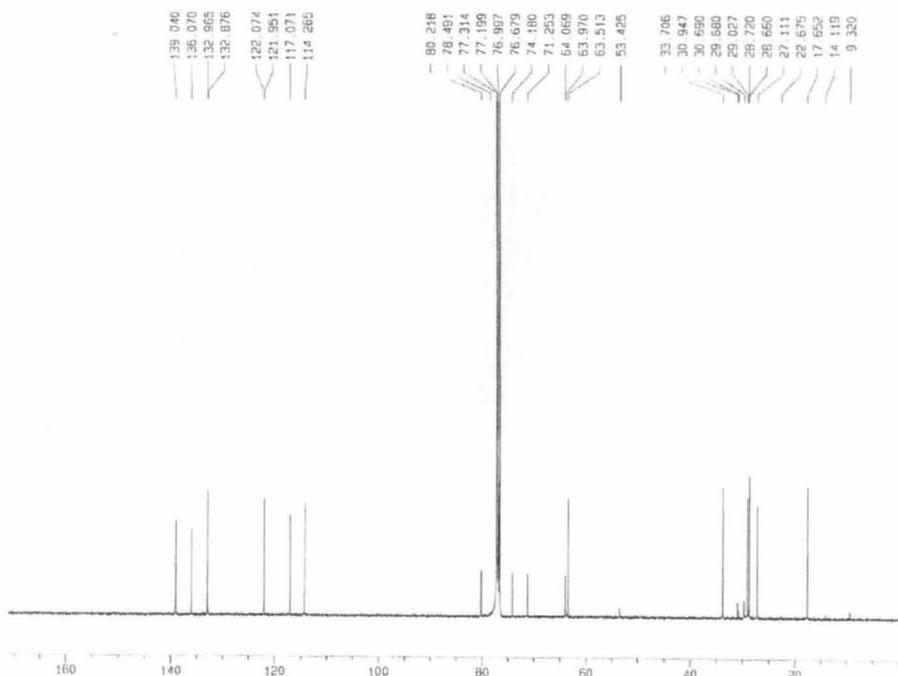
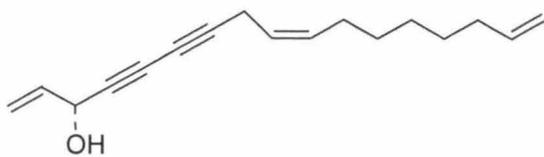


Figura 22. Espectro de RMN-¹³C de TPZ-25d1 a 100 MHz disuelto en CDCl₃. Se observa la presencia de seis carbonos tipo olefínicos a δ 139.0, 136.1, 132.9, 122.0, 117.0 y 114.2, cuatro carbonos cuaternarios a δ 80.2, 74.2, 71.2 y 64.0 y un oximetino a δ 63.5.

Con base en el análisis de estos datos espectroscópicos y por comparación de los mismos con los reportados anteriormente en la literatura (Bernat *et al.*, 1996), se propuso la estructura (**100**) para TPZ-25d1, la cual se pudo identificar como una oxilipina conocida como (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (Cuadro 9). Este metabolito ya había sido aislado previamente de *T. procumbens* en un estudio preliminar realizado en la Unidad de Biotecnología del CICY (Novelo-Castilla, 2005).



100

Cuadro 9. Comparación de desplazamientos químicos de los datos de carbono e hidrogeno de TPZ-25d1, con el dideshidrofalcarinol reportado en la literatura ^a. Desplazamientos químicos de los carbonos y de los hidrógenos de TPZ-25d1 observados en los espectros de RMN, a 100 y 400 MHz, respectivamente, en CDCl₃.

#C	TPZ-25d1	Dideshidrofalcarinol ^a	TPZ-25d1	Dideshidrofalcarinol ^a
	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^1\text{H m J (Hz)}$	
1	117.0	117.0	5.24 (1H _{cis} , dt, 10.1, 1.1) 5.46 (1H _{trans} , dt, 17.0, 1.1)	5.24 (dt, 10.4, 1.3) 5.44 (dt, 17.4, 1.3)
2	136.1	136.1	5.94 (1H, ddd, 17.0, 10.1, 5.3)	5.92 (ddd, 17.4, 10.4, 5.4)
3	63.5	63.5	4.92 (1H, ddd, 17.0, 10.1, 5.3, 1.1)	4.91 (ddd, 6.8, 5.4, 1.3)
4	74.2	74.3	----	----
5	71.2	71.2	----	----
6	64.0	64.0	----	----
7	80.2	80.1	----	----
8	17.6	17.6	3.03 (2H, d, 6.5)	3.01 (d, 6.5)
9	122.0	122.0	5.38 (1H, dtt, 10.5, 6.5, 1.5)	5.36 (dtt, 10.8, 6.5, 1.5)
10	132.9	132.9	5.51 (1H, dtt)	5.49 (dtt, 10.8, 7.3, 1.5)
11	27.1	27.1	2.04 (m)	2.00 (m)
12	28.7	28.7	1.35 (m)	1.35 (m)
13	28.6	28.6	1.35 (m)	1.29 (m)
14	29.0	29.0	1.35 (m)	1.35 (m)
15	33.7	33.7	2.04 (m)	2.03 (m)
16	139.0	139.0	5.81 (ddt)	5.79 (ddt, 17.1, 10.8, 6.8)
17	114.2	114.2	4.93 (dq) 4.99 (dq)	4.93 (dq, 10.8, 1.5) 4.99 (dq, 17.1, 1.5)
3-OH	----		1.74 (d)	1.87 (d, 6.8)

^a Bernat *et al.*, 1996

(3S)-16,17-dideshidrofalcarinol es una oxilipina que fue reportada por primera vez en 1966 por Bolhmann *et al.* de la raíz de *Falcaria vulgaris* (Umbelliferae), y que también ha sido aislada de las raíces de *Artemisia capillaris* (Harada & Iwasaki, 1982), de *Calea integrifolia* (Bolhmann & Zdero, 1976) y de la parte aérea de *Lidbeckia pectinata* (Bolhmann *et al.*, 1972), que son especies pertenecientes a la familia Asteraceae (Compositae).

El término oxilipina ha sido introducido como un vocablo colectivo para compuestos oxigenados biosintetizados a partir de ácidos grasos (Vivanco *et al.*, 2005) (Fig. 24), implicados en la respuesta al daño físico causado por animales o insectos, así como al estrés y al ataque de patógenos (Howe *et al.*, 2002). La presencia de enlaces triples en sus estructuras, como en el dideshidrofalcarinol (**100**), permite que se les considere como lípidos acetilénicos o poliacetilenos (polienos) que, a menudo, contienen enlaces dobles C=C o unidades de alenos. Estos compuestos son producidos por hongos (Basidiomicetos) (Anchel, 1952) y plantas pertenecientes a las familias Asteraceae, Apiaceae y Araliaceae (Boll & Hansen, 1987; Christensen & Lam, 1990; Christensen & Lam, 1991; Christensen, 1992; Wittstock *et al.*, 1995; Rollinger *et al.*, 2003).

Se conocen más de mil poliacetilenos de plantas. Los poliacetilenos naturales son formados a partir de los ácidos grasos insaturados, como el ácido oleico y el linoleico, por deshidrogenación adicional de sus enlaces *cis*-alqueno y acortamiento subsecuente de la cadena hidrocarbonada (Fig 23). Para el aislamiento de los poliacetilenos, se procede con una extracción cuidadosa a temperatura ambiente (Marston & Hostettman, 1994). Estos compuestos presentan diferentes actividades biológicas, como antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antibiótica, antiprotozoaria, entre otras (Hansen & Boll, 1986; Dembitsky, 2006; Christensen & Brandt, 2006; Senn, 2007).

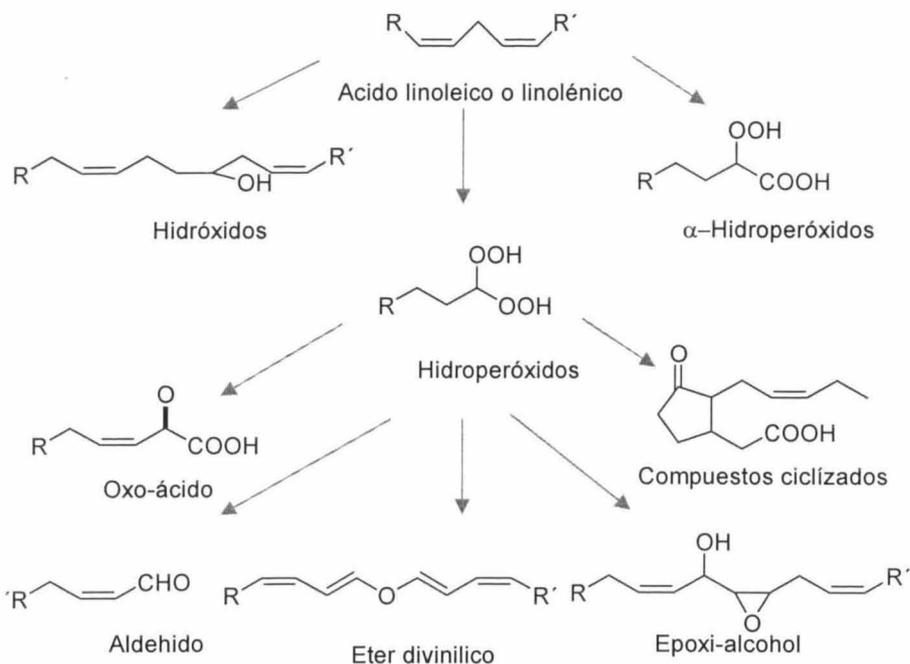
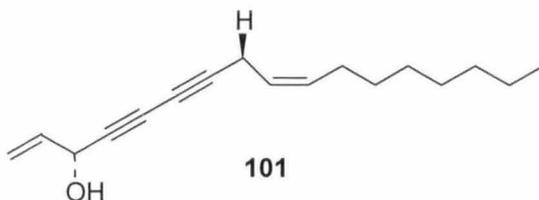
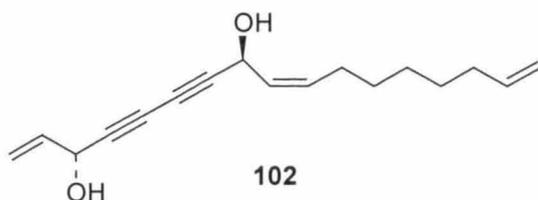


Figura 23. Biosíntesis de las oxilipinas. Los poliacetilenos naturales son formados a partir de los ácidos grasos insaturados, como el ácido oleico y el linoleico, por deshidrogenación adicional de sus enlaces *cis*-alqueno y acortamiento subsecuente de la cadena hidrocarbonada.

El dideshidrofalcarinol (**100**) fue también aislado del extracto crudo de las hojas de *Dendropanax arboreus* (Araliaceae) junto con otros poliacetilenos C₁₇, como falcarinol (**101**) y el dideshidrofalcarindiol (**102**). Estos compuestos muestran actividad citotóxica contra diferentes líneas tumorales *in vitro*. El dideshidrofalcarinol tiene también actividad *in vivo* contra el melanoma LOX (Bernart *et al.*, 1996).



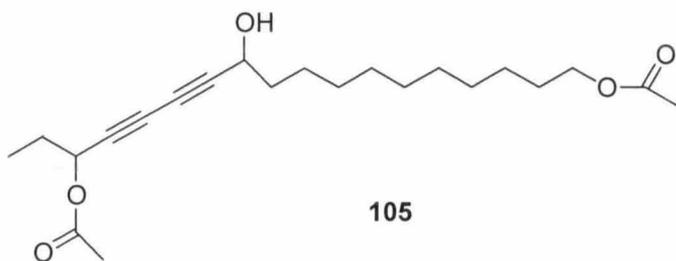
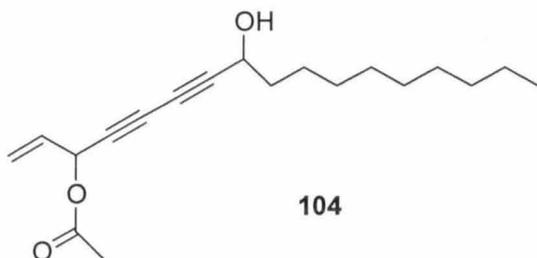
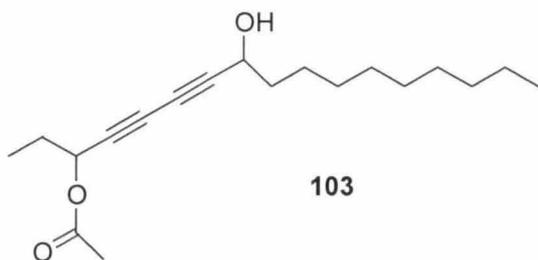


Por otro lado, el falcarinol es uno de los poliacetilenos más conocidos, también llamado “panaxynol” y considerado una fitoalexina, las cuales son sustancias que se biosintetizan en respuesta a daños externos, como el ataque de algún patógeno o por heridas, y están ausentes en tejidos normales de las plantas (Vivanco *et al.*, 2005). Es decir, en algunas especies estos compuestos no se encuentran de manera constitutiva, sino que son inducidos después de que han sido atacadas por hongos, tal como sucede en especies de las familias Fabaceae y Solanaceae. Así, por ejemplo, los tomates producen falcarindiol y falcarinol cuando son infectados por *Verticillium albo-atrum* (Elgersma *et al.*, 1984). Existen pocas fitoalexinas reportadas con actividad leishmanicida, entre las cuales se encuentra el resveratrol, el cual mostró actividad contra promastigotes de *L. major* ($CI_{50} = 45 \mu\text{g/mL}$). Resveratrol también mostró una reducción en el porcentaje de infección de macrófagos infectados con amastigotes de la misma especie, sin embargo a pesar de no presentar actividad tóxica en ratones (Kedzierski *et al.*, 2007), a dosis elevadas de este compuesto, (de 1,000 a 3,000 mg/kg peso al día) se observó un daño renal (Crowell *et al.*, 2004).

El compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (TPZ-25d1), obtenido del extracto hénanico (TPZ-2a) de *T. procumbens*, demostró una marcada actividad contra los promastigotes de *L. mexicana* LV4, presentando un $CI_{50} = 0.132 \mu\text{g/mL}$, el cual fue mejor que la anfotericina B con un $CI_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$, revelando esta última una mayor citotoxicidad contra las células MDCK y KB (Cuadro 11).

Son pocos los compuestos poliacetilénicos que han sido reportados con actividad antiparasitaria. Entre estos están el 8-hidroxiheptadeca-4,6-diyn-3-il-acetato (**103**), el 8-hidroxiheptadeca-1-eno-4,6-diyn-3-il-acetato (**104**) y el 16-acetoxi-11-hidroxiocetadeca-17-eno-12,14-diynyl-acetato (**105**), obtenidos de *Cussonia zimmermannii* (Araliaceae), que tienen una importante actividad

leishmanicida, tripanocida y antimalárica (Senn, *et al.*, 2007) (Cuadro 10).



Cuadro 10. Actividad antiparasitaria de los policétidos aislados de *Cussonia zimmermannii*.^a

Com- puesto	<i>T. brucei</i> <i>rhodensi</i>	<i>P.</i> <i>falciparum</i>	<i>T.</i> <i>cruzi</i>	<i>L.</i> <i>donovani</i> Cultivo axénico	<i>L. donovani</i> macrófagos infectados	Toxici- dad L-6
103	5.4 (18)	5.9 (19)	7.9 (26)	2.4 (7.8)	>3 (>10)	17 (54)
104	0.14 (0.46)	0.44 (1.4)	0.2 (0.65)	0.039 (0.13)	0.098 (0.32)	3.6 (12)
105	0.42 (1.1.)	0.84 (2.2)	0.15 (0.40)	0.054 (0.14)	0.85 (2.3)	22 (58)

^a Los resultados se reportan como CI_{50} en $\mu\text{g/mL}$. Los resultados en paréntesis se presentan en μM .

En el trabajo realizado por Senn y colaboradores (2007) se observó que el compuesto **103** fue el menos activo en todos los ensayos antiparasitarios realizados, mientras que el compuesto **104** mostró una importante actividad contra *T. cruzi* y *L. donovani* (tanto de manera axénica como en macrófagos infectados), con valores de CI_{50} de 0.2, 0.04 y 0.1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La citotoxicidad de este compuesto fue relativamente alta, por lo que se analizó el IS, mostrando valores de 18 y 37 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (*T. cruzi* y *L. donovani* en macrófagos infectados).

Se puede observar que los compuestos **103** y **104** sólo tienen de diferencia la presencia de un doble enlace, el cual al parecer desempeña un papel importante en la actividad, ya que ésta se incrementó notablemente contra los parásitos ($CI_{50} = 0.039 \mu\text{g/mL}$), aunque también se incrementó su citotoxicidad ($CI_{50} = 3.6 \mu\text{g/mL}$). Por otro lado, el metabolito **105**, que también presentó importante actividad contra *T. cruzi*, con un $CI_{50} = 0.15 \mu\text{g/mL}$, y contra *L. donovani* (axénica), con un $CI_{50} = 0.054 \mu\text{g/mL}$, presentó menor citotoxicidad $CI_{50} = 22 \mu\text{g/mL}$, pudiendo deberse a la presencia del grupo ácido, el cual podría hacerlo más selectivo.

El estudio de estos compuestos en el bioensayo contra amastigotes axénicos fue ventajoso, ya que las pruebas se realizaron con el parásito en la fase que se desarrolla dentro del huésped vertebrado; sin embargo, debido a que este parásito es intracelular, también fue necesaria la realización de estudios en amastigotes intracelulares,

demostrando que estos compuestos poliacetilénicos presentan actividad en ambos casos.

En lo que se refiere a la actividad citotóxica, TPZ-25d1 no presentó una importante contra las diferentes células evaluadas (Cuadro 11). La actividad tóxica de TPZ-25d1 contra células adherentes, resulto muy baja, siendo el IS = 3625, con respecto a las células adherentes, y IS = 1378, con respecto a las células no adherentes, y resulto menos tóxico contra las líneas celulares MDCK y KB, en comparación con la anfotericina B, lo que indica que TPZ-25d1 es responsable de la actividad leishmanicida (Cuadro 11).

Cuadro 11. Actividad biológica de TPZ-25d1. Los valores de CI_{50} están dados en $\mu\text{g/mL}$

Compuesto Fármaco	Promastigos de <i>L.</i> <i>mexicana</i> LV4	Células no adherentes	Células adherentes	MDCK	KB
TPZ-25d1	0.132	181.97	478.63	13.85	81.30
Pentamidina	NE	173.78	549.54	98.04	129.9
Anfotericina B	1	456.51	575.43	6.58	6.02

NE No evaluado $IS = IC_{50} \text{ células} / IC_{50} \text{ parásito}$

A pesar de que el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol mostró actividad importante contra los promastigotes de *L. mexicana* ($CI_{50} = 0.132 \mu\text{g/mL}$), es necesario el análisis en el bioensayo contra amastigotes intracelulares y la evaluación de la citotoxicidad en los macrófagos (Capítulo 4), para saber si aún se conserva la actividad leishmanicida.

3.4.1.3 Identificación de ácido palmítico (TPZ-26b1)

De la fracción TPZ-26b se obtuvo un polvo blanco, soluble en CH_2Cl_2 , el cual se le denominó TPZ-26b1. Una muestra de este polvo blanco se inyectó en el CG, obteniéndose un cromatograma que mostró un solo pico a $t_R = 6.4$ (Fig. 24).

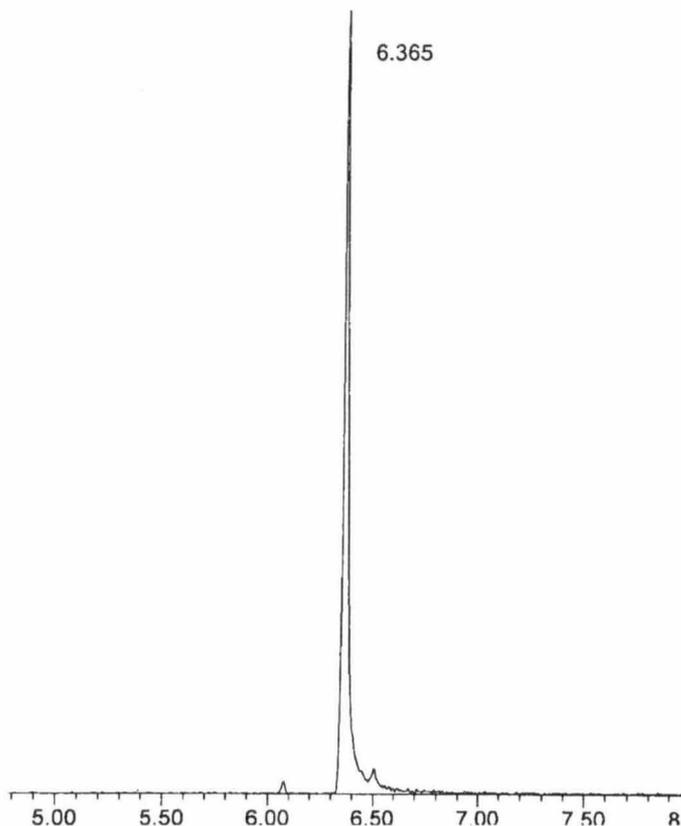


Figura 24. Cromatograma de gases de TPZ-26b1. Se observó un solo pico a $t_R = 6.4$

El compuesto TPZ-26b1 fue analizado mediante el cromatógrafo de gases acoplado a un detector másico. En el espectro de masas obtenido se observó un pico a m/z 256 correspondiente al ion molecular, una señal a m/z 60 debida a un fragmento formado por rearrreglo de McLafferty, una señal a m/z 73 debida al fragmento $(CH_2)_2COOH^+$ y los fragmentos a m/z 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143 y 129, generados por pérdidas sucesivas de grupos CH_2 de la cadena hidrocarbonada (Fig. 25). Una comparación del patrón de fragmentación de este compuesto con el obtenido de la base de datos del equipo permitió identificarlo como el ácido hexadecanoico o ácido palmítico, de fórmula molecular $C_{16}H_{32}O_2$ (**106**). El ácido

palmitico no presentó actividad contra los promastigotes de *L. mexicana*. Otros ácidos grasos reportados por Sartorelli y colaboradores (2007) tampoco mostraron actividad leishmanicida, sin embargo, existen reportes de que este tipo de metabolitos pueden presentar actividad leishmanicida como el ácido minquartinoico, el cual es un derivado de ácido graso, aislado de la corteza de *Minquartia guianensis*, el cual mostró una moderada actividad contra *L. major*, aunque esta actividad esta atribuida más a su citotoxicidad en general (Rasmussen *et al.*, 2000).

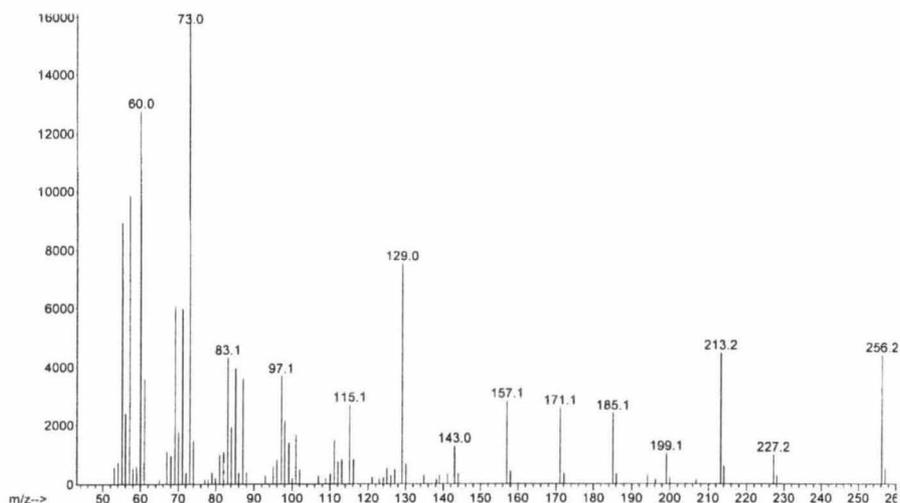
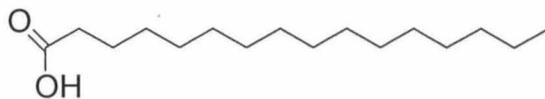
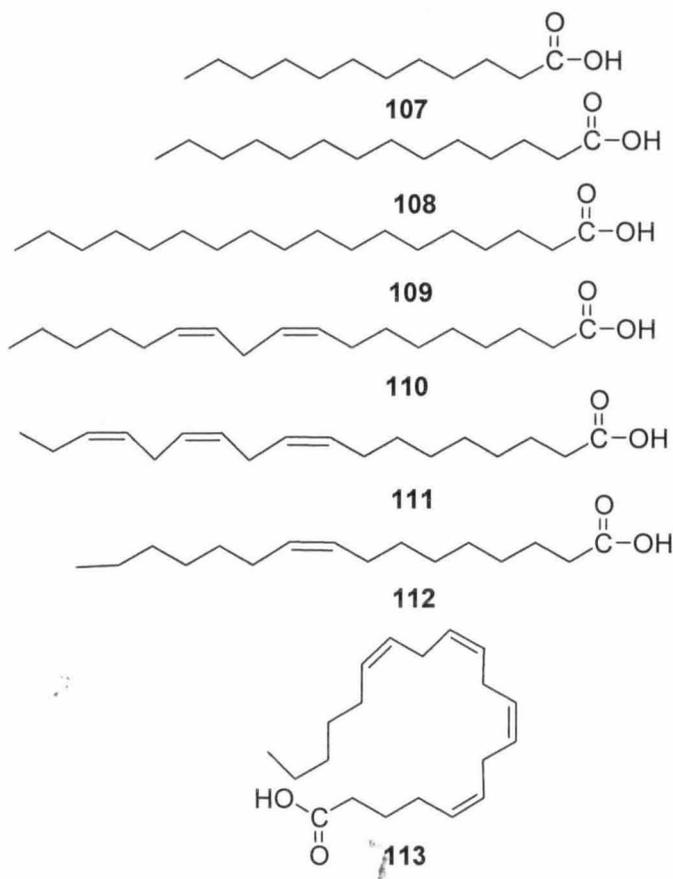


Figura 25. Patrón de fragmentación de TPZ-26b1. En el espectro de masas obtenido se observa un pico a m/z 256 correspondiente al ion molecular, una señal a m/z 60 debida a un fragmento formado por rearrreglo de McLafferty, una señal a m/z 73 debida al fragmento $(\text{CH}_2)_2\text{COOH}^+$ y los fragmentos a m/z 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143 y 129, generados por pérdidas sucesivas de grupos CH_2 de la cadena hidrocarbonada.



106

La presencia de ácido palmítico en *T. procumbens* ya había sido reportada (Novelo-Castilla, 2005), al igual que otros ácidos grasos, como el ácido laúrico (107), mirístico (108), esteárico (109), linoleico (110), linolénico (111), palmitoleico (112) y araquidónico (113) (Gadre & Gabhe, 1988).



3.5 CONCLUSIONES

Se obtuvieron de la fracción hexánica activa de *T. procumbens* tres metabolitos, el estigmasterol, el ácido palmítico y el (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, reportados previamente en la literatura, de los

cuales los dos primeros no presentaron actividad contra los promastigotes de *L. mexicana*, mientras que el dideshidrofalcarinol presentó una importante actividad leishmanicida. Este metabolito no presentó actividad citotóxica contra las diferentes células evaluadas (MDCK, KB y células CMSP).

Estos resultados permitieron continuar con la evaluación de dideshidrofalcarinol contra los amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, así como la evaluación de la actividad citotóxica contra los macrófagos derivados de médula ósea.

Parte de este capítulo fue publicado como Martín-Quintal *et al.*, *In vitro* activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. J. Ethnopharmacol. (2009), doi:10.1016/j.jep.2009.01.037

3.6 BIBLIOGRAFIA

- Akbar, E., Malik, A., Afza, N. and Hai, S.M.A. (2002) Flavone glycosides and bergenin derivatives from *Tridax procumbens*. *Heterocycles*, 57, 733-739.
- Anchel, M. (1952) Acetylenic compounds from fungi. *Journal of the American Chemical Society*, 74, 1588-1590.
- Berguer, I., Barrientos, A.C., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter C.M. and Kubelka, W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 107-115.
- Bernart, M.W., Cardellina, J.H., Balaschak, M.S., Alexander, M.R., Shoemaker, R.H. and Boyd, M.R. (1996) Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *Journal of Natural Products*, 59, 748-753.
- Bolhmann, F. and Zdero, C. (1972) Terpenes from higher plants. XIII Two new sesquiterpene lactones from *Lidbeckia pectinata* and *Pentzia elegans*. *Tetrahedron Letters*, 7, 621-624.
- Bolhmann, F. and Zdero, C. (1976) Polyacetylene compounds. Part 242. C17-Acetylene compounds from *Calea integrifolia*. *Phytochemistry*, 15, 1177.
- Bolhmann, F., Niedballa, U. and Rode, K.M. Polyacetylene compounds. CXVIII. (1966) New polyynes with a C17-chain. *Chemische Berichte*, 99, 3552-3558.
- Boll, P.M. and Hansen, L. (1987) On presence of falcarinol in *Araliaceae*. *Phytochemistry*, 26, 2955-2956.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I. and Maki, J. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Chan-Bacab, M.J. and Peña-Rodríguez, L.M. (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, 18, 674-688.
- Christensen, L.P. (1992) Acetylenes and related compounds in *Anthemideae*. *Phytochemistry*, 31, 7-49.
- Christensen, L.P. and Brandt, K. (2006) Bioactive polyacetylenes in food plants of the *Apiaceae* family: occurrence, bioactivity and

- analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 683-693.
- Christensen, L.P. and Lam, J. (1990) Acetylenes and related compounds in Cynareae. *Phytochemistry*, 29, 2753-2785.
- Christensen, L.P. and Lam, J. (1991) Acetylenes and related compounds in Heliantheae. *Phytochemistry*, 30, 11-49.
- Crowell, J.A., Korytko, P.J., Morrissey, R.L., Booth, T.D. and Levine BS (2004) Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological Sciences* 82, 614-619.
- Dembitsky, V.M. (2006) Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids. *Lipids*, 41, 883-924.
- Elgersma, D.M., Weijman, A.C.M., Roeymans, H.J., Van Eijk, G.W. (1984) Occurrence of faltarinol and faltarindiol in tomato plants after infection with *Verticillium albo-atrum* and characterization of four phytoalexins by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Phytopathologische Zeitschrift*, 109, 237-240.
- Gadre, A.P. and Gabhe, S.Y. (1988) Saturated and unsaturated fatty acids from *Tridax procumbens*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 168.
- Hansen, L. and Boll, P.M. (1986) Polyacetylenes in Araliaceae: their chemistry, biosynthesis and biological significance. *Phytochemistry*, 25, 285-293.
- Harada, R. and Iwasaki, M. (1982) Volatile components of *Artemisia capillaris*. *Phytochemistry*, 21, 2009-2012.
- Howe, G.A., and Schilmiller, A.L. (2002) Oxylin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 230-236.
- Kedzierski, L., Curtis, J.M. and Kaminska, M., Jodynys-Liebert, J. and Murias, M. (2007) In vitro antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. *Parasitology Research*, 102, 91-97.
- Novelo-Castilla, J.S. (2005) Oxilipina con actividad leishmanicida aislada de *Tridax procumbens* L. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, México.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R. and Mut-Martín, M. (2007) Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.

- Rasmussen, H.B., Chistensen, S.B., Kvist, L.P., Kharazmi, A. and Gonzales Huansi, A. (2000) Absolute configuration and antiprotozoal activity of minquartynoic acid. *Journal of Natural Products*, 63, 1295-1296.
- Rollinger, J.M., Zidorn, C.; Dobner, M.J., Ellmerer, E.P. and Stuppner, H. (2003) Lignans, phenylpropanoids and polyacetylenes from *Chaerophyllum aureum* L. (Apiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung*, 58, 553-557.
- Sahpaz, S., Bories, C., Loiseau, P.M., Cortés, D., Hocquemiller, R., Laurens, A. and Cavé, A. (1994) Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis*. *Planta Medica*, 60, 538-540.
- Sartorelli, P., Andrade, S.P., Melhem, M.S.C., Prado, F.O. and Tempone, A.G. (2007) Isolation of Antileishmanial sterol the fruits of *Cassia fistula* using bioguided fractionation. *Phytotherapy Research*, 21, 644-647.
- Senn, M., Gunzenhauser, S., Brun, R. and Séquin, U. (2007) Antiprotozoal polyacetylenes from Tanzanian medicinal plant *Cussonia zimmermannii*. *Journal of Natural Products*, 70, 1565-1569.
- Torres-Santos, E.C., Lopes, D., Rodrigues Oliveira, R., Carauta, J.P.P., Bandeira, C.A., Kaplan, M.A.C. and Rossi-Bergmann, B. (2004) Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*, 11, 114-120.
- Vivanco, J.M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V.M. and Flores, E.H. (2005) Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia (Febrero)*, 68-75.
- Waizel Bucal, J. and Waizel Haiat S. (2005) Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratorias Parte I. *Anales de Otorrinolaringología Mexicana*, 4, 76-87.
- Wen-Hao, C., Xing-Ming, M., Quan-Xiang, W. and Yan-Ping, S. (2008) Chemical-constituent diversity of *Tridax procumbens*. *Canadian Journal of Chemistry*, 86, 892-898.
- Wittstock, U., Hadaček, F., Wurz, G., Teuscher, E. and Greger, H. (1995) *Planta Medica*, 61, 439-445.

Capítulo 4

Efecto leishmanicida en amastigotes del (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol

4.1 INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los estudios dirigidos hacia la detección de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida han sido realizados utilizando la forma promastigote del parásito (Phillipson & Wright, 1991; Chan-Bacab & Peña-Rodriguez, 2001; Rocha *et al.*, 2005; Salem & Werbovets, 2006), la cual es fácil de mantener en condiciones *in vitro*, proporcionando una herramienta para la detección masiva de drogas leishmanicidas. Sin embargo, debido a que el promastigote es la forma infectante, esta prueba solamente tiene un valor indicativo de la posible actividad leishmanicida, en el hospedador vertebrado, de los metabolitos evaluados, por lo que la evaluación antes mencionada debe ser complementada con una prueba utilizando amastigotes, ya que estos se encuentran en vertebrados, estando este método más cercano al modelo *in vivo*, que el método que utiliza promastigotes. Al mismo tiempo, se debe evaluar la actividad citotóxica de los metabolitos en macrófagos no parasitados, con el fin de establecer si la actividad *in vitro* de los metabolitos evaluados se debe a su propiedad citotóxica en general, o estos poseen una actividad selectiva hacia los parásitos de *Leishmania* (Polonio & Efferth, 2008). El metabolito (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol obtenido de *T. procumbens* presentó actividad contra los promastigotes de *L. mexicana* LV4, por lo que este metabolito también podría presentar actividad contra los amastigotes intracelulares sin presentar actividad citotóxica contra los macrófagos.

En este capítulo se describe el efecto leishmanicida en amastigotes de los extractos y del compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol activos contra promastigotes obtenidos de *T. procumbens* así como la evaluación citotóxica de los mismos en los macrófagos y la producción de NO.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Animales

Ratones hembras BALB/c de 7 semanas de edad, proporcionado por el bioterio del CIR-UADY, fueron mantenidos en ciclo luz/oscuridad 12 h y con alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron manejados de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Institute of Laboratory Animal Resources, 1996).

4.2.2 Parásitos

Parásitos de *L. mexicana* LV4 (MNYC/B2/62/M379) fueron cultivados a 25 °C en medio TC199 (Gibco, cat. 12350-039) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin, 20 mM de piruvato de sodio, 10 mM de L-glutamina y 50 µM de 2-mercaptoetanol. Los promastigotes metacíclicos fueron lavados dos veces a 800 g por 10 min con medio RPMI-1640 simple (Gibco, cat. 22400-089). Los parásitos se contaron en cámara de Thoma y se ajustaron a 1×10^7 parásitos/mL.

4.2.3 Preparación de macrófagos derivados de médula ósea

Los macrófagos fueron obtenidos cultivando *in vitro* progenitores de médula ósea de ratón. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se les extrajo el fémur, se desechó el exceso de tejido en una caja de Petri utilizando medio RPMI-1640 y luego se cortaron ambas epífisis del fémur. Con 1 mL de medio RPMI-1640 en una jeringa de insulina se extrajo la médula ósea por perfusión, repitiéndose en varias ocasiones hasta observar limpio el fémur. Para determinar la viabilidad de las células obtenidas se usó la técnica de exclusión con azul de tripano en la cámara de Neubauer. Las células se cultivaron en caja de Petri de 90 mm (Sterilin) a una densidad de 5×10^6 células/10 mL de medio DMEM suplementado (Gibco, cat. 11965-092) al 20% de SFB y con penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 g/mL), piruvato de sodio (20 mM), 2-mercaptoetanol (50 µM) y L-glutamina (20 mM) y 15% del sobrenadante de cultivos de células L929 que contiene el factor

estimulante de colonias de macrófagos (CSF-M) a 37 °C en 5% de CO₂ por 6 días. Transcurrido este tiempo, se retiró este medio y las células no adheridas, y se les añadió medio DMEM fresco, sin el factor de crecimiento y se dejaron dos días a 37 °C en CO₂. Transcurrido este tiempo, las células fueron cosechadas enfriándolas a 4 °C en RPMI-1640 simple durante 1 h, retiradas de la placa mecánicamente con una jeringa de 10 mL y colectadas por centrifugación (10 min a 200 g, resuspendiéndose en 1 mL de RPMI-1640 suplementado). Las células se ajustaron a una densidad de 1×10^6 /mL y 100 μ L de la suspensión se sembraron en cada pozo contenidos en placas de 24 pozos. Se incubó 2 h a 37 °C en 5% de CO₂ con la finalidad de permitir la adherencia de las células.

4.2.4 Infección de macrófagos con promastigotes de *L. mexicana* y tratados posinfección con el extracto hexánico (TPZ-2a) o con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (TPZ-25d1).

Antes de la infección, los macrófagos se dejaron 1 h a 4 °C y se desprendieron mecánicamente con una jeringa de 10 mL. Lo colectado se centrifugó y las células se resuspendieron en 1 mL de RPMI-1640 con 10% de SFB. Las células viables se contaron con azul de tripano y se ajustaron a 1×10^6 células/mL RPMI-1640 con 10% de SFB (1×10^5 en portaobjeto de 13 mm de diámetro). Se añadieron 100 μ L/pozo y se dejaron adhiriendo por 2 h a 37 °C en CO₂.

Los promastigotes metacíclicos, obtenidos previo cultivo, fueron lavados dos veces a 800 g por 10 min con medio RPMI-1640 simple conteniendo antibióticos y suplementos: penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 g/mL), piruvato de sodio (20 mM), 2-mercaptoetanol (50 μ M) y L-glutamina (20 mM) y se resuspendieron en 1 mL de RPMI-1640 completo (con antibióticos, suplementos y con 20% de SFB). Después, se contaron en cámara de Thoma y se ajustaron a 3×10^7 parásitos/mL de RPMI-1640 con antibióticos, suplementos y 10% SFB, y de ahí se tomaron 100 μ L para cada pozo, resultando una relación de infección 30:1. Se incubaron 2 h a 37 °C y 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, los cultivos se lavaron con RPMI-1640 para eliminar los parásitos no endocitados y las células infectadas se trataron con seis diluciones diferentes de la oxilipina (10, 3, 1, 0.3, 0.1 y 0.03 μ M) y con cinco diluciones

diferentes del extracto hexánico de *T. procumbens* (30, 10, 3, 1, y 0.3 µg/mL) y como control se usaron células infectadas en RPMI-1640 suplementado (sin extracto o metabolito) y células infectadas en 0.5% de DMSO en RPMI-1640 suplementado (sin extracto o metabolito). El ensayo se realizó por triplicado.

Las células se dejaron incubando por 24, 48 y 72 h posinfección a 37 °C en 5% CO₂. Transcurrido cada tiempo los cultivos se lavaron con PBS y las placas se fijaron con metanol y se realizó la tinción con Giemsa (Merck). La proporción de los parásitos dentro de las células y el número de células infectadas se cuantificó microscópicamente contando un mínimo de 200 células/portaobjeto. Para la determinación del porcentaje de células infectadas, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células infectadas} = \left[\frac{\text{Células infectadas}}{\text{Células totales contadas}} \right] \times 100$$

4.2.5 Activación de macrófagos con el extracto hexánico o con (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol para la producción de NO

Macrófagos derivados de médula ósea (1×10^5) fueron sembrados en 100 µL de medio, en microplacas de 96 pozos e incubados a 37 °C, en 5% CO₂ durante 2 h para que se adhirieran. Transcurrido este tiempo, se les agregó el extracto hexánico de *T. procumbens* a cinco concentraciones diferentes, empezando con una concentración de 30 µg/mL y realizando cuatro diluciones seriadas 1:3 (30, 10, 1, 3, 0.3 µg/mL) o de la oxilipina, empezando con una concentración de 10 µM y realizando cinco diluciones seriadas 1:3 (10, 3, 1, 0.3, 0.1, 0.03 µM). Se usaron cinco controles: macrófagos incubados con 10 U/mL de IFN-γ; macrófagos incubados con 10 ng/mL de LPS; macrófagos incubados con 10 U/mL de IFN-γ y 10 ng/mL de LPS; macrófagos incubados con medio RPMI-1640 suplementado y 0.5% de DMSO; y macrófagos incubados sólo con medio RPMI-1640 suplementado. Se dejaron los macrófagos incubando 48 h a 37 °C en 5% de CO₂ y posteriormente se recolectó el sobrenadante y se determinó la producción de nitritos mediante el ensayo de Griess.

4.2.6 Bioensayo de citotoxicidad en macrófagos derivados de médula ósea

Para analizar el efecto tóxico de los extractos y del compuesto sobre los macrófagos derivados de médula ósea se llevó al cabo el método descrito por Mosmann (1983), que consiste en un ensayo colorimétrico empleando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), en el cual el MTT (líquido de color amarillo) es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales de células metabólicamente activas y lo transforman a cristales de formazán (azul oscuro). Los cristales de formazán se solubilizaron con un detergente iónico, el dodecilsulfato de sodio (SDS) y se determinó la cantidad de formazán en un fotocolorímetro expresada en densidad óptica (D.O.), siendo el número de células activas metabólicamente proporcional a la cantidad de formazán obtenido en el cultivo.

Los macrófagos se dejaron 1 h a 4 °C y luego se desprendieron mecánicamente con una jeringa de 10 mL. Se centrifugó lo colectado y las células se resuspendieron en 1 mL de RPMI-1640 con 10% de SFB. Las células viables se contaron con azul de tripano y ajustaron a 1×10^6 células/mL RPMI-1640 con 10% de SFB (1×10^5 /pozo). Se pusieron 100 μ L de suspensión/pozo en placas de 96 pozos y se dejaron adhiriendo durante 2 h a 37 °C en CO₂.

Transcurrido este tiempo, se les agregó ya sea el extracto hexánico de *T. procumbens* a una concentración inicial de 30 μ g/mL y realizando cuatro diluciones seriadas 1:3 (30, 10, 3, 1 y 0.3 μ g/mL), o la oxilipina a seis concentraciones, realizando diluciones seriadas 1:3 partiendo de 10 μ M (10, 3, 1, 0.3, 0.1 y 0.003 μ M), usando como control células en RPMI-1640 suplementado y células en 0.5% de DMSO en RPMI-1640 suplementado. El ensayo se realizó por triplicado.

Se dejaron incubando 48 h a 37 °C, en 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, se colectó el sobrenadante y se guardó a -20 °C. A las células se les añadió 10 μ L de MTT (10 mg/mL) en cada pozo y se incubaron por 4 h a 37 °C en 5% de CO₂. Posteriormente, se retiró el medio contenido en cada pozo, las células adheridas se lavaron con PBS y se añadieron 100 μ L de SDS al 20% en PBS (pH = 7.2, 0.15

M) a cada pozo, para la disolución de los cristales de formazán. La lectura de la placa se realizó en un lector de ELISA a una densidad óptica (DO) de 540 nm. La citotoxicidad se reportó como porcentaje de inhibición de crecimiento celular (% ICC) y se determinó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ ICC} = 100 - [(DO \text{ muestra} / DO \text{ control}) \times 100]$$

4.2.7 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron normalizados respecto a los del control negativo (medio RPMI-1640), siendo el control negativo, sin tratamiento, el 100% en el caso del porcentaje de infección celular. Partiendo de éste, se obtienen los demás porcentajes normalizados, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ normalizado de cels infec de X compuesto} = \left[\frac{\% \text{ cels infec de X compuesto}}{\% \text{ cel infec del control sin tx}} \right] \times 100$$

Los promedios de los grupos fueron comparados usando el análisis estadístico *t de student* para muestras independientes. También se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (para la comparación de medias de 3 o más grupos independientes) y el test de comparación Dunnet, para comparación de todos los grupos con el control negativo. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los datos se analizaron mediante el programa estadístico Graphpad Prism Software 4.

4.2.8 Ensayo antioxidante: Reducción del radical DPPH

Este ensayo es autográfico en CCD. Después de aplicar y eluir las muestras con una mezcla de disolventes apropiada, se empleó como agente revelador una solución al 0.2% de DPPH (hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en disolución metanólica. Las placas cromatográficas fueron calentadas con una pistola de aire, para visualizar los metabolitos presentes, y fueron examinadas 24 h después de haber sido reveladas. Los compuestos activos aparecieron de color amarillo en un fondo púrpura.

La solución de DPPH fue utilizada en fresco, en metanol y protegida de la luz. Como control de la actividad antioxidante se usó vitamina C (Sánchez-Medina *et al.*, 2001). Las pruebas se realizaron por duplicado para verificar los resultados.

4.2.9 Microscopía

Las fotografías digitales de las células tratadas y no tratadas, fijadas y montadas fueron obtenidas usando una cámara Samsung, modelo Digimax A50/CYBER 500, 5 megapixels, 3× optical zoom, 2.5 Power (Movie Clip) LTPS, LCD zoom 5.8-17.4 mm.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar el efecto del extracto héxanico de *T. procumbens* (TPZ-2a) sobre los macrófagos infectados con promastigotes metacíclicos de *L. mexicana* (LV4), se realizaron tratamientos posinfección con este extracto (30, 10, 3, 1 y 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24, 48 y 72 h. Como puede observarse en la figura 36, TPZ-2a presentó un efecto leishmanicida, con una disminución en el porcentaje de infección de tipo dosis-tiempo respuesta. Sin embargo, a concentraciones más bajas no se observó efecto. Después de 72 h, TPZ-2a aún presentó actividad en el porcentaje de inhibición, a concentraciones de 30, 10 y 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig. 26).

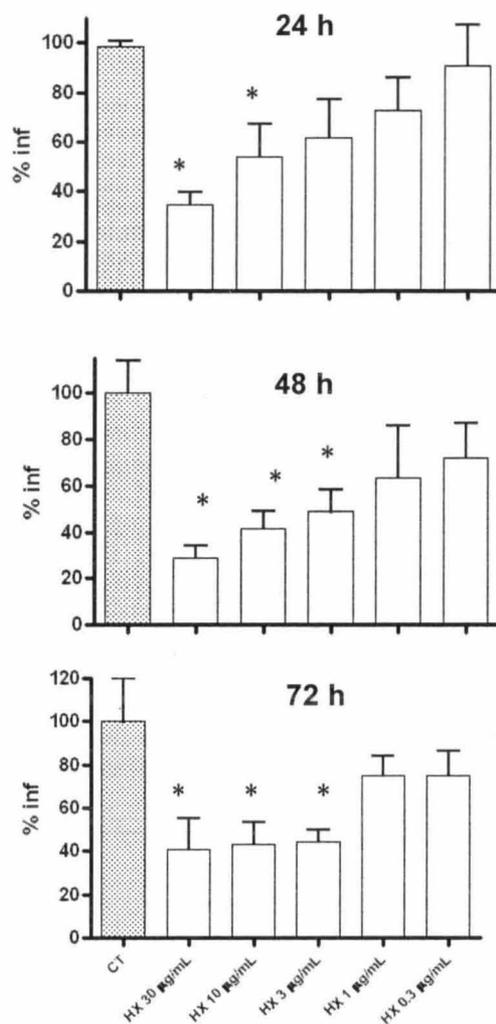


Figura 26. Porcentaje de infección (% inf) de macrófagos derivados de médula ósea con *L. mexicana*, tratados posinfección con TPZ-2a. Los macrófagos se infectaron con promastigotes de *L. mexicana* en una relación 30:1; posteriormente se lavaron y dejaron incubando con TPZ-25d1 posinfección en cinco concentraciones diferentes por 24, 48 y 72 h. CT) Control. Los valores son medias \pm D.E. de dos experimentos por triplicado. ANOVA ($p < 0.0001$) de una vía seguido de test de comparación múltiple de Dunnett. Las barras con * son estadísticamente diferentes al control (CT).

El NO forma parte de un proceso de producción de metabolitos tóxicos para los parásitos, producido por el macrófago. Diferentes extractos de plantas han demostrado este tipo de activación, como el extracto rico en polifenoles de *Cocos nucifera* L. (Mendonça-Filho *et al.*, 2004); los extractos de *Plantago major* (Tamez *et al.*, 2001); el extracto de ajo (Gamboa-León *et al.*, 2007); el aceite esencial rico en linalool de *Croton cajucara* (Rosa *et al.*, 2003); así como el aceite esencial rico en eugenol extraído de *Ocimum gratissimum* (Ueda-Nakamura *et al.*, 2006). La actividad leishmanicida que se encontró en TPZ-2a podría ser debida a la activación del macrófago para inducir la producción de NO.

Sin embargo, el extracto hexánico de *T. procumbens* (TPZ-2a) no indujo la producción de NO, sino que se observó inhibición de ésta (Fig. 27). Así como existen compuestos que activan la producción de NO, así también hay compuestos que inhiben esta producción. En la literatura hay reportes de extractos de plantas que inhiben esta producción, como las reportadas en la medicina tradicional de Mali (Ahua *et al.*, 2007) y los extractos obtenidos de plantas de Brasil (Napolitano *et al.*, 2005). Resultados similares se han observado con una fracción obtenida de *Tabernaemontana catharinensis* (Costa Soares *et al.*, 2007). La inhibición observada de NO puede deberse a que *T. procumbens* tiene compuestos que poseen actividad antioxidante (Nia *et al.*, 2003). Esto se corroboró al observar actividad antioxidante en este ensayo de los diferentes extractos de *T. procumbens*, en comparación con el control vitamina C (Fig. 28).

Así, el extracto metanólico presentó actividad antioxidante comparada con el control; el extracto hexánico mostró en placa diferentes compuestos con actividad antioxidante; y el extracto de acetato de etilo fue el que presentó una mayor actividad, lo cual puede deberse a la presencia de los flavonoides, ya que estos metabolitos presentan importante actividad antioxidante (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Este tipo de metabolitos ha sido reportado en *T. procumbens* (Yadava & Saurabh, 1998; Ali *et al.*, 2001).

Al no haber inducción de la producción de NO por los macrófagos, la actividad encontrada en el extracto TPZ-2a podría ser debida a la acción directa de este a los parásitos.

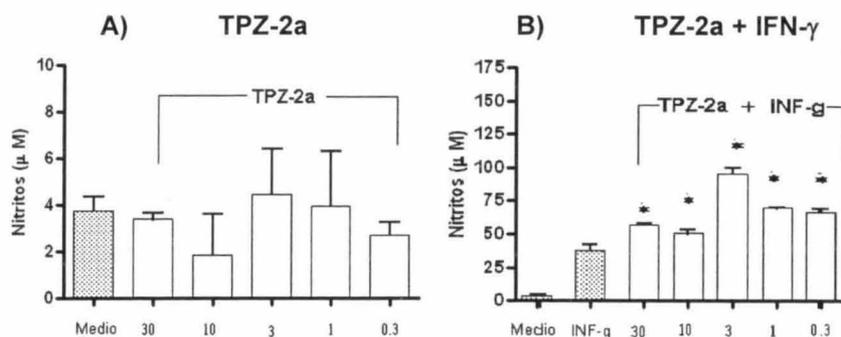


Figura 27. Producción de óxido nítrico por macrófagos derivados de médula ósea activados, con diferentes concentraciones de los extractos solos o en presencia de IFN- γ . Los macrófagos fueron tratados con TPZ-2a en presencia o ausencia de IFN- γ ; posteriormente se determinó la cantidad de nitritos por el ensayo de Griess. **A)** Producción de óxido nítrico por macrófagos derivados de médula ósea incubados con TPZ-2a, durante 48 h. **B)** Producción de óxido nítrico por macrófagos derivados de médula ósea incubados durante 48 h con TPZ-2a + IFN- γ . Los datos graficados representan el promedio de producción de nitritos \pm D.E. de un experimento por triplicado. El asterico indica que son estadísticamente diferentes. Los valores estan dados en $\mu\text{g/mL}$.

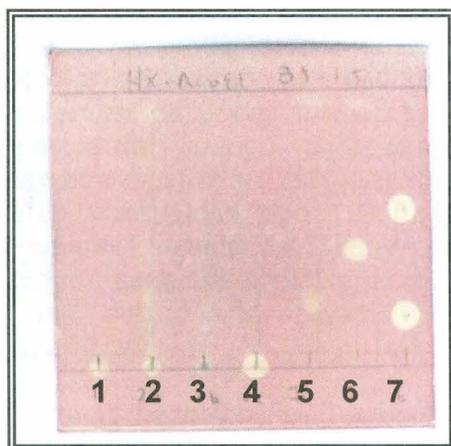


Figura 28. Actividad antioxidante de los extractos de *T. procumbens* y la oxilipina. Muestras eluidas en el sistema Hx-AcOEt (85:15) y reveladas con DPPH, donde el carril 1 representa el extracto metanólico; carril 2, extracto hexánico, activo; carril 3, extracto diclorometánico, con poca actividad; carril 4, extracto de acetato de etilo, mostrando una fuerte actividad antioxidante; carril 5, estigmasterol, con moderada actividad; carril 6, oxilipina, con una actividad antioxidante bastante importante comparada con el control; carril 7, vitamina C como control positivo. La actividad aparece como manchas amarillo-blancuzcas contra un fondo púrpura.

Diferentes estudios han mostrado que extractos de diferentes especies de plantas han presentado actividad leishmanicida. Extractos de plantas Bolivianas y de plantas Colombianas usadas para el tratamiento de la leishmaniosis en la medicina tradicional de esos países, han mostrado importante actividad leishmanicida (Fournet *et al.*, 1994 y Weninger *et al.*, 2001). La actividad leishmanicida encontrada en este estudio del extracto TPZ-2a, refuerza el uso de esta planta en la medicina tradicional maya, para el tratamiento de la leishmaniosis (Cáceres *et al.*, 1998 y Berguer *et al.*, 1998).

Sin embargo, en otros reportes, la actividad leishmanicida encontrada en los extractos de plantas es debida principalmente a la alta citotoxicidad encontrada en las células de mamíferos, más que a la actividad contra el parásito (Camacho *et al.*, 2003), por lo que es

necesaria la realización de estudios citotóxicos para descartar este efecto, en los extractos.

Se evaluó la fracción hexánica de TPZ-2a obtenido de *T. procumbens*. Este extracto no presentó actividad citotóxica a concentraciones de 30 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 29). Esto podría deberse a una saturación en el sistema biológico de la *Leishmania*, por lo que a concentraciones mayores no existe efecto tóxico, sino más bien un efecto proliferativo, estimulando la división celular de los macrófagos; sin embargo, este efecto no es significativo. Los porcentajes de inhibición de crecimiento en el número de macrófagos a las concentraciones empleadas no fueron estadísticamente diferentes respecto al control.

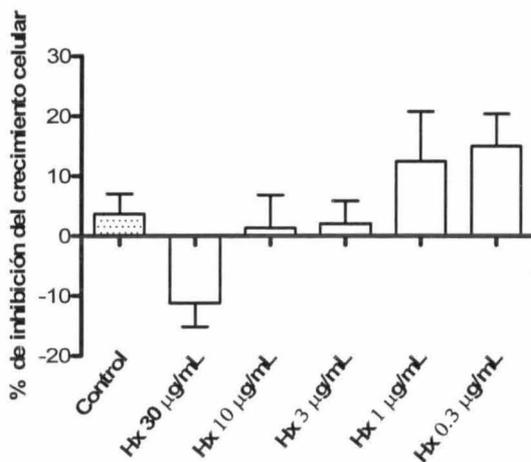


Figura 29. La inhibición del crecimiento celular de macrófagos derivados de médula ósea se determinó por el método de MTT. Las células fueron tratadas con TPZ-2a a diferentes concentraciones por 48 h. No existe diferencia estadística de los tratamientos con respecto al control.

Estos resultados demuestran la actividad dosis-dependiente de TPZ-2a, ya que a dosis mayores provocó una disminución del porcentaje de infección de los macrófagos por promastigotes, mientras que a dosis menores la infección no disminuyó, además no se observaron

efectos citotóxicos contra los macrófagos a las concentraciones utilizadas (Fig. 26 y 29).

En la Figura 30 se observa el efecto del tratamiento a macrófagos infectados con amastigotes con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TPZ-2a. Claramente se puede ver una disminución en el número de amastigotes internalizados en las vacuolas fagocíticas.

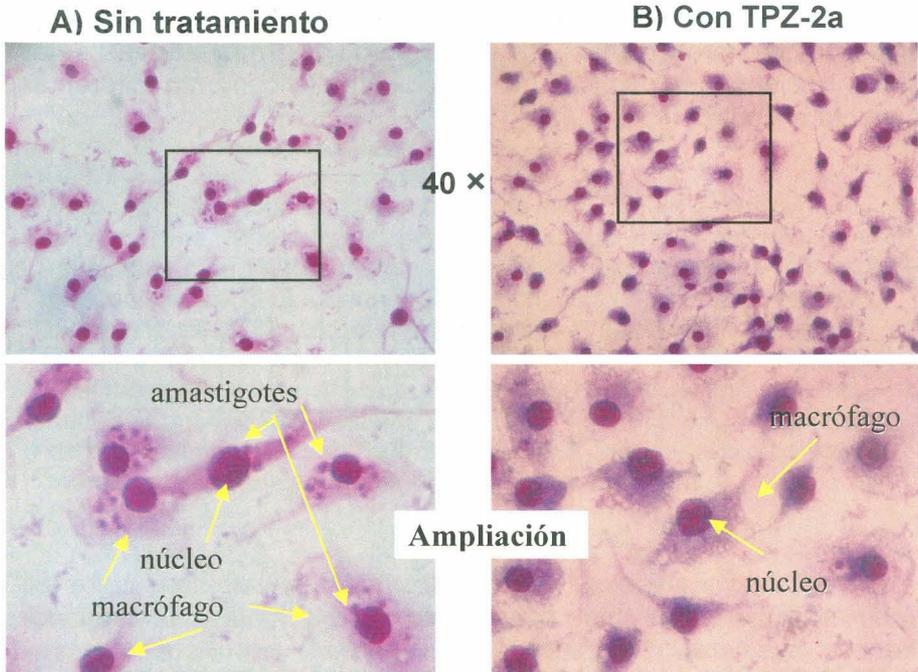


Figura 30. Macrófagos derivados de médula ósea infectados con amastigotes de *L. mexicana* LV4 y teñidos con Giemsa. **A)** Cultivo control, sin tratamiento, se pueden observar los amastigotes en el interior de los macrófagos; **B)** Cultivo infectado con amastigotes, tratado con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TPZ-2a.

Al observarse que el extracto hexánico disminuyó el porcentaje de infección de los macrófagos, se decidió analizar la actividad de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (TPZ-25d1) en amastigotes intracelulares. Esta oxilipina fue aislada del extracto hexánico,

demostrando este metabolito una actividad con una $CI_{50} = 0.132 \mu\text{g/mL}$ en el bioensayo de inhibición de crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana* LV4.

Así, los resultados de este bioensayo mostraron una disminución en el porcentaje de infección de macrófagos tratados con la oxilipina TPZ-25d1, tipo dosis dependiente, a las concentraciones de 0.3, 1 y 3 μM . Esta actividad permanece aun después de 72 h (Fig. 31). Estos resultados fueron muy similares a los resultados obtenidos con la anfotericina B, la cual presentó disminución en el porcentaje de macrófagos infectados a las concentraciones de 0.25, 0.5 y 0.75 μM , observándose que la actividad también permanece después de 72 h.

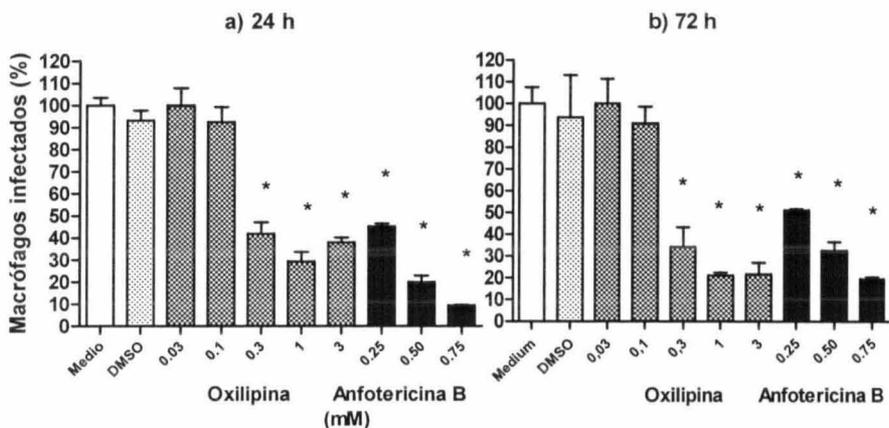


Figura 31. Efecto de la oxilipina TPZ-25d1 y la anfotericina B contra los amastigotes intracelulares. Los macrófagos fueron infectados con promastigotes de *L. mexicana* LV4, tratados a diferentes concentraciones de la oxilipina e incubados a) 24 y b) 72 h. El porcentaje de macrófagos fue calculado. Los datos son las medias y el error estándar ($n = 3$). El asterisco indica que hay diferencia significativa entre el control (medio) y el tratamiento ($*P < 0.05$).

Los resultados indicaron una importante disminución en el porcentaje de infección a las concentraciones de 0.3, 1 y 3 μM de la oxilipina, tanto a las 24 como a las 72 h (Fig. 31) comparable al control anfotericina B. Sin embargo, a concentraciones menores TPZ-25d1

no presentó diferencia en el porcentaje de infección de los tratamientos y los controles (medio y DMSO).

Se puede observar que el disolvente utilizado (DMSO) no influyó en el porcentaje de inhibición, ya que los resultados son comparables a los obtenidos con el medio sin oxilipina. A bajas concentraciones de la oxilipina ya no se observó el efecto inhibitorio, siendo la actividad de tipo dosis-tiempo respuesta. Este tipo de respuesta también se ha observado en el compuesto nerolidol, aunque las concentraciones utilizadas fueron muy superiores a las utilizadas en este estudio (50, 75 y 100 μM), reportándose un 95% de reducción de macrófagos infectados con *L. amazonensis*, a 100 μM . Las concentraciones citotóxicas del 50% fueron de 126 y de 135 μM , contra macrófagos J774.A1 y contra células fibroblásticas humanas, al ser tratadas con nerolidol (Arruda *et al.*, 2005).

En la figura 32 se muestra una micrografía de los macrófagos infectados, tratados con la oxilipina en comparación con los no tratados. En ella se puede notar la disminución en la infección ocasionada por el tratamiento con la oxilipina.

A) Macrófagos tratados con oxilipina (3 μM) B) No tratados.

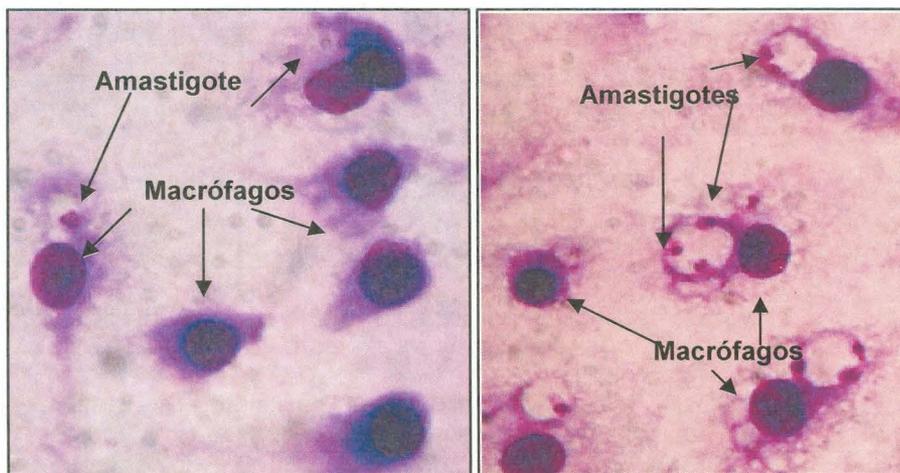
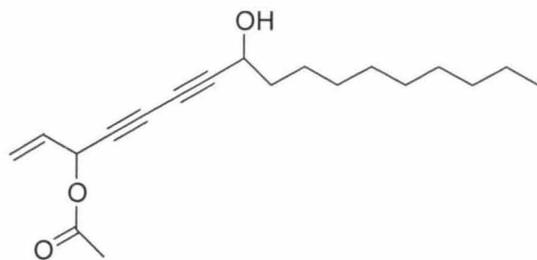
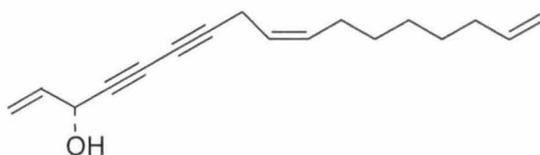


Figura 32. Macrófagos infectados con *L. mexicana*. Los macrófagos fueron obtenidos e infectados con *L. mexicana* como se describe en la sección de Materiales y Métodos. (A) Células tratadas con oxilipina; (B) células no tratadas. La fotografía digital fue obtenida con células fijadas como se describe en el texto. Magnificación 100 \times .

El único reporte de compuestos poliacetilénicos tipo falcarinol con actividad leishmanicida es el de Senn y colaboradores (2007), donde el compuesto 8-hidroxihéptadeca-1-eno-4,6-diyn-3-il-acetato presentó una importante actividad contra amastigotes intracelulares con $\text{CI}_{50} = 0.32 \mu\text{M}$ a las 96 h, comparable a los valores de CI_{50} de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, que fueron de $0.49 \mu\text{M}$, a las 24 h, y de $0.23 \mu\text{M}$ a las 72 h de incubación.



8-hidroxiheptadeca-1-eno-4,6-diyn-3-il-acetato



(3S)-16,17-dideshidrofalcarinol

El efecto citotóxico de la oxilipina TPZ-25d1 contra los macrófagos solamente se observó a concentraciones mayores de 10 μM , mientras que a concentraciones menores se observó un efecto mitogénico, ya que hay estimulación en el crecimiento del macrófago. Las células tratadas con 10 μM de oxilipina se observaron dañadas (figura no mostrada). Sin embargo, se observó a concentraciones menores una disminución en el número de macrófagos infectados con parásitos (Figs. 31 y 32)

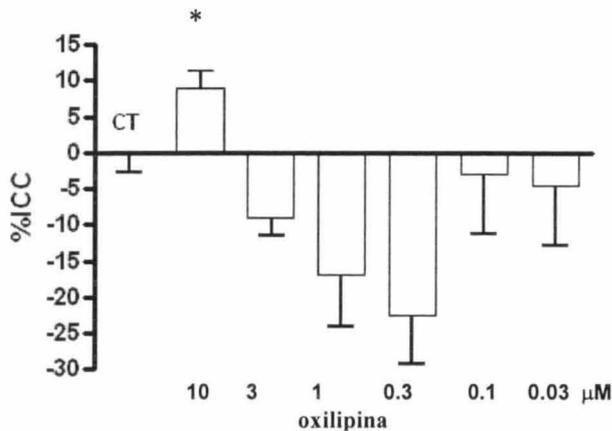


Figura 33. Inhibición del crecimiento celular (%ICC) de macrófagos derivados de médula ósea. Las células fueron tratadas con TPZ-25d1 con diferentes concentraciones por 48 h. El asterisco indica diferencia significativa entre el control (CT) y los macrófagos tratados con oxilipina a la concentración de 10 μM (prueba de *t de student*, $p < 0.05$). La inhibición se determinó por MTT.

Asimismo, en el bioensayo se pudo observar que con diferentes concentraciones de TPZ-25d1 no aumentó la producción de óxido nítrico por macrófagos derivados de médula ósea activados, sino al contrario, la oxilipina provocó una reducción del mismo, sin importar la presencia del activador $\text{INF-}\gamma$. (Fig. 34). Otros poliacetilenos como el falcarinol y el falcarindiol también mostraron ser inhibidores de la producción de NO por los macrófagos peritoneales de ratón (Yoshikawa *et al.*, 2006). Al igual que lo ocurrido con el extracto hexánico, esto podría deberse a la actividad antioxidante que presentó este compuesto (Fig 28).

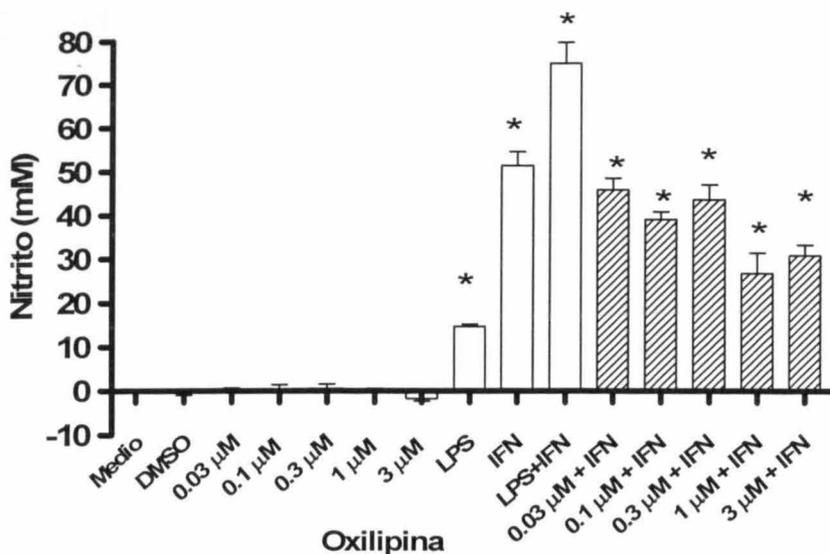


Figura 34. Efecto de diferentes concentraciones de la oxilipina en la producción de NO por los macrófagos. Los macrófagos fueron cultivados por 48 h en presencia de diferentes concentraciones de la oxilipina e IFN- γ . La producción de NO en el supernadante celular fue determinada por la reacción de Griess. LPS = Lipopolisacárido. Los datos son las medias y el error estándar ($n = 3$). Los resultados fueron significativos con $*P < 0.05$. Control negativo: sulfóxido de dimetilo (DMSO).

4.4 CONCLUSIONES

Se observó que tanto el extracto héxanico (TPZ-2a) y el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, obtenidos de *T. procumbens*, disminuyeron el porcentaje de macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, ambos tratamientos fueron independientes de la activación del macrófago para la producción de NO, ya que no hubo producción del mismo, sino hubo una reducción. Además, no se observaron efectos citotóxicos contra los macrófagos a las concentraciones leishmanicidas. Es posible que el efecto principal de la actividad leishmanicida de este compuesto sea la acción directa a los amastigotes, tal como la acción inhibitoria contra promastigotes, sin embargo es necesaria la realización de otras

pruebas, como la observación de los mismos en el microscopio electrónico para observar si se presentan daños a nivel celular, específicamente en la membrana o en algún organelo. Debido a que sólo existe un reporte previo de poliacetilenos con actividad leishmanicida (Senn *et al.*, 2007), estos metabolitos representan un nuevo tipo de estructuras activas contra *Leishmania*.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

- Ahua, K.M., Ioset, J.R., Ndjoko Ioset, K., Diallo, D., Mauël, J. and Hostettmann, K. (2007) Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 99-104.
- Ali, M., Ravinder, E. and Ramachandran, R. (2001) A new flavonoid from the aerial parts of *Tridax procumbens*. *Fitoterapia*, 72, 313-315.
- Arruda, D.C., D'Alexandri, F.L., Katzin, A.M. and Uliana, R.B.S. (2005) Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1679-1687.
- Berguer, I., Barrientos, A.C., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Passreiter C.M. and Kubelka, W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 107-115.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I. and Maki, J. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Camacho, M.d.R., Phillipson, J.D.; Croft, S.L., Solis, P.N., Marshall, S.J. and Ghazanfar, S.A. (2003). Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 185-191.
- Chan-Bacab, M.J. and Peña-Rodríguez, L.M. (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, 18, 674-688.
- Costa Soares, D., Pereira, C.G., Meireles, M.A.A and Saraiva, E.M. (2007) Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. *Parasitology International*, 56, 135-139.
- Fournet, A., Barrios, A.A. and Muñoz, V. (1994) Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 41, 19-37.
- Gamboa-León, M.R., Aranda-González, I., Mut-Martín, M., García-Miss, M.R. and Dumonteil, E. (2007) *In vivo* and *in vitro* control

- of *Leishmania mexicana* due to garlic-induced NO production. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66, 508-514.
- Institute of Laboratory Animal Resources. (1996) *Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio*. Academy press: Washington D.C.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M. and Muñón, M.J. (2002) Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6, 271-278.
- Mendonça-Filho, R.R., Rodrigues, I.A., Alviano, D.S., Santos, A.L.S., Soares, R.M.A., Alviano, C.S., Lopes, A.H.C.S. and Rosa, M.S. (2004) Leishmanicidal activity of polyphenolic-rich extract from husk fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). *Research in Microbiology*, 155, 136-143.
- Napolitano, D.R., Mineo, J.R., De Souza, M.A., De Paula, J.E., Espindola, L.S. and Espindola, F.S. (2005) Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 37-41.
- Nia, R., Paper, D.H., Essien, E.E., Oladimeji, O.H., Iyadi, K.C., and Franz, G. (2003) Investigation into *in vitro* radical scavenging and *in vivo* anti-inflammatory potential of *Tridax procumbens*. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, 18, 39-43.
- Phillipson, J.D. and Wright, C.W. (1991) Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Medica*, 57, 53-59.
- Polonio, T. and Efferth, T. (2008) Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review), *International Journal of Molecular Medicine*, 22, 277-286.
- Rocha; L.G., Almeida, J.R.G.S., Macedo, R.O. and Barbosa-Filho, J.M. (2005) A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12, 514-535.
- Rosa, M.S.S., Mendonça-Filho, R.R., Bizzo, H.R., De Almeida Rodrigues, I., Soares, R.M.A., Souto-Pradón, T., Sales Alviano, C. and Lopes, A.H.C.S. (2003) Antileishmanial activity of a linalool-rich-essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1895-1901.
- Salem, M.M. and Werbovetz, K.A. (2006) Natural products from plants as drugs candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 2571-2598.

- Sánchez-Medina, A., García-Sosa, K., May-Pat, F., and Peña-Rodríguez, L.M. (2001) Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan traditional medicine. Part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 8, 144-151.
- Senn, M., Gunzenhauser, S., Brun, R. and Séquin, U. (2007) Antiprotozoal polyacetylenes from Tanzanian medicinal plant *Cussonia zimmermannii*. *Journal of Natural Products*, 70, 1565-1569.
- Tamez, G.R.S., Rodríguez, P.C., Tamez, G.P., Weber, R.J., Gómez, F.R. and Calderón, C.L. (2001) Activación de macrófagos y linfocitos *in vitro* por extractos metanólicos de hojas de *Plantago major*. *Ciencia UANL*, 4, 304-313.
- Ueda-Nakamura, T., Mendonça-Filho, R.R., Morgado-Díaz, J.A., Korehisa Maza, P., Prado Dias Filho, B., Garcia Cortez, D.A., Sales Alviano, D., Rosa, M.S.S., Lopes, A.H.C.S., Sales Alviano, C. and Vataru Nakamura, C. (2006) Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International*, 55, 99-105.
- Weninger, B., Robledo, S., Arango, G.J., Deharo, E., Aragon, R., Muñoz, V., Callapa, J., Lobstein, A. and Anton, R. (2001) Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 78, 193-200.
- Yadava, R.N. and Saurabh, K. (1998) A new flavone glycoside: 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxyflavone-5-O- α -L-rhamnopyranoside from the leaves of *Tridax procumbens* L. *Journal of Asian Natural Products Research*, 1, 147-152.
- Yoshikawa, M., Nishida, N., Ninomiya, K., Ohgushi, T., Kubo, M., Morikawa, T. and Matsuda, H. (2006) Inhibitory effects of coumarin and acetylene constituents from the roots of *Angelica furcijuga* on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice and on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated mouse peritoneal macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 456-463.

Capítulo 5

Diferentes actividades antiprotozoarias de *Tridax procumbens*

5.1 INTRODUCCIÓN

Los extractos y el compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol obtenidos de *T. procumbens* mostraron actividad leishmanicida importante, tanto contra los promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, sin presentar actividad citotóxica a las concentraciones leishmanicidas. Reportes de metabolitos que han presentado actividad leishmanicida también han presentado actividad contra otros protozoarios (Muhammad *et al.*, 2003; Salem & Werbovetz, 2005; 2006; Shima *et al.*, 2005 y Senn *et al.*, 2007). *T. procumbens* es utilizada en la medicina tradicional maya para el tratamiento contra diferentes protozoarios, ya sea aplicada de manera oral o localmente (Cáceres *et al.*, 1998 y Berguer *et al.*, 1998).

Peraza-Sánchez y colaboradores (2005; 2007) reportaron que el extracto metanólico de *T. procumbens* presentaba importantes actividades contra *L. mexicana* y contra *Giardia lamblia*, agente causante de una enfermedad gastrointestinal conocida como giardiasis. Por otro lado, Cáceres (1998) y Berger (1998) reportaron que *T. procumbens* presentaba actividad contra *T. cruzi*, agente causal del mal de Chagas.

Los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* pertenecen a la familia Trypanosomatidae, por lo que es posible que ambos compartan ciertos sitios de acción en común (Bringaud *et al.*, 2006; Nowicki & Cazzulo, 2007), por lo cual un extracto o compuesto que sea activo contra un género, es probable que también lo sea contra el otro. Weniger y colaboradores en 2001 reportaron plantas colombianas con estas actividades. Se ha reportado que la diospirina y sus derivados presentan importante actividad contra ambos géneros (Yardley *et al.*, 1996) y también ciertas chalconas sintetizadas han presentado resultados similares (Lunardi *et al.*, 2003). Por lo anterior, se decidió evaluar los extractos y el metabolito TPZ-25d1 aislado de

T. procumbens (activos contra *L. mexicana*) contra los epimastigotes de *T. cruzi*.

Al mismo tiempo, con base en reportes previos sobre la actividad giardicida del extracto metanólico de *T. procumbens* se decidió evaluar este extracto, sus fracciones y los metabolitos puros obtenidos en el bioensayo de inhibición de crecimiento contra los trofozoítos de *G. lamblia*, *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*, ya que son organismos amitocodriales y podrían compatir la misma actividad.

Se sabe que existe variabilidad y, por lo mismo, susceptibilidad entre diferentes cepas, por lo que se decidió analizar también si los extractos y la oxilipina conservan actividad antiprotozoaria contra cepas de *L. mexicana* diferentes a LV4. Asimismo, los extractos activos se probaron contra diferentes especies de *Leishmania*, para observar la variabilidad de la actividad entre ellas.

Todo esto fue realizado para saber si los extractos y el compuesto activo de *T. procumbens* contra *L. mexicana* LV4, podrían tambien presentar actividad contra diferentes especies de *Leishmania* y contra otros parásitos.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Este bioensayo se realizó basándose en los métodos reportados por Muñoz *et al.* (1994) e Inchausti *et al.* (1997). Los promastigotes de *Leishmania mexicana* (cepa MHOM/MX/841SETGS) fueron cultivados a 28 °C en medio Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma), penicilina (100 UI/mL), estreptomocina (100 µg/mL), CaCl₂ (0.6 mg/mL) y NaHCO₃ (0.4 mg/mL). Los extractos y/o fracciones evaluadas se disolvieron en DMSO y se diluyeron con medio líquido a una concentración de 400 µg/mL. Los parásitos en fase de crecimiento logarítmico fueron distribuidos en microplacas de 96 pozos (Costar) a concentraciones de 1×10^4 parásitos/100 µL y combinados con 100 µL de la solución del extracto o fracción a evaluar. Las evaluaciones se realizaron por

triplicado a concentraciones de 200, 100 y 50 µg/mL. Como control positivo se utilizó pentamidina en una concentración de 20 µg/mL; como control negativo, parásitos sin la aplicación del extracto; y como blanco, parásitos en medio de cultivo con DMSO al 0.5%. Las placas se incubaron a 28 °C por 72 h y la actividad de las muestras evaluadas se determinó por observación directa del pozo en un microscopio de fase invertida. La medición cualitativa de la actividad se realizó de la siguiente manera:

0	parásitos con movimiento igual al control
+	parásitos móviles y algunos muertos
++	parásitos con ligero movimiento, la mayoría inmóviles
+++	todos los parásitos muertos, actividad igual a la pentamidina

A aquellos extractos y compuestos que presentaron actividad se les obtuvo sus CI_{50} por medio del análisis Probit.

5.2.2 Inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*

La inhibición de crecimiento de los epimastigotes fue realizada siguiendo una modificación del método descrito por Hocquemiller y colaboradores (1991). Los epimastigotes de *T. cruzi* (MHOM/MX/1994/INC5) fueron cultivados a 26 °C en medio Schneider's drosophila (Sigma), suplementado con 10% de SBF (Gibco), penicilina (100 IU/mL; Sigma) y estreptomycin (100 µg/mL; Sigma). Los bioensayos fueron realizados en placas de 96 pozos y todos los extractos y compuestos fueron evaluados por duplicado. Los compuestos fueron solubilizados en DMSO (Omnisolv) y diluidos con medio líquido. Se mezclaron 100 µL de una disolución de los extractos o de los compuestos y de 100 µL de medio de cultivo conteniendo 20,000 parásitos. Se obtuvieron concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL y como control positivo se utilizó Nifurtimox. Un control, conteniendo sólo parásitos, y otro, con DMSO fueron también incluidos. Los pozos fueron incubados a 26 °C durante 72 h y la actividad tripanocida de los extractos y compuestos fue determinada por conteo directo de los parásitos en una cámara de Neubauer. El CI_{50} fue determinado usando el análisis Probit.

5.2.3 Ensayo de viabilidad celular de *L. major*, *L. aethiopica* y *L. tropica* con MTS

Este bioensayo fue realizado por el método reportado por Ganguly *et al.* (2006), optimizado para tres líneas de *Leishmania* [*L. tropica* (OD, MHOM/SU/58/OD), *L. aethiopica* (L100 NHOM/ET/72/L11) y *L. major* (5ASKH, MHOM/SU/73/5ASKH)] (Getti *et al.*, 2008).

5.2.4 Inhibición del crecimiento de trofozoítos de *Giardia lamblia*

El bioensayo *in vitro* de susceptibilidad de *Giardia lamblia* fue realizado siguiendo la metodología descrita por Cedillo *et al.* (1992).

Se utilizó el microorganismo *G. lamblia*, cepa IMSS:0696:1 en fase logarítmica de crecimiento. El extracto fue disuelto en DMSO. Se realizaron alícuotas con las muestras a concentraciones de 2.5, 25, 50, 100, 150 y 200 µg/mL, se transfirieron a seis tubos para microcentrifuga de 1.5 mL c/u, se adicionó a cada tubo el medio de cultivo Diamond TYI-S-33 modificado por Keyster para *G. lamblia* y el inóculo de 75,000 trofozoítos de *G. lamblia* y los tubos se incubaron por 48 h a 37 °C. Pasado este tiempo, se tomó una alícuota de 50 µL de cada tubo, se inoculó en un nuevo tubo con medio fresco, ya sin extracto, y se incubó por otras 48 h, al cabo de las cuales se determinó la cuenta total de trofozoítos de cada tubo en una cámara de Neubauer. Como controles negativos se emplearon trofozoítos incubados únicamente con DMSO. Se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento de los trofozoítos, comparándolos con los controles y se determinaron las concentraciones inhibitorias del 50% (CI₅₀) por medio de un análisis Probit.

5.2.5 Inhibición del crecimiento de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*

5.2.5.1 Parásitos

Trichomonas vaginalis cepa GT3 fue usada en todos los experimentos. Los trofozoítos de *T. vaginalis* fueron mantenidos en

medio TYI-S-33 suplementado con SBF al 10%. Para los bioensayos, los trofozoítos fueron mantenidos axénicamente y empleados en la fase logarítmica de crecimiento.

5.2.5.2 Bioensayo *in vitro* de susceptibilidad

Este bioensayo fue realizado usando subcultivos del método descrito previamente por Cedillo-Rivera *et al.*, 2002. Los extractos fueron disueltos en 1 mL de DMSO y fueron adicionados en microtubos conteniendo 1.5 mL de medio; las concentraciones utilizadas fueron de 1.6, 3.3, 6.6 y 13.3 $\mu\text{g/mL}$. Las disoluciones se prepararon con trofozoítos de *T. vaginalis* con un inóculo de 4×10^4 trofozoítos/mL, e incubados durante 48 h a 37 °C. Se utilizó como control positivo metronidazol; como control negativo, el medio de cultivo, trofozoítos y DMSO; y como control blanco sólo medio. Después de incubarse, los trofozoítos fueron desprendidos de los microtubos por congelación y las muestras de cada tubo fueron subcultivadas en medio fresco por otras 48 h, ya sea sin drogas antiprotozoarias o con los extractos. El número final de parásitos fue determinado por medio de un hematocitómetro y la inhibición de la concentración al 50% (CI₅₀) fue calculado por medio de un análisis Probit. Los experimentos fueron realizados de manera duplicada y repetidos en tres ocasiones.

El bioensayo con *Entamoeba histolytica*, cepa HM1-IMSS, fue realizado de la misma manera que el anterior.

Los ensayos se realizaron por duplicado y se repitieron tres veces. El CI₅₀ fue determinado usando el análisis Probit

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al realizar los bioensayos contra *L. mexicana* MHOM/MX/841SETGS y *T. cruzi*, se pudo observar que el extracto crudo presentó actividad contra ambos parásitos, aunque la actividad fue mayor contra *L. mexicana* (un extracto crudo se considera activo cuando tiene un CI₅₀ $\leq 100 \mu\text{g/mL}$). Al realizar la partición y obtener los extractos no polar, de polaridad media y polaridad media-alta, la fracción no polar presentó la actividad más alta contra ambos parásitos, pero se observó una mayor actividad contra *T. cruzi*, con un CI₅₀ = 1.85

$\mu\text{g/mL}$, la cual es comparable a los controles utilizados, nifurtimox y benznidazol, con CI_{50} de 1.54 y 2.90 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Cuadro 12). Si se toma en cuenta que un extracto obtenido por medio de una partición se considera activo cuando su $\text{CI}_{50} \leq 50$ $\mu\text{g/mL}$, entonces los extractos de polaridad media y media-alta no son activos contra *L. mexicana*, aunque sí se consideran activos contra *T. cruzi*, por lo que deben tener metabolitos selectivos contra este parásito.

Cuadro 12. Bioensayos de la actividad contra los promastigotes de *L. mexicana* (MHOM/MX/84/SETGS) y contra los epimastigotes de *T. cruzi* de los extractos de *T. procumbens*.

Extracto, Fármaco	Actividad contra promastigotes de <i>L. mexicana</i> (MHOM/MX/84/SETGS) CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Actividad contra epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (MHOM/MX/1994/INC 5) CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
TPZ-1 Ext MeOH (Crudo)	3	17.83
TPZ-2a Ext Hx (No polar)	18	1.85
TPZ-2b Ext CH_2Cl_2 (Polaridad media)	126	15.07
TPZ-2c AcOEt (Mediana-alta)	295	44.75
Pentamidina	0.451	
Anfotericina B	0.149	
Nifurtimox		1.54
Benznidazol		2.90

En las evaluaciones realizadas con diferentes especies de *Leishmania* se obtuvo, como se esperaba, una mayor actividad leishmanicida con el extracto no polar TPZ-2a obtenido de *T. procumbens*, ya que se observó un bajo porcentaje de células viables de las especies de *Leishmania*, especialmente *L. aethiopica* (Cuadro 13), con una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$, con una $\text{DL}_{50} = 18.5$ $\mu\text{g/mL}$ contra los promastigotes de esta especie.

Cuadro 13. Porcentaje de inhibición contra promastigotes de *Leishmania* spp. de los extractos obtenidos de *T. procumbens*.

<i>Extracto</i>	<i>L. tropica</i>	<i>L. major</i>	<i>L. aethiopica</i>
TPZ-1	56.97	21.86	78.94
TPZ-2a	86.46	74.70	92.13
TPZ-2b	68.45	29.96	78.70

Como se puede observar en el Cuadro 13, hay una diferencia en la actividad leishmanicida de una cepa a otra, lo cual puede deberse a que los metabolitos responsables de la actividad sean específicos para una cepa en particular.

Debido a que el promastigote es la forma infectante del parásito, la prueba con promastigotes solamente tiene un valor indicativo de la posible actividad leishmanicida de los metabolitos evaluados. Por esta razón, la evaluación antes mencionada debe ser complementada con la evaluación de los amastigotes.

Por lo tanto, al ser TPZ-2a la fracción más activa contra los promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, fue evaluada la actividad contra amastigotes axénicos de *L. aethiopica*, obteniéndose un $DL_{50} = 95.2 \mu\text{g/mL}$. Este extracto redujo el porcentaje de infección en una línea celular de macrófagos derivados de monocitos (THP-1) preinfectados con *L. aethiopica*, sin una importante disminución en el número de estas células, en una concentración de $5 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 35).

Por el resultado anterior, se considera que este extracto representa una importante fuente de metabolitos activos contra diferentes especies de *Leishmania*. Existen pocos reportes de metabolitos que presentan actividades contra diferentes especies de *Leishmania*, entre ellos se encuentran el terpeno nerolidol, activo contra los promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. chagasi* (Arruda *et al.*, 2005), y los alcaloides xilopina, criptodorina, nornantenina y nornuciferina, activos contra *L. mexicana* y *L. panamensis* (Montenegro *et al.*, 2003).

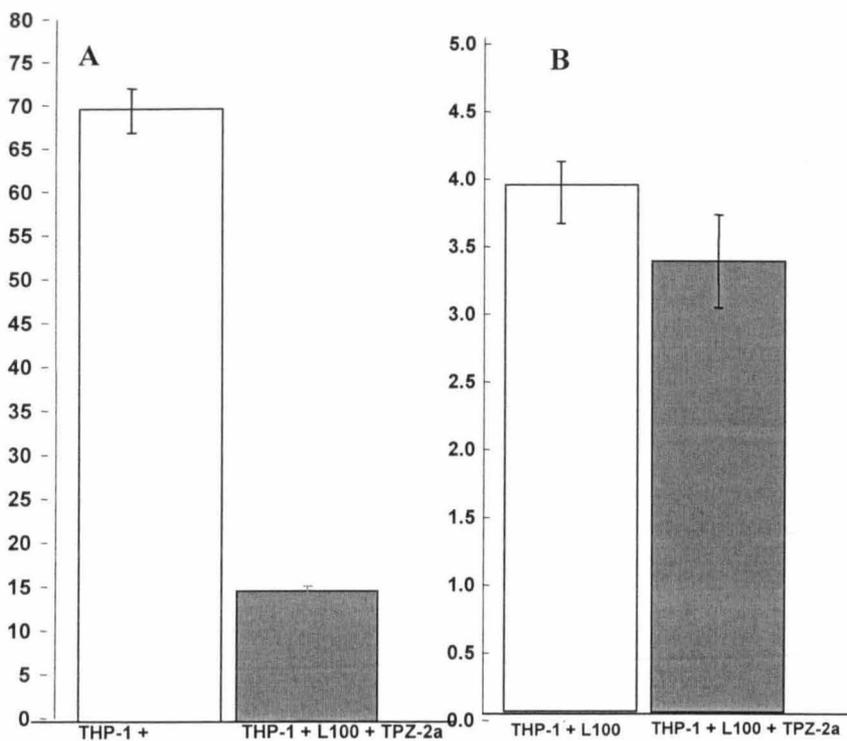


Figura 35. A) Porcentaje de células infectadas con *L. aethiopica* (L100). La barra blanca indica el grupo de células THP-1 sin tratar, comparado con las tratadas con TPZ-2a, barra gris. **B)** Número total de células THP-1, la barra blanca indica las células no tratadas con respecto a las tratadas con TPZ-2a, barra gris. Se puede observar que existe una notable disminución en el porcentaje de células THP-1 infectadas, al ser tratadas con la fracción TPZ-2a, sin efectos tóxicos importantes contra estas células.

La oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol (TPZ-25d1), obtenida de *T. procumbens* y activa contra *L. mexicana* LV4, fue probada contra la cepa de promastigotes de *L. mexicana* y contra los epimastigotes de *T. cruzi*, dando como resultado que este compuesto es activo contra ambos parásitos, comparándolo con sus respectivos controles (Cuadro 14). El IC₅₀ de TPZ-25d1 contra los promastigotes de *L. mexicana* (MHOM/MX/841SETGS) fue de 0.478 µg/mL el cual es comparable al IC₅₀ de la pentamidina, que fue de 0.451 µg/mL. Mientras que el IC₅₀ de TPZ-25d1 contra los epimastigotes de *T. cruzi* fue de 3.03 µg/mL, comparable al control benznidazol con un IC₅₀ = 2.90 µg/mL.

Cuadro 14. Bioensayos de la actividad contra promastigotes de *L. mexicana* (MHOM/MX/841SETGS) y contra epimastigotes de *T. cruzi* del compuesto TPZ-25d1 aislado de *T. procumbens*.

Compuesto/ Fármaco	Promastigotes de <i>L. mexicana</i> CI ₅₀ (µg/mL)	Epimastigotes de <i>T. cruzi</i> CI ₅₀ (µg/mL)
TPZ-25d1	0.478	3.03
Pentamidina	0.451	
Anfotericina B	0.149	
Nifurtimox		1.54
Benznidazol		2.90

Los bioensayos realizados con los extractos y los compuestos puros contra los diferentes parásitos mitocondriales arrojaron los resultados que se observan en el cuadro 15.

Cuadro 15. Actividad biológica de los extractos, fracciones y compuestos puros aislados de *Tridax procumbens* expresada como CI₅₀ (µg/mL).

Extracto, Fracción, Fármaco	<i>G. lamblia</i>	<i>T. vaginalis</i>	<i>E. histolytica</i>
TPZ-1 (Fracción MeOH)	7.10	6.005	2.1
TPZ-2a (Fracción Hx)	6.86	2.936	36.796
TPZ-2b (Fracción CH ₂ Cl ₂)	SA	20.235	35.099
TPZ-2c (Fracción AcOEt)	SA	3.019	15.456
TPZ-25d1	4.62	NE	NE
Estigmasterol/β-Sitosterol	SA	NE	NE
Ácido Palmítico	12.57	NE	NE
Metronidazol	0.22	0.049	0.132

SA = sin actividad; NE = no evaluado.

Los resultados indican que el extracto metanólico de *T. procumbens* presentó una actividad significativa contra los parásitos anaeróbicos amitocnoriales. Nuevamente se puede observar que el extracto hexánico es el que obtuvo actividad contra los diferentes parásitos, aunque el extracto de acetato de etilo tuvo también una importante actividad contra *T. vaginalis* y contra *E. histolytica*, pero no contra *G. lamblia* (Cuadro 15). Estos resultados indicaron que los metabolitos activos antiprotozoarios de *T. procumbens* se encuentran distribuidos en extractos de diferente polaridad.

Al ser evaluados el estigmasterol y el ácido palmítico, aislados e identificados de la fracción activa (TPZ-2a), de *T. procumbens* contra *G. lamblia*, solamente el ácido palmítico presentó actividad con un CI₅₀ = 12.57 µg/mL; sin embargo, al compararlo con los valores del metronidazol (CI₅₀ = 0.22 µg/mL), el medicamento usado como control, se observa que la actividad es ligera (Cuadro 14).

La oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol activa contra *L. mexicana* y *T. cruzi* mostró una mediana actividad contra *G. lamblia* (CI₅₀ = 4.62 µg/ml), lo cual podría indicar que este compuesto es más selectivo

contra parásitos emparentados con *Leishmania*, tal como *T. cruzi*, ya que ambos pertenecen a la misma familia Trypanosomatidae. Lo más probable es que existan otros compuestos activos contra *G. lamblia*, los cuales no han sido aislados, o que exista un sinergismo. En los resultados reportados por Arrieta y colaboradores (2001), donde el extracto metanólico presentó actividad contra los trofozoítos de *E. histolytica* ($CI_{50} = 3.5 \mu\text{g/mL}$), los metabolitos aislados de este extracto no presentaron actividad o tuvieron una actividad muy leve, siendo la asarinina la más activa con un $CI_{50} = 20 \mu\text{g/mL}$ (Arrieta *et al.*, 2001). Al no presentar la oxilipina, el estigmasterol y el ácido palmítico una importante actividad, comparable al control, metronidazol, no se realizaron los ensayos contra *T. vaginalis* y *E. histolytica*.

5.4 CONCLUSIONES

Los extractos obtenidos de *T. procumbens* presentaron importantes actividades contra los diferentes protozoarios, por lo que esta planta representa una importante fuente de metabolitos con actividad antiprotozoaria. Los metabolitos ácido palmítico y la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, obtenidos de *T. procumbens*, presentaron actividad antiprotozoaria, siendo ambos medianamente activos contra *G. lamblia*, mientras que la oxilipina presentó importante actividad contra *T. cruzi*, aunque fue más activa contra *L. mexicana*.

Parte de este capítulo fue publicado como Martín-Quintal *et al.*, *In vitro* activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. J. Ethnopharmacol. (2009), doi:10.1016/j.jep.2009.01.037

5.5 BIBLIOGRAFÍA

- Arruda, D.C., D'Alexandri, F.L., Katzin, A.M. and Uliana, R.B.S. (2005) Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 1679-1687.
- Berger, I., Barrientos, A.C., Cáceres, A., Hernández, M., Rastrelli, L., Martin Passreiter, C., Kubelka, W. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 107-115.
- Bringaud, F., Rivière, L. and Coustou, V. (2006) Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 149, 1-9.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I. and Maki, J. (1998) Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 195-202.
- Cedillo-Rivera, R. and Muñoz, O. (1992) *In vitro* susceptibility of *Giardia lamblia* to albendazole, mebendazole and other chemotherapeutic agents. *Journal of Medical Microbiology*, 37, 221-224.
- Cedillo-Rivera, R., Chávez, B., González-Robles, A., Tapia, A. and Yépez-Mulia, L. (2002) *In Vitro* effect of Nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49, 201-208.
- Ganguly, S., Bandyopadhyay, S., Sarkar, A. and Chatterjee, M. (2006) Development of semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 79-86.
- Getti, G., Durgadoss, P., Domínguez-Carmona, D., Martín-Quintal, Z., Peraza-Sánchez, S., Peña-Rodríguez, L.M. and Humber, D. (2008). Leishmanicidal activity of Yucatecan medicinal plants on *Leishmania* species responsible for cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology*, DOI: 10.1645/GE-1675.1.

- Hocquemiller, R., Cortes, D., Arango, G.J., Myint, S.H. and Cavé, A. (1991) Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpène antiparasitaire. *Journal of Natural Products*, 54, 445-452.
- Inchausti, A., Yaluff, G., Rojas de Arias, A., Torres, S., Ferreira, M.A., Nakayama, H., Schinini, A., Lorenzen, K., Anke, T. and Fournet, A. (1997) Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Basidiomycetes. *Phytotherapy Research*, 11, 193-197.
- Lunardi, F., Guzela, M., Rodrigues, A.T., Corrêa, R., Eger-Mangrich, I., Steindel, M., Grisard, E.C., Assreuy, J., Calixto, J.B. and Santos, A.R.S. (2003) Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 1449-1451.
- Montenegro, H., Gutiérrez, M., Romero, L.I., Ortega-Barría, E., Capson, T. and Cubilla Ríos, L. (2003) Aporphine alkaloids from *Gutteria* spp. with leishmanicidal activity. *Planta Médica*, 69, 677-679.
- Muhammad, I., Dunbar, D.C., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Bedir, E., Takamatsu, S., Ferreira, D. and Walker, L.A. (2003) Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. *Journal of Natural Products*, 66, 962-967.
- Muñoz, V., Moretti, C., Sauvain, M., Caron, C., Porzel, A., Massiot, G., Richard, B. and Le Men-Olivier, L. (1994) Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (Syn. *Tabernaemontana van heurkii*). *Planta Medica*, 60, 455-459.
- Nowicki, C. and Cazzulo, J.J. (2008) Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 151, 381-390.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R. and Mut-Martín, M. (2007) Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Peraza-Sánchez, S.R., Poot-Kantún, S., Torres-Tapia, L.W., May-Pat, F., Simá-Polanco, P. and Cedillo-Rivera, R. (2005) Screening of native plants from Yucatán for anti-*Giardia lamblia* activity. *Pharmaceutical Biology*, 43, 594-598.

- Salem, M.M. and Werbovetz, K.A. (2005) Antiprotozoal compounds from *Psoralea polydenia*. *Journal of Natural products*, 68, 108-111.
- Senn, M., Gunzenhauser, S., Brun, R. and Séquin, U. (2007) Antiprotozoal polyacetylenes from Tanzanian medicinal plant *Cussonia zimmermannii*. *Journal of Natural Products*, 70, 1565-1569.
- Shima Luize, P., Shioji Tiunan, T., Morello, L.G., Korehiza Maza, P., Ueda-Nakamura, T., Prado Dias Filho, B., Garcia Cortez, D.A., Palazzo de Mello, C. and Vataru Nakamura, C. (2005) Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41, 85-94.
- Yardley, V., Snowden, D., Croft, S. and Hazra, B. (1996) *In vitro* activity of diospyrin and derivatives against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytotherapy Research*, 10, 559-562.

Capítulo 6

Conclusiones generales y perspectivas

6.1 Conclusiones generales

En este trabajo se estudió el extracto metanólico de la planta *Tridax procumbens* L., el cual demostró una importante actividad antiprotozoaria, específicamente contra la leishmaniosis, tripanosomiasis, giardiasis, amibiasis y trichomoniasis, lo cual es una confirmación de los usos reportados de esta planta en la medicina tradicional.

La fracción hexánica activa resultante de la partición cromatográfica del extracto metanólico, fue purificada hasta obtener el metabolito (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, el cual pertenece al grupo de las oxilipinas, los cuales son compuestos oxigenados biosintetizados a partir de ácidos grasos. Este compuesto demostró una importante actividad leishmanicida, a pesar de que se encuentra en bajas concentraciones. Este tipo de metabolitos presentan importantes, diferentes y potentes actividades. Este metabolito también presentó actividad contra los amastigotes intracelulares, los cuales son el estadio en el que se encuentran en los mamíferos, observándose una notable disminución en el porcentaje de infección de macrófagos tratados con este compuesto, sin efectos citotóxicos a la concentración leishmanicida. Por otro lado, se pudo observar que la producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos derivados de médula ósea activados con diferentes concentraciones de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, no se llevó al cabo, sin importar la presencia de activadores LPS e INF- γ . Estos resultados sugieren que la actividad leishmanicida del compuesto es independiente de la activación del macrófago para la producción de NO. Es posible que el efecto principal de la actividad leishmanicida sea la acción directa a los amastigotes. Sin embargo, es necesaria la realización de otras pruebas.

Los resultados obtenidos indican que la actividad de (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol, es más efectiva en los protozoarios

pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, que a los protozoarios amitocnondriales, por lo tanto esta importante actividad detectada en este planta contra otros protozoarios es debida a la presencia de otros metabolitos que se encuentran en *T. procumbens*.

El compuesto (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol representa un grupo nuevo de metabolitos con importante actividad leishmanicida.

6.2 Perspectivas

El presente trabajo dio como resultado la purificación del metabolito responsable de la actividad leishmanicida de *T. procumbens*, con una baja citotoxicidad. Sin embargo, es necesaria la realización de más bioensayos para poder descartar la actividad citotóxica, así como ensayos *in vivo* y de toxicidad en ratones.

Al mismo tiempo, debido al bajo rendimiento del metabolito, sería interesante llevar al cabo la síntesis del mismo, lo que permitirá realizar ensayos leishmanicidas *in vivo*, así como también llevar al cabo estudios de relación estructura-actividad y otros que permitan elucidar el mecanismo de acción del compuesto.

Debido a que no se aislaron los metabolitos responsables de la actividad contra los protozoarios amitocnondriales (*G. lamblia*, *E. histolytica* y *T. vaginalis*), es necesario la búsqueda de los mismos.

T. procumbens representa una importante fuente de metabolitos con diferentes actividades, por lo que el estudio a futuro de esta especie es necesario.

Anexo

- Los extractos de *Tridax procumbens* presentan una importante actividad antiprotozoaria y no citotóxica.
- El extracto crudo metanólico fue activo contra promastigotes de *Leishmania mexicana* MHOM/MX/84/ISETGS con un $CI_{50} = 3 \mu\text{g/mL}$ y contra *L. mexicana* LV4 con un $CI_{50} = 16.52 \mu\text{g/mL}$.
- De las fracciones obtenidas de la partición del extracto metanólico utilizando disolventes de polaridad creciente, la fracción de baja polaridad (hexánica) fue la más activa contra las dos cepas de *L. mexicana*.
- Se aisló una oxilipina conocida como (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol con una marcada actividad leishmanicida contra los promastigotes de *L. mexicana* MHOM/MX/84/ISETGS, con una $CI_{50} = 0.478 \mu\text{g/mL}$ comparable con la de la pentamidina ($CI_{50} = 0.451 \mu\text{g/mL}$), y con un $CI_{50} = 0.132 \mu\text{g/mL}$ contra *L. mexicana* LV4.
- Al ser analizada la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol en el bioensayo para citotoxicidad contra células MDCK, mostró un $CI_{50} = 14.012 \mu\text{g/mL}$, mientras que la anfotericina B presentó un $CI_{50} = 6.584 \mu\text{g/mL}$, revelando esta última una mayor citotoxicidad.
- La oxilipina mostró una actividad poco tóxica contra las células adherentes, siendo necesaria una dosis 1,000 veces mayor que la requerida para inhibir el 50% de los promastigotes de *L. mexicana* ($CI_{50} = 478.63 \mu\text{g/mL}$), indicando claramente que este compuesto es responsable de la actividad leishmanicida, es decir, es específico y no tóxico no selectivo.
- La oxilipina redujo el porcentaje de infección de los macrófagos derivados de médula ósea de ratón infectados.
- La oxilipina es uno de los metabolitos, sino el único, responsable de la actividad leishmanicida detectada en el extracto crudo de *T. procumbens*.
- La oxilipina no estimula la producción de óxido nítrico para la eliminación de los parásitos, por lo que no hay activación del macrófago, es decir la actividad podría ser de manera directa.
- La oxilipina presenta actividad antioxidante, lo cual podría ser

- la causa de la inhibición de la producción de NO.
- La oxilipina presentó una importante actividad contra la familia Trypanosomatidae, ya que fue activa contra los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
 - En la purificación del extracto hexánico de *T. procumbens* también se obtuvieron otros metabolitos conocidos, y ya reportados en esta especie: la mezcla estigmasterol- β -sitosterol y ácido palmítico, los cuales no fueron activos en el bioensayo leishmanicida.
 - La oxilipina y el ácido palmítico presentaron una ligera actividad contra los trofozoítos de *G. lamblia*.

