



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**METABOLITOS CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA
PRODUCIDOS POR PLANTAS NATIVAS DE LA
PENÍNSULA DE YUCATÁN**

Tesis que presenta

GLENDY MARILÚ POLANCO HERNÁNDEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México
Enero 2011





CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "Metabolitos con actividad tripanocida producidos por plantas nativas de la Península de Yucatán" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado de Ciencias Biológicas de este centro.

Atentamente,

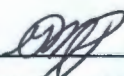
Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela
Director Académico

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó, para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que dicha información le pertenece en términos de la Ley de la Propiedad Industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, México, a 17 de Enero de 2011.



Q.F.B. Glendy Marilú Polanco Hernández

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por la formación profesional, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por la confianza que depositó en mí y por su apoyo durante la realización de esta tesis.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la Unidad de Biotecnología por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría y por el programa de Becas Mixtas para Estancias en el extranjero (Chile, 2010).

A los integrantes de mi comité revisor: Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, Dra. Teresa Hernández Sotomayor, Dr. Sergio Peraza Sánchez, Dr. Roberto Cedillo y Dr. Hernán Sagua Franco.

Al M. en C. Manuel Chan Bacab y a la Dra. Karla Acosta por su ayuda durante la realización de este trabajo.

A Paulino Simá por su apoyo en la identificación de las plantas.

A las técnicas Fabiola Escalante Erosa y Karlina Sosa por su apoyo técnico y profesional durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Hernán Sagua, al Dr. Jorge González y a todos mis amigos chilenos por hacer de mi estancia en Chile algo especial.

A mis padres por su apoyo, cariño y confianza para seguir adelante y porque gracias a ellos logré esta meta.

A mis hermanos, Gaby y Gerardo por su cariño, apoyo y consejos que siempre me han brindado.

A Pedro por estar a mi lado y apoyarme siempre para salir adelante.

A todos mis amigos, tanto del CICY como fuera de él, con los que he compartido muchos momentos divertidos, por su amistad y por sus consejos.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS**DEDICATORIA**

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
-------------------	----

ÍNDICE DE CUADROS	v
-------------------	---

RESUMEN	1
---------	---

ABSTRACT	3
----------	---

CAPÍTULO I.	5
-------------	---

1.1 INTRODUCCIÓN	5
------------------	---

1.2 ANTECEDENTES	7
------------------	---

1.2.1 Enfermedad de Chagas	7
----------------------------	---

1.2.2 Tratamiento de la enfermedad de Chagas	9
--	---

1.3 LA MEDICINA TRADICIONAL Y LOS PRODUCTOS NATURALES COMO FÁRMACOS	10
--	----

1.3.1 Las plantas como fuente de metabolitos bioactivos	10
---	----

1.3.2 Productos naturales con actividad <i>in vitro</i> contra <i>T. cruzi</i>	12
--	----

1.3.3 Productos naturales con actividad <i>in vivo</i> contra <i>T. cruzi</i>	13
---	----

1.4 BIODIVERSIDAD EN MÉXICO Y LA PENÍNSULA DE YUCATÁN	14
---	----

1.5 <i>Byrsonima bucidaefolia</i>	15
-----------------------------------	----

1.5.1 Usos etnobotánicos	15
--------------------------	----

1.5.2 Estudios fitoquímicos y biológicos de la familia Malpighiaceae	15
--	----

1.5.3 Estudios fitoquímicos y biológicos de <i>Byrsonima bucidaefolia</i>	16
---	----

1.6 <i>Bourreria pulchra</i>	16
------------------------------	----

1.6.1 Distribución geográfica	17
-------------------------------	----

1.6.2 Usos etnobotánicos	17
--------------------------	----

1.6.3 Estudios fitoquímicos y biológicos de la familia Boraginaceae	17
---	----

1.6.4 Estudios fitoquímicos y biológicos de <i>Bourreria pulchra</i>	18
--	----

1.7 <i>Senna villosa</i>	18
--------------------------	----

1.7.1 Distribución geográfica	19
-------------------------------	----

1.7.2 Usos etnobotánicos	19
--------------------------	----

1.7.3 Estudios fitoquímicos y biológicos de la familia Fabaceae	19
---	----

1.7.4 Estudios fitoquímicos y biológicos de <i>Senna villosa</i>	20
--	----

1.8 <i>Serjania yucatanensis</i>	20
----------------------------------	----

1.8.1 Distribución geográfica	21
-------------------------------	----

1.8.2 Usos etnobotánicos	21
--------------------------	----

1.8.3 Estudios fitoquímicos y biológicos de la familia Sapindaceae	21
--	----

1.8.4 Estudios fitoquímicos y biológicos de <i>Serjania yucatanensis</i>	22
--	----

1.9 OBJETIVO GENERAL	23
1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
1.11 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
1.12 REFERENCIAS	25
CAPÍTULO II. <i>IN VITRO</i> AND <i>IN VIVO</i> TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF NATIVE PLANTS FROM THE YUCATAN PENINSULA	35
2.1 ABSTRACT	35
2.2 INTRODUCTION	36
2.3 MATERIALS AND METHODS	36
2.3.1 Plant material	36
2.3.2 Preparation of plant extracts	37
2.3.3 Cell cultures	37
2.3.4 Parasites	37
2.3.5 <i>In vitro</i> trypanocidal activity against epimastigotes of <i>T. cruzi</i>	37
2.3.6 <i>In vitro</i> trypanocidal activity against trypomastigotes of <i>T. cruzi</i>	38
2.3.7 <i>In vivo</i> trypanocidal activity	38
2.3.8 Cytotoxic activity against Vero cells	39
2.3.9 Inhibition of <i>T. cruzi</i> egress test	39
2.3.10 Statistical analyses	39
2.4 RESULTS	40
2.5 DISCUSSION	43
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS	46
2.7 SUPPLEMENTARY MATERIAL	47
2.8 REFERENCES	48
CAPÍTULO III. IDENTIFICATION OF TRYPANOCIDAL METABOLITES FROM <i>Serjania yucatanensis</i>	51
3.1 ABSTRACT	51
3.2 INTRODUCTION	52
3.3 MATERIALS AND METHODS	53
3.3.1 General experimental procedures	53
3.3.2 Plant material	54
3.3.3 Extraction and isolation	54
3.3.4 Oxidation of lupeol	55
3.3.5 Epoxidation of β -caryophyllene	55
3.3.6 Parasites and their growth conditions	55

3.3.7 Evaluation of the <i>in vitro</i> trypanocidal activity against epimastigotes of <i>T. cruzi</i>	56
3.3.8 Evaluation of the <i>in vitro</i> trypanocidal activity against trypomastigotes of <i>T. cruzi</i>	56
3.3.9 Cytotoxic activity	56
3.3.10 Inhibition of <i>T. cruzi</i> egress test	57
3.3.11 Statistical analyses	57
3.4 RESULTS AND DISCUSSION	57
3.5 ACKNOWLEDGEMENTS	62
3.6 SUPPLEMENTARY MATERIAL	63
3.7 REFERENCES	64
CAPÍTULO IV	69
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	69
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	72
4.3 PERSPECTIVAS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Figura 1.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
Figura 1.3 Fármacos importantes aislados de plantas	11
Figura 1.4 Metabolitos con actividad <i>in vivo</i> contra <i>T. cruzi</i>	14
Figura 1.5 Ejemplos de metabolitos aislados de la familia Malpighiaceae	16
Figura 1.6 Metabolito obtenido del extracto de <i>Byrsonima bucidaefolia</i>	16
Figura 1.7 Ejemplos de metabolitos aislados de la familia Boraginaceae	18
Figura 1.8 Ejemplos de algunos metabolitos aislados de <i>Bouyeria pulchra</i>	18
Figura 1.9 Metabolitos aislados de <i>Senna villosa</i>	20
Figura 1.10 Metabolitos aislados de la familia Sapindaceae	22
Figura 1.11 Estrategia experimental	24
Figure 2.1 Activity of crude extracts of native plants of the Yucatan península against trypomastigotes of <i>T. cruzi</i>	41
Figure 2.2 Cytotoxic effect of crude extracts at 100,50 and 25 µg/mL against Vero cells by the resazurin method	41
Figure 2.3 Parasitaemic curve in mice infected with <i>T. cruzi</i> and treated by oral route with extracts of <i>S. yucatanensis</i> and <i>B. pulchra</i>	42
Figure 2.4 Survival rates of <i>T. cruzi</i> infected mice during the <i>in vivo</i> treatment with extracts of <i>S. yucatanensis</i> and <i>B. pulchra</i>	43
Figure 2.5 Inhibition of the egress of <i>T. cruzi</i> trypomastigotes by leaf extracts of <i>S. yucatanensis</i> and <i>B. pulchra</i> tested at 100 µg/mL	43
Figure 3.1 Trypanocidal activity of fractions and metabolites obtained from <i>S. yucatanensis</i> against trypomastigotes	58
Figure 3.2 Isolated metabolites from the hexane fraction of <i>S. yucatanensis</i>	59
Figure 3.3 Cytotoxic effect of fractions and metabolites obtained from the leaf extract of <i>S. yucatanensis</i> at 100, 50 and 25 µg/mL against Vero cells by resazurin method	60
Figure 3.4 Inhibition of the egress of <i>T. cruzi</i> trypomastigotes by fractions and metabolites obtained from leaf extract of <i>S. yucatanensis</i> at 100 µg/mL	61
Figure S3.1 Fragmentation patterns of metabolite 1 and lup-20(29)-en-3-one contained in the data base of the GC-MS equipment	63
Figure S3.2 Fragmentation patterns of metabolite 2 and β-caryophyllene oxide contained in the data base of the GC-MS equipment	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Productos naturales de origen vegetal con actividad <i>in vitro</i> contra <i>T. cruzi</i>	12
Table 2.1 Trypanocidal activity of crude extracts from four native plants of the Yucatan peninsula	40
Table S2.1 Trypanocidal activity against epimastigotes of <i>T. cruzi</i> of crude extracts	47
Table S2.2 Cytotoxic effect (IC ₅₀) of crude extracts against Vero cells evaluated by the sulforhodamine B method	47
Table 3.1 Trypanocidal activity of fractions from <i>Serjania yucatanensis</i>	58

RESUMEN

Las plantas representan una de las fuentes más importantes para la obtención de metabolitos bioactivos con aplicación potencial como agentes terapéuticos; sin embargo, hasta ahora, menos del 15% del total de las especies vegetales han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y/o farmacológico. Recientemente, en un estudio de la flora nativa y endémica de la Península de Yucatán, se reportó que el extracto de hojas de *Bouyeria pulchra*, *Senna villosa* y *Byrsonima bucidaefolia*, y el extracto de raíz de *Serjania yucatanensis*, poseen actividad frente a *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, uno de los problemas parasitarios de salud pública más importantes en el continente americano.

Reconociendo el rol de *B. pulchra*, *S. villosa*, *B. bucidaefolia* y *S. yucatanensis* como fuentes potenciales de metabolitos bioactivos, como parte inicial de este trabajo, y con el fin de confirmar los resultados reportados anteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la actividad tripanocida *in vitro* de los extractos de hojas, tallo y raíz de estas cuatro plantas de la flora de la Península de Yucatán. Los extractos de hojas de las cuatro especies mostraron actividad tripanocida, siendo particularmente activos los extractos de hojas de *S. yucatanensis* y *B. pulchra*. Estos dos últimos extractos fueron evaluados *in vivo* contra *T. cruzi*, detectándose actividad únicamente en el extracto de *S. yucatanensis*.

La actividad tripanocida detectada en la fracción hexánica de *S. yucatanensis* mostró que los metabolitos responsables son de baja polaridad. Al evaluar la actividad de las fracciones semipuras del extracto de *S. yucatanensis* frente a tripomastigotes de *T. cruzi*, se encontró que la fracción que contiene una mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno posee actividad tripanocida.

Finalmente, los estudios de inhibición mediante el test de egreso de *T. cruzi*, permitieron establecer que el extracto de hojas de *S. yucatanensis* y la fracción que contiene una mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno fueron capaces de inhibir significativamente la salida de tripomastigotes de *T. cruzi* de células infectadas.

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el rol del Estado en el desarrollo económico de América Latina, considerando tanto el período de la independencia como el actual. Se examina el impacto de las políticas económicas implementadas por los gobiernos de la época colonial y posterior, así como el papel del Estado en la industrialización y el comercio exterior. Se concluye que el Estado ha sido un actor fundamental en el proceso de desarrollo, aunque su intervención ha variado significativamente a lo largo del tiempo.

En el contexto latinoamericano, el rol del Estado ha sido objeto de debate y análisis durante décadas. Se ha observado que, en general, el Estado ha intervenido activamente en la economía, tanto a través de la regulación como de la inversión directa. Sin embargo, también se ha señalado que esta intervención ha sido a menudo ineficiente o corrupta, lo que ha limitado el crecimiento económico. Por lo tanto, es necesario evaluar críticamente el desempeño del Estado y explorar alternativas para mejorar su gestión y promover el desarrollo sostenible.

En conclusión, el rol del Estado en el desarrollo económico de América Latina es un tema complejo y multifacético. Requiere un análisis detallado de las condiciones históricas, sociales y económicas que han moldeado su intervención. Al mismo tiempo, es esencial considerar las lecciones aprendidas de otros países y adaptarlas al contexto latinoamericano. Solo así se podrá evaluar de manera adecuada el impacto real del Estado y determinar las estrategias más efectivas para impulsar el crecimiento y el bienestar de la región.

ABSTRACT

Plants represent one the most important sources of bioactive metabolites with potential application as therapeutic agents; however, to date, less than 15% of all plant species have been studied from a phytochemical or pharmacological point of view. Recently, a study of the native and endemic flora of the Yucatan peninsula as a source of bioactive metabolites reported the leaf extracts of *Bourreria pulchra*, *Byrsonima bucidaefolia* and *Senna villosa*, and the root extract of *Serjania yucatanensis* as having activity against *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease, which is an important public health parasite problem in Latin America.

Recognizing the role of *B. pulchra*, *B. bucidaefolia*, *Senna villosa* and *S. yucatanensis* as potential sources of bioactive metabolites, in the initial part of this work, and in order to confirm the results reported previously, the extracts of leaves, stems and roots of these four plants of the flora of the Yucatan peninsula were evaluated for their *in vitro* trypanocidal activity. The leaf extracts of the four species showed trypanocidal activity, with the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* being the most active. These two last extracts were evaluated *in vivo* against *T. cruzi*, and only the extract of *S. yucatanensis* proved to be active.

The trypanocidal activity present in the hexane fraction of *S. yucatanensis* showed that the metabolites are of low polarity. Testing of semipure fractions from the extract of *S. yucatanensis* for their activity against trypomastigotes of *T. cruzi* showed that the fraction containing a mixture of lup-20(29)-en-3-one and β -caryophyllene oxide has trypanocidal activity.

Finally, studies of inhibition by test of egress of *T. cruzi*, allowed establishing that the leaf extract of *S. yucatanensis*, and the fraction containing a mixture of lup-20(29)-en-3-one and β -caryophyllene oxide, are able to significantly inhibit the egress of trypomastigotes of *T. cruzi* from infected cells.

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de la implementación de un sistema de gestión de la calidad (SGC) en una empresa manufacturera. Se describe el proceso de implementación, desde la definición de la estrategia hasta la puesta en marcha del sistema. Se detallan los beneficios obtenidos, como la mejora en la eficiencia, la reducción de costos y el aumento de la satisfacción del cliente. Se concluye que la implementación de un SGC es una herramienta efectiva para mejorar el desempeño organizacional.

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de la implementación de un sistema de gestión de la calidad (SGC) en una empresa manufacturera. Se describe el proceso de implementación, desde la definición de la estrategia hasta la puesta en marcha del sistema. Se detallan los beneficios obtenidos, como la mejora en la eficiencia, la reducción de costos y el aumento de la satisfacción del cliente. Se concluye que la implementación de un SGC es una herramienta efectiva para mejorar el desempeño organizacional.

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de la implementación de un sistema de gestión de la calidad (SGC) en una empresa manufacturera. Se describe el proceso de implementación, desde la definición de la estrategia hasta la puesta en marcha del sistema. Se detallan los beneficios obtenidos, como la mejora en la eficiencia, la reducción de costos y el aumento de la satisfacción del cliente. Se concluye que la implementación de un SGC es una herramienta efectiva para mejorar el desempeño organizacional.

El presente trabajo tiene como objetivo principal analizar el impacto de la implementación de un sistema de gestión de la calidad (SGC) en una empresa manufacturera. Se describe el proceso de implementación, desde la definición de la estrategia hasta la puesta en marcha del sistema. Se detallan los beneficios obtenidos, como la mejora en la eficiencia, la reducción de costos y el aumento de la satisfacción del cliente. Se concluye que la implementación de un SGC es una herramienta efectiva para mejorar el desempeño organizacional.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas y en particular las parasitarias como la leishmaniasis, la tripanosomiasis americana, la malaria y la amibiasis son consideradas por la OMS como principales causas de muerte en el mundo (Jemal *et al.*, 2003).

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una parasitosis crónica causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* que provoca lesiones cardíacas e intestinales y puede causar la muerte; es uno de los problemas de salud pública más importantes en el continente americano, donde se estima que existe un total de 10 millones de personas infectadas (WHO, 2010), agravándose el problema con el fenómeno de la migración de latinoamericanos con la infección chagásica a otros continentes, producto del fenómeno de globalización.

Hasta ahora el tratamiento de esta parasitosis es insatisfactorio, debido a que los fármacos utilizados son tóxicos y presentan efectos secundarios severos (Castro y Montalvo, 2006; Rodríguez-Coura y de Castro, 2002); por esta razón, la OMS estableció recientemente como prioritaria la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios (WHO, 2000).

Los productos naturales representan una alternativa importante para el desarrollo de nuevos fármacos o modelos para los mismos (Newman y Cragg, 2007). Aun cuando el reino vegetal representa una de las fuentes más importantes para la obtención de metabolitos bioactivos con aplicación potencial como agentes terapéuticos, hasta ahora menos del 15% del total de las especies vegetales han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y/o farmacológico (Harvey, 2000).

México, y en particular la Península de Yucatán, cuenta con una flora nativa muy característica dada sus condiciones geográficas y climáticas (Pulido y Serralta, 1993); sin embargo, y al igual que el resto de la flora mexicana, las numerosas especies de la península de Yucatán han sido poco estudiadas en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos. Recientemente, como parte de un estudio dirigido hacia la

detección de actividad biológica en extractos crudos de plantas nativas de la Península de Yucatán, se reportó la presencia de actividad tripanocida en los extractos de hojas de *Bourreria pulchra* Mill., *Byrsonima bucidaefolia* Standl. y *Senna villosa* Mill. (Guzmán *et al.*, 2004; Vera-Ku, 2003) y en el extracto de raíz de *Serjania yucatanensis* Standl. (Vera-Ku, 2003).

Dada la importancia de estas especies vegetales como fuentes potenciales de metabolitos bioactivos de interés farmacológico y/o farmacéutico, y al limitado conocimiento fitoquímico que existe sobre estas plantas, para este trabajo se planteó como objetivo principal llevar a cabo la evaluación de la actividad tripanocida de *B. pulchra*, *B. bucidaefolia*, *S. villosa* y *S. yucatanensis* y la purificación biodirigida del extracto orgánico crudo con mayor actividad para identificar los metabolitos responsables de la actividad frente a *Trypanosoma cruzi*.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es uno de los problemas de salud pública más importantes en el continente americano; esta enfermedad se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile, y actualmente se estima un total de 10 millones de personas infectadas con el parásito. Adicionalmente, se estima que existen 25 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y en 2008 esta enfermedad causó la muerte de más de 10,000 personas (WHO, 2010).

La tripanosomiasis americana es causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozooario hemoflagelado que presenta cuatro estadios morfológicos: epimastigote, amastigote, tripomastigote metacíclico y tripomastigote sanguíneo (Figura 1.1); el principal mecanismo de transmisión del parásito es por medio de un insecto vector de la familia *Reduviidae* (Romero, 1999). Los insectos vectores se infectan al alimentarse de la sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes sanguíneos y éstos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del triatomino. Los epimastigotes se reproducen por fisión binaria y posteriormente se transforman en tripomastigotes metacíclicos infectantes para el hombre o huésped vertebrado. El vector infectado se alimenta picando al hombre o huésped vertebrado al tiempo que defeca sobre la piel o mucosas del mamífero; cuando estas deyecciones se frotan sobre la piel, el sitio de la picadura u otro sitio lesionado se contamina y los parásitos penetran los tejidos. Una vez que los parásitos se encuentran dentro del mamífero, se introducen a las células en donde se transforman en amastigotes y se multiplican por fisión binaria hasta que lisan la célula y emergen a la circulación sanguínea convirtiéndose en tripomastigotes sanguíneos; estos últimos penetran a otras células y continúan con el ciclo, al transformarse nuevamente en amastigotes (Figura 1.2) (Rodríguez *et al.*, 2008; Tay *et al.*, 2003)

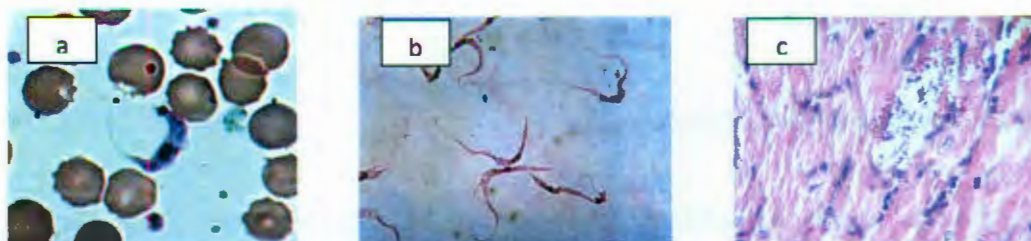
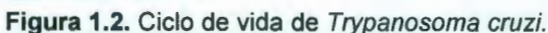


Figura 1.1. Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*: a) Tripomastigote sanguíneo, b) Epimastigote, c) Amastigote.

La enfermedad de Chagas es una parasitosis crónica que, en la mayoría de los casos, lleva a la muerte a largo plazo; comienza con una fase aguda que se caracteriza por un malestar general, irritabilidad, cefalea y hepatoesplenomegalia, pero en el 95% de los casos es asintomática; sin embargo, se puede encontrar una reacción inflamatoria local (chagoma de inoculación), así como un edema unilateral de alguno de los párpados (signo de Romaña). Después de la fase aguda ocurre una respuesta inmune que provoca la disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Este período va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de la fase crónica y es llamado latente o indeterminado. En la fase crónica se presenta la miocardiopatía chagásica que conduce típicamente a las arritmias, a la falla cardíaca, a los fenómenos de tromboembolia y a la muerte repentina (Cevallos y Hernández, 2007; Teixeira *et al.*, 2006; Tay *et al.*, 2003; Storino, 2002).

Aun cuando la transmisión del parásito se ha controlado en la mayor parte de América del Sur, la enfermedad continúa siendo endémica en diversas regiones de México; en todos los estados de la República Mexicana se han reportado casos de enfermedad de Chagas y en la Península de Yucatán se han reportado tasas de seroprevalencia de 15.6% en la población en general y de un 5.6% en donantes de sangre (Cruz y Pickering, 2006; Dumonteil, 1999).



Actualmente existen tres productos aceptados para el control de la enfermedad de Chagas: nifurtimox (Lampit®), benznidazol (Rochagan®) y allopurinol (Zyloprim®); sin embargo, el tratamiento de las infecciones producidas por *T. cruzi* es considerado actualmente como uno de los más insatisfactorios. La disponibilidad de los fármacos en algunas zonas consideradas como endémicas de la enfermedad es limitada y su eficiencia para la cura de pacientes en fase aguda es baja (ca. 50%). Adicionalmente estos fármacos causan efectos secundarios severos como vómitos, diarrea, dermatitis, depresión de la médula ósea, polineuritis, leucopenia e intolerancia gastrointestinal, y en estudios experimentales presentaron neurotoxicidad, daño testicular, toxicidad ovárica y efectos nocivos en colon, esófago y tejido mamario. Además de lo anterior, el período de tratamiento con estos fármacos es largo y a menudo se requiere su suspensión (Castro y Montalvo, 2006; Vassia *et al.*, 2004; López-Antuñano, 1997).

9

anterior refleja la importancia de continuar con la búsqueda de nuevos y más eficientes fármacos para el tratamiento de esta enfermedad.

1.3 LA MEDICINA TRADICIONAL Y LOS PRODUCTOS NATURALES COMO FÁRMACOS

Se estima que, actualmente, el 80% de la población en países desarrollados basa el cuidado de su salud en la medicina tradicional y que el 20% restante depende, en más del 45% de los casos, de fármacos derivados de productos naturales (Newman y Cragg, 2007; Fabricant y Farnsworth, 2001; Müller *et al.*, 2000).

La importancia de los productos naturales como nuevos fármacos o modelos para el desarrollo de los mismos es evidente si se toma en cuenta que en los últimos 25 años, de los casi 1,200 productos que se incorporaron al mercado como nuevos fármacos, el 5% corresponde a productos naturales con estructuras novedosas, el 23% son derivados semisintéticos de los mismos, el 10% corresponde a nuevas moléculas desarrolladas utilizando productos naturales como modelo y el 4% son productos naturales obtenidos por síntesis química (Newman y Cragg, 2007; Newman *et al.*, 2003). Adicionalmente, nueve de los 20 fármacos no proteínicos de mayor venta en el mundo son productos naturales o derivados de ellos y el 60% de los agentes antitumorales y antiinfecciosos comercialmente disponibles o en las últimas etapas de pruebas clínicas tienen su origen en productos naturales (Phillipson, 2001; Harvey, 2000; Yue-Zhong, 1988).

1.3.1 LAS PLANTAS COMO FUENTE DE METABOLITOS BIOACTIVOS

Las plantas constituyen el recurso medicinal más conocido y accesible para grandes núcleos poblacionales. Históricamente, el uso de las plantas como fuentes de agentes terapéuticos incluye el aislamiento de metabolitos bioactivos de uso directo como fármacos, la generación de productos semisintéticos de alta actividad y/o baja toxicidad, el uso de agentes como coadyuvantes en tratamientos farmacológicos, o el uso de la planta completa o partes de la misma como remedio herbal (Fabricant y Farnsworth, 2001).

Entre los fármacos más importantes aislados de plantas se encuentran los antimaláricos quinina y artemisina aislados de *Cinchona officinalis* y *Artemisia annua*, respectivamente; los analgésicos opioides codeína y morfina, aislados de *Papaver somniferum*; el antihipertensivo reserpina, aislado de *Rauwolfia serpentina*; el cardiotónico digoxina, aislado de *Digitalis purpurea*; el diterpenoide antitumoral taxol, aislado de *Taxus brevifolia*; y los alcaloides bisindólicos anticancerígenos vincristina y vinblastina, aislados de *Catharanthus roseus* (Figura 1.3) (Evans, 2002; Phillipson, 2001).

Sin embargo, y pese a la gran cantidad de productos naturales de origen vegetal utilizados como fármacos, se considera que, hasta ahora, menos del 15% de las 300,000 especies de plantas superiores que se cree existen en el mundo, han sido investigadas desde un punto de vista fitoquímico y/o farmacológico. Con base en lo anterior y tomando en cuenta el potencial de las plantas como productoras de metabolitos secundarios, se considera que existe aproximadamente un millón de diferentes productos naturales por identificarse (McChesney *et al.*, 2007; Harvey, 2000).

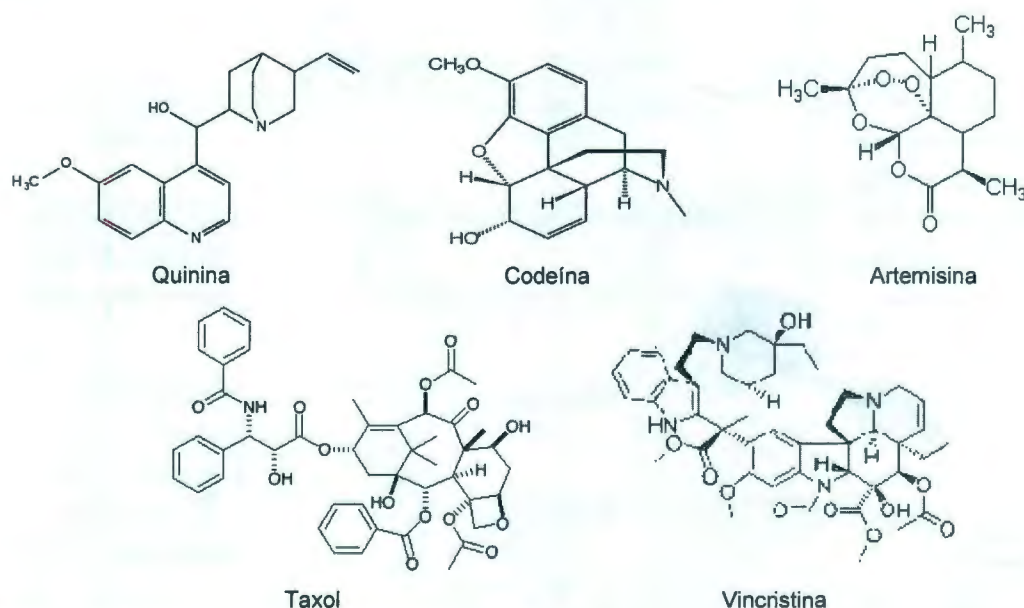
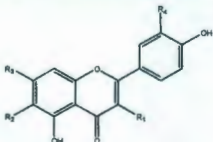
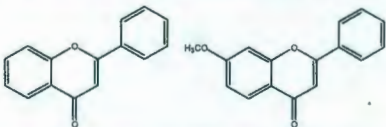
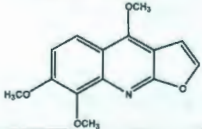


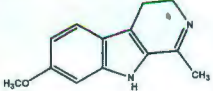
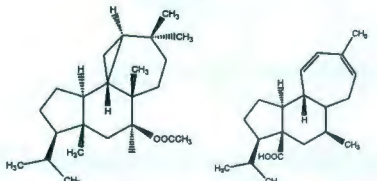
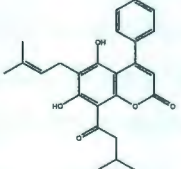
Figura 1.3. Fármacos importantes aislados de plantas.

1.3.2 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD *IN VITRO* CONTRA *Trypanosoma cruzi*

Entre las plantas reportadas con actividad tripanocida se destacan las pertenecientes a las familias *Fabaceae*, *Passifloraceae* y *Ancistrocladeae*, siendo la mayoría de los metabolitos activos aislados de estas familias, alcaloides de tipo quinoleínico (Ibañez *et al.*, 2008). Por otra parte, entre los metabolitos de origen vegetal con actividad contra *T. cruzi* se incluyen quinonas, esteroides, lignanolactonas, naftoquinonas, terpenos, flavonoides y alcaloides isoquinolínicos (Guzmán *et al.*, 2004; Kayser *et al.*, 2000). En el Cuadro 1.1 se enlistan los productos naturales producidos por plantas reportados recientemente con actividad *in vitro* contra *T. cruzi*.

Cuadro 1.1 Productos naturales de origen vegetal con actividad *in vitro* contra *T. cruzi*.

Especie	Metabolito	Actividad
<i>Chromolaena hirsuta</i> Hook. (Asteraceae)	Flavonoides: 3,6,3'-trimetoxiquercetagetina y 3,6-dimetoxiquercetagetina  a: R ₁ ,R ₂ ,R ₃ ,R ₄ =OCH ₃ b: R ₁ ,R ₂ ,R ₄ =OCH ₃ ; R ₃ =OH	IC ₅₀ 102 -352.6 µg/mL (Taleb <i>et al.</i> , 2004)
<i>Narcissus angustifolius</i> Curt. (Amarillydaceae)	Alcaloide isoquinolínico: Pancracina	IC ₅₀ 7.1 µg/mL (Labraña <i>et al.</i> , 2002)
<i>Conchocarpus heterophyllus</i> St.-Hil (Rutaceae)	Flavonoides: flavona y metoxiflavona 	Reducción (34.5%) de parásitos a 100 µg/mL (Ambrozín <i>et al.</i> , 2004)
<i>Xylopia aromatica</i> Mart. (Annonaceae)	Acetogeninas	Mortalidad (70%) de parásitos a 211 µg/mL (Tenorio <i>et al.</i> , 2006)
<i>Teclea trichocarpa</i> Engl. (Rutaceae)	Skimmianina 	IC ₅₀ 14.5 µg/mL (Mwangi <i>et al.</i> , 2010)
<i>Piper regnellii</i> Miq (Piperaceae)	Neolignano: [2-(4'-hidroxi-5'-metoxifenil)-3-metil-5(E)-propenil benzofurano] ó Eupomatenoide-5	IC ₅₀ 7.0 µg/mL (Shima <i>et al.</i> , 2006)

<i>Peganum harmala</i> L. (Zygophyllaceae)	Alcalóide indólico: harmalina 	Inhibición del 50 - 90% de epimastigotes a 50 µg/mL (Sepúlveda-Boza y Cassels, 1996)
<i>Pseudocedrela kotschy</i> Harms. (Meliaceae)	Limonoide: kotschyina A	IC ₅₀ >30 µg/mL (Hay <i>et al.</i> , 2007)
<i>Azorella compacta</i> Phil. (Umbelliferae)	Diterpenos azorellanol y ácido mulin-11,13-dien-20-oico 	Inhibición del 88- 95% de parásitos a 10µM (Araya <i>et al.</i> , 2003)
<i>Cussonia zimmermannii</i> Harms. (Araliaceae)	Poliacetilenos	IC ₅₀ 26 µg/mL (Senn <i>et al.</i> , 2007)
<i>Calophyllum brasiliense</i> Camb. (Clusiaceae)	Coumarinas: mammea A/BA y mammea A/BB 	IC ₁₀₀ 15- 90 µg/mL (Reyes-Chilpa <i>et al.</i> , 2008)

1.3.3 PRODUCTOS NATURALES CON ACTIVIDAD *IN VIVO* CONTRA *Trypanosoma cruzi*

Hasta ahora el número de estudios relacionados con la evaluación de la actividad tripanocida *in vivo* de productos naturales es limitado. Se ha reportado que el ajoeno (Figura 1.4), aislado de *Allium sativum* (Alavez-Magaña, 2006), y los alcaloides daphnolina y cepharanthina (Figura 1.4), aislados de *Albertisia papuana* y *Stephania cepharantha*, respectivamente, inhiben la parasitemia en ratones (Fournet *et al.*, 2000).

Recientemente se reportó que derivados de lignanolactonas como la hinokinina (Figura 1.4) poseen actividad *in vitro* e *in vivo* contra epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* (Saraiva *et al.*, 2007); en tanto que al evaluar la berberina, aislada de

Coptis chinensis y con demostrada actividad tripanocida *in vitro*, se encontró que este alcaloide no mejora la supervivencia de los ratones infectados (Schinella *et al.*, 2007).

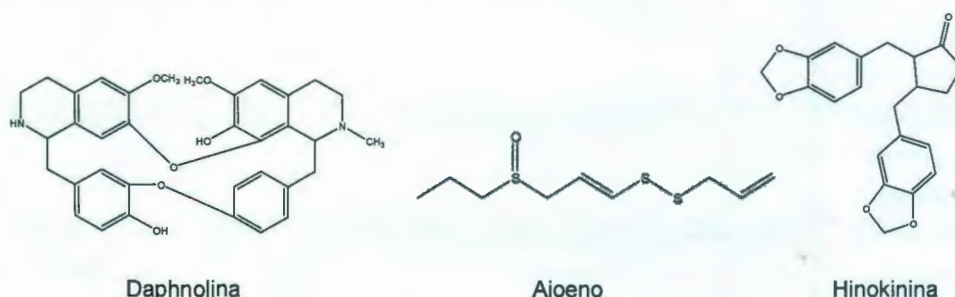


Figura 1.4. Metabolitos con actividad *in vivo* contra *T. cruzi*.

1.4 BIODIVERSIDAD EN MÉXICO Y LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

México, con más de 30,000 especies vegetales, es considerado como uno de los cinco países con mayor diversidad a nivel mundial (Convention on Biological Diversity, 2008). Sin embargo, a pesar de la gran riqueza y variedad de su flora, de las 7,000 especies de plantas medicinales clasificadas botánicamente, el porcentaje de las especies estudiadas desde el punto de vista fitoquímico y/o farmacológico es menor al 2% (Meckes *et al.*, 1993); lo anterior refleja el potencial de las plantas mexicanas como productoras de metabolitos con estructuras novedosas y con propiedades farmacológicas importantes (Estrada y Quezada, 1995).

La Península de Yucatán cuenta con una flora nativa muy característica dada sus condiciones climáticas y geográficas. Estudios realizados en Yucatán reportan cerca de 2,300 especies de plantas con flores, de las cuales 168 son consideradas endémicas o nativas (Pulido y Serralta, 1993). Este último grupo de plantas es de particular importancia debido a que, además de que cuentan con un número limitado de estudios fitoquímicos y farmacológicos, son especies que se encuentran en peligro de extinción debido a los procesos de transformación del ambiente (Durán *et al.*, 1997). El estudio de las especies endémicas o nativas de la flora de Yucatán como fuentes de metabolitos bioactivos, con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos o modelos para los mismos, representa un área de estudio importante dado que el descubrimiento de nuevos productos naturales, con aplicaciones biológicas comprobadas, le daría a estas especies un valor económico que hasta ahora no ha

sido reconocido y que podría contribuir a su conservación (Sánchez-Medina, 2007; Sánchez-Medina *et al.*, 2001; Durán *et al.*, 2000).

Recientemente, como parte de un estudio de bioprospección de la flora nativa de la península de Yucatán, se reportó que los extractos de *B. pulchra* (Boraginaceae), *B. bucidaefolia* (Malpighiaceae) y *S. yucatanensis* (Sapindaceae), además del extracto de hojas de *S. villosa* (Fabaceae), representan fuentes potenciales importantes de metabolitos bioactivos, dada su actividad contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Guzmán *et al.*, 2004; Vera-Ku, 2003).

1.5 *Byrsonima bucidaefolia*

Byrsonima bucidaefolia pertenece a la familia Malpighiaceae que comprende aproximadamente 1,250 especies distribuidas en 68 géneros (Stevens, 2009). Es un árbol pequeño con ramillas cubiertas de pelusa suave y tupida, presenta pecíolos de 6 mm, hojas redondeadas y amplias de 5-8 cm de largo, inflorescencias, pedicelos, sépalos de 3-3.5 cm de largo, fruto globoso amarillo y succulento (Anderson, 1993). Su distribución geográfica comprende Centro y Sudamérica, Belice, Guatemala, Honduras y México (Campeche, Quintana Roo, Veracruz, Yucatán).

1.5.1 USOS ETNOBOTÁNICOS

Es conocida comúnmente como sakpah o nance agrio y en la medicina tradicional es usada para el tratamiento de la disentería (Castillo-Ávila *et al.*, 2009).

1.5.2 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LA FAMILIA MALPIGHIACEAE

Estudios fitoquímicos en especies pertenecientes a la familia Malpighiaceae han reportado la presencia de flavonoides, terpenos, saponinas, taninos y triterpenos con actividad antifúngica como la α - y β -amirina aislados de *Byrsonima crassifolia* (Fernández *et al.*, 2006).

Otros metabolitos aislados en esta familia incluyen alcaloides indólicos como la harmina, harmalina, tetrahydroharmina y la 6-metoxitriptamina, obtenidos de *Banisteriopsis caapi* (Figura 1.5) (Mejía y Rengifo, 2000).

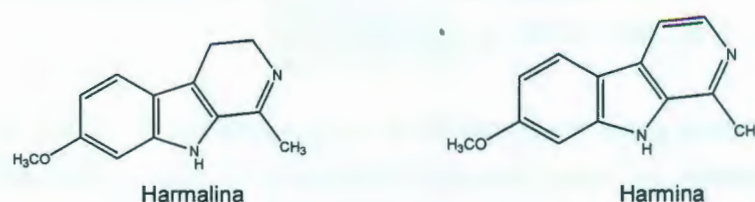
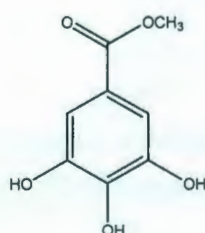


Figura 1.5. Ejemplos de metabolitos aislados de la familia Malpighiaceae.

1.5.3 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE *Byrsonima bucidaefolia*

Estudios biológicos han demostrado que el extracto metanólico de la corteza de *B. bucidaefolia* posee actividad leishmanicida (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007) y que el extracto de hoja posee actividad antioxidante y bacteriostática (Vera- Ku, 2003).

Recientemente los metabolitos con actividad antioxidante en el extracto de hoja de *B. bucidaefolia* se identificaron como galotaninos y derivados del ácido gálico (Figura 1.6) (Castillo-Ávila *et al.*, 2009).



Galato de metilo

Figura 1.6. Metabolito obtenido del extracto de *B. bucidaefolia*.

1.6 *Bouffieria pulchra*

Bouffieria pulchra pertenece a la familia Boraginaceae, que comprende alrededor de 100 géneros y 2,000 especies. La mayoría de los miembros de esta familia son arbustos o lianas, aunque hay algunas plantas leñosas; la mayoría crecen como plantas ornamentales, aunque algunas tienen usos medicinales (Özcan, 2008).

B. pulchra es un árbol de 1-10 m con hojas membranosas, simples, ovaladas a elípticas, alternadas; presenta vistosas flores blancas con filamentos largos, pétalos unidos, un estigma bilobulado y su fruto es seco en forma de cápsula y de color amarillo-verdoso.

1.6.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El género *Bourreria* se distribuye en México, Centroamérica y Florida, en tanto que, *B. pulchra* se encuentra ampliamente distribuida en toda la península de Yucatán; su área de distribución comprende los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Chiapas, Guatemala y Belice (Campos-Ríos, 2005).

1.6.2 USOS ETNOBOTÁNICOS

B. pulchra es conocida comúnmente como azar del monte o bakalche' y es utilizada en la medicina tradicional como antiviral, antipirético, antihemorrágico, para el tratamiento de enfermedades cutáneas (micosis, herpes, erupciones), dislocaciones y la pérdida del habla (Argueta *et al.*, 1994).

1.6.3 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LA FAMILIA BORAGINACEAE

Estudios fitoquímicos de la familia Boraginaceae reportan la presencia de fenoles, taninos condensados, saponinas, cianógenos, terpenos, alcaloides pirrolizidínicos y ácidos grasos como el ácido gamma- linolénico (Baldizán *et al.*, 2006; Raffauf, 1996).

Asimismo, de la familia Boraginaceae se han aislado el β -eudesmol, el espatulenol y el 4-metil,4-etenil-3-(1-metil-etenil)-1-(1-metil metanol) ciclohexano, obtenidos de *Cordia curassavica*, siendo el aceite esencial de esta planta, poseedor de actividad antimicrobiana y antifúngica (Hernández *et al.*, 2007), en tanto que de *Cordia cylindrostachya* se han aislado el flavonoide 5-hidroxi-3,7,4-trimetoxi-flavona, el β -sitosterol y un triterpeno, el ácido-3 α -hidroxiolean-12-en-27-oico (Figura 1.7), con actividad inhibitoria contra el crecimiento bacteriano *in vitro* (Ortega *et al.*, 2007).

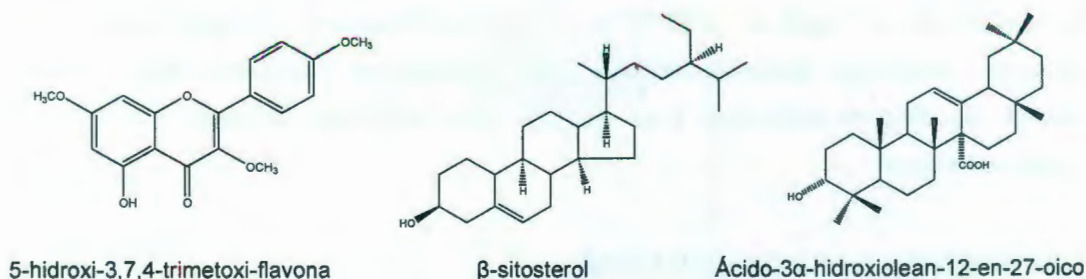


Figura 1.7. Ejemplos de metabolitos aislados de la familia Boraginaceae.

1.6.4 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE *Bourreria pulchra*

El conocimiento fitoquímico y farmacológico que se tiene de *B. pulchra* es limitado. Recientemente, del extracto de raíz, se reportó el aislamiento de β -sitosterol, α - y β -amirina, 1,4-difenil-2,3-butanodiol, ácido 3-acetoxiolean-12-en-28-oico, didehidroconicol, pulchral y pulchrol (Figura 1.8), siendo este último el único metabolito activo contra *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma cruzi* (Erosa, 2008).

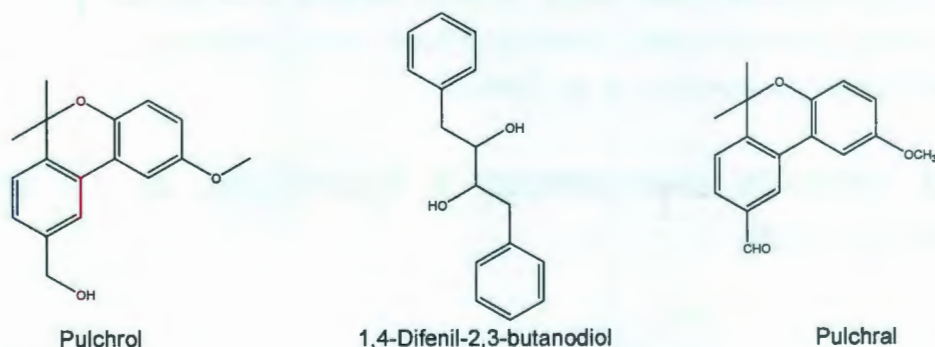


Figura 1.8. Ejemplos de algunos metabolitos aislados de *B. pulchra*.

1.7 *Senna villosa*

Senna villosa pertenece a la familia Fabaceae, cuya distribución es cosmopolita y comprende alrededor de 600 géneros divididos en tres subfamilias con aproximadamente 1,200 a 1,700 especies.

S. villosa es un arbusto frondoso, áspero a todo lo largo del tallo, el cual es grueso y de color gris; el follaje es de textura gruesa, bicoloreado, en el haz es verde y en el envés está descolorido, sus flores están dispuestas en forma alterna con 3-4 pares de

hojuelas largamente ovaladas de 2.5 a 6.5 cm. Las flores son hermafroditas, tienen sépalos membranosos, de color amarillo, dispuestos en racimos terminales, con cáliz tubuloso, pétalos con estibación imbricada y estambres libres. El fruto es una legumbre o vaina de 4-5 mm de ancho, carnosa, con estrangulaciones entre las semillas. Las semillas carecen de endospermo, con cotiledones delgados y membranosos (Pech-Solís, 1996).

1.7.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Se encuentra en el sureste de México desde el centro de Veracruz hasta Yucatán, en este último se localiza en los poblados de Valladolid, Santa Elena, Muna, Pixoy, Dzibilchaltún, Timucuy, Yaxcabá, Dzoncauich, Ticul, Uayma, Maní, Oxkutzcab, Ixmatkuil, Cantamayec.

1.7.2 USOS ETNOBOTÁNICOS

S. villosa se conoce comúnmente como saalche' y es empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de salpullido, para curar y secar granos, para ayudar a la cicatrización, para eliminar manchas blancas, ronchas, dismenorrea y también se utiliza como laxante (Flores, 2001).

1.7.3 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LA FAMILIA FABACEAE

Estudios fitoquímicos realizados a esta familia reportan la presencia de varios tipos de metabolitos que incluyen polisacáridos, alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenos, antocianidinas, proantocianidinas y dímeros de flavonoides. Asimismo, se ha identificado a las 9,10 antraquinonas hidroxiladas o metiladas en posición 2 o 3 como metabolitos característicos del género *Senna* (Pech-Solís, 1996).

1.7.4 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE *Senna villosa*

Se ha reportado que los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico de las hojas de *S. villosa* poseen actividad contra hongos y contra bacterias Gram positivas (Reyes-Manzanero, 1998; Escalante, 1996), y se han aislado dos quinonas antracénicas: el crisofanol (1,8-dihidroxi-3-metil-9,10-antraquinona) y el fiscion (1,8-dihidroxi-3-metoxi-6-metil-9,10-antraquinona) (Figura 1.10) (Pech-Solís, 1996).

Asimismo, se ha reportado que los extractos etanólico y clorofórmico de las hojas de *S. villosa* poseen actividad contra tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, respectivamente (Polanco-Hernández, 2008; Mena-Chin, 2006).

Recientemente, se aisló al acetato de 8-hidroximetilen-trieicosanilo, presentando actividad antiprotzoaria (Guzmán *et al.*, 2008).

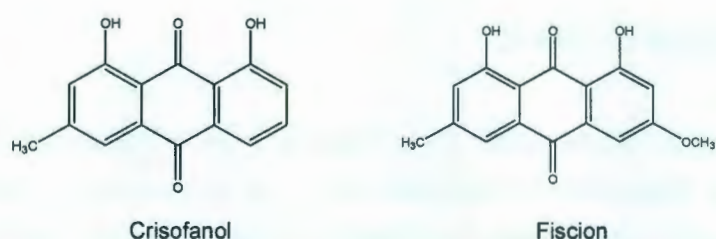


Figura 1.9. Metabolitos aislados de *S. villosa*.

1.8 *Serjania yucatanensis*

Serjania yucatanensis pertenece a la familia Sapindaceae, la cual es principalmente tropical con cerca de 1,500 especies de árboles, arbustos y lianas (Watson y Dallwitz, 2005).

S. yucatanensis presenta hojas alternas y compuestas, con flores generalmente blancas de simetría bilateral; éstas presentan cinco sépalos, cuatro pétalos cada uno, con un apéndice petaloide, tiene ocho estambres en fascículo excéntrico, presentan cuatro glándulas nectaríferas y su fruto es esquizocárpico compuesto de tres alas ensanchándose hacia la base con la semilla en el ápice (Sánchez-Medina *et al.*, 2001).

1.8.1 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

S. yucatanensis se encuentra distribuida en México en los estados de Chiapas, Tabasco y Yucatán y en Guatemala (Calónico, 2003; Espadas-Manrique *et al.*, 2003).

1.8.2 USOS ETNOBOTÁNICOS

En la medicina tradicional yucateca es conocida comúnmente como *chac uayam* o árnica de bejuco y es una planta medicinal utilizada para el tratamiento de apostemas, fístulas, infecciones, vómitos, dolor de cabeza y diarrea (Vera-Ku, 2003).

1.8.3 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE LA FAMILIA SAPINDACEAE

Estudios fitoquímicos realizados en especies de la familia Sapindaceae reportan la presencia de alcaloides, saponinas, taninos condensados y productos cianogénicos (Pino-Benítez, 2006).

Estudios realizados en las semillas de *Paullinia cupana* (guaraná) reportan la presencia de cafeína, teobromina, ácidos grasos, taninos y saponósidos, y el uso de estos metabolitos como estimulantes y para el tratamiento de diarreas ligeras (Carretero-Acame, 2001). Asimismo, de *Cupania glabra* se ha reportado un cupaniósido con actividad antibacteriana (Setzer *et al.*, 2005); en tanto que un estudio realizado al extracto de hojas de *Allophylus cominia* detectó la presencia de fenoles, taninos, saponinas, flavonoides, triterpenos y esteroides, y demostró que el extracto posee actividad hipoglucemiante (Marrero *et al.*, 2004).

De *Sapindus saponaria* se reporta el aislamiento de una saponina triterpénica de tipo hederagenina con actividad leishmanicida (Herrera *et al.*, 2007), en tanto que de *Nephelium longan* se han aislado los metabolitos escopoletina y estigmasterol (Figura 1.10) (Rahman *et al.*, 2007).

Finalmente, se ha reportado que el extracto de *Serjania erecta* posee actividad antiinflamatoria y nematocida (Slomp *et al.*, 2009; Gomig *et al.*, 2008) y que el extracto de *Serjania glabrata* posee actividad antioxidante (Meira *et al.*, 2007).

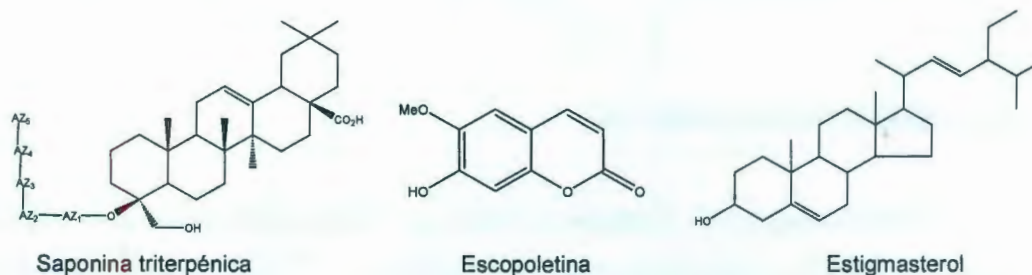


Figura 1.10. Metabolitos aislados de la familia Sapindaceae.

1.8.4 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DE *Serjania yucatanensis*

El estudio fitoquímico de *S. yucatanensis* es muy limitado, debido a que únicamente se reporta el aislamiento de una saponina obtenida del extracto de raíz de esta planta (Sánchez-Medina, 2007).

Dada la importancia de *B. pulchra*, *B. bucidaefolia*, *S. villosa* y *S. yucatanensis* como fuentes potenciales de metabolitos bioactivos de interés farmacológico y farmacéutico, como parte de este trabajo se planteó evaluar la actividad tripanocida de estas plantas y llevar a cabo la purificación biodirigida de los metabolitos responsables de la actividad antiprotozoaria detectada en el extracto con mayor actividad.

1.9 OBJETIVO GENERAL

La purificación biodirigida y la identificación de metabolitos bioactivos con actividad *in vitro* e *in vivo* contra *T. cruzi* en el extracto orgánico crudo de una planta nativa de la península de Yucatán.

1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar la actividad *in vitro* contra *T. cruzi* de cuatro plantas nativas de la península de Yucatán.
- ❖ Evaluar la actividad *in vivo* contra *T. cruzi* de los extractos más activos evaluados *in vitro*.
- ❖ Purificación biodirigida del extracto con mayor actividad *in vitro* e *in vivo* contra *T. cruzi*, utilizando diferentes estrategias de fraccionamiento y técnicas cromatográficas de separación.
- ❖ Elucidar las estructuras químicas de los productos obtenidos en forma pura, mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos.
- ❖ Determinar la actividad tripanocida de los metabolitos puros o semipuros obtenidos.

1.11 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

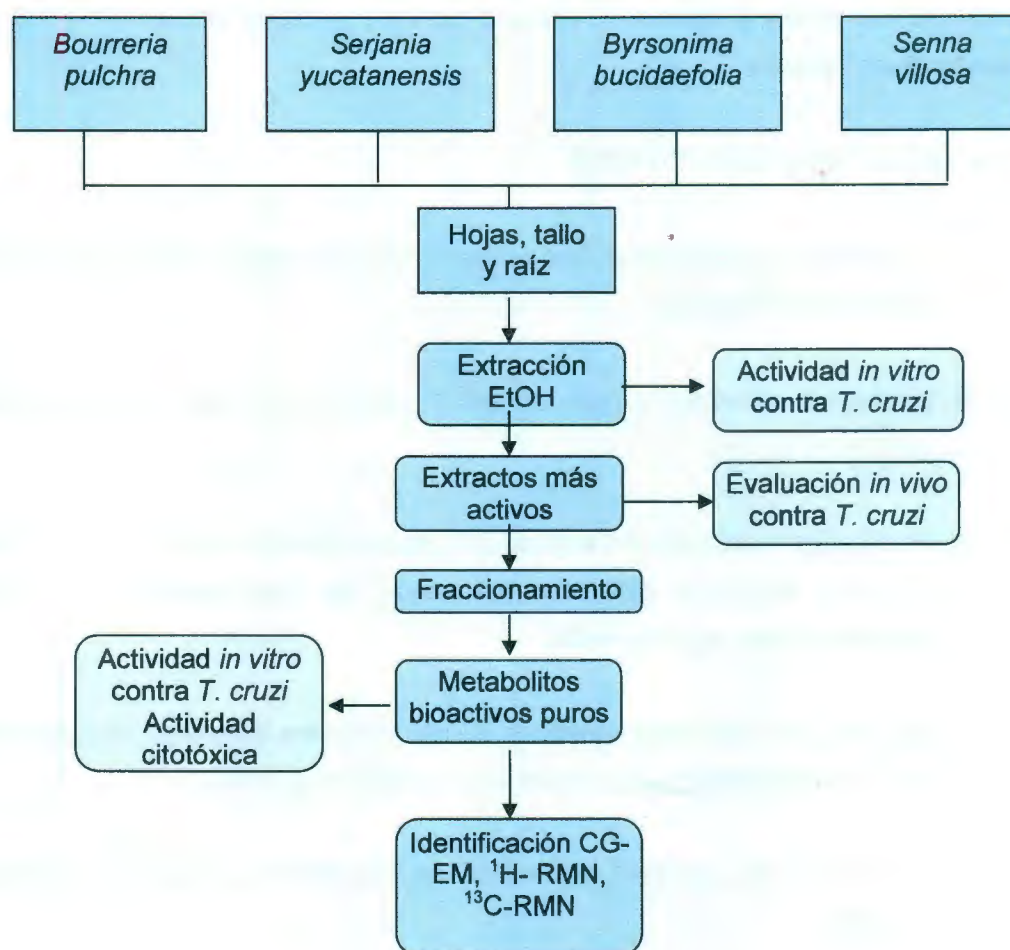


Figura 1.11. Estrategia experimental.

1.12 REFERENCIAS

- Alavez-Magaña, J. M. (2006). Metabolitos aislados de plantas con actividad contra *Trypanosoma cruzi*. Monografía de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. 85 p.
- Ambrozin, A., Fernández, J., Vieira, P. y S. Albuquerque (2004). Trypanocidal activity of *Meliaceae* and *Rutaceae* plant extracts. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 227-231.
- Anderson, W.R. (1993). Notes on neotropical Malpighiaceae- IV. Contributions from the University of Michigan Herbarium, 19, 355-392.
- Araya, E., Solange da Silva, I., Mortara, R., Manque, P., Cordero, E., Sagua, H., Loyola, A., Bórquez, J., Morales, G. y J. González (2003). Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 413-418.
- Argueta, V., Cano, L. y M. Rodarte (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, 1, 483-485.
- Baldizán, A., Domínguez, C., García, D., Chacón, E. y L. Aguilar (2006). Secondary metabolites in a tropical deciduous forest vegetation of the Venezuelan central plains. *Zootecnia Tropical*, 24, 213-232.
- Calónico, J. (2003). El género *Serjania* (Sapindaceae) en la Lacandona, Chiapas. Tesis de maestría. UNAM, México. 128 p.
- Campos-Ríos, M.G. (2005). Revisión del género *Borreria* P. Browne (Boraginaceae) en México. *Polibotánica*, 19, 39-103.
- Carretero-Acame, M.E. (2001). Alcaloides: derivados del triptófano y otros alcaloides. *Panorama Actual del Medicamento*, 25, 442-449.
- Castillo-Avila, M., García-Sosa, K. y L.M. Peña-Rodríguez (2009). Antioxidants from the leaf extract of *Byrsonima bucidaefolia*. *Natural Product Communications*, 4, 83-86.

- Castro, J.A. y M. Montalvo (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25, 471-479.
- Cevallos A.M. y R. Hernández (2007). *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas. Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de México. [Online] (Actualizado junio 2008). Disponible: http://www.microbiologia.org.mx/microbioenlinea/CAPÍTULO_19/Capítulo19.pdf [Acceso 10 junio 2010].
- Convention on Biological Diversity (2008). Status and trends of biodiversity. [online] (Actualizado diciembre 2008). Disponible: <http://www.cdb.int> [Acceso 12 noviembre 2010].
- Cruz, R.A. y J.M. Pickering (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 345-354.
- Dumonteil, E. (1999). Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Pública de México*, 41, 322-327.
- Durán R., Méndez M. y R. Orellana (1997). Manual de Propagación de Plantas Nativas de la Península de Yucatán. CICY, Mérida, Yucatán, México. 11 p.
- Durán, R., Campos, G., Trejo, J.C., Simá, P., May, F. y M. Juan (2000). Listado Florístico de la Península de Yucatán. Impresiones Profesionales del Sureste, Mérida, Yucatán, México. 99 p.
- Erosa, G. (2008). Characterization of secondary metabolites from natural sources. Tesis de doctorado. Lund University, Suecia. 138 p.
- Escalante, R. (1996). Detección de la actividad antimicrobiana de extractos de 10 leguminosas utilizadas en la medicina tradicional maya. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. 80 p.
- Espadas-Manrique, C., Duran, R. y J. Argaez (2003). Phytogeographic analysis of taxa endemic to the Yucatan peninsula using geographic information systems, the

domain heuristic method and parsimony analysis of endemism. *Diversity and Distributions*, 9, 313-330.

Estrada, E. y N. Quezada (1995). *Chamanismo y Plantas Medicinales. Lecturas para el diplomado internacional plantas medicinales de México*. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 39 p.

Evans, M.C. (2002). *Trease and Evans' Pharmacognosy*. Saunders, Canadá. 616 p.

Fabricant, D.S. y N.R. Farnsworth (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109, 69-75.

Fernández, M.C., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Cáceres, A., Rodríguez, B y A.M. Villar (2006). Estudio fitoquímico del extracto diclorometánico de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K.: aislamiento de compuestos activos. Congreso de fitoterapia [Online]. Disponible en: [http://www.medicosnaturistas.es/uploads/ponencias/XXIV Reunion AEMN/Carretero_2006.pdf](http://www.medicosnaturistas.es/uploads/ponencias/XXIV_Reunion_AEMN/Carretero_2006.pdf) [Acceso agosto 2010].

Flores, J.S. (2001). *Leguminosae: Florística, Etnobotánica y Ecología. Etnoflora Yucatanense*. UADY, Mérida, Yucatán. 33 p.

Fournet, A., Rojas de Arias, A., Ferreira, M., Nakayama, H., Schini, A. y M. Samudio (2000). Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13, 189-195.

Gomig, F., Pietrovski, E., Guedes, A., Dalmarco, E., Calderar, M., Guimarães, C., Pinheiro, R., Cabrini D. y M. Otuki (2008). Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 220-224.

Guzmán, E., González, R., Flores, S. y J. Zavala (2004). Activity of *Senna villosa* against *Trypanosoma cruzi*. *Pharmaceutical Biology*, 42, 504-507.

Guzmán, E., Pérez, C., Zavala, M.A., Acosta-Viana, K.Y. y S. Pérez (2008). Antiprotozoal activity of (8-hydroxymethylen)-trieicosanyl acetate isolated from *Senna villosa*. *Phytomedicine*, 15, 892-895.

- Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, 5, 294-300.
- Hay, A.E., Ioset, J.R., Ahua, K.M., Diallo, D., Brun, R. y K. Hostettmann (2007). Limonoid orthoacetates and antiprotozoal compounds from the roots of *Pseudocedrela kotschyi*. *Journal of Natural Products*, 70, 9-13.
- Henández, T., Canales, M., Teran, B., Ávila, O., Duran, A., García, A.M., Hernández, H., López, O., Fernández, M. y G. Ávila (2007). Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 137-141.
- Herrera, N., Correa, E., Cardona, D., Archbold, R., Torres, F., Quiñones, W. y I. Velez (2007). Estructura y actividad de sapogeninas triterpénicas. *Scientia et Technica*, 13, 87-90.
- Ibañez, S., Ruíz, G., Michel, R. y M. Sauvain (2008). Evaluación de la flora en el valle de Zongo contra leishmania y chagas. *Revista Boliviana de Química*, 25, 43-52.
- Jemal, A., Murray, T., Samuels, A., Ghafoor, A., Ward, E. y M.J. Thun (2003). Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 53, 5-26.
- Kayser, O., Kiderlen A.F. y S. Croft (2000). Natural Products as Potential Antiparasitic Drugs. *Universität Berlin, Alemania*. 72 p.
- Labraña, J., Machocho A.K., Kricsfalussy, V., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F. y J. Bastida (2002). Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus*. *Phytochemistry*, 60, 847-852.
- López-Antuñano, F.J. (1997). Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública de México*, 39, 463-471.
- Marrero, E., Valls, J., Veliz, T., Laguna, A. y O. Fernández (2004). Natural extract with hypoglycaemic activity and method of obtaining same. World intellectual property organization. Patent 110467.
- McChesney J.D., Venkataraman S.K. y J.T. Henri (2007). Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, 68, 2015-2022.

- Meckes, M., Mata, R y X. Lozoya (1993). *La Investigación Científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana en Investigación Farmacológica de Plantas Medicinales*. Secretaria de Salud, México. 272 p.
- Meira, M., David, J., Brandão, H., Branco, A., Agra, M., Barbosa, M., de Queiroz, L. y A. Giulietti (2007). Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. *Fitoterapia*, 78, 215-218.
- Mejía, K. y E. Rengifo (2000). *Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana*. Tarea Asociación Gráfica Educativa, Lima, Perú. 286 p.
- Mena-Chin, M. M. (2006). Actividad antiparasitaria *in vivo* del extracto etanólico de las hojas de *Senna villosa* (P. Miller) Irwin y Barneby contra *Trypanosoma cruzi*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. 88 p.
- Müller, H., Brackhagen, O., Brunne, R., Henkel, T. y F. Reichel (2000). The role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 206-220.
- Mwangi, E.S., Keriko, J.M., Machocho, A.K., Wanyonyi, A.W., Malebo, H.M., Chabira S.C. y P.K. Tarus (2010). Antiprotozoal activity and cytotoxicity of metabolites from leaves of *Teclea trichocarpa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 726-731.
- Newman, D.J. y G.M. Cragg (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-477.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. y K.M. Snader (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.
- Ortega, F.J., Barboza, U.A., Peña, N. y D. Ávila (2007). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación antimicrobiana del extracto neutro de las hojas de *Cordia cylindrostachya* (Boraginaceae). *Ciencia*, 15, 294-300.
- Özcan, T. (2008). Analysis of the total oil and fatty acid composition of seeds of some Boraginaceae taxa from Turkey. *Plant Systematics and Evolution*, 274, 143-153.

- Pech-Solís, Gwendoli (1996). Aislamiento e identificación de quinonas presentes en las hojas de *Senna villosa* Mill. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. 93 p.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R. y M. Mut-Martín (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Phillipson J.D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, 56, 237-243.
- Pino-Benítez, N. (2006). Genero *Paullinia* L. (sapindaceae) y su distribución en el departamento del Chocó, Colombia. [Online] (Actualizado diciembre 2005). Disponible: http://www.reuna.unalmed.edu.co/temporales/memorias/especies/Vegetales/21_GENERO%20Paullinia%20L.htm [Acceso junio 2010].
- Polanco-Hernández, G.M. (2008). Actividad *in vivo* del extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa* contra las formas de amastigote de *Trypanosoma cruzi* en fase crónica de la enfermedad. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. 95 p.
- Pulido, M.T. y L. Serralta (1993). Lista Anotada de las Plantas Medicinales de Uso Actual en el Estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. México. 106 p.
- Raffauf, R. (1996). Plant Alkaloids: a Guide to their Discovery and Distribution. Haworth Press. 255 p.
- Rahman, K., Nahar, K., Khan, M. y C. Hasan (2007). Phytochemical and biological studies of *Nephelium longan*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6, 68-72.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Vega-Ávila, E., Abe, F., Kinjo, J. y S. Hernández-Ortega (2008). Trypanocidal constituents in plants. Mammea-type coumarins. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 431-436.

- Reyes-Manzanero, D.P. (1998). Análisis de las fracciones activas de los extractos apolares de las hojas de *Senna villosa* Mill. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México. 87 p.
- Rodriguez-Coura, J. y S.L. de Castro (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.
- Rodríguez, M.E., Briceño, L. y M.A. Chiurillo (2008). Tripanosomiasis Americana: Aspectos teóricos. Curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Instituto de Biomedicina, UCV, Caracas, Venezuela. [Online] (Actualizado septiembre 2008).
Disponible en: http://www.biolac.unu.edu/PDF/BioM_Tripanosomiasis.pdf [Acceso 8 mayo 2010].
- Romero, R. (1999). Microbiología y Parasitología Humana. Médica Panamericana, México. 904 p.
- Sánchez-Medina, A. (2007). Phytochemical and pharmacological studies on some endemic yucatecan medicinal plants. Tesis de Doctorado. Universidad de Greenwich, Londres. 204 p.
- Sánchez-Medina, A., García-Sosa, K., May-Pat, F. y L.M. Peña-Rodríguez (2001). Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in the Yucatecan traditional medicine. Part 1. Antioxidant, antimicrobial, and β -glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine*, 8, 144-151.
- Saraiva, J., Vega, C., Rolon, M., da Silva, R., Andrade, M., Donate, P., Kenupp, J., Gómez, A. y S. Albuquerque (2007). *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 100, 791-795.
- Schinella, G., Tournier, H. y A. Zaidenberg (2007). *In vitro* and *in vivo* activity of berberine on the trypomastigote blood from *Trypanosoma cruzi*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6, 81-85.
- Senn, M., Gunzenhauser, S., Brun, R. y U. Séquin (2007). Antiprotozoal polyacetylenes from Tanzanian medicinal plant *Cussonia zimmermannii*. *Journal of Natural Products*, 70, 1565-1569.

Sepúlveda-Boza, S. y B.K. Cassels (1996). Plants metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Médica*, 62, 98-105.

Setzer, W., Vogler, B., Schmidt, J., Petty, J. y W. Haber (2005). Isolation of cupanioside, a novel cytotoxic and antibacterial long-chain fatty alcohol glycoside from the bark of *Cupania glabra*. *Planta Medica*, 71, 686-688.

Shima, P., Ueda-Nakamura, T., Prado-Dias, B., García, D. y C. Nakamura (2006). Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck against *Trypanosoma cruzi*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29, 2126-2130.

Slomp, L., Pereira, P., De Castro, S., Zingaretti, S. y R. Beleboni (2009). *In vitro* nematocidal effects of medicinal plants from Sao Paulo state, Brazil. *Pharmaceutical Biology*, 47, 230-235.

Stevens, P.F. (2009). Angiosperm Phylogeny Website. [Online] (Actualizado octubre 2009). Disponible en: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [Acceso septiembre 2010].

Storino, R. (2002). Enfermedad de Chagas con parasitemia evidente. *Revista Argentina de Cardiología*, 70, 15-39.

Taleb, S.H., Salvador, N.J., Balanco, J.M., Albuquerque, S. y D.C.R. de Oliveira (2004). Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, 18, 250-254.

Tay, J., Lara R., Velasco O. y M. Gutiérrez (2003). *Parasitología Médica*. Méndez, México. 876 p.

Teixeira, A.R., Nitz, N., Guimaro, M.C., Gomes, C. y C.A. Santos-Buch (2006). Chagas disease. *Postgraduate Medical Journal*, 82, 788-798.

Tenorio, J.L., Hernández, J.E., Carvajal, G.A. y J.D. Ramos (2006). Actividad tripanomicida en el *Trypanosoma cruzi* del extracto etanólico de las semillas de la *Xylopia aromatica*. *Revista Cubana de Farmacia*, 40, 20-23.

- Vassia, M., Patti, C., Burrote, S y J. Bustamante (2004). Análisis electrocardiográficos post-tratamiento con benznidazol en infección con dos cepas de *T. cruzi*. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.[Online] (Actualizado abril 2010). Disponible en:<http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/tf334.pdf>
- Vera-Ku, M. (2003). Evaluación de la actividad biológica en plantas nativas de la península de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 175 p.
- Watson, L. y M.J. Dallwitz (2005). The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification and information. [Online] (Actualizado septiembre 2005). Disponible en: <http://delta.intkey.com> [Acceso junio 2010].
- WHO (World Health Organization), 2010. Descriptive note No.340. [Online] (Actualizado junio 2010). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Acceso 15 Julio 2010].
- WHO (World Health Organization), 2000. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). Natural products for parasitic diseases. TDR News, 62,4.
- Yue-Zhong, S. (1988). Recent natural products based drug development, a pharmaceutical industry perspective. Journal of Natural Products, 61, 1053-1071.

CAPÍTULO II

IN VITRO AND IN VIVO TRYPANOCIDAL ACTIVITY OF NATIVE PLANTS FROM THE YUCATAN PENINSULA*

Glendy Polanco-Hernández,[†] Fabiola Escalante-Erosa,[†] Karlina-García-Sosa,[†] Karla Acosta-Viana,[‡] Manuel J. Chan-Bacab,[¶] Hernán Sagua-Franco,[§] Jorge González,[§] Luis Osorio-Rodríguez,[§] Rosa E. Moo-Puc,⁺ Luis M. Peña Rodríguez[†]

[†]Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán; [‡]Unidad Biomédica, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi"; [¶]Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche; [§]Unidad de Parasitología, Universidad de Antofagasta; ⁺Unidad de Investigación Médica Yucatán, Centro Médico "Ignacio García Téllez" IMSS.

2.1 ABSTRACT

Ethanol extracts of *Senna villosa*, *Serjania yucatanensis*, *Byrsonima bucidaefolia* and *Bouyeria pulchra* were evaluated for their *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. Results showed that the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* were the most active against the parasite. However, only the leaf extract of *S. yucatanensis* showed noteworthy trypanocidal activity when tested *in vivo*, significantly reducing the parasitaemia in infected mice. This same extract inhibited the egress of trypomastigotes and proved not to be cytotoxic.

Key words: Chagas disease - trypanocidal activity - native plants - *Serjania yucatanensis* - *Bouyeria pulchra*

*Los resultados descritos en este capítulo forman parte del Manuscrito "In vitro and in vivo trypanocidal activity of native plants from the Yucatan Peninsula", sometido a *Parasitology Research*. Autores: Glendy Polanco-Hernández, Fabiola Escalante-Erosa, Karlina-García-Sosa, Karla Acosta-Viana, Manuel J. Chan-Bacab, Hernán Sagua-Franco, Jorge González, Luis Osorio-Rodríguez, Rosa E. Moo-Puc, Luis M. Peña Rodríguez.

2.2 INTRODUCTION

Chagas disease (American trypanosomiasis) is an important public health problem in Latin America, where there are an estimated 10 million infected persons (WHO, 2010). The disease is caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and, to date, there is no satisfactory chemotherapy for the disease. The use of benznidazole, nifurtimox, and allopurinol to treat Chagas disease is limited to the acute and chronic phases of the disease, and their use is limited because of their severe toxic effects (Castro and Montalvo, 2006; Rodríguez-Coura and de Castro, 2002).

Natural products represent an important alternative for the development of new drugs or models for them. Although the plant kingdom is one of the most important sources of bioactive metabolites with potential application as therapeutic agents, less than 15% of all plant species have been studied from a phytochemical or pharmacological point of view (Harvey, 2000).

The Yucatan peninsula has a characteristic native flora due to its particular geographical location and climatic conditions; however, to date, the number of studies on the native plants of the Yucatan peninsula as potential sources of bioactive metabolites has been limited. Recently, the presence of trypanocidal activity against epimastigotes of the Tulahuen and Y strains of *T. cruzi* was reported in the leaf extracts of *Bourreria pulchra* Mill. (Boraginaceae), *Byrsonima bucidaefolia* Standl. (Malpighiaceae), *Senna villosa* Mill. (Fabaceae), and the root extract of *Serjania yucatanensis* Standl. (Sapindaceae) (Guzmán *et al.*, 2004; Vera-Ku, 2003). We wish to report herein on the results of the *in vitro* evaluation of the trypanocidal activity of the extracts of leaves, stems and roots of the four species when tested against epimastigotes of the Y strain of *T. cruzi*, as well as the cytotoxic effect and *in vivo* and *in vitro* activity of the most active extracts against trypomastigotes of *T. cruzi*, together with their capacity to inhibit the egression of *T. cruzi* parasites from infected cells.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1 PLANT MATERIAL

Leaves, stems and roots of *B. pulchra*, *S. yucatanensis*, *S. villosa* and *B. bucidaefolia* were collected in September 2008 at the 8.5 Km mark of the Yaxcabá-Libre Unión highway in Yucatan, Mexico. The plant material was identified by taxonomist Paulino

Simá-Polanco and a voucher specimen of each species was deposited at the herbarium of "Centro de Investigación Científica de Yucatán" under collection numbers 2258, 2983, 2508, 4488, respectively.

2.3.2 PREPARATION OF PLANT EXTRACTS

Leaves, stems and roots were first dried for three days at room temperature and then for three days in an oven at 50 °C. The plant material was ground and extracted three times with ethanol (400 mL/20 g of plant material) at room temperature for 72 h. The solvent was eliminated under reduced pressure to produce the corresponding crude extracts from the leaves, stems and roots of each plant (12 extracts in total).

2.3.3 CELL CULTURES

Vero cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) at 37° C, in 75 cm³ growth flasks, using a cell culture incubator in a 5% CO₂ humid atmosphere.

2.3.4 PARASITES

Epimastigote forms of the Y (isolated from a patient in Brazil) (Silva and Nussenzweig, 1953) and Ninoa strains (isolated from a patient with Chagas' disease in Oaxaca, Mexico) (Bosseno *et al.*, 2002), trypomastigote forms of the Y strain and blood trypomastigote forms of the H₄ strain (isolated from a patient with Chagas' disease in Yucatan, Mexico) (Barrera-Pérez *et al.*, 2001) of *T. cruzi* were used in this study. Epimastigotes were maintained through successive passes in Liver Infusion Tryptose medium (LIT) supplemented with 10% FBS (Camargo, 1964); trypomastigotes were obtained from infected Vero cell cultures as previously described (De Diego *et al.*, 1988), and blood trypomastigotes were obtained by successive infections of BALB/c mice.

2.3.5 IN VITRO TRYPANOCIDAL ACTIVITY AGAINST EPIMASTIGOTES OF *T. cruzi*

The trypanocidal activity of plant extracts was assayed on epimastigotes of *T. cruzi* (Y and Ninoa strains). The epimastigotes of *T. cruzi* were cultivated in LIT medium supplemented with 10% of SFB and cultured at 28 °C (Camargo, 1964). Experiments

were carried out using 96-well microplates containing different concentrations of the plant crude extracts (100, 50 and 25 µg/mL) diluted in DMSO. Then 100 µL of 1×10^5 epimastigotes/mL were added to the wells and the plates were incubated for 48 h. The activity was expressed as IC₁₀₀ (µg/mL) and the controls included cultures of the parasites in DMSO 0.5% (negative control), in culture medium (blank) or in the presence of the reference drugs nifurtimox (Lampit®) and allopurinol (Zyloprim®) (positive controls). The assays were performed in duplicate.

2.3.6 IN VITRO TRYPANOCIDAL ACTIVITY AGAINST TRYPOMASTIGOTES OF *T. cruzi*

The trypanocidal activity of leaf extracts of plants under study was assayed on trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Experiments were carried out in 96-well microplates containing 1×10^7 parasites/mL. The plates were incubated at 28 °C for 48 h, testing the different extracts at concentrations of 100, 50 and 25 µg/mL. After incubation, the medium was removed and the wells were washed with PBS pH 7.2. Subsequently, DMEM medium (100 µL) containing resazurin (4.4 µM) was added to each well and the plates were incubated for an additional 4 h. The plates were read in a fluorescence scanner (Rolón *et al.*, 2006; Răz *et al.*, 1997), at an excitation wavelength of 535 nm and 595 nm, using a Tecan reader (Anoopkumar-Duke *et al.*, 2005). Absorbance values are expressed in percentage values relative to those obtained from control wells. Controls refer to the incubation of trypomastigotes in DMSO 0.5% (negative control) or culture medium (blank). The assays were performed in triplicate.

2.3.7 IN VIVO TRYPANOCIDAL ACTIVITY

Four groups of six BALB/c female mice, weighing approximately 22 g, were used. Mice were divided into the following groups: group 1, infected animals treated with PBS (negative control); group 2, animals treated with allopurinol (positive control); group 3, animals treated with leaf extract of *S. yucatanensis* (100 mg.kg⁻¹.day⁻¹); group 4, animals treated with leaf extract of *B. pulchra* (100 mg.kg⁻¹.day⁻¹). The animals were infected by means of an intraperitoneal injection of 3×10^4 blood trypomastigote forms of *T. cruzi* (H₄ strain). The various treatments were carried out in parallel and were initiated 15 days after infection; the mice received different treatments once a day by oral route, for 15 days. Parasitaemia was evaluated by collecting blood from the

animal's tail, starting at the fourth day of infection, and counting the number of *T. cruzi* trypomastigote in a Neubauer chamber (Brenner, 1962). Survival was determined as the percentage of mice that lived during the experiment. The experiments were carried out under the approval of the Bioethics Committee of Centro de Investigaciones Regionales Dr. "Hideyo Noguchi", in Merida, Yucatan, México.

2.3.8 CYTOTOXIC ACTIVITY AGAINST VERO CELLS

The cytotoxicity of the leaf extracts of *B. pulchra*, *S. yucatanensis*, *S. villosa*, and *B. bucidacifolia* was evaluated using the reduction of resazurin (O'Brien *et al.*, 2000) and sulforhodamine B (Vichai and Kirtikara, 2006) methods on Vero cells adhered to 96-well plates. Cell viability was evaluated after two days of incubation at 37 °C in a CO₂ atmosphere. Cytotoxicity is presented as IC₅₀ for the sulforhodamine B method and as a percentage of viability for the resazurin method. The assays were performed in triplicate.

2.3.9 INHIBITION OF *T. cruzi* EGRESS TEST

Vero cells (4×10^4) adhered to 96-well plates were infected with 2×10^5 trypomastigotes (Y strain) per well and incubated under standard conditions (González *et al.*, 1990) for 24 h. The cells were washed with DMEM medium to remove extracellular parasites and the infected cell cultures were treated with leaf extracts of *B. pulchra* and *S. yucatanensis* (100 µg/mL), observing the trypomastigotes egresses on the fifth day after infection. Inhibition in the egression of the parasites was determined by counting the trypomastigotes number in the cell culture supernatant medium using a Neubauer chamber and comparing it with those observed in the negative control (medium-diluted DMSO). The bioassays were performed eight times.

2.3.10 STATISTICAL ANALYSES

The statistical analyses were performed using Prism program 5.0 software. Data are presented as mean values $\pm$ S.D. Statistical analyses: one way ANOVA and post-hoc Tukey's test were used to compare different experimental groups.

2.4 RESULTS

A preliminary evaluation of the *in vitro* trypanocidal activity of the 12 crude extracts from the four native plants of the Yucatan peninsula, when tested against two strains of *T. cruzi* epimastigotes, showed that the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* had the highest activity, followed by the leaf extracts of *B. bucidaefolia* and *S. villosa* which proved to be active against only one of the two parasite lines (Table S2.1). These results were confirmed when the IC₁₀₀ values of all the extracts were determined and the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* proved to be the most active (Table 2.1).

Table 2.1 Trypanocidal activity of crude extracts from four native plants of the Yucatan peninsula.

Species	Part used	IC ₁₀₀ µg/mL Epi	IC ₁₀₀ µg/mL Epi
		Y strain	Ninoa strain
<i>Bourreria pulchra</i>	Leaf	> 100	100
	Stem	> 100	> 100
	Root	> 100	> 100
<i>Senna villosa</i>	Leaf	> 100	> 100
	Stem	> 100	> 100
	Root	> 100	> 100
<i>Serjania yucatanensis</i>	Leaf	100	100
	Stem	> 100	> 100
	Root	> 100	> 100
<i>Byrsonima bucidaefolia</i>	Leaf	> 100	> 100
	Stem	> 100	> 100
	Root	> 100	> 100
Allopurinol ^a		> 100	> 100
Nifurtimox ^a		100	100

^a positive controls; Epi: epimastigotes of *T. cruzi*

Examination of the *in vitro* trypanocidal effect of the four leaf extracts against trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain) demonstrated that the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* were the only ones able to inhibit the trypomastigotes growth in two of the tested concentrations (100 and 50 µg/mL; Figure 2.1). None of the leaf extracts of the four plants showed cytotoxic activity when tested against Vero cells using the resazurin (98% of cells survived at 100, 50 and 25 µg/mL) (Figure 2.2) or

sulforhodamine B methods (IC_{50} range between 211.4 - 946.7 $\mu\text{g/mL}$ for the various extracts) (Table S2.2).

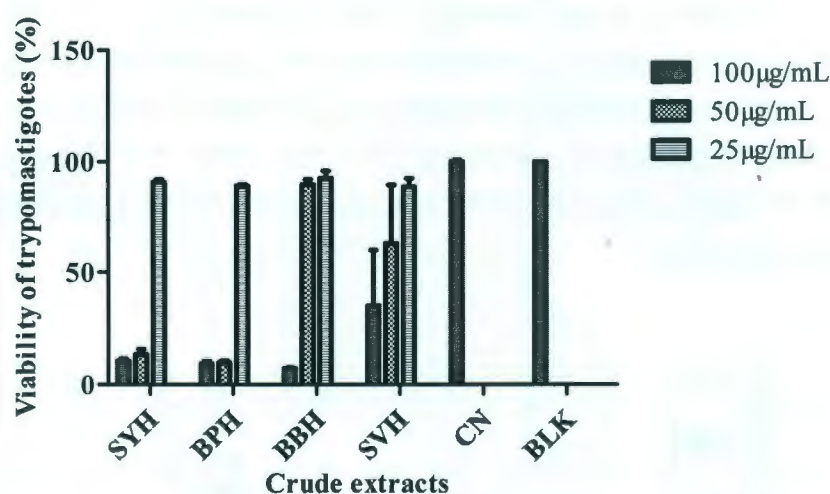


Figure 2.1. Activity of crude extracts of native plants of the Yucatan Peninsula against trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). CN: negative control; BLK: blank; SYH: leaf extract of *S. yucatanensis*, BPH: leaf extract of *B. pulchra*; BBH: leaf extract of *B. bucidaefolia*; SVH: leaf extract of *S. villosa*.

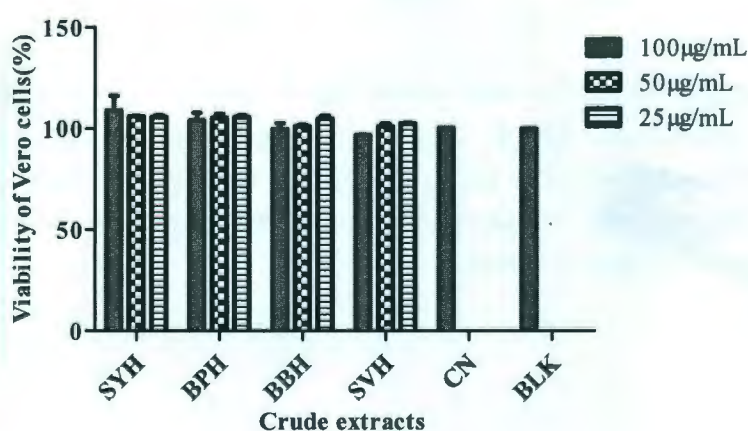


Figure 2.2. Cytotoxic effect of crude extracts at 100, 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$ against Vero cells by the resazurin method. Data are expressed as the percentage of viability of Vero cells as compared with the growth of untreated control cells. SYH: leaf extract of *S. yucatanensis*, BPH: leaf extract of *B. pulchra*; BBH: leaf extract of *B. bucidaefolia*; SVH: leaf extract of *S. villosa*.

Testing of the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* for their *in vivo* trypanocidal activity indicated that the leaf extract of *S. yucatanensis* was the most active, with a decrease of 70% or more in the parasitaemia of the animals treated with the extract compared to that observed in the negative control ($p < 0.05$) (Figure 2.3). Additionally, the decrease in the parasitaemia of individuals treated with the leaf extract of *S. yucatanensis* was reflected in an absence of mortality in the animals of the group (Figure 2.4). Finally, results also showed that the extract of *S. yucatanensis*, when tested at 100 $\mu\text{g/mL}$, was able to inhibit the egress of *T. cruzi* (Y strain) parasites from Vero cell (Figure 2.5).

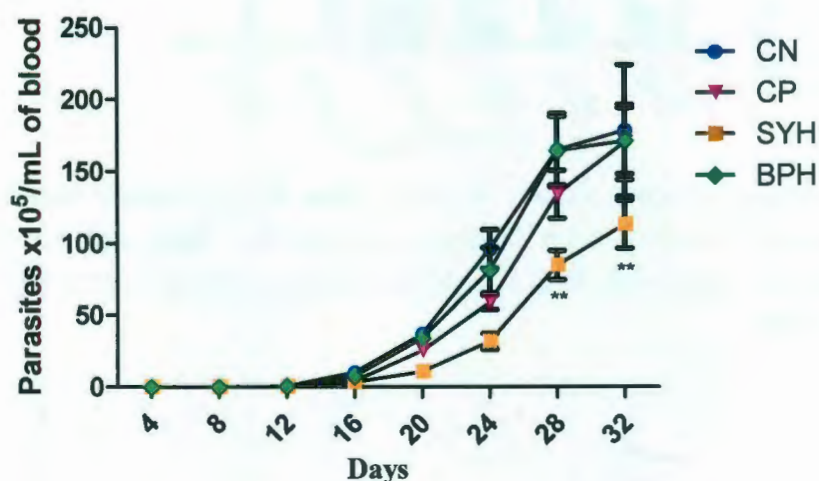


Figure 2.3. Parasitaemic curve of mice infected with *T. cruzi* and treated by oral route with extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra*. CN: negative control; CP: positive control (allopurinol); SYH: leaf extract of *S. yucatanensis*, BPH: leaf extract of *B. pulchra*. Statistical analysis was performed using One-way Anova and post hoc Tukey's test: ** $p < 0.05$ compared with negative control and positive control.

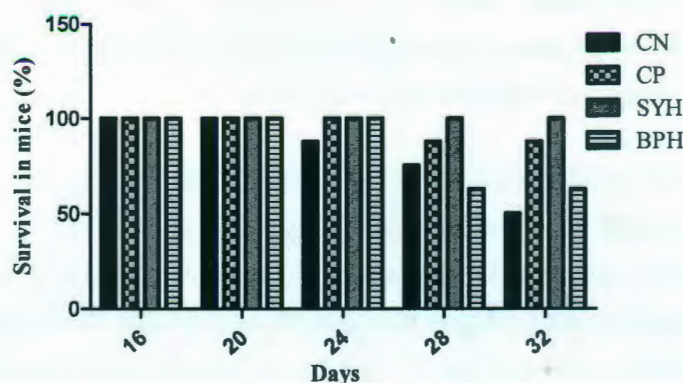


Figure 2.4. Survival rates of *T. cruzi* infected mice during the *in vivo* treatment with extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra*. CN: negative control; CP: positive control (allopurinol); SYH: leaf extract of *S. yucatanensis*, BPH: leaf extract of *B. pulchra*.

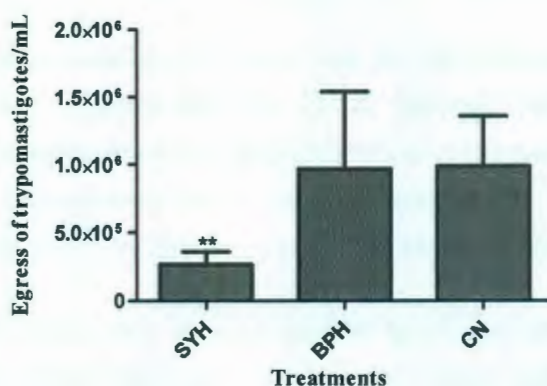


Figure 2.5. Inhibition of the egress of *T. cruzi* trypomastigotes by leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* tested at 100 $\mu\text{g/mL}$. CN: negative control; SYH: leaf extract of *S. yucatanensis*, BPH: leaf extract of *B. pulchra*. Statistical analysis was performed using Anova and post hoc Tukey's test: ** $p < 0.05$ compared with negative control and leaf extract of *B. pulchra*.

2.5 DISCUSSION

The study of bioactive crude extracts from plants represents a promising alternative for finding secondary metabolites with pharmacological activity. Historically, the investigation of plants as sources of therapeutic agents includes the isolation of

bioactive metabolites used directly as commercial drugs, the development of coadjuvant agents in pharmacological treatments, and the use of plants, whole or in parts, as herbal remedies (Fabricant and Farnsworth, 2001).

The initial evaluation of the trypanocidal effect against epimastigotes of *T. cruzi* of the organic crude extracts of leaves, stems and roots of *B. bucidacifolia*, *B. pulchra*, *S. yucatanensis* and *S. villosa*, four species belonging to the native flora of the Yucatan peninsula that have a limited number of phytochemical and/or pharmacological studies, showed that the leaf extracts of the four plants were active; however, the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* proved to be the most active ($IC_{100} = 100 \mu\text{g/mL}$), with values that were equal or greater than those of the reference drugs nifurtimox and allopurinol, respectively. It is important to point out that the leaf extract of *S. yucatanensis* showed activity against the two strains (Y and Ninoa) of *T. cruzi*, whereas the leaf extract of *B. pulchra* only showed activity against the Ninoa strain.

On the basis of these initial results, and taking into account those reported previously (Guzmán *et al.*, 2004; Vera-Ku, 2003), the leaf extracts of the four plants were evaluated for their trypanocidal activity against trypomastigotes of *T. cruzi*, finding that the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* were the only ones able to reduce the number of trypomastigotes by 95% or more at 100 and 50 $\mu\text{g/mL}$.

In order to rule out the possibility that the trypanocidal activity detected in the crude extracts was due to their cytotoxicity, the leaf extracts of the four plants were tested for their *in vitro* cytotoxic activity against Vero cells, using the sulforhodamine B and resazurin methods. Vero is a cell line commonly used to test for cytotoxicity and viability of cell cultures exposed to drugs or natural products, due to its high sensitivity and for best reproducing the conditions in mammals. While the sulforhodamine B method is based on the staining of specific cell components and the measurement of cellular debris after incubating the cells in the presence of the product being evaluated (Vichai and Kirtikara, 2006), the resazurin method is based on the reduction of resazurin by oxido-reductase enzymes (Escobar *et al.*, 2009). The results obtained using both methods, which are reported to produce similar findings (Escobar *et al.*, 2009), showed that none of the leaf extracts were cytotoxic and indicated that the significant antiprotozoal activity detected in the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra* was not due to their cytotoxicity.

In view of the high trypanocidal activity shown *in vitro* by the leaf extracts of *S. yucatanensis* and *B. pulchra*, the leaf extracts of the two plants were assayed *in vivo*. The results showed a significant activity, but only in the leaf extract of *S. yucatanensis* which caused a decrease in parasitaemia that was greater than that of allopurinol® ($p < 0.05$) during the course of the infection; additionally, the group treated with the leaf extract of *S. yucatanensis* also displayed a better survival rate (100% of survival after 32 days of infection) than that of the group treated with allopurinol.

In order to explore the possible mode of action of the metabolites responsible for the trypanocidal activity detected in the leaf extract *S. yucatanensis*, the crude extract was tested for its capacity to inhibit the egress of *T. cruzi* parasites from infected cells. The assay reproduces *in vitro* what it happens in mammals, i.e. trypomastigotes enter the body and penetrate the cells, where they transform into amastigotes that multiply and differentiate back into trypomastigotes, which are then released into the bloodstream to infect other cells. In this assay the cells are infected with trypomastigotes and then treated with the extract; after incubation, the number of parasites that were able to leave the cells are quantified and compared to those of the controls. Testing of the leaf extract of *S. yucatanensis* showed that it inhibits the egress of *T. cruzi* parasites from infected cells when evaluated at 100 µg/mL. These results are of particular interest because they suggest that the bioactive metabolites in the crude extract can penetrate the cell and affect the parasites inside, thus inhibiting one of the crucial events in the cycle of the parasite.

Although there is no phytochemical or pharmacological knowledge about *S. yucatanensis*, it has been reported that the extract of *Serjania erecta* has anti-inflammatory and nematicidal activity (Slomp *et al.*, 2009; Gomig *et al.*, 2008) and that the extract of *Serjania glabrata* has antioxidant activity (Meira *et al.*, 2007). Additionally, phytochemical studies carried out in species of the Sapindaceae family report the presence of alkaloids, tannins, fenols, saponins, terpenes and flavonoids (Marrero *et al.*, 2004; Carretero-Acame, 2001). The significant *in vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of the leaf extract of *S. yucatanensis* against *T. cruzi*, together with its lack of cytotoxic activity, identifies the extract as an important source of bioactive metabolites with potential application in the development of new pharmaceuticals for the treatment of Chagas disease.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Paulino Simá-Polanco for technical assistance and the identification of the plant material. GPH acknowledges the support of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), through its "Becas Mixtas" Program, to carry out a research stay at the University of Antofagasta. This work was supported by Project FOMIX-Yucatán (66262) and Programa de Cooperación Bilateral México-Chile.

2.7 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S2.1 Trypanocidal activity against epimastigotes of *T. cruzi* of crude extracts

Species	Part used	% Growth inhibition Y strain	% Growth inhibition Ninoa strain
		100µg/mL	100µg/mL
<i>Bourreria pulchra</i>	Leaf	0	100
	Stem	0	0
	Root	0	0
<i>Senna villosa</i>	Leaf	0	50
	Stem	0	0
	Root	0	0
<i>Serjania yucatanensis</i>	Leaf	100	100
	Stem	0	0
	Root	0	0
<i>Byrsonima bucidaefolia</i>	Leaf	50	0
	Stem	0	0
	Root	0	0

Table S2.2 Cytotoxic effect (IC₅₀) of crude extracts against Vero cells evaluated by the sulforhodamine B method.

Cells	IC ₅₀ ±SD (µg/mL)/48h			
	SYH	BPH	BBH	SVH
Vero	318.8 ± 2.34	425.7±5.6	211.4±4.2	946.7± 2.56

SYH: leaf extract of *S. yucatanensis*, BPH: leaf extract of *B. pulchra*; BBH: leaf extract of *B. bucidaefolia*; SVH: leaf extract of *S. villosa*.

2.8 REFERENCES

- Anoopkumar-Duke, S., Carey J.B. and T. Conere (2005). Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *British Journal of Radiology*, 78, 945-947.
- Barrera-Pérez, M., Rodríguez-Félix, M.E., Guzmán-Marín, E., Zavala, J. and E. Dumonteil (2001). Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, Mexico. *Revista Biomédica*, 12, 224-230.
- Brener, Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 4, 389-396.
- Bosseno, M.F., Barnabé, C., Magallón, E., Lozano, F., Ramsey, J., Espinoza, B. and F. Simone (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 627-632.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid medium. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 6, 93-100.
- Carretero-Acame, M.E. (2001). Alcaloides: derivados del triptófano y otros alcaloides. *Panorama Actual del Medicamento*, 25, 442-449.
- Castro, J.A. and M. Montalvo (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25, 471-479.
- De Diego, C., Avendaño, C., Alcina, A., Carrasco, L. and J. Elguero (1988). Effects of heterocyclic analogues of triphenylmethane dyes against *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 82, 235-241.
- Escobar, L., Alfonso, P. and F. Aristizábal (2009). Assessing two staining methods for cytotoxicity tests on tumor cell lines. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 49-56.
- Fabricant, D.S. and N.R. Farnsworth (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109, 69-75.

- Gomig, F., Pietrovski, E., Guedes, A., Dalmarco, E., Calderar, M., Guimarães, C., Pinheiro, R., Cabrini, D. and M. Otuki (2008). Topical anti-inflammatory activity of *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 220-224.
- González, J., Sagua, H., Araya, J., Loyola, A., Morales, G., Pereira, J. and M. Estrada (1990). *In vitro* activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Phytotherapy Research*, 4, 1-4.
- Guzmán, E., González, R., Flores, S. and J. Zavala (2004). Activity of *Senna villosa* against *Trypanosoma cruzi*. *Pharmaceutical Biology*, 42, 504-507.
- Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, 5, 294-300.
- Marrero, E., Valls, J., Veliz, T., Laguna, A. and O. Fernández (2004). Natural extract with hypoglycaemic activity and method of obtaining same. World intellectual property organization. Patent 110467.
- Meira, M., David, J., Brandão, H., Branco, A., Agra, M., Barbosa, M., de Queiroz, L. and A. Giullietti (2007). Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. *Fitoterapia*, 78, 215-218.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and F. Pognan (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421-5426.
- Rätz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R. and R. Brun (1997). The alamar blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Tropica*, 68, 139-147.
- Rodriguez-Coura, J. y S.L. de Castro (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias Instituto do Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.
- Rolón, M., Vega, C., Escario, J. and A. Gómez-Barrio (2006). Development of resazurin microtiter assay for drug sensitivity testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 99, 103-107.

- Silva, L.H. and V. Nussenzweig (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica*, 20, 191-208.
- Slomp, L., Pereira, P., de Castro, S., Zingaretti, S. and R. Beleboni (2009). *In vitro* nematocidal effects of medicinal plants from Sao Paulo state, Brazil. *Pharmaceutical Biology*, 47, 230-235.
- Vera-Ku, M. (2003). Evaluación de la actividad biológica en plantas nativas de la península de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. 175 p.
- Vichai, V. and K. Kirtikara (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1, 1112-1116.
- WHO (World Health Organization), 2010. Descriptive note No.340. [Online] (Actualizado junio 2010). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Acceso 15 Julio 2010].

CAPÍTULO III

IDENTIFICATION OF TRYPANOCIDAL METABOLITES FROM *Serjania yucatanensis**

Glendy Polanco-Hernández,[†] Fabiola Escalante-Erosa,[†] Karlina-García-Sosa,[†] Manuel J. Chan-Bacab,[¶] Hernán Sagua-Franco,[§] Jorge González,[§] Luis Osorio-Rodríguez,[§] Luis M. Peña Rodríguez[†]

[†]Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán;

[¶]Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología, Universidad Autónoma de Campeche; [§]Unidad de Parasitología, Universidad de Antofagasta.

3.1 ABSTRACT

Phytochemical investigation of *Serjania yucatanensis*, woody climbing plant endemic to the Yucatan Peninsula, led to the isolation and identification of triterpene lup-20(29)-en-3-one, an oxygenated sesquiterpenoid, β -caryophyllene oxide, and mixture of lup-20(29)-en-3-one and β -caryophyllene oxide. In this study, different fractions of this plant also showed trypanocidal activity. Results proved that the hexane fraction is active against epimastigotes and trypomastigotes and that the mixture of lup-20(29)-en-3-one and β -caryophyllene oxide is active against trypomastigotes of *T. cruzi* and inhibits the egress of trypomastigotes from infected Vero cells without being cytotoxic.

Key words: *Trypanosoma cruzi* - *Serjania yucatanensis* – Lupenone - β -caryophyllene oxide

*Los resultados descritos en este capítulo forman parte del Manuscrito "Identification of trypanocidal metabolites from *Serjania yucatanensis*" sometido a *Phytotherapy Research*. Autores: Glendy Polanco-Hernández, Fabiola Escalante-Erosa, Karlina-García-Sosa, Manuel J. Chan-Bacab, Hernán Sagua-Franco, Jorge González, Luis Osorio-Rodríguez, Luis M. Peña Rodríguez.

3.2 INTRODUCTION

Protozoal diseases continue to be considered an important group of illnesses because of their significant number of cases and mortalities every year (WHO, 2000). Chagas disease, caused by the hemoflagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects about 10 million people in Central and South America; the parasite is transmitted by triatomine insects and it is often associated to poverty and poor sanitation conditions (WHO, 2010). The initial or acute phase of the disease is generally asymptomatic and has a low mortality rate associated to it; however, the chronic phase of the disease usually involves cardiac and gastrointestinal pathology, causing serious damage as a result of the progressive destruction of the invaded organ (Tay *et al.*, 2003; Storino, 2002).

Currently available chemotherapy is unsatisfactory; to date, no medication has proved to be completely effective once the disease has progressed to the chronic phase, while the efficiency of pharmaceuticals such as benznidazole, nifurtimox and allopurinol is low (ca. 50%) and their side effects considerable (Castro and Montalvo, 2006; Rodriguez-Coura and de Castro, 2002). Because of this, the WHO has emphasized the need to develop new and better trypanocidal drugs with none or limited side effects (WHO, 2000).

Presently, close to 80% of the world population depends on plants used in traditional medicine to solve their daily health care needs (Fabricant and Farnsworth, 2001); alternatively, the chemical and biological investigations of plants used in the treatment of numerous human diseases have resulted in the discovery of an important number of bioactive metabolites (Ho *et al.*, 2001) and the important role played by natural products in drug discovery is well recognized (Newman and Cragg, 2007). Still it is estimated that only a small fraction of plants have been studied and their constituents identified (Harvey, 2000).

Mexico is considered one of the five countries with the highest global diversity; the Yucatan peninsula has a characteristic native flora due to its particular geographical location and climatic conditions. Studies of the Yucatecan flora report about 2,300 species of flowering plants, 168 of which are considered to be native or endemic (Pulido and Serralta, 1993). Although the flora of the Yucatan peninsula has been studied extensively by biologists and botanists, the number of phytochemical and

pharmacological studies on yucatecan plants, particularly native and endemic species, is limited (Durán *et al.*, 2000).

Recently, as part of a project directed towards identifying native plants from the Yucatan peninsula as potential sources of antiprotozoal metabolites, we reported the leaf extract of *Serjania yucatanensis* as having a marked *in vitro* and *in vivo* activity against *T. cruzi*, without being cytotoxic (Polanco-Hernández *et al.*, 2010).

S. yucatanensis Standl. (Sapindaceae) is a woody climbing plant endemic to the Yucatan peninsula; its common name is *chac uayam* and is used in traditional medicine to treat fistula, abscesses, infections, vomiting, headache and diarrhoea (Vera-Ku, 2003). Previous phytochemical investigations of *S. yucatanensis* are limited, with a single report describing the isolation of saponins from the root extract of the plant (Sánchez-Medina, 2007). However, phytochemical studies carried out on species of the Sapindaceae family report the presence of a fatty alcohol glycoside with antibacterial activity from *Cupania glabra* (Setzer *et al.*, 2005), triterpenoid saponins with leishmanicidal activity from *Sapindus saponaria* (Herrera *et al.*, 2007), and sterols and coumarins from *Nephelium longan* (Rahman *et al.*, 2007). We wish to describe herein the bioassay-guided purification of the secondary metabolites responsible for the antiprotozoal activity detected in the leaf extract of *S. yucatanensis*.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 GENERAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Solvent evaporation was performed on a Büchi Rotavapor RE111 with a H₂O bath at 35 °C. Analytical thin layer chromatography (TLC) was carried out on aluminium sheets impregnated with silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, 0.20 mm thickness). Chromatographic purifications were run using silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) for vacuum liquid chromatography (VLC), silica gel 60 (Merck, 70-230 mesh) for open column chromatography and preparative TLC was performed on glass plates impregnated with silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, 0.25 mm thickness, 20 × 20 cm). GC-MS analyses were carried out in a Agilent Technologies 6890N gas chromatograph coupled to an Agilent Technologies 5975B mass selective detector (GC conditions: split injection of 1 µL of sample; HP-Ultra 1 column; carrier gas He; flow rate: 1 mL/min; oven temperature: 150 to 280 °C; gradient: 10 °C/min; injector and detector: 280 °C).

3.3.2 PLANT MATERIAL

Leaves of *S. yucatanensis* were collected in September 2008, at the 8.5 Km mark of the Yaxcabá-Libre Unión highway in Yucatán, Mexico. A voucher specimen (P. Simá 2983) was deposited in the Herbarium of "Centro de Investigación Científica de Yucatán".

3.3.3 EXTRACTION AND ISOLATION

Dried and ground leaves of *S. yucatanensis* (428.0 g) were successively extracted (3 times, 72 h each) with ethanol (6,000 mL) at room temperature. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure to yield the corresponding crude extract (67.5 g). A portion of the crude extract (1.0 g) was sonicated (Cole-Parmer sonicator 8853) first with hexane (3 h) and then with ethyl acetate (3 h), to produce the corresponding fractions of low (344.6 mg) and medium (223.2 mg) polarity, together with a residue containing mostly polar materials (121.4 mg). The extract and the resulting fractions were assayed against epimastigotes forms of *T. cruzi*.

The active hexane fraction (21.5 g) was purified using vacuum liquid chromatography (VLC, Coll and Bowden, 1986), eluting with mixtures of hexane-dichloromethane-ethylacetate of increasing polarity to produce 24 fractions. Each fraction was assayed for trypanocidal activity and the bioactive fractions (**A7-A9**) were combined (3.6 g) and subjected to a second VLC which, after eluting with mixtures of hexane-dichloromethane-ethylacetate of increasing polarity, yielded 15 fractions. The bioactive fraction **B5** (246.0 mg) was further purified by column chromatography eluting with a mixture of hexane-acetone-methanol (95:3:2) to produce 16 fractions. Final preparative-thin layer chromatography purification of the combined bioactive fractions **C3-C7** (29.0 mg) using multiple elution (twice) with a mixture of hexane-ethylacetate-methanol (90:8:2) led to the isolation of three main fractions (**1-3**) identified as lup-20(29)-en-3-one (**1**, 6.2 mg), β -caryophyllene oxide (**2**, 2.0 mg), and a mixture of **1** and **2** (**3**, 4.0 mg).

The structures of the isolated metabolites were established by comparing their fragmentation patterns with those contained in the data base of the GC-MS equipment and by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature (Özek *et*

al., 2010; Marín-Solano and Ordoñez-Calderon, 2008; Vieira *et al.*, 2005; Barrero *et al.*, 1995).

Lup-20(29)-en-3-one (**1**; reliability to MS standard: 94), t_R : 35.3 min; LREIMS: m/z 424 $[M]^+$ ($C_{30}H_{48}O$), 205 (base peak) (Figure S3.1).

β -caryophyllene oxide (**2**; reliability to MS standard: 95), t_R : 5.9 min; LREIMS: m/z 220 $[M]^+$, 177 ($M^+-C_3H_7$), 149 ($M^+-C_5H_{11}$), 121($M^+-C_5H_{11}-C_2H_4$), 109 ($M^+-C_5H_{11}-C_3H_4$), 79 ($M^+-C_5H_{11}-C_5H_{10}$), 69 (C_5H_9), and 41 (C_3H_5) (Figure S3.2).

3.3.4 OXIDATION OF LUPEOL

A sample of lupeol (3 mg) was dissolved in CH_2Cl_2 (5 mL) and the resulting solution stirred for 4 h at room temperature with an excess amount of PCC (Kumar *et al.*, 2008). The reaction mixture was filtered through a plug of silica gel (70-230 mesh, Merck) washing the adsorbent with CH_2Cl_2 . The solvent was evaporated under reduced pressure to yield 2.5 mg of an oxidized product identical by TLC, GC and MS to lup-20(29)-en-3-one (**1**).

3.3.5 EPOXIDATION OF β -CARYOPHYLLENE

A solution of 3-chloroperoxybenzoic acid (10 mg) in CH_2Cl_2 (3 mL) was added to a solution of β -caryophyllene (Sigma-Aldrich, 10 mg) in CH_2Cl_2 (3 mL), and the mixture was allowed to stir at room temperature for 2 h. After this time, 10% aq. Na_2SO_3 was added to the reaction mixture and the organic phase was washed with H_2O . The solvent was removed *in vacuo* and the residue was passed through a silica gel column (70-230 mesh, Merck), washing with CH_2Cl_2 to yield 9.4 mg of an epoxidized product identical by TLC, GC and MS to β -caryophyllene oxide (**2**).

3.3.6 PARASITES AND THEIR GROWTH CONDITIONS

Epimastigote and trypomastigote forms of the Y strain of *T. cruzi* (Silva and Nussenzweig, 1953) were used in this study. Epimastigotes were obtained from Liver Infusion Tryptose medium (LIT) supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) (Camargo, 1964); trypomastigotes were obtained from Vero cell cultures (De Diego *et al.*, 1988).

3.3.7 EVALUATION OF THE *IN VITRO* TRYPANOCIDAL ACTIVITY AGAINST EPIMASTIGOTES OF *T. cruzi*

The trypanocidal activity of the semipurified fractions obtained from leaf extract of *S. yucatanensis* was assayed against epimastigote forms of *T. cruzi*. The fractions tested were dissolved in DMSO to have a final concentration of 0.5% and for each experiment there were controls of parasites growing in the presence and absence of DMSO. Experiments were carried out using 96-well microplates containing 1×10^5 epimastigotes/mL. Different concentrations of the fractions (100, 50, 25, and 12.5 $\mu\text{g/mL}$) were added to the wells and the plates were incubated at 28 °C for 48 h. The activity is expressed as IC_{100} ($\mu\text{g/mL}$). Nifurtimox (Lampit®) and allopurinol (Zyloprim®) were used as reference drugs (positive controls). The assays were performed in duplicate.

3.3.8 EVALUATION OF THE *IN VITRO* TRYPANOCIDAL ACTIVITY AGAINST TRYPOMASTIGOTES OF *T. cruzi*

Trypanocidal activity was assayed on trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain). Experiments were carried out in 96-well microplates containing 1×10^7 parasites/mL. Different concentrations of the fractions (100, 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$) were added to the wells and the plates were incubated at 28 °C for 48 h. After incubation, the medium was removed and the wells were washed with PBS pH 7.2. Subsequently, DMEM medium (100 μL) containing resazurin (4.4 μM) was added to each well and the plates were incubated for an additional 4-h period. The plates were read in a fluorescence scanner (Rolón *et al.*, 2006; Raz *et al.*, 1997), at excitation wavelengths of 535 nm and 595 nm, using a Tecan reader (Anoopkumar-Duke *et al.*, 2005). Absorbance values are expressed as percentage values relative to those obtained from control wells. Controls refer to the incubation of trypomastigotes in dilute DMSO 0.5% (negative control) or culture medium (blank). The assays were performed in triplicate.

3.3.9 CYTOTOXIC ACTIVITY

Vero cells were maintained in 75 cm^3 growth flasks, in DMEM medium supplemented with 10% SFB at 37 °C, using a cell culture incubator in a 5% CO_2 humid atmosphere. The Vero cells were adhered to 96-well plates at a concentration of 4×10^4 cells per well and allowed to proliferate for 24 h in DMEM medium supplemented with 10% SFB.

Different concentrations of fractions or metabolites were evaluated (100, 50 and 25 µg/mL) and DMSO 0.5% was used as a negative control. After two days of incubation at 37 °C for 72 h, the cell growth was evaluated by the resazurin method (O'Brien *et al.*, 2000). Cytotoxicity is presented as the percentage of viability of Vero cells.

3.3.10 INHIBITION OF *T. cruzi* EGRESS TEST

Vero cells (4×10^4) adhered to 96-well plates were infected with 2×10^5 trypomastigotes (Y strain) per well and incubated under standard conditions (González *et al.*, 1990) for 24 h. The cells were washed with DMEM medium to remove extracellular parasites and the infected cell cultures were treated with the hexane fraction, semipure fractions, and the purified fractions 1-3 at 100 µg/mL; egress of trypomastigotes was observed on the fifth day after infection. Inhibition in the egress of the parasites was determined by counting the trypomastigotes number in the cell culture supernatant medium using a Neubauer chamber and comparing it with those observed in the negative control (medium with DMSO 0.5%). The bioassays were performed eight times.

3.3.11 STATISTICAL ANALYSES

The statistical analyses were performed using Prism program 5.0 software. Data are presented as mean values $\pm$ S.D. Statistical analyses: one way ANOVA and post-hoc Tukey's test were used to compare different experimental groups.

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

Sonication of the leaf extract of *S. yucatanensis* with hexane and ethyl acetate produced the corresponding low, medium and high polarity fractions, with the low polarity fraction showing an activity against epimastigotes of *T. cruzi* ($IC_{100} = 100$ µg/ml) that was similar to that of nifurtimox and greater than that of allopurinol (Table 3.1). The low polarity fraction also showed 78% inhibition when tested against trypomastigotes of *T. cruzi* at 100 µg/ml (Figure 3.1), although this level of activity was below of that shown by the original leaf extract of *S. yucatanensis*.

Table 3.1 Trypanocidal activity of fractions from *Serjania yucatanensis*.

Fractions obtained from leaf extract of <i>S. yucatanensis</i>	IC ₁₀₀ µg/mL
	Y strain
Low polarity fraction (hexane fraction)	100
Medium polarity fraction	> 100
High polarity fraction	nd
A1-A6 fractions	> 100
A7, A8 and A9 fractions	50
A10-A24 fractions	> 100
B5 fraction	100
Allopurinol ^a	> 100
Nifurtimox ^a	100

^a positive controls; Epi: epimastigotes of *T. cruzi*; nd= not determined.

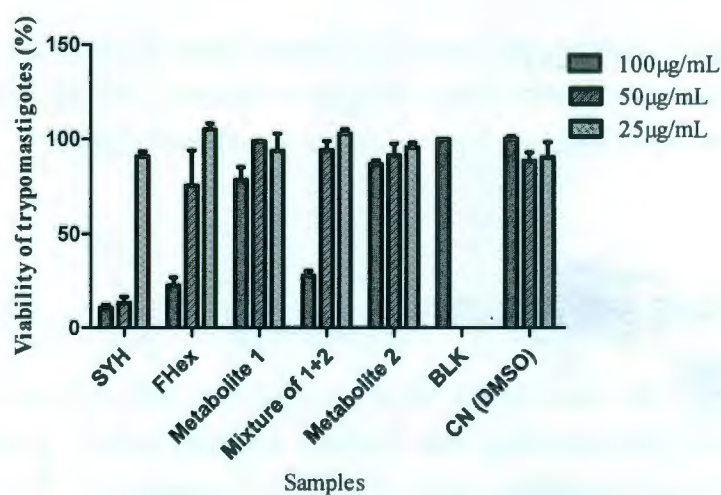


Figure 3.1. Trypanocidal activity of fractions and metabolites obtained from *S. yucatanensis* against trypomastigotes (Y strain). CN: negative control, BLK: blank, SYH: leaf extract of *S. yucatanensis*, FHex: hexane fraction, Metabolite 1: Lup-20(29)-en-3-one, Metabolite 2: β -caryophyllene oxide, Mixture of 1+2: mixture of lup-20(29)-en-3-one and β -caryophyllene oxide.

Initial bioassay-guided fractionation of the low polarity fraction produced a group of fractions (A7-A9) that could inhibit completely the growth of epimastigotes of *T. cruzi* when tested at 50 µg/ml ($IC_{100} = 50$ µg/ml; Cuadro 3.1). Purification of the combined bioactive fractions A7-A9 produced the bioactive fraction B5 ($IC_{100} = 100$ µg/ml) which, after final purification, yielded three main fractions with two of them showing a single component by TLC. The purified metabolites were identified as lup-20(29)-en-3-one (1), β -caryophyllene oxide (2), while the third fraction (3) was identified as a mixture of metabolites 1 and 2 (Figure 3.2). The structures of the purified metabolites were initially established by comparing their fragmentation pattern with those of various standards included in the data base of the mass detector and by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature (Marín-Solano and Ordoñez-Calderón, 2008; Xiao *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2005; Barrero *et al.*, 1995). Final identification was confirmed when 1 and 2 proved to be identical by both GC-MS and TLC to the oxidation and epoxidation products of an authentic sample of lupeol and a commercial sample of β -caryophyllene, respectively.

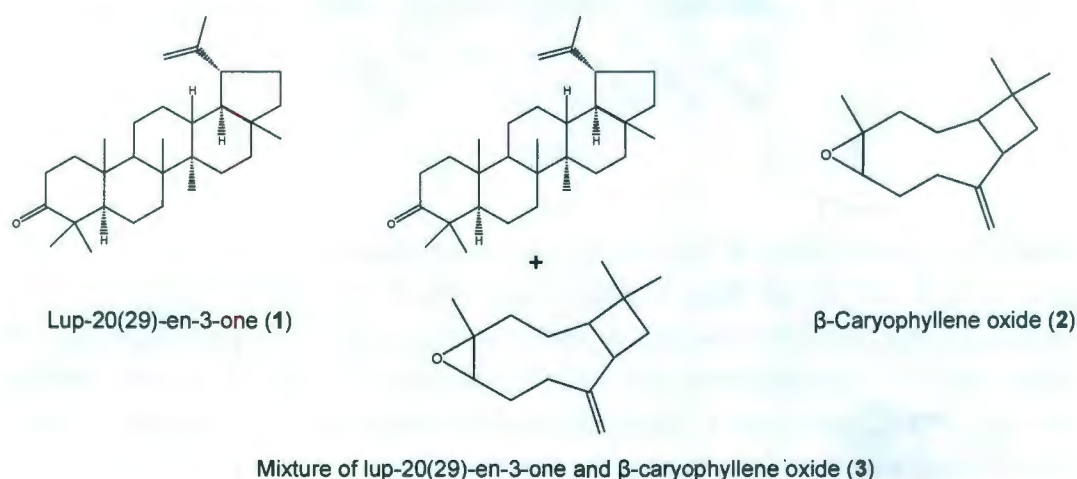


Figure 3.2. Isolated metabolites from the hexane fraction of *S. yucatanensis*.

Evaluation of metabolites 1 and 2 and fraction 3 against trypomastigotes of *T. cruzi* (Y strain) showed that only fraction 3 was active, inhibiting 70% or more of the growth of trypomastigotes of *T. cruzi* at 100 µg/mL (Figure 3.1). The trypanocidal activity of fraction 3 proved to be similar to that of the hexane fraction, but lower than that detected in the original leaf extract of *S. yucatanensis* (Polanco-Hernández *et al.*, 2010).

Testing of the hexane fraction as well as of semipurified fractions A7 and A8, metabolites 1 and 2, and fraction 3, for cytotoxic activity in Vero cells using the resazurin method, showed that none of the fractions or pure metabolites were toxic to mammalian host cells when tested at concentrations in which they are able to inhibit the growth of epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* (Figure 3.3). These results indicate that the active fractions of *S. yucatanensis* can affect *T. cruzi* but not normal cells, and are in agreement with reports of β -caryophyllene oxide (2) not showing cytotoxicity against Vero and THP-1 cells (Özek *et al.*, 2010; Escobar *et al.*, 2010).

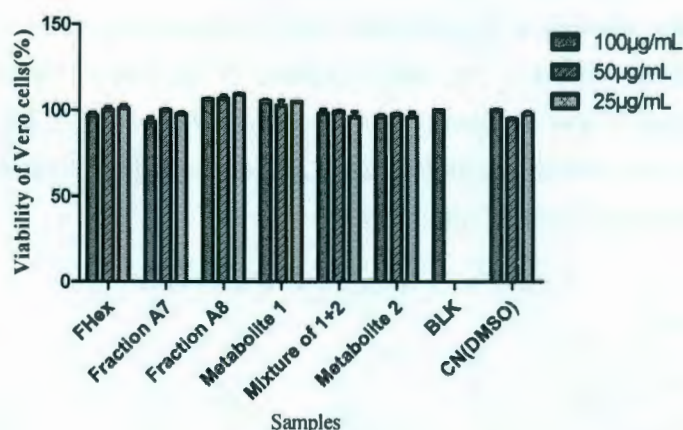


Figure 3.3. Cytotoxic effect of fractions and metabolites obtained from the leaf extract of *S. yucatanensis* at 100, 50 and 25 µg/mL against Vero cells by the resazurin method. Data are expressed as the percentage of viability of Vero cells as compared with the growth of untreated control cells. CN: negative control; BLK: blank; FHex: hexane fraction; A7 and A8: fractions obtained of VLC; Metabolite 1: lup-20(29)-en-3-one; Metabolite 2: β -caryophyllene oxide; Mixture of 1+2: mixture of lupenone and β -caryophyllene oxide.

Finally, metabolites 1 and 2 and fraction 3 were tested for their capacity to inhibit the egress of *T. cruzi* trypomastigotes from infected cells; the results showed that only the low polarity fraction and the mixture of 1 and 2 (fraction 3) significantly inhibited the egress of parasites from infected Vero cells when tested at 100 µg/mL (Figure 3.4), a level of activity similar to that previously reported for the original leaf extract of *S. yucatanensis* (Polanco-Hernández *et al.*, 2010).

The results of this study suggest that the trypanocidal effect of the original leaf extract of *S. yucatanensis*, as well as that of both the low polarity fraction and fraction 3, might be due to the combined action of two or more secondary metabolites and that the mixture may be necessary for the expression of trypanocidal activity. These results are in agreement with those reported in the literature where a fraction of *Ampelozizyphus amazonicus* containing lup-20(29)-en-3-one (1) is reported to show trypanocidal activity against trypomastigotes of *T. cruzi* (Rosas *et al.*, 2007), and the antiprotozoan activity of caryophyllene oxide (2) isolated from *Croton draco* is lower than that shown by the essential oil (Setzer *et al.*, 2007).

The results of this investigation indicate that the leaves of *S. yucatanensis* contain bioactive metabolites against *T. cruzi* and that these metabolites can have a direct effect on the egress of parasites, thus affecting a crucial event in the cycle of *T. cruzi* and one that it is necessary for the parasite to infect other cells.

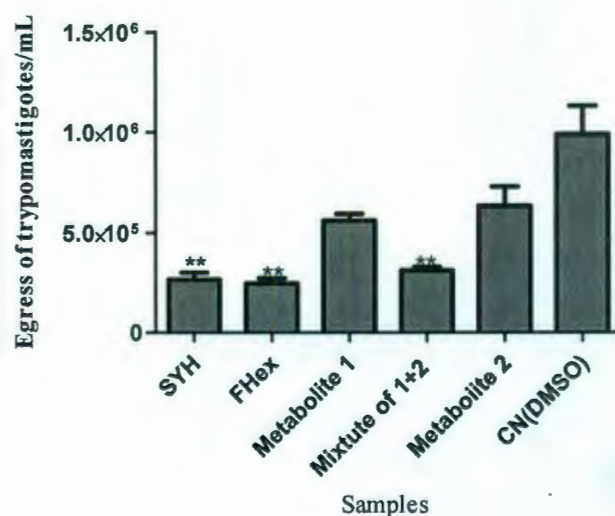


Figure 3.4. Inhibition of the egress of *T. cruzi* trypomastigotes by fractions and metabolites obtained from the leaf extract of *S. yucatanensis* at 100 µg/mL. CN: negative control; SYH: leaf extract of *S. yucatanensis*, FHex: hexane fraction; Metabolite 1: lup-20(29)-en-3-one; Metabolite 2: β-caryophyllene oxide; Mixture of 1+2: mixture of lup-20(29)-en-3-one and β-caryophyllene oxide. Statistical analysis was performed using Anova and post hoc Tukey's test: **p<0.05 compared with negative control.

3.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Paulino Simá-Polanco for technical assistance and the identification of the plant material. GPH acknowledges the support of Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), through its "Becas Mixtas" Program, to carry out a research stay at the University of Antofagasta. This work was supported by Project FOMIX-Yucatán (66262) and Programa de Cooperación Bilateral México-Chile.

3.6 SUPPLEMENTARY MATERIAL

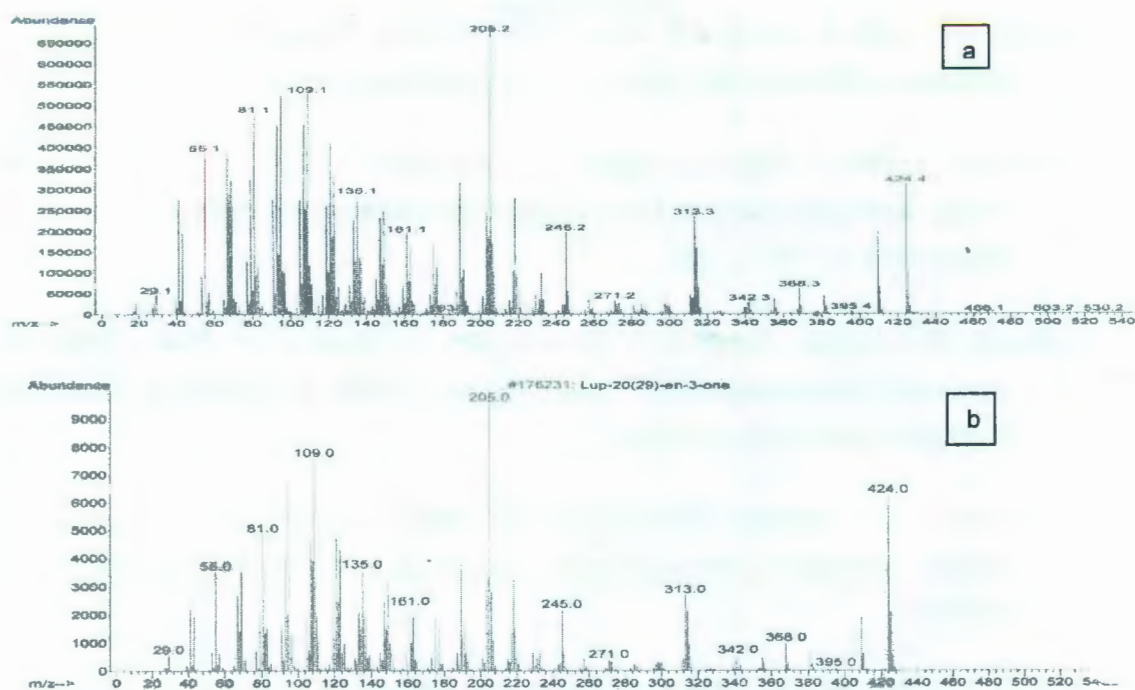


Figure S3.1. Fragmentation patterns of metabolite 1 (a) and lup-20(29)-en-3-one contained in the data base of the GC-MS equipment (b).

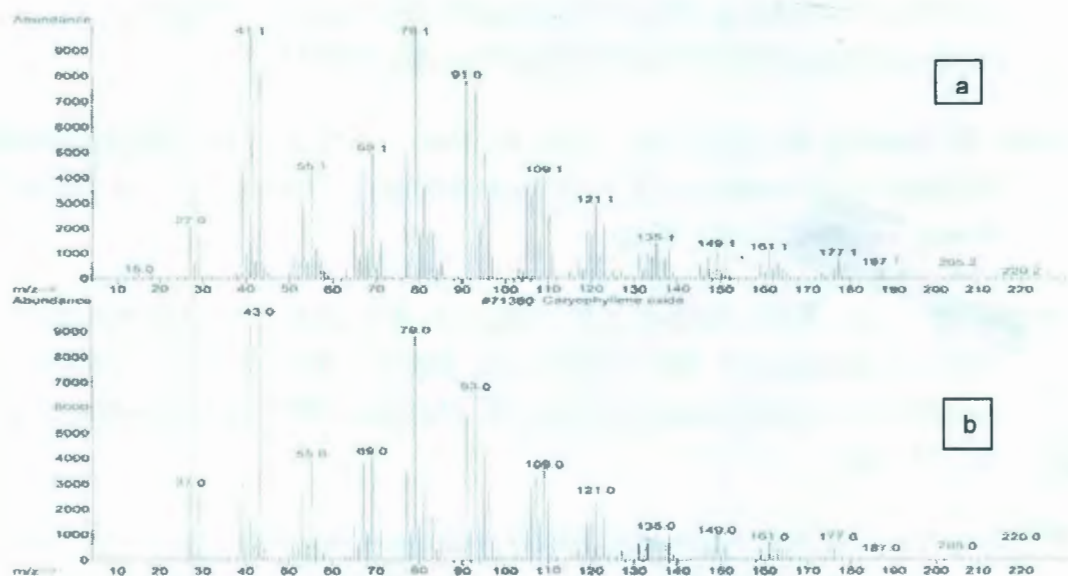


Figure S3.2. Fragmentation patterns of metabolite 2 (a) and β -caryophyllene oxide contained in the data base of the GC-MS equipment (b).

3.7 REFERENCES

- Anoopkumar-Duke, S., Carey J.B. and T. Conere (2005). Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *British Journal of Radiology*, 78, 945-947.
- Barrero, A., Molina, J., Oltra, E., Altarejos, J., Barragán, A., Lara, A. and M. Segura (1995). Stereochemistry of 14-hydroxy- β -caryophyllene and related compounds. *Tetrahedron*, 51, 3813-3822.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid medium. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 6, 93-100.
- Castro, J.A. and M. Montalvo (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25, 471-479.
- Coll, J.C. and B.F. Bowden (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, 49, 934-936.
- De Diego, C., Avendaño, C., Alcina, A., Carrasco, L. and J. Elguero (1988). Effects of heterocyclic analogues of triphenylmethane dyes against *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 82, 235-241.
- Durán, R., Campos, G., Trejo, J.C., Simá, P., May, F. and M. Juan (2000). *Listado Florístico de la Península de Yucatán. Impresiones Profesionales del Sureste*, Mérida, Yucatán, México. 99 pp.
- Escobar, P., Leal, S.M., Herrera, L.V., Martinez, J.R. and E. Stashenko (2010). Chemical composition and antiprotozoal activities of *Colombian Lippia* spp. essential oils and their major components. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 184-190.
- Fabricant, D.S. and N.R. Farnsworth (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109, 69-75.

- González, J., Sagua, H., Araya, J., Loyola, A., Morales, G., Pereira, J. and M. Estrada (1990). *In vitro* activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Phytotherapy Research*, 4, 1-4.
- Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, 5, 294-300.
- Herrera, N., Correa, E., Cardona, D., Archbold, R., Torres, F., Quiñones, W. and I. Velez (2007). Estructura y actividad de sapogeninas triterpénicas. *Scientia et Technica*, 13, 87-90.
- Ho, K.Y., Tsai, C.C., Huang, J.S., Chen, C.P., Lin, T.C. and C.C. Lin (2001). Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 187-191.
- Kumar, S., Misra, N., Raj, K., Srivastava, K. and S.K. Puri (2008). Novel class of hybrid natural products derived from lupeol as antimalarial agents. *Natural Product Research*, 22, 305-319.
- Marín-Solano, N. and S. Ordoñez-Calderón (2008). Determinación de metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles, y ácidos aristolóquicos en *Aristolochia ringens* Vahl. Tesis de licenciatura. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. 94 p.
- Newman, D.J. and G.M. Cragg (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-477.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. and F. Pognan (2000). Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267, 5421-5426.
- Özek, G., Demirci, F., Özek, T., Tabanca, N., Wedge, D., Shabana, K., Hüsnu, K., Duran, A. and E. Hamzaoglu (2010). Gas-chromatographic-mass spectrometric analysis of volatiles obtained by four different techniques from *Salvia rosifolia* Sm., and evaluation for biological activity. *Journal of Chromatography A*, 1217, 741-748.

- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Acosta, K., Chan-Bacab, M., Sagua, H., Gonzalez, J., Osorio, L and L.M. Peña-Rodríguez (2010). *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatan peninsula. *Parasitology Research*. Sometido.
- Pulido, M.T. and L. Serralta (1993). Lista Anotada de las Plantas Medicinales de Uso Actual en el Estado de Quintana Roo, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. México. 106 p.
- Rahman, K., Nahar, K., Khan, M. and C. Hasan (2007). Phytochemical and biological studies of *Nephelium longan*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6, 68-72.
- Răz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R. and R. Brun (1997). The alamar blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Tropica*, 68, 139-147.
- Rodriguez-Coura, J. and S.L. de Castro (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.
- Rolón, M., Vega, C., Escario, J. and A. Gómez-Barrio (2006). Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 99, 103-107.
- Rosas, L.V., Cordeiro, M.S.C., Campos, F.R., Nascimento, S.K.R., Januário, A.H., Franca, S.C., Nomizo, A., Toldo, M.P., Albuquerque, S. and O.S. Pereira (2007). *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40, 663-670.
- Sánchez-Medina, A. (2007). Phytochemical and pharmacological studies on some endemic yucatecan medicinal plants. Tesis de Doctorado. Universidad de Greenwich, Londres. 204 p.
- Setzer, W., Stokes, S., Bansal, A., Haber, W., Caffrey, C., Hansell, E. and J. McKerrow (2007). Chemical composition and cruzain inhibitory activity of *Croton draco* bark

essential oil from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, 2, 685-689.

Setzer, W., Vogler, B., Schmidt, J., Petty, J. and W. Haber (2005). Isolation of cupanioside, a novel cytotoxic and antibacterial long-chain fatty alcohol glycoside from the bark of *Cupania glabra*. *Planta Medica*, 71, 686-688.

Silva, L.H and V. Nussenzweig (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica*, 20, 191-208.

Storino, R. (2002). Enfermedad de Chagas con parasitemia evidente. *Revista Argentina de Cardiologia*, 70, 15-39.

Tay, J., Lara R., Velasco O. and M. Gutiérrez (2003). *Parasitología Médica*. Méndez editores. p. 516-530.

Vera-Ku, M. (2003). Evaluación de la actividad biológica en plantas nativas de la península de Yucatán. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. 175 p.

Vieira, G.M., Leite de Souza, C.M. and M.H. Chaves (2005). Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Quimica Nova*, 28, 183-187.

WHO (World Health Organization), 2010. Descriptive note No.340. [Online] (Actualizado junio 2010). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Acceso 15 Julio 2010].

WHO (World Health Organization), 2000. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). Natural products for parasitic diseases. *TDR News*, 62,4.

Xiao, J.B., Chen, X.Q., Zhang, Y.W., Jiang, X.Y. and M. Xu (2006). Cytotoxicity of *Marchantia convoluta* leaf extracts to human liver and lung cancer cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39, 731-738.

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de extractos crudos bioactivos obtenidos de plantas representa una alternativa prometedora para la búsqueda de metabolitos con potencial farmacológico. Desde tiempo atrás, la investigación de las plantas como fuente de agentes terapéuticos incluye el aislamiento de metabolitos bioactivos usados directamente como drogas comerciales, el desarrollo de agentes coadyuvantes en tratamientos farmacológicos y el uso de plantas como remedio herbal. Sin embargo, hasta ahora las especies vegetales han sido poco estudiadas desde el punto de vista farmacológico y la flora de la península de Yucatán, en particular, ha sido poco estudiada en cuanto a su producción de metabolitos bioactivos.

Bourreria pulchra, *Byrsonima bucidaefolia*, *Senna villosa* y *Serjania yucatanensis*, plantas nativas y/o endémicas de la península de Yucatán, presentan un limitado conocimiento fitoquímico y/o farmacológico y debido a la importancia de estas plantas como fuentes de metabolitos bioactivos; en este trabajo se evaluó la actividad contra *T. cruzi* *in vitro* de los extractos de hojas, tallo y raíz de cada una de estas especies. Los resultados obtenidos en esta evaluación permitieron ubicar la presencia de actividad tripanocida en los extractos de hojas de las cuatro especies, siendo los extractos de *S. yucatanensis* y de *B. pulchra* los de mayor actividad, debido a que presentaron inhibición total de epimastigotes de *T. cruzi* a 100 µg/mL y fueron capaz de reducir en 95% o más el número de tripomastigotes a 100 y 50 µg/mL, observándose que estos extractos son activos contra ambas formas del parásito.

Con base en la actividad tripanocida *in vitro* presentada en los extractos de hojas de *S. yucatanensis* y *B. pulchra*, estos dos extractos fueron evaluados *in vivo* contra tripomastigotes de *T. cruzi*, mostrando que únicamente el extracto de hoja de *S. yucatanensis* es capaz de disminuir significativamente el número de parásitos en los individuos tratados con este extracto, debido a que se demostró que existen diferencias significativas en cuanto al número de parásitos en los animales tratados con *S. yucatanensis* y el número de parásitos en los animales del control negativo ($p \leq 0.05$), así como en los animales que recibieron el extracto de *B. pulchra* ($p \leq 0.05$), e inclusive los animales que fueron tratados con el fármaco de referencia alopurinol ($p \leq 0.05$). Asimismo, se observó que la disminución en la parasitemia de los individuos

tratados con el extracto de hojas de *S. yucatanensis* se refleja en una ausencia de mortalidad en el grupo, un resultado por encima del valor mostrado por el control positivo o alopurinol.

Dado que el extracto de hoja de *S. yucatanensis* mostró la mayor actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo*, se llevó a cabo la purificación biodirigida de este extracto, mostrando que los metabolitos responsables de la actividad son de baja polaridad. La purificación final de esta fracción condujo a la obtención de dos metabolitos puros, identificados como lup-20(29)-en-3-ona (1) y óxido de β -cariofileno (2) y una mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno (3). La evaluación de estos metabolitos contra tripomastigotes de *T. cruzi* mostraron que únicamente la mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno es capaz de inhibir el crecimiento de los parásitos en más del 70% a 100 $\mu\text{g/ml}$, siendo esta actividad similar a la presentada por el extracto de *S. yucatanensis*.

Asimismo, se observó que el extracto de hojas de *S. yucatanensis* y todas las fracciones y metabolitos obtenidos no son citotóxicos contra células Vero, indicando que la actividad tripanocida detectada en la mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno no es debida a su citotoxicidad.

Con el fin de explorar el posible modo de acción de los metabolitos responsables de la actividad tripanocida, el extracto de hoja de *S. yucatanensis*, la fracción hexánica, la lup-20(29)-en-3-ona, el óxido de β -cariofileno y la mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno fueron evaluados por su capacidad para inhibir la salida de *T. cruzi* de células infectadas. A través de este ensayo se reproduce *in vitro* lo que sucede dentro de los mamíferos cuando son infectados con el parásito; los tripomastigotes penetran los tejidos y una vez que se encuentran dentro del mamífero se introducen a las células, en donde se transforman en amastigotes que posteriormente se multiplican y se diferencian a tripomastigotes, los cuales son liberados al torrente sanguíneo para infectar otras células. En este ensayo las células son infectadas con tripomastigotes y tratados con el extracto y/o metabolito, y después de un período de incubación, el número de parásitos que son capaces de salir de las células son cuantificados y comparados con los controles. Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que el extracto de hojas de *S. yucatanensis* y la mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno son capaces de inhibir la egresión de *T. cruzi* de células Vero a 100 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados son de gran interés debido a que

sugieren que los metabolitos bioactivos pueden penetrar la célula y afectan la salida de los tripomastigotes, la cual es un evento crucial en el ciclo del parásito.

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad tripanocida presentada puede ser debida a una acción combinada de dos o más metabolitos secundarios y que la mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno puede ser necesaria para la expresión de la actividad.

De la misma manera, los resultados obtenidos indican que las hojas de *S. yucatanensis* contienen metabolitos bioactivos contra *T. cruzi*, que no son citotóxicos para las células normales y que estos metabolitos pueden afectar la egresión de *T. cruzi*, la cual es un evento crucial para que el parásito infecte a otras células.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

- ❖ Los extractos de hojas de *Bourreria pulchra*, *Byrsonima bucidaefolia*, *Senna villosa* y *Serjania yucatanensis* presentaron actividad contra epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* *in vitro*; siendo los extractos de *S. yucatanensis* y *B. pulchra* los más activos.
- ❖ El extracto de hoja de *S. yucatanensis* presentó la mayor actividad tripanocida *in vitro* y es el único extracto que posee actividad tripanocida *in vivo*.
- ❖ El extracto de hoja de *S. yucatanensis* no es citotóxico e inhibe la salida de *T. cruzi* fuera de la célula.
- ❖ El fraccionamiento inicial del extracto crudo de hojas de *S. yucatanensis* mostró que los metabolitos responsables de la actividad tripanocida son de baja polaridad.
- ❖ La fracción de baja polaridad (fracción hexánica) y la mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno (fracción 3) son activas contra tripomastigotes de *T. cruzi* y no son citotóxicos.
- ❖ La mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno inhiben la egresión de tripomastigotes de *T. cruzi* de células Vero infectadas.
- ❖ El efecto tripanocida del extracto de hoja de *S. yucatanensis*, de la fracción de baja polaridad y de la mezcla de lup-20(29)-en-3-ona y óxido de β -cariofileno,

sugieren que la actividad presentada es debida a una acción combinada de dos o más metabolitos secundarios.

4.3 PERSPECTIVAS

En este trabajo se observa que el estudio de la medicina tradicional es una importante fuente para la búsqueda de nuevos metabolitos obtenidos a partir de plantas propias de la Península de Yucatán; el aislamiento e identificación de metabolitos bioactivos de plantas endémicas permite conocer su potencial para el desarrollo de nuevos productos tripanocidas y darle un valor agregado a estas especies que son amenazadas por la extinción debido a los procesos de transformación del ambiente.

Por lo tanto, se sugiere que *Serjania yucatanensis* debe seguir evaluándose para determinar la actividad tripanocida *in vivo* de los metabolitos activos, confirmar el probable sinergismo responsable de la actividad contra *T. cruzi* presentada en el extracto de *S. yucatanensis*, así como para evaluar su actividad en la fase crónica de la enfermedad. Por otra parte, es importante determinar si la inhibición en la salida de *T. cruzi* de la célula es debido a una afectación directa hacia los parásitos o hacia la célula, con el fin de establecer el mecanismo y/o sitio de acción de los metabolitos activos y, en un futuro, considerar la posibilidad de que esta planta o sus metabolitos bioactivos sean utilizados como alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.