



Agentes antiparasitarios de plantas de la Amazonia Peruana empleadas en medicina tradicional

Tesis Doctoral

**Olga Claudia Sáenz Bocanegra
2010**



La Dra. AZUCENA GONZÁLEZ COLOMA, el Dr. RAFAEL MARTÍNEZ DÍAZ y el Dr. MATÍAS REINA ARTILES, como directores,

AUTORIZAN la presentación de la memoria titulada “Agentes antiparasitarios de plantas de la Amazonia Peruana empleadas en medicina tradicional”, realizada en el Dpto. de Protección Vegetal del Instituto de Ciencias Agrarias (CSIC), en el Dpto. de Química Biológica y Biotecnología del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (CSIC) y en el Dpto. de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, dado que reúne los requisitos necesarios para constituir la Tesis Doctoral que la Licenciada Olga Claudia Sáenz Bocanegra presenta para aspirar al grado de Doctor.

Madrid, marzo 2010

Dra. Azucena González Coloma

Dr. Rafael Martínez Díaz

Dr. Matías Reina Artiles

Quiero reconocer y agradecer a todas las personas e instituciones que de alguna forma han hecho posible este trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, por haberme brindado la oportunidad de iniciar este sueño.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CONCYTED) y a la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), por haber financiado este trabajo.

A la Doctora Lastenia Ruíz, Investigadora del Laboratorio de Productos Naturales Antiparasitarios de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, por confiar en mí y brindarme esta oportunidad.

Al Doctor Rafael Martínez Díaz, a la Doctora Azucena González Coloma y al Doctor Matías Reina Artilles, mis directores, por haberme permitido trabajar en su grupo de investigación estos años y por su buena predisposición.

Al Doctor Vicente Arán del Instituto de Química Orgánica del CSIC, por su colaboración en la elucidación estructural de compuestos.

Al Doctor Jesús Sanz y a la Doctora Ana Cristina Soria del Instituto de Química Orgánica del CSIC, por su colaboración en la identificación de compuestos mediante GC-MS.

A mis compañeros de laboratorio del Centro de Ciencias Medioambientales del CSIC, María, Marisi, Nagla, Victoria, Carlo, y Lucía, por la ayuda prestada, el respeto y la cordialidad en el trabajo, pero sobre todo por los buenos momentos compartidos.

A mis amigos Ximena, Pablo, María José, Matías, Gema, Nuria, Carolina y a mi familia por darme siempre su apoyo.

Y finalmente a Daniel por su apoyo, su paciencia y por compartir conmigo esta etapa tan importante de nuestras vidas.

.

Índice

Introducción y objetivos

1. Leishmaniasis	3
1.1. Morfología	6
1.2. Ciclo biológico	7
1.3. Formas y manifestaciones clínicas	9
1.3.1. Leishmaniasis cutánea	9
1.3.2. Leishmaniasis cutánea difusa	10
1.3.3. Leishmaniasis mucocutánea	10
1.3.4. Leishmaniasis visceral	10
1.4. Vector	11
1.5. Epidemiología	12
1.6. Tratamiento y Prevención	13
1.6.1. Tratamiento tópico	13
1.6.2. Tratamiento intralesional	14
1.6.3. Cirugía y Terapéutica física	15
1.6.4. Tratamiento sistémico	16
- Antitumorales pentavalentes	16
- Amidosidina y Paromomicina	17
- Otros medicamentos	17
1.6.5. Métodos tradicionales	19
1.6.6. Productos naturales con actividad leishmanicida	19
- Quinonas	20
- Alcaloides	22
- Flavonoides	26
- Terpenos	26
2. Tripanosomiasis	28
2.1. Agente Causal	29
2.2. Distribución y Morfología	30
2.3. Taxonomía	33

2.4. Vector.....	33
2.5. Ciclo biológico	34
2.6. Epidemiología	35
2.7. Manifestaciones clínicas.....	38
2.8. Tratamiento.....	39
2.8.1. Nifurtimox.....	40
2.8.2. Benznidazol.....	40
2.9. Otras posibilidades terapéuticas.....	42
2.9.1. Nitrofuranos y Nitroimidazoles.....	42
2.9.2. Alopurinol y Pirazol pirimidinas.....	43
2.9.3. Productos naturales con actividad tripanocida	44
3. Otros biomodelos evaluados en este estudio.....	47
3.1. Insectos.....	47
4. Potencial farmacológico de las plantas.....	49
5. Plantas seleccionadas para este estudio.....	51
5.1. <i>Geissospermum</i> sp.....	56
5.2. <i>Aspidosperma</i> sp	57
5.3. <i>Aristolochia pilosa</i>	60
5.4. <i>Tabebuia serratifolia</i>	60
5.5. <i>Tradescantia zebra</i>	61
5.6. <i>Cedrela odorata</i>	61
5.7. <i>Chondodendron tomentosum</i>	62
5.8. <i>Paullinea clavigera</i>	62
5.9. <i>Brunfelsia grandiflora</i>	63
5.10. <i>Zamia ulei</i>	63
6. Objetivos.....	64

Material y Métodos

1. Material biológico	67
1.1. Material vegetal.....	67

1.2. Parásitos.....	83
1.2.1. <i>Leishmania infantum</i>	83
1.2.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	83
1.3. Células de ovario de hamster chino (CHO).....	84
1.4. Insectos diana.....	85
- Insectos masticadores.....	85
- Insectos chupadores.....	86
2. Medios de cultivo, soluciones, reactivos y fármacos de referencia.....	87
2.1. Medios de cultivo.....	87
2.2. Soluciones y reactivos.....	88
2.3. Fármacos de referencia.....	90
3. Técnicas generales.....	92
3.1. Técnicas instrumentales.....	92
3.2. Técnicas cromatográficas.....	93
4. Ensayos de actividad biológica.....	96
4.1. Ensayos de actividad antiparasitaria.....	96
4.2. Ensayos de citotoxicidad.....	99
4.3. Ensayos de actividad en insectos.....	100
5. Fraccionamiento químico biodirigido.....	103
5.1. <i>Zamia ulei</i>	103
5.1.1. Obtención de extracto crudo.....	103
5.1.2. Fraccionamiento.....	104
5.1.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados.....	107
5.2. <i>Chondodendron tomentosum</i>	109
5.2.1. Obtención de extractos crudos.....	109
5.2.2. Fraccionamiento.....	109
5.2.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados.....	113
5.3. <i>Tabebuia serratifolia</i>	117
5.3.1. Obtención del extracto crudo.....	117

5.3.2. Fraccionamiento.....	117
5.3.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados.....	119

Resultados y discusión

1. Ensayos de actividad antiparasitaria e insecticida de extractos de plantas utilizadas en medicina tradicional peruana y sus perfiles químicos.....	123
1.1. Actividad antiparasitaria	124
1.2. Actividad citotóxica.....	128
1.3. Actividad antialimentaria.....	130
1.4. Perfiles químicos (RMN de ¹ H) de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de <i>A. pilosa</i> , <i>C. tomentosum</i> , <i>P. clavigera</i> y <i>Z. ulei</i>	133
1.4.1. Perfil químico de los extractos de tallo de <i>A. pilosa</i>	133
1.4.2. Perfil químico de los extractos de corteza de <i>C. tomentosum</i>	137
1.4.3. Perfil químico de los extractos de corteza de <i>P. clavigera</i>	139
1.4.5. Perfil químico de los extractos de tallo subterráneo de <i>Z. ulei</i>	142
2. Aislamiento e identificación de productos puros. Evaluación antiparasitaria y citotóxica.....	145
2.1. <i>Zamia ulei</i>	145
2.2. <i>Chondodendron tomentosum</i>	149
2.3. <i>Tabebuia serratifolia</i>	155
3. Actividad antiparasitaria y citotóxica de los géneros <i>Geissospermum</i> y <i>Aspidosperma</i> (Apocynaceae) y sus alcaloides.....	171
3.1. <i>Geissospermum reticulatum</i>	171
3.1.1. Alcaloides aislados de <i>G. reticulatum</i>	173
3.2. <i>Aspidosperma desmanthum</i>	176
3.2.1. Alcaloides aislados de <i>A. desmanthum</i>	177
3.3. <i>Aspidosperma spruceanum</i>	183
3.3.1. Alcaloides aislados de <i>A. spruceanum</i>	184
3.4. <i>Aspidosperma schultesii</i>	188
3.4.1. Alcaloides aislados de <i>A. schultesii</i>	188

3.5. <i>Aspidosperma rigidum</i>	189
3.5.1. Alcaloides aislados de <i>A. rigidum</i>	190
Conclusiones	195
Anexos	199
Abreviaturas	217

Introducción y objetivos

Introducción y objetivos

Las enfermedades parasitarias ocupan un lugar preeminente entre las enfermedades de los trópicos húmedos; están muy difundidas y constituyen un serio problema de salud pública, no solo por su importancia sanitaria sino también por su trascendencia socioeconómica. Los protozoos parásitos están entre los patógenos más comunes del mundo; se reconocen como los agentes causantes de algunas de las enfermedades tropicales más serias del hombre y de patologías importantes en los animales domésticos.

La tripanosomiasis y la leishmaniasis, son enfermedades parasitarias que afectan a una parte importante de la población mundial, principalmente en los países en desarrollo¹. Debido a esto son consideradas por la Organización Mundial de la Salud, junto a la malaria, entre las seis enfermedades tropicales más importantes².

1. Leishmaniasis

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades derivadas de la infección producida por protozoos del género *Leishmania*, que parasita las células del sistema reticuloendotelial. Los parásitos son transmitidos por la picadura de las hembras de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, de los cuales más de 30 especies son vectores demostrados. El reservorio lo constituyen generalmente mamíferos salvajes o domésticos, aunque también puede ser una infección antroponótica. Su capacidad infectiva se manifiesta de forma variada en la sintomatología, dando lugar a formas viscerales (Kala-azar), mucocutáneas y cutáneas.

La infección por *Leishmania* constituye un problema de extraordinaria envergadura desde el punto de vista de la salud pública ya que afecta a la población de 88 países de zonas intertropicales y templadas, de entre las cuales sólo en 40 es de

¹ Chan, Bacab, M.; Peña, Rodríguez, L. M. 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. Nat. Prod. Rep. 18, 674 – 688.

² World Health Organization [sede web]. Ginebra, Suiza: World Health Organization, [actualizado 11 de mayo 2007, acceso mayo 2007]. TDR diseases. Disponible en: <http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm>

declaración obligatoria. Debido a esto, de los aproximadamente 2 millones de casos nuevos estimados por año, sólo 600.000 se declaran oficialmente. La prevalencia está en torno a los 12 millones de enfermos y la población en riesgo es de 350 millones de personas³. De los casos nuevos, una cuarta parte corresponden a las formas viscerales, el 90% se dan en la India, Nepal, Bagladesh, Brasil y Sudán. El 90% de las formas cutáneas ocurren en Afganistán, Arabia Saudí, Irán, Siria, Brasil y Perú. Por lo que respecta a las mucocutáneas, el 90% se encuentran en Bolivia, Brasil y Perú⁴.

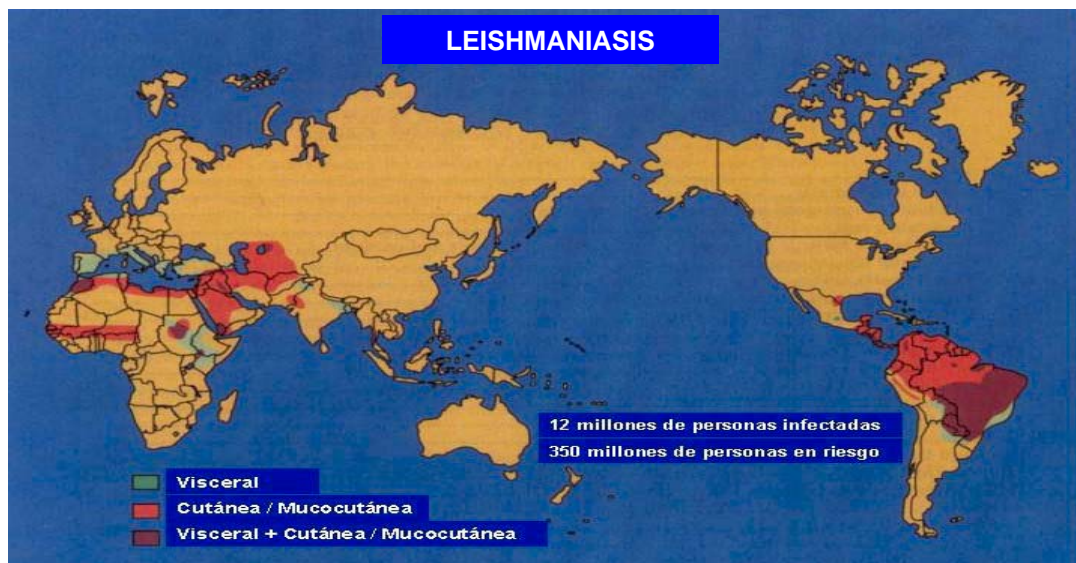


Figura 1: Distribución de la leishmaniasis en el mundo⁵

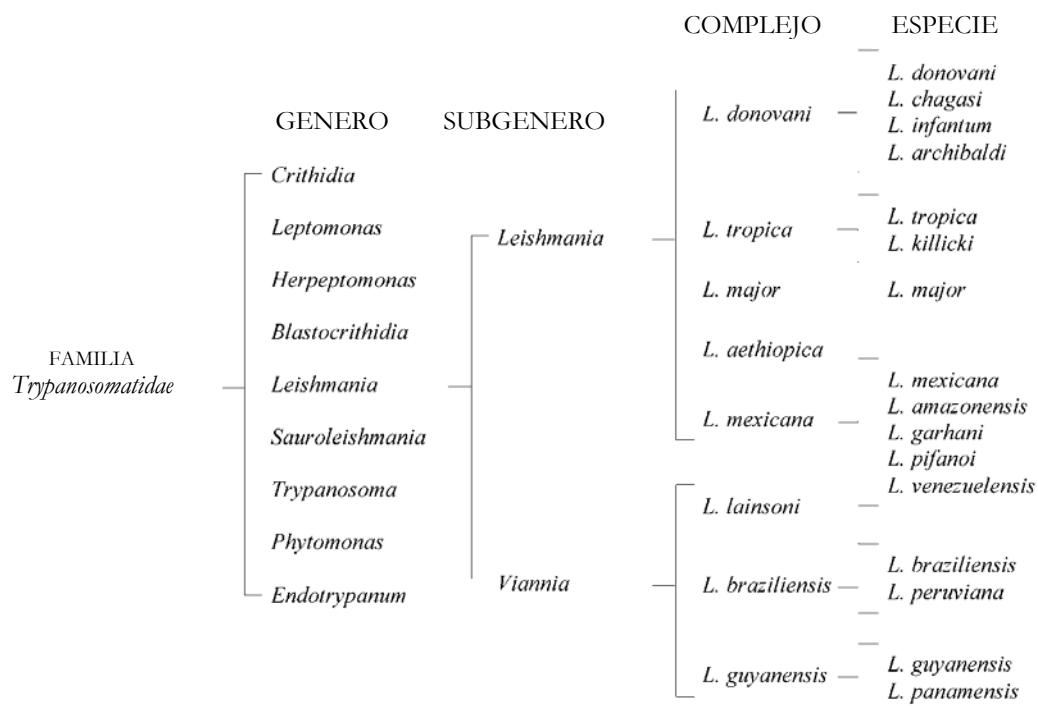
El género *Leishmania* fue descrito en 1903 por Leishman y Donovan en la India, y simultáneamente por Wright en un niño armenio. Se trata de un protozoo flagelado perteneciente a la clase Zoomastigophorea, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae. El género incluye más de dos docenas de especies (Tabla 1), la mayoría de las cuales parasitan al ser humano. De todas ellas, *L. donovani* (*L. archibaldi* en el este de África) y *L. infantum* (*L. chagasi* en el nuevo Mundo), tienen un tropismo

³ WHO. Report on Global Surveillance of epidemic-prime infectious diseases. WHO/GDS/GSR/ISR/2000.1.

⁴ García-Almagro, D. 2003. Leishmaniasis cutánea. Actas Dermosifiliogr. 1, 1-24.

preferentemente visceral, mientras que en el resto de las especies es cutáneo o mucocutáneo. No obstante, algunas de estas especies viscerotrópicas pueden dar lugar a afección exclusivamente cutánea, como es el caso de *L. infantum*, agente de la leishmaniasis cutánea en España y en el resto de la cuenca del Mediterráneo occidental, y *L. chagasi*, responsable de formas cutáneas en el Nuevo Mundo. Igualmente se han escrito casos de afecciones viscerales por *L. tropica* en zonas endémicas y en veteranos de la guerra del Golfo⁴.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Leishmania* spp. según Lezama-Dávila e Isaac-Márquez. 1995⁶



⁵ Handman, E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin. Microbiol. Rev. 14, 229-243.

⁶ Lezama-Dávila, C. M.; Isaac-Márquez, A. P. 1995. Inmunológica de las *Leishmaniasis*. UAC. México.

1.1. Morfología

Leishmania se presenta bajo una forma intracelular, **amastigote**, que se encuentra dentro del sistema reticuloendotelial del mamífero huésped, así como en frotis y biopsias; y en forma flagelada, **promastigote**, en el interior del intestino del vector y en los medios de cultivo.

Los amastigotes (Figura 2) se presentan como cuerpos redondeados u ovalados de 2 a 6 μm de diámetro, en los que se identifican un núcleo, un kinetoplasto puntiforme y un flagelo interno, este último solo visible al microscopio electrónico^{7,8}.

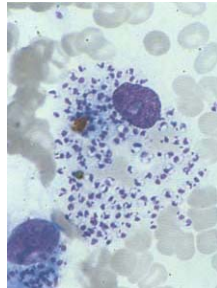


Figura 2: Amastigotes en impronta de médula ósea⁹

Los promastigotes (Figura 3) son alargados, de alrededor de 20 μm de longitud por 2-3 μm de anchura, con un núcleo central, un flagelo externo anterior rodeado de membrana plasmática, de longitud similar al cuerpo del parásito y un kinetoplasto ubicado en el extremo anterior, en la proximidad del origen del flagelo^{7,10}.

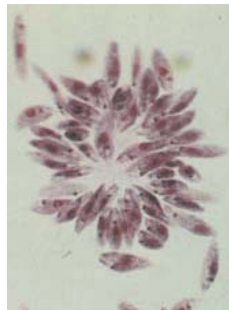


Figura 3: Promastigotes formando una roseta⁹

⁷ Chang, P. G. H. 1956. The ultrastructure of *Leishmania donovani*. J. Parasitol. 42, 126-136.

⁸ González-González, G.; Rodríguez, González, C., Simón, Merchán, A. 1976. Morfología de la *Leishmania tropica* en su estado intracelular en la dermis humana. Actas Dermo-Sif. 67, 527-534.

⁹ Rondanelli, E. G.; Scaglia, M. 1993. Atlas of human protozoa. Masson S. P. A. Milano.

¹⁰ Dedet, J. P.; Pratlong, F.; Lanotte, G.; Ravel, C. 1999. The Parasite. Clin. Dermatol. 17, 261-268.

1.2. Ciclo biológico

Para alimentarse la hembra del insecto vector pica al mamífero reservorio, de este modo los amastigotes de los tejidos infectados o de la sangre pasan al tracto digestivo del díptero y en el intestino medio se transforman en promastigotes unas 24-36 horas tras la picadura e inician una rápida multiplicación.

Dentro del tubo digestivo del vector, las características del promastigote van cambiando desde la fase de nectomona sujeto a las microvellosidades del tubo digestivo, a la de promastigote infectivo o metacíclico libre en la hipofaringe, pasando por una fase intermedia de haptomona.

Este proceso se conoce como metaciclogénesis y dura aproximadamente 10 días¹¹. Los promastigotes metacíclicos rellenan la faringe y probóscide del díptero y permanecen allí hasta una nueva picadura, momento en el que serán inoculados en un nuevo huésped. Existe un alto nivel de especificidad entre vector y especie de *Leishmania* ligada a la estructura del parásito y a características genéticas del insecto, de modo que una especie de flebótomo sólo es susceptible a una o unas especies de *leishmania* y viceversa¹².

Con cada picadura entran en la dermis entre 10 y 200 promastigotes metacíclicos, alguno de los cuales son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, mientras que otros se adhieren a los receptores de superficie de los macrófagos y son fagocitados. Una vez dentro del macrófago se transforman nuevamente en amastigotes, que se mantienen en los fagolisosomas o vacuolas parasitóforas del macrófago. En estas estructuras los amastigotes sobreviven y se multiplican por fisión binaria hasta que el macrófago queda repleto de ellos, momento en el que se rompe y los parásitos pasan al espacio intracelular, donde serán nuevamente captados por otros macrófagos^{10,13} (Fig 4).

¹¹ Sacks, D. L.; Perkins, P. V. 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within *Phlebotominae* sandflies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, 456-459.

¹² Kamhawi, S.; Modi, G. B.; Pimenta, P. F. 2000. The vectorial competence of *Phlebotomus sergenti* is specific for *Leishmania tropica* and is controlled by species-specific, lipophosphoglycan-mediated midgut attachment. Parasitol. 121, 23-53.

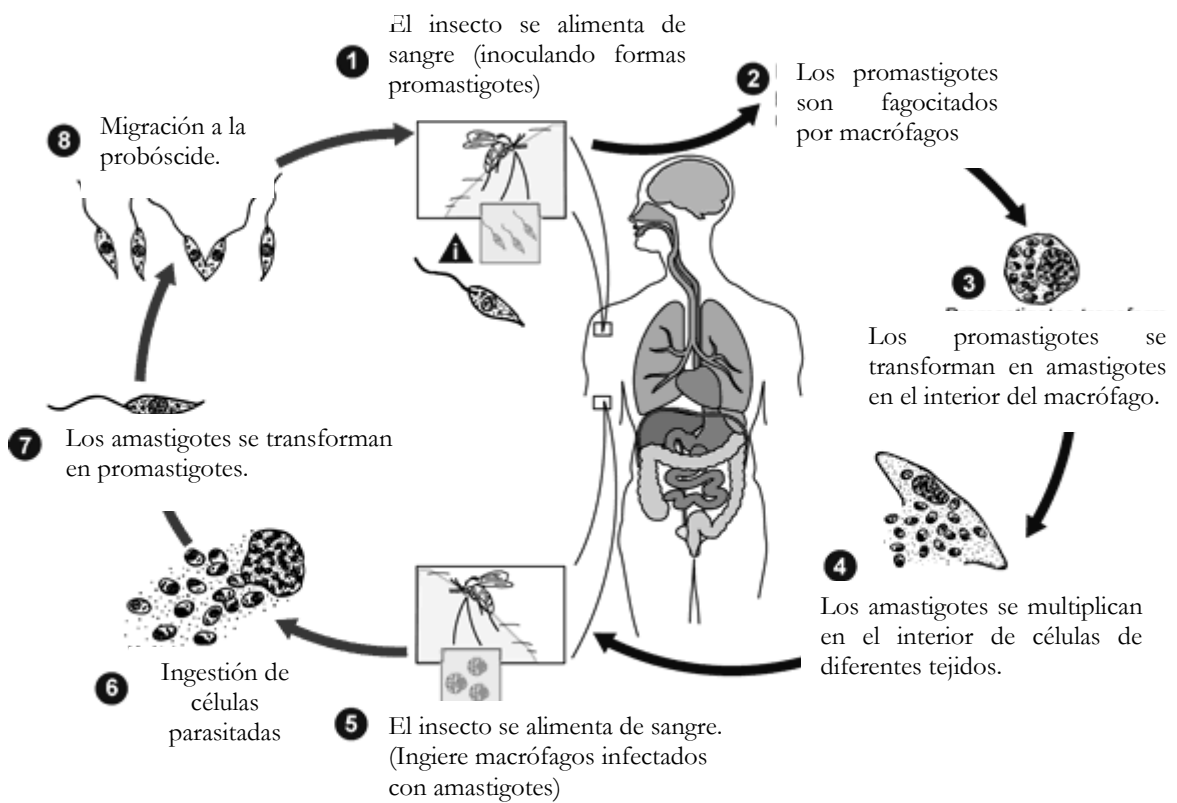


Figura. 4: Ciclo biológico y formas del género *Leishmania*¹⁴

Un factor fundamental asociado a la virulencia es el tropismo de la especie, que hace que las especies viscerotropas *L. donovani* (*L. archibaldi*), *L. infantum* (*L. chagasi*) alcancen rápidamente cualquier área del sistema reticuloendotelial, mientras que las especies dermatropas como *L. tropica* o *L. major*, quedan acantonadas preferentemente en la piel¹³. La situación de inmunocompetencia del sujeto infectado también es determinante del alcance de la infección.

¹³ Weigle, K.; Saravia, N. G. 1996. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol. 14, 433-450.

¹⁴ <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

1.3. Formas y manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de las *leishmaniasis* son extraordinariamente variadas y dependen de factores del parásito como son: el tropismo de la especie, su capacidad infectiva, patogenicidad y virulencia; también de factores dependientes del vector como el número de picaduras, o de la situación inmunitaria y susceptibilidad genética del huésped.

El polimorfismo clínico se agrupa en cuatro formas diferentes: leishmaniasis visceral la forma más grave, leishmaniasis mucocutánea, leishmaniasis cutánea y cutánea difusa⁴.

1.3.1. Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea es denominada, entre otras formas, como botón de oriente en Asia, o úlcera del chiclero en América Central y del Sur. El periodo de incubación tras la picadura del vector es de entre una semana y tres meses de promedio, lo que depende de diversos factores, como la especie de *Leishmania* y la cantidad de parásitos inoculados^{15,16}. Produce lesiones en la piel, principalmente en la cara y las piernas. Aunque estas lesiones se curan espontáneamente, pueden crear graves discapacidades y cicatrices permanentes. Después de la recuperación y un tratamiento exitoso, la leishmaniasis cutánea induce inmunidad en caso de reinfección por *Leishmania* de la misma especie.

Leishmaniasis cutánea aguda: es la forma mas habitual y comprende aquellos casos de menos de un año de evolución si se trata de infecciones zoonóticas, y de dos años si son antroponóticas. Está causada con más frecuencia por *L. tropica*, *L. mayor*, *L. infantum* (en la cuenca mediterránea occidental, fundamentalmente) y *L. aethiopica*, en el Viejo Mundo, *L. mexicana* y *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo.

¹⁵ Salman, S. M.; Rubies, N. G.; Kibbi, A. G. 1999. Cutaneous leishmaniasis: Clinical features and diagnosis. Clin. Dermatol. 17, 291-296.

¹⁶ Kubba, R.; Al Gindan, Y.; El Hassan, A. M. 1987. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J. Am Acad. Dermatol. 16, 1183-1189.

Leishmaniasis cutánea crónica: Incluyen los casos que exceden la duración de las formas agudas. Suele estar asociada con *L. tropica* en el Viejo Mundo y con *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo, donde es mucho más infrecuente^{13,17,18,19}, aunque también puede producirse por *L. infantum*²⁰.

1.3.2. Leishmaniasis cutánea difusa

La leishmaniasis cutánea difusa es difícil de tratar debido a la difusión de sus lesiones, que se asemejan a la lepra. Curan espontáneamente. Esta forma en particular se relaciona con un defecto del sistema inmunológico y es a menudo caracterizada por recaídas después del tratamiento. Producida por *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y *L. mexicana* en el Nuevo Mundo^{13,15,17}.

1.3.3. Leishmaniasis mucocutánea

También llamada “espundia” en América del Sur, no solo causa lesiones que desfiguraron el rostro, sino que destruye las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta. La cirugía reconstructiva es una parte importante de la terapia. Es producida por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* y *L. panamensis*, y puede presentar cura espontánea en un determinado porcentaje de los casos.

1.3.4. Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral, también conocida como “kala azar”, se caracteriza por presentar fiebre irregular, pérdida de peso, hinchazón del hígado y el bazo además de anemia. Es la forma más grave de leishmaniasis. Puede ser mortal si no se trata.

¹⁷ Convit, J. 1996. Leishmaniasis: Immunological and clinical aspects and vaccines in Venezuela. Clin Dermatol. 14, 479- 487.

¹⁸ Srebrink, A.; Brenner, S. 1996. Leishmaniasis recidivas mimicking lupus vulgaris. Int. J. Dermatol. 35, 572-573.

¹⁹ Saravia, N. G.; Weigle, K.; Segura, I. 1990. Recurrent Lesions in human *Leishmania braziliensis* infection: reactivation or reinfection? Lancet. 336, 398-402.

²⁰ Soler Burgos, J. 1946. Leishmaniasis “sine leishmaniasis”. Actas Dermo-Sif. 37, 579-582.

El período de incubación puede ser de meses o años, y a diferencia de las formas cutáneas, esta afecta a los órganos internos. Después del tratamiento y la recuperación los pacientes pueden desarrollar leishmaniasis cutánea crónica. Está producida principalmente por *L. donovani*, *L. chagasi* y *L. infantum*.

1.4. Vector

Los vectores de la leishmaniasis son insectos del orden *Díptera*, familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* y género *Phlebotomus* (12 subgéneros), en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* (25 subgénero), en el Nuevo Mundo (Figuras 5 y 6). La identificación de los flebotominos como vectores fue llevada a cabo por primera vez por Adle y Theodor en 1925. El díptero se distribuye preferentemente en las zonas intertropicales y templadas, aunque alcanzan los 50° N de latitud en el suroeste de Canadá. No se ha localizado en Nueva Zelanda e islas del Pacífico, ni en la Antártida.

En cuanto a la altura, su distribución va del nivel del mar hasta 3.000 m sobre el mismo^{21,22}.



Figura 5: *Phlebotomus* sp



Figura 6: *Lutzomyia* sp

²¹ Killick, Kendrick, R. 1999. The biology and control of Phlebotomine Sand Flies. Clin Dermatol. 17, 279-289.

²² Lane, R. P. 1996. Sandflies (Phlebotominae). En: Lane RP, Crosskey R, W, editors. Medical insects and arachnids. London: Chapman and Hall. 78-119.

1.5. Epidemiología

La prevalencia de la infección por *Leishmania* está claramente subestimada, además, existen factores en el mundo actual que sin duda, están contribuyendo a su progresión. El incremento de viajes a zonas endémicas por motivos turísticos o laborales, el transporte de mercancías propio del comercio internacional, la emigración de zonas no afectadas a zonas endémicas, los grandes movimientos de masas por guerras, la deforestación y el desarrollo agrícola, la reducción o eliminación de las campañas de fumigación insecticida contra el paludismo, urbanización incontrolada, precariedad de medios y condiciones sanitarias en áreas intensamente subdesarrolladas, la irrupción del sida y otros factores están provocando un incremento de la transmisión y diseminación de la enfermedad.

En el Perú no hay pruebas de la existencia de la leishmaniasis visceral, tan solo leishmaniasis cutánea y mucocutánea, definidas por características geográficas y clínicas: la leishmaniasis andina (uta) y la leishmaniasis selvática (espundia). La primera se presenta en las laderas occidentales de los valles andinos e interandinos entre 300 y 800 metros de altura. La mayor parte de los casos se manifiestan en niños y más del 80% de la población adulta presenta cicatrices. En zonas endémicas, del 25 al 32% de los perros se encuentran infectados presentando un cuadro de leishmaniasis cutánea canina.

Los principales vectores son *Lutzomyia peruensis* y *Lutzomyia verrucarum* (capturados dentro de las casas)²³. En el caso de la leishmaniasis selvática, la transmisión está relacionada a la actividad ocupacional realizada en el bosque, donde existe mucho contacto entre el hombre y el vector²⁴. Además la enfermedad va en aumento en el país²⁵.

²³ Medina, G. 2002. Infección por leishmania sp. En caninos del distrito de Pampas Grandes, Ancash. Rev. Inv. Vet. 13, 44-50.

²⁴ Muñoz, A. M.; Pareja, B. 2003. Plantas Medicinales empleadas en el tratamiento de la leishmaniasis. Folia Dermatol. P. 14, 10-14.

²⁵ Arias, J.; Beltran, F.; Besjeux, P. 1996. Epidemiología y control de la leishmaniasis de las Américas, por país o territorio. Cuaderno Técnico N° 44. OPS.

En España tanto la leishmaniasis cutánea como la visceral están producidas por *Leishmania infantum* y han sido enfermedades de declaración obligatoria (EDO, rúbrica 085) desde febrero de 1982 hasta el 1 de julio de 1996. A partir de entonces son enfermedades de notificación regional y sólo se registran en las comunidades autónomas donde se considera oportuno. Por ello no se dispone de información fiable.

Una estimación realista sería de unos 200 casos nuevos de leishmania visceral y 100 de cutánea al año²⁶.

Sobre una población aproximada de 380.000 habitantes, entre enero de 1992 y febrero de 2004, se registraron 131 pacientes con lesiones cutáneas o mucosas en los que se confirmó el parásito. Si a ello se añaden los casos no demostrados con la presencia del parásito que presentaban lesiones sospechosas de botón de oriente, los curados con antimoniales intralesionales y el número indeterminado de pacientes que no llegan a las consultas por la regresión espontánea a de las lesiones, es muy verosímil que la cifra de pacientes en este período pueda incrementarse como mínimo en un 20–25%, lo que hace pensar que la incidencia de la leishmaniasis cutánea en España excede ampliamente las previsiones antes mencionadas²⁷.

1.6. Tratamiento y Prevención

1.6.1. Tratamiento tópico

La paromomicina es un aminoglucósido obtenido de *Streptomyces rimosus*, y se ha utilizado en diversas formulaciones tópicas. Aparte de la paromomicina, el metilcloruro de benzetonio tiene actividad contra *Leishmania*.

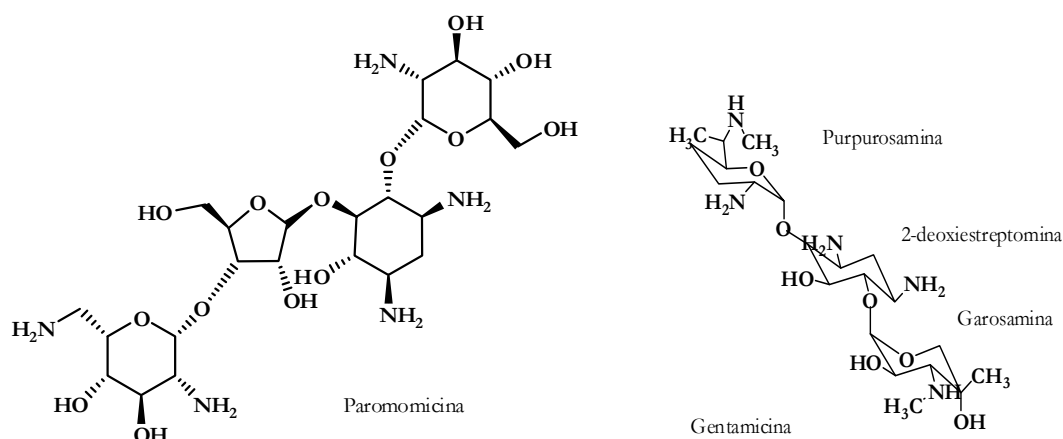
Otros aminoglucósidos con cierta actividad antileishmanial son la gentamicina y la kanamicina, pero su utilidad clínica es escasa al igual que ocurre con la rifampicina^{28,29}.

²⁶ Alvar, J. 2001. Las Leishmaniasis: de la biología al control. Laboratorios Intervet. 2º Edición Salamanca. 95.

²⁷ Urrutia, S.; García, G.; Schoendorff, G. 2000. Leishmaniasis cutánea en la provincial de Toledo. Actas Dermo.-sif. 91, 1-8.

²⁸ El-On J.; Livshin R.; Even Paz, Z. 1986. Tropical Treatment of cutaneous Leishmaniasis. J. Invest. Dermatol. 87, 284-288.

²⁹ El-On J.; Halevy, S.; Grunwald, M.; Weinrauch, L. 1992. Tropical Treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* a double blind control study. J. Am. Acad. Dermatol. 27, 27-31.



El iniquimod es una imidazoquinolina, comercialmente disponible en crema. Activa los macrófagos induciendo la producción de NO, lo que conlleva a la destrucción intracelular de los amastigotes de *leishmania in vitro*. Su aplicación tanto en humanos como en ratones está ofreciendo resultados prometedores^{30,31}.

La anfotericina B liposomal en formulaciones tópicas con etanol se ha mostrado eficaz en ratones, pero de momento, no parece tener éxito en humanos.

1.6.2. Tratamiento intralesional

El empleo de antimoniales intralesionales con buenos resultados se remonta a la década de 1940^{31,32,33,34}. Para el tratamiento de elección de las formas típicas de botón de oriente uni o plurilesional se ha utilizado antimonio de meglumina (glucantime) dando excelentes resultados; también el estibogluconato de sodio (Pentostan) ha ofrecido resultados similares³⁵.

³⁰ Garnier, T.; Croft, S. L. 2000. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr. Opin. Invest. Dr.* 3, 538-544.

³¹ Vilanova, X. 1942. Las formas degenerativas de la *Leishmania tropica* en el curso de los tratamientos antimoniales. *Actas Dermo.-Sif.* 33, 521-523.

³² Vilanova, X. 1942. Utilidad de los tratamientos de orden general en determinadas formas de leishmaniasis cutáneas mediterránea. *Actas Dermo.* 33, 256-257.

³³ Vilanova, J. 1943. Fundamentos técnicos y resultados obtenidos en el tratamiento intralesional del botón de oriente con un nuevo preparado de antimonio a alta concentración. *Rev. Clin. Esp.* 8, 21-28.

³⁴ Canto Ibáñez, F. 1945. Leishmaniasis cutánea y soluestibosán. *Actas Dermo- Sif.* 36, 774-777.

³⁵ Kellum, R. 1986. Treatment of cutaneous leishmaniasis with an intralesional antimonial drug (pentostan). *J. Am. Acad. Dermatol.* 15, 620-622.

Ambos son antimoniales pentavalentes que se transforman en trivalentes en el interior del macrófago para poder ejercer su acción mediante el bloqueo del metabolismo energético del parásito.

Lo reducido de las dosis, con minimización de la toxicidad sistémica y disminución del coste, comodidad de aplicación, rapidez de respuesta y buen resultado estético avalan esta forma de tratamiento para las formas cutáneas del Viejo Mundo, aunque son necesarios más estudios controlados con placebo para validar en grandes series su eficacia³⁶. Estudios recientes han determinado que la artemisinina, una lactona sesquiterpénica aislada de *Artemisia annua*, que muestra actividad frente a *Plasmodium falciparum*, es también eficaz en el tratamiento intralesional de la leishmaniasis cutánea³⁷.

1.6.3. Cirugía y Terapéutica física

La cirugía no tiene lugar en el caso de la leishmaniasis cutánea, con la excepción de la extirpación de lesiones pequeñas que no hayan podido diagnosticarse con frotis. El legrado por sí solo no es curativo. La terapia mediante agua a 39-41°C en bañera circulante, la radiación infrarroja y el uso de ultrasonidos para producir hipotermia local, se han utilizado con éxito aparente, pero hasta el momento no existen datos de estudios controlados y de evolución a largo plazo^{38,39}.

También aparecen citados en la bibliografía la crioterapia con nieve carbónica, la aplicación de NO₂ (óxido nitroso) y el empleo de nitrógeno líquido con buenos resultados⁴⁰.

³⁶ Moskowitz P.; Kurban, A. K. 1999. Treatment of cutaneous leishmaniasis: Retrospectives and advances for the 21 st century. Clin. Dermatol. 17, 305-315.

³⁷ Ghaffarpasand, S.; Seraj, S. R.; Heiran, H. R. 2009. Intralesional artemisinin for the treatment of cutaneous Leishmaniasis. Med. Hypotheses. 72, 233-234.

³⁸ Neva, F.; Petersen, E.; Corsey, R. 1984. Observations on local heat treatment for cutaneous leishmaniasis. J. Am. Trop. Med. Hyg. 33, 800-804.

³⁹ Aram, H.; Leibovici, V. 1987. Ultrasound-induced hyperthermia in the treatment of cutaneous leishmaniasis. Cutis. 40, 350-353.

⁴⁰ Alcalde, M.; Delgado, V.; Gutiérrez, M. T. 1989. Leishmaniasis cutánea: alternativas terapéuticas al glucantine. Actas Dermo- Sif. 80, 259-266.

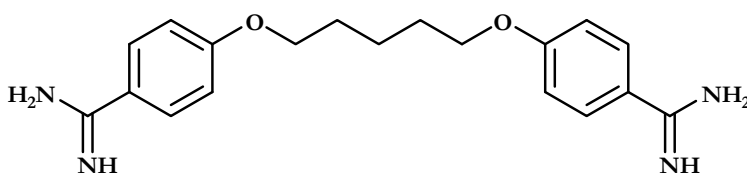
1.6.4. Tratamiento sistémico

- Antimoniales pentavalentes

Son los medicamentos de primera elección cuando está indicado el tratamiento sistémico^{36,41}. El antimonio de meglumina (Glucantime) y estibogluconato de sodio (Pentostan) también son utilizados en terapia intralesional. Entre los efectos secundarios frecuentes podemos mencionar las reacciones de hipersensibilidad con erupciones cutáneas, náuseas y vómitos, cefaleas, dolor abdominal, fiebre, mialgias y artralgias. Otros mas graves son las alteraciones electrocardiográficas, elevación de las transaminasas, pancreatitis y neuropatía periférica.

Pentamidina

Además de la actividad antileishmania, es también eficaz frente a los tripanosomas africanos (*Trypanosoma gambiense* y *T. rhodesiense*) y *Pneumocystis jiroveci* (antes *carinii*). Es un fármaco de segunda línea que se ha utilizado sobre todo en el Nuevo Mundo. Entre los efectos secundarios comunes están: dolor en el lugar de la inyección, cefaleas, mialgias y náuseas. La falta de estudios controlados y comparativos mantiene a este medicamento como una opción secundaria.



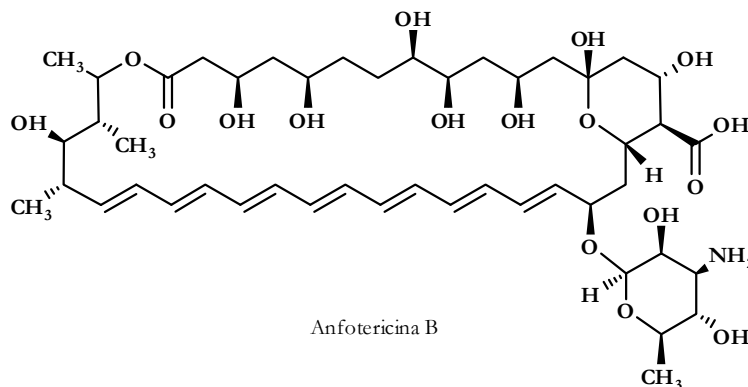
Pentamidina

Anfotericina B

Es un antibiótico poliénico macrocíclico obtenido de *Streptomyces nodosus*, y se encuentra así mismo en segunda línea de la terapéutica sistémica antileishmania. Su amplia toxicidad se ha venido a paliar por el desarrollo de formas liposomales. En las

⁴¹ Koff, A.B.; Rosen, T. 1994. Treatment of cutaneous Leishmaniasis. J. Am. Acad. Dermatol. 31, 693-708.

formas cutáneas no complicadas de botón de oriente no está indicado por la sencillez y coste de otras alternativas, en especial el antimonio de meglumina intralesional.

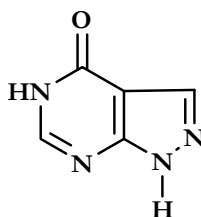


- Aminosidina y Paromomicina

A pesar de su uso en el tratamiento tópico, su empleo como agente terapéutico único no es útil en la leishmaniasis cutánea.

- **Otros medicamentos**

Entre las diversas opciones alternativas a los antimoniales y la pentamidina, se han ensayado medicamentos de uso oral como el alopurinol^{42,43}, una pirazolpirimidina, que inhibe la xantina oxidasa, interfiriendo así con el metabolismo de los ácidos nucleicos del huésped e impidiendo la liberación de purinas.



Alopurinol

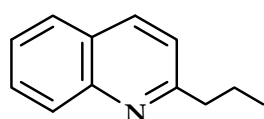
⁴² Pirmez, C.; Yamamua, M.; Uyemuta, K. 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 91, 1390-1395.

⁴³ Kalter, D. C. 1994. Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmaniasis. *Dermatol. Clin.* 12, 37-50.

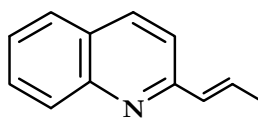
Leishmania es incapaz de sintetizar las purinas por sí misma y necesita las del huésped, por lo que la acción del alopurinol impide la síntesis de ácidos nucleicos del parásito. Sin embargo, en los ensayos clínicos, hasta el momento, se ha revelado de escasa utilidad como medicamento único en la leishmaniasis cutánea.

Los azoles, ketoconazol e itraconazol actuarían inhibiendo el sistema de ergosterol en la membrana del parásito, pero tampoco han demostrado eficacia relevante frente a *Leishmania*.

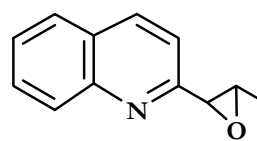
Así mismo se han utilizado la rifampicina y el metronidazol⁴⁰ sin resultados de interés. El comité de quimioterapia integrada del programa para la investigación de enfermedades tropicales (TDR) de la OMS ha establecido entre sus prioridades la investigación y desarrollo de tratamientos orales para la leishmaniasis cutánea. Entre los medicamentos actualmente en fase de estudio que se han mostrado eficaces, están las quinoleínas; chimanina B, D y 2-n-propilquinoleína, (derivadas de una planta medicinal boliviana, *Galipea longiflora*, de la familia Rutáceae), 8-aminoquinoleína y lepidina^{36,44}.



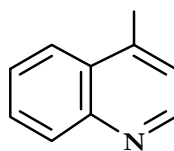
2-n-Propilquinolina



Chimania B



Chimania D



Lepidina

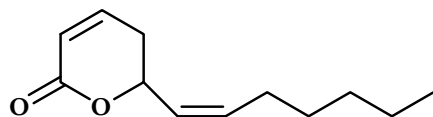
Así mismo, las chalconas, flavonoides oxigenados de la raíz de regaliz chino se han mostrado leishmanicidas *in vitro e in vivo*⁴⁵.

Desde hace algunos años, se ha intensificado la investigación etnomédica en busca de remedios de la medicina tradicional^{46,47}. Dentro de los numerosos compuestos

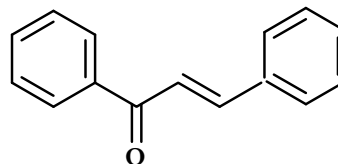
⁴⁴ Singh, S.; Sudndar, S.; Singh, V. 1997. Leishmaniasis: Recent advances in treatment. J. Am. Acad. Dermatol. 37, 512-513.

⁴⁵ Chen, M.; Christensen, S. B.; Theander, T. G.; Kharazuri, A. 1994. Antileishmanial activity of licochalcone a in mice infected with *Leishmania major* and in hamsteres infected with *Leishmania donovani*. Antimicrob. Agents. Ch. 38, 1339-1344.

que se están estudiando como potenciales antiprotozoarios podemos mencionar a la argentilactona aislada de *Annone haematantha*⁴⁸.



Argentilactona



Chalcona

1.6.5. Métodos tradicionales

Debido a la disponibilidad limitada de productos farmacéuticos eficaces, la mayoría de la gente en áreas endémicas de leishmaniasis depende en gran parte de tratamientos populares y de medicina tradicional para aliviar los síntomas. El tratamiento de la leishmaniasis consiste generalmente en la administración oral de los extractos crudos de las plantas para la forma sistémica de la enfermedad y como preparaciones tópicas de los extractos correspondientes para tratamiento de las infecciones de la piel¹.

1.6.6. Productos naturales con actividad leishmanicida

Existen 239 moléculas de origen natural con actividad leishmanicida conocida, que corresponden a distintas clases químicas entre las que encontramos alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, lactonas, quinonas, flavonoides, diterpenos, esteroides,

⁴⁶ Zerehsas, F.; Salmanpour, R.; Handjani, F. 1999. A double-blind randomized clinical trial of a tropical herbal extract (Z-HE) vs Systemic meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *Int. Dermatol.* 38, 610-612.

⁴⁸ Ghazanfari, T.; Hassan, Z. M.; Ebtekar, M. 2000. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major* infected BALB/ c mice. *J. Immunol.* 52, 491-495.

Waechter, A.; Ferreira, M.; Fournet, A. 1997. Experimental treatment of cutaneous leishmaniasis with argentilactone isolate from *Annone haematantha*. *Plant. Med.* 63, 512-513.

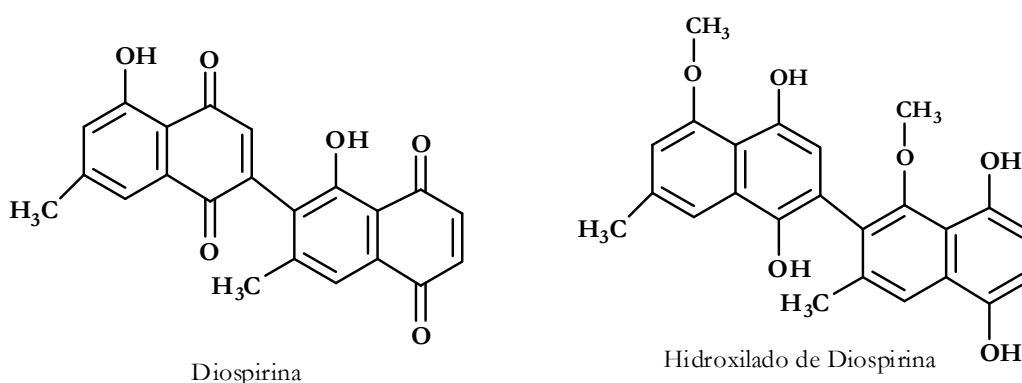
lípidos, iridoides, heterociclos oxigenados, carbohidratos, lignanos, cumarinas, fenilpropanoides, prótidos, y monoterpenos⁴⁹.

- Quinonas

Entre algunos de los productos naturales con actividad leishmanicida tenemos la diospirina, una bis-naftoquinona, aislada de corteza de *Diospyros montana* (Ebenaceae).

Diospirina presenta actividad frente a promastigotes de *Leishmania donovani*; aunque esta actividad no es selectiva contra los amastigotes en macrófagos⁵⁰. Por otra parte su derivado hidroxilado es efectivo frente a amastigotes en macrófagos infectados.

El mecanismo de acción de esta hidroxinaftoquinona se centra aparentemente sobre la base de su capacidad de interferir en el transporte de electrones en la mitocondria del parásito o en la generación de radicales libres durante la interacción entre el metabolito y la cadena respiratoria del parásito.



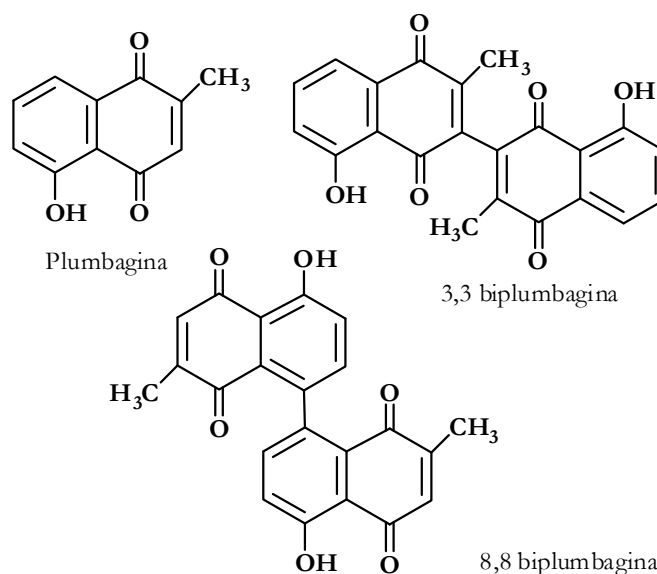
Plumbagina, una naftoquinona aislada del genero *Plumbago*, muestra actividad frente a amastigotes de *L. donovani* y *L. amazonensis*⁵¹. Plumbagina y los dimeros 3,3 biplumbagina y 8,8 biplumbagina, se han aislado de la corteza de *Pera benences*

⁴⁹ Rocha, L. G.; Almeida, J. R. G. S.; Macêdo, R. O.; Barbosa-Filho, J. M. 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. 12, 514-535.

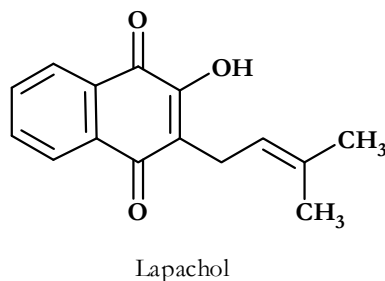
⁵⁰ Hazra, B.; Saha, K.; Ray, R.; Roy, D. K.; Sur, P.; Banerjee, A. 1987. Antiprotozoal activity of diospyrin Towards *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 738.

⁵¹ Croft, S. L.; Evans, A. T.; Neal, R. A. 1985. The activity of plumbagin and other electron carriers against *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79, 651-653.

(Euphorbiaceae), una planta utilizada en Bolivia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea⁵².



Otro metabolito con acción similar a la del hidroxilado de diospirina y plumbagina es el lapachol, una hidroxinaftoquinona obtenida a partir de especies de *Tabebuia* (Bignonaceae), que es poco activa frente a amastigotes de *L. donovani* en macrófagos de ratones⁵³.

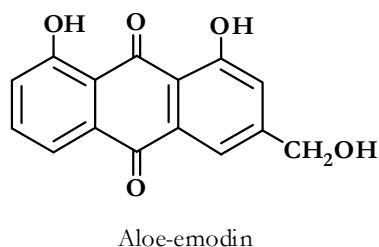
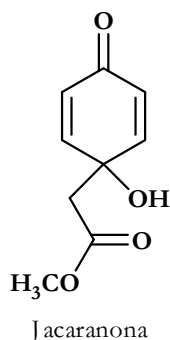


4-Hidroxi-1-tetralona es un metabolito aislado de la corteza de *Ampelocera edentula* (Ulmaceae) que presenta actividad contra *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani*⁴⁹. Estudios *in vivo* con *L. amazonensis* y *L. venezuelensis* mostraron que la actividad

⁵² Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cavé, A. 1992. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* 37, 159.

de 4-hidroxi-1-tetralona es similar a la demostrada por glucantime⁴⁹. La quinona jacaranona, aislada de las hojas de *Jacaranda copaia* (Bignoanaceae), muestra una fuerte actividad contra promastigotes de *L. amazonensis*. Además muestra una débil actividad *in vivo* cuando es administra por vía subcutánea a ratones infectados con *L. amazonensis* y una fuerte toxicidad cutánea cuando se aplica en el interior de las lesiones⁴⁹.

Aloe-emodin, una antroquinona aislada de la parte aérea de *Stefania dinklageni* (Menispermaceae), presenta actividad leishmanicida contra promastigotes y amastigotes de *L. donovani*.¹.



- Alcaloides

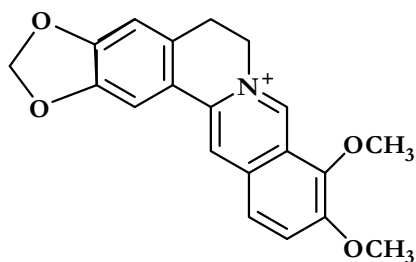
Quinolinicos y análogos de isoquinolinas

Berberina, alcaloide cuaternario isoquinolinico que se encuentra en varias familias de plantas como Annonaceae, Berberaceae y Menispermaceae, es uno de los alcaloides con mayor actividad leishmanicida. Este metabolito es el principal constituyente de muchos recursos botánicos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, la malaria y la amebiasis⁵⁴. Berberina se ha utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis desde hace 50 años y se ha demostrado que posee importante actividad tanto *in vitro* como *in vivo* frente a varias especies de *Leishmania*.

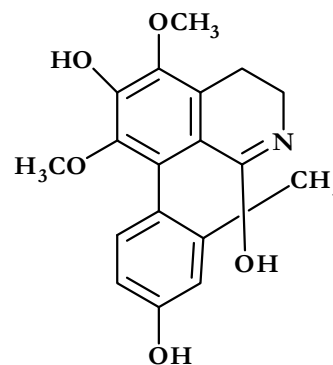
⁵³ Kaycer, O.; Kiderlen, A. F.; Croft, S. L. 2003. Natural Products as Antiparasitic drugs. Parasitol. Res. 90, 55-62.

⁵⁴ Marshall, S. J.; Rsumell, P. F.; Wright, W. C.; Anderson, M. M.; Phillipson, J. D.; Kirby, G. C.; Warhurst, D. C.; Schiff, Jr, P. L. 1994. In vitro antiplasmodial, antiamebic and cytotoxic activities of a series of bisbenzylisoquinoline alkaloids. Antimicrob. Agents. Ch. 38, 96-103.

Otro alcaloide isoquinolinico, (-)-isoguattouregidina, aislado de la corteza de *Guatteria foliosa* (Anonaceae), provoca una lisis total de los parásitos de *L. donovani* y *L. amazonensis*. Anonaina y liriodenina, aislados de la corteza de *Annona spinences* (Anonaceae), han demostrado actividad contra promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani*⁵⁵.



Berberina



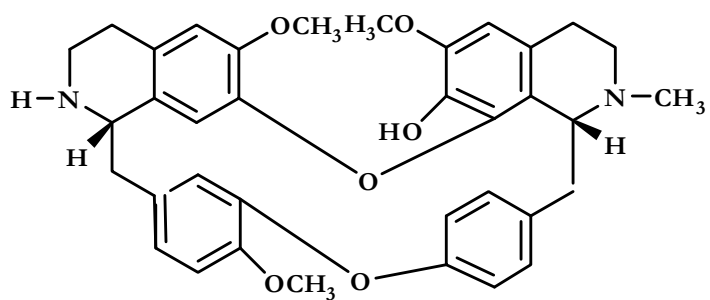
Isoguattouregidina

Bisbenzylisoquinólicos

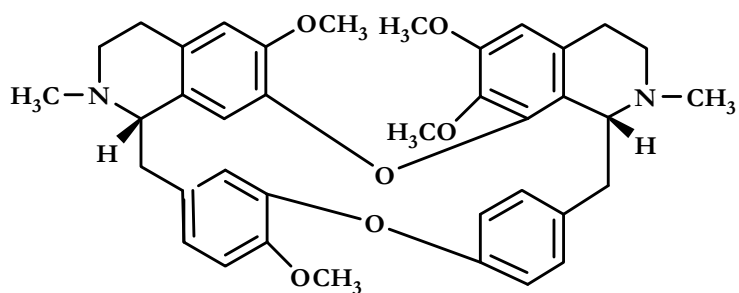
Se distribuyen ampliamente en la naturaleza y han sido aislados de diversas plantas comúnmente utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de las enfermedades parasitarias. Los estudios realizados han demostrado que daphnandrina, aislado a partir de *Albertisia papuana* (Menispermaceae), obaberina, obtenido de *Pseudoxandra sclerocarpa* (Annonaceae), gyrocarpina, producido por *Gyrocarpus americanus*, (Hernandiaceae), y limacina, aislado de *Caryomene olivasans* (Menispermaceae), presentan una fuerte actividad contra promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. donovani*⁵⁶.

⁵⁵ Queiros, E. F.; Roblot, F.; Cavé, A.; Paulo, M. Q.; Fournet, M. K. 1996. Alkaloids: Future Prospective to combat leishmaniasis. *J. Nat. Prod.* 59, 438.

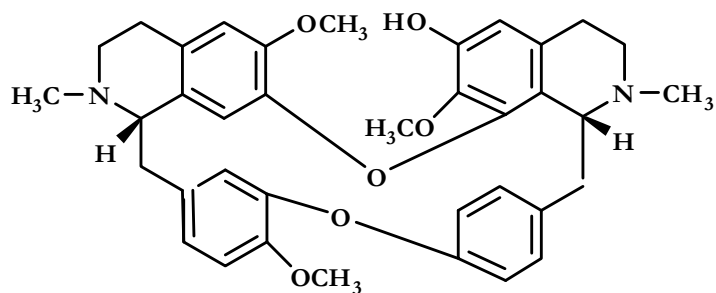
⁵⁶ Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Hoquemiller, R.; Cavér, A. 1993. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents. Ch.* 37, 859-863.



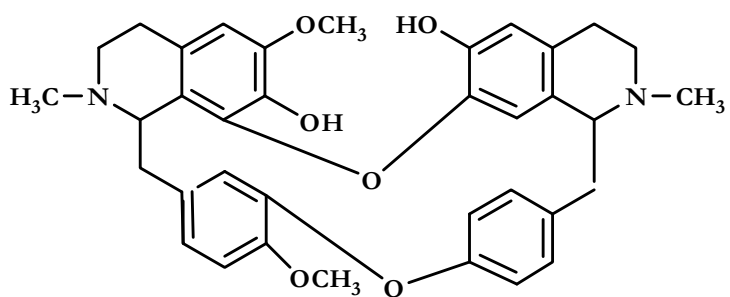
Daphnandrina



Obaberina

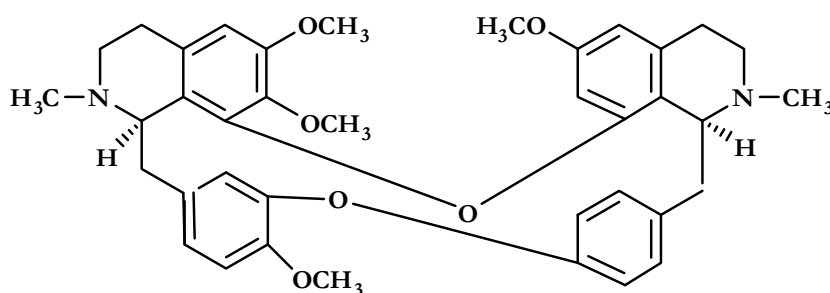


Gyrocarpina



Limacina

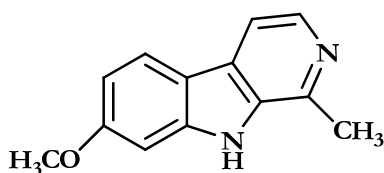
Otro alcaloide bisbencilisoquinolínico que muestra actividad contra promastigotes de *L. amazonensis*, *L. donovani* y *L. braziliensis* es isotetrandina, un metabolito aislado de *Limaciopsis loangensis* (Menispermaceae)⁵⁷; la actividad de este metabolito es comparable a la del glucantime cuando se analizaron frente a *L. amazonensis* y es ligeramente efectiva contra *L. venezuelensis*⁵⁶.



Isotetrandina

Análogos de los alcaloides indólicos

Entre algunos de los alcaloides indólicos que presentan actividad antiparasitaria podemos mencionar: harmalina, que es el principal constituyente de plantas que se usan en medicina tradicional para el tratamiento de la leishmaniasis (*Banisteriopsis caapi*, *Peganum harmala*, *Passiflora incarnata*); pero no es posible su uso como agente terapéutico porque produce efectos psicopáticos^{58,59}.



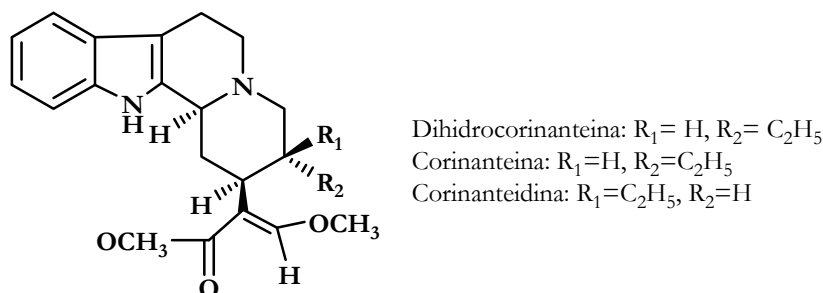
Harmalina

⁵⁷ Osorio, J.; Montoya, G.; Arango, G. 2006. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Medellín Colombia. 13, 61-84.

⁵⁸ Camacho, M. R.; Kirby, G. C.; Warhurst, S. L.; Croft, S. L.; Phillipson, D. J. 2000. Oxaporphine alkaloids and quinines from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. Plant. Med. 66, 478-480.

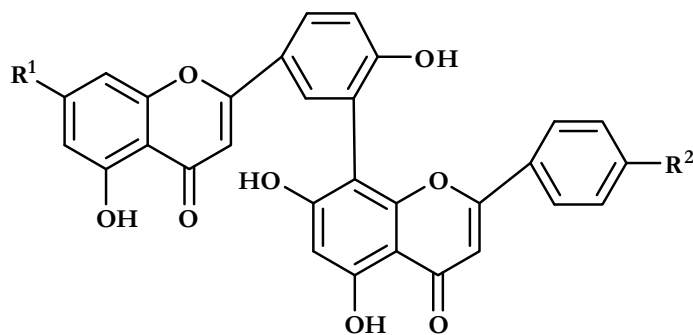
⁵⁹ Mahiou, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Rojas de Arias, A.; Yaluff, G.; Fournet, A.; Angelo, A. 1994. A new aporphine alkaloids from *Guatteria boliviana*. J. Nat. Prod. 57, 890.

Otros compuestos, como dihidrocorinanteína, corinanteína y corinanteidina, presentan una importante selectividad en su actividad antiprotozoaria.



-Flavonoides

Amentoflavona y podocarpusflavona A y B, aisladas de *Celaenodendron mexicanum*, presentan actividad frente a *L. donovani*⁶⁰.



Amentoflavona = $R^1 = H, R^2 = H$
 Podocarpusflavona A = $R^1 = H, R^2 = OCH_3$
 Podocarpusflavona B = $R^1 = OCH_3, R^2 = OCH_3$

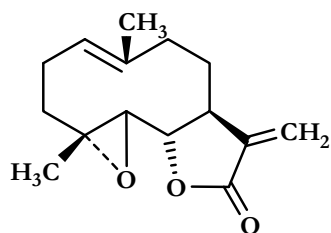
-Terpenos

Partenolida, aislada de *Tanacetum parthenium*, muestra una importante actividad frente a *L. donovani*⁶¹. 6-β-hidroxiogamina y arbortristosides A, B y C, aislados de

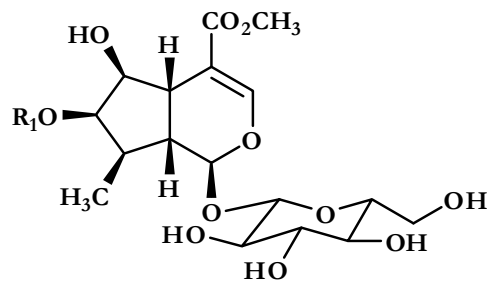
⁶⁰ Camacho, M. D. R.; Mata, R.; Castañeda, P.; Kirby, G. C.; Warhust, D. C. Croft, S. L.; Phyllipson, J. D.; 2000. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. Plant. Med. 66. 462-468.

⁶¹ Tiunan, T. S.; Ueda-Nakamura, T.; Garcia Cortez, D. A.; Dias Filho, B. P.; Morgado-Díaz, J. A.; De Souza, W.; Vataru Nakamura, C. 2005. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. Antimicrob. Agents. Chem. 49, 176-182.

Nyctanthes arbor-tristis, además del monoterpeno amarogentina, obtenida a partir de *Swertia chirata*, muestran actividad antiparasitaria frente a *L. donovani*^{62,63}.



Partenolida

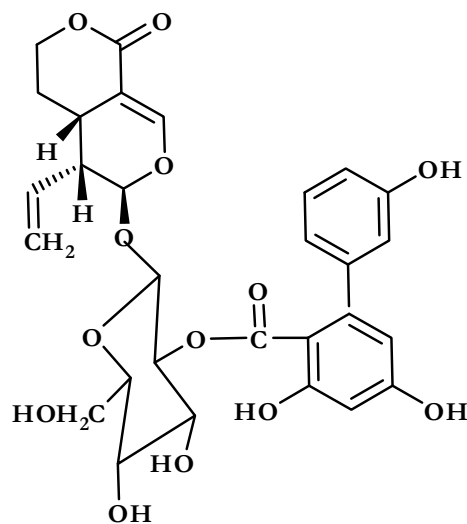


Arbostrisida A: R₁ = p-metoxicinnamoil

Arbostrisida B: R₁ = Caffeoil

Arbostrisida C: R₁ = Coumaroil

6-β-hidroxiogamina : R₁ = H



Amarogentina

⁶² Mishra, J.; Saxena, A.; Singh, S. 2007. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr. Med. Chem.* 14, 1153-1169.

⁶³ Ray, S.; Majumder, H. K.; Chakravarty, A. K.; Mukhopadhyay, S.; Gil, R. R.; Cordell, G. A. 1996. Amarogentin, a naturally occurring secoiridoid glycoside and a newly recognized inhibitor of topoisomerase I from *Leishmania donovani*. *J. Nat. Prod.* 59, 27-29

2. Tripanosomiasis

La tripanosomiasis americana o mal de Chagas es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo flagelado de la Orden Kinetoplastida, *Trypanosoma cruzi*. Su ciclo de vida es muy complejo, con tres estadios distintos (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes) y pases obligatorios a través de un hospedador vertebrado (mamífero) y un invertebrado (triatomino) para sobrevivir.

Aunque las primeras referencias a la enfermedad de Chagas datan de finales del siglo XVI, no es hasta principios del siglo XX cuando se identifica a *T. cruzi* como el agente causal de la misma y a los triatominos como los hospedadores invertebrados y transmisores de la forma infectante para el hombre.

Según datos de la OMS, se estima que entre 18 y 20 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* y otros 40 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad. Teniendo en cuenta que puede ser mortal tanto en su fase aguda (2-8% de los pacientes, principalmente población infantil) como en la crónica (20%), es lógica la preocupación que esta parasitosis suscita entre las autoridades sanitarias en los países afectados. Estudios recientes indican que cerca de 200.000 nuevos casos y 21.000 muertes asociadas a esta enfermedad se producen cada año. La enfermedad es endémica desde el norte de México hasta el sur de Argentina.

El parásito se distribuye fundamentalmente por zonas rurales de poca altitud, donde habita el vector, permitiendo que el ciclo natural se complete. No obstante, los movimientos migratorios de las zonas rurales a las urbanas y a otros países, han tenido como consecuencia un aumento en su distribución geográfica. Además, la transmisión por vía transfusional posibilita el contagio de la enfermedad sin intervención del insecto vector. Por otra parte, el hombre no es el único hospedador vertebrado de *T. cruzi*, actuando numerosas especies animales como reservorio. Todo ello determina que el control de la enfermedad esté basado en la eliminación del vector, el control en los bancos de sangre y el desarrollo de fármacos eficaces.

Se han obtenido grandes avances en el control de la transmisión vectorial y transfusional, especialmente por los países de Sudamérica que están integrados en una

de las tres iniciativas existentes: Iniciativa del Cono Sur, de países andinos y la recientemente formada iniciativa de los países centroamericanos. Las dos primeras iniciativas con sus programas de control de la enfermedad de Chagas han reducido el número de personas en riesgo de infección de aproximadamente 100 millones de personas a 40 millones. La prevalencia de la infección en el grupo de edad 0-7 años ha disminuido radicalmente en los últimos años. Casi el 100% de los bancos de sangre realizan determinaciones sanguíneas para desechar sangre infectada y evaluar la evolución de la prevalencia⁶⁴.

2.1. Agente causal

T. cruzi fue aislado por primera vez en el año 1909 por el investigador brasileño Carlos Chagas, a partir del contenido intestinal de un insecto reduído (*Panstrongylus megistus*). En su honor, la tripanosomiasis americana lleva el nombre de enfermedad de Chagas. A diferencia de otros hallazgos de enfermedades, en esta primero se encontró el insecto vector y luego se definió el agente patógeno. Además del nombre recibido por su descubridor, se han empleado otras denominaciones como tripanosomiasis brasileña, tripanosomiasis sudamericana, enfermedad de Chagas-Mazza, mal de encargo, fiebre de barbeiro y otras⁶⁵.

⁶⁴ Rolón, M. S. 2005. Aplicación del Ensayo de Resazurina al Cribado Farmacológico Sobre *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid. Facultad Farmacia. Departamento Parasitología.

⁶⁵ Ryckman, R. E.; Blankenship, C. M. 1984. The triatominae and triatominae –borne trypanosomes of North and Central America and the west Indies: a bibliography with index. Bull. Soc. Vector Ecologists. 9, 112-430.

2.2. Distribución y Morfología

T. cruzi es un organismo digenético con alternancia entre un hospedador vertebrado, donde usualmente se encuentra en tejido y sangre, y el insecto vector, donde usualmente se encuentra en el tracto digestivo, cambiando su morfología y expresión antigénica de acuerdo a su estadio y al lugar donde se encuentre.

Esta diferencia en morfología y estados funcionales implica una importante adaptación a una variedad de condiciones medioambientales en el insecto vector y en el hospedador mamífero.

Las formas tripomastigote sanguíneas y epimastigote en el insecto vector se encuentran en un medio donde la concentración de calcio es muy elevada, sin embargo los amastigotes intracelulares en los mamíferos se encuentran en una concentración muy baja. Estos cambios drásticos de calcio libre en el medio durante el ciclo de vida indican que el parásito tiene una gran capacidad de adaptación⁶⁶.

El parásito presenta tres tipos morfológicos funcionales denominados epimastigote, tripomastigote y amastigote⁶⁷ (figura 7), caracterizados por la forma, localización del corpúsculo basal del flagelo y posición del kinetoplasto en relación al núcleo celular⁶⁸.

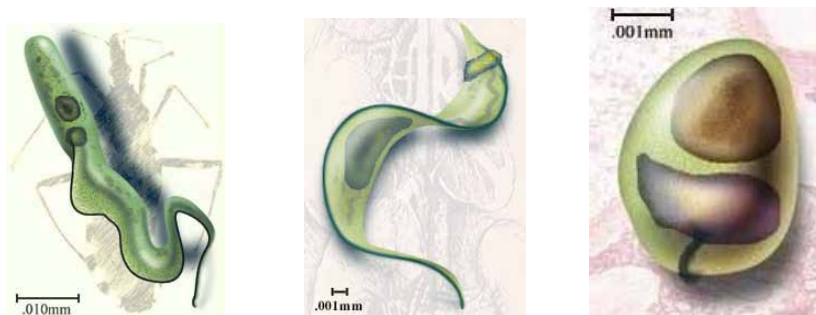


Figura 7: Morfología de *Trypanosoma cruzi*, epimastigote, tripomastigote y amastigote respectivamente

⁶⁶ Vercesi, A. E. 1994. Ca^{2+} Homeostasis and mitochondrial bioenergetics in *Trypanosoma cruzi*. Bras. J. Med. Biol. Res. 2, 501-503.

⁶⁷ Berner, Z.; Chiari, C. 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosomas cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 5, 220-224.

⁶⁸ Braun, M.; De Titto, E. 1985. Inmune response to *Trypanosoma cruzi*. An approach to the Pathogenesis of Chagas' disease. Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 35, 1-47.

Las formas **epimastigotes** miden de 20 a 40 μm de longitud y se caracterizan por su flagelo emergente desde la región lateral anterior y kinetoplasto anterior al núcleo⁶⁹. Se encuentran en la luz intestinal del insecto vector, donde se multiplican extracelularmente. También se localizan en el hospedador vertebrado entre el fin del ciclo intracelular y el comienzo del nuevo ciclo, durante la transformación de amastigote en tripomastigote y viceversa⁷⁰. Los epimastigotes que se multiplican en el hospedador invertebrado y en cultivos axénicos se consideran formas equivalentes en ambos casos.

Los **tripomastigotes** tienen una longitud entre 11-29 μm y 0,8-3 μm de diámetro, variables según la cepa y el tipo morfológico⁷¹. Se caracterizan por su flagelo emergente desde el extremo apical posterior y el kinetoplasto ubicado posterior al núcleo, distinguiéndose una membrana ondulante característica. Estas formas pueden observarse en la sangre y células de otros tejidos del hospedador vertebrado, así como en el intestino posterior, heces y orina del hospedador invertebrado, además de en la fase estacionaria de crecimiento de cultivos axénicos.

Chagas, en 1909, describe dos tipos morfológicos de tripomastigotes circulantes en sangre: esbelto (slender) e intermedio (broad), que posteriormente han diferenciado en otra más rechoncha (stout)⁶⁷.

Las formas “slender”, “broad” y “scout” tienen diferencias significativas morfométricas en numerosos parámetros analizados, incluidas las superficies del núcleo y la mitocondria⁷². Los primeros presentan el núcleo alargado y central, el kinetoplasto subterminal y un flagelo libre y corto. Los segundos poseen el núcleo redondeado en posición media anterior y el kinetoplasto terminal o subterminal. Los rechonchos presentan el núcleo ovalado situado hacia la parte anterior, el kinetoplasto casi terminal

⁶⁹ Hoare, C. A.; Wallace, F. G. 1966. Development stages of tripanosomatid flagellates: a new terminology. Nature London. 212, 1385-1389.

⁷⁰ Meyer, H.; Olivera, M. 1948. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: a four year study. Parasitol. 39,91-94.

⁷¹ Hoare, C. A. 1972. The salivarian (Subgenus Trypanosoon). In: The Trypanosomes of mammals. A zoological monograph B.S.P. Oxford- Edinburgo. 360-380.

⁷² De Diego, J. A.; Penin, P.; Mayer, F.; Del Rey, J.; Gamillo, C. 1991. The application of the statistical study in the morphometric characterization of a Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Parasitol Hum. Comp. 1, 3-8.

y un largo flagelo libre.

En el hospedador vertebrado, pasado el primer periodo de infección en el que predominan las formas esbeltas, la abundancia relativa de cada tipo parece depender conjuntamente de factores del propio hospedador y del parásito⁷³ o propiamente de la cepa de *T. cruzi*^{74,75}.

Las formas **amastigote** se caracterizan por su morfología redondeada y tiene un flagelo muy corto, observable en el microscopio electrónico. Es la forma replicativa intracelular en el hospedador vertebrado⁶⁹, aunque también se observan en sangre circulante en una proporción del 10%⁷⁶. Los amastigotes son redondeados u ovals, con un diámetro de 3-5 µm, con núcleo y kinetoplasto, y con un corto flagelo libre de 1 µm de longitud máxima. Se transforman en tripomastigotes por un proceso directo de elongación o de forma indirecta mediante el desarrollo de una vacuola cerca del kinetoplasto que se rompería y formaría un tripomastigote por desenrollamiento^{77,78,79}.

⁷³ Morel, C.; Chiare, E.; Camargo, E. P.; Mattei, D. M.; Romamha, A. J.; Simpson, L. 1980. Strains and Clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast and minicircles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 11, 6810-6814.

⁷⁴ Berner, Z.; Chiari, E. 1965. Aspects of early grow of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. J. Parasitol. 51, 922-926.

⁷⁵ Berner, Z. 1976. Significance of morphologic variation of bloodstream forms. American tripanosomiasis Research. O.M.S. Publ. Cient. N° 318. Washington. 127-131.

⁷⁶ Andreus, N. W.; Hong, K.; Robbins, E. S.; Nussenzweig, V. 1987. Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 64, 474-484.

⁷⁷ Word, D. E. 1951. Development of Arizona *Trypanosoma cruzi* in mouse muscle. AMP. J. Trop. Med. 31, 1-7.

⁷⁸ Brener, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. Microbiol. 27, 347-382.

⁷⁹ Dvorak, J. A. 1976. A new in vitro approach to quantification of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. Proc Symposium on New approaches in American Tripanosomiasis research. Ed. Pan. Americana Health Organisation. 109-120.

2.3. Taxonomía

Según la revisión taxonómica de los protozoos realizada por Cavalier-Smit en 1998, *T. cruzi*, queda encuadrado del siguiente modo:

Reino:	Protozoa (Goldfuss, 1818) Owen, 1858
Filo:	Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981
Clase:	Kinetoplastea (Honigberg, 1963) Margulis, 1974
Orden:	Kinetoplastida (Honigberg, 1963) Vickerman, 1976
Familia:	Trypanosomatidae Doflein, 1901
Genero:	<i>Trypanosoma</i> Gruby, 1843
Subgénero:	<i>Schizotrypanum</i> Chagas, 1909
Especie:	<i>Trypanosoma (S.) cruzi</i> Chagas, 1909

2.4. Vector

Los hospedadores invertebrados del parásito son del orden Hemiptera, familia Reduviidae, tales como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* o *Panstrongylus megistus*, entre otros. Los triatominos (figura 8) son hemátofagos y comprenden casi un centenar de especies, la mayor parte de las cuales posee un hábitat silvestre. Las de más importancia sanitaria son aquellas que se han habituado a colonizar la vivienda humana.

Algunas especies se han transformado en estrictamente domiciliarias como *Triatoma infestans* ya que habita en las vigas y grietas de las paredes de barro de chozas y ranchos, convirtiéndolo en el insecto vector de mayor importancia en lo que se refiere a la transmisión de la enfermedad de Chagas.



Figura 8: Vector de *T. cruzi*, *Triatoma infestans*.

La morfología de los redúvidos es característica, de forma alargada, con un abdomen ancho y generalmente aplanado. Presenta una cabeza alargada, cilíndrica y una trompa picadora emergiendo del extremo anterior, formada por tres segmentos; está doblada debajo de la cabeza durante el reposo y se extiende hacia delante cuando el insecto se alimenta. Presenta ojos compuestos, grandes, redondeados y salientes; un par de antenas, largas, finas y formadas por cuatro segmentos. El tórax es firme, duro y bien quitinizado; en él se distingue un segmento anterior (pronoto) de forma trapezoide y uno posterior (escutelo) de aspecto triangular.

Del tórax nacen dos pares de alas bien desarrolladas que cubren el abdomen y tienen manchas características de gran importancia taxonómica. Son principalmente nocturnos o al menos pican cuando hay oscuridad.

2.5. Ciclo biológico

El ciclo biológico del parásito incluye un hospedador vertebrado y un insecto vector⁶⁹.

El vector sano se infecta al ingerir sangre del vertebrado infectado que contiene *T. cruzi* en forma de tripomastigotes sanguíneos. En el lumen del intestino del insecto los parásitos se multiplican por fisión binaria bajo la forma de epimastigotes y luego de 15 a 30 días se desarrollan las formas tripomastigotes metacíclicas infectivas en el intestino posterior del triatomino.

Cuando el insecto infectado pica al hospedador vertebrado defeca, emitiendo deyecciones que contienen numerosos tripomastigotes metacíclicos infectivos, que favorecidos por el rascado atraviesan la piel por el sitio de la picadura o a través de la mucosa.

Son fagocitados por los macrófagos y atravesando la membrana de la vacuola fagocítica se disponen en la matriz citoplasmática.

Los tripomastigotes tardan unas 3 horas en reorganizarse como amastigotes y entonces permanecen quiescentes por espacio de 35 horas antes de empezar a dividirse⁷⁹.

Ocurren unas 9 divisiones asincrónicas para producir en torno a 500 amastigotes, un 25% de los cuales degenera y el resto se transforman en tripomastigotes, que abandonan las células en pocos minutos y escapan a la sangre como formas no multiplicativas. Los tripomastigotes sanguíneos invaden células de tejidos, principalmente muscular, teniendo especial predilección por el músculo cardíaco, o son de nuevo fagocitados por los macrófagos. Cualquiera que sea el tipo celular se repite en su interior el ciclo multiplicativo formándose pseudoquistes reproductores.

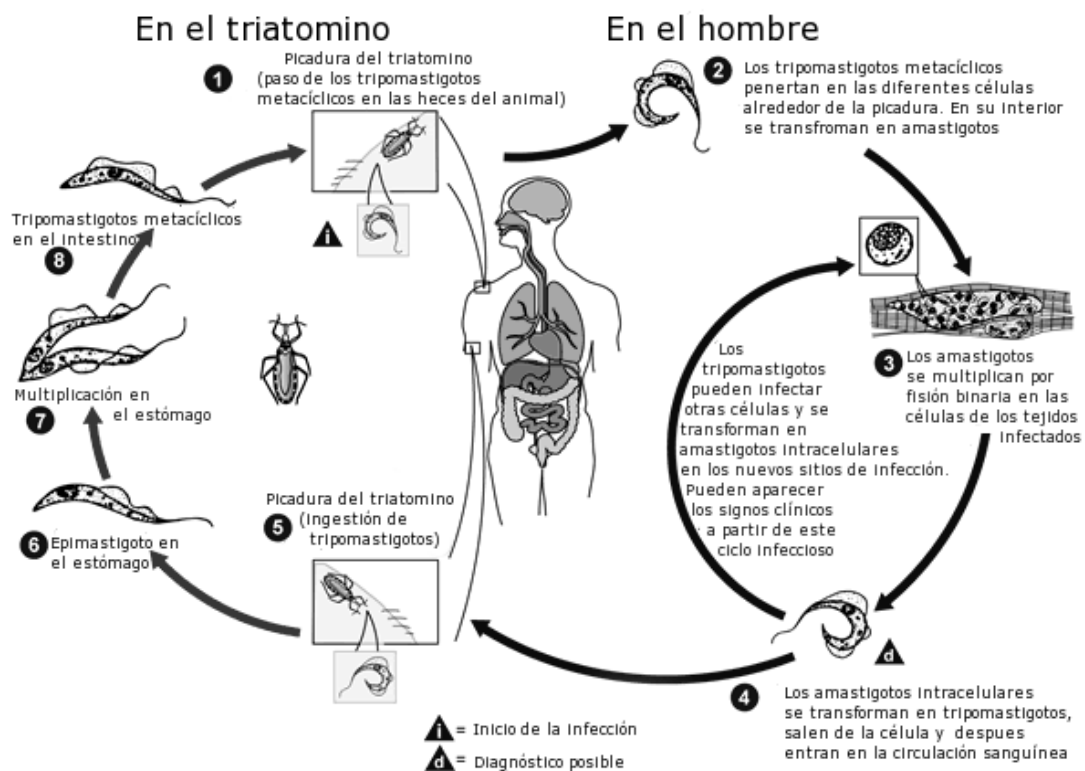


Figura 9: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*¹⁴.

2.6. Epidemiología

La infección natural se localiza únicamente en América, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y Chile (Figura 10). La organización Mundial de la Salud estima que 18-20 millones de personas están infectadas en toda América y que

otros 100 millones de personas tienen el riesgo de contraer la enfermedad⁸⁰.

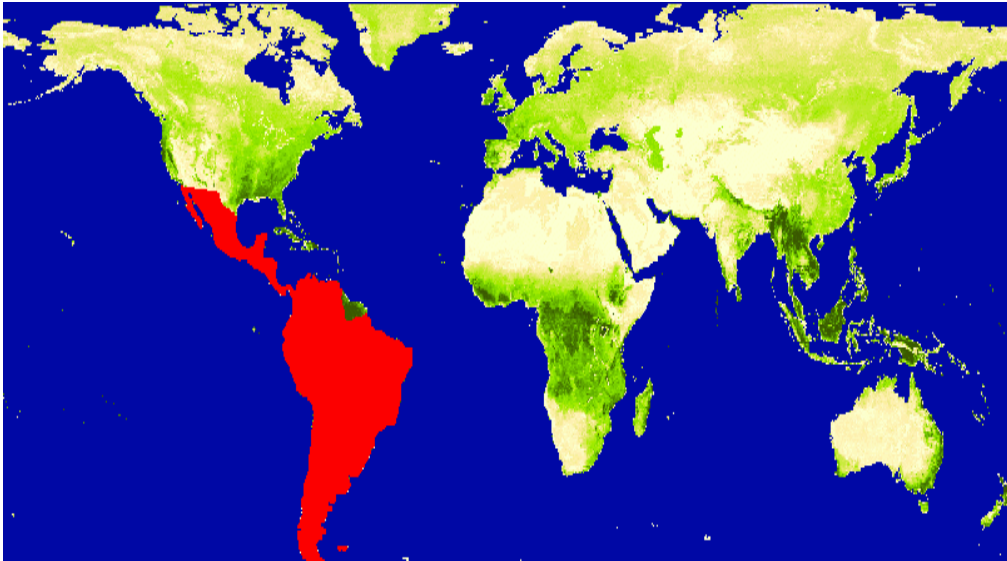


Figura 10: Distribución Geográfica de la Enfermedad de Chagas en América

En el caso de los animales salvajes la distribución es más amplia que en la población humana y coincide con la distribución de los triatomíneos, desde Maryland, en Estados Unidos, hasta el sur de Argentina⁸¹. Además de los animales salvajes, los animales domésticos como el perro y el gato, y en menor medida los animales sinantrópicos como las ratas y los ratones, constituyen un reservorio de la infección chagásica.

En el hombre se han diagnosticado casos de infección desde la frontera sur de Estados Unidos hasta la provincia de Chubut en Argentina. La distribución no es regular, así países de América Central y del Sur como la Guayana, Surinam o las Islas del Caribe no son zonas endémicas.

La prevalencia es mayor en Brasil, Argentina y Venezuela, y la infección no se observa en los picos andinos donde no habita el vector, ni en la selva amazónica, donde

⁸⁰ World Health Organization. Disease statistics. The World Health Report. WHO: Geneva; 1999.

⁸¹ Brener, Z.; Andrade, Z. A. 1979. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan. 152-174.

la infección queda reducida en una enzootia silvestre, ya que las especies autóctonas no se han adaptado a las viviendas humanas⁸¹. Los focos endémicos más importantes se centran en zonas rurales donde las condiciones de vida son muy precarias y favorecen la instalación del vector dentro de las viviendas. Por tanto la enfermedad esta muy relacionada con el subdesarrollo y la desigualdad social⁸².

Otros factores relacionados con la persistencia de la enfermedad son las transfusiones sanguíneas. La falta de control de los individuos donantes en los bancos de sangre facilitó que la enfermedad pasara de los focos rurales a los medios urbanos y periurbanos. Este paso también se ha realizado a través de trasplantes de órganos, y por su puesto, por las fuertes migraciones del campo a la urbe⁸³.

El parásito también se transmite por vía transplacentaria provocando abortos y nacimientos prematuros. En algunos países endémicos la frecuencia de Chagas congénito llega a ser muy importante. Esta vía de transmisión está influenciada por factores socio-culturales relacionados con la madre, como son: mayor fertilidad, primera maternidad a edad temprana y transfusiones sanguíneas⁸².

Se considera que la enfermedad de Chagas está presente en 17 países sudamericanos. Aproximadamente 100 millones de personas están expuestas a la enfermedad, es decir, un cuarto de la población total de estos países; 18-20 millones de personas están infectadas, lo que representa una prevalencia del 4%, pero en algunas zonas puede llegar a ser del 75%. De las personas infectadas, 2-3 millones están desarrollando la fase crónica de la enfermedad. La mortalidad es de 21.000 individuos/año⁸⁴. La OMS estima que 500.000 individuos se infectan cada año, de los cuales 300.000 son niños⁸².

⁸² Vélez, Vernal, I. D. 1996. El Impacto de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Jornadas Iberoamericanas de Ciencias Farmacéuticas: Parasitismo y Desarrollo. Real Academia de Farmacia. Realigraf. S.A. 9-19.

⁸⁰ Pinto, Días, J. C. 1992. Epidemiology of Chagas' disease in chagas' disease-american. Tripanosomiasis: Its impact on transfusion and clinical medicine. ED ISBT. Brasil. 117-137.

⁸⁴ Urbina, J. A.; Docampo, R. 2003. Specific Chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends. Parasitol. 11, 495-501.

2.7. Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas tiene tres etapas (aguda, indeterminada y crónica). El periodo de incubación puede ser de una a tres semanas y posteriormente se desarrollan las tres etapas.

Fase aguda: En esta fase se observa el síndrome de la puerta de entrada, es decir, lesiones en el lugar donde han penetrado los tripanosomas. Cuando las penetraciones han sido a nivel de la mucosa ocular se observa el complejo oftálmico ganglionar denominado síndrome de **Mazza Romana**, que se caracteriza por edema bpalpebral unilateral; si la penetración ha sido a través de la piel se observa el **Chagoma de inoculación**, que se presenta como una tumoración redondeada de un área edematosa.

Esta fase es generalmente asintomática; sólo del 1-2% de los pacientes presentan síntomas, los cuales aparecen entre la primera y segunda semana después de adquirida la infección. Las manifestaciones clínicas en esta fase incluyen fiebre, anorexia, diarreas, inflamación de los ganglios, miocarditis e inflamación del hígado y del bazo.

Fase indeterminada o asintomática: Se observa en sujetos que pasaron la fase aguda de forma asintomática o manifiesta. Empieza de 8-10 semanas después de la infección.

Durante esta etapa el enfermo no tiene ningún síntoma y son detectados por la presencia de anticuerpos específicos. Estos pacientes no tienen evidencia del parásito en la sangre aunque el xenodiagnóstico puede ser positivo. En estos pacientes la infección puede ser rápidamente reactiva durante una enfermedad severa o en condiciones de inmunodepresión severa como el caso de pacientes que reciben un trasplante de órganos o aquellos que desarrollan VIH^{85,86}.

⁸⁵Kirshhoff, L. V. 1994. American Trypanosomiasis. (Chagas disease) and African Trypanosomiasis (sleeping, sickness). *Curr. Opin. Infect. Dis.* 7, 542-546.

⁸⁶ Cançado, J. R. 1999. Criteria of Chagas disease cure. *Ment. Inst. Oswaldo Cruz.* 94, 331-335.

Fase crónica: Se observa en el 30% de los sujetos seropositivos. Dos formas clínicas se observan en esta fase, la miocardiopatía crónica y las alteraciones del esófago y del colon denominadas megaesófago y megacolon. Por razones que se desconocen la enfermedad chagásica gastrointestinal es común en el sur del Amazonas, pero rara en México y en Centro América.

2.8. Tratamiento

Desafortunadamente, y a pesar de los impresionantes avances en el conocimiento de la biología de *T. cruzi*, las únicas dos drogas disponibles son nifurtimox (nitrofurano) y benznidazol (nitroimidazol), que fueron desarrolladas empíricamente en los años 1960 y 1970, y registradas hace más de veinte años. Estos compuestos son activos en la fase aguda de la enfermedad, y recientemente se ha visto que benznidazol es también eficaz en la infección crónica temprana⁸⁷, pero su eficacia es limitada en la fase crónica establecida.

Los efectos tóxicos de ambas drogas son severos, pudiendo provocar anorexia, vómitos, polineuropatía periférica y dermatopatía alérgica^{88,89,90}, probablemente como consecuencia del daño oxidativo o reductivo de los tejidos del hospedador. Los pacientes en tratamiento han de ser vigilados estrechamente ya que la frecuencia de efectos colaterales es muy alta, debido a que los medicamentos tienen que ser administrados por periodos largos. Tampoco existe un tratamiento eficaz en la fase crónica de la enfermedad, con lesiones irreversibles tanto cardiacas como gastrointestinales.

⁸⁷ Sosa, S.; Segura, E. L.; Ruíz, A. M.; Velásquez, E.; Porcel, B. M.; Yampotia, C. 1998. Efficacy of Chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of chagas disease. Am. J. Trop. Med. HYS. 59, 526-529.

⁸⁸ De Castro, S. L.; Soerio, M. H.; Higashi, K. O.; Meirelles, M. N. 1993. Differential of amphotericin B on the three evolutive stages of *T. cruzi* and on the host cell-parasite interaction. Bras. J. Med. Res. 26, 1219-1229.

⁸⁹ Croft, S. L.; Urbina, J. A.; Brun, R. 1997. Chemotherapy of human leishmaniasis and tripanosomiasis. En G. Hide, J. C. Motram, G. H. Coombs, P. H. Holmes (EDS). Tripanosomiasis and leishmaniasis biology and control CAB Internatinal, Wallingford, Oxon, U. K. 254-257.

2.8.1. Nifurtimox

Se sintetizó para un estudio sistemático de la actividad tripanocida de los derivados del nitrofurfurilideno. Se introduce para su uso clínico en 1965, pero actualmente su producción está interrumpida⁸⁹.

Tanto el nitrofurano como la tetrahidrotiazina son esenciales para la actividad *in vivo* del nifurtimox. Se administra a una dosis de 8-10 mg/kg/día, de 60-90 días en adultos y de 15mg/kg/día, también durante 60-90 días a niños.

El fármaco es activo frente al protozoo, haciendo disminuir la parasitemia pero no cura las lesiones. Los efectos secundarios que se producen tras la administración de nifurtimox y benznidazol son muy similares, pero generalmente se producen con mayor intensidad con el nifurtimox. El efecto colateral más común con el nifurtimox es la intolerancia gastrointestinal, la cual se manifiesta con anorexias, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Los efectos neurológicos incluyen insomnio, desorientación, parestesias y polineuritis. Estos efectos colaterales son reversibles cuando la dosis se reduce o el tratamiento es suspendido.

Los pacientes en fase aguda y los niños toleran mejor este fármaco. No se debe prescribir a embarazadas ni a pacientes con enfermedades graves asociadas a la enfermedad de Chagas⁹¹.

2.8.2. Benznidazol

Entre los derivados nitroimidazólicos con actividad frente a *T. cruzi* se encuentra el benznidazol. Mostró mucha actividad frente a la cepa Y en ratones, por lo que se pasó a estudiar su eficacia en la terapéutica humana. El bajo coste del producto ha posibilitado el tratamiento de personas de bajo poder adquisitivo, que en el caso de esta enfermedad son la mayoría⁹².

⁹⁰ Rassi, A.; Amato, Neto, V.; Siquira, A. F.; Leite, M. S. B. 1998. Efeito protetor do nifurtumox contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo *trypanosoma cruzi* e tratados com corticoides em vitude de afecções associadas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 31, 249-255.

⁹¹ Luquetti, A. O. 1997. Etiological treatment for Chagas' disease. Parasitol. Today. 4, 127-128.

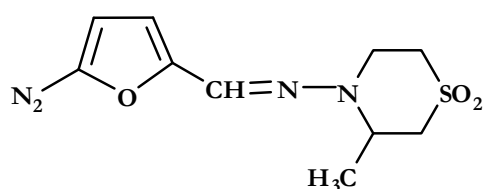
⁹² Malta, J.; Malta, F.; Malta, L. 1997. Tratamiento etiológico da doença de chagas: indicações e controvérsias. Arq. Bras. Med. 31, 129-131.

La intolerancia a benznidazol es menos frecuente que a nifurtimox, aunque en algunos casos es de mayor gravedad. Los efectos secundarios de este medicamento generalmente aparecen de forma temprana con reacciones cutáneas que pueden ir de leves a graves⁹³. Suelen aparecer al noveno día del comienzo del tratamiento y pueden ir asociados a un aumento de los nódulos linfáticos. También se pueden producir alteraciones hematológicas por hipersensibilidad, como leucopenia. Asociado a todo esto suele aparecer fiebre. También se producen alteraciones neurológicas.

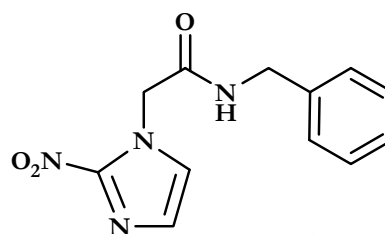
El tratamiento con benznidazol requiere un control hemático semanal después de la segunda semana, para controlar las posibles alteraciones hematológicas que se pueden producir.

El mecanismo de acción es similar al del nifurtumox y está ligado a la reducción del grupo nitro, la cual afecta a su potencial redox o afinidad electrónica. La acción tripanocida también está relacionada con el enlace covalente de los metabolitos reactivos, ADN, proteínas y lípidos del parásito⁹⁴.

Se utiliza en adultos a una dosis de 5mg/kg/día, durante 60 días y a los niños se les administra 5-10 mg/kg/día, también durante 60 días. Para prevenir la infección accidental en laboratorio o transfusión de sangre infectada se administra de 7-10 mg/kg/día, durante 10 días⁹⁵.



Nifurtimox



Benznidazol

⁹³ Levi, G.; Lobo, I.; Kallas, E.; Amato, V. 1996. Etiological Drug Treatment of human infection By *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 1. 35-38.

⁹⁴ Espada, M.; Avendaño, C. 1994. Fármacos que actúan sobre receptores intracelulares II. Fármacos que interactúan con los ácidos nucleicos. Introducción a la química Farmacéutica. Ed Interamericana. Mac Graw Hill. 537-538.

⁹⁵ Amato Neto, V. 1999. Etiological treatment for infection by *Trypanosoma cruzi*. Men. Inst. Oswaldo Cruz. 94, 337-339.

2.9. Otras posibilidades terapéuticas

A parte de los fármacos de referencia, nifurtimox y benznidazol, se han ensayado muchos productos con actividad antichagásica, pero con poco éxito en las fases clínicas.

2.9.1. Nitrofuranos y Nitroimidazoles

Dentro de los derivados de los nitrofuranos están algunos de los compuestos más activos frente a *Trypanosoma cruzi*. Además del nifurtimox, demuestran cierta actividad la furadantina, la nitrofurazona, la furaltona y la furazolidona⁹⁶.

Por su parte, además del benznidazol, otros nitroimidazoles también tienen actividad frente a *T. cruzi*. La acción supresora del metronidazol la verificó Pizza en 1961, pero Agosin en 1983 informa que se producen resistencias debido al metabolismo del fármaco o a su incapacidad de dar compuestos de nitrorreducción. También se han sintetizado derivados del metronidazol que son efectivos frente a formas de cultivos celulares, por lo que pueden ser considerados como agentes profilácticos en transfusiones sanguíneas⁹⁷.

El MK-436 y su derivado el L- 634,549 son efectivos contra *Trypanosoma cruzi* en cultivos celulares y menos tóxicos que el benznidazol y el nifurtimox⁹⁸. El MK-436 es activo tanto en fase aguda como crónica en infecciones experimentales con ratones⁹⁹, pero no mantiene este efecto en conejos¹⁰⁰. Actualmente su producción se ha interrumpido, ya que este producto no supera el test de mutagenidad, lo que hace necesario continuar con su estudio⁹⁵.

⁹⁶ Kinnamon, K.; Poon, B.; Hanson, W.; Waits, W. 1998. *Trypanosoma cruzi*: A novel chemical class (nitrobenzofurans) active against infections in mice (*Mus musculus*) Exp. Parasitol. 89, 251-256.

⁹⁷ Nothenberg, M.; Takeda, G.; Najjar, R. 1999. Adducts of nitroimidazoles derivatives with rhodium (II) carboxylates: Syntheses, characterization, and evaluation antichagasic activities. J. Inorg. Biochem. 42, 217-229.

⁹⁸ Murray, P.; Habbersett, M.; Meurer, R. 1983. *Trypanosoma cruzi*: Efficacy of the 2-substitute 5-Nitroimidazoles, MK-346 and L-634,549, in tissue culture and mice. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 1243-1250.

⁹⁹ Andrade, S.; Silva, R.; Santiago, C. 1989. Treatment of chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections in mice with MK-436, a 2-substituted 5-nitroimidazole. Bull WHO. 5, 509-514.

El nitroimidazol CL-64,855 o megazol, es activo en infecciones experimentales, incluidas las causadas con cepas resistentes a benznidazol y nifurtimox^{101,102}. Disminuye los niveles de interiorización y la proliferación de los amastigotes¹⁰³. Los derivados del megazol parece que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en amastigotes^{104,105}.

2.9.2. Alopurinol y Pirazol pirimidinas

Alopurinol (1H-pirazol [3,4-d]-4-pirimidinol) es utilizado en terapéutica como antigotoso por su capacidad para inhibir la síntesis de ácido úrico. Se ha ensayado como alternativa a nifurtimox y benznidazol, ya que también parece ser activo frente a *T. cruzi* y resulta menos tóxico que los anteriores. Este fármaco, como análogo estructural de las bases púricas, se cree que interfiere en la ruta de salvamento de las purinas, por tanto la síntesis de ácidos nucleicos queda inhibida. Es efectivo *in vitro* e *in vivo*, con variaciones según la cepa utilizada. Estas variaciones se pueden deber a diferencias en la ribonucleósido fosfotransferasa o la nucleósido quinasa¹⁰⁶, y a la habilidad de transportar el fármaco y la acumulación previa de nucleótidos.

Alopurinol no se ha mostrado eficaz en pacientes en fase aguda¹⁰⁷. En la fase crónica, se induce una serología negativa en un porcentaje similar a benznidazol y

¹⁰⁰ Texeira, A.; Silva, R.; Cunha Neto, E.; Santana, J.; Rizzo, L. 1990. Malignant, no hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi* infected rabbits treated with nitroarenes. J. Comp. Pathol. 103, 37-48.

¹⁰¹ Filardi, L. S.; Brener, Z. 1982. A nitroimidazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Annals Trop. Med. An Parasitol. 3, 293-297.

¹⁰² Filardi, L. S.; Gilber, B.; Gilber, M. E.; Brener, Z. 1985. Efeito curativo 2-amino-5-(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)-1,3,4-tiadiazol(megazol) em animais inoculados com cepas de *trypanosoma cruzi* resistente ao nifurtimox e benznidazol. XII Reun. Pesq. Bas Doença de Chagas. (Mg- Brasil). 135.

¹⁰³ Lages Silva, E.; Filardi, L. S.; Breber, Z. 1990. Effect of de host specific treatment in the phagocytosis of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85, 401 - 405.

¹⁰⁴ De Castro, S. L.; Miralles, M. N. 1986. Effects of drugs of *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell in vitro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2, 209-218.

¹⁰⁵ De Castro, S. L.; Miralles, M. N. 1990. Mechanism of action of nitroimidazole thiadiazole derivative upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigote. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85, 95-99.

¹⁰⁶ Berens, R. L.; Marr, J. J.; Looker, D. L.; Nelson, D. J.; Lafon, S. W. 1984. Efficacy of pyrazolopyrimidine ribonucleosides against *Trypanosoma cruzi* studies *in vivo* and *in vitro* with sensitive and resistant strains. J. Infec. Dis. 150, 602-608.

¹⁰⁷ Lauri Pires, L. 1988. Ineficacia do allopurinol em pacientes na fase aguda do doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 21, 79-83.

nifurtimox, pero con menores efectos secundarios¹⁰⁸. Para obtener efectos notables se requieren dosis relativamente altas de alopurinol, que pueden producir intolerancia¹⁰⁹.

Alopurinol ribósido, otro derivado purínico, es efectivo contra epimastigotes, con susceptibilidades distintas dependiendo de la cepa utilizada. En los animales y en los cultivos celulares, este fármaco sólo controla la infección¹⁰⁶, previniendo la muerte del animal, pero sin eliminar completamente al parásito.

Furamicina A, es otro derivado que es activo frente a epimastigotes y tripomastigotes, pero que no muestra efecto en animales infectados. Hasta ahora no se ha logrado una purina o pirimidina como fármaco eficaz para la cura parasitológica de la enfermedad¹⁰⁹.

2.9.3. Productos naturales con actividad tripanocida

El tratamiento con cronassial, una mezcla de gangliósidos extraídos de corteza cerebral bovina, se muestra efectivo en la fase crónica de la enfermedad produciendo un aumento de la presión sistólica, se reducen los mareos y las arritmias y se mejora el estado general del paciente¹¹⁰.

Se han probado diferentes péptidos de secreciones dérmicas de rana, que son capaces de inducir la lisis de *T. cruzi* y que no han mostrado toxicidad cuando se inocularon en ratones. Péptidos sintéticos de 23 residuos aminoácidos análogos a la magainina (aislada de *Xenopus laevis*) son eficaces contra formas epimastigotes¹¹¹.

También se han ensayado compuestos de origen vegetal, miconidín (un derivado quinólico) y tingenon (un triterpeno) son activos contra epimastigotes, produciendo una inhibición de la síntesis de las proteínas y ácidos nucleicos¹¹². Taxol (aislado de *Taxus*

¹⁰⁸ Gallerazo, R. H.; Marr, J. J.; Sosa, R. R. 1990. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43, 159-166.

¹⁰⁹ Stoppani, A. O. M. 1999. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Medicine. 2, 147-165.

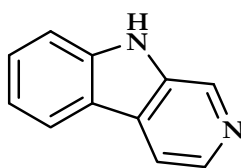
¹¹⁰ Werbovets, K. A.; Jerónimo, S. M. B.; Macdonald, T. L.; Pearson, R. D. 1992. Treatment of leishmaniasis and Tripanosomiasis. Curr. Inf. Dis. 5, 840-848.

¹¹¹ Huang, C. M.; Chen, H. C.; Zierdt, C. H. 1990. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa. Antimicrob. Agents. Chemother. 34, 1824-1826.

¹¹² Goijman, S. G.; Turnes, J. F.; Marin Bettolo, J. P.; Stoppani A. O. M. 1984. Inhibición del Crecimiento y la biosíntesis de macromoléculas de *Trypanosoma cruzi* por productos naturales. Efectos de la Miconidina y tingenona. Medicine. 44, 360-371.

brevifolia) interfiere en la proliferación de los epimastigotes, evitando la división celular pero permitiendo la multiplicación de los organelos. Se cree que su mecanismo de acción está relacionado con la estabilización del citoesqueleto¹¹³.

Entre los alcaloides probados están los índoles de la β -carbolina, 2-n-propilquinolina (aislado de *Galipea longiflora* Kr, Rutacea^{114,115}), que presenta actividad en ratones infectados con *T. cruzi*, y las bisbenciltetrahidroisoquinolinas, que tienen un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los epimastigotes de distintas cepas del parásito^{116,117}. También muestran actividad *in vivo* en la fase aguda de la enfermedad cuando son administrados por vía oral¹¹⁸.



β -carbolina

Curina, cycleanina, isotetrandina, limacina y feantina, también son activas frente al parásito. El mecanismo de acción de los alcaloides del tipo bisbencilisoquinolinas no es muy conocido, pero se han obtenido interesantes resultados con daphnolina, que muestra actividad *in vivo* en las fases aguda y crónica de la enfermedad¹¹⁹.

¹¹³ Bam, S. G.; Wittner, M.; Madler, J. P.; Horowitz, S. B.; Schiff, B.; Tonowitz, H. B. 1981. Taxol a microtubule stabilizing agent-blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 4571-4575.

¹¹⁴ Fournet, A.; Vagneur, B.; Richomme, P.; Bruneton, J. 1989. Aryl-2-et Alkyl-2-quinoléines nouvelles isolées d'une Rutacée bolivienne: *Galipea longiflora*. Can. J. Chem. 67, 2116-2118.

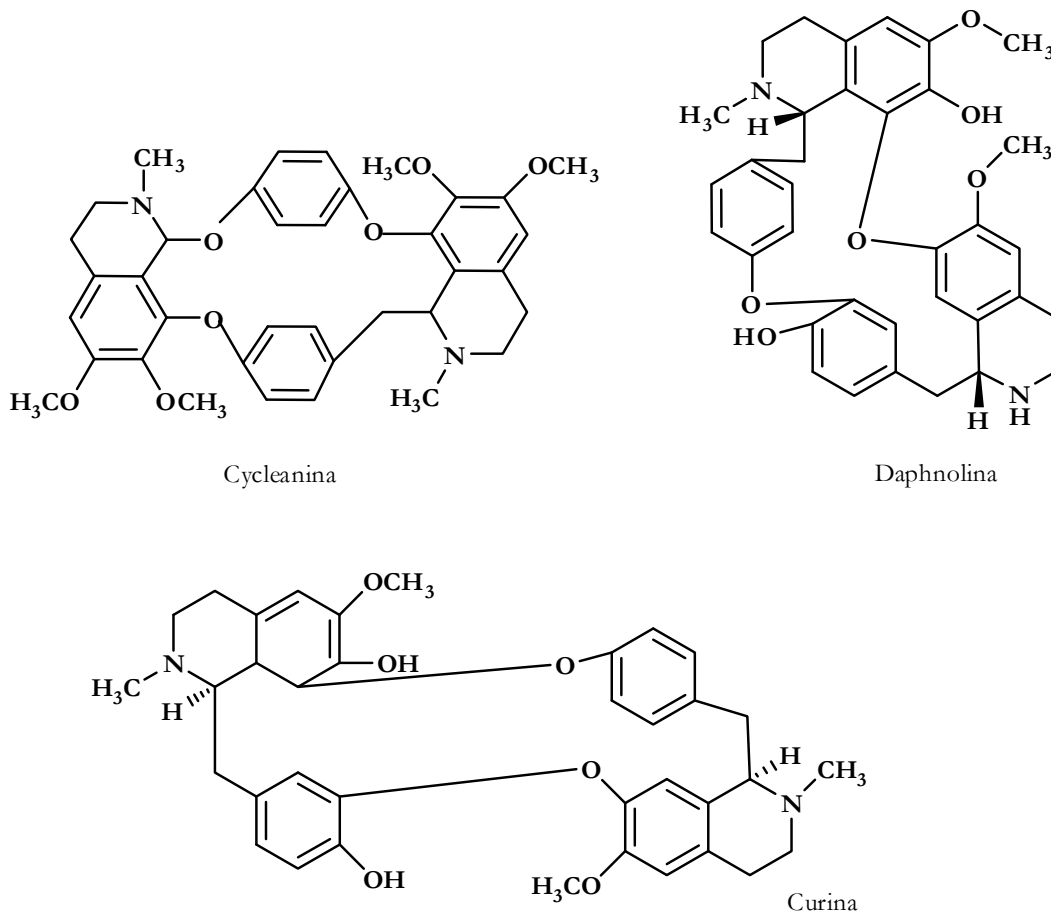
¹¹⁵ Fournet, A.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cavé, A.; Richomme, P.; Bruneton, J.; Chimanines, L. 1993. Nouvelles Quinoléines Substituées en 2 Isolées de *Galipea longiflora* Kr. J. Nat. Prod. 56, 1547-1552.

¹¹⁶ Cavin, J. C.; Krassner, S. M.; Rodriguez, E. 1987. Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. J. Ethnopharmacol. 19, 89-94.

¹¹⁷ Fournet, A.; Manjon, A. M.; Muñoz, V.; Angelo, A.; Breneton, J.; Hocquemiller, R.; Cortez, D.; Cave, A. 1988. Active Tripanocidal alkaloids bisbelzillisoquinones active in vitro against *Trypanosoma cruzi* the agent responsible for tripanosomiasis in south America. J. Ethnopharmacol. 24, 337-343.

¹¹⁸ Fournet, A.; Inchausti, A.; Ferreira, M. E.; Nakayama, H.; Rojas de Arias, A.; Schinini, A.; Torres, S.; Sanabria, R.; Guinaudeau, H.; Brunito, J. 1997. The effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi* infections in mice. Inst. J. Antimicrob. Agents. 8, 163-170.

¹¹⁹ Fournet, A.; Muñoz, V. 2002. Natural Products as Trypanocidal, Antileishmanial and Antimalarial Drugs. Curr. Top. Med. Ch. 2, 1215-1237.



Los derivados de la violaceina (pigmento aislado de *Chromobacterium violaceum*) inhiben la proliferación en medio axénico de las formas epimastigotes y amastigotes, con niveles de actividad diferentes dependiendo de la cepa utilizada para el estudio. No son activos en infecciones experimentales¹²⁰.

Gossipol, extraído de las semillas del algodón, es un compuesto polifenólico y agente antifertilidad, activo contra epimastigotes y tripomastigotes, produciendo alteraciones estructurales en el kinetoplasto y en la mitocondria. También reduce la

¹²⁰ Haun, M.; Pereira, M. F.; Hoffman, M. E.; Joyas, A.; Campos, V.; Filardi, L. S.; De Castro, S. L.; Durán, N. 1992. Bacterial Chemistry IV. Biological activities and cytotoxicity of 1,3 dihidro-2H-indol-2-one derivatives. Biol. Res. 1, 21-25.

parasitemia y prolonga la supervivencia, sin producir la curación parasitológica¹²¹. A pesar de esto, este producto no se considera efectivo contra *T. cruzi* porque su efecto se inhibe en presencia de albumina¹²².

La magnitud y la trascendencia tanto de leishmaniasis como de la enfermedad de Chagas, unida a la carencia de fármacos seguros y eficaces, han intensificado la investigación etnomédica en busca de principios activo de origen natural.

3. Otros biomodelos evaluados en este estudio

Para complementar los ensayos de actividad antiparasitaria se han realizado ensayos de citotoxicidad utilizando células de mamífero (CHO).

Adicionalmente, se ha considerado de interés ampliar el estudio con otros organismos de relevancia; concretamente con insectos de importancia agrícola y económica debido a su incidencia sobre cultivos hortícolas.

3.1. Insectos

De forma general los insectos se seleccionaron por la importancia económica de su incidencia sobre cultivos hortícolas, su capacidad de transmitir virus (áfidos), así como por su disponibilidad y facilidad de cría y mantenimiento en el laboratorio.

La especie *Spodoptera littoralis* es muy polífaga y se conoce por su extrema voracidad. Ataca a cultivos de patata, tomate, arroz, tabaco, melón, alfalfa, pimiento y naranjo, entre otros. Las larvas se alimentan tanto de hojas como de flores llegando a alcanzar un marcado gregarismo. Esto, unido a su alta capacidad reproductora y de migración, les confiere una gran importancia económica en Europa y en el Norte de África¹²³.

¹²¹ Olcina, M. A.; Blanco, A. 1990. Effects of gossypol of mice infected with *T. cruzi*. Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 40, 219-226.

¹²² Rovai, L. E.; Auki, A.; Geres de Burgos, N. M.; Blanco, A. 1990. Effects of gossypol on Tripomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool. 4, 280-286.

¹²³ Balachowsky, A. S. 1972. Entomologie Appliquee a L' Agriculture. Traité Tome II Lépidoptères. Ed. Masson E T Cie. 1050-1627.

Myzus persicae tiene como hospedador primario habitual plantas del género *Prunus*, sobre todo *Prunus persica*, aunque es muy polífago y presenta más de cuarenta familias de hospedadores secundarios, muchas de ellas de elevado interés económico. Es capaz de transmitir más de 100 tipos de virus, entre los que encontramos algunos muy persistentes como el luteovirus del amarilleo occidental de la remolacha, el penamovirus de las excrecencias y mosaico del guisante, o el luteovirus del enrollado de la patata; virus semipersistentes como el closterovirus del amarilleo de la remolacha o el caulimovirus del mosaico de la coliflor; y no persistentes como el virus del mosaico de la alfalfa, el potyvirus latente de la alcachofa, el potyvirus del mosaico amarillo de la judía, el fabavirus del marchitamiento del haba y el potyvirus del mosaico de la lechuga y de la remolacha^{124,125}.

Al igual que su hospedador primario, es originario de Asia, aunque actualmente se considera cosmopolita¹²⁶.

Rhopalosiphum padi, también conocido como pulgón de la avena, presenta igualmente como hospedador primario una planta del género *Prunus*, generalmente *Prunus padus*. En cuanto a su hospedador secundario es bastante polífago. Prefiere las gramíneas, incluidos los cereales y las plantas de pasto. También ha aparecido en otras familias¹²⁷. Es vector de virus vegetales persistentes y algunos no persistentes: BYDV, virus de la hoja manchada del maíz, potyvirus del enanismo amarillo de la cebolla y potyvirus del mosaico enanizante del maíz¹²⁸. Presenta una distribución mundial.

¹²⁴ Kennedy, J. S., Day, M. F., Eastop, V. F. 1962. A conspectus of Aphids as vectors of plant viruses. Commonwealth Inst. Entomol. London. 100-114.

¹²⁵ Jordá, C., Llácer, G. 1996. Lista de virosis descritas en los distintos grupos de plantas cultivadas. In: Llácer, G., López, M. M., Trapero, A. y Bello, A. (editores). Patología Vegetal. Sociedad Española de Fisiopatología. 379-429.

¹²⁶ Blackman, R. L., Eastop, V. T. 1984. Aphids on the world's crops. An identification guide. Ed. Wiley, N. Y. 466.

¹²⁷ Rautapaa, J. 1970. Preference of cereal aphids for various cereal varieties and species of Graminae, Juncaceae and Cyperaceae. Ann. Agric. Fenn. 9, 267-277.

¹²⁸ Belli, G., Corbetta, G., Ostler, R. 1975. Ricerche e ossevazione sull' epidemiologia a sulle posserverta di prevenzione del 'gialhume' del riso. Riso. 24, 395-398.

Leptinotarsa decemlineata, conocido comúnmente como escarabajo de la patata, ataca fundamentalmente a esta planta, pero también a otras de la familia Solanaceae como berenjenas y tomates, produciendo daños cuantiosos en estos cultivos.

4. Potencial farmacológico de las plantas

Las plantas y sus extractos se han utilizado durante siglos para el tratamiento de muchas dolencias, desde dolores de cabeza hasta enfermedades parasitarias¹²⁹, sin embargo, sólo en los últimos 20-30 años los científicos han comenzado a estudiar las plantas utilizadas como remedios tradicionales a fin de determinar si sus derivados son efectivos y en caso de serlo, precisar su modo de acción.

La investigación farmacológica de productos naturales representa la mejor estrategia para el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas. El uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades parasitarias es bien conocido y documentado desde tiempos antiguos (Tabla 2). El descubrimiento de la quinina en *Cinchona succiruba* (Rubiaceae) y su posterior desarrollo como medicamento antimalárico, representa un hito en la historia de las drogas antiparasitarias de origen natural¹³⁰.

Las selvas tropicales nos ofrecen enormes perspectivas para el descubrimiento de nuevos fármacos; cuentan con una gran diversidad de especies de plantas superiores, centrandó nuestra atención en aquellas plantas utilizadas por los pueblos indígenas. Este uso tradicional puede servir de primera aproximación para identificar aquellas que puedan contener compuestos bioactivos útiles para la medicina o la industria^{131,132}.

Los recursos de la flora se utilizan ampliamente en el Perú¹³³, especialmente en la selva, donde se emplean directamente en el uso medicinal. Existe una indefinida

¹²⁹ Anthony, J. P.; Fyfe, L.; Smith, H. 2005. Plant active components-a resource for antiparasitic agents?. Trends Parasitol. 1, 462-468.

¹³⁰ Kayser, O., Kiderlen, A.; Croft, S. 2002. Natural products potential antiparasitic drugs. Stud. Natural Chem. 26, 779-848.

¹³¹ Wiley, J. 1994. Ethnobotany and the search for new drugs. Ltd. Baffins Lane, Chichester. England. 106-115.

¹³² Desmarchelier, C.; Witting, F. 2000 Sixty medicinal plants from the peruvian amazon, ecology, ethnomedicine and bioactivity. Asociación Española de Médicos Naturistas. 270.

¹³³ Ferreira, R. 1999. Plantas medicinales de la zona Peruana. Instituto Peruano de Fitoterapia Andina. 52, 31-33.

variedad de plantas y de resinas de árboles que han sido estudiadas y de las que se han obtenido principios activos con efectos farmacológicos comprobados. Otras, sin embargo, siguen utilizándose empíricamente.

La falta de disponibilidad de quimioterapia para infecciones parasitarias, junto con el alto coste de los tratamientos existentes, el aumento de viajes a áreas endémicas y el aumento de las resistencias a los tratamientos con drogas convencionales son los principales impulsores para el descubrimiento de nuevos medicamentos.

Tabla 2: Productos de origen natural con actividad antiparasitaria⁵³

Productos	Plantas	Actividad
ALCALOIDES		
2-n-propilquinolina	<i>Galipea longiflora</i>	<i>L. amazonensis</i>
Chimanina B	<i>G. longiflora</i>	<i>L. amazonensis</i>
Chimanina R	<i>G. longiflora</i>	<i>L. amazonensis</i>
2-n-pentilquinolina	<i>G. longiflora</i>	<i>L. amazonensis</i>
4-metoxi-2-filquinolina	<i>G. longiflora</i>	<i>L. amazonensis</i>
2-(3,4-metilenodioxifenil) quinolina	<i>G. longiflora</i>	<i>L. amazonensis</i>
Berberina	<i>Coptis chinensis</i>	<i>L. donovani</i> , <i>L. panamensis</i> . y <i>T. cruzi</i>
(+)-gyrocarpina	<i>Gyrocarpus americanus</i>	<i>Plasmodium</i> sp.
(-)-cycleanina	<i>Stephania epigea</i>	<i>Plasmodium</i> sp.
Diocofilina B	<i>Trifolium peltatum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Leishmania</i> sp. y <i>Trypanosoma</i> sp.
Diocofilina C	<i>T. peltatum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Leishmania</i> sp. y <i>Trypanosoma</i> sp.
Korundamina A	<i>Ancistrocladus korupensis</i>	<i>Plasmodium</i> sp.
Criptolepina	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	<i>Plasmodium</i> sp.
Usambaresina	<i>Strychnos icaja</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
Usambarina	<i>Strychnos usambarensis</i>	<i>E. histolytica</i>
3,4-Dihidrousamberina	<i>S. usambarensis</i>	<i>P. falciparum</i>
TERPENOS		
Geduina	<i>Azadirachta indica</i>	<i>Plasmodium</i> sp.
Artemisinina	<i>Artemisia annua</i> L.	<i>Plasmodium</i> sp.
Yingzhaosu A	Derivado sintético a partir de un combinado de hierbas orientales.	<i>P. berghei</i>
Yingzhaosu C	Derivado sintético a partir de un combinado de hierbas orientales.	<i>P. berghei</i>
Fenozana	<i>Sipbonochilus aethiopicus</i>	<i>P. falciparum</i>
Arteflena	<i>Artabotrys uncinatus</i>	<i>P. falciparum</i>
1-hidroxicriptotanshinona	<i>Perovskia abrotano</i>	<i>Leishmania</i> sp.

Productos	Plantas	Actividad
l-oxocriptotanshinona	<i>P. abrotano</i>	<i>Leishmania</i> sp.
l-oxomiltirona	<i>P. abrotano</i>	<i>P. falciparum</i>
Nimbolida	<i>Azadirachta indica</i>	<i>P. falciparum</i>
Grandisina	<i>Elaeocarpus grandis</i>	<i>T. cruzi</i> , <i>L. donovani</i> , y <i>P. falciparum</i>
Veraguensina	<i>Virola surinamensis</i> <i>Trimenia papuana</i>	<i>T. cruzi</i> , <i>L. donovani</i> , y <i>P. falciparum</i>
Licocalcoa A	<i>Glycyrrhiza inflata</i>	<i>Leishmania</i> sp. <i>P. falciparum</i>
Aurona	<i>Uvaria hamiltonii</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i> <i>P. falciparum</i> <i>Leishmania</i> sp
Artemetina	<i>A. annua</i> <i>A. indica</i>	Antiparasitaria en general
Casticina	<i>Artemisia</i> sp.	Antiparasitaria en general
Sakurenina	<i>A. indica</i>	Antiparasitaria en general
Metoxiaromadendrina	<i>A. indica</i>	Antiparasitaria en general
Plumbagina	<i>Pera benensis</i>	<i>P. falciparum</i> y <i>L. donovani</i>
Diospirina	<i>Pera benensis</i>	<i>P. falciparum</i> y <i>L. donovani</i>

5. Plantas seleccionadas para este estudio

Para realizar este trabajo utilizamos especies vegetales de la Amazonia Peruana que fueron seleccionadas teniendo en cuenta su uso en medicina tradicional (Tabla 3).

Con ellas se prepararon extractos que se ensayaron *in vitro* frente a promastigotes de *L. infantum* y epimastigotes de *T. cruzi*, además de células de mamífero CHO, para determinar tanto su actividad antiparasitaria como su citotoxicidad inespecífica. Aquellas que mostraron mayor actividad antiparasitaria fueron seleccionadas para continuar con su estudio

Tabla 3: Plantas seleccionadas para su estudio biológico

Nombre Científico	Familias	Aplicación Tradicional de las Plantas
<i>Geissospermum reticulatum</i>	Apocynaceae	Malaria.
<i>Aspidosperma desmanthum</i>	Apocynaceae	Malaria.
<i>A. spruceanum</i>	Apocynaceae	Malaria.
<i>A. schultesii</i>	Apocynaceae	Malaria.
<i>Aristolochia pilosa</i>	Aristolochiaceae	Mordedura de serpiente
<i>Tabebuia serratifolia</i>	Bignoniaceae	Bronquitis, gripe, cálculos biliares, anticanceroso, diabetes, fiebre, leishmania y reumatismo.
<i>Tradescantia zebra</i>	Commeliaceae	Insecticida.
<i>Cedrela odorata</i>	Meliaceae	Astringente, febrífugo, tónico.
<i>Chondodendron tomentosum</i>	Menispermaceae	Antiséptico, anti-inflamatorio, reumatismo, Ictericia, gonorrea, anestésico.
<i>Paullinia clavifera</i>	Sapindaceae	Insecticida.
<i>Brunfelsia grandiflora</i>	Solanaceae	Leishmaniasis, reconstituyente, antirreumático febrífugo, Fiebre amarilla, anti-sífilis, diurético
<i>Zamia ulei</i>	Zamiaceae	Leishmaniasis.

La familia **Apocynaceae** es considerada fuente de alcaloides mono y bis indólicos con actividad antiparasitaria¹³⁴. *Aspidosperma pyriforme*, *A. megalocarpon*, *A. excelsum*, *A. polineuron*¹³⁵, *Geissospermum sericeum* y *G. vellosii*¹³⁶ incluyen en su composición alcaloides indólicos que han demostrado tener una variada gama de actividades biológicas, incluidas la antibacteriana, tripanosomal, leishmanial, antiplasmodial y anticancerosa^{137,138,139,140,141,142,143,144}.

¹³⁴Mitaine, A. C.; Mesbah, K.; Richard, B.; Peterman, C.; Arrazola, S.; Moretti, C.; Hanrot, M. Z. Oliver, L. M. 1996. Alkaloids from *Aspidosperma* species from Bolivia. *Plant. Med.* 62, 458-461.

¹³⁵Mitaine-Offer A. C.; M. Sauvain; A. Valentin; J. Callapa; M. Mallié; Zèches-Harnot; M. 2002. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indol Alkaloids. *Phytomedicine.* 9, 142-145

¹³⁶Steele, J. C.; Veitch, N. C. Simmonds, M. S. Warhurst, D.C. 2002. Indole and beta-carbonile alkaloids from *Geissospermum sericeum*. *J. Nat. Prod.* 65, 85-88.

¹³⁷Phillipson J. D.; Wright C. W.; Kirby G. C.; Warhurst D. C.; 1993. Tropical plants as sources of antiprotozoal agents. In KR Downum, J. T Romeo, HA Stafford (eds), *Phytochem. Trop. Plant.* 1-40.

¹³⁸Kayser O, Kiderlen A. F, Croft S. L 2003. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol. Res.* 90, S55-S62.

¹³⁹Sakamoto-Hojo E. T; Takahashi C. S.; Ferrari I.; Motidome M. 1988. Clastrogenic effect of the plant alkaloid ellipticine on bone marrow cells of Wistar rats and on human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 199, 11-19.

La familia **Aristolochiaceae**, debido a las sustancias con actividad farmacológica que contiene, ha jugado y juega un papel importante en las diferentes farmacopeas. De forma tradicional, estas sustancias se han usado en obstetricia (de ahí deriva el nombre del género *Aristolochia*, que significa *buen parto*), y para curar picaduras de serpientes y escorpiones. Algunas especies de *Asarum* y *Aristolochia* se cultivan como ornamentales^{145,146,147}. Se ha descrito actividad antibacteriana¹⁴⁸ y actividad insecticida^{149,150} en varias especies de esta familia.

La familia **Bignoniaceae**, al igual que las familias antes mencionadas, también posee múltiples propiedades por lo que se utiliza en el tratamiento de la diabetes y como antiinflamatorio^{151,152}. Algunas especies de esta familia poseen los alcaloides tecomina y

¹⁴⁰ Delorenzi J. C.; Attias M.; Gattass C. R.; Andrade M.; Rezende C.; Pinto A. C., Henriques A. T.; Bou-Habib D. C.; Saraiva E.M. 2001. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Peschiera australis*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 45, 1349-1354.

¹⁴¹ Kuo P. C.; Damu A. G., Lee K. H., Wu T. S. 2004. Cytotoxic and antimalarial constituents from roots of *Eurycoma longifolia*. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 537-544.

¹⁴² Ferreira M. E., Nakayama H., De Arias A. R., Schinini A.; De Bilbao N. V.; Serna E.; Lagoutte D.; Soriano Agaton F.; Poupon E.; Hocquemiller R.; Fournet A. 2006. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Ethnopharmacol.* 109, 258-263.

¹⁴³ Tanaka J. C. A.; Da Silva C. C.; Dias Filho, B. P.; Nakamura C. V.; Oliveira A. J. B. 2006. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 387-391.

¹⁴⁴ Wright C. W.; Allen D.; Cai Y.; Chen Z.; Phillipson J. D.; Kirby G. C.; War-hurst D. C.; Tits M.; Angenot L. 1994. Selective antiprotozoal activity of some *Strychnos* alkaloids. *Phytother. Res.* 8, 149-152.

¹⁴⁵ Huber, H. 1993. *Aristolochiaceae*, en Kubitzki, K.; Rohwer, J. G.; Bittrich, V. (Editores). *The Families and Genera of Vascular Plants. II. Flowering Plants - Dicotyledons*. Springer-Verlag: Berlín. ISBN 3-540-55509-9.

¹⁴⁶ Neinhuis, C.; Wanke, S.; Hilu, K. W., Müller, K.; Borsch, T. 2005. Phylogeny of Aristolochiaceae based on parsimony, likelihood, and Bayesian analyses of sequences. *Plant. System. Evol.* 250, 7-26.

¹⁴⁷ Watson, L.; Dallwitz, M. J. 1992. *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*. Version: 29th July 2006. [29 de noviembre de 2006].

¹⁴⁸ Manikandar, R. V.; Selvamani, P.; Latha, S. 2006. Antibacterial Activity of leaf extracts of *Aristolochia bracteata* retz. *Indian. J. Pharm. Sci.* 68, 509-510.

¹⁴⁹ Jvilou, R.; Ennabli, A.; Sayah, F. 2006. Insecticidal activity of four medicinal plants extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *African J. Biotechnol.* 5, 936-940.

¹⁵⁰ Messiano, G. B.; Vieira, L.; Machado, M. B.; Lopes, L. M. X.; De Bortoli, S. A.; Zukerman-Schpector, J. 2008. Evaluation of insecticidal activity of diterpenes of lignans from *Aristolochia malmeana* against *Anticarsia gemmatalis*. *J. Agr. Food. Chem.* 56, 2655-2659.

¹⁵¹ Carey, W. M.; Jeevan Mani Babu, D.; Venkat Rao, N.; Krishna Mohan, G. 2008. Antiinflammatory activity of the fruit of *Kigelia pinnata* DG. *Pharmacologyonline.* 2, 234-235.

tecostanina, a los que se atribuye dicha actividad, por ello se realizaron estudios que confirmaron su actividad citotóxica frente a células cancerosas humanas¹⁵³. Además se le atribuye actividad insecticida^{154,155}, antiplasmodial y antitumoral¹⁵⁶.

En la familia **Commeliaceae** se ha citado actividad insecticida¹⁵⁷ de extractos de *Tradescantia zebra*.

Muchas de las plantas que pertenecen a la familia **Meliaceae** son consideradas potenciales insecticidas¹⁵⁸, presentan actividad antimicrobiana¹⁵⁹, antibacteriana¹⁶⁰, antimalárica¹⁶¹, además de ser citotóxicas frente a células tumorales¹⁶².

Especies de la familia **Menispermaceae** se han utilizado en la farmacopea popular y de ellas se han extraído fármacos de gran utilidad en medicina, como la

¹⁵² Byeon, S. E., Chung, J. Y.; Lee Y. G.; Kim, B. H.; Cho, J. Y. 2008. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extracts from the inner bark of *Tabebuia avellaneadae*. J. Ethnopharmacol. 119, 145-152.

¹⁵³ Zuh, J.; Viñas, R.; Smith, E. E. 2008. In vitro evaluation of human liver cancer cells and the potential cytotoxicity of *Tecoma stans* (Bignoniaceae) and *Brickellia cavanillesi* (Asteraceae) both single and in combination. Toxicol. Environment. Chem. 90, 801-808.

¹⁵⁴ Castillo, L.; Gonzáles-Coloma, A.; Gonzáles, A.; Díaz, M.; Santos, E.; Alonso-Paz, E.; Bassagoda, M. J.; Rossini, C. 2008. Screening for Uruguayan plants for deterrent activity against insects. In. Crop. Prod. 29, 235-240.

¹⁵⁵ Kaushik, R.; Saini, P. 2008. Larvicidal activity of leaf extract of *Millingtonia hortensis* (family: Bignoniaceae) against *Anopheles stephensi* Culex quinquefasciatus and *Aedes aegypti* mosquitoes. J. Vector. Dis. 45, 66-69.

¹⁵⁶ De Morais S. K. R.; Silva, S.G.; Portela, C. N.; Nunomura S. M.; Quignarg E. L. J.; Pohlit A. M. 2007. Bioactive dihydroxifuranonaphthoquinone from the bark of *Tabebuia incana* A.H. Gentry (Bignoniaceae) and HPLC analysis of commercial pau d'arco and certified *T. incana* barkinfusions. Acta Amazonica. 37, 99-102.

¹⁵⁷ Perez, D.; Iannacone, J. 2006. Efectividad de extractos botánicos de diez plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de *Rhychoiphorus palmarum* L. insecto plaga del pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonia del Perú. Agricultura Técnica. 66, 21-30.

¹⁵⁸ Seffrin, R. D.; Costa, E. C.; Domínguez, L. D. S.; Dequech, S. T. B.; Saucen, S. D. 2008. Insecticidal activity of meliaceous plants on *Diabrotica speciosa* (Col. Chrysomelidae). Ciencia Rural. 38, 1805-1809.

¹⁵⁹ Makut, M. D.; Gyar, S. D.; Pennap, G. R. I.; Anthony, P. 2008. Phytochemical screening and antimicrobial activity of the ethanolic and methanolic extracts of the leaf and bark of *Khaya senegalensis*. African J. Biotechnol. 7, 1216-1219.

¹⁶⁰ Rahman, A. K. M. S.; Chowdhury, A. K. A.; Ali, H. A.; Raihan, S. Z.; Ali, M. S. Nahar, L.; Sarker, S. D. 2008. Antimicrobial Activity of two limonoids from *Swietenia mahagoni* against multiple drugs resistant (MRD) bacterial strains. J. Nat. Med. 63, 41-45.

¹⁶¹ Lee, S. E.; Kim, M. R.; Kim, J. H.; Takeoka, G. R.; Kim, T.W.; Park, B. S. 2008. Antimalarial activity of anthothocol from *Khaya anthotheca* (Meliaceae) Phytomedicine.15, 533-535.

¹⁶² Maneerat, W.; Laphookhieo, S.; Koysonmbon S.; Chantrapromma, K. 2008. Antimalarial, antimycobacterial and cytotoxic limonoids from *Chisocheton siamensis*. Phytomedicine. 15, 1130-1134.

tubocurarina, alcaloide del curare (veneno empleado por los indígenas sudamericanos para sus dardos), obtenido de especies de *Curarea*, *Chondodendron*, etc. Se ha determinado que muchas de las plantas de esta familia tienen componentes que han demostrado una gran variedad de actividades: antiplasmodial^{163,164,165,166}, antitripanosomal^{167,168}, antibacteriana^{169,170}, además de antileishmanial¹⁶⁶.

En la familia **Sapindaceae**, algunas especies muestran actividad antiparasitaria frente a *Trichomonas vaginalis*¹⁷¹, actividad antibacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis* y *M. smegmatis*^{172,173}, así como actividad insecticida¹⁵⁴.

En la familia **Solanaceae**, algunas especies son mundialmente conocidas por sus usos medicinales, insecticidas, sus efectos psicotrópicos o por ser venenosas. Otras especies, en particular las que son fuentes de alcaloides, son utilizadas en medicina y farmacología. Entre los alcaloides más famosos presentes en estas plantas podemos mencionar a los tropanos, utilizadas durante cientos de años como veneno. No

¹⁶³ Carraz, M.; Jossang, A.; Rasoanaivo, P.; Mazier, D.; Frappier, F. 2008. Isolation and antimalarial activity of new morphinan alkaloid of *Plasmodium yoelii* liver stage. *Bioorganic. Med. Chem.* 16, 6186-6192.

¹⁶⁴ Bhatnagar, S.; Das, P. 2007. Antimalarial Activity in tropical plants: A review. *J. Herb. Sp. Med. Plant.* 13, 103-132.

¹⁶⁵ De Wet, H.; Van Heerden, F. R.; Van, Wyk, D. E.; Van Zyl, R. L. 2007. Antiplasmodial activity and cytotoxicity of *Alberticia delagoensis*. *Fitoterapia.* 78, 420-422.

¹⁶⁶ Kvist, L. P.; Christensen, S. B.; Rassmusen, H. B.; Mejia, K.; Gonzales, A. 2006. Identification and evolution of Peruvian Plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* 106, 390-402.

¹⁶⁷ Murebwayire, S.; Frédéricich, M.; Hannaert, V.; Jonville, M. C.; Duez, P. 2008. Antiplasmodial, antitripanosomal activity of *Triclisia saclenxii* (Pierre) Diels. *Phytomedicine.* 15, 728-733.

¹⁶⁸ Camacho, M. D. R.; Philipson, J. D.; Croft, S. L.; Rock, P.; Marshall, S. J.; Schiff, Jr. P. R. 2002. In vitro activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytother. Res.* 16, 432-436.

¹⁶⁹ Jeyachandra, R.; Mahesh, A.; Cindrella, L.; Baskaran, X. 2008. Screening Antibacterial Activity of root extract of *Cocculus hirsutus* (L.) Diels. Used in folklore remedies in south India. *J. Plant. Sci.* 3, 194-198.

¹⁷⁰ Chea, A.; Jonville, M. C.; Bun, S. S.; Laget, M.; Elias, R.; Duménil, G.; Balansar, G. 2007. In vitro antimicrobial activity of plants used in Cambodian traditional medicine. *American J. Chinese. Med.* 35, 867-873.

¹⁷¹ Tiwari, P.; Singh, D.; Singh, M. M. 2008. Anti-*Trichomonas* activity of *Sapindus saponins* a candidate for development as microbicidal contraceptive. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 526-534.

¹⁷² Matibandlela, S. P. N.; Meyer, J. J. M.; Hussein, A. A.; Houghton, P. J.; Hamilton, C. J.; Lall, N. 2008. Activity against *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis* by extract of South African medicinal plants. *Phytother. Res.* 22, 841-845.

¹⁷³ Sofidiya, M. O.; Gimo, M. O.; Aliero, A. A.; Afolayan, A. J.; Odukoya, O. A.; Familoni, O. B. 2008. Antioxidant and antibacterial properties of *Lecaniodiscus cupanioides*. *Research. J. Microbiol.* 3, 91-98.

obstante, pese a su reconocido efecto venenoso, muchas de las sustancias presentes en la familia Solanaceae muestran valiosas propiedades farmacéuticas^{174,175,176,177}.

Algunos géneros la familia **Zamiaceae** presentan actividad leishmanicida¹⁷⁸.

5.1. *Geissospermum* sp.

El género *Geissospermum* comprende árboles nativos de la zona amazónica de América del Sur, Surinam, Brasil, Perú, y Bolivia. En Perú se localiza en los Departamentos de Huanuco, Madre de Dios y Loreto. Habita en llanuras aluviales, desde terrazas ligeramente altas hasta orillas y colinas bajas.

La corteza de *Geissospermum* es la parte del árbol que utilizan las comunidades nativas para el tratamiento de los síntomas relacionados con la malaria. Por tanto, es la parte del árbol que más importancia tiene, pues contiene importantes metabolitos secundarios: alcaloides, saponinas, flavonoides y bases cuaternarias.

Existen doce especies de *Geissospermum* descritas hasta ahora, de las que solamente cinco se han estudiado desde el punto de vista fitoquímico, *Geissospermum argenteum*, *G. laeve*, *G. sericeum* y *G. vellosii*^{179,180} y *G. reticulatum*. El género *Geissospermum* es fuente de alcaloides indólicos tipo estricnano (subtipo akuammicina), corinanteano (subtipo normaculina B) y aspidoespermato (subtipo geissosvellina) y el alcaloide β -carbonílico flavopereirina, de conocida actividad antiplasmodica⁵⁷.

¹⁷⁴ Olmstead, R. G.; Bohs, L. 2007. A Summary of molecular systematic research in Solanaceae: 1982-2006. Acta Hort. (ISHS) 745, 255-268.

¹⁷⁵ Zeiger, E. 1998. Solanine and Chaconine. Review of Toxicological Literature. Integrated Laboratory Systems, USA. 2-98.

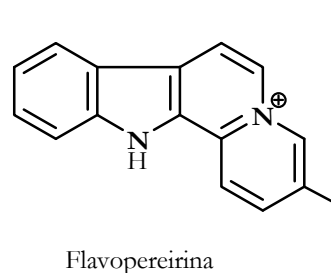
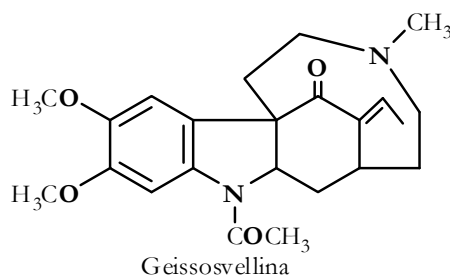
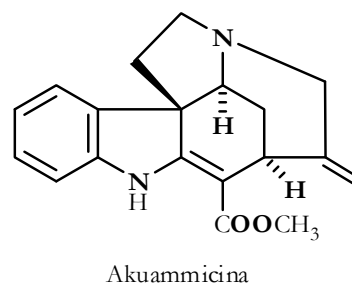
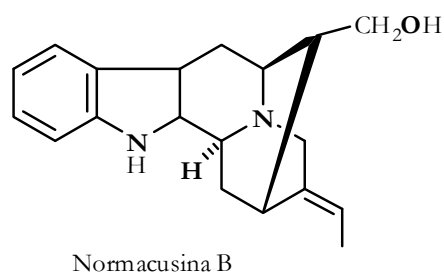
¹⁷⁶ Matsuda, J.; Okabe, S.; Hashimoto, T.; Yamada, Y. 1991. Molecular cloning of hyoscyamine 6-beta-hydroxylase, a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, from cultured roots of *Hyoscyamus niger*. J. Biol. Chem. 266, 9460-9464.

¹⁷⁷ Rocha, P.; Stenzel, O.; Parr, A.; Walton, N.; Leech, M. J. 2002. Functional expression of tropinone reductase I (trI) and hyoscyamine-6 β -hydroxylase (h6h) from *Hyoscyamus niger* in *Nicotiana tabacum*. Plant Science. 162, 905-913.

¹⁷⁸ Esteves, Y.; Castillo, D.; Pisando, M. T.; Arevalo, J.; Rojas, R.; Alban, J.; Dejaró, E.; Bouordy, G.; Sauvain, M. 2007. Evaluation of the leishmanial activity of plant used by peruvian Chayahuita ethnic group. J. Ethnopharmacol. 114, 254-259.

¹⁷⁹ Milliken, W. 1997. Traditional anti-malarial medicine in Roraima, Brazil. Econ. Bot. 51, 212-237

¹⁸⁰ Paccioni, J. P.; Husson, H. P. 1978. Alcaloides de *Geissospermum argenteum* (Apocynaceae). Phytochemistry. 17, 2146-2147.



5.2. *Aspidosperma sp.*

El género lo constituyen unas 260 especies que se encuentran distribuidas en las zonas tropicales y subtropicales entre México y Argentina¹⁸¹. De las 80 especies distribuidas en las zonas tropicales de América del Sur, 16 se encuentran en Perú (tabla 4) y 8 de ellas crecen en el Departamento de Loreto.^{182,183} Estas especies son utilizadas por los pobladores de la Amazonia peruana para el tratamiento de los síntomas de enfermedades tropicales (malaria, dengue, leishmaniasis, etc.).

¹⁸¹ Fonseca, Barbosa, L.; Curcino, Viera, I. J.; Leda, M.; Braz, Filho, R.; Uchoa D. 2006. Actividad antimicrobiana de extractos de *Aspidosperma*. S. B. Q. 133.

¹⁸² Vásquez, Martínez, R. 1997. Flora de las Reservas Biológicas de Iquitos Perú. Ed. Copyrigh USA, 114-115.

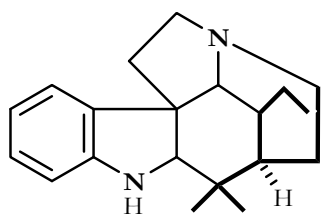
¹⁸³ Brako, L.; Zaruchi J. L. 1993. Catalogue of Flowering Plants and Cymnosperms. Ed. Copyrigh. 58-59.

Tabla 4. Especies de *Aspidosperma* de Perú

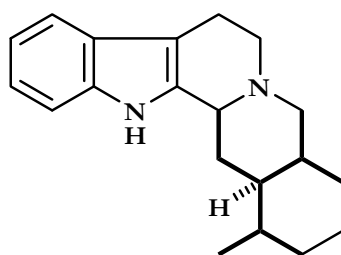
Especie	Lugar
<i>A. araracanga</i>	Loreto y Ucayali
<i>A. capitatum</i>	Huanuco y Pasco
<i>A. carapanauba</i>	Pasco
<i>A. cruenta</i>	Loreto
<i>A. cylindrocarpon</i>	Huanuco y San Martín
<i>A. desmanthum</i>	Loreto
<i>A. excelsum</i>	Loreto y San Martín
<i>A. macrocarpon</i>	Huanuco, Junin, San Martín y Ucayali
<i>A. marcgravianum</i>	Juni, Madre de Dios, San Martín y Ucayali
<i>A. megaphyllum</i>	Madre de Dios
<i>A. myristifolium</i>	Madre de Dios
<i>A. parvifolium</i>	Cajamarca, Huanuco, Loreto, Madre de Dios, Pasco, San Martín y Ucayali.
<i>A. polyneuron</i>	Cajamarca
<i>A. rigidum</i>	Huanuco, Loreto, Madre de Dios y Pasco
<i>A. schultesii</i>	Loreto
<i>A. spruceanum.</i>	Loreto y San Martín

Hasta la fecha se han estudiado aproximadamente 57 especies de *Aspidosperma*, de las que se han aislado 270 alcaloides indólicos de diferentes tipos estructurales: Aspidospermatano (A), Corinanteano (C), Eburnano (E), Plumerano (P), Estricnano (S) y Vallesiacotamano (V); que a su vez se dividen en subtipos dependiendo de la variación del fragmento alicíclico¹⁸⁴.

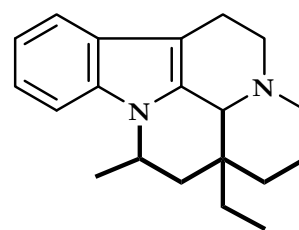
¹⁸⁴ Ruíz, W. 2008. Alcaloides indólicos antiparasitarios de especies de la Amazonia peruana. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. Tenerife.



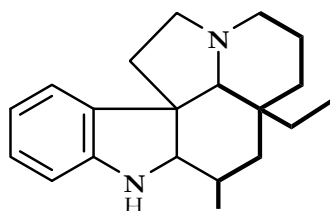
Tipo Aspidospermatano



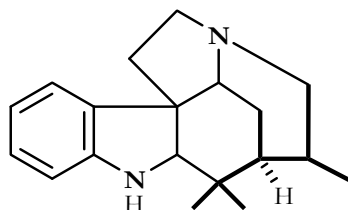
Tipo Corinanteano



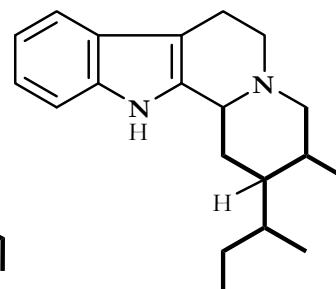
Tipo Eburnano



Tipo Plumerano



Tipo Estricano



Tipo Vallesiacontamano

Existen algunos alcaloides indólicos que no están dentro de esta clasificación y que provienen de otros tipos de reagrupamiento del fragmento alicíclico, entre ellos citaremos los siguientes: uleina, rhazinilam, subincanadina A, gilbertina y los piridocarbazoles, como la ellipticina¹⁸⁴.

Muchas especies de este género se usan de forma tradicional para el tratamiento de diferentes enfermedades. *Aspidosperma quebracho-blanco* es utilizada para el tratamiento de la disentería y apendicitis¹⁸⁵, así como antiasmático, cicatrizante y febrífugo¹⁸⁶.

¹⁸⁵Bourdey, G.; Oporto, P.; Gimenez, A.; Deharo, E. 2004. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isocño-Guaran Indians. J. Ethnopharmacol. 93, 269-277.

¹⁸⁶Bogiovanni, G. A.; Palacio, L.; Nuñez, C. O.; Cantero, J. J. 2006. Medicinal Plants from the Sierra de Comechingones, Argentina. J. Ethnopharmacol. 107, 327-341.

Aspidosperma album se usa para la malaria¹⁸⁷, al igual que *Aspidosperma excelsum*¹⁸⁸, *Aspidosperma dicolor*¹⁸⁹, *Aspidosperma polyneuron*¹⁹⁰ y *Aspidosperma nitidum*¹⁹¹.

La actividad antiparasitaria descrita hasta el momento es principalmente frente a *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* sp., *Trypanosoma* sp., además frente a diferentes bacterias y virus¹⁹².

Su amplia utilización contra la malaria, y su comprobada actividad frente a *Plasmodium*, así como su uso tradicional hacen de *Aspidosperma* un género muy interesante.

5.3. *Aristolochia pilosa*

Se emplea la raíz para tratar las mordeduras de serpientes venenosas. Pertenece a la familia Aristolochiaceae, y es llamada comúnmente huancahuasi sachá¹⁹³.



5.4. *Tabebuia serratifolia*

La parte de la planta empleada principalmente es la corteza. Es usada para el tratamiento de las afecciones bronquiales, gripe, cálculos biliares, cáncer, diabetes, fiebre, leishmaniasis, reumatismo, tumores, afecciones cutáneas,



¹⁸⁷Grenand, P.; Moretti, C.; Jacquemin, H. 1987. Pharmacopées traditionnelles en Guyane, (Créoles, Palikours, Wayampis). de l'ORSTOM ed. 108. Collection Mémoires. Paris. 569.

¹⁸⁸Brandao, M.; Botelho, M.; Krettli, E. 1985. Antimalarial experimental chemotherapy using natural products. Ciência e Cultura. 37, 1152-1163.

¹⁸⁹Schultes, R. E.; 1979. De plants toxicariie e mundo novo tropicale commentationes. XIX. Biodynamic apocynaceous plants of the northwest Amazon. J. Ethnopharmacol. 1, 165-192.

¹⁹⁰Wasicky, R.; Unti, O.; Barbieri, E. 1942. Quinine and alkaloids in Brazil. Annales Facultad Farmacologia Odontology University Sao Paulo. 3, 137-263.

¹⁹¹Brandao, M.; Grandi, T.; Rocha, E.; Sawyer, D.; Krettli, A.; 1992. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. J. Ethnopharmacol. 36, 175-182.

¹⁹²Verpoortte, R.; Van Beek, T.,A.; Tomasen, P.; Aandewiel, J.; Baerheim, Svendsen, A. 1983. Screening of antimicrobial activity of some plants belonging to the Apocynaceae and Loganiaceae. J. Ethnopharmacol. 8, 287-302.

¹⁹³Brack, A. 2003. Lista de plantas nativas domesticadas del Perú. Edt. Bruño.160. Lima –Perú.

infecciones por hongos, etc. Comúnmente llamada tahuari. Pertenece a la familia Bignonaceae¹⁹⁴.

De las especies del género *Tabebuia* se aislaron diferentes naftoquinonas. Las partes estudiadas son varias: raíces, hojas, corteza y duramen. La *Tabebuia* es un árbol muy común en Guayana, en donde los nativos la utilizan cocida como febrífugo y en emplastos contra las úlceras provocadas por la leishmaniasis¹⁹⁵. Entre los productos aislados de este género destacan varias naftoquinonas.

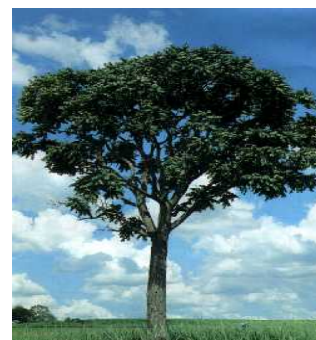
5.5. *Tradescantia zebrina*

Su uso es principalmente ornamental, además se utiliza en forma tradicional como insecticida¹⁹⁴. Pertenece a la familia Commelinaceae. Es comúnmente denominada: judío que vaga, hierba de la cucaracha o judío que vaga púrpura. Los extractos de esta planta muestran actividad insecticida¹⁵⁷ y antiprotozoaria¹⁹⁶.



5.6. *Cedrela odorata*

Su madera es de gran importancia, siendo utilizada en la fabricación de chapas y torneado, así como en la fabricación de cajas para puros. La corteza es astringente y se utiliza como febrífugo y tónico. Las hojas tienen aplicaciones medicinales.¹⁹⁷ Pertenece a la familia Meliaceae y es comúnmente llamado cedro, cedro amargo o cedro colorado.



¹⁹⁴Pérez, D.; Iannacone, J. 2004. Efecto insecticida de sacha yoco, (*Paullinea clavigera* var. *Bullata* Simpson), (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* hort ex Bosse) (Commeliaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y Lopéz, 1941, principal vector de la malaria en Ucayali, Perú. Ecol. Apl. 3, 64-72.

¹⁹⁵ Vidal, Tessier, A. M.; Delaveau, P.; Champion, B.; Jacquemin, H. 1988. Sur des quinine lipophiles du bois de tronc de *Tabebuia serratifolia* (vahl) Nichols. Anm. Pharmacoceutiques Françaises. 46, 55-57.

¹⁹⁶ Tapia, Pérez, M. E.; Tapia, Contreras, A.; Cedillo, Rivera, R.; Osuna, L.; Meckes, M. 2003. Screening Mexican of medicinal plants for antiprotozoal activity-Part II. Pharm. Biol. 66, 21-30.

¹⁹⁷Vásquez, M. R. 1997. Florila de las reservas biológicas de Iquitos, Perú: Allpahuayo-Mishana, Explornapo Camp., Explorama Lodge. Monogr. Syst. Bot. Mo. Bot. Gard. 63, 1-1046.

5.7. *Chondodendron tomentosum*

Es considerado diurético y reductor de la fiebre. Las hojas se emplean en el tratamiento de mordeduras de serpientes venenosas y para la inflamación de las vías urinarias y de la próstata. También es considerado antiséptico para las inflamaciones crónicas de la vejiga, reumatismo, ictericia y gonorrea. Además esta asociado a varios agentes anestésicos y se usa como relajante muscular¹⁹⁸. El curare se usa en muchas situaciones crónicas, como por ejemplo, espasmos del músculo, artritis o poliomielitis. Las partes de la planta usadas son: tallo, corteza, raíces y hojas. El género *Chondodendron* pertenece a la familia Menispermaceae¹⁹⁹.



La familia Menispermaceae, distribuida ampliamente en los trópicos, se caracteriza por la presencia de alcaloides del tipo bencilisoquinolinas²⁰⁰, concretamente l-bencilisoquinolína, aporphina, hasubanan, bisbencilisoquinolína y protoberberina.

Dentro de los aislados de *C. tomentosum* se encuentran (+)-isochondodendrina, cycleanina, norcycleanina, (+)-chondocurina, (+)-tubocurarina, (+)-chondocurarina y curina²⁰⁰.

5.8. *Paullinia clavigera*

Pertenece a la familia Sapindaceae y es conocida comúnmente como sacha yoco. Se utiliza principalmente como insecticida¹⁵⁷.



¹⁹⁸ Lee, C. 2003. Confirmation, action, and mechanism of neuromuscular blocking muscle relaxants. *Pharmacol. Ther.* 98, 143-169.

¹⁹⁹ <http://www.ecoaldea.com/plmd/brava.htm>

²⁰⁰ Thornber, C. W. 1970. Alkaloids of The Menispermaceae. *Phytochemistry.* 9, 157-187.

5.9. *Brunfelsia grandiflora*

Se utiliza como reconstituyente y en el tratamiento de la leishmaniasis o uta. La parte utilizada de la planta es la corteza.

Pertenece a la familia Solanaceae y es comúnmente llamada chiric sanango o manaca, entre otras formas²⁰¹.



5.10. *Zamia ulei*.

El tallo triturado es empleado en el tratamiento de la leishmaniasis y también como cicatrizante. Pertenece a la familia Zamiaceae (cicas)²⁰¹.



Las Cicas estaban ampliamente distribuidas en áreas tropicales y subtropicales en la era Mesozoica; se encuentran entre las plantas con semillas más primitivas. A menudo se denominan fósiles vivos, debido a que su morfología ha cambiado poco desde sus antepasados del mesozoico.

Las gimnospermas del orden Cycadales comprenden unas 240 especies existentes en la actualidad, que se encuentran escasamente distribuidas en los trópicos y subtropicos.

Las cicas, producen una variedad de sustancias secundarias; dentro de ellas las más importantes son cycasina, macrozamina y neocycasina. Macrozamina y cycasina son azoxiglicosidos muy tóxicos que pueden desempeñar un papel ecológico importante como antiherbívoros.²⁰²

Al igual que cycasina, el 3-metilamino-L-alanina (BMAA) se encuentra en casi todos los géneros de las cicas analizadas hasta el momento, aunque hay diferencias cuantitativas entre ellas. En *Zamia* se encuentra en un 0.001%^{203,204,205}.

²⁰¹ <http://www.siamazoni.org.pe/publicaciones/2003>

²⁰² Castillo Guevara, C.; Rico Gray, V. 2003. The role of macrozamin and cycasin (cycadales) as antiherbivore defense. J. Bot. Soc. 3, 206-217.

²⁰³ Schneider, D.; Wink, M.; Sporer, F. 2002. Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. Naturwissenschaften. 89, 281-294.

²⁰⁴ Osborne, R.; Grove, A.; Oh, P.; Mabry, T. J.; Ng, J.C.; Seawright, A. A. 1994. The magical and medicinal usage of *Stangeria eriopus* in South Africa. J. Ethnopharmacol. 43, 67-72.

6. Objetivos

Objetivo general:

Búsqueda de nuevos principios activos para el control de enfermedades parasitarias: leishmaniasis y Chagas.

Objetivos específicos:

- Selección de especies vegetales de uso tradicional con propiedades antiparasitarias.
- Estudio fitoquímico de las especies seleccionadas: aislamiento de productos activos y elucidación estructural de los mismos.

En el presente estudio se pretende comprobar la presencia de principios activos con actividad antiparasitaria en plantas que se usan de forma tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades. Se han realizado estudios de actividad biológica con los extractos y compuestos aislados de las especies vegetales seleccionadas sobre los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum* por su importancia como agentes causantes de parasitosis de relevancia mundial, así como sobre cultivos de líneas celulares de mamífero (CHO) para conocer la citotoxicidad inespecífica de los compuestos.

²⁰⁵ Yagi, F. 2004. Azoxyglycoside content and β -glycosidase activities in leaves of various cycads. *Phytochemistry*. 65, 3243-3247.

Material y métodos

Material y métodos

1. Material biológico

1.1. Material vegetal

Este trabajo se ha centrado en el estudio de especies de plantas endémicas de la Amazonía peruana, que son empleadas de forma popular en el tratamiento de enfermedades parasitarias y como insecticidas: *Aristolochia pilosa* (hoja y tallo); *Brunfelsia grandiflora* (hoja y tallo); *Cedrela odorata* (corteza); *Paullinia clavigera* (corteza); *Tradescantia zehbrina* (toda la planta); *Zamia ulei* (tallo); *Chondodendron tomentosum* (hoja y corteza); *Tabebuia serratifolia* (corteza).

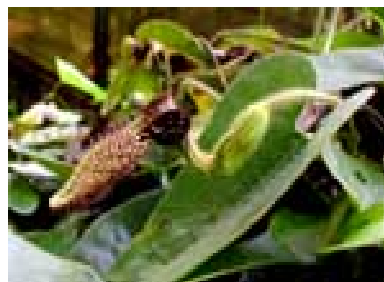
Estas especies se recolectaron teniendo en cuenta la revisión bibliográfica y las entrevistas realizadas a campesinos que las utilizan habitualmente. Una vez recolectadas, una parte de ellas se llevaron al Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana para su clasificación. El material vegetal restante se llevó al laboratorio de fitoquímica de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana para realizar la extracción correspondiente.

Se obtuvieron 33 extractos, que se ensayaron frente a *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi* y frente a células de mamífero CHO, además de los modelos de insectos descritos en el apartado 3 de la introducción. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se seleccionaron tres especies para continuar con su estudio químico y biológico.

Aristolochia pilosa

Se recolectó (hojas y tallo) en agosto del 2003 en la estación biológica Allpahuayo Mishana, Km 27 de la Carretera Iquitos–Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 025860.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Piperales
Familia:	Aristolochiaceae
Género:	<i>Aristolochia</i>
Especie:	<i>Aristolochia pilosa</i>



Lianas perennes de 2 a 5 m de largo; el tallo es cilíndrico, brillante y piloso; las hojas son cordiformes, de 9 a 14.5 cm de largo, y de 7 a 10 cm de ancho. Esta planta se encuentra en la selva baja de Perú¹.

Brunfelsia grandiflora

Se recolectó (hojas y tallo) en julio del 2003 en la estación biológica Allpahuayo Mishana, Km 27 de la Carretera Iquitos–Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 026365.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Brunfelsia</i>
Especie:	<i>Brunfelsia grandiflora</i>



Planta arbustiva que presenta hasta 5 m de altura. Hojas alternas, apicalmente frondosas ó dispersas en las ramas en floración, de un tamaño de 15 a 20 cm de longitud

¹ Brack, A. 2003. Lista de plantas nativas domesticadas del Perú. Diez mil años de Domésticación. Edt. Bruño, Lima, Perú. 1-160.

y de 5 a 8 cm de anchura. Inflorescencias cimosas, flores pediceladas de 3.5 a 4 cm de longitud, de color blanco o morado, con corola tubular, campanulada y con 5 grandes lóbulos; cáliz corto de 1.5 a 2 cm de longitud con anteras libres de estigma, pequeñas, obtusas, apendiculares en la base; ovario superior bicarpelar. Fruto en baya ovada redondeada. Se encuentra en bosques tropicales húmedos².

Cedrela odorata

Se recolectó (corteza) en agosto del 2003 en la estación biológica Allpahuayo Mishana, Km 27 de la Carretera Iquitos–Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 033574.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapindales
Familia:	Meliaceae
Género:	<i>Cedrela</i>
Especie:	<i>Cedrela odorata</i>



Árbol caducifolio, llega a alcanzar 30 m de alto en sus zonas de origen. Con la copa redondeada, densa y el tronco con la corteza gruesa de color gris–marrón, fisurada.

Hojas pinnadas con 5-11 pares de folíolos de lanceolados a oblongos, de 5-10 cm de longitud, opuestos o alternos, enteros, acuminados, con la base asimétrica. El haz es de color verde oscuro y el envés más claro o verde amarillento. Inflorescencias terminales de 15-30 cm de longitud, con fina pubescencia. Flores pequeñas, tubulosas, de color crema verdoso. Fruto en cápsula leñosa dehiscente de 2.5-5 cm de longitud, colgante.

² <http://www.siamazonia.org.pe/publicaciones/2003>.

Se distribuye desde México hasta tierras bajas de centro y Sudamérica; está presente en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Bolivia, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela³.

Paullinia clavigera

Se recolectó (corteza) en agosto del 2003 en la estación biológica Allpahuayo Mishana, Km 27 de la Carretera Iquitos–Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 033368.

Reino: Plantae
Filo: Magnoliofita
Clase: Magnoliopsida
Orden: Sapindales
Familia: Sapindaceae
Género: *Paullinia*
Especie: *Paullinia clavigera*



Árboles y arbustos trepadores con hojas alternas, rara vez opuestas, simples o más frecuentemente compuestas, sin estipulas, a excepción de las trepadoras.

Inflorescencias en panículas o racimos. En las trepadoras con dos zarcillos, flores normalmente pequeñas, unisexuales o funcionando como tales, con 4-5 sépalos, libres o unidos, y de 0-5 pétalos libres. Disco patente entre los pétalos y los estambres, que están dispuestos en filas y pueden ser de 5 a 10. El fruto es una cápsula, drupa,

³ INIA, OIMT. 1996. Manual de Identificación de Especies Forestales de la Subregión Andina. Instituto Nacional de Investigación Agraria-Perú y Organización Internacional de las Maderas Tropicales, Proyecto PD/91.Lima, Perú.

esquizocarpo o baya, a veces alado. Comprende unos 150 géneros y unas 2000 especies distribuidas en los trópicos y subtrópicos⁴.

Tradescantia zebrina

Se recolectó (corteza) en julio del 2003 en la estación biológica Allpahuayo Mishana, Km 27 de la Carretera Iquitos–Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 034665.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Liliopsida
Orden:	Commelinales
Familia:	Commelinaceae
Género:	<i>Tradescantia</i>
Especie:	<i>Tradescantia zebrina</i>



Planta rastrera con largos tallos rojizos y nudos abultados, hojas verdes oscuras con unas bandas plateadas con un brillo metálico por arriba y púrpura por debajo; flores pequeñas blancas en el interior de los pétalos y rosa en el exterior⁴.

Zamia ulei

Se recolectó (tallo subterráneo) en agosto del 2003 en la estación biológica Allpahuayo Mishana, en el Km 27 de la Carretera Iquitos–Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. Una muestra de la planta se

⁴ Pérez, D.; Iannacone, J. 2004. Efecto insecticida de sacha yoco, (*Paullinea clavigera* var. Bullata Simpson), (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* hort ex Bosse) (Commeliaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y López, 1941, principal vector de la malaria en Ucayali, Perú. Ecol. Apl. 3, 64-72.

encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 027675.

Reino:	Plantae
Filo:	Tracheofita
Clase:	Cycadopsida
Orden:	Cycadales
Genero:	Zamia
Familia:	Zamiaceae
Especie:	<i>Zamia ulei</i>



Zamia ulei pertenece a la familia Zamiaceae, que es afín a las Cycadaceae, diferenciándose de ellas en la estructura de las hojas fructíferas. Se divide en dos subfamilias con ocho géneros y 150 especies distribuidas en regiones tropicales (África, Australia, Norte y Sudamérica). Son originarias de América Central e Islas del Caribe⁵.

Se trata de un grupo muy antiguo que en el Cretácico tuvo su máximo desarrollo. El aspecto general de esta planta recuerda al de una palmera. Son perennes, siempre verdes, dioicas; con tallo subterráneo, largo, erecto, usualmente cilíndricos; hojas pinnadas, rectas o curvadas; pecíolos engrosados en la base, opuestos o casi opuestos, enteros o con dientes marginales, carentes de nervio central; conos masculinos cilíndricos; conos femeninos ovoides; semillas subglobosas.

Está distribuida al norte del Río Amazonas, en Río Branco (Brasil), en la frontera oeste entre Brasil y Perú, y al este de Colombia⁶.

⁵ Calderón, E.; Galeno, G.; Bernal, R. 2003. Lista Preliminar de Plantas Fanerógamas de la familia Zamiaceae. Instituto Alexander Von-Humboldt. www.humboldt.org.co/conservación/zamiaceae.

⁶ Donalson, J. S. 2003. In *Cycas*. Status survey and conservation. Plan IUCN/SSC. Cycas Specialist group. IUCN. 9-19.

Chondodendron tomentosum

Se recolectó (hojas y corteza) en el CRI-IIAP- Pucallpa (Centro Regional de Investigación), en julio de 2003. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 033896.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Eudicotyledoneae
Orden:	Ranunculales
Familia:	Menispermaceae
Género:	<i>Chondodendron</i>
Especie:	<i>Chondodendron tomentosum</i>



Chomdodendron tomentosum pertenece a la familia Menispermaceae y es nativa de la selva tropical del Huallaga. Es una enredadera perenne, dioica, con un tallo que puede alcanzar 10 cm de diámetro. Presenta hojas pecioladas, grandes, de forma acorazonada, lisas por el haz y con una superficie interior sedosa compuesta de pelos blancos minúsculos. La inflorescencia es una panícula de pequeñas flores y los frutos son drupas de color púrpura que contienen una semilla y se presentan en grupos de seis⁷.

Tabebuia serratifolia

Se recolectó (corteza) en agosto del 2003 en la estación biológica Allpahuayo Mishana, en el Km 27 de la Carretera Iquitos–Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 034665.

⁷ <http://www.ecoaldea.com/plmd/pareiarabraba.htm>

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Bigoniaceae
Género:	<i>Tabebuia</i>
Especie:	<i>Tabebuia serratifolia</i>



Árboles y arbustos de hojas simples o palmeadas, con 3 a 7 folíolos, enteros o aserrados. Flores con panículas terminales, con el cáliz acampanado, con 3-5 lóbulos.

Corola tubular acampanada de 5 lóbulos. Fruto en cápsula alargada, dehiscentes, con semillas aladas. Comprenden alrededor de 100 especies nativas de América Central, Antillas y Sudamérica⁸.

Además de las especies anteriormente mencionadas, en este trabajo se ensayaron extractos y productos puros obtenidos a partir de especies vegetales, también originarias de la Amazonía Peruana, proporcionadas por el Dr. Wilfredo Ruíz Mesia, Docente de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana⁹.

Geissospermum reticulatum

Se recolectó en el CRI-IIAP - Puerto Maldonado (Departamento de Madre de Dios), a 280 metros sobre el nivel del mar. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, con el código N° 46008.

⁸ <http://www.siamazonia.org.pe/publicaciones/2003>

⁹ Ruíz, W. 2008. Alcaloides indólicos antiparasitarios de especies de la Amazonía peruana. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. Tenerife.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Maganoliopsida
Orden:	Apocinales
Familia:	Apocinaceae
Género:	<i>Geissospermum</i>
Especie:	<i>Geissospermum reticulatum</i>



Aspidosperma desmanthum

Se recolectó en la estación biológica de Allpahuayo Mishana, en el Km 27 de la Carretera Iquitos-Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, en Junio de 2003. La muestra fue autenticada por el Ing. Juan Ruiz Macedo y una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 034138.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Maganoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Apocinaceae
Género:	<i>Aspidosperma</i>
Especie:	<i>Aspidosperma desmanthum</i>



Aspidosperma spruceanum

Se recolectó en el Arboretum el Huayo de Puerto Almendra, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, en Febrero de 2005. Una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 034315.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Maganoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Apocinaceae
Género:	<i>Aspidosperma</i>
Especie:	<i>Aspidosperma spruceanum</i>



Árbol de 20 a 45 m de altura¹⁰, con hojas oblongas de entre 8 y 20 cm de largo, y de 3.5 a 6 cm de ancho; fuertemente membranosas, agudas, obtusas o redondeadas en la base. Pecíolo de 1.5 a 4 cm de largo. En la Amazonía Peruana es conocida como remocaspi de bajeal y quilloborbon; en la Amazonía Brasileña como pumaquiro, carapanauba, maparana;¹¹ y en Costa Rica se la conoce como amargo¹⁰. Esta especie se encuentra en bosques tropicales húmedos; es un componente frecuente de los bosques costeros de Costa Rica. Es conocida en Belice, Panamá, Colombia, Bolivia, Brasil y Perú¹⁰.

Aspidosperma schultesii

Se recolectó en la estación biológica de Allpahuayo Mishana, en el Km 27 de la Carretera Iquitos-Nauta, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, en Junio de 2003. Fue autenticada por el Ing. Juan Ruiz Macedo, y una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 035169.

¹⁰ Morales, J. F. 2005. Studies in the neotropical Apocynaceae XIX: the family Apocynaceae (Rauvolfioideae, Apocynoidae) in Costa Rica. Darwiniana. 43, 90-191.

¹¹ Duke, J. A.; Vásquez, R. 1994. "Amazonian ethnobotanical dictionary". CRS Press, Boca Ratón, Florida USA. 1-215.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Maganoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Apocinaceae
Género:	<i>Aspidosperma</i>
Especie:	<i>Aspidosperma schultesii</i>



Aspidosperma rigidum

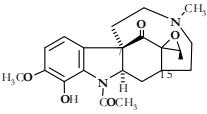
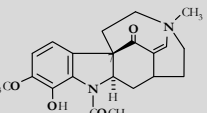
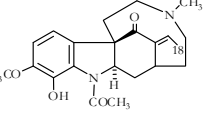
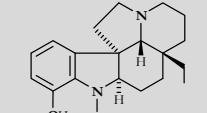
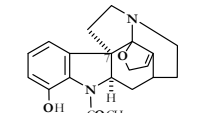
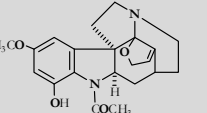
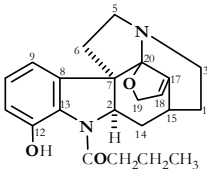
Se recolectó en el lago de Pañacocha, Distrito de San Juan Bautista, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a 12 km. de la ciudad de Iquitos en noviembre del 2001. Fue autenticada por el Ing. Juan Ruiz Macedo, y una muestra de la planta se encuentra depositada en el Herbarium Amazonense de la Facultad de Biología de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con el código N° 034316.

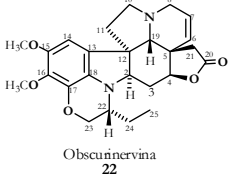
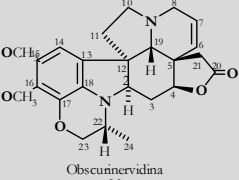
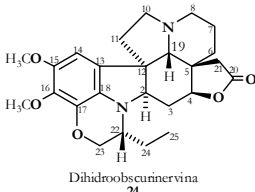
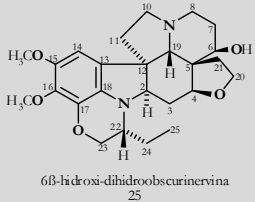
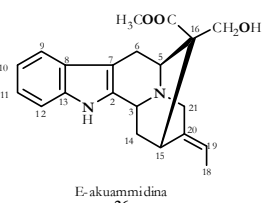
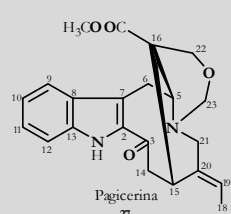
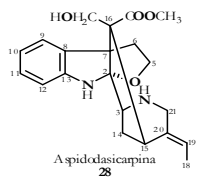
Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliofita
Clase:	Maganoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Apocinaceae
Género:	<i>Aspidosperma</i>
Especie:	<i>Aspidosperma rigidum</i>

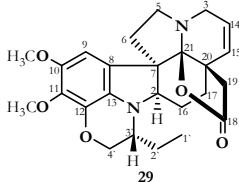
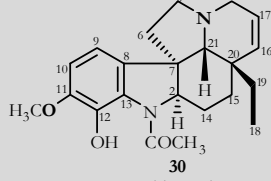
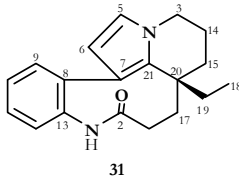
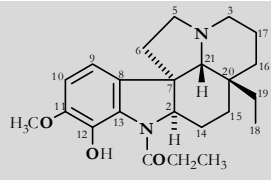
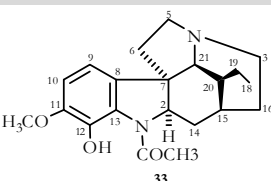
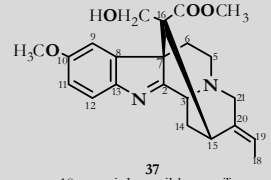
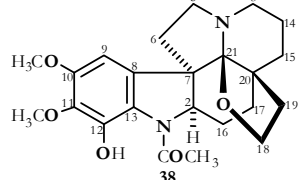


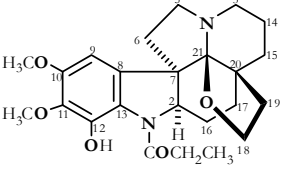
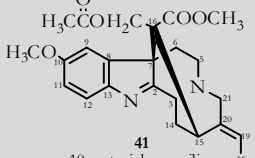
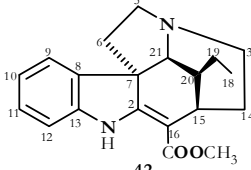
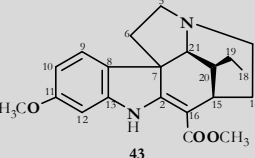
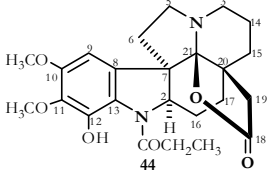
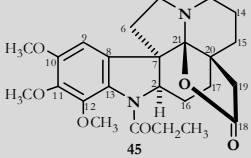
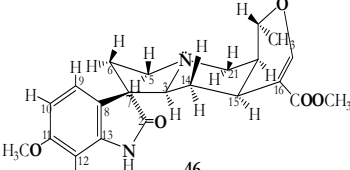
Árbol grande, con hojas alternas, con latex rojo o naranja, flores pequeñas y blancas, frutos con folículos leñosos usualmente redondeados y comprimidos. Semillas ovaladas.

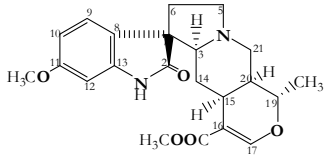
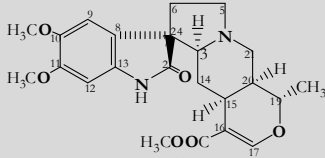
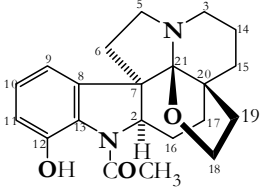
Tabla 1. Productos ensayados de las especies estudiadas

Especie	Compuesto	Parte de la planta
<i>Geissospermum reticulatum</i>	 Geissosreticulina 12	Hojas y Corteza
	 (Z) 10-desmetoxi-12-hidroxi-geissosvellina 13	Hojas y Corteza
	 (E) 10-desmetoxi-12-hidroxi-geissosvellina 14	Hojas y Corteza
	 12-hidroxi-N-acetilapidospermidina 15	Hojas y Corteza
	 Geissospermidina 16	Hojas y Corteza
	 10-metoxi-geissospermidina 17	Hojas y Corteza
	 N-desacetil-N-butanoilgeissospermidina 18	Hojas y Corteza

Especie	Compuesto	Parte de la planta
<i>Aspidosperma desmanthum</i>	 <p>Obscurinervina 22</p>	Hojas
	 <p>Obscurinervidina 23</p>	Hojas
	 <p>Dihydroobscurinervina 24</p>	Hojas
	 <p>6β-hidroxi-dihydroobscurinervina 25</p>	Hojas
	 <p>E-akuamidina 26</p>	Corteza
	 <p>Pagicerina 27</p>	Corteza
	 <p>Aspidolasicarpina 28</p>	Corteza

Especie	Compuesto	Parte de la planta
	 <p>29 14,15-dehidroalalaina</p>	Corteza
	 <p>30 Aspidocarpina</p>	Corteza de la raíz
	 <p>31 Rhazinilam</p>	Corteza de la raíz
	 <p>32 Aspidolimina</p>	Corteza de la raíz
	 <p>33 19,29-dihidro-11-metoxi-(+)-limatrina</p>	Corteza de la raíz
<i>Aspidosperma spruceanum</i>	 <p>37 10-metoxi-desacetilakammilina</p>	Corteza
	 <p>38 N-acetil-N-despropionilaspidoalbina</p>	Corteza

Especie	Compuesto	Parte de la planta
	 <p>39 Aspidobina</p>	Corteza de la raíz
	 <p>41 10-metoxikuammilina</p>	Corteza de la raíz
	 <p>42 Tubotaiwina</p>	Corteza de la raíz
	 <p>43 11-metoxitubotaiwina</p>	Corteza de la raíz
<i>Aspidosperma schultesii</i>	 <p>44 18-oxo-aspidobina</p>	Corteza
<i>Aspidosperma rigidum</i>	 <p>45 (-)-18-oxo-o-metilaspidoalbina</p>	Corteza
	 <p>46 Caboxina A</p>	Hojas

Especie	Compuesto	Parte de la planta
	 <p style="text-align: center;">47 Caboxina B</p>	Hojas
	 <p style="text-align: center;">49 Carapanaubina</p>	Hojas y Corteza
	 <p style="text-align: center;">51 Haplocidina</p>	Corteza

1.2. Parásitos

1.2.1. *Leishmania infantum*

Para realizar los ensayos de actividad leishmanicida se empleó la cepa PB75 de *Leishmania infantum*, procedente del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.



Las formas promastigotes se mantienen a 28°C en cultivo axénico, empleando medio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (30 minutos a 56°C). Para mantener los cultivos en fase de crecimiento exponencial (factor necesario para realizar los ensayos de actividad biológica), se realizan pases semanales con un inóculo de 1×10^6 promastigotes/ml.

Se utiliza medio de cultivo RPMI sin rojo fenol debido a que éste produce interferencias a la hora de hacer la lectura de resultados con MTT¹².

La conservación de la cepa se lleva a cabo por criopreservación en N₂ líquido, centrifugando la suspensión de promastigotes a 1.500 rpm durante 10 minutos y resuspendiendo el sedimento obtenido en medio de cultivo con un 5% de DMSO.

1.2.2. *Trypanosoma cruzi*

Para realizar los ensayos de actividad tripanocida se empleó la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, aislada por el Profesor Pedreira de Freitas en 1950 de un caso humano agudo procedente de Marilia (Sao Paulo, Brasil). Caracterizada morfológicamente por Silva y Nussenzweig (1953), fue donada por el Profesor Dr. Miguel Belda Neto de la Universidad de Araraquara (Brasil) en el año 1985.

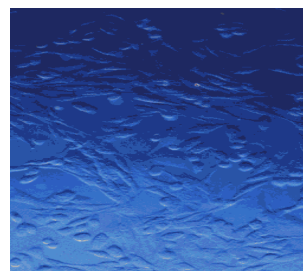


Las formas epimastigotes de *T. cruzi* se mantienen a 28°C en cultivo axénico, empleando medio de cultivo LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con suero bovino fetal inactivado (30 minutos a 56°C) al 10%.

Para mantener los cultivos en fase de crecimiento exponencial se realizan pases semanales con un inoculo de 2×10^6 epimastigotes/ml. La criopreservación se realiza siguiendo el mismo protocolo empleado para *L. infantum*.

1.3. Células de ovario de hámster chino (CHO)

Para los ensayos de citotoxicidad inespecífica se utilizaron células de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) pertenecientes a la línea celular CHO, de morfología epitelial, procedente de la ECACC (European Collection of Cell Cultures); ref. 85050302.



Se mantienen a 37°C en medio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, 1% de L- glutamina 200mM, y 1% de antibiótico (10.000 U penicilina/ml y 10.000 µg estreptomicina/ml; Bio Whitaker Europe).

El cultivo se realiza en frascos Roux de 25 cm² incubados a 37°C en atmósfera enriquecida con un 5% de CO₂. Las células crecen adheridas en monocapa, siendo redondeadas al principio y más tarde alargadas.

Cuando llegan a estar confluentes se despegan del frasco de crecimiento celular para realizar una siembra controlada en nuevos frascos.

Para la conservación de la línea, las células se mantienen congeladas en N₂ líquido, habiéndolas previamente centrifugado (1.000 rpm durante 5 minutos) resuspendiendo el sedimento en 1 ml de SBF con DMSO al 9%.

¹²Mosmann, T. 1983. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Method. 65, 55-63.

1.4. Insectos diana

- **Insectos masticadores**

Spodoptera littoralis (rosquilla negra)¹³.

Filo: Arthropoda
 Clase: Insecta
 Orden: Lepidoptera
 Familia: Noctuidae
 Género: *Spodoptera*
 Especie: *Spodoptera littoralis*



La oruga es de color negruzco y se enrolla en espiral. Presenta seis estadios larvales y en su mayor desarrollo puede alcanzar de 3.5 a 4 cm de longitud. Los adultos se caracterizan por llevar dibujado en las alas anteriores un 4 en la derecha y su simétrico en la izquierda.

Leptinotarsa decemlineata (escarabajo de la patata)

Filo: Arthropoda
 Clase: Insecta
 Orden: Coleoptera
 Familia: Chrysomelidae
 Género: *Leptinotarsa*
 Especie: *Leptinotarsa decemlineata*



Los insectos adultos miden de 9 a 12 mm de longitud, tienen forma oval, convexa por encima y aplanada por debajo. Tienen cuatro estadios larvales. La larva es alargada y su tamaño varía desde 2 mm al eclosionar, hasta 10-14 mm en su mayor desarrollo.

¹³ Balachowsky, A. S. 1972. Entomologie Appliquee a L' Agriculture. Traité. Tome II. Lèpidopterès. Ed. Masson et Cie. 1050-1627.

▪ **Insectos chupadores**

Myzus persicae (pulgón verde del melocotonero)¹⁴.

Filo: Arthropoda
Clase: Insecta
Orden: Hemiptera
Familia: Aphididae
Género: *Myzus*
Especie: *Myzus persicae*



Es un pulgón de tamaño medio, mide de 1.2 a 2.3 mm de longitud. Las formas ápteras presentan color verde-amarillento, y entre verde y negro las formas aladas. El hospedador primario suele ser una planta del género *Prunus*, sobre todo *Prunus persica*, aunque es muy polífago y presenta más de cuarenta familias de hospedadores secundarios, muchas de ellas de elevado interés económico.

Rhopalosiphum padi (pulgón de la avena)¹⁴.

Filo: Arthropoda
Clase: Insecta
Orden: Homóptera
Familia: Aphididae
Género: *Rhopalosiphum*
Especie: *Rhopalosiphum padi*



Su tamaño varía entre 1.2 y 2.4 mm, su color va desde el verde al negro grisáceo, aunque generalmente es de color verde oliva. Igual que en el caso de *M. persicae*, el hospedador primario suele ser una planta del género *Prunus*, generalmente *Prunus padus*.

Prefiere las gramíneas, incluidos los cereales y las plantas de pasto. Se distribuye por todo el mundo.

¹⁴ Blackman, R. L., Eastop, V. T. 1984. Aphids on the world's crops. An identification guide. Ed. Wiley-Interscience. Chichester. U. K. 466.

2. Medios de cultivo, soluciones, reactivos y fármacos de referencia

2.1. Medios de cultivo

Medio LIT (Liver Infusion Tryptose)

Infusión de hígado	0.225 g
Triptosa	0.450 g
ClNa	0.360 g
Glucosa	0.180 g
KCl	0.036 g
Na ₂ HPO ₄	0.284 g
SBFi	10 ml
Hemina (25 mg/ml)	90 µl
Antibiótico	180 µl
(10.000 U penicilina/ml y 10.000 µg estreptomicina/ml)	
H ₂ O destilada	90 ml

Se mezclan todos los componentes, se ajusta el pH a 7.4 ± 2 con HCl 1N o NaOH 1N, se esteriliza por filtración.

Medio RPMI 1640 (sin rojo fenol)

RPMI en polvo (Sigma)	1.042 g
Hepes	0.500 g
CO ₃ HNa	0.200 g
SBFi	10 ml
Antibiótico	200 µl
(10.000 U penicilina/ml y 10.000 µg estreptomicina/ml)	
H ₂ O destilada	90 ml

Mezclar todos los componentes, ajustar el pH a 7.4 ± 2 con HCl 1N o NaOH 1N y esterilizar por filtración.

Medio RPMI 1640 (con rojo fenol)

RPMI 1640 (Sigma)	44 ml
SBF	5 ml
L-glutamina	500µl
Antibiótico.....	500 µl

(10.000 U penicilina/ml y 10.000 µg estreptomicina/ml)

Todos los componentes del medio se mezclan dentro de una campana de flujo laminar en condiciones estériles.

2.2. Soluciones y reactivos

MYFb (tintura de yodo)

Yodo metálico	5g
Yoduro Potásico	10 g
Agua destilada	100 ml

Mezclar los componentes y filtrar.

PBS (solución salina fosfatada)

ClNa.....	8.00 g
PO ₄ HNa ₂	1.21 g
PO ₄ H ₂ K	0.34 g
Agua destilada	1000 ml

Solución de MTT-PMS (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio)

PBS	5 ml
PMS (Sigma)	1.117 mg
MTT (Sigma).....	12.5 mg

Solución de MTT (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazolio)

MTT (Sigma)	5 mg
PBS	1ml

Solución SDS

SDS (Duchefa Biochemie)	10 g
HCl	31.5 μ l
Agua destilada	100 ml

Solución de Hemina

Hemina (Sigma)	25 mg
NaOH 1N	1 ml

Azúl Tripan

Azúl Tripan 0.4%	10 ml
PBS	90 ml

Oleum

H ₂ O	15ml
CH ₃ COOH	80ml
H ₂ SO ₄	5ml

Dragendorff**Solución A**

Nitrato Básico de Bismuto	0.85 g
Ácido Acético	10 ml
Agua Destilada	40 ml.

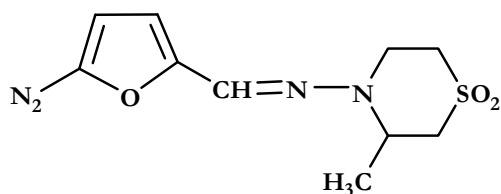
Solución B

KI	8 g
Agua Destilada	20 ml

Se mezclan 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B con 20 ml de ácido acético glacial y se completa con agua destilada hasta 100 ml.

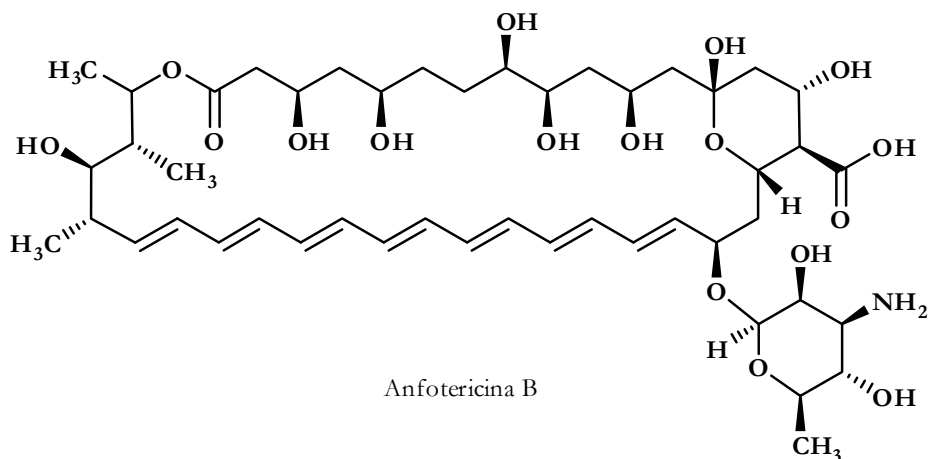
2.3. Fármacos de referencia

El fármaco de referencia utilizado en los ensayos frente a *Trypanosoma cruzi* es **Nifurtimox**. (Lampit, BAYER 2502), que presenta una ED₅₀= (2.3 µg/ml).



Nifurtimox

El fármaco de referencia utilizado en los ensayos de actividad frente a *Leishmania infantum* es **Anfotericina B** (GIBCO).



Anfotericina B

Antifúngico con importante actividad leishmanicida, es usado desde 1984 para el tratamiento de la leishmaniasis, tanto cutánea como visceral¹⁵. Se ha observado que la actividad de este antibiótico presenta variaciones en función de la especie y el modelo utilizado.

¹⁵ Croft, S. L.; Davidson, R. N.; Thornton, E. A. 1991. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. J. Antimicrob. Chemoth. (Suppl B). 28, 111-118.

Actividad de la Anfotericina B sobre Leishmania sp.	
Especie	Actividad (DE ₅₀)
<i>L. infantum</i>	0.014 ±0.005 μM ¹⁶
<i>L. amazonensis</i>	0.016 ±0.005 μM ¹⁵
<i>L. mexicana</i>	0.038 ±0.005 μM ¹⁷

DE₅₀: dosis capaz de producir un 50% de actividad leishmanicida.

3. Técnicas generales

3.1. Técnicas instrumentales

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se realizaron en espectrómetros Bruker Advance y AMX-500, a 400 y 500 MHz para el ^1H , y a 100 y 125 MHz para el ^{13}C .

Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz).

Como disolvente se usó el deuterocloroformo (CDCl_3) usando como referencia interna TMS. CHCl_3 , mientras no se indique lo contrario.

Los experimentos de 2D con correlación homo y heteronuclear COSY, HSQC, HMBC y NOESY, fueron realizados utilizando el software estándar suministrado por la firma Bruker.

Espectros de masas (EM)

Los espectros de masas de alta y de baja resolución se realizaron en un espectrómetro Micromasas, modelo Autospec.

La técnica empleada fue impacto electrónico (IE) con un potencial de ionización de 70 eV y la fuente se mantuvo a una temperatura de 230°C.

Las muestras se introdujeron directamente mediante una sonda de sólidos. Para cada compuesto se han indicado solamente los picos más significativos estructuralmente y/o los de mayor intensidad relativa.

Actividad óptica

La determinación de las actividades ópticas se realizó en un polarímetro Perkin Elmer modelo 343 usando la línea D de una lámpara de sodio.

Los productos se disolvieron en CHCl_3 y la medida se realizó en una célula de 1 ml de volumen y 1 dm de longitud. La concentración se expresa g/100 ml (**c**) de disolución.

$$[\alpha]_{d=20} = \alpha \times 100 / l \times c$$

Puntos de fusión

Se determinaron en un aparato tipo Kofler de la firma Reichert-Thermovar y están sin corregir.

Espectofotometría

Para medir tanto la viabilidad de las líneas celulares como la de los parásitos se utilizó un espectofotómetro SLT 340 ATTC (Microtiter Plate Spectrophotometer). En el caso de los parásitos la longitud de onda utilizada es de 570 nm, mientras que para las células la lectura se realiza a dos longitudes de onda, 570 y 620 nm (absorbancia de referencia), obteniéndose los datos de la diferencia de absorbancia a ambas longitudes de onda (570-620).

3.2. Técnicas cromatográficas

Cromatografía en capa fina (CCF)

Se utilizaron placas de gel de sílice de 0.20 mm de espesor de las casas Macherey-Nagel y Merck. Las placas se revelaron por pulverización con una solución de ácido sulfúrico (4%) y ácido acético (80%) en agua destilada, y a continuación se calentaron a una temperatura de 120°C.

Cromatografía líquida de vacío (VLC)

Para este tipo de cromatografía se utilizó gel de sílice de tamaño de partícula 0.015-0.040 mm (Merck). Las dimensiones de las distintas columnas de vidrio utilizadas dependieron del peso del extracto y/o fracción de partida, según lo recomendado por Coll y Bowden (1986)¹⁶. La muestra se coloca en forma de “cabeza de columna”, absorbida en gel de sílice más gruesa de 0.063-0.200 mm de diámetro. La elución se realiza en gradientes de polaridad creciente y los disolventes empleados fueron mezclas de n-hexano (n-Hex), acetato de etilo (EtOAc), diclorometano (CH₂Cl₂) y/o metanol (MeOH).

¹⁶ Coll, C. J., Bowden, F. D. 1986. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. J. Nat. Prod. 49, 934-936.

Cromatografía en columna (CC)

Las columnas cromatográficas de gel de sílice “secas” se prepararon de la siguiente forma: se hace vacío en la parte inferior de la columna y al mismo tiempo, por el extremo superior, se introduce lentamente la gel de sílice de grano fino (0.2-0.05 mm) o de grano más fino (0.040-0.015 mm). Las mezclas a separar se colocaron como “cabeza” mezclando la muestra con gel de sílice. Seguidamente fueron eluidas con mezclas de polaridad creciente empleando n-Hex/EtOAc/MeOH. Los componentes de las diferentes fracciones fueron detectados por la técnica de CCF.

Cromatografía de exclusión molecular (SPH)

Para este tipo de cromatografía se usó como soporte Sephadex LH-20 (Farmacia Fine Chemicals) para la fase estacionaria y las columnas se montaron en metanol. Para la fase móvil se emplearon sistemas n-Hex: CHCl₂: MeOH en distintas proporciones.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Las cromatografías líquidas de alta presión se realizaron en un equipo Beckman Coulter 125P, acoplado a un detector de fotodiodo modelo 168, controlado por el programa 32-Karat. Las muestras se filtraron previamente con filtros de 0,45 µm de tamaño de poro y los disolventes empleados fueron de grado HPLC. Las separaciones se llevaron a cabo sobre columnas de fase normal, de sílica de 20 mm x 250 mm (preparativa) de 10 µm de tamaño de partícula y Ultrasphere sílica de 10.0 mm x 250 mm (semipreparativa) de 5 µm de tamaño de partícula, dependiendo de la cantidad de muestra. Se utilizaron también columnas de fase reversa preparativas, de Interstil ODS de 20 mm x 250 mm y 10 µ de tamaño de partícula.

Cromatografía de gases-masa (GC-MS)

Se han realizado utilizando un cromatógrafo de gases Agilent modelo 5973N acoplado a un detector de masas con fuente de ionización por impacto electrónico (IE) a 70eV. Con este equipo se ha utilizado una columna capilar HP-1 (fase ligada de metil silicona) de Hewlett-Packard de 25 m de largo, 200 µm de diámetro interno y 0.2 µm de

espesor de fase. Las condiciones utilizadas han sido: split (30:1), temperatura del inyector 260°C, temperatura de la columna 70°C, calentando hasta 270°C a 4°C/min.

Los espectros de masas y el tiempo de retención han sido utilizados para identificar los compuestos por comparación con los encontrados en la base de datos Wiley (Wiley 275Mass Spectra Database, 2001), mientras que para la cuantificación se han utilizado los porcentajes del área de los picos obtenidos en los cromatogramas.

Cromatografía capa fina preparativa (CCFP)

La separación de productos con este tipo de cromatografía se llevó a cabo con cromatoplacas de alúmina, en base de vidrio (20 x 20 cm y 0.25 mm de espesor) art. 105715 y alúmina art. 5713 (Merck). Se extienden de 20 a 25 mg de muestra por placa en el punto de aplicación. El seguimiento de la cromatografía se realizó utilizando una lámpara ultravioleta.

4. Ensayos de actividad biológica

4.1. Ensayos de actividad antiparasitaria

Los ensayos de actividad sobre *L. infantum* y *T. cruzi* permiten determinar la capacidad citostática o citocida de un producto, comparando el crecimiento de un cultivo en fase de crecimiento exponencial tratado, con respecto a un control sin tratar.

Aplicando la técnica de reducción del MTT se determina la densidad de parásitos en cada pocillo mediante la lectura de la absorbancia a 570 nm, lo cual permitirá el cálculo de la actividad anti-parasitaria (AP).

$$\%AP=100-[(Ap-Ab)/(Ac-Ab)\times 100]$$

Ap: absorbancia del problema

Ab: absorbancia del blanco

Ac: absorbancia del control

Como fármacos de referencia se han utilizado anfotericina B y nifurtimox para las pruebas con *L. infantum* y *T. cruzi* respectivamente. En el caso de que los productos en estudio resulten activos, se realizan ensayos a diferentes concentraciones con el fin de determinar la relación dosis–respuesta. Esto permite determinar la **Dosis Eficaz 50** (dosis que produce una mortalidad del 50%) mediante regresión logarítmica con el programa STATGRAPHICS plus5.1.

Ensayos de actividad frente a *Leishmania infantum*

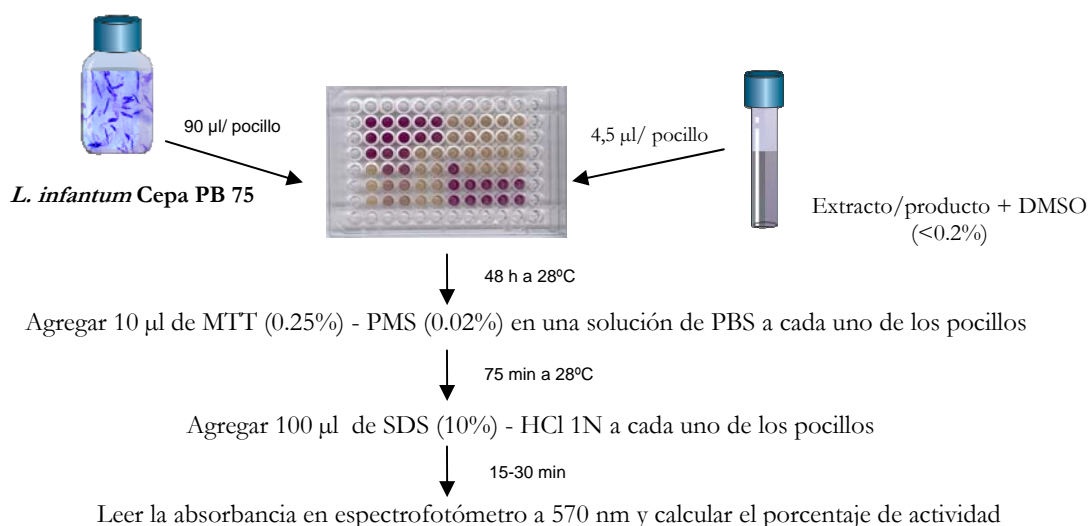
Se prepara un cultivo en masa con un inóculo de 1×10^6 promastigotes/ml a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (día cuatro de cultivo), en un volumen final de 20 ml.

Al tercer día de la preparación del cultivo en masa está listo para el ensayo de actividad y, en condiciones estériles, se reparte en una placa de 96 pocillos, a razón de 90 μ l/pocillo, teniendo en cuenta tres tipos de pocillo: **blancos**, que contienen medio de cultivo sin parásitos; **controles**, que contienen el cultivo en masa sin producto; y los pocillos **problema**, que contienen cultivo en masa y producto a ensayar. Por último se añaden los productos o extractos a ensayar a razón de 4.5 μ l/pocillo y se incuba durante 48 horas a 28°C.

Pasadas 24 horas de incubación, la placa se observa al microscopio invertido, para controlar que el ensayo se está produciendo de forma adecuada y que no hay ningún tipo de contaminación.

Completadas las 48 horas de incubación, se añaden 10 μ l de MTT/PMS a cada pocillo y se incuba 75 minutos más en las mismas condiciones antes mencionadas, para que tenga lugar la reacción de reducción del MTT. Transcurrido ese tiempo se añade 100 μ l de SDS para disolver los cristales de formazán obtenidos como consecuencia de la reducción del MTT. Una vez que se han disuelto los cristales (15-30 min) se procede a la lectura en espectrofotómetro a 570 nm. El fármaco de referencia, que en este caso es anfotericina B, se ensaya a tres concentraciones: 1, 0.1 y 0.01 μ g/m. Cada producto se ensaya por cuadruplicado.

ESQUEMA DEL ENSAYO FRENTE A *Leishmania infantum*



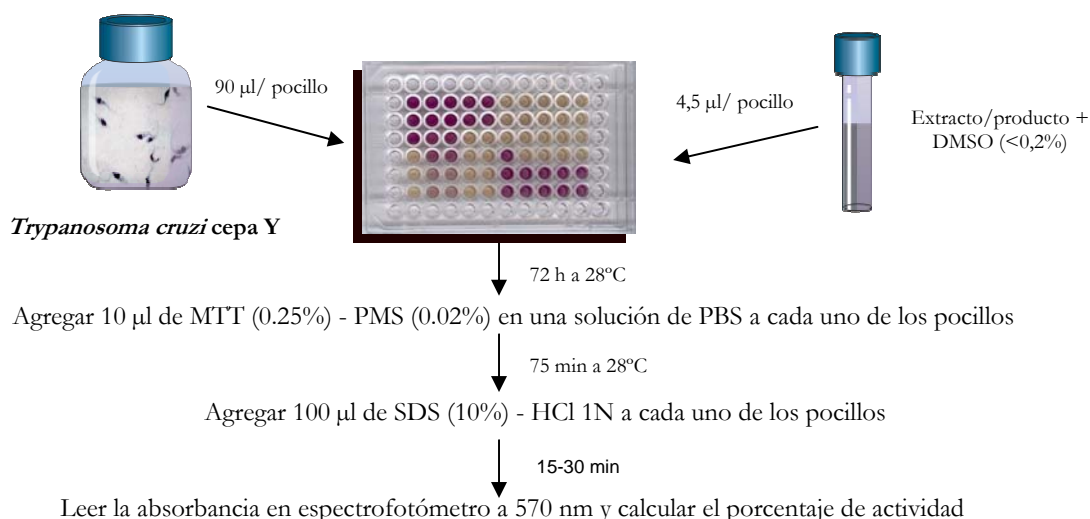
Ensayos de actividad frente a *Trypanosoma cruzi*

Se prepara un cultivo en masa con un inóculo inicial de 2×10^6 epimastigotes/ml, a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial, en un volumen final de 20 ml.

Se sembraran tantos frascos como sean necesarios y a partir de este momento se procederá del mismo modo que en caso de *L. infantum*, con una pequeña variación en el tiempo de incubación, que en este caso será de 72 horas, una vez se hayan agregado los productos o extractos a ensayar. El producto de referencia utilizado es el Nifurtimox, que se ensaya a tres concentraciones: 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, repitiendo por cuadruplicado cada una de ellas.

Los extractos se ensayan a concentraciones de 800, 400 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y los productos puros a 100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los productos que resulten activos se ensayarán a concentraciones intermedias. En todos los ensayos se realizan cuatro repeticiones por concentración.

ESQUEMA DEL ENSAYO FRENTE A *Trypanosoma cruzi*



4.2. Ensayos de citotoxicidad

Permiten determinar la citotoxicidad inespecífica de un producto mediante la comparación del crecimiento celular en pocillos tratados y sin tratar tras 48 horas de contacto. Se llevan a cabo con la línea celular CHO, utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos, donde se evalúa la viabilidad celular mediante el método de reducción del MTT según el protocolo de Mosmann (1983)¹².

Las células, casi confluentes, se despegan del frasco de cultivo utilizando 1 ml de medio y un raspador estéril; se toman 10 μ l de la suspensión celular y se cuentan las células en cámara de Neubauer, tiñéndolas previamente con azul tripán (dilución 1:2). Se prepara una suspensión celular de 10.000 células/100 μ l en medio de cultivo RPMI, que se reparte a razón de 100 μ l en cada pocillo, excepto en los pocillos denominados blancos. Se incuba la placa durante 24 horas a 37°C en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂ para que las células se peguen en el fondo.

A las 24 horas de incubación, las placas se observan al microscopio para verificar que no haya ningún tipo de contaminación.

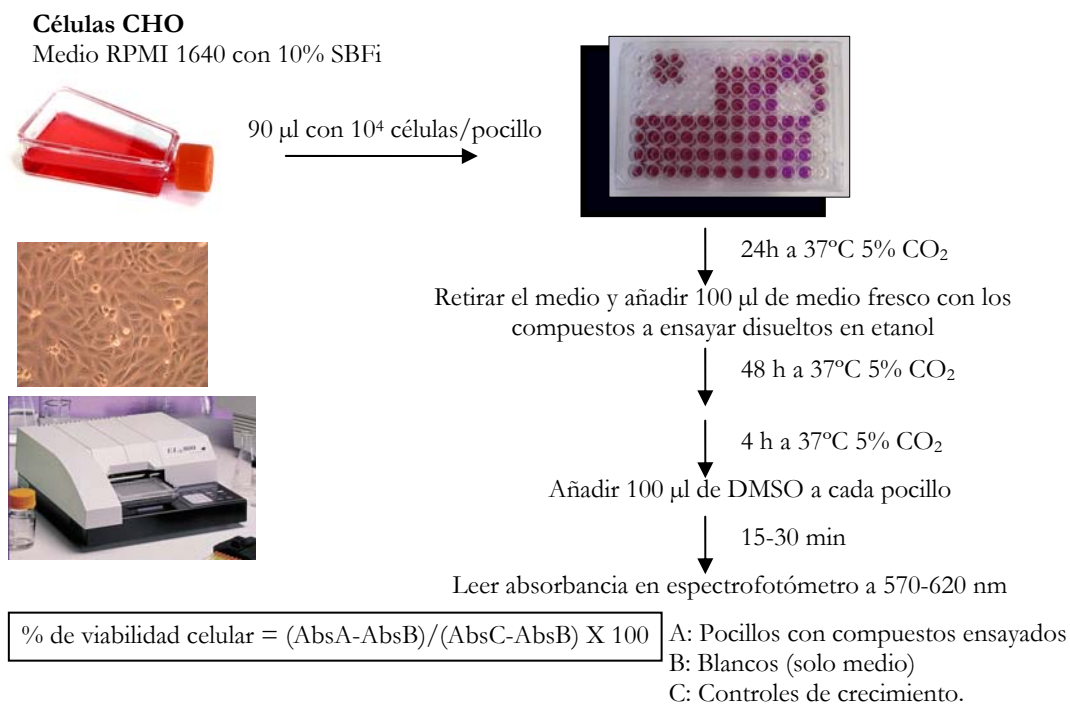
Pasadas las 24 horas de incubación, se aspira el medio de cultivo dejando las células adheridas al fondo de cada uno de los pocillos y se añaden 100 μ l de medio de cultivo en los blancos (no contienen células adheridas) y controles (contienen células adheridas); y 100 μ l de medio de cultivo conteniendo los productos a ensayar en los pocillos problema. Se incuba durante 48 horas en las condiciones antes mencionadas.

Transcurridas las 48 horas de incubación, se añaden 10 μ l de una solución de 5 mg/ml de MTT en PBS a cada pocillo y se incuba 4 horas a 37°C en una atmósfera enriquecida con 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación, se aspira el sobrenadante de cada pocillo y se añaden 100 μ l de DMSO a cada uno.

La placa se lee utilizando el espectrofotómetro a 570 y 620 nm. Los datos obtenidos resultan de la diferencia entre ambas longitudes de onda y nos van a permitir calcular el porcentaje de viabilidad celular para determinar la **DE**₅₀ mediante regresión logarítmica (STATGRAPHICS Plus, versión 5.1).

Las concentraciones ensayadas frente a esta línea celular son las mismas que se ensayan frente a los parásitos, tanto en el caso de productos puros como en el caso de extractos.

ESQUEMA DEL ENSAYO DE CITOTOXICIDAD



4.3. Ensayos de actividad en insectos

Se llevaron a cabo bioensayos de elección con el fin de determinar la capacidad repelente o antialimentaria de los productos y/o extractos

Ensayos con *Spodoptera littoralis* y *Leptinotarsa decemlineata*

Con este tipo de bioensayos se pretende analizar la capacidad repelente de un producto a corto plazo. Se observa la preferencia de larvas del sexto estadio (L6) de *S. littoralis* y/o adultos de *L. decemlineata* por discos de hojas (tratados y control) de la planta huésped, *C. annuum* y *S. tuberosum* respectivamente, colocados en las misma placa petri.

Las superficies de los discos (1 cm²) son tratadas con la sustancia a probar. Cada tratamiento consiste en 5 placas petri con 2 insectos cada una y dos repeticiones por 100

ensayo, de acuerdo con la metodología descrita por González Coloma *et al* (1995; 1996)^{17,18}. Una vez consumido un 75% de la superficie de los discos control, las superficies foliares no consumidas (control y tratamiento) se miden de acuerdo con la metodología de Escoubas *et al* (1993)¹⁹.



L. decemlineata



S. littoralis

Posteriormente se calcula el índice de consumo, %FR²⁰, considerándose que un extracto es activo cuando su FR es >75%.

T: consumo del tratamiento

$$FR = 1 - (T/C) \times 100\%$$

C: consumo del control

Ensayos con áfidos (*Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*)

En el caso de los áfidos, este mismo tipo de ensayo determina el efecto de los compuestos sobre el asentamiento de las diferentes especies de pulgones. En cada experimento se utilizaron cajas de plástico de 3 x 3 x 1.5 cm tapadas y con ventilación, colocándose en la tapa una capa muy fina de agar (2.5%).

¹⁷ González-Coloma, A.; Reina, M.; Cabrera, R.; Castañera, P.; Gutiérrez, C. 1995. Antifeedant and toxic effects of sesquiterpenes from *Senecio palmensis* to Colorado potato beetle. J. Chem. Ecol. 21, 1255-1270.

¹⁸ González-Coloma, A.; Terrero, D.; Perales, A.; Escobas, P.; Fraga, B. M. 1996. Insect antifeedant ryanodane diterpenes from *Persea indica*. J. Agric. Food. Chem. 44, 296-300.

¹⁹ Escoubas, P.; Lajide, L.; Mizutni, J. 1993. An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. Entomol. Exp. Appl. 66, 99-108.

²⁰ Bentley, M. D.; Stoddard, W. F.; Zalkow, L. H. 1984. Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 77, 393-397.

Con *M. persicae* se emplearon medios discos de hojas de *C. annuum*²¹, mientras que con *R. padi* se utilizaron dos fragmentos de hojas de *H. vulgare*, de 1 cm² de superficie cada uno, por caja.

Cada medio disco o fragmento de hoja se trató con una solución del extracto a ensayar (tratamiento) en acetona, y la otra mitad o fragmento con el disolvente (control).

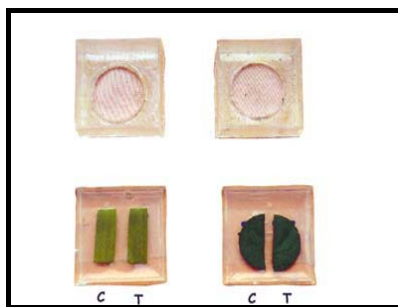
Se aplican en 20 cajas con 10 insectos cada una y se incuban a 22 ± 1°C y un fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad) en posición invertida.

Después de 24 h se cuentan los pulgones asentados en el tratamiento y en el control, calculándose el índice de inhibición del asentamiento, %SI, para cada tratamiento, mediante la siguiente formula:

$$\%SI = [1 - (\%T / \%C)] \times 100$$

%T: porcentaje de pulgones sobre la superficie tratada

%C: porcentaje de pulgones sobre la superficie control



Bioensayos de elección con áfidos en plantas huésped.

Cebada (Izq.) y pimiento (dcha.).

C = Control, T = Tratamiento.

Los extractos crudos se ensayan a una dosis inicial de 100 µg/cm² y los productos puros a 50 µg/cm².²² En nuestro caso solo se ensayaron extractos crudos.

²¹ Gutiérrez, C.; Fereres, A.; Reina, M.; Cabrera, R.; González-Coloma, A. 1997. Behavioral and sub-lethal effects of structurally-related lower terpenes on *Myzus persicae*. J. Chem. Ecol. 23, 1641-1650.

²² Kubo, I. 1991. Screening techniques for plant-insect interactions. In: Methods in Plant. Assays for Bioactivity (K. Hostettman ed.) Academic. Press. New York. Biochemistry. 6, 179-193.

5. Fraccionamiento químico biodirigido

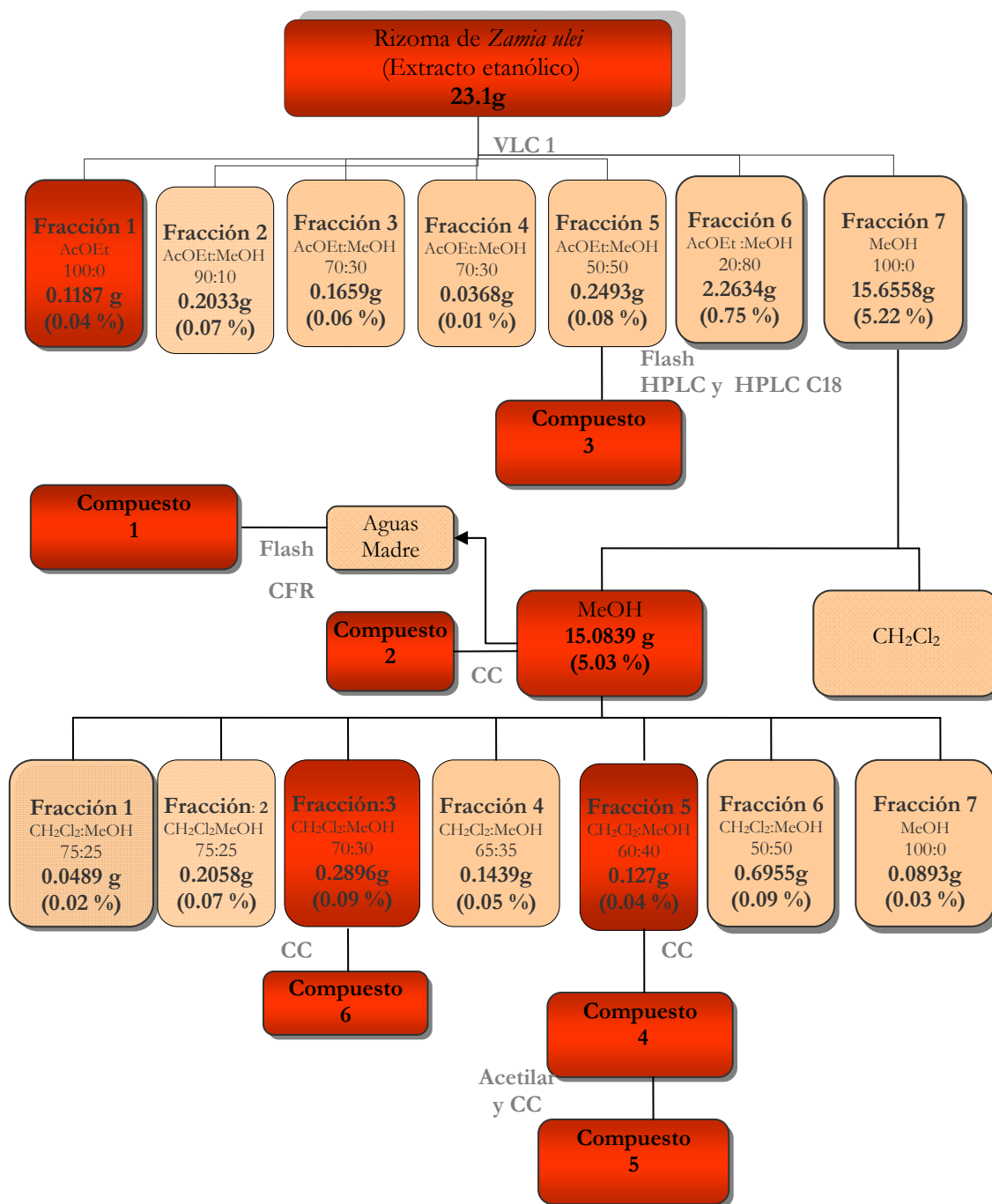
Después de obtener extracto crudo, se procede a comprobar su actividad mediante los bioensayos anteriormente descritos. Determinados los tipos y niveles de actividad del extracto frente a las distintas líneas parasitarias y especies de insectos diana, se realiza su fraccionamiento químico mediante diferentes técnicas cromatográficas: cromatografía líquida de vacío (VLC), cromatografía en columna de gravedad (CC), cromatografía de exclusión molecular (SPH), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía en capa fina analítica (TLC) y preparativa (PTLC).

5.1. *Zamia ulei*

5.1.1. Obtención del extracto crudo

Trescientos gramos de rizoma molido y seco de *Zamia ulei* procedentes de la reserva Allpahuayo-Mishana (Iquitos-Perú) fueron extraídos mediante maceración con etanol durante 48 - 72 horas a temperatura ambiente. El residuo obtenido al evaporar el disolvente a vacío pesó 23.1 g (rendimiento 7.7 %).

5.1.2. Fraccionamiento



El fraccionamiento se realizó a partir de 23.1 g de extracto etanólico de rizoma de *Zamia ulei*, mediante una VLC [8cm (alto) x 10 cm (diámetro)], eluyendo con n-Hex:AcOEt, con un gradiente de polaridad creciente, obteniendo 7 fracciones; de las cuales solo describiremos las más relevantes.

VLC 1

Fracción 1: (0.1197 g)

Esta fracción se obtuvo a partir de Acetato de Etilo en una proporción de 100:0 encontrándose ftalato.

Fracciones 3 y 4: (0.1659 g y 0.0368 g)

Estas fracciones son el resultado de una mezcla de AcOEt:MeOH en una proporción 70:30, obteniéndose ftalato y β -sitosterol.

Fracción 5: (0.2493 g)

Esta fracción se obtuvo utilizando AcOEt:MeOH en una proporción 50:50. A partir de ella se realizó una cromatografía en columna flash eluida con una mezcla de n-Hex:AcOEt con una polaridad inicial de 95:5, obteniendo nueve fracciones, continuando el fraccionamiento con la fracción seis.

▪ **Fracción 6:** (0.0843 g)

Esta fracción se obtuvo de una mezcla de n-Hex:AcOEt en una proporción 85:15, a partir de la cual se hizo una cromatografía líquida de alta presión (HPLC), con una mezcla de n-Hex:AcOEt en una proporción 88:12, obteniendo cinco fracciones, de las cuales la fracción cinco resultó interesante y a partir de ella se hizo una cromatografía líquida de alta presión en fase reversa (HPLC C18) utilizando como eluyente una mezcla de ACN:H₂O al 5%, obteniendo el compuesto **8,11-nonadecadieno (3)**, (10.6 mg, 0.046%).

Fracción 7: (15.6558 g)

Esta fracción se obtuvo utilizando AcOEt:MeOH en una proporción 0:100. A partir de ella obtuvimos un precipitado (15.0839 g, 5.03 %) soluble en MeOH y otra parte más pequeña denominada agua madre, soluble en CH₂Cl₂.

Se realizó una cromatografía en columna, CC [25 cm (alto) x 7 cm (diámetro)], a partir de 1.6 g del precipitado obtenido de la fracción 7, eluida con una mezcla de polaridad creciente de CH₂Cl₂:MeOH, obteniendo 7 fracciones, considerando de interés las fracciones 3 y 5 descritas a continuación.

▪ **Fracción 3:** (0.2896 g.)

Esta fracción se obtuvo utilizando una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH 70:30, y tras una cromatografía en columna, CC, [12 cm (altura) x 5 cm (diámetro)], eluida con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH de polaridad creciente, se obtuvo el compuesto denominado **6C (6)**, (17.6 mg, 0.59 x 10⁻²%).

▪ **Fracción 5:** (0.127 g)

Esta fracción se obtuvo con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH en una proporción 60:40, a partir de la cual se hizo otra cromatografía en columna, CC, [12 cm (altura) x 5 cm (diámetro)] eluida con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH de polaridad creciente, y se obtuvo el compuesto **7E (4)** (38 mg, 0.013 %).

Compuesto 7E: (38 mg)

Este compuesto se obtuvo de una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH, en una proporción 80:20.

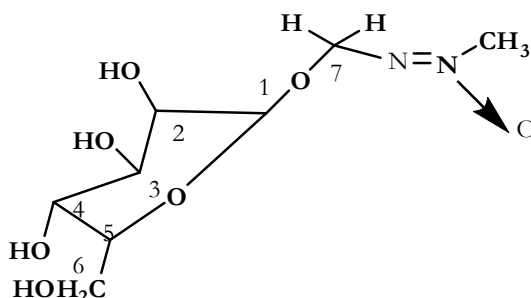
Acetilación del compuesto 7E. Compuesto 7E (24.5 mg), piridina (0.4 ml) y anhídrido acético (0.4 ml), se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12 horas, en agitación. El producto de reacción se cromatografió en gel de sílice de 0.20 mm (CH₂Cl₂: MeOH, 95:5), obteniéndose 47.1 mg, que se purificó mediante cromatografía

en columna, CC, [12 cm (altura) x 2.5 cm (diámetro)], eluido con CH_2Cl_2 , obteniendo el compuesto **7EA (5)**, (19.9 mg 0.66×10^{-2}).

De los 14 g restantes de la fracción 7 (VLC 1) se obtuvieron dos partes: una parte menos polar que se fraccionó mediante cromatografía en columna flash, eluida con una mezcla de CH_2Cl_2 :MeOH de polaridad creciente, obteniendo el compuesto denominado **cycasina (1)**, (40.6 mg, 0.014 %), y otra más polar que se fraccionó mediante cromatografía en columna de fase reversa (CFR), con una mezcla de MeOH: H_2O al 5%, obteniendo **Sacarosa (2)** (3.7 g, 16%).

5.1.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados

Cycasina (1)



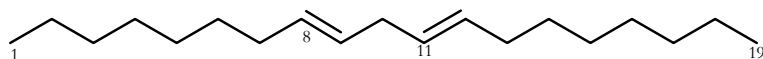
EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 238 [$\text{M}^+ - 15$] (9), 195 (17), 189 (5), 133 (5), 131 (6), 126 (8), 121 (9), 75 (23), 73 (20), 61 (100).

EM de alta resolución. Electrospray (ESI-MS) m/z : [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ 275.0855 calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7 \text{Na}$, [$\text{M} + \text{Na}$] $^+ = 275.0859$.

RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3): δ 4.06 (3 H, triplete no resuelto $J = 1.5$ Hz, =NO- CH_3), 5.05 y 5.15 (1 H cada una, dq, $J = 14.4$ y 1.6 Hz, O- CH_2 -N), 4.52 (1H, d, $J = 12.8$, H-1. protón anomérico), 3.84 y 3.64 (1H, cada una, dd, $J = 2.2$, 12.0 y $J = 5.5$, 12.0 Hz, respectivamente CH_2OH), 3.20 y 3.40 (4H, protones geminales a los hidroxilos del glicosido).

RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3): δ_{C} 55.6 (q, NO- CH_3), 81.2 (t, C-7), 101.1 (d, C-1), 61.2 (t, C-6), 76.7 (d, C-2), 76.5 (d, C-3), 73.5 (d, C-4), 70.1 (d, C-5).

8,11 nonadecadieno (3)



Los datos espectroscópicos de NMR ^1H y ^{13}C en 1D y 2D (COSY, HSQC, HMBC) son típicos de un hidrocarburo saturado de cadena larga²³.

²³ <http://www.pherobase.com/database/floral-compounds/floral-taxa-compounds-det>
108

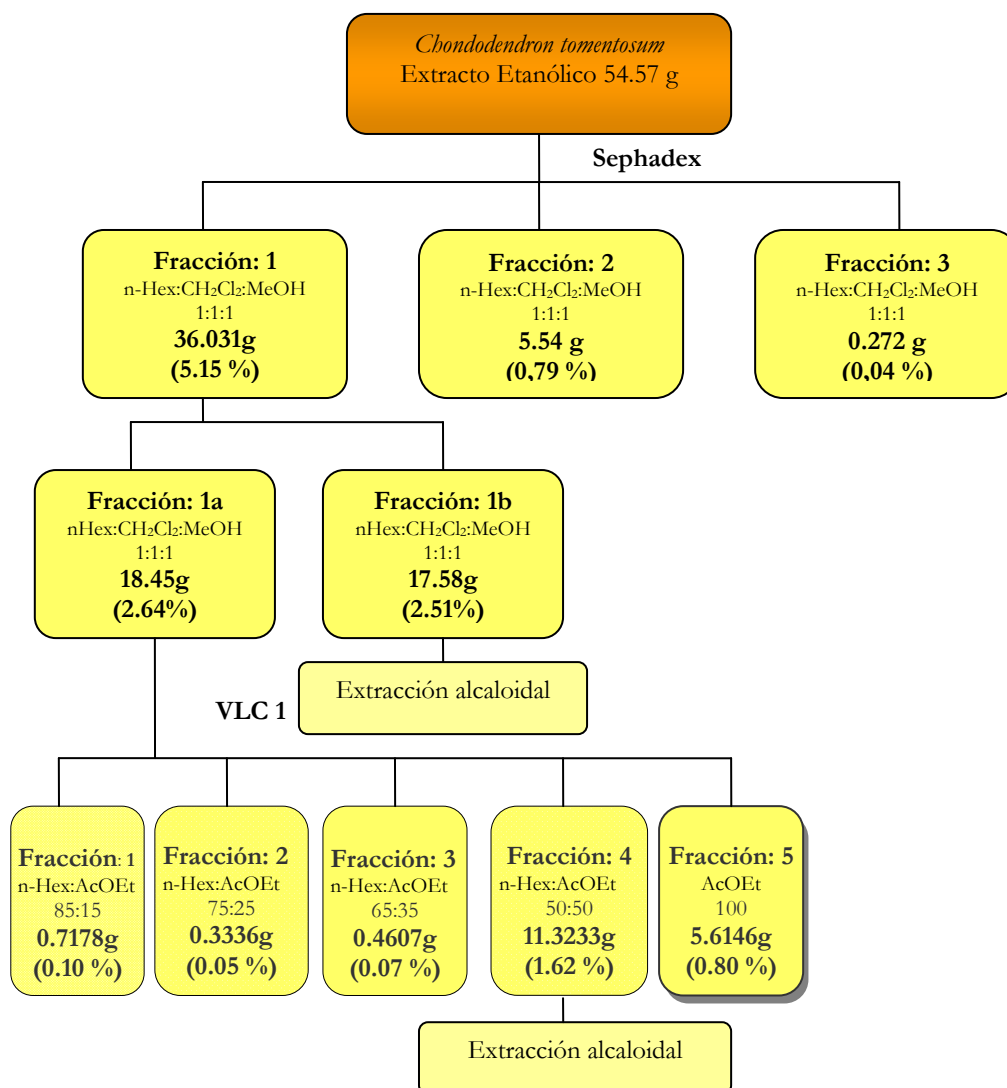
5.2. *Chondodendron tomentosum*

5.2.1. Obtención del extracto crudo

Un total de 700 g de corteza molida y seca de *Chondodendron tomentosum*, fueron extraídos mediante maceración con etanol durante 48-72 horas a temperatura ambiente.

El residuo obtenido al evaporar el disolvente a vacío pesó 54.57 g (rendimiento 8%) y se sometió al proceso de fraccionamiento que se indica a continuación.

5.2.2. Fraccionamiento



Un total de 54.57 g de extracto etanólico de corteza de *C. tomentosum* se fraccionaron mediante cromatografía de exclusión molecular (SHP), [30 cm (alto) x 10 cm (diámetro)], eluida en n-Hex:CH₂Cl₂:MeOH en una proporción de 1:1:1, obteniendo 3 fracciones. De ellas, la fracción 1 resulto ser interesante por la presencia de alcaloides, que se determino mediante un análisis cromatográfico.

Cromrografia de exclusión molecular (SHP)

▪ **Fracción 1:** (36.03 g)

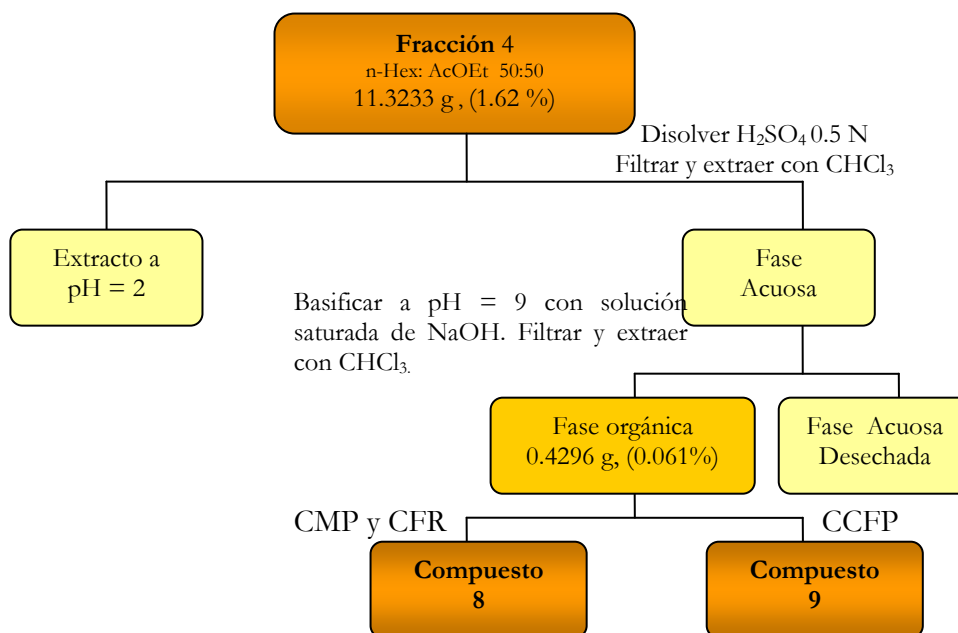
Esta fracción se obtuvo con una mezcla de n-Hex:AcOEt:MeOH, en una proporción 1:1:1. Con 18.45 g (fracción 1a), se realizó una cromatografía de vacío (VLC) [8cm (alto) x 10cm (diámetro)], eluida con una mezcla de n-Hex:AcOEt de polaridad creciente, obteniendo 5 fracciones.

VLC 1

▪ **Fracción 4:** (11.32 g)

Esta fracción se obtuvo de una mezcla de n-Hex:AcOEt 50:50 y a partir de esta fracción se realizó una extracción alcaloidal.

Extracción Alcaloidal (Fracción 4: SHP)



La fracción 4 (11.32 g) se disolvió en 400 ml de H₂SO₄ 0.5 N, se filtró y se extrajo utilizando CHCl₃, obteniendo dos fases, una acuosa y otra orgánica.

La fase acuosa se basificó (pH 9) utilizando NH₄OH 20%, se filtró y extrajo utilizando CH₂Cl₂, obteniendo por segunda vez dos fases, una acuosa que se desecha y otra orgánica rica en alcaloides (0.4296 g). A partir de la fase orgánica se realizó una cromatografía de media presión (CMP), obteniendo 8 fracciones.

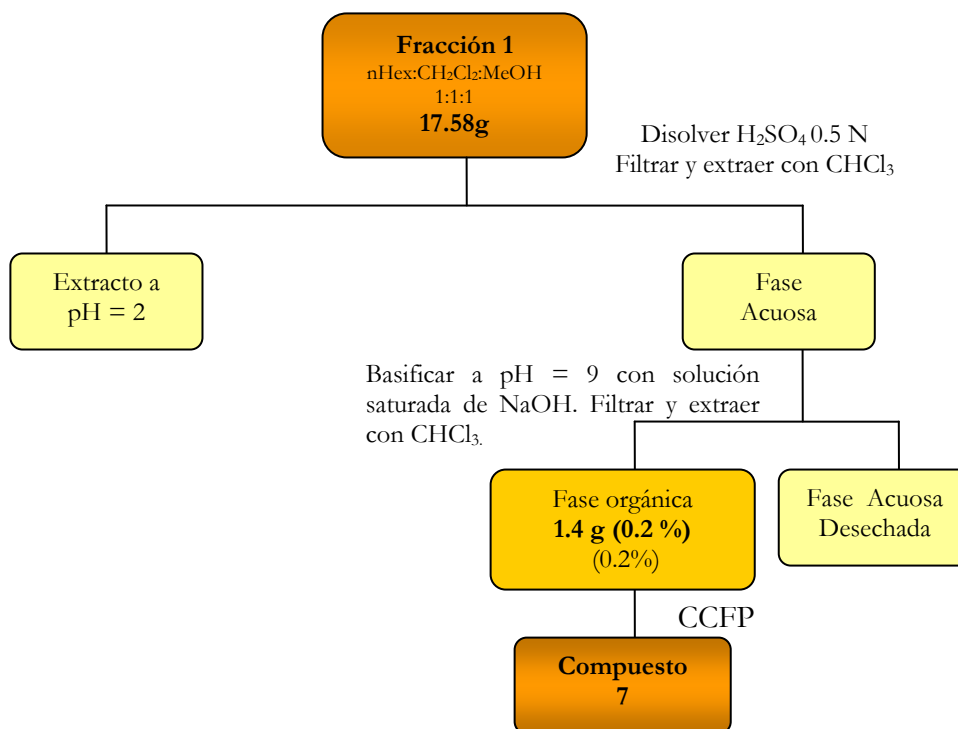
CMP 1

Fracción 2: (0.1286 g)

Esta fracción se obtuvo con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH a una proporción 90:10. Su fraccionamiento continuó mediante cromatografía de fase reversa de alúmina, (CFR) [10 cm (altura) x 3 cm (diámetro)], eluida en AcOEt:MeOH:H₂O en una proporción 80:13:7; obteniendo seis fracciones y el compuesto denominado **Chondrocurina (8)** (3.4 mg, 4.8 x 10⁻³).

Las cinco fracciones obtenidas por CFR anteriormente se reunieron y se realizaron varias cromatografías de capa fina preparativa de alúmina (CCFP) [20 cm (alto) x 20 cm (ancho)], extendiendo 15 mg de muestra por placa, eluyendo en una mezcla de nHex:AcOEt a una proporción de 50:50, obteniendo el compuesto denominado **12-0-metilcurina (9)** (15.4 mg, 2.2 x 10⁻²).

Extracción Alcaloidal (Fracción 1b: VLC1)



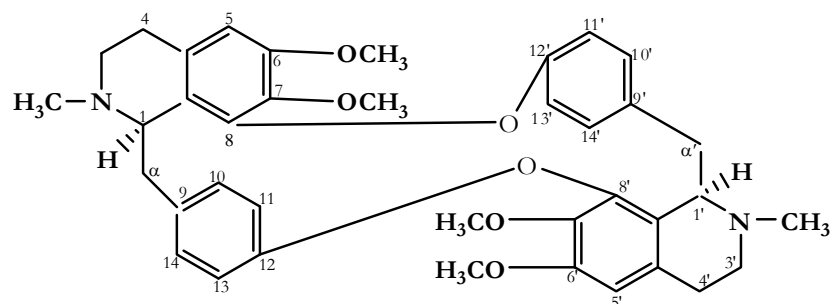
A partir de la fracción 1b (17.58 g), obtenida por cromatografía de exclusión molecular descrita anteriormente, se realizó una extracción alcaloidal siguiendo los mismos pasos y condiciones antes mencionadas obteniendo una fase acuosa y una fase orgánica (1.4 g, 2.5%). Ambas fueron fraccionadas mediante cromatografía en columna flash [14 cm (alto) x 4 cm (diámetro)], eluida con una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH con polaridad creciente, obteniendo un total de 11 fracciones. De ellas, las fracciones 2 y 3 se reúnen para continuar con el fraccionamiento.

Fracciones 2 y 3: (0.399 g)

Las fracciones 2 y 3 se fraccionaron a su vez mediante cromatografía de capa fina preparativa de alumina (CCFP) [20 cm (alto) x 20 cm (ancho)], extendiendo 15 mg por placa, eluyendo varias veces con una mezcla de nHex:AcOEt 50:50, obteniendo el compuesto denominado **Cycleanina (7)**, (5.3 mg, 7.5×10^{-3}).

5.2.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados

Cycleanina (7)



EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 622 (63%), 313 (19), 312 (100), 311 (29), 204 (27), 190 (15), 174 (15), 159 (11), 146 (8), 145 (11).

EM en alta resolución, m/z : 622.3036 calculado para un $C_{36}H_{42}N_2O_6$.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 2.53 (s, 6 H, 2 x N-Me), 2.51 (m, H- α), 3.25 (m, H- α'), 3.40 (s, 3H, OMe), 3.81 (s, 3H, OMe), 4.30 (2 H, d, $J=10.3$ Hz, H-1 y H-1'), 2.92 y 3.29 (2 H, m, H-3 y H-3'), 3.01 y 2.92 (2H, m, H-4 y H-4'), 6.57 (s, 2 H, H-5 y H-5'), 7.82 (dd, 2 H, $J=8.4, 2.8$ Hz, H-13 y H-13'), 6.60 (dd, 2H, $J=8.4$ y 2.8 Hz, H-11 y H-11'), 6.28 (dd, 2H, $J=8.4$ y 2.8 Hz, H-14 y H-14'), 7.06 (dd, 2H, $J=8.5, 2.1$ Hz, H-10 y H-10').

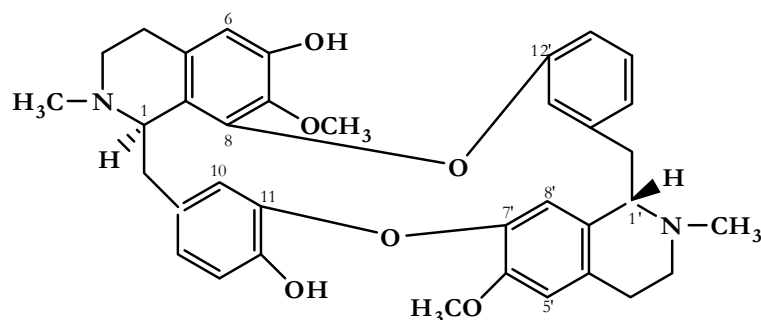
RMN ^{13}C (400 MHz, $CDCl_3$): δ_C 154.2 (s, C-12 y C-12'), 152.1 (s, C-6 y C-6'), 143.8 (s, C-18 y C-18'), 139.1 (s, C-7 y C-7'), 130.3 (s, C-9 y C-9'), 129.5 (s, C-4a y C-4a'), 128.7 (d, C-14, C-14'), 128.3 (d, C-10, C-10'), 124.7 (s, C-8a y C-8a'), 117.5 (d, C-11, C-11'), 114.0 (d, C-13, C-13'), 109.2 (d, C-5, C-5'), 60.1 (q, C-7, C-7'), 59.6 (d, C-1, C-1'), 56.0 (q, C-6, C-6'), 44.6 (t, C-3, C-3'), 42.3 (q, 2 x NMe), 37.9 (t, C- α , C- α'), 24.6 (t, C-4, C-4').

Tabla 2. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC y NOESY de *Cycleanina*²⁴

Protón	δ ($J_{\text{H-H}}$ /Hz)	COSY	HMQC	HMBC
H-1, H-1'	430 d (10.3)	H- α , H- α'	59.6 (d)	-
H-3, H-3'	3.29 y 2.92 m	H-4 y H-4'	44.6 (t)	C-4, C-4'
H-4, H-4'	3.01 y 2.92 m	H-3 y H-3'	24.6 (t)	C-5, C-5', C-4a, C-4a'
H-5, H-5'	6.57 s	-	109.2 (t)	C-6, C-6', C-7, C-7', C-8, C-8a'
H-10, H-10'	7.06 dd (8.5, 2.1)	H-11, H-11'	128.3 (d)	C-11, C-11', C-12, C-12'
H-11, H-11'	6.60 dd (8.4, 2.2)	H-10, H-10'	128.7 (d)	C-10, C-10', C-12, C-12'
H-13, H-13'	5.82 dd (8.4, 2.8)	H-14, H-14'	117.5 (d)	C-11, C-11', C-12, C-12', C-14, C-14'
H-14, H-14'	6.28 dd (8.4, 2.8)	H-13, H-13'	114.0 (d)	C-9, C-9', C-12, C-12'
H-15 α , H-15 α'	3.25 y 2.51 m	H-1, H-1'	37.9 (t)	C-10, C-10'
N-CH ₃	2.52 s	-	42.3 (q)	C-1, C-1', C-3, C-3'
C-6 OMe	3.40 s	-	60.1 (q)	C-7, C-7'
C-7 OMe	3.81 s	-	56.0 (q)	C-6, C-6'
-	-	C-4 ^a y C-4'a	130.3 (s)	
-	-	C-6 y C-6'	152.1 (s)	
-	-	C-7 y C-7'	139.1 (s)	
-	-	C-8 y C-8'	143.8 (s)	
-	-	C-8a y C-8'a	125.8 (s)	
-	-	C-9 y C-9'	129.5 (s)	
-	-	C-12 y C-12'	154.2 (s)	

²⁴ Scheinmann, F.; Scriven, E. F. V.; Ogbeibe, O. N. 1980. Cycleanine from *Syclisia scabrida*: Conformational information from the ^1H NMR spectrum at 300 MHz. *Phytochemistry*. 19, 1837-1840.

Chondrocurina (8)



$[\alpha]_D = +130$ (c, $6 \cdot 10^{-2}$, CHCl_3)

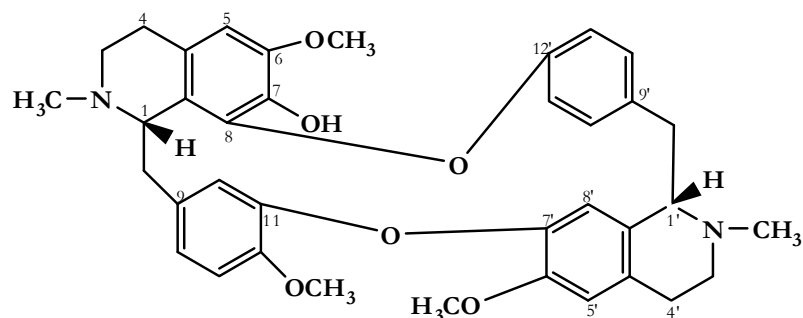
EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 594 (28), 442 (10), 398 (7), 369 (4), 341 (2), 299 (22), 298 (150), 297 (23), 296 (17), 266 (7), 253 (15), 208 (23), 180 (23), 180 (43), 160 (23), 136 (33), 134 (18), 91 (14), 83 (10), 81 (12), 57 (50).

EM en alta resolución, m/z : 594.2733 calculado para un $\text{C}_{36} \text{H}_{38} \text{N}_2 \text{O}_6$, $[\text{M}]^+ = 594, 2730$

RMN ^1H (400 MHz , CDCl_3): δ_{H} 6.57 (1H, s, H-5'), 5.87 (1H, H-8'), 6.74 (1H, s, H-5), 6.27 (1H, d, $J=2.0$ Hz, H-10'), 6.83 (1H, dd, $J=8.4, 2.2$ Hz, H-14), 7.06 (1H, dd, $J=8.4, 2.2$ Hz, H-14'), 6.79 (1H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-13'), 6.70 (1H, dd, $J=8.0, 2.4$ Hz, H-13), 6.54 (1H, dd, $J=8.0, 2.0$ Hz, H-10), 3.92 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-1'), 3.83 (3H, s, OMe), 3.78 (3H, s, OMe), 2.42 (3H, s, N-Me), 2.18 (3H, s, N-Me), 3.80 (1H, m, H-1), 3.10 y 3.30 (4H, m, H-3 y H-3'), 2.66 y 2.79 (4H, m, H-4, H-4').

RMN ^{13}C (400 MHz , CDCl_3): δ_{C} 155.4 (s, C-12'), 148.0 (s, C-6'), 146.7 (s, C-6), 145.9 (s, C-12), 143.1 (s, C-11), 143.1 (s, C-7'), 137.9 (s, C-8), 137.2 (s, C-7), 132.6 (s, C-9), 132.2 (d, C-10'), 131.7 (s, C-9'), 129.9 (d, C-14'), 128.6 (s, C-4a'), 128.1 (s, C-8a'), 125.7 (d, C-14), 125.4 (s, C-8a), 124.6 (s, C-4a), 121.0 (d, C-10), 117.9 (d, C-8'), 115.4 (d, C-13), 114.9 (d, C-13'), 111.9 (d, C-5'), 107.7 (d, C-5), 64.4 (d, C-1'), 59.3 (d, C-1), 56.0 y 55.8 (s, 2 x OMe), 46.5 (t, C-3'), 44.2 (t, C-3), 42.5 y 42.4 (q, 2 x N-Me), 25.2 (t, C-4'), 23.2 (t, C-4).

12-O-metil(+)-curina (S,S')(9)



$[\alpha]_D = + 128.7$ (c, 0.282, CHCl_3)

EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 608 (23), 607 (17), 593 (9), 313 (7), 312 (31), 31 (3), 298 (19), 297 (8), 296 (18), 190 (13), 86 (81), 84 (100).

EM en alta resolución, m/z : 608.2886 calculado para un $\text{C}_{37} \text{H}_{40} \text{O}_6 \text{N}_2$

RMN ^1H (400 MHz , CDCl_3): δ_{H} 2.21 (3H, s, N-Me), 2.57 (3H, s, N-Me), 2.43-2.94 (3H, m, H-4, H-4'), 3.20 (1H, br d, $J = 9, 9$ Hz, H- α), 2.8 (1H, m, H- α'), 3.36 y 2.75 (1H cada una, m, H-3 y H-3'), 3.60 (1H, m, H-1), 3.79 y 2.88 (3H cada una, s, OMe), 3.92 (1H, m, H-1'), 3.95 (3H, s, OMe), 5.82 (1H, s, H-8'), 6.26 (1H, d, $J = 2.0$, H-10), 6.51 (1H, s, H-5), 6.60 (1H, br d, $J = 8.4$ Hz, H-14'), 6.62 (1H, s, H-5'), 6.68 (1H, d, $J = 8.4, 2.4$ Hz, H-13'), 6.75 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-13), 6.78 (1H, br d, $J = 8.5$ y 2.4 Hz, H-11), 6.82 (1H, br d, $J = 8.1$ Hz, H-14), 7.05 (1H, br d, $J = 8.4$ Hz, H-10').

RMN ^{13}C (400 MHz , CDCl_3): δ_{C} 155.5 (s, C-12'), 149.2 (s, C-6'), 148.7 (s, C-7'), 146.7 (s, C-6), 145.4 (s, C-12), 144.1 (s, C-11), 138.2 (s, C-8), 137.5 (s, C-7), 133.7 (s, C-9), 132.6 (s, C-9'), 132.5 (d, C-14'), 131.0 (d, C-10'), 128.8 (s, C-4'a), 128.4 (s, C-8'a), 125.7 (d, C-14), 125.3 (s, C-4a), 125.2 (s, C-8a), 120.1 (d, C-10), 117.9 (d, C-8), 114.8 (d, C-11'), 114.2 (d, C-13'), 112.7 (d, C-13), 112.7 (d, C-5'), 108.3 (d, C-5), 64.9 (d, C-1), 58.7 (d, C-1'), 56.5 (q, OMe), 56.4 (q, 2 x OMe), 48.5 y 44.7 (t cada una, C-3 y C-3' respectivamente), 42.8 y 43.4 (q cada una, N-Me), 38.2 y 39.7 (t cada una, C- α y C- α' respectivamente), 26.7 (t, C-4'), 23.4 (t, C-4).

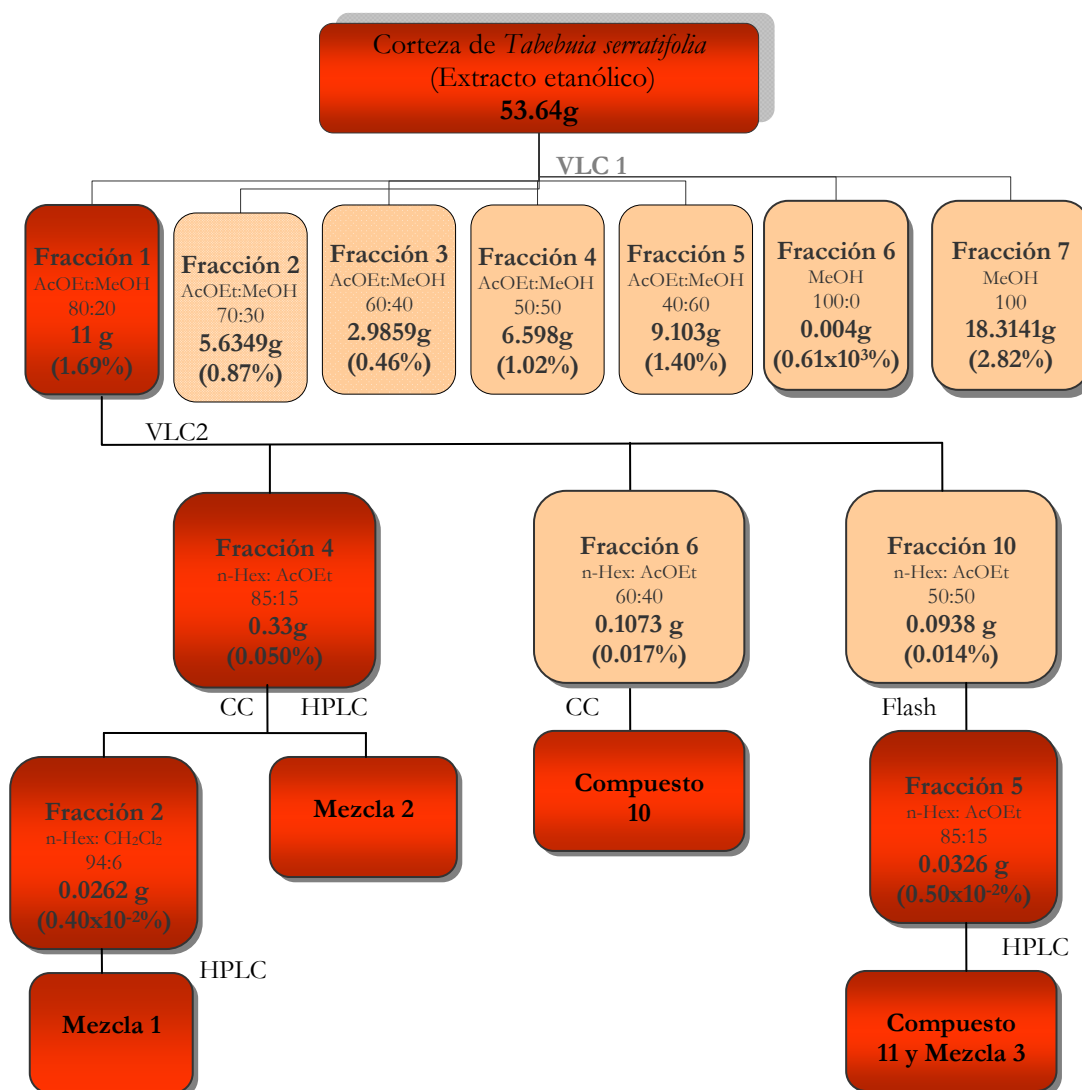
5.3. *Tabebuia serratifolia*

5.3.1. Obtención del extracto crudo

Un total de 650 g de parte aérea seca y molida de *Tabebuia serratifolia* fueron extraídos mediante maceración con etanol durante 48-72 horas a temperatura ambiente.

El residuo obtenido al evaporar el disolvente a vacío pesó 53.64 (rendimiento 8.25 %).

5.3.2. Fraccionamiento



El fraccionamiento se realizó a partir de 53.64g de extracto etanólico de corteza de *T. serratifolia*, mediante cromatografía en columna de vacío (VLC) [16 cm (alto) x 12 cm (diámetro)], eluida con AcOEt:MeOH de polaridad creciente, obteniendo 7 fracciones.

VLC 1

- **Fracción 1:** (11 g.)

Esta fracción se obtuvo con una mezcla de AcOEt:MeOH en proporción 80:20; con ella se realizó otra cromatografía de columna de vacío (VLC2) [8 cm (alto) x 10 cm (ancho)], eluida con n-Hex: AcOEt de polaridad creciente, obteniéndose 10 fracciones de las cuales la 4, la 6 y la 10 se describen a continuación por su importancia.

VLC 2

- **Fracción 4:** (0.33g.)

Esta fracción se obtuvo de una mezcla de n-Hex:AcOEt en proporción 95:5, y tras la realización de una cromatografía en columna (CC) [23 cm (largo) x 1,50 cm(diámetro)], eluida con una mezcla de n-Hex:AcOEt de polaridad creciente, obteniéndose 8 fracciones. Las fracciones 2 y 3 se unieron para realizar una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) [0.25 cm (largo) x 0.212 cm (diámetro) y poros de 5 μ], eluyéndose con n-Hex:CH₂Cl₂, obteniéndose la **mezcla 2**, (12.6 mg, 1.9 x 10⁻³ %).

- **Fracción 2:** (0.0262 g)

Esta fracción se obtuvo de una mezcla de n-Hex:CH₂Cl₂ en una proporción 94:6, a partir de la cual se realizó otra cromatografía líquida de alta presión (HPLC) [0.25 cm (largo) x 0.05 cm(diámetro) y poros de 5 μ], eluida con una mezcla de n-Hex:CH₂Cl₂ en una proporción 94:6, obteniendo la **mezcla 1**, (9.2 mg, 1.4 x 10⁻³ %).

- **Fracción 6:** (0.1073 g)

Esta fracción se obtuvo de una mezcla de de n-Hex:AcOEt en proporción 60:40, a partir de la cual se hizo una cromatografía en columna de silica gel (CC) [15 cm

(largo) x 3 cm (diámetro)], eluida con una mezcla de n-Hex:AcOEt de polaridad creciente. Se obtuvo el compuesto **2-acetil-4H, 9H-nafto [2,3b] furano-4,9-diona (11)** (2.5 mg, 0.38×10^{-3}) y varias fracciones, de las cuales a continuación se describe la fracción 10.

▪ **Fracción 10:** (0.0938g)

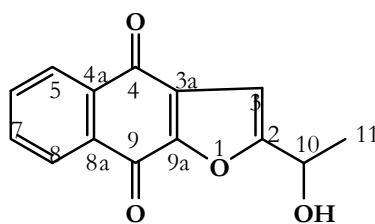
Esta fracción se obtuvo de una mezcla de n-Hex:AcOEt en proporción 50:50, a partir de la cual se hizo una cromatografía en columna, con una mezcla de polaridad creciente de n-Hex:AcOEt, obteniendo cinco fracciones.

✓ **Fracción 5:** (0.0326 g)

Esta fracción se obtuvo de una mezcla de n-Hex:AcOEt en una proporción de 85:15; a la misma se le hizo una cromatografía líquida de alta presión (HPLC) [0.25 cm (largo) x 0.08 cm (diámetro)], con una mezcla n-Hex:AcOEt de polaridad creciente, obteniendo el compuesto **2-(1-hidroxietil)-4H,9H-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona (10)** (7.9 mg, 1.22×10^{-3}), y la **mezcla 3**, (5,9 mg, $0,9 \times 10^{-3}$).

5.3.3. Datos físicos y espectroscópicos de los productos aislados

2-(1-hidroxietil)-4H,9H-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona (10)



EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 242 (44), 227 (100), 200 (48), 199 (39). 171 (20), 115 (24), 113 (7), 105 (24), 104 (11).

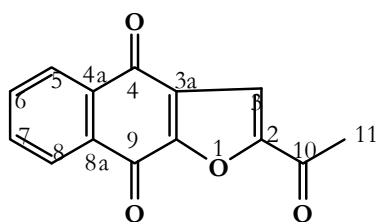
EM en alta resolución, m/z : 242.0575, calculado para un $C_{14}H_{10}O_4$, calculado para un $[M]^+$ 242.0575.

RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): δ_H 1.61 (3H, d, $J=6.7$ Hz, H-11), 5.03 (1H, q, $J=6.7$, H-

10), 6.84 (1H, s, H-3), 7.74 (2H, m, protones aromáticos), 8.19 (2H, m, protones aromáticos).

RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃): δ_C 180.7 (s, C-4), 173.5 (s, C-9), 165.1 (s, C-2), 151.9 (s, C-9a), 151.0 (s, C-3a), 133.9 (d, C-6), 133.8 (d, C-7), 133.0 (s, C-8a), 132.5 (s, C-4a), 127.0 (d, C-5), 126.9 (d, C-8), 103.7 (d, C-3), 63.8 (d, C-10), 21.7 (q, C-11).

2-acetil-4H, 9H-nafto [2,3b] furano-4,9-diona (11)



EM de baja resolución, m/z (int. rel., %): 240 (62), 225 (100), 197 (2). 173 (2). 157 (8), 141 (3), 129 (4), 113 (12), 76(6) y 57 (12).

EM en alta resolución, m/z: 240. Calculado para un. C₁₄H₈ O₄

RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ_H 2.60 (3H, s, H-11), 7.5 (1H, s, H-3), 7.75 (2H, m, H-6 y H-7), 8.18 (2H, m, H-5 y H-8).

RMN ¹³C (400 MHz, CDCl₃): δ_C 187.9 (s, C-10), 180.2 (s, C-4), 174.4 (s, C-9), 155.8 (s, C-9a), 153 (s, C-3a), 137.4 (s, C-2), 134.8 (d, C-6 y C-7), 134.7 (s, C-8a), 131.1 (s, C-4a), 127.6 (d, C-5 y C-8), 112.8 (d, C-3), 27.0 (q, C-11).

Los datos de RMN de ¹H y ¹³C en 1D y 2D (COSY, HSQC, HMBC), están estrechamente relacionados con el compuesto¹⁰²⁵.

²⁵ Madhusudana Roa, M.; Kingston, D. G. I. 1982. Plant anticancer agents. XII. Isolated and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. J. Nat. Prod. 45, 600-604.

Resultados y discusión

Resultados y discusión

1. Ensayos de actividad antiparasitaria e insecticida de extractos de plantas utilizadas en medicina tradicional peruana y sus perfiles químicos

Este estudio se inició con la recolección de ocho plantas originarias de la Amazonía Peruana teniendo en cuenta principalmente el uso que se les da en medicina tradicional (Tabla 1). De estas plantas se obtuvieron un total de 33 extractos (tres por planta: hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico), a partir de la parte de la planta empleada para el tratamiento de enfermedades.

Tabla 1: Plantas seleccionadas para el estudio y su uso tradicional.

Nombre Científico	Familia	Número Voucher	Nombre Común	Partes de la Planta	Aplicación Tradicional
<i>Aristolochia pilosa</i>	Aristolochiaceae	025860	Huancachui sacha	Tallo y Hojas	Mordedura de serpiente
<i>Brunfelsia grandiflora</i>	Solanaceae	026365	Chiric sanango	Tallo y Hojas	Leishmaniasis, reconstituyente, antirreumático febrífugo, fiebre amarilla, anti-sífilis, diurético
<i>Cedrela odorata</i>	Meliaceae	033574	Cedro amargo	Corteza	Astringente, febrífugo.
<i>Cbondodendron tomentosum</i>	Menispermaceae	033896	Curare	Corteza y Hojas	Antiséptico, anti-inflamatorio, reumatismo, ictericia, gonorrea, anestésico.
<i>Paullinia clavifera</i>	Sapindaceae	033368	Sacha yoko	Corteza	Insecticida.
<i>Tabebuia serratifolia</i>	Bignoniaceae	034665	Tahuari	Corteza	Bronquitis, gripe, cálculos biliares, anticanceroso, diabetes, fiebre, leishmaniasis y reumatismo.
<i>Tradescantia zebra</i>	Commeliaceae	011382	Judío que vaga	Parte Aerea	Insecticida.
<i>Zamia ulei</i>	Zamiaceae	027675	Lengua de perro	Tallo Subterráneo	Leishmaniasis.

1.1. Actividad antiparasitaria

La actividad antileishmanial y antitripanosomal de los 33 extractos obtenidos a partir de las ocho plantas se muestra a continuación.

Tabla 2: Actividad *in vitro* de extractos de plantas frente a *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi* expresada en porcentajes de inhibición del crecimiento.

Planta	Parte de la planta	E.	% de inhibición del crecimiento					
			<i>L. infantum</i>			<i>T. cruzi</i>		
			800 µg/ml	400 µg/ml	100 µg/ml	800 µg/ml	400 µg/ml	100 µg/ml
<i>A. pilosa</i>	Tallo	H	99.1±0.6	99.1±0.7	37.8±9.9	100.0±0.0	99.0±0.9	59.1±7.8
		C	95.6±0.1	89.8±0.4	73.3±2.2	98.2±0.5	95.4±0.4	88.4±1.2
		E-w	0.0	0.0	0.0	15.1±3.6	0.0	0.0
	Hojas	H	99.9±0.2	98.5±0.2	40.8±5.5	100.0±0.5	99.0±0.4	42.4±1.7
		C	92.2±0.7	84.1±0.7	60.3±1.0	91.0±0.8	86.0±0.5	76.5±1.2
		E-w	22.0±4.0	0.0	0.0	36.7±8.2	20.4±2.9	0.0
<i>B. grandiflora</i>	Tallo	H	99.0±0.6	54.6±2.7	0.0	22.0±9.0	0.0	0.0
		C	88.0±3.2	13.0±1.6	12.0±1.2	98.0±1.3	95.0±2.3	27.2±2.0
		E-w	77.2±7.3	8.5±1.8	3.0±4.2	72.6±2.1	46.6±1.6	4.2±3.7
	Hojas	H	98.1±0.1	97.4±1.3	47.9±7.1	82.0±1.0	51.5±2.1	0.0
		C	69.2±0.9	38.8±13.8	3.1±3.2	97.7±0.6	93.5±0.2	33.2±2.7
		E-w	42.5±5.8	8.4±6.2	5.0±4.5	46.0±8.7	42.0±4.8	16.1±1.8
<i>C. odorata</i>	Corteza	H	98.1±0.3	97.3±0.6	95.9±0.5	100.0±0.4	100.0±0.2	100.0±0.5
		C	100.0±1.8	100.0±0.2	100.0±0.1	97.9±0.4	95.1±1.1	76.5±1.2
		E-w	0.0	0.0	0.0	72.1±0.7	50.9±2.3	0.0
<i>C. tomentosum</i>	Corteza	H	15.0±9.9	0.0	0.0	96.5±0.9	21.7±5.6	0.0
		C	93.0±1.0	93.0±0.4	93.0±1.0	100.0±0.5	89.9±2.2	28.0±1.2
		E-w	100.0±1.1	97.0±0.4	91.0±1.2	42.1±2.6	24.0±2.2	0.0
	Hojas	H	99.0±0.1	96.0±0.7	19.68±2.9	97.2±0.2	27.3±5.8	0.0
		C	85.6±10.6	80.5±4.8	44.0±6.9	32.8±7.7	14.5±5.9	0.0
		E-w	89.0±3.1	87.0±2.0	84.0±1.0	27.9±0.6	4.0±5.1	0.0
<i>P. clavigera</i>	Corteza	H	93.9±1.5	92.1±0.9	20.1±3.4	56.0±2.2	47.2±3.0	5.7±5.2
		C	100.0±0.8	100.0±2.7	74.1±5.6	100.0±0.2	89.9±1.0	38.4±3.6
		E-w	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>T. serratifolia</i>	Corteza	H	100.0±0.5	99.1±0.7	37.8±9.9	100.0±0.2	99.5±0.5	24.8±4.0
		C	100.0±0.4	98.9±2.8	90.5±0.7	98.0±1.3	96.0±1.0	94.0±0.7
		E-w	1.5±3.2	0.0	0.0	47.6±1.8	28.5±3.7	14.3±1.6
<i>T. zebra</i>	Parte aérea	H	96.4±1.2	93.5±0.4	7.8±1.4	96.0±1.4	95.0±1.0	73.5±3.2
		C	23.8±3.2	6.3±2.0	4.1±2.7	27.0±11.6	0.0	0.0
		E-w	0.0	0.0	0.0	35.7±7.1	17.4±7.4	13.4±4.4
<i>Z. ulei</i>	Tallo	H	84.7±1.0	72.2±1.3	27.5±3.5	78.2±2.0	77.0±0.6	28.2±6.2
	Subterráneo	C	93.3±1.2	84.2±1.3	0.0	92.5±2.3	88.2±0.2	62.9±1.0
	E-w	0.0	0.0	0.0	26.4±5.7	10.1±1.4	7.8±3.3	

E= Extractos, H= hexánicos, C= clorofórmicos, E-w= hidroalcohólicos.

Los extractos hexánicos y clorofórmicos de tallo y hojas de *Aristolochia pilosa* presentan actividad elevada frente a ambos parásitos, sugiriendo composiciones químicas parecidas; siendo el más efectivo el extracto clorofórmico, ya que mantiene su actividad a la dosis más bajas. El extracto hidroalcohólico no presentó actividad en ningún caso.

En el caso de *Brunfelsia grandiflora* la actividad de los extractos hexánico y clorofórmico de tallo y hojas resultó similar para las dos concentraciones más altas ensayadas frente a ambos parásitos. El extracto hidroalcohólico de tallo solo mostró actividad a la mayor concentración ensayada. Las partes más empleadas de la planta para el tratamiento de enfermedades parasitarias son el tallo y la raíz¹ sin embargo, estos resultados muestran que las hojas también poseen actividad antiparasitaria.

Los extractos hexánico y clorofórmico de corteza de *Cedrela odorata* son los más activos frente a ambos parásitos (con rangos entre 100-95.19% y 100-76.65% de actividad frente a *L. infantum* y *T. cruzi*, respectivamente). La corteza de esta planta tiene propiedades astringentes y es utilizada en medicina tradicional como febrífugo y tónico².

De *Chondodendron tomentosum* se ensayaron extractos de hojas y corteza ya que cada una de esas partes se emplea para diferentes tratamientos: es considerado como diurético, reductor de la fiebre y antiséptico, está asociado con varios agentes anestésicos y se usa como relajante muscular³. En general podemos decir que los extractos de ambas partes de la planta muestran mayor actividad frente a *L. infantum* que frente a *T. cruzi*. Las tres concentraciones ensayadas de los extractos clorofórmico e hidroalcohólico de corteza y del hidroalcohólico de hojas resultaron activos frente a los promastigotes de *L. infantum*. Frente a *T. cruzi* se observó actividad para los extractos hexánico de corteza y

¹ www.siamazonia.org.pe

² Vásquez, I. D. 1997. Flora de las Reservas Biológicas de Iquitos-Perú: Allpahuayo-Mishana. Explornapo Camp., Explorama Lodge. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. 63, i-xii, 1-1046.

³ Lee, C. 2003. Confirmation, action, and mechanism of neuromuscular blocking muscle relaxants. Pharmacol. Ther. 98, 143-169.

hojas y clorofórmico de corteza a la concentración más alta. El extracto hexánico de hojas sólo presenta actividad tripanocida a la mayor concentración ensayada.

Los extractos hexánico y clorofórmico de la corteza de *Paullinea clavigera* muestran actividad antiparasitaria frente a promastigotes de *L. infantum*, siendo más efectivo el clorofórmico, que también resultó activo frente a *T. cruzi*, aunque con menor intensidad.

La actividad que muestra *Tabebuia serratifolia*, planta que se emplea en medicina tradicional para el tratamiento de *Leishmania*⁴, es similar frente a ambos parásitos. Esta es la primera descripción de su actividad tripanocida. Estudios previos informan que se han aislado diferentes naftoquinonas de varias partes de plantas del género *Tabebuia* (raíces, hojas, corteza, y duramen), entre ellas el lapachol, α lapachona, β lapachona y dehidrolapachol^{5,6,7,8,9}. Las plantas de este género son utilizadas para tratar el cáncer por su gran contenido en lapachol, cuya actividad anticancerosa está comprobada^{10,11,12}.

Anteriores investigaciones fitoquímicas informan de la presencia de otras naftoquinonas, tres furanoquinonas, además de lapachol y lapachenol¹³, triterpenos¹⁴ y lignanos^{15,16,17}.

⁴ Mejía, K., Rengifo, E. 2000. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana. Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana – Gobierno Regional de Loreto - Agencia Española de Cooperación Internacional. 2º ed. 1-286.

⁵ [Htt://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/libros/quimica/pigmentos/naturales](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/libros/quimica/pigmentos/naturales)

⁶ Burnett, A. R.; Thomson, R. H. 1967. Naturally occurring quinones. X Quinonoid constituent of *Tabebuia avellanedae*. J. Chem. Soc. 21, 2100-2104.

⁷ Burnett, A. R.; Thomson, R. H.; 1968. Naturally occurring quinines. XII Extractives from *Tabebuia chysantha* and other Bignoniaceae. J. Chem. Soc. 7, 850-853.

⁸ Sonakshi, J.; Chauhan, P.; Singh, P. 2002. Quinonoid Constituent from some Bignoniaceae plants. J. Indian Chem. Soc. 12, 946-948.

⁹ Gomez, Castellano, J. R.; Prieto, J. M.; Heinrich, M. 2009. Red Lapachol (*Tabebuia impetigosa*)- A global ethnopharmacological commodity?. J. Ethnopharmacol. 121, 1-13.

¹⁰ Suffnes, M.; Douros, J. 1980. Miscellaneous natural products with antitumor activity. In: Cassidy, J. M.; Douros, J. D. (Eds), anticancer agents based on natural product models. Academic Press, New York 474. (Chapter 14).

¹¹ Ravelo, A. G.; Estevez-Braun, A., Chavez-Orellana, H.; Perez-Sacua, E.; Mesa-Siverio, D. 2004. Recent studies on natural products as anticancer agents. Curr. Top. Med. Chem. 4, 241-265.

¹² Cragg, G. M.; Newman, D. J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. J. Ethnopharmacol. 100, 72-79.

¹³ Lemos, T. L. G.; Monte, F. J. Q.; Santos, A. K.; Fonseca, A. M.; Santos, H. S.; Costa, S.; Pessoa, O. D. L.; Braz-Filho, R. 2007. Quinones from plants of northeastern Brasil: structural diversity, chemical transformation, NMR data and biological activities. Nat. Prod. Res. 21, 529-550.

Tradescantia zebrina empleada tradicionalmente como insecticida¹⁸, en general muestra menos actividad frente a ambos parásitos que el resto de las plantas ensayadas.

Se observa que solo resultó ser activo el extracto hexánico, mostrando mayor actividad frente a *T. cruzi*, a las tres concentraciones ensayadas (96.0; 95.0; 73.5) y menor actividad frente a *L. infantum*, (96.4-93.5%), solo a las dos concentraciones más elevadas.

Los extractos obtenidos del tallo subterráneo de *Zamia ulei* mostraron actividad frente a ambos parásitos, con excepción del hidroalcohólico. Se observa la mayor actividad para el extracto clorofórmico frente a *T. cruzi*, siendo activo a las tres concentraciones ensayadas. Esto confirma que la planta, empleada empíricamente para el tratamiento de la leishmaniasis^{4,19}, posee en su composición compuestos capaces de actuar *in vitro* frente a promastigotes de *L. infantum*. Además, podemos decir que por la similitud de los resultados obtenidos frente a ambos parásitos, los extractos de esta planta no son selectivos.

¹⁴ Rodrigues, Garcez, F.; Silva, Garcez, W.; Suleiman, Mahamoud, T.; De Oliveira, Figueiredo, P. 2007. Novos constituintes químicos das cascas do caule de *Tabebuia heptaphylla*. Quim. Nova. 38, 1897-1891.

¹⁵ Braga De Oliveira, A.; Soares, D.; De Oliveira, G. G.; Guilherme, M. J. 1993. Lignans and naphthoquinones from *Tabebuia indica*. Phytochemistry. 34, 1409-1412.

¹⁶ Schmeda, G.; Panastergiou, F. 2003. Naphthoquinone derivatives and lignans from the paraguayan crude drug "Tayi-pita" (*Tabebuia heptaphylla*, Bignoniaceae). J. Biosciences. 58, 495-501.

¹⁷ Warashina, T.; Nagatani, Y.; Noro, T. 2004. Constituents from the bark of *Tabebuia impetigosa*. Phytochemistry. 65, 2003-2011.

¹⁸Pérez, D.; Iannacone, J. 2004. Efecto insecticida de sacha yoco, (*Paullinea clavigera* var. Bullata Simpson), (Sapindaceae) y oreja de tigre (*Tradescantia zebrina* hort ex Bosse) (Commeliaceae) en el control de *Anopheles benarrochi* Gabaldon, Cova García y Lopéz, 1941, principal vector de la malaria en Ucayali, Perú. Ecol. Apl. 3, 64-72.

¹⁹ Esteves, Y.; Castillo, D.; Pisando, M. T.; Arevalo, J.; Rojas, R.; Alban, J.; Dejaró, E.; Bouordy, G.; Sauvain, M. 2007. Evaluation of the leishmanial activity of plant used by peruvian chayahuira ethnic group. J. Ethnopharmacol. 114, 254-259.

1.2. Actividad citotóxica

En lo que respecta a las pruebas de citotoxicidad inespecífica, sólo los extractos y las concentraciones que mostraron actividad antiparasitaria se ensayaron frente a células CHO. Estos resultados se muestran en la tabla 3, expresados en porcentajes de viabilidad celular.

Tabla 3: Citotoxicidad *in vitro* de extractos de plantas frente a la línea celular CHO.

Nombre Científico	Parte de la Planta	Extractos	% de Viabilidad Celular CHO		
			800 µg/ml	400 µg/ml	100 µg/ml
<i>A. pilosa</i>	Tallo	H	0.2±0.2	1.2±0.2	9.5±1.6
		C	17.3±3.1	22.3±0.5	33.5±1.6
	Hojas	H	0.5±0.4	0.2±0.1	-
		C	1.9±0.4	5.5±2.1	-
<i>B. grandiflora</i>	Tallo	H	3.4±0.8	31.7±3.0	35.7±5.7
		C	4.2±1.7	-	-
		E-w	0.4±0.2	-	-
	Hojas	H	0.0	58.5±3.4	49.9±6.2
<i>C. odorata</i>	Corteza	H	0.0	0.0	1.72±1.7
		C	67.1±1.6	95.5±7.0	100.0±10.5
<i>C. tomentosum</i>	Corteza	H	0.7±0.4	1.8±1.2	-
		C	1.9±0.9	1.4±0.7	2.6±1.5
		E-w	48.6±17.0	87.9±13.23	66.0±11.1
	Hojas	C	0.0	0.0	-
E-w		12.7±1.9	4.3±1.8	14.5±1.6	
<i>P. clavigera</i>	Corteza	H	0.9±0.6	0.2±0.3	-
		C	1.2±0.5	7.8±0.9	72.7±1.6
<i>T. serratifolia</i>	Corteza	H	0.0	1.8±0.9	-
<i>T. zebra</i>	Parte aérea	H	0.0	27.9±2.5	-
<i>Z. nlei</i>	Tallo	H	0.1±0.1	40.0±1.5	-
	Subterráneo	C	4.0±3.3	1.0±0.6	-

H= hexánico, C= clorofórmico, E-w= hidroalcohólico, -= No determinado.

En general se observa citotoxicidad para los extractos estudiados. Hay cuatro casos a destacar. En primer lugar el extracto clorofórmico de *C. odorata*, que es uno de los más activos contra los parásitos (principalmente frente a *L. infantum*; Tabla 2) y sin embargo no resultó ser tóxico a ninguna de las concentraciones ensayadas frente a CHO.

El extracto hidroalcohólico de la corteza de *C. tomentosum* que mostró una gran actividad frente a *L. infantum* (Tabla 2) presentó una citotoxicidad moderada frente a CHO.

El extracto clorofórmico de corteza de *P. clavigera* no es citotóxico y si resulta activo frente a *L. infantum* (Tabla 2) a la menor concentración ensayada.

El extracto hexánico de hojas de *B. grandiflora*, que a 400 µg/ml se muestra muy activo frente a los promastigotes de *L. infantum*, y moderadamente activo frente a epimastigotes de *T. cruzi* (Tabla 2) resulta ser moderadamente citotóxico frente a CHO.

1.3. Actividad antialimentaria

Los extractos hexánico y clorofórmico de cada planta (22 extractos en total) se ensayaron frente a las diferentes especies de insectos diana. Los resultados obtenidos se expresan a continuación en la tabla 4.

Tabla 4: Actividad antialimentaria de extractos de plantas frente a *Leptinotarsa decemlineata*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi* y *Spodoptera littoralis*.

Planta	Partes de la Planta	E.	<i>L. decemlineata</i>	<i>S. littoralis</i>	<i>R. padi</i>			<i>M. persicae</i>		
			%FR ^a	%FR ^a	C%	T%	%SI ^b	C%	T%	%SI ^b
<i>A. pilosa</i>	Hojas	H	89.3* ± 4	11.8 ± 28	67 ± 5	33 ± 5	49	68 ± 5	32 ± 5	40
		C	93.3* ± 7	56.9 ± 16	72 ± 5	28* ± 5	57	89 ± 3	11* ± 3	84
	Tallo	H	74.55 ± 18	18.8 ± 12	82 ± 3	18* ± 3	72	58 ± 4	42 ± 4	31
		C	89.3* ± 4	13.5 ± 20	62 ± 4	38 ± 4	41	86 ± 3	14* ± 3	79
<i>B. grandiflora</i>	Hojas	H	80.9* ± 18	0	58 ± 5	40 ± 4	38	63 ± 4	37 ± 4	41
		C	67.1 ± 26	0	61 ± 6	39 ± 6	41	61 ± 4	39 ± 4	36
	Tallo	H	84.8* ± 11	0	75 ± 3	22* ± 3	69	74 ± 5	26* ± 5	61
		C	80.5* ± 10	61.6 ± 20	74 ± 3	25* ± 3	62	84 ± 4	16* ± 4	77
<i>C. odorata</i>	Corteza	H	60.1 ± 20	0	46 ± 6	43 ± 6	23	52 ± 5	48 ± 5	27
		C	92.6* ± 4	0	56 ± 4	44 ± 3	23	45 ± 5	50 ± 5	18
<i>C. tomentosum</i>	Hojas	H	95.7* ± 2	0	79 ± 3	21* ± 3	70	61 ± 4	39 ± 4	42
		C	85.8* ± 3	0	72 ± 4	28* ± 3	58	57 ± 3	43 ± 3	28
	Corteza	H	89.5* ± 12	0	66 ± 4	31 ± 3	50	85 ± 4	15* ± 4	77
		C	82.3* ± 7	86.5* ± 5	63 ± 4	37 ± 4	41	42 ± 8	58 ± 8	23
<i>P. clavigera</i>	Corteza	H	15.5 ± 45	0	41 ± 3	58 ± 4	8	58 ± 5	42 ± 5	33
		C	35.1 ± 34	11.1 ± 18	40 ± 5	54 ± 5	14	62 ± 4	38 ± 4	39
<i>T. serratifolia</i>	Corteza	H	47.8 ± 34	10.4 ± 30	69 ± 4	31 ± 4	53	67 ± 3	33 ± 3	47
		C	92.6* ± 3	66.0 ± 3.7	77 ± 3	23* ± 3	66	63 ± 6	37 ± 6	45
<i>T. zebrina</i>	Parte aérea	H	77.7* ± 9	0	71 ± 5	29* ± 5	54	43 ± 8	49 ± 8	37
		C	47.8 ± 26	67.0 ± 7	78 ± 4	22* ± 4	67	64 ± 5	37 ± 5	43
<i>Z. ulei</i>	Tallo	H	38.0 ± 42	0	51 ± 4	46 ± 4	22	39 ± 7	61 ± 7	20
	Subterráneo	C	81.4* ± 14	0	52 ± 3	48 ± 3	19	53 ± 5	47 ± 5	30

E= extracto H= hexánico, C= clorofórmico. ^aFR = $1 - (T/C) \times 100$, donde T y C son el consumo de los discos tratamiento y control, respectivamente. ^bSI = $1 - (T/C) \times 100$, donde T y C son el porcentaje de pulgones asentados en el tratamiento y control respectivamente. * p < 0.05 Wilcoxon Signed-rank test.

En general podemos observar que todos los insectos respondieron a alguno de los extractos siendo *L. decemlineata* el más sensible (17/22), seguido de *R. padi* (11/22), *M. persicae* (5/22) y *S. littoralis* (5/22) de acuerdo con sus adaptaciones tróficas.

Todos los extractos ensayados mostraron actividad antialimentaria significativa (FR entre 60-96%) frente a *L. decemlineata*, a excepción de los de *P. clavigera* (hexánico y clorofórmico), *T. serratifolia* (hexánico), *T. zebra* (clorofórmico) y *Z. ulei* (hexánico).

El extracto clorofórmico de tallo de *C. tomentosum* fue más activo frente a *S. littoralis*.

Frente a *R. padi* el extracto hexánico de *B. grandiflora* (tallo) resultó moderadamente activo. El extracto hexánico de tallo de *A. pilosa*, el extracto hexánico de hojas de *C. tomentosum*, el extracto hexánico de *B. grandiflora* (tallo) y el clorofórmico de *T. zebra* (parte aérea) fueron los más activos (%SI>65%).

Frente a *M. persicae* las actividades más significativas (%SI>75) las presentaron los extractos clorofórmicos de hojas y tallo de *A. pilosa*, el extracto clorofórmico de tallo de *B. grandiflora* y el extracto hexánico de corteza de *C. tomentosum*.

En cuanto a la actividad insecticida descrita previamente, sólo podemos mencionar que el extracto acuoso de *A. pilosa* mostró actividad importante frente a larvas de *Rhynchophorus palmarum* (insecto plaga del pijuayo, *Bactris gasipaes*), con porcentajes de mortalidad y repelencia superiores al 70%²⁰. Gedunina, un compuesto aislado de *C. odorata* mostró actividad antialimentaria frente a *Sitophilus oryzae* (gorgojo del arroz)²¹, además compuestos como germacreno D e himachaleno presentes en el aceite esencial de *C. odorata* son los que le confieren actividad insecticida²².

Los extractos de *P. clavigera* y *T. zebra* mostraron actividad insecticida sobre larvas de *Anopheles benarrochi*, siendo más activa *P. clavigera*¹⁸.

²⁰ Pérez, D. Iannacone, J. 2006. Efectividad de extractos botánicos de diez plantas sobre la mortalidad y repelencia de larvas de *Rhynchophorus palmarum*, insecto plaga del pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. Agric. Téc. 66, 21-30.

²¹ Omar, S.; Marcotte, M.; Fields, P.; Sanchez, P. E.; Poveda, L.; Mata, R.; Jimenez, A.; Durst, T.; Zhang, J.; Mackinnon, S.; Leaman, D.; Arnason, J. T.; Philogéne, B. J. R. 2007. Antifeedant activities of terpenoids isolated from tropical Rutales. J. Stored Prod. Res. 43. 92-96.

²² Soarea, M. G.; Batista-Pereira, L. G.; Fernández J. B.; Correa A. G.; Da Silva, M. F. G. F.; Vieira, P. C.; Rodríguez, E., Ohashi, S. 2003. Electrophysiological responses of female and male *Hypsipyla grandella* (zeller) to *Swietenia macrophylla* essential oil. J. Chem. Ecol. 29, 2143-2151.

En el género *Tabebuia* es clásica la presencia de fenilnaftoquinona, furanonaftoquinona y piranonaftoquinona así como la elevada proporción de lapachol que le confiere propiedades tóxicas contra las termitas; también tienen actividad antitumoral²³.

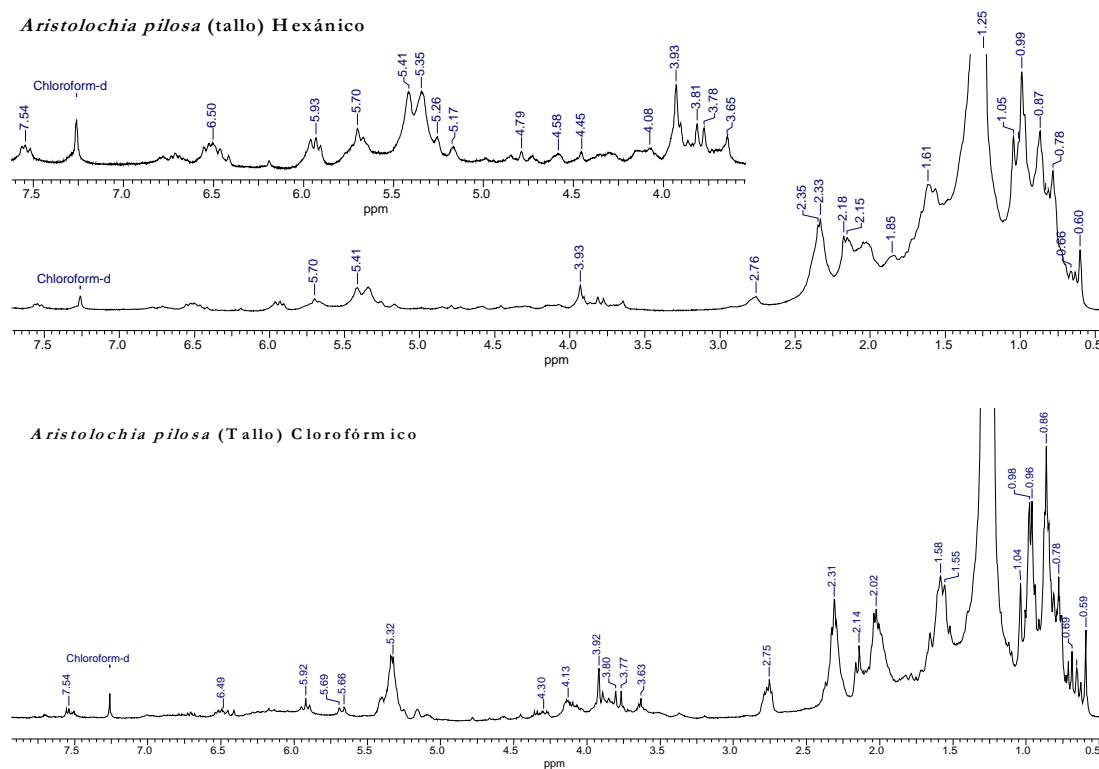
Es la primera vez que se describe actividad insecticida frente a *L. decemlineata*, *R. padi*, *M. persicae* y *S. littoralis*, de todas las plantas ensayadas en este trabajo.

²³ Vidal, Tessier, A. M.; Delaveau, P.; Champion, B.; Jacquemin, H. 1988. Sur des quininés lipophiles du bois de tronc de *Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nichols. *Ann. Pharmaceutiques Françaises*. 46, 55-57.

1.4. Perfiles químicos (RMN de ^1H) de los extractos hexánico, clorofórmico, e hidroalcohólico de *Aristolochia pilosa*, *Chondodendron tomentosum*, *Paullinea clavigera* y *Zamia ulei*.

Este estudio se llevó a cabo con la finalidad de establecer los tipos de compuestos presentes en los extractos que puedan ser responsables de su actividad biológica. Para ello se realizó el estudio de los perfiles químicos de algunos extractos de las plantas estudiadas, teniendo en cuenta su actividad biológica y disponibilidad (cuatro de las ocho plantas ensayadas).

1.4.1. Perfil químico de los extractos de tallo de *A. pilosa*.



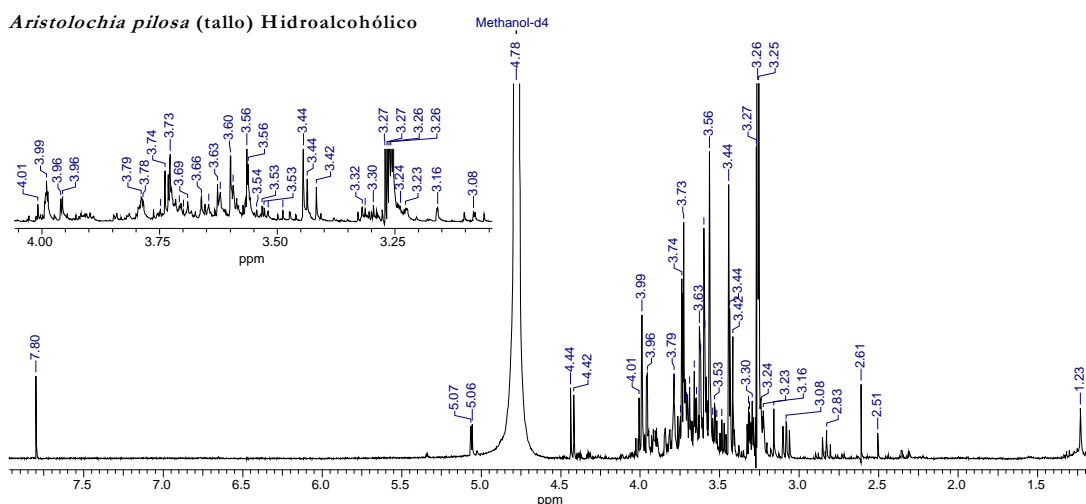


Figura 1: Espectros de RMN de ^1H de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de *A. pilosa*.

Tabla 5: Selección de datos espectroscópicos de los extractos de tallo de *A. pilosa*.

Extracto	Ppm				
Hexánico	-	3.65-4.08	4.45-4.79	5.17-5.26	5.35-5.41
Clorofórmico	-	3.63-4.30	-	-	5.32
Hidroalcohólico	2.51-2.83	3.00-4.00	4.42-4.44	-	-

Los espectros de RMN de ^1H de los extractos hexánico y clorofórmico son muy parecidos, en ellos podemos observar desplazamientos químicos importantes entre 3.65 y 4.30 ppm correspondientes a protones geminales de grupos hidroxilos, desplazamientos químicos a 5.32 ppm correspondiente a una insaturación que se asemeja a los que presentan algunos triterpenos, compuestos que se han descrito en varias especies del género *Aristolochia*^{24,25} y que podrían encontrarse en la composición de estos extractos (Figura 1, tabla 5).

²⁴ Ruecker, G.; Langmann, B.; De Siqueira, N. S. 1981. Constituents of *Aristolochia triangularis*. Plant. Med. 41, 143-149.

²⁵ Wu, T. S.; Damu, A. G.; Su, C. R. P. C. 2004. Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities. Nat. Prod. Rep. 21, 594-624.

Ambos extractos mostraron actividad frente a *L. infantum* y *T. cruzi*, siendo más activo el clorofórmico. Además estos extractos mostraron actividad frente a *L. decemlineata* (ambos), *M. persicae* (clorofórmico) y *R. padi* (hexánico) (Tabla 4).

El espectro de RMN de ^1H del extracto hidroalcohólico no muestra los desplazamientos químicos observados en los espectros anteriores aunque se observan desplazamientos químicos que van desde 3.00 a 4.44 ppm característicos de protones geminales de grupos hidroxilos, similares a los que se presentan los azúcares. Además se observan desplazamientos químicos a 3.25-3.26 ppm (Figura 1, Tabla 5) asignables a metoxilos característicos de flavonoides glicosilados descritos en este género^{26,27}. Este extracto no mostró actividad antiparasitaria.

Especies del género *Aristolochia* son utilizadas en medicina tradicional, como antiinflamatorio, antiasmático, abortivo, en terapias de adelgazamiento, así como para curar varios tipos de cáncer^{26,28,29}. Hasta el momento se ha descrito que de este género se han aislado chalconas, dímeros de flavonas, biflavonas, tetraflavonoides (chalconas tetrameros de flavonas)^{26,28}. Concretamente del tallo y de las hojas de *Aristolochia ridicula*, una biflavona (ridiculoflavona D), una chalcona (ridiculoflavonilchalcona B), y un tetraflavonoide (ridiculoflavona C)²⁷. También se han descrito derivados del ácido aristolóquico, y mono, sesqui, di, tri y tetra terpenos siendo los más abundantes los sesqui y di terpenos²⁵.

Las raíces y tallos de *A. triangularis* contienen ácidos grasos, (estigmastano -4-en-3-ona, estigmastano -3,6-diona y stigmastano-4-en-3,6-diona), así como diterpenos tipo kaurano ((-)-Kaur-16-eno, (-)-kaur-16-en-18-al, (-)-kaurano-16 α -ol-18-al, (-)-16 α ,17-epoxykaurano, (-)-kaur-16-en-18-ol, (-)-kaur-15-en-17-ol), y sesquiterpenos ((-)- α -

²⁶ Machado, M. B.; Lopes, L. M. X. 2005. Chalcone – flavone tetramer and biflavones from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry*. 66, 669-674.

²⁷ Machado, M. B.; Lopes, L. M. X. 2008. Tetraflavonoids and biflavonoids from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry*. 69, 3095-3102.

²⁸ Cameiro, F. J. C.; Boralle, N.; Silva, D. H. S.; Lopes, M. X. 2000. Bi-and tetraflavonoids from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry*. 55, 823-832.

²⁹ Silva-Brandão, K. L.; Solferini, V.; Trigo, J. R. 2005. Chemical and phylogenetic relationships among *Aristolochia* L. (Aristolochiaceae) from southeastern Brazil. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 291-302.

ylangeno, (-)- α -copaeno, (E)- β -farneseno, γ -elemeno, (E)-(R)-nerolidol^{24,29}). Las hojas, tallos aéreos y órganos subterráneos de *A. argentina* contienen aceites esenciales³⁰.

Las raíces y tallos de *A. elegans* contienen alcaloides del grupo bisbencilisoquinolínico^{31,32}; y se han aislado alcaloides como el ácido aristolóquico de *Aristolochia californica*³³.

Especies del género *Aristolochia* presentan actividad repelente e insecticida; los extractos etanólico y acetónico del tubérculo de *A. pubescens* muestran actividad insecticida sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis* (lepidoptera)³⁴; argenticlactona, compuesto aislado de *A. argentina*, muestra actividad antileishmanial y antimicótica²⁵, el ácido aristolóquico produce efectos nefrotóxicos en mamíferos y alarga el periodo larval de *Anticarsia gemmatalis*³⁴, el extracto crudo de *A. bracteata* es usado en medicina tradicional como estimulante gástrico y en el tratamiento de cáncer, en la inflamación pulmonar y en picaduras de serpientes²⁰. *Aristolochia pilosa* presenta actividad insecticida frente a larvas de *Rhynchophorus palmarum*³⁵.

La actividad mostrada por los extractos hexánico y clorofórmico de *A. pilosa* frente a los parásitos e insectos ensayados puede deberse a la presencia de posibles triterpenos y ácido aristolóquico; teniendo en cuenta sus espectros de RMN de ¹H y que ambos se han descrito en muchas especies de este género^{25,26}. Ambos compuestos son utilizados en medicina tradicional, en el caso del ácido aristolóquico a pesar de su efecto

³⁰ Priestap, H. A.; Van Baren, C. M.; Di Leo Lira, P.; Coussio, J. D.; Bandoni A. L. 2003. Volatile constituents *Aristolochia argentina*. *Phytochemistry*. 63, 221-225.

³¹ Shi, L. S.; Kuo, P. C.; Tsai, Y. L.; Damu, A. G.; Wu, T. S. 2004. The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 439-446.

³² Wu, T. S.; Tsai, Y. L.; Damu, A. G.; Kuo, P. C.; Wu, P. L. 2002. Constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*. *J. Nat. Prod.* 65, 1522-1525.

³³ Fordyce, J. A. 2001. The lethal defence paradox remains: inducible host-plant aristolochic acids and the *Entomol. Exp. Appl.* 100, 339-346

³⁴ Nascimento, I. R.; Mutara, A. T.; Bortoli, S. A.; Lopes, L. M. 2004. Insecticidal activity of chemical constituents from *Aristolochia pubescens* against *Anticarsia gemmatalis* larvae. *Pest. Manage. Sci.* 60, 413-416.

³⁵ Pérez, D.; Iannacone, J. 2008. Mortalidad y repelencia en *Eupalamides cyparissias* (Lepidoptera: Castniidae), plaga de palma aceitera *Elaeis guineensis*, por efecto de diez extractos botánicos. *Entomol. Argent.* 67, 41-48.

nefrotóxico³⁶. La diferencia de actividad entre los extractos puede deberse principalmente a la concentración a la que se encuentran.

1.4.2. Perfil químico de los extractos de corteza de *C. tomentosum*

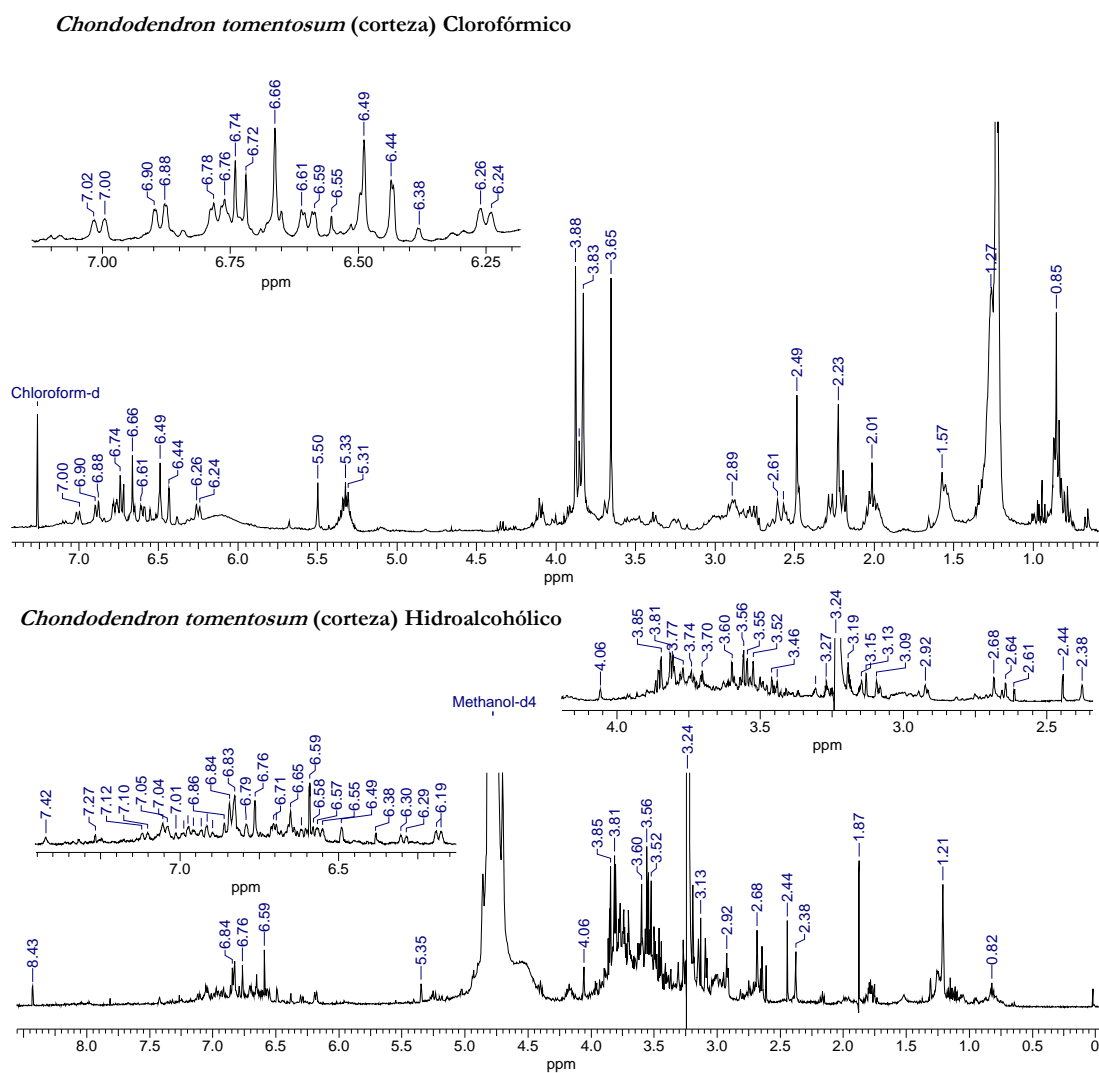


Figura 2: Espectros de RMN de ^1H de los extractos clorofórmico e hidroalcohólico de *C. tomentosum*.

³⁶ Heinrich, M.; Chan, J.; Wanke, S.; Neinhuis, C.; Simmonds, M. S. J. 2009. Local uses of *Aristolochia* species and content of nephrotoxic aristolochic acid 1 and 2. A global assessment based on bibliographic sources. *J. Ethnopharmacol.* 125, 108-144.

Tabla 6: Selección de datos espectroscópicos de los extractos de corteza *C. tomentosum*.

Extracto	Ppm				
Clorofórmico	0.85-2.54	2.23-2.49	3.65-5.52	6.24-7.02	-
Hidroalcohólico	0.82-2.68	-	3.70-5.35	6.19-7.04	7.05-7.42

El espectro de RNM de ^1H del extracto clorofórmico de *C. tomentosum* presenta señales de protones característicos de una mezcla de alcaloides bisbencilisoquinolínicos con diferentes grados de oxidación a δ_{H} 2.23-2.49 (N – Me), 3.65-3.88 (OMe), y 6.25-7.10 (protones aromáticos) y difiere claramente con lo observado para el extracto hidroalcohólico, probablemente por que el extracto clorofórmico esté enriquecido en alcaloides (Figura 2, Tabla 6).

Ambos extractos mostraron actividades antiparasitarias similares frente a *L. infantum*, mientras que frente a *T. cruzi*, sólo mostró actividad antiparasitaria el extracto clorofórmico (Tabla 2). El extracto clorofórmico de corteza además de ser citotóxico (Tabla 3) presentó actividad insecticida frente a *S. littoralis* y *L. decemlineata* y el hexánico frente a *M. persicae* (Tabla 4).

El género *Chondodendron* pertenece a la familia Menispermaceae, de la cual se suelen aislar alcaloides del tipo bisbencilisoquinolínico³⁷, dentro de los aislados de *C. tomentosum* se han descrito: (+)-isochondodendrina, cycleanina, norcycleanina, (+)-chondocurina, (+)-tubocurarina, (+)-chondocurarina y curina^{37,38,39}; lo que nos indica que las señales químicas observadas en los espectros de estos extractos podrían deberse a la presencia de alguno de estos alcaloides en su composición.

De los alcaloides bisbencilisoquinolínicos se ha descrito una gran variedad de actividades, antitripanosomal⁴⁰, antiplasmodial^{41,42}, antileishmanial⁴³, antibacterial y citotóxica⁴⁴.

³⁷ Thornber, C. W. 1970. Alkaloids of the Menispermaceae. *Phytochemistry*. 9, 157-187.

³⁸ Schiff, P. L. 1991. Bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.* 54, 645-749.

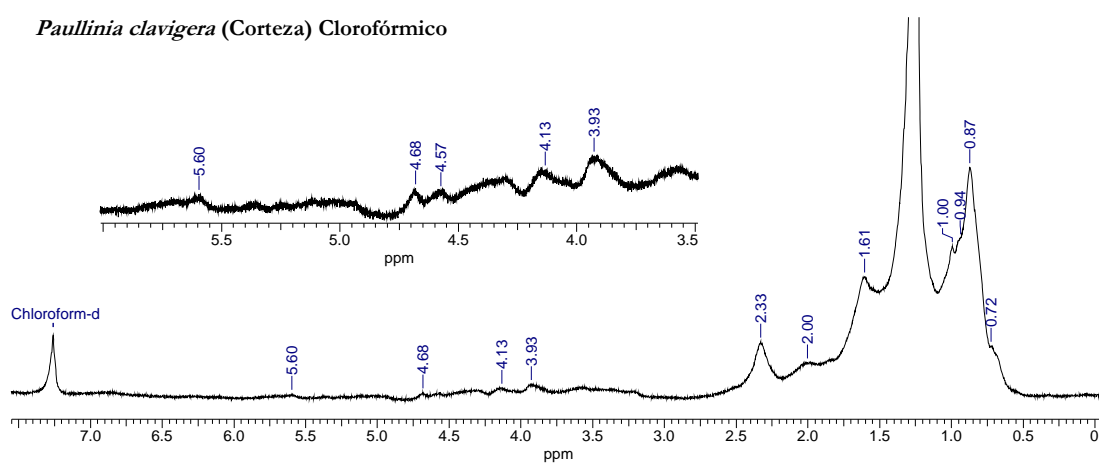
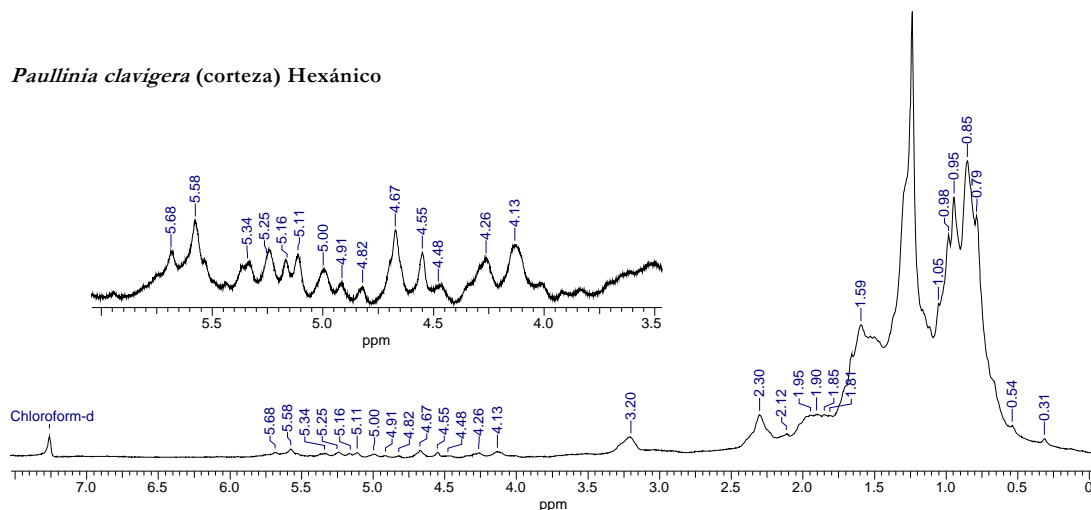
³⁹ Guha, K. P.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R. 1979. Bisbenzylisoquinoline Alkaloids-A review. *J. Nat. Prod.* 42, 1-84.

⁴⁰ Fournet, A.; Ferreira, M. E.; Rojas de Arias, A.; Schinini, A.; Nakayama, H.; Torres, S.; Sanabria, R. Guinaudeau, H.; Bruneton, J. 1997. The effects of bisbenzylisoquinoline alkaloids in *T. cruzi* infections in mice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 8, 163-170.

⁴¹ Angerhofer, C.; Guinaudeau, H.; Wongpanich, V.; Pezzuto, J. M.; Cordell, A. 1999. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.* 62, 59-66.

Las señales químicas observadas sugieren la presencia de alcaloides del tipo bisbencilisoquinolínico. La diferencia en la actividad demostrada entre ambos extractos podría deberse principalmente a la concentración en la que se encuentran dichos alcaloides, siendo superior en el extracto clorofórmico.

1.4.3. Perfil químico de los extractos de corteza de *P. clavigera*



⁴² Lin, L. Z.; Shied, H. L.; Angerhofer, C. K.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. 1993. Citotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cyclea barbata*. J. Nat. Prod. 56, 22-29.

⁴³ Osorio, J.; Montoya, G.; Arango, G. 2006. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. VITAE. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Medellín Colombia. 13, 61-84.

⁴⁴ Lohombo, M. L.; Okusa, P. N.; Penge, O.; Kabongo, C.; Iqbal, M.; Kasende, O. E. 2004. Antibacterial, Antifungal, Antiplasmodial and Cytotoxic activities of *Alvertisia villosa*. J. Ethnopharmacol. 93, 331-335.

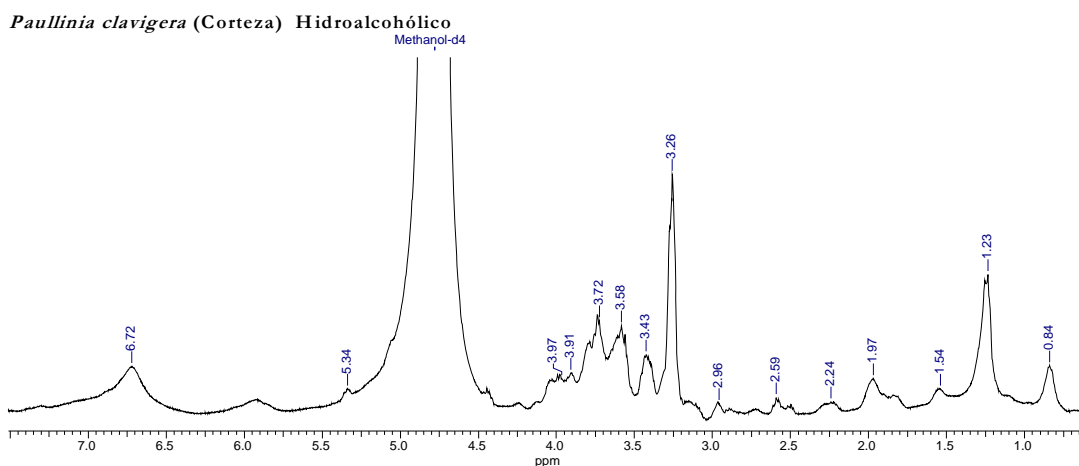


Figura 3: Espectros de RMN de ^1H de los extractos hexánico, clorofórmico e hidroalcohólico de *P. clavigera*.

Tabla 7: Selección de datos espectroscópicos de los extractos de corteza *P.clavigera*.

Extracto	Ppm						
Hexánico	0.31	0.54	0.79-1.59	1.81-2.30	-	4.13-5.68	-
Clorofórmico	-	-	0.72-1.61	2.00-2.33	-	3.93-5.60	-
Hidroalcohólico	-	-	0.84-1.97	2.24-3.91	3.26-3.97	5.34	6.72

El espectro de RNM de ^1H del extracto hexánico muestra desplazamientos químicos entre 4.13 y 5.68 ppm correspondientes a protones geminales de heteroátomos (Figura 3, Tabla 7). En el espectro del extracto clorofórmico no es posible determinar con exactitud la presencia de éstas señales por falta de definición pero son similares.

Estos extractos mostraron importante actividad antiparasitaria frente a *L. infantum* (ambos) y frente a *T. cruzi* (clorofórmico) (Tabla 7).

El espectro de RMN de ^1H del extracto hidroalcohólico presenta señales entre 3.26 y 5.34 ppm correspondientes a posibles azúcares unidos a señales de protones aromáticos característicos de flavonas glicosiladas (Figura 3, Tabla 7). Este extracto no mostró actividad frente a los parásitos ensayados (Tabla 2).

De la familia Sapindaceae se han aislado triterpenos, β -sistosterol y aceites esenciales⁴⁵, por otro lado de *P. pinnata* se han aislado flavonas glicosiladas a las que se les atribuye la actividad molusquicida de esta especie⁴⁶. *P. clavigera* muestra actividad insecticida sobre larvas de *Anopheles benarrochi*⁴⁸, y su contenido en saponinas le confiere propiedades antifúngicas y molusquicidas⁴⁷. Las saponinas tienen un amplio rango de actividades biológicas tales como acción antimicótica⁴⁸, antiviral⁴⁹, anticancerígena⁵⁰, hipocolesterolemica⁵¹, hipoglucémica⁵², antitrombótica⁵³, diurética⁵⁴, antiinflamatoria⁵⁵ y molusquicida^{56,57}.

Teniendo en cuenta que no se han observado señales químicas correspondientes a posibles saponinas y flavonas glicosiladas en los extractos hexánico y clorofórmico, es probable que la actividad antiparasitaria demostrada por estos extractos se deba a la presencia de otros compuestos.

⁴⁵ Schultes, R. E.; Raffauf, R. F. 1990. The healing forest: Medicinal and toxic plant of the Northwest Amazonia (Historical, Ethno- & Economic Botany, Vol. 2). 484. Discorides Press, Portland Oregon, USA.

⁴⁶ Abourashed, E. A.; Toyang, N. J.; Choinski, J. R.; Khan, I. A. 1999. Two new flavone glycosides from *Paullinea pinnata*. J. Nat. Prod. 62, 1179-1181.

⁴⁷ Ekabo, O.; Farnsworth, N.; Henderson, T.; Mao, G.; Mukherjee, R. 1996. Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. J. Nat. Prod. 59, 431-435.

⁴⁸ Zamilpa, A.; Tortoriello, J.; Navarro, V.; Delgado, G.; Alarez, L. 2002. Five new steroidal Saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimycotic activity. J. Nat. Prod. 65, 1815-1819.

⁴⁹ Aquino, R.; Conti, C.; De-Simone, F.; Orsi, N.; Pizza, C.; Stein, M. L. 1991. Antiviral activity of constituents of *Tamus communis* J. Chemother. 3, 305-309.

⁵⁰ Sung, M. K.; Kendall, C. W. C.; Rao, A. V. 1995. Effect of saponins and Gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture. Food Chem. Toxicol. 33, 357-366.

⁵¹ Sauvaire, Y.; Ribes, G.; Baccou, J. C.; Loubatier'es-Mariani, M. M. 1991. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. Lipids. 26, 191-197.

⁵² Kato, A.; Miura, T.; Fukunaga, T. 1995. Effects of steroidal glycosides on blood glucose in normal and diabetic mice. Biol. Pharm. Bull. 18, 167-168.

⁵³ Zhang, J.; Meng, Z.; Zhang, M.; Ma, D.; Xu, S.; Kodama, H. 1999. Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae* rhizome on platelet aggregation and hemolysis in human blood. Clin. Chim. Acta. 289, 79-88.

⁵⁴ Silva, G. M.; De Souza, A. M.; Lara, L. S.; Mendes, T. P.; Da Silva, B. P.; Lopes, A. G.; Caruso-Neves, C.; Parente, J. P. 2005. A new steroidal saponin from *Agave brittoniana* and its biphasic effect on the Na⁺-ATPase activity. Z. Naturforsch. 60, 121-127.

⁵⁵ Da Silva, B. P.; De Sousa, A. C.; Silva, G. M.; Mendes, T. P.; Parente, J. P. 2002. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. J. Biosci. 57, 423-428.

⁵⁶ Abdel-Gawad, M. M.; El-Sayed, M. M.; Abdel-Hameed, E. S. 1999. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. Fitoterapia. 70, 371-381.

⁵⁷ El-Saved, M. M. 1998. Molluscicidal steroidal saponins from *Agave ferox*. J. Pharm. Sci. 7, 73-79.

1.4.4. Perfil químico de los extractos de tallo subterráneo de *Z. ulei*

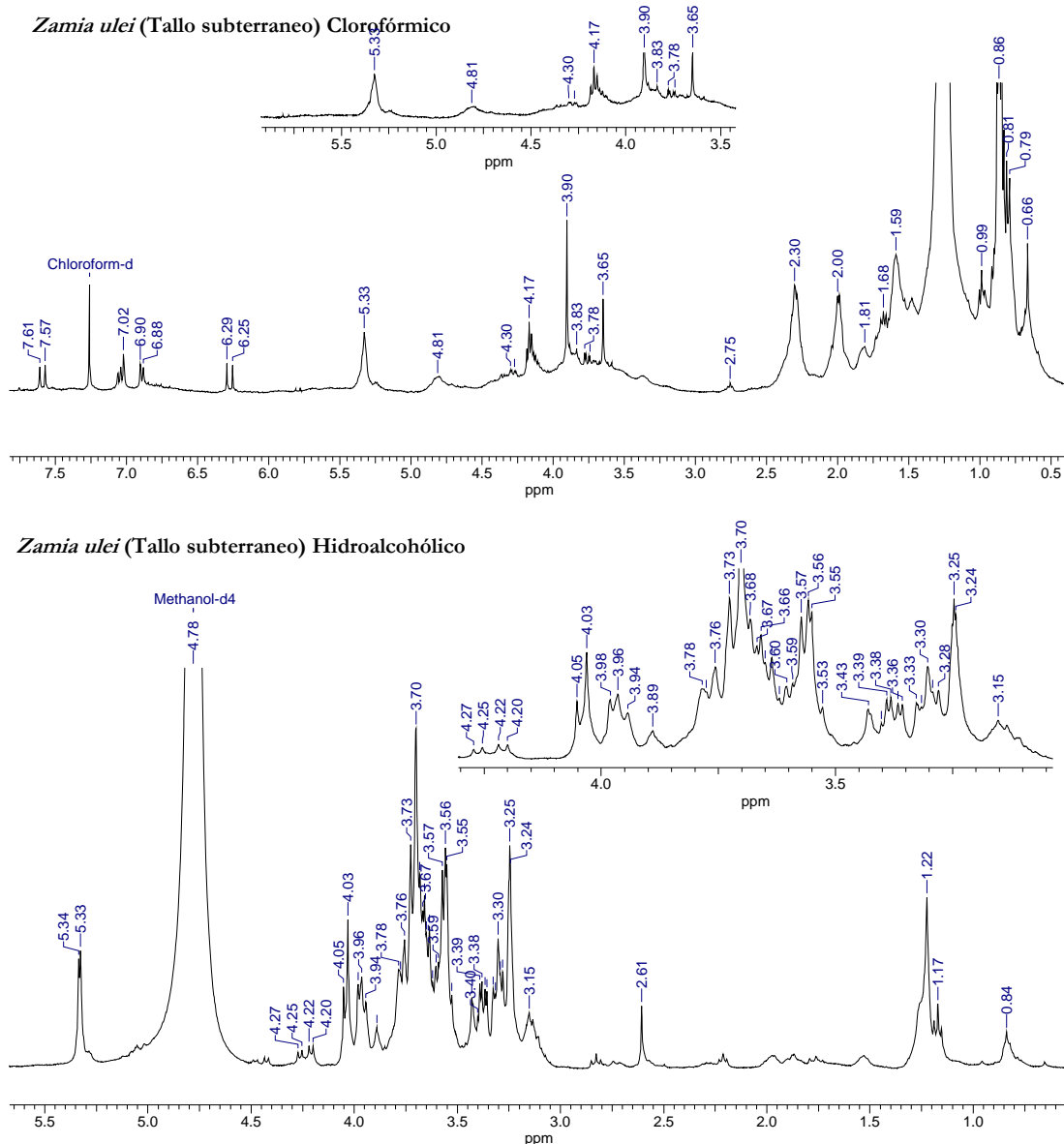


Figura 4: Espectros de RMN de ¹H de los extractos clorofórmico e hidroalcohólico de *Z. ulei*.

Tabla 8: Selección de datos espectroscópicos de los extractos de tallo subterráneo de *Z. ulei*.

Extracto	ppm						
Clorofórmico	-	-	1.59-2.75	-	3.65-4.30	5.33	6.25-7.61
Hidroalcohólico	0.84	1.17-2.61	-	3.15-4.05	3.66-4.27	5.33	-

Los espectros de RNM de ^1H de los extractos clorofórmico e hidroalcohólico de *Z. ulei*, presentan diferencias importantes. En el espectro del extracto clorofórmico se observan desplazamientos químicos a 6.25-7.61 ppm, característicos de compuestos aromáticos. En el espectro del extracto hidroalcohólico se pueden observar desplazamientos químicos entre 3.15 y 5.30 ppm, señales típicas de unidades de monosacáridos. Esto nos sugiere la presencia de al menos un monosacárido unido a una aglicona (Figura 4, Tabla 8). Ambos espectros muestran desplazamientos químicos similares en la región de 3.65-4.30 ppm, que corresponden a protones geminales de grupos hidroxilos y 5.33 ppm, correspondientes a protones geminales de heteroátomos (Figura 4, Tabla 8).

El extracto clorofórmico mostró mayor actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi* (Tabla 2) e insecticida frente a *S. littoralis* (Tabla 4), mientras que el extracto hidroalcohólico no mostró actividad antiparasitaria (Tabla 2).

De las cicadas se han aislado biflavonas diméricas, además de otros compuestos como cicasina, macrozamina⁵⁸ y neocycasina A^{20,59,60}. Se ha descrito la presencia de monoterpenos en los conos reproductores de este género⁶¹. *Z. pumila* contiene sesquiterpenos e hidrocarburos en la composición química de sus conos reproductores que le confiere efectos antiherbívoros⁶¹. Se han encontrado Monosacáridos como arabinosa, fucosa, galactosa, manosa, ramnosa y metilramnosa en el mucílago de varias cicadas incluido el género *Zamia*^{62,63}. De *Z. ulei* se ha aislado Cycasina⁶⁴, un glicosido

⁵⁸ Yagi, F. 2004. Azoxyglycoside content and β -glycosidase activities in leaves of various cycads. *Phytochemistry*. 65, 3243-3247.

⁵⁹ Osborne, R.; Grove, A.; Oh, P.; Mabry T. J.; Ng, J. C.; Seawright, A. A. 1994. The magical and medicinal usage of *Stageria eriopus* in South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 43, 67-72.

⁶⁰ Meurer, Grimes, B.; Stevenson, D. W. 1994. The biflavones of the Cycadales revisited: biflavones in *Stangeria eriopus*, *Chigua restrepoi* and 32 other species of Cycadales. *Biochem. Syst. Ecol.* 22, 595-603.

⁶¹ Pellmyr, O.; Tang, W.; Groth, I.; Bergstroem, G.; Thien, L. B. 1991. Cycad cone and angiosperm floral volatiles: inferences for evolution of insect pollination. *Biochem. Syst. Ecol.* 19, 623-627.

⁶² Stevenson, D. W.; Gigliano, G.; Siniscalco, G. 1989. The systematic value of the monosaccharide composition and distribution pattern of *Cycad mucilages*. *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 185-190.

⁶³ De Luca, P.; Moretti, A.; Sabato, S.; Siniscalco, G. G. 1982. A comparative study of *Cycad mucilages*. *Phytochemistry*. 21, 1609-1611.

⁶⁴ Schneider, D.; Wink, M.; Sporer, F. 2002. Cycads: their evolution, toxins, herbivores and insect pollinators. *Naturwissenschaften*. 89, 281-294.

derivado de metilazoximetano con actividad antibacterial, antifúngica y antiherbívoro^{64,65}, además de tratarse de un compuesto mutagénico y carcinogénico⁶⁶.

Considerando los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la disponibilidad de material, estudios previos realizados con dichas plantas e información bibliográfica recopilada, se seleccionaron tres plantas: *Zamia ulei*, *Chondodendron tomentosum*, y *Tabebuia serratifolia* para iniciar el fraccionamiento biodirigido, así como su estudio químico y biológico.

⁶⁵ Moretti, A.; Sabato, S.; Siniscalco Gigliano, G. 1983. Taxonomic significance of methylazoxymethanol glycosides in the Cycads. *Phytochemistry*. 22, 115-117.

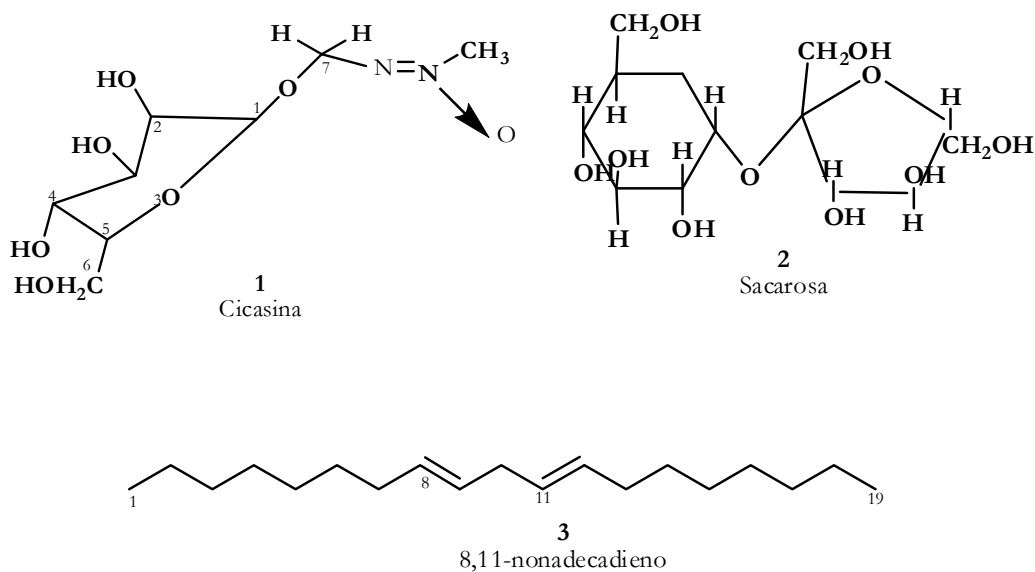
⁶⁶ Hoffmann, G. R.; Morgan, R. W. 1984. Putative mutagens and carcinogens in foods. V. Cycad azoxyglycosides. *Environ. Mutagen.* 6, 103-116.

2. Aislamiento e identificación de productos puros. Evaluación antiparasitaria y citotóxica

2.1. *Zamia ulei*

Como resultado del fraccionamiento biodirigido del extracto etanólico (tallo subterráneo) (pág. 104) se aislaron los siguientes productos: **cycasina (1)**, **sacarosa (2)**, **8,11-nonadecadieno (3)**, **7E (4)** y **6C (6)**. Además la acetilación de **7E (4)** rindió su derivado acetilado **7EA (5)**. Los rendimientos de los productos se indican en la Tabla 9.

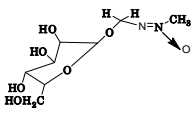
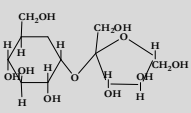
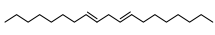
La identificación de los mismos se realizó mediante técnicas espectroscópicas (EM, IR, UV) y experimentos de RMN de ^1H y ^{13}C mono y bidimensionales (COSY, HSQC, NOESY).



De los compuestos identificados, **cycasina (1)** se ha aislado previamente de otras especies como *Cycas revoluta*^{67,68}, *Bowenia spectabilis*, *Stangeria eriopus*, *Ceratozamia mexicana*, *Lepidozamia hopei*, *Encephalartos villosus*, *Macrozamia miquelii* y *Zamia fischeri*⁵⁸.

⁶⁷ Nishida, K.; Kobayashi, A.; Nagahama, T. 1955. Cycasin, a toxiglycoside of *Cycas revoluta*. I. Isolation and structure of cycasin. Bull. Agr. Chem. Soc. Jpn. 19, 77-83.

Tabla 9. Actividad antiparasitaria y citotóxica de compuestos aislados de *Z. ulei* y derivados acetilados. Los resultados se expresan como ED₅₀ (µg/ml).

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
 1	0.014	> 100	> 100	59.54 (37.59-94.31)
 2	16	> 100	> 100	> 100
 3	0.046	> 100	> 100	> 100
4	0.013	54.86 (47.17-63.80)	> 100	65.38 (47.87-89.30)
5	0.66 x 10 ⁻²	> 100	> 100	51.04 (38.07-68.43)
6	0.59 x 10 ⁻²	> 100	> 100	> 100
Nifurtimox			3.39 (1.40-8.19)	13.91 (9.09-21.30)
Anfotericina B		0.04 (0.01-0.12)		10.25 (5.36-19.61)

ED₅₀= Dosis eficaz, necesaria para eliminar el 50% de las células/parásitos. Nifurtimox y Anfotericina B= fármacos de referencia. Entre paréntesis límites de confianza del 95%.

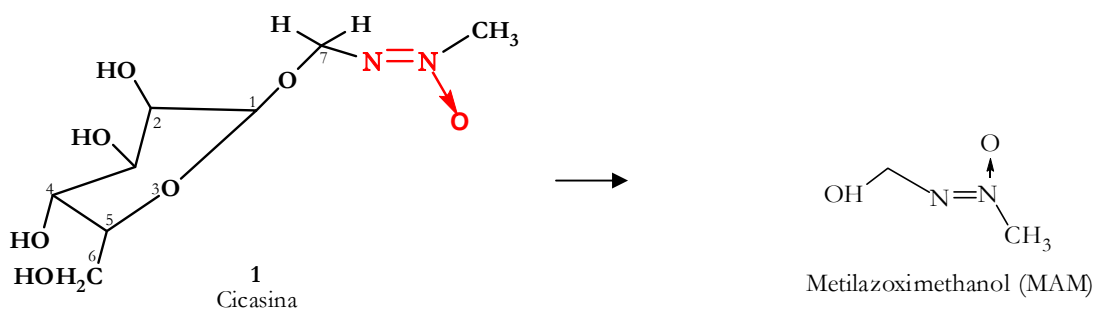
En la tabla 9 podemos observar que **cycasina (1)** no es activa frente a *L. infantum* ni frente a *T. cruzi*, pero muestra citotoxicidad moderada frente a las células CHO. **Sacarosa (2)**, no mostró actividad antiparasitaria ni citotóxica. El hidrocarburo **8,11-nonadecadieno (3)**, no muestra actividad frente a ninguno de los parásitos ensayados ni es tóxico frente a células CHO. Dentro de los compuestos no identificados, **4** muestra actividad moderada frente a *L. infantum*, ninguna frente a *T. cruzi* y es moderadamente citotóxico frente a CHO su derivado acetilado **5**, no muestra

⁶⁸ Nishida, K.; Kobayashi, A.; Nagahama, T. 1956. Cycasin, a new toxic glycoside of *Cycas resoluta*. III. Isolation of cycasin from the stem of Japanese cycad. Seikagaku. 28, 70-74.

actividad frente a ninguno de los parásitos ensayados y es moderadamente tóxico frente a CHO. El compuesto **6** no muestra actividad antiparasitaria ni citotóxica.

Cycasina (1) es un compuesto tóxico del tipo azoxiglicosido (AZG), producido de forma abundante por las cícadas. Representa el mecanismo central de protección de estas plantas contra los herbívoros, su metabolito principal denominado metilazoximetanol (MAM)^{64,69,70}, es el responsable de alteraciones genéticas en diferentes sistemas (bacterias, levaduras, plantas, *Drosophila melanogaster* y células de mamíferos⁶⁶).

En seres humanos y ratones **1** se absorbe a través del tracto intestinal y la placenta, al ser absorbido se produce la hidrólisis de la molécula liberando su metabolito (MAM) provocando intoxicación aguda, así como mutaciones y la iniciación de tumores, pero se sabe poco sobre su modo de acción *in vivo*^{71,72,73}.



⁶⁹ Kobayashi, A.; Matsumoto, H. 1965. Studies on methylazoxymethanol the aglycone of cycasin. Isolation biological and chemical properties. Arch. Biochem. Biophys. 110, 373-380.

⁷⁰ Lythgoe, B.; Riggs, N. V. 1949. Macrozamin, Part I. The identity of the carbohydrate component. J. Chem. Soc. 4, 2716-2718.

⁷¹ Choi, I. J.; Kim, C. J.; Ji, G. E. 1996. A partially purified β -glucosidase from *Bifidobacterium adolescentis* converts cycasin to a mutagenic compound. Lett. Appl. Microbiol. 22, 145-148.

⁷² Gabridge, M. G.; Denunzio, A.; Legator, M. S. 1969. Cycasin: Detection of Associated Mutagenic activity in vivo. Am. Assoc. Adv. Sci. 163, 689-691.

⁷³ Hirono, I.; Hayashi, K.; Mori, H.; Miwa, T. 1971. Carcinogenic effects of cycasin in Syrian golden hamsters and the transplantability of induced tumors. Cancer Res. 31, 283-287.

El grupo azoxy está presente en **1** y es probable que esta característica química pueda haber jugado un papel ecológico importante como defensa frente a herbívoros durante la larga evolución histórica de las cícadas, además tiene actividad antibacteriana y antimicótica^{58,64,65}.

A pesar de su toxicidad existen larvas de lepidópteros (*Eumaeus minyas*, *E. atala*) que se alimentan de raíces, tallos, hojas y tejidos reproductivos de su planta hospedadora, *Zamia loddigesii* (*Zamiaceae*) secuestrando los compuestos químicos que contienen y la utiliza como defensa química frente a su depredador principal *Solenopsis geminata* (*Hymenoptera: Formicidae*), por lo que requieren de adaptaciones fisiológicas que les permitan adquirir, acumular y almacenar estas sustancias. Los estudios realizados han demostrado que **1** está presente en todos los estadios de esta mariposa lo que sugiere que le confiere defensas químicas frente a sus depredadores^{74,75}. Las larvas de *Eumaeus atala* se alimenta de las hojas de *Z. floridana* adquiriendo protección contra sus depredadores naturales; la larva está protegida frente a la toxina ingerida y presenta colores brillantes que indican protección por aposematismo⁷⁶.

En nuestro caso la falta de actividad de **1** frente a los parásitos ensayados puede deberse a que no penetra en el parásito y/o las células por problemas de solubilidad (son compuestos muy polares) por tanto no se produce la hidrólisis y no se libera MAM responsable de su toxicidad.

En cuanto al compuesto **3** no se ha descrito actividad antiparasitaria previa pero sí que es utilizado por muchas especies de hormigas como sistema de comunicación química o para marcar su territorio⁷⁷. El extracto clorofórmico de *Z. ulei* muestra una importante actividad antialimentaria frente a *L. decemlineata*, por lo que la presencia de los compuestos aislados podrían explicar en parte su actividad insecticida.

⁷⁴ Castillo, Guevara, C.; Rico Gray, V. 2003. The role of macrozamin and cycasin (cycadales) as antiherbivore defense. J. Torrey Botanical. Society. 3, 206-217.

⁷⁵ Castillo, Guevara, C.; Rico Gray, V. 2006. Is Cycasin in *Eumaeus minyas* (Lepidoptera: *Lycaenidae*) a predator deterrent?. Interciencia. 27, 465-470.

⁷⁶ Bell, E. A. 2001. Ecological biochemistry and its development. Phytochemistry. 56, 223-227.

⁷⁷ Salzemann, A; Nagnan, P.; Tellier, F.; Jaffe, K. 1991. Leaf-Cutting antatta (Formicidae: Attini) marks its territory with colony-specific dufour gland secretion. J. Chem. Ecol. 18, 183-196.

2.2. *Chondodendron tomentosum*

Teniendo en cuenta el contenido en alcaloides bisbenzilisquinolínicos de esta especie y los resultados presentados en el capítulo anterior, a partir del extracto etanólico de la parte aérea de la planta (corteza y hojas) se obtuvo un extracto alcaloidal que se ensayó frente a las líneas parasitarias y frente a células CHO. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Tabla 10).

Tabla 10. Actividad antiparasitaria y citotóxica de los extractos etanólico y alcaloidal de *C. tomentosum*.

Extracto	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% de inhibición del Crecimiento		% Viabilidad Celular
		<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
Etanólico	800	94.94 \pm 1.4	89.99 \pm 0.9	0.1 \pm 0.1
	400	88.66 \pm 1.3	55.93 \pm 0.3	2.1 \pm 1.6
	200	73.72 \pm 2.0	3.43 \pm 1.3	9.1 \pm 1.9
Alcaloidal	800	100.0 \pm 4.2	82.9 \pm 4.0	0.5 \pm 0.3
	400	100.0 \pm 2.2	90.9 \pm 0.7	0.2 \pm 0.2
	200	100.0 \pm 7.9	96.5 \pm 0.5	0.0

En la Tabla 10 podemos observar que el extracto etanólico de la parte aérea muestra importante actividad frente a *L. infantum*, moderada frente a *T. cruzi* y es muy tóxico frente a las células CHO de forma similar a lo obtenido previamente para los extractos de hojas y corteza (Tabla 2 y 3). Por otro lado, el extracto alcaloidal también presenta una gran actividad frente a ambos parásitos, con porcentajes de inhibición del crecimiento de hasta el 100% en el caso de *L. infantum*; pero también muestra una citotoxicidad importante frente a células de mamífero CHO.

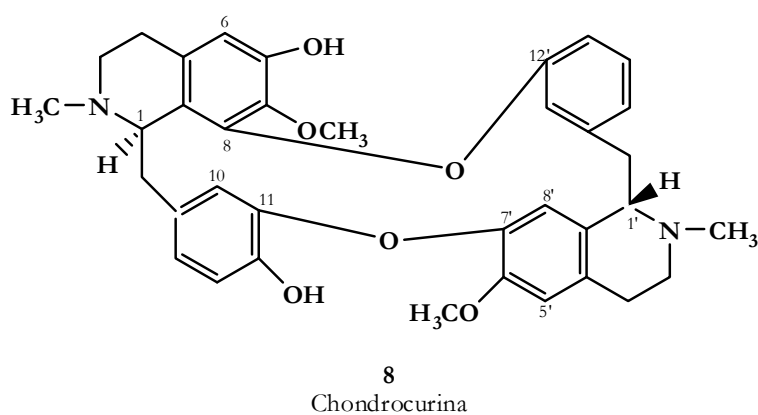
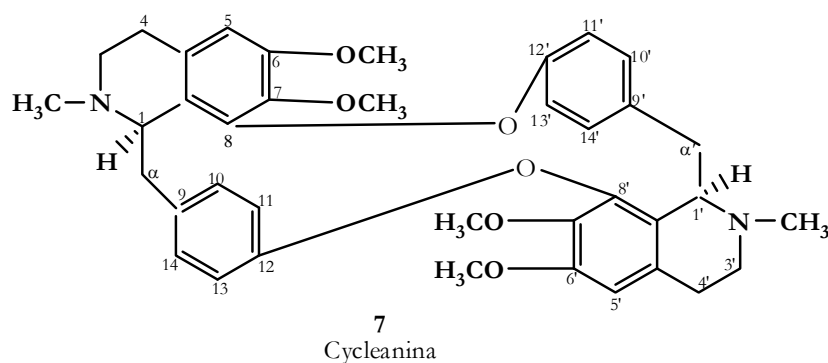
Existen publicaciones sobre extractos alcaloidales de especies de Menispermaceae, como *Cyclea barbata*, cuyo extracto alcaloidal presenta actividad antipalúdica, pero a la vez actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales KB-3, KB-V1 y P-388⁷⁸. *C. tomentosum* se caracteriza porque en su composición química

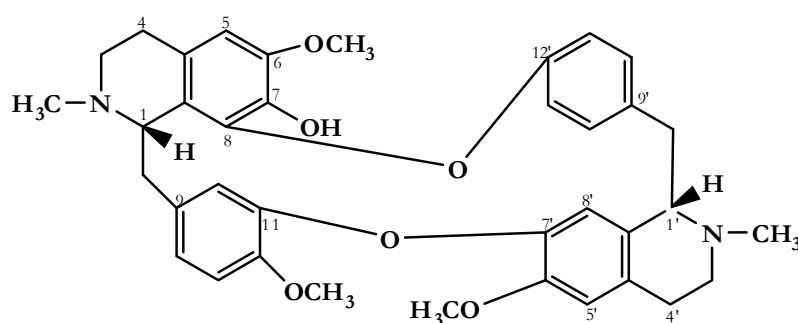
⁷⁸ Long-Ze, Lin; Hui-Ling, Shieh; Angerhoper, C. K.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A. 1993. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cyclea barbata*. J. Nat. Prod. 56, 22-29.

predominan los alcaloides del tipo bisbencilisoquinolínico, pero también se han encontrado alcaloides del tipo aporfina, morfina, hasubanan, y protoberberinas³⁷. Los alcaloides bisbencilisoquinolínicos (BBIs), en general muestran actividad frente a *T. cruzi* y frente a *Plasmodium falciparum*^{40,78}.

Dentro de los alcaloides que se han aislados de *C. tomentosum* están (+)-isochondodendrina, cycleanina, norcycleanina, (+)-chondocurina, (+)-tubocurarina, (+)-chondocurarina y curina³⁷.

El fraccionamiento biodirigido se llevó a cabo a partir del extracto alcaloidal (págs. 109-112) obteniendo los siguientes alcaloides del tipo bisbencilisoquinolínico: **cycleanina (7)**, **chondocurina (8)**, y **12-O-metil(+)-curina (S,S') (9)**. Los rendimientos de los productos se indican en la Tabla 11; y la identificación de los mismos se realizó mediante técnicas espectroscópicas (EM, IR, UV) y experimentos de RMN de ¹H y ¹³C mono y bidimensionales (COSY, HSQC, NOESY).





9
12-O-metil-curina (S,S')

Cycleanina (7) fue aislado por primera vez de *Cissampelos insularis*⁷⁹ además de otras Menispermaceae como *Cyclea insulares*, *C. ochiaiana*, *Coscinium fenestratum*, *Epinetrum cardifolium*, *E. villosum*, *E. manganati*, *Stephania capitata*, *S. glabra*, *S. cepharantha*, *S. epigeae*, *S. pierre*, *S. tetrandia*, y *S. elegans*^{38,80}. Y también se encuentra en otras familias, como Annonaceae (concretamente fue aislado de *Isolona hexaloba*⁸¹). **Chondrocurina (8)** fue aislado por primera vez a partir de *C. tomentosum*⁸² además se aisló de otras especies, *Cyclea barbata*⁸³ y *C. madagascariensis*⁸⁴. Por lo que respecta a **12-O-metil(+)-curina (S,S') (9)** sólo se ha descrito que su enantiomero fue aislado por primera vez de *Guatteria megalophylla*⁸⁵.

⁷⁹ Kondo, H.; Tomita, M.; Uyeo, S. 1937. In Guha, K. P.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R.; 1979. Bisbenzylisoquinoline alkaloids. A review. J. Nat. Prod. 42, 1-85.

⁸⁰ Longanga, Otshudi, A.; Apers, S.; Pieters, L.; Claeys, M.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Van Zeebroeck, A.; Lauwers, S.; Frédérick, M.; Foriers, A. 2005. Biologically active bisbenzylisoquinoline alkaloids from the root bark of *Epinetrum villosum*. J. Ethnopharmacol. 102, 89-94.

⁸¹ Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaunik, P. K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R. 1982. The phytochemistry of the Annonaceae. Phytochemistry. 21, 2783-2813.

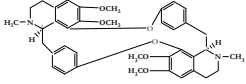
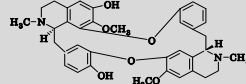
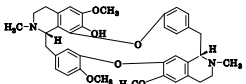
⁸² Dutcher, J. D. 1946. Curare alkaloids from *Chondodendron tomentosum* Ruiz and Pavon. J. Am. Chem. Soc. 68, 419-424.

⁸³ Dame, K.; Pachaly P.; Zymalkawski, F. 1977. Alkaloids from the thai drug drug kha MaO (*Cyclea barbata*, Menispermaceae) V. Isolation and structural elucidation of further bisbenzylisoquinoline alkaloids. Arch. Pharm. (Weinheim, Ger). 310, 95-102.

⁸⁴ Boissier, J. R.; Combes, G.; Pernet, R.; Domoni, C. 1965. Menispermaceae alkaloids of Madagascar: *Cissampelos pareira*, *Cyclea madagascariensis*, *Anisocyclea grandidieri* and *Spirospermum penduliflorum*. Lloydia. 28, 191-198.

⁸⁵ Galeffi, C.; Marini-Bettolo, G. b.; Vecchi, D. 1975. (R, R)-12'-O-methylcurine and (R, R')-O,O-dimethylcurine, two new natural alkaloids from *Guatteria megalophylla* Diels. Gazzetta Chimica Italiana. 105, 1207-1213.

Tabla 11. Actividad antiparasitaria y citotóxica de compuestos aislados de *C. tomentosum*.Los resultados se expresan en ED₅₀ (µg/ml).

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
 7	7.5 x 10 ⁻³	52.96 (29.76-94.21)	> 100	51.41 (27.62-57.69)
 8	4.8 x 10 ⁻³	0.85 (0.55-1.29)	21.69 (13.50-33.19)	45.48 (37.81-54.69)
 9	2.2 x 10 ⁻²	0.76 (0.46-1.25)	22.83 (15.74-33.10)	41.69 (38.15-45.57)
Nifurtimox			3.39 (1.40-8.19)	13.91 (9.09-21.30)
Anfotericina B		0.04 (0.01-0.12)		10.25 (5.36-19.61)

ED₅₀= Dosis eficaz, necesaria para eliminar el 50% de las células/parásitos. Nifurtimox y Anfotericina B= fármacos de referencia. Entre paréntesis límites de confianza del 95%.

En la tabla 11 podemos observar que el compuesto 7 presenta moderada actividad frente a *L. infantum*, no presenta actividad frente a *T. cruzi*, y muestra ligera citotóxicidad frente a células de mamífero. Si comparamos los resultados obtenidos con 7 frente a los de los fármacos de referencia, podemos observar que ésta resulta ser menos activa frente a ambos parásitos; pero al mismo tiempo menos citotóxica frente a las células de mamífero CHO.

Chondrocurina (8) muestra una fuerte actividad frente a *L. infantum*, moderada actividad frente a *T. cruzi* y moderada toxicidad frente a células CHO. Si comparamos los resultados obtenidos en nuestro trabajo con los obtenidos a partir de los fármacos de referencia, podemos observar que a pesar de que 8 muestra una importante actividad frente a *L. infantum* sigue siendo menos activo que el fármaco de referencia. Para *T. cruzi*

la actividad es también menor que la del fármaco de referencia, sin embargo **8** es menos citotóxico que anfotericina B y nifurtimox.

12-O-metil(+)-curina (S,S') (9) presenta una importante actividad frente a *L. infantum*, buena actividad frente a *T. cruzi* y moderada toxicidad frente a CHO, inferior a la de los fármacos de referencia.

El compuesto **7** solo mostró actividad frente a *L. infantum*, siendo considerablemente menos activo frente a este parásito que **8** y **9**, que mostraron actividades similares frente a los parásitos ensayados, esta variación en la actividad puede ser debido a que el compuesto **7** está constituido por dos unidades isoquinolinicas del tipo coclaurina unida por dos puentes éter, cabeza-cola, en C-8 y C-12' y C-8' y C-12⁸⁶, mientras que los compuestos **8** y **9** muestran una unión del tipo cabeza-cola por los C8-C12' y C11-C7'. Además estudios previos con compuestos como isotetrandrina, feantina, cefarantina y cycleanina (**7**) ponen de manifiesto el importante papel que juega la estereoquímica en la actividad demostrada³⁷. Estos alcaloides constituyen un valor añadido, pues potencian el efecto antimalárico de diferentes fármacos comerciales que habitualmente se usan para combatir esta enfermedad y actúan en ocasiones como agentes que revierten la resistencia del parásito⁴².

El compuesto **7** también se ha aislado de *Albertisia villosa* (Menispermaceae) entre otros alcaloides. Esta planta es utilizada en medicina tradicional para el tratamiento de malaria y otras enfermedades infecciosas, siendo **7** el más activo frente a *P. falciparum*⁴⁴, debido a la presencia de un grupo N-CH₃ en posición 2 común en estos alcaloides. Además presenta actividad selectiva frente a HIV-2 (cepa ROD), a la vez que se indica una notable falta de citotoxicidad frente a células de mamífero KB⁴¹. También mostró actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes* y *Klebsiella pneumonia*, además de una actividad fungicida *in vitro* muy potente frente a un amplio espectro de microorganismos patógenos, en particular frente a *Trichophyton longiformis*, *Aspergillus flavus* y *Emoniliiform* sp,

⁸⁶ Scheinmann, F.; Scriven, E. F.V.; Ogbeibe, O. N. 1980. Cycleanine from *Sycolisia scabrida*. Conformational information from the ¹H NMR spectrum at 300 MHz. *Phytochemistry*. 19, 1837-1840.

resultados que han corroborado su utilización en el tratamiento de micosis en humanos⁴⁴.

Para **7** también se ha descrito actividad *in vitro* frente a protozoos flagelados como *Leishmania brasiliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani*, además de no presentar actividad frente a *T. cruzi*⁴³. Sin embargo, otros estudios han demostrado que administrado junto con otros alcaloides del mismo tipo (curina, isotetrandina, limacina y feantina) muestra una fuerte actividad en ratones infectados con las cepas CL y la cepa Y de *T. cruzi*. De estos cinco alcaloides, sólo dos, curina y **cycleanina (7)**, mostraron alta eficacia frente a *T. cruzi* por separado⁴⁰.

El compuesto **8** se ha probado como relajante muscular en gatos⁸⁷ y como supresor del sistema inmune junto con otros tres alcaloides, tetrandina, isotetrandina y cefarantina, siendo **8** el más potente⁸⁸.

Los alcaloides **8** y **7** suprimen la producción *in vitro* de óxido nítrico (NO), que es uno de los indicadores mediadores de la inflamación, estos resultados explican algunos aspectos del mecanismo antiinflamatorio de los alcaloides bisbenziloquinolínicos componentes de la familia Menispermaceae⁸⁹. Además **8**, tiene efecto hepatoprotector y previene las lesiones hepáticas y la necrosis tumoral en ratones⁸⁹.

Los compuesto **8** y **9** fueron aislados además de *Cissampelos mucronata*, cuyo extracto es activo frente a cepas de *P. falciparum* (W2 y D6) resistentes y sensibles a la cloroquina, y presenta moderada citotoxicidad frente a la línea celular tumoral KB^{41,8890}.

No se ha descrito otro tipo de actividad, por lo que, teniendo en cuenta nuestros resultados, podemos decir que además de presentar actividad antiplasmodial muestran actividad antileishmanial y antitripanosomal.

⁸⁷ Chingmuh, L. 2003. Conformation, action and mechanism of action of neuromuscular blocking muscle relaxants. *Pharmacol. Therapeut.* 98, 143-169.

⁸⁸ Kondo, Y.; Imai, Y.; Hojo, H.; Hashimoto, Y.; Nosohe, S. 1992. Selective inhibition of T-Cell dependent immune responses by bisbenzylisoquinoline alkaloids in vivo. *Int. J. Immunopharmac.* 14, 1181-1186.

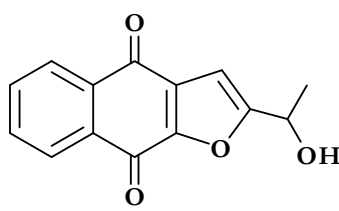
⁸⁹ Kodo, Y.; Takano, F.; Hojo, H. 1993. Inhibitory Effect of Bisbenzylisoquinoline alkaloids of nitric oxide production in activated macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 46, 1887-1892.

⁹⁰ Tshibangu, J. N.; Wright, A. D.; Köning, G. M. 2003. HPLC isolation of the antiplasmodially active bisbenzylisoquinoline alkaloids present in roots of *Cissampelos mucronata*. *Phytochem. Analysis.* 14, 13-22.

Estudios previos han descrito que los alcaloides bisbencilisoquinolínicos actúan sobre la tripanotión reductasa (enzima patógeno-específica que no existe en el hombre y por tanto supone una de las principales dianas en la búsqueda de nuevos fármacos frente a *T. cruzi* de forma similar a los inhibidores previamente descritos de esta enzima (nitrofuranos y naftoquinonas) que cuentan con una carga positiva unida a un grupo hidrófobo. Los alcaloides bisbencilisoquinolínicos, cargados positivamente, podrían ser atraídos al sitio activo de la tripanotión reductasa, cargada negativamente y al producirse la unión, la enzima quedaria inhibida interfiriendo en la catálisis de la reducción del disulfuro de tripanotona (compuesto responsable del intercambio de oxígeno), reduciéndose los niveles de oxígeno en el parásito y produciendo su muerte.⁹¹

2.3. *Tabebuia serratifolia*

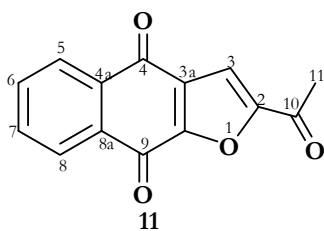
Se realizó el fraccionamiento biodirigido (pág. 117) a partir del extracto etanólico de la parte aérea de la planta (corteza) dando como resultado el aislamiento de tres mezclas, identificadas por gases-masa (**mezclas 1-3**), y dos compuestos puros: **2-(1-hidroxi-etil)-4H,9H-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona (10)** y **2-acetil-4H, 9H-nafto [2,3-b] furano-4,9-diona (11)**. Los rendimientos de los productos y las mezclas se indican en la Tabla 15. La identificación de los mismos se realizó mediante técnicas espectroscópicas (EM, IR, UV) y experimentos de RMN de ¹H y ¹³C mono y bidimensionales (COSY, HSQC, NOESY).



10

2-(1-hidroxi-etil)-4H,9H-nafto-[2,3-b]furano-4,9-diona

⁹¹ Fournet, A.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Rojas de Arias, A.; Guinaudeau, H.; Breidenbach, P.; Andrew Karplus, F. 1998. Trypanocidal Bisbenzylisoquinoline alkaloids are inhibitor of trypanothione reductasa. J. Enzyme inhibition. 13, 1-9.

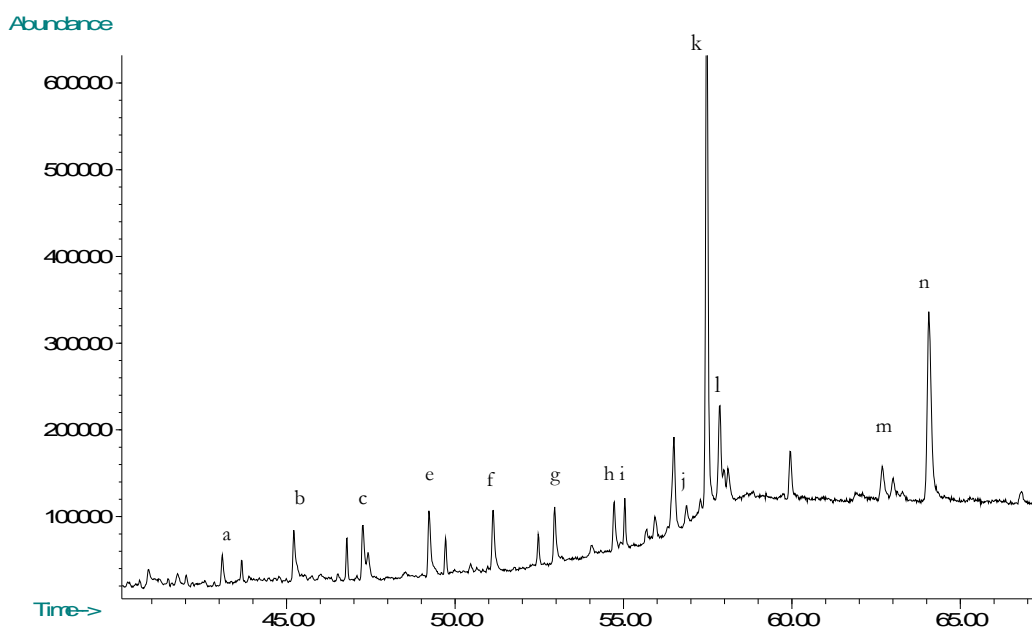


11
2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona

Ambos compuestos han sido aislado previamente a partir de *Tabebuia cassinoides* y *T. ocracea*⁹²

El análisis de la composición química de la **mezcla 1** se determinó por cromatografía de gases-masas (GC-MS).

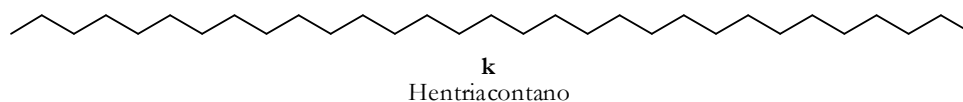
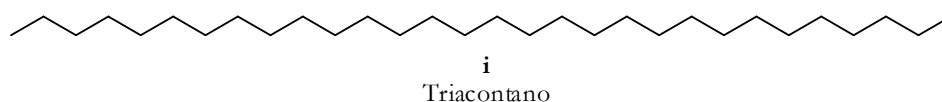
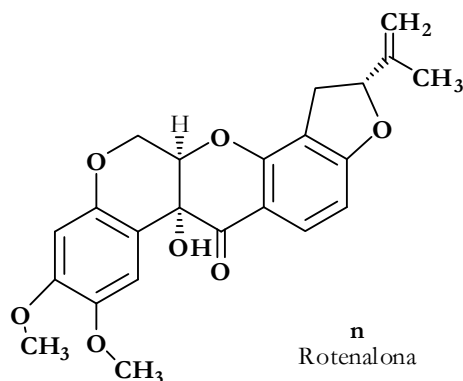
Cromatograma de Gases **Mezcla 1**



La **mezcla 1** está constituida por un total de catorce compuestos que en su mayoría son hidrocarburos saturados de la familia de los alcanos (Tabla 12). Sin embargo, el componente mayoritario es el isoflavonoide **rotenalona (n)** (15,1%);

⁹² Zani, C. L.; De Oliveira, A. B.; De Oliveira, G. G. 1991. Furonaphtoquinones from *Tabebuia ocracea*. *Phytochemistry*. 30, 2379-2381.

seguido de **triacontano (i)** (6.2%), **hentriacontano (k)** (6.0%) y un compuesto no identificado de $[M]^+$ 396 (6.0%).



No se han encontrado datos sobre el aislamiento previo de los dos primeros compuestos mayoritarios sin embargo se ha publicado que **hentriacontano (k)** fue aislado por primera vez de la cáscara de arroz (*Oryza sativa*)⁹³ y corresponde al 0.001% de los componentes; también se ha aislado de *Antigonon leptopus*⁹⁴, en donde se encuentra en un 0.01%; y además es componente de los aceites esenciales de *Centauro calcitrapa* y *C. sphaerocephala*⁹⁵.

⁹³ Chung, I. M.; Hamh, S. J.; Ahmand, A. J. 2005. Confirmation of potential herbicidal agents in hulls of rice, *Oryza sativa*. J. Chem. Ecol. 31, 1339-1352.

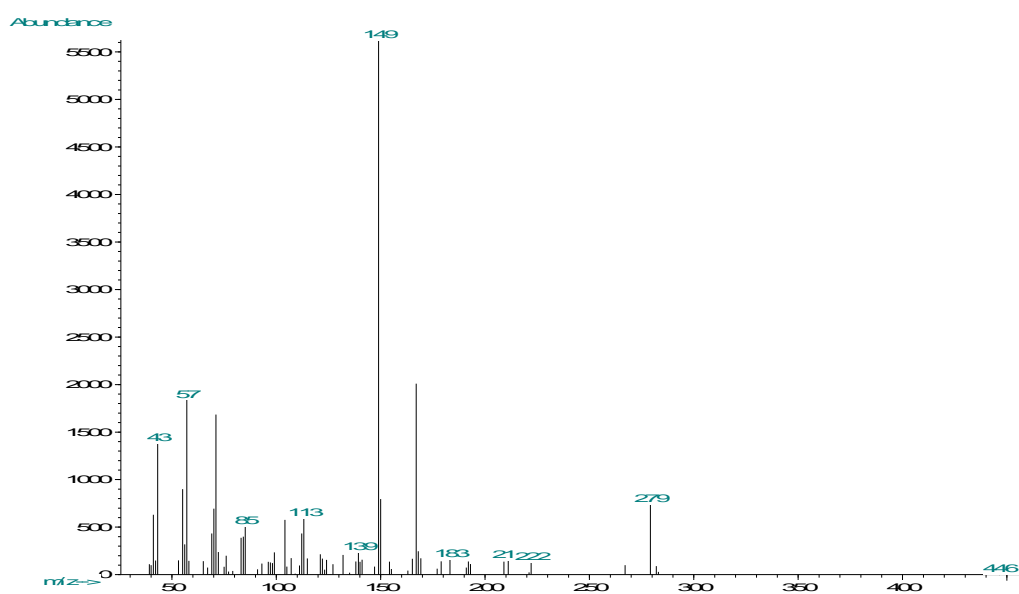
⁹⁴ Vanisree, M.; Alexander-Lindob, R. L.; Dewitt, D. L.; Nair, M. G. 2008. Functional food components of *Antigonon leptopus* tea. Food Chem. 106, 487-492.

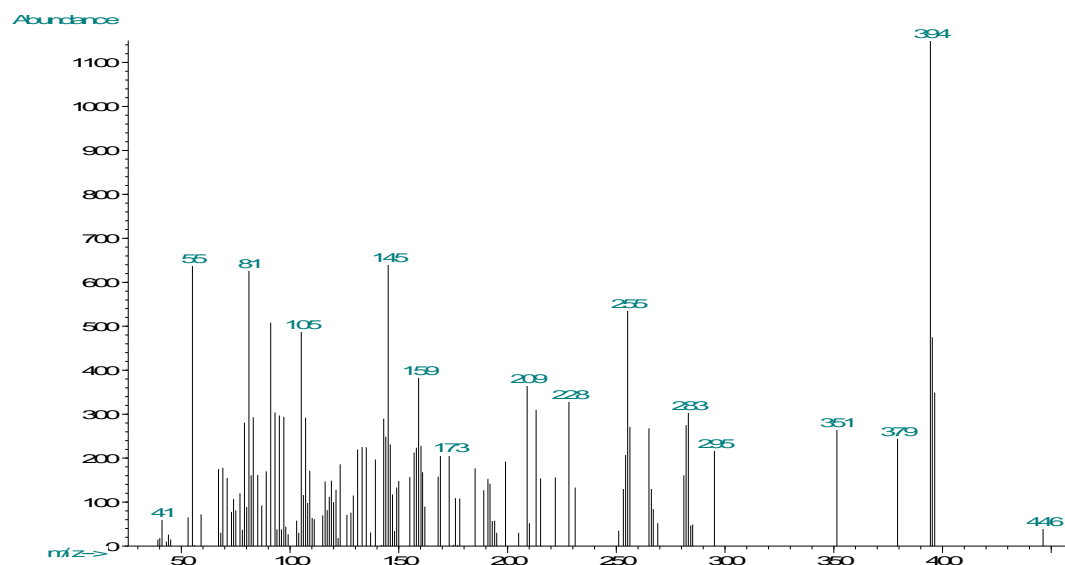
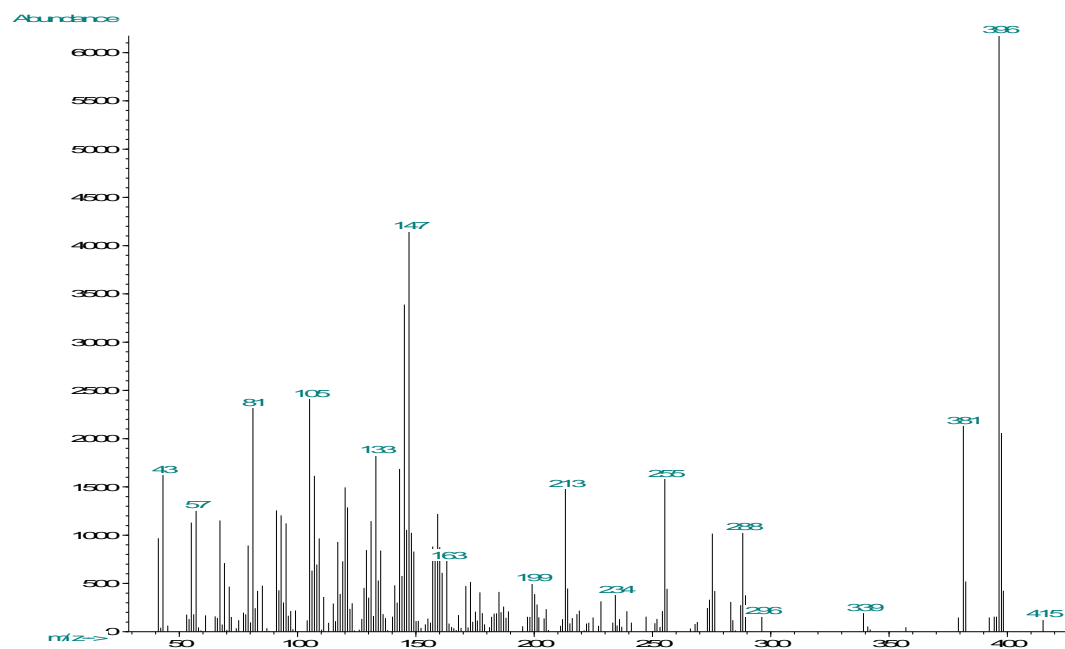
⁹⁵ Senatore, F.; Landolfi, S.; Celik, S.; Bruno, M. 2006. Volatile components of *Centaurea calcitrapa* L. and *Centaurea sphaerocephala* L. ssp. *sphaerocephala*, two Asteraceae growing wild in Sicily. Flavour Frag. J. 21, 282-285.

Tabla 12. Composición de la mezcla 1, obtenida por cromatografía de gases masa.

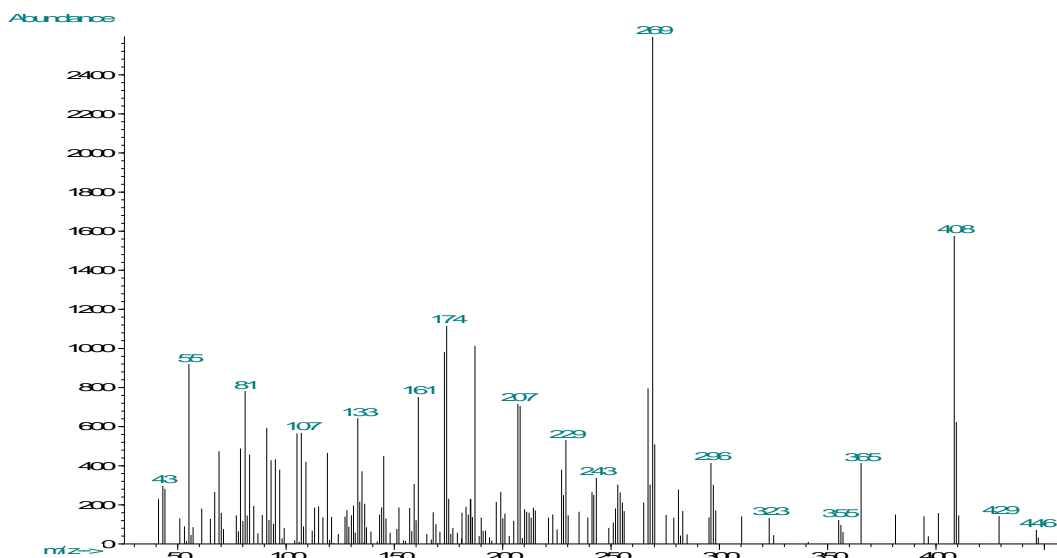
	Compuesto	Tiempo de Retención	Abundancia Relativa (%)
a	Tricosano	43.09	1.5
b	Tetracosano	45.22	3.1
c	Pentacosano	47.25	2.7
d	222[M] ⁺ (57, 71,149,167,279)	47.43	1.4
e	Hexacosano	49.24	3.9
f	Heptacosano	51.13	3.7
g	Octacosano	52.97	3.0
h	Nonacosano	54.72	2.5
i	Triacotano	56.49	6.2
j	394[M] ⁺ (55,81,145,255)	56.88	1.0
k	Hentriacotano	57.86	6.0
l	396[M] ⁺ (81,105,145,147)	57.86	6.0
m	408[M] ⁺ (55,81,174,187,269)	62.67	2.7
n	Rotenalona	64.06	15.1
Total Compuestos Identificados %			58.8

De los catorce compuestos que conforman la **mezcla 1** cuatro no se identificaron y a continuación se muestran los espectros de masa de cada uno de ellos.

Espectro de masa del Compuesto **d** (222[M]⁺)

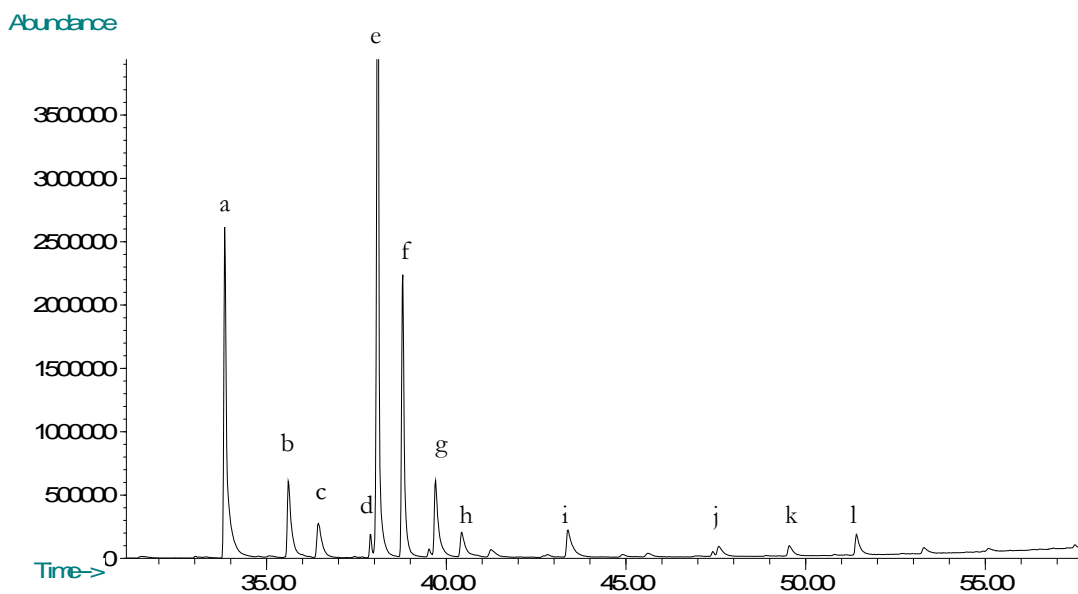
Espectro de masa del compuesto **j** ($394[M]^+$)Espectro de masa del Compuesto **1** ($396[M]^+$)

Espectro de masa del compuesto **m** (408[M]⁺)



La **mezcla 2** está conformada por un total de doce compuestos (Tabla 13) que fueron identificados por GC-MS.

Cromatograma de Gases **Mezcla 2**



Los compuestos mayoritarios de la **mezcla 2** son **octadecenoato de metilo** (36.2%), **éster metílico del ácido hexadecanoico** (20.5%) y **éster metílico del ácido octadecanoico** (15.6%).

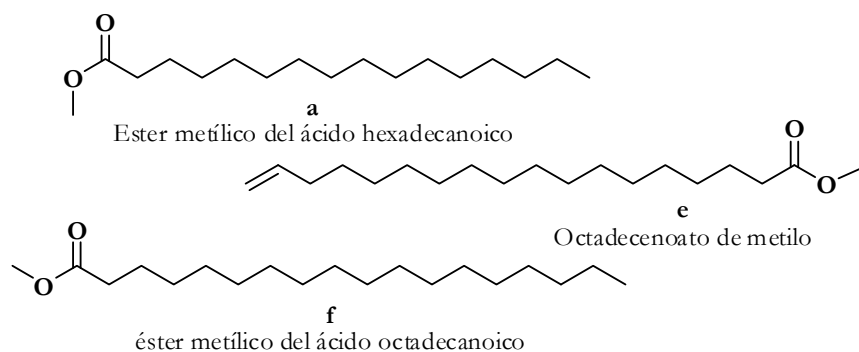
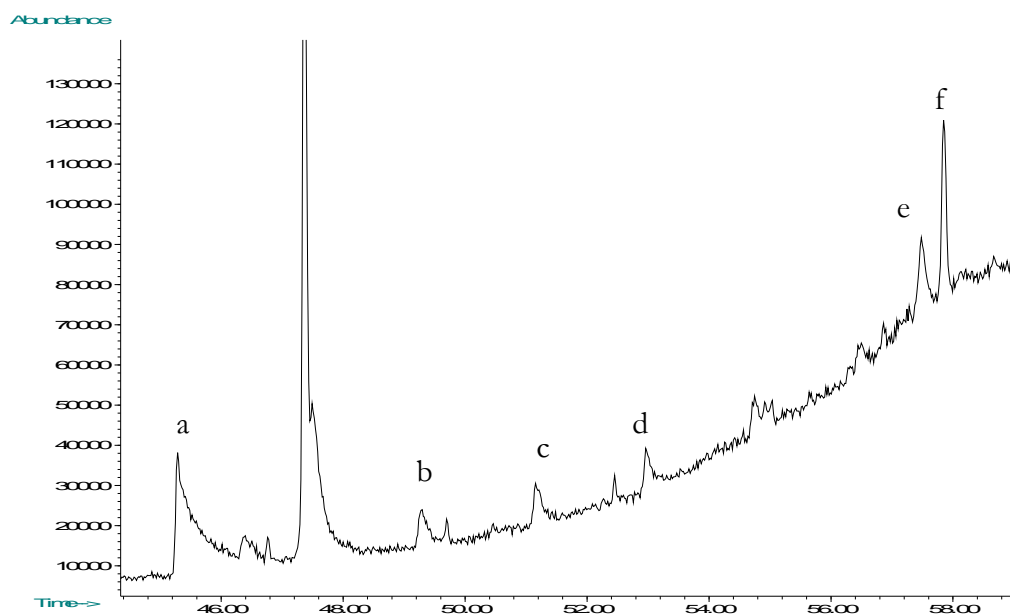


Tabla 13. Composición de la mezcla 2, obtenida por cromatografía de gases masa

Compuesto	Tiempo de Retención	Abundancia Relativa (%)
a Éster metílico del ácido hexadecanoico	33.85	20.5
b Éster etílico del ácido hexadecanoico	35.62	6.4
c Éster metílico del ácido. heptadecanoico	36.47	3.4
d Octadecadienoato de metilo	37.89	1.0
e Octadecenoato de metilo	38.10	36.2
f Éster metílico del ácido octadecanoico	38.79	15.6
g Octadecenoato de etilo	39.70	6.6
h Éster etílico del ácido octadecanoico	40.43	2.7
i Éster metílico del ácido eicosanoico	43.40	3.1
j Docosanoato de metilo	47.59	1.1
k Éster metílico del ácido tricosanoico	49.55	0.9
l Éster metílico del ácido tetracosanoico	51.42	1.9
Total de Compuestos Identificados %		99.4

La **mezcla 3** está constituida por seis compuestos identificados por cromatografía de gases masa (Tabla 14).

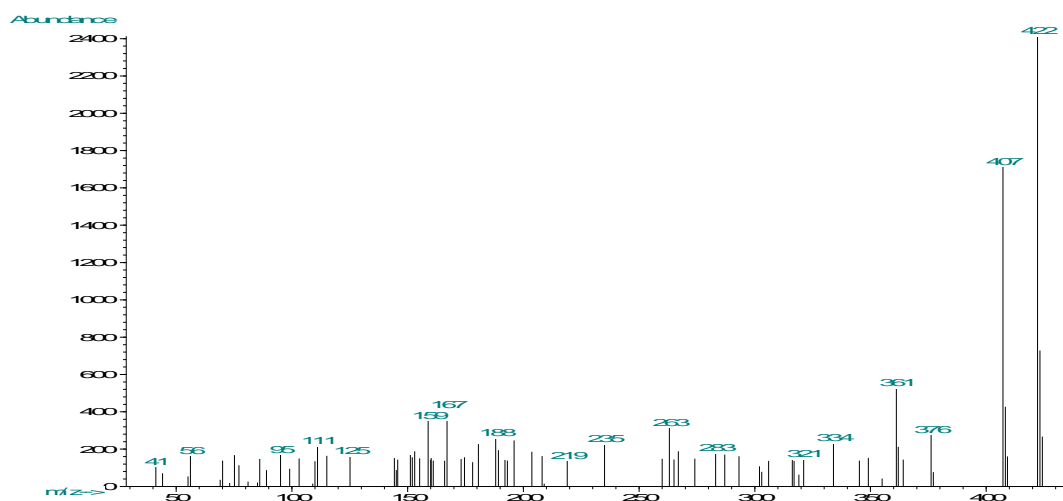
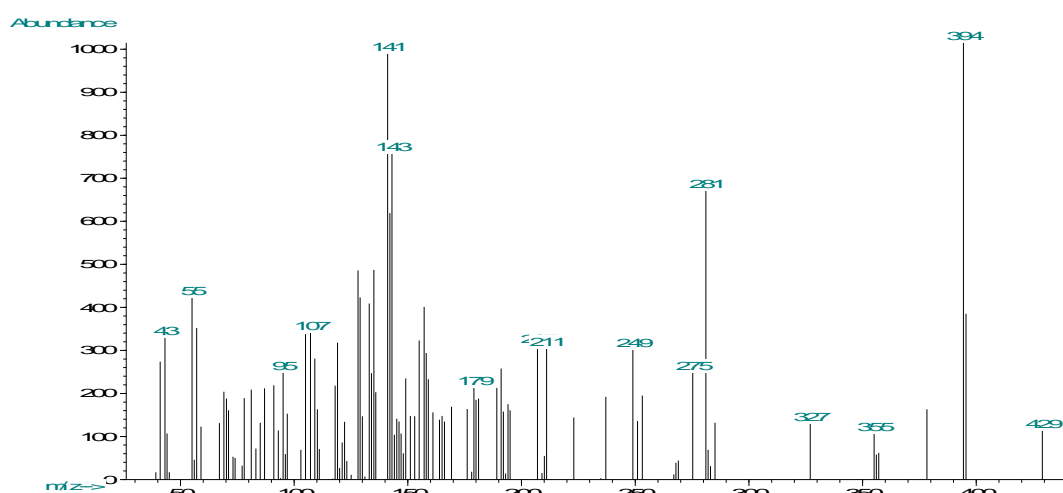
Cromatograma de Gases Mezcla 3



Los compuestos mayoritarios de esta mezcla, de $[M]^+$ 422 (6.7%) y $[M]^+$ 396 (6.9%), no pudieron ser identificados, por lo que se muestran los espectros de masa de cada uno de ellos, siendo los minoritarios **eicosano** (1.5%), **docosano** (1.7%) y **octadecano** (1.4%) de un total de compuestos identificados del 23.6%.

Tabla 14. Composición de la mezcla 3, obtenida por cromatografía de gases masa

	Compuesto	Tiempo de Retención	Abundancia Relativa (%)
a	422 $[M]^+$ (159,167,263,361)	45.28	6.7
b	Eicosano	49.27	1.5
c	Docosano	51.15	1.7
d	Octadecano	52.96	1.4
e	394 $[M]^+$ (55,107,128,141,157,281)	57.50	5.4
f	396 $[M]^+$ (81,105,147,381)	57.84	6.9
	Total de Compuestos identificados %		23.6

Espectro de Masa del Compuesto **a** (422[M]⁺)Espectro de Masa del Compuesto **e** (394[M]⁺)

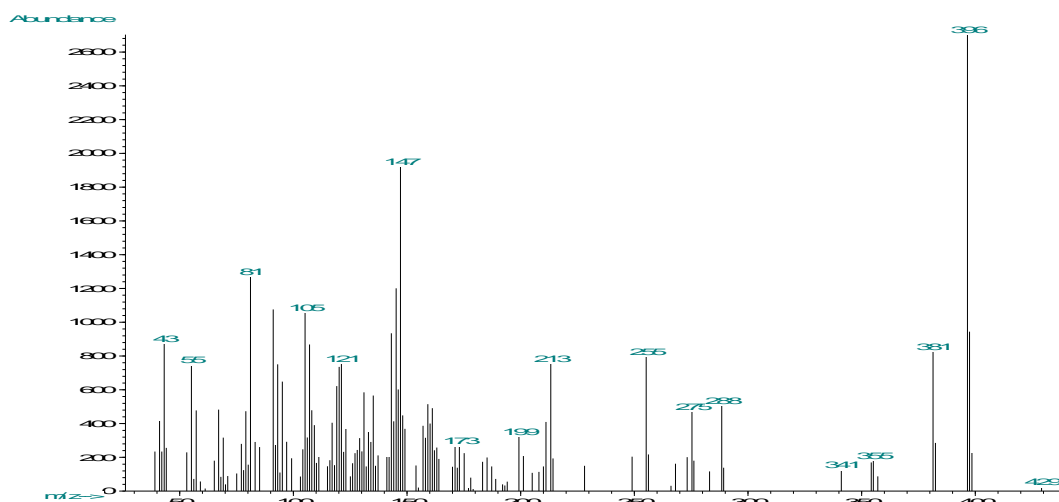
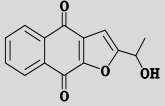
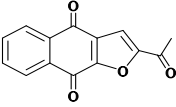
Espectro de Masa del Compuesto f (396[M]⁺)

Tabla 15. Actividad antiparasitaria y citotóxica de compuestos aislados de *T. serratifolia*.

Los resultados se expresan en ED₅₀ (µg/ml).

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
Mezcla 1	1.4 x 10 ⁻³	35.07 (18.99-64.76)	> 100	67.54 (48.11-94.82)
Mezcla 2	1.9 x 10 ⁻³	> 100	> 100	43.18 (26.53-69.96)
Mezcla 3	0,9 x 10 ⁻³	2.49 (2.22-2.80)	1.57 (0.55-4.49)	11.02 (8.92-13.62)
 10	0.45 x 10 ⁻³	0.19 (0.03-1.09)	0.01 (0.001-0.04)	2.72 (1.12-6.61)
 11	0.38 x 10 ⁻³	2.15 (1.97-2.35)	2.36 (2.03-2.75)	5.39 (4.16-6.97)
Nifurtimox			3.39 (1.40-8.19)	13.91 (9.09-21.30)
Anfotericina B		0.04 (0.01-0.12)		10.25 (5.36-19.61)

ED₅₀ = Dosis eficaz, necesaria para eliminar el 50% de las células/parásitos. Nifurtimox y Anfotericina B = fármacos de referencia. Entre paréntesis límites de confianza del 95%.

Como se aprecia en la tabla 15, la **mezcla 1** mostró moderada actividad frente a *L. infantum*, ninguna frente a *T. cruzi* y baja citotoxicidad frente a CHO.

La **mezcla 2** no muestra actividad frente a ninguno de los parásitos ensayados, pero sí una moderada toxicidad frente a células CHO.

La **mezcla 3** muestra importante actividad frente a *L. infantum* y *T. cruzi*, además de ser citotóxica frente a células CHO.

Los compuestos **10** y **11** muestran importante actividad frente a *L. infantum* y *T. cruzi* y citotoxicidad frente a CHO. Si los comparamos con los fármacos de referencia, anfotericina B y nifurtimox, podemos observar que en el caso de *L. infantum*, la ED₅₀ de ambos compuestos resulta bastante baja, acercándose mucho a la ED₅₀ de la anfotericina B. En el caso de *T. cruzi*, la ED₅₀ de ambos productos es menor que la ED₅₀ del nifurtimox, siendo el **compuesto 11** 1.5 veces más activo, y el **compuesto 10** 300 veces más que el fármaco de referencia.

No se han encontrado datos sobre la actividad biológica de dos de los compuestos mayoritarios de la **mezcla 1**, sin embargo se ha descrito que **hexacosano**, presente en un 3.9%, fue aislado también de *Trichodesma amplexicaule*, que es una planta medicinal de la familia Annonaceae con propiedades antifúngicas y antimicrobianas⁹⁶. **Hexacosano** por si solo es activo de forma importante frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y frente al hongo *Rhizoctonia phaseoli*⁹⁶. **Hexacosano** junto con heptacosano, tetracosano, pentacosano y tricosano, además de otros compuestos, forman los componentes del aceite volátil de *Cynanchum stauntonii*, planta utilizada durante años por la medicina china para el tratamiento del tracto respiratorio superior. Este aceite mostró actividad frente al virus de la gripe *in vitro* e *in vivo* y su acción se cree que podría deberse al bloqueo de la absorción del virus por las células de acogida, impidiendo la replicación del mismo. La mezcla del aceite volátil es muy

⁹⁶ Singh, B.; Singh, S. 2003. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. Phytother. Res. 17, 814-816.

complicada de separar por lo que sólo se han realizado estudios de actividad como mezcla⁹⁷.

Tetracosano, que corresponde al 3.1 % de la **mezcla 1**, muestra actividad insecticida frente a huevos de insectos parasitoides⁹⁸. Por otro lado **octacosano**, que se encuentra en un 3%, se ha aislado también de *Moschosma polystachyum*, de la familia Lamiaceae, y presenta actividad insecticida frente al mosquito *Culex quinquefasciatus*⁹⁹.

Pentacosano (2.7%) se encuentra como componente minoritario del aceite esencial de *Dittrichia viscosa*; dicho aceite muestra actividad frente a *Helicobacter pylori*¹⁰⁰ y también se encuentra en pequeñas trazas, junto con tricosano, en el aceite esencial de *Achillea falcata*, de la familia Asteraceae, que muestra actividad frente a bacterias gram-negativas, pero es muy poco probable que la actividad se deba a **pentacosano** ya que se encuentra en cantidades muy pequeñas¹⁰¹.

Otro de los componentes de la **mezcla 1** es el **nonacosano**, que se encuentra en un 2.5 %. Este compuesto es un constituyente del aceite esencial de *Heliotropium indicum*, que muestra actividad significativa frente a *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Ra¹⁰². También está presente entre los componentes de *Saxifraga stolonifera*, que muestra actividad anticancerosa¹⁰³. Finalmente podemos mencionar que al realizarse un estudio de la composición química de aceites esenciales y extractos de tabaco oriental, se encontró como componente principal el **nonacosano**, y tanto los aceites como los

⁹⁷ Zai-Chang, Y.; Bo-Chu, W.; Xio-Sheng, Y.; Qiang, W. 2005. Chemical composition of the volatile oil from *Cynanchum stauntonii* and its activities of anti-influenza virus. *Colloids and Surfaces B: Biointerphases*. 43, 198-202.

⁹⁸ Paul, A. V. N.; Singh, S.; Singh, A. K. 2002. Kairomonal effects of some saturate hidricarbons on the egg parasitoids, *Trichogramma brasiliensis*, (Ashmead) and *Trichogramama exiguum*, Pinto, Platner and Oatman (Hym. Trichogrammatidae). *J. Appl. Ent.* 126, 409-416.

⁹⁹Rajkumar, S. Jebanesan, A. 2004. Mosquitocidal activities of octacosane from *Moschosma polystachyum* Linn (Lamiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 90, 87-89.

¹⁰⁰ Graça, M.; Faleiro, L.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. Casanova, J. 2008. Suceptibility of *Helicobacter pylori* to essential oil of *Dittrichia viscosa* subps. *Revolute. Phytother. Res.* 22, 259-263.

¹⁰¹ Senatore, F.; Napolitano, F.; Arnold, N. A.; Bruno, M. Herz, W. 2005. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcate* L. (Asteraceae). *Flavour Frag. J.* 20, 291-294.

¹⁰² Machan, T.; Korth, J.; Liawruangrath, B.; Liawruangrath, S. Pyne, S. G. 2006. Composition and antituberculosis activity of the volatile oil *Heliotropium indicum* Linn. Growing in Phitsanulok. Thailand. *Flavour Frag. J.* 21, 265-267.

¹⁰³ Chen, Z.; Liu, Y. M.; Yang, S.; Song, B. A.; Xu, G. F.; Bhadury, P. S.; Jin, L. H.; Hu, D.Y.; Liu, F.; Xue, W. Zhou, X. 2008. Studies on the chemical constituents and anticancer activity of *Saxifraga stolinif* (L) Meeb. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 1337-1344.

extractos mostraron actividad frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*¹⁰⁴.

Tricosano se encuentra en la **mezcla 1** en un 1.5%. Este hidrocarburo, junto con heptacosano y nonacosano, también fueron identificados dentro de los compuestos volátiles presentes en *Centaurea calcitrapa*, donde los hidrocarburos resultaron ser los componentes mayoritarios, y en *C. sphaerocephala*, donde heptacosano es considerado el componente mayoritario. Estas plantas de la familia Asteraceae presentan actividad frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas, aunque se cree que se debe a otros compuestos presentes en su composición⁹⁵. Además se han estudiado las fracciones del extracto hexánico de *Cupressus lusitanica* de Camerún, que presentan como principales componentes hidrocarburos, eicosano (41.1%), **tricosano** (37.3%) y heptacosano (22.2%). Dichas fracciones muestran actividad antifúngica frente a *Microsporum audouinii*, *Microsporum langeronii*, *Microsporum canis*, *Tryphophyton rubrum* y *T. tonsurans*¹⁰⁵.

Teniendo en cuenta las actividades descritas y las proporciones en que cada uno de los compuestos se encuentra en la **mezcla 1**, podemos decir que es muy probable que la actividad demostrada frente a *L. infantum* se deba principalmente a la unión de ellos.

No se han publicado datos de actividad biológica de los compuestos que conforman la **mezcla 2**.

En cuanto a la actividad publicada para los compuestos que forman parte de la **mezcla 3**, podemos mencionar que **eicosano** se encuentra presente en el aceite esencial de *Peumus boldus*, planta de la familia Monimiaceae, originaria de Chile, que muestra una gran actividad frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, y frente a hongos como es el caso de *Candida albicans*,

¹⁰⁴ Palic, R.; Stojanovic, G.; Alagic, S.; Nikolic, M. Lepojevic, Z. 2002. Chemical Composition and antimicrobial activity of the essential oil CO₂ extracts of the oriental tobacco, Prilep. Flavour Frag. J. 17, 323-326.

¹⁰⁵ Kuate, J. R.; Bessiere, J. M.; Zollo, P. H. A.; Kuate, S. P. 2006. Chemical Composition antidermatophytic properties of volatile fractions of hexanic extract from leaves of *Cupressus lusitanica* Mill. from Cameroon. J. Ethnopharmacol. 103, 160-165.

Fusarium oxysporum y *Aspergillus niger*¹⁰⁶. **Eicosano** junto a **octacosano**, que también forma parte de la **mezcla 3**, fueron descritos como componentes volátiles de el alga roja *Jania rubens*, mostrando actividad moderada frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas¹⁰⁷. También está presente en un 41.1% en fracciones del extracto hexánico de *Cupressus lusitanica* de Camerún, junto con otros hidrocarburos; dichas fracciones muestran actividad antifúngica frente a *Microsporium audouinii*, *Microsporium langeronii*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* y *T. tonsurans*¹⁰⁵. **Eicosano** forma parte de los componentes del aceite volátil de *Cynanchum stauntonii*, planta utilizada para el tratamiento del tracto respiratorio superior; este aceite mostró actividad frente al virus de la gripe *in vitro* e *in vivo* y su acción se cree que podría deberse al bloqueo de la absorción del virus por las células de acogida, impidiendo la replicación del mismo⁹⁷.

Octadecano, otro de los componentes de la **mezcla 3**, forma parte del aceite obtenido a partir de extractos de larvas de *Holotrichia dioamphalia*. Tanto los extractos como los aceites mostraron actividad antifúngica¹⁰⁸.

La actividad mostrada por la **mezcla 3** probablemente se deba al conjunto de sus componentes.

En cuanto a la actividad biológica de **10** y **11** podemos mencionar que ambas furonaftoquinonas tienen importante actividad frente a células tumorales KB, con unos valores de ED₅₀ de 1.0 y de 2.0 µg/ml⁹²¹⁰⁹ para **11** y **10**, respectivamente. Además **10** también ha sido aislado de *Kigelia pinnata* (Bignoniaceae), posee importante actividad *in vitro* frente a *T. brucei brucei*, *T. brucei rhodiense*¹¹⁰, *P. falciparum* y *P. berghei*.¹¹¹; es considerado un agente antibacteriano y antiviral importante a pesar de su alta citotoxicidad, y

¹⁰⁶ Mazutti, M.; Mossi, A. J.; Cansian, R. L.; Corazza, M. L.; Dariva, C.; Oliveira, V. 2008. Chemical Profile and antimicrobial activity of Boldo (*Peumus boldus* Molina). Extracts obtained by compressed carbon dioxide extraction. Braz. J. Chem. Eng. 25, 427-434.

¹⁰⁷ Karabay, N. U.; Sukatar, A.; Ozdemir, G.; Horzum, Z. 2007. Antimicrobial Activity of volatile components and various extracts of the red alga *Jania rubens*. Phytoter. Res. 21, 153-156.

¹⁰⁸ Qing-Feng Dong; Jun-Lan Wang; Shu-Feng Zhang; Zhi, Wang.; Chong-Xi Zhang; He Gao; Han-Ming Zhang; Lei Zhang. 2008. Antifungal Activity of crude extracts and fat-soluble constituents of *Holotrichia dioamphalia* larvae. Bioresource Technol. 99, 8521-8523.

¹⁰⁹ Madhusudana Roa, M.; Kingston, D. G. I. 1982. Plant Anticancer Agents. XII. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. J. Nat. Prod. 45, 600-604.

¹¹⁰ Fournet, A.; Muñoz, V. 2002. Natural Products as Trypanocidal, Antileishmanial and Antimalarial Drugs. Curr. Trop. Med. Chem. 2, 1215-1237.

¹¹¹ Weiss, C. R.; Moideen, S. V. K.; Croft, S. L.; Houghton, P. J. 2000. Activity of Extracts and Isolated Naphthoquinones from *Kigelia pinnata* against *Plasmodium falciparum*. J. Nat. Prod. 63, 1306-1309.

presenta actividad frente a una amplia gama de microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *S. faecalis*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *S. dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* y *P. vulgaris*)¹¹².

Entre las naftoquinonas bioactivas descritas para el género *Tabebuia* esta el lapachol, aislado de los árboles de la familia Bignoniaceae y Verberaceae¹¹³. α -lapachona ha sido aislada con anterioridad de *T. serratifolia*, y l - α -lapachona se ha aislado de otras especies de *Tabebuia*. Lapachol, α lapachona y β lapachona son activos contra *Schistosoma mansoni* y *Trypanosoma cruzi*; lapachol muestra marcada actividad leishmanicida *in vitro*, pero el mecanismo por el cual produce la lisis de los amastigotes intracelulares en cultivo aún no se ha podido determinar; β -lapachol muestra la mayor actividad frente a *T. cruzi*^{114,115} además interfiere en el metabolismo de oxígeno de las células tumorales, bloqueando la respiración celular y la generación de radicales libres de oxígeno¹¹⁶.

Se han descrito diferentes actividades biológicas para las quinonas, como por ejemplo: citostática contra varias líneas tumorales^{117,118}, antiinflamatoria¹¹⁹, bactericida y

¹¹² Kuete, V.; Eyong, K. O.; Folefoc, G. N.; Beng, V. P.; Hussain, H.; Krohn, K.; Nkengfack, A. E. 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extract and the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. Die Pharmazie. 62, 552-556.

¹¹³ De Moura, K.C. G.; Emery, A. S.; Neves, Pinto, C.; Do Carmo, M.; Pinto, F. R.; Dantas, A. P.; Salomao, K.; De Castro, S. L.; Pinto, A. V. 2001. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and Some heterocyclic derivatives: A review from an interdisciplinary study. J. Braz. Chem. Soc. 12, 325-338.

¹¹⁴ Do Campo, R.; Lopes, J. N.; Cruz, F.S.; De Souza, W. 1977. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by β -lapachone. Exp. Parasitol. 42, 142-149.

¹¹⁵ Do Campo, R.; Cruz, F. S.; Boveris, A.; Muniz, R. P.; Esquibel, D. M. 1978. Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in beta-lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Arch. Biochem. Biophys. 186, 292-297.

¹¹⁶ Hussain, H.; Krohn, K.; Uddin Ahmad, V.; Abbas Miana, G.; Robert Green, I. 2007. Lapachol: an overview. Special Issue Reviews and Accounts. ARKIVOC. 2, 145-171.

¹¹⁷ D'Albuquerque, I. C.; Maciel, M. C. N.; Shuler, A. R.; De Araújo, M. C.; Medeiros, Maciel, G.; Cavalcanti, M. S. B.; Gimeno Martins, D.; Lins Lacerda, A. 1972. Preparação e primeiras observações sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogos inferiores na série da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). Rev. Inst. Antibiot.(Recife). 12, 31-40.

¹¹⁸ Dimen, R. D.; Ebisuzaki, K. 1997. The search for novel anticancer agents: a differentiation-based assay and analysis of a folklore product. Anticancer Res. 17, 1027-1033.

¹¹⁹ De Almeida, E. R.; Da Sila Filho, A. A.; Dos Santos, E. R.; Lopes, C. A. 1990. Antiflammatory action of lapachol. Ethnopharmacol. 29, 239-241.

fungicida^{120,121}, antiviral^{122,123,124}, antipalúdica¹²⁵ y antihelmíntica frente a *Schistosoma mansoni*¹²⁶.

El modo de acción antiparasitario de la furonaftoquinona **10** no se conoce; es posible que sea similar al descrito para otras naftoquinonas que actúan induciendo el estrés oxidativo, reduciendo el consumo de oxígeno en la cadena respiratoria he inhibiendo el transporte de electrones en el hígado de rata¹²⁷. Además se a descrito que la actividad de las naftoquinonas frente a cepas de *Plasmodium falciparum* sensibles y resistentes a cloroquina es posible debido a la presencia de un grupo metilo que aumente su lipofilia favoreciendo la acumulación de la droga en la mitocondria del parásito¹¹¹.

En nuestro caso podemos decir que la diferencia de las actividades de los compuestos puede deberse a la presencia de un grupo hidroxietil en la cadena lateral de **10** y un grupo carbonilo en la cadena lateral del compuesto **11**, responsable de su polaridad, aumentando la actividad del compuesto **10** por ser menos polar y por tanto de más fácil absorción frente al compuesto **11**, aunque los dos son muy activos. Es la primera vez que se describe la actividad de estos compuestos frente a *L. infantum* y *Trypanosoma cruzi* aunque se ha descrito su actividad para otras especies de *Trypanosoma*.

¹²⁰ Guiraud, P.; Staiman, R.; Campos, Takaki, G. M.; Seigle, Murandi, F.; Simeon de Buochberg, M. 1994. Comparison of antibacterial and antifungal of lapachol and β -lapachol. Plant. Med. 60, 373-374.

¹²¹ Gafner, S.; Wolfender, J. L.; Nianga, M.; Stoeckli, Evans, H.; Hostettmann, K.; 1996. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia leavis* roots. Phytochemistry. 42, 315-327.

¹²² Pinto, A. V.; Pinto, M. de C.; Lagrota, M. H.; Wigg, M. D.; Aguiar, A. D. 1987. Antiviral activity of naphthoquinones. I. Lapachol derivatives against enteroviruses. Rev. Latinoam. Microbiol. 29, 15-20.

¹²³ Lagrota, M. H.; Wigg, M. D.; Aguiar, A. N.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R. 1986. Estudio in vitro com derivados do lapachol. Rev. Latinoam. Microbiol. 28, 221-226.

¹²⁴ Santos, M. G. M.; Lagrota, M. H. C.; Wigg, M. D.; Miranda, M. M. F.; Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R. 1992. Antiviral activity of naphthoquinone. Rev. Bras. Farm. 73, 78-80.

¹²⁵ Fieser, L. F.; Berliner, E.; Bondhus, F.; Chang, F. C.; Dauben, W. G.; Ettliger, M. G.; Fawa, Z, G.; Fields, M.; Heidelberger, C.; Heymann, H.; Vaughan, W. R.; Wilson, E.; Moore, E. E.; Moore, M. B.; Zaugg, H. E. 1948. Naphthoquinones Antimalarials. I. General Survey. J. Am. Chem. Soc. 70, 3151-3155.

¹²⁶ Pinto, A. V.; Pinto, M. C. F. R.; Gilbert, B.; Pellegrino, J.; Mello, R. T. 1977. *Schistosomiasis mansoni*: blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: i. Naphthoquinones and derivatives. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 71, 133-135.

¹²⁷ Colman De Saizarbitoria, T.; Anderson, J. E.; Alfonso, D.; MacLaughlin, J. L. 1997. Bioactive Furonaphthoquinones from *Tabebuia barbata*, Bignoniaceae. Acta Cient. Venezuela. 48, 42-46.

3. Actividad antiparasitaria y citotóxica de los géneros *Aspidosperma* y *Geissospermum* (Apocynaceae) y sus alcaloides

Además de las plantas consideradas en los capítulos anteriores, en este estudio también se han realizado ensayos de actividad antiparasitaria y citotóxica con extractos etanólicos de hojas y cortezas, extractos alcaloidales ácidos, básicos y neutros de hojas y corteza, así como con alcaloides aislados de *Geissospermum reticulatum*, *Aspidosperma desmanthum*, *A. spruceanum*, *A. schultesii* y *A. rigidum*, que se describen en el apartado 1.1 del capítulo de Material y Métodos.

3.1. *Geissospermum reticulatum*

En la Tabla 16 se muestra la actividad antiparasitaria y citotóxica de los diferentes extractos obtenidos de *G. reticulatum*. En general podemos observar que existe mayor actividad frente a *L. infantum*, con porcentajes de mortalidad de van desde 100% en el caso del extracto alcaloidal básico de hojas (EABH), hasta 81.1% en el caso del extracto alcaloidal ácido de hojas (EAAH), a 400 µg/ml. La actividad frente a *T. cruzi* es menor en relación a la de *L. infantum*; los extractos más activos son el extracto alcaloidal ácido de corteza (EAAC), con porcentajes de mortalidad similares a los obtenidos frente a *L. infantum*; el extracto alcaloidal básico de corteza (EABC), con porcentajes de actividad superiores en relación con *L. infantum* sólo a las dos concentraciones más altas ensayadas y el EABH, con porcentajes de actividad inferiores con respecto a los obtenidos frente a *L. infantum*. El EAAH sólo presentó actividad a la mayor concentración ensayada, y finalmente, el extracto etanólico de la corteza (EEC) no mostró actividad frente a *T. cruzi*.

En cuanto a la citotoxicidad de los extractos ensayados podemos observar que sólo cuatro de ellos no son tóxicos. El EEC deja de ser citotóxico a partir de 400 µg/ml, al igual que el EAAH. El EAAC y el EABC dejan de ser tóxicos a la menor concentración ensayada, siendo el menos tóxico el EABC, con un porcentaje de viabilidad celular del 75.78%.

La falta de actividad de EEC frente a *T. cruzi* sugiere una actividad selectiva. Además podemos decir que *L. infantum* muestra mayor sensibilidad frente a los alcaloides de *G. reticulatum*. Por lo tanto y teniendo en cuenta la actividad antiparasitaria obtenida, los extractos que resultan más interesantes para continuar con su estudio químico son los extractos alcaloidales ácidos y básicos de corteza y hojas.

Tabla 16. Actividad antiparasitaria y citotóxica de extractos etanólico y alcaloidales de *G. reticulatum*.

Extracto	Concentración (µg/ml)	% de mortalidad		% de viabilidad
		<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
EEC	800	98.33±0.3	46.33±1.3	0.83±0.7
	400	98.31±0.2	0	84.00±4.7
	200	91.75±7.3	0	100±8.8
EAAC	800	95.47±0.5	99.94±0.0	12.07±0.1
	400	97.35±0.6	99.76±0.0	4.52±0.7
	200	99.08±0.3	99.73±0.0	58.18±3.1
EABC	800	96.22±0.7	100±0.1	0
	400	98.43±0.2	100±0.0	0
	200	99.00±0.0	43.18±1.0	75.78±4.9
EAAH	800	99.09±0.5	71.01±1.3	12.10±1.6
	400	81.11±1.2	38.84±2.8	59.54±4.1
	200	42.15±1.2	0	53.49±3.1
EABH	800	99.09±0.5	96.88±1.3	0
	400	99.76±0.5	64.67±3.2	0
	200	100±0.4	34.69±2.2	8.97±1.7

EEC, extracto etanólico corteza. EAAC, extracto alcaloidal ácido corteza. EABC, extracto alcaloidal básico corteza. EAAH, extracto alcaloidal ácido hojas. EABH, extracto alcaloidal básico hojas.

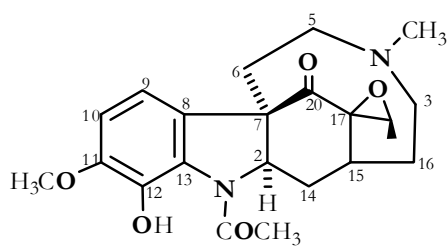
El género *Geissospermum* es reconocido por poseer propiedades antimaláricas, en concreto *G. laeve*, *G. sericeum* y *G. vellosii*⁴³. *G. sericeum* contiene alcaloides indólicos (geissoschizolina, N-óxido-flavopereirina) y β-carbolina, que presentan actividad frente a diversas cepas de *P. falciparum*¹²⁸.

¹²⁸ Steele, J. C.; Veitch, N. C. Simmonds, M. S. Warhurst, D.C. 2002. Indole and beta-carbonile alkaloids from *Geissospermum sericeum*. J. Nat. Prod. 65, 85-88.

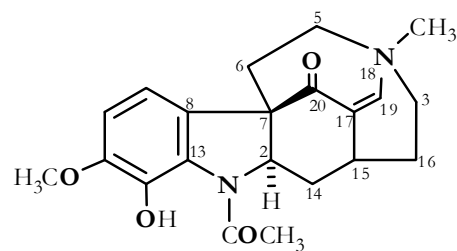
3.1.1. Alcaloides aislados de *Geissospermum reticulatum*

En un trabajo previo se han aislado un total de siete alcaloides de las hojas y de la corteza de esta planta (**12-18**) y tres alcaloides de la corteza (**19-21**)¹²⁹.

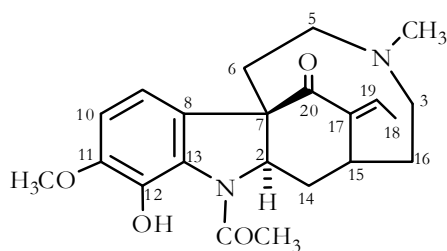
Estructura de los Alcaloides aislados de *Geissospermum reticulatum*



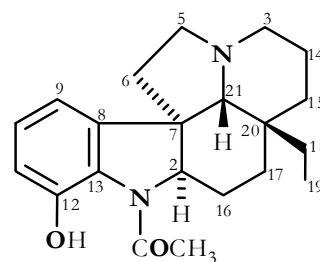
12
Geissosreticulina



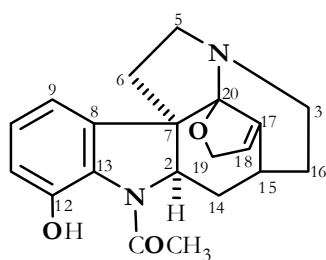
13
(Z) 10-desmetoxi-12-hidroxi-geissosvellina



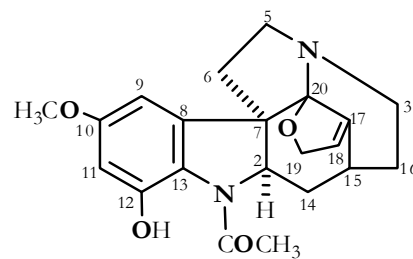
14
(E) 10-desmetoxi-12-hidroxi-geissosvellina



15
12-hidroxi-N-acetilaspidospermidina

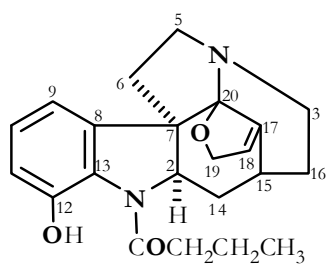


16
Geissospermidina



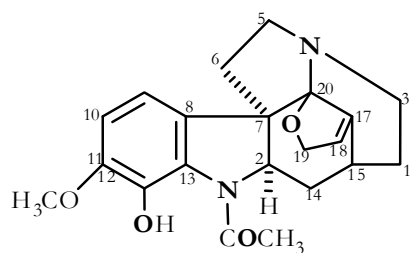
17
10-metoxi-geissospermidina

¹²⁹ Ruíz, W. 2008. Alcaloides indólicos antiparasitarios de especies de la Amazonía peruana. Tesis Doctoral. Universidad de la Laguna. Tenerife.



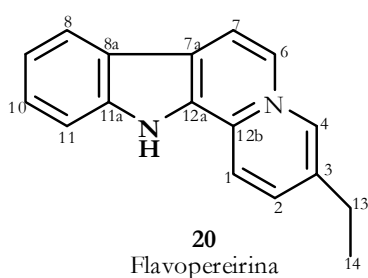
18

N-desacetil-N-butanoilgeissospermidina



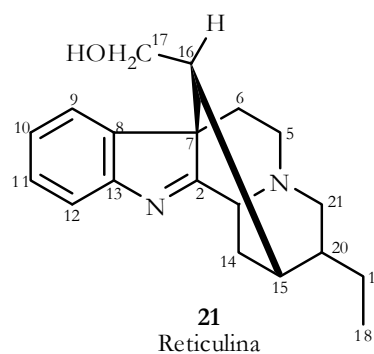
19

11-Metoxigeissospermidina



20

Flavopereirina

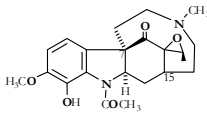
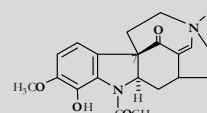
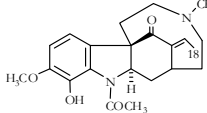


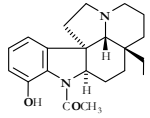
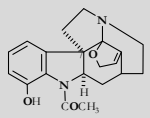
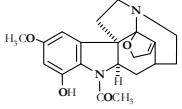
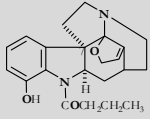
21

Reticulina

Tabla 17. Actividad antiparasitaria y citotóxica de los alcaloides 12-18.

Los resultados se expresan en ED₅₀ (µg/ml).

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
 12	1.63	>100	>100	>100
 13	0.72	>100	>100	>100
 14	0.41	>100	>100	>100

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
 15	0.17	7.71 (5.13-1.56)	41.70 (27.92-62.28)	16.74 (8.48-33.05)
 16	0.76	>100	>100	>100
 17	0.72	>100	>100	≈100
 18	0.16	52.22 (34.24-79.65)	>100	≈100
Nifurtimox			3.39 (1.40-8.19)	13.91 (9.09-21.30)
Anfotericina B		0.04 (0.01-0.12)		10.25 (5.36-19.61)

ED₅₀= Dosis eficaz, necesaria para eliminar el 50% de las células/parásitos. Nifurtimox y Anfotericina B= fármacos de referencia. Entre paréntesis límites de confianza del 95%.

En la tabla 17 se muestran los resultados de actividad antiparasitaria de los alcaloides ensayados. Sólo dos alcaloides presentaron actividad antiparasitaria. El alcaloide **12-hidroxi-N-acetilspidospermidina** o **desmetilspidospermina (15)** aislado de las hojas, muestra elevada actividad frente a *L. infantum*, moderada actividad frente a *T. cruzi*, y es moderadamente toxico frente a la línea celular CHO. Es similar estructuralmente a los alcaloides **30** y **32** aislados de *Aspidosperma desmanthum* (Tabla 19).

El compuesto **15** fue aislado previamente de *A. discolor*, *A. eburneum*, *A. neblinae*¹³⁰, *A. pyricollum*¹³¹ y *A. exalatum*¹³². Se ha descrito actividad frente a *P. falciparum* de **aspidospermidina** y **aspidospermina**, estructuralmente relacionados con **15**, **30** y **32**¹³³.

El compuesto **18 (desacetil-N-butanoilgeissospermidina)**, aislado de las hojas, muestra actividad moderada-baja frente a *L. infantum*. Del grupo estructural de los compuestos **16-18** se deduce la importancia del N-sustituyente. No se conocen datos previos de actividad antiparasitaria ni citotóxica. Por tanto, y teniendo en cuenta estos resultados, la actividad de los extractos de corteza puede deberse a los alcaloides que no han sido ensayados por no estar disponibles; dichos alcaloides son **11-metoxigeissospermidina (19)**, **flavopereirina (20)** y **reticulatina (21)**.

Concretamente **flavopereirina** tiene actividad antiplasmodial y citotóxica¹³⁴ y es capaz de interactuar selectivamente con células cancerosas¹³⁵. Por su parte el compuesto **21** es tóxico con moderada selectividad frente a células tumorales¹³⁶, lo que los hace interesantes para continuar con su estudio biológico.

3.2. *Aspidosperma desmanthum*

En la Tabla 18 se puede observar que existe una clara selectividad de los extractos frente a los modelos ensayados. Ambos extractos (EAAH y EAAC) mostraron una elevada actividad frente a los promastigotes de *L. infantum*, con porcentajes de mortalidad similares; mientras que frente a *T. cruzi* podemos decir que solo el EAAH

¹³⁰ Thomas D. W.; Schones H. K.; Biemann.K. 1969. The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology *Experientia*. 25, 678-685.

¹³¹ Arndt R. R.; Djerassi Carl. 1965. Alkaloids studies L. V.19-deydroyohimbine, a novel alkaloid from *Aspidosperma pyricollum*. *Experientia*. 21, 566.

¹³² Verpoorte, R.; Koskuyck, E.; Tjin A. Tsoi, A.; Ruigrok, C. L. M.; G.; Baerheim-Svendsen; A. 1983. Medicinal-Plant of Surinam. *Plant. Med.* 48, 283-289.

¹³³ Mitaine-Offer A. C.; M. Sauvain; A. Valentin; J. Callapa; M. Mallié; Zèches-Harnot; M. 2002. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indol Alkaloids. *Phytomedicine*. 9, 142-145

¹³⁴Phillipson J. D.; Wright C. W.; Kirby G. C.; Warhurst D. C.; 1993. Tropical plants as sources of antiprotozoal agents. In KR Downum, J. T Romeo, HA Stafford (eds), *Phytochem. Trop. Plant.* 1-40.

¹³⁵ Beljanski, M.; Beljanski, M. S. 1982. Selective inhibition of in vitro synthesis of cancer DNA by alkaloids carboline class. *Expel. Cell. Biol.* 50, 79-87.

¹³⁶ Segraves, N. L.; Robinson, S. J.; Garcia, D.; Said, S. A.; Fu, X.; Schmitz, F. J.; Pietraskiewicz, H.; Crews, P. 2004. Comparison of fascaplysin and related alkaloids: a study of structures, cytotoxicities, and sources. *J. Nat. Prod.* 67, 783-792.

presentó una actividad moderada-baja. En cuanto a la toxicidad con CHO, estos extractos presentan una actividad modera-alta excepto a la concentración más baja.

Tabla 18. Actividad antiparasitaria y citotóxica de extractos alcaloides de *A. desmanthum*.

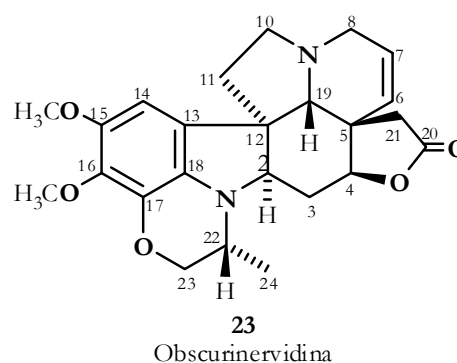
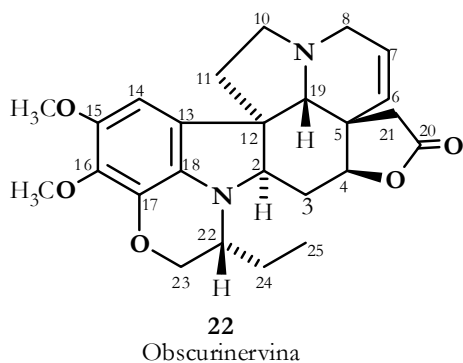
Extracto	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% de mortalidad		% de viabilidad
		<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
EAAH	800	86.49 ± 0.1	93.02 ± 0.6	2.89 ± 1.7
	400	86.06 ± 1.1	60.80 ± 0.9	0
	200	80.56 ± 1.6	32.92 ± 0.9	65.65 ± 3.7
EAAC	800	88.06 ± 0.6	13.98 ± 4.2	9.03 ± 1.4
	400	89.04 ± 0.1	0	1.95 ± 0.5
	200	83.51 ± 1.3	0	100 ± 5.7

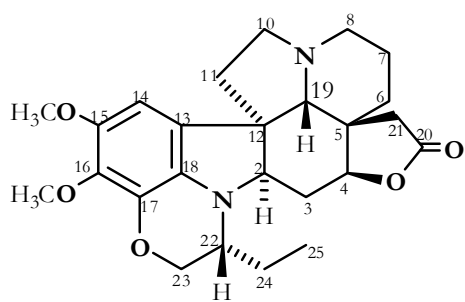
EAAH, extracto alcaloidal ácido hojas; EAAC, extracto alcaloidal ácido corteza.

3.2.1. Alcaloides aislados de *Aspidosperma desmanthum*

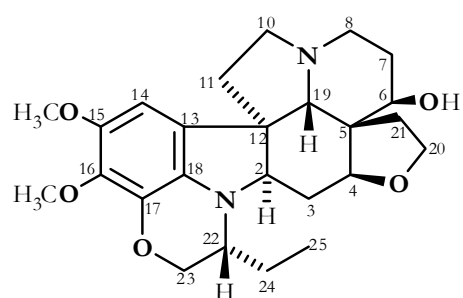
En un trabajo previo de *A. desmanthum* se han aislado quince alcaloides indólicos, cuatro del extracto etanólico de hojas (22-25), cinco del extracto de la corteza (26-29 y 33) y seis de la corteza de la raíz (30-32, y 34-36)¹²⁹.

Estructura de los Alcaloides aislados de *Aspidosperma desmanthum*

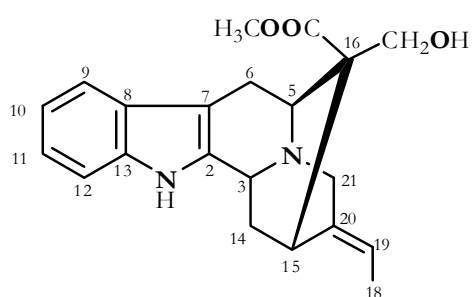




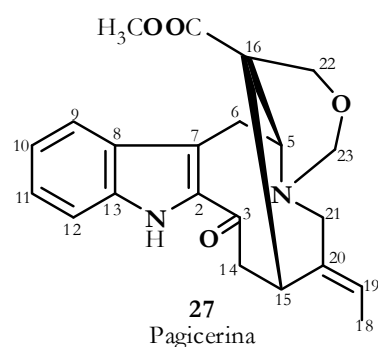
24
Dihidroobscurinervina



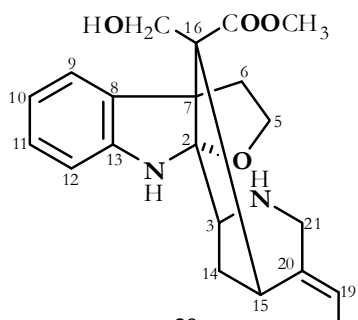
25
6β-hidroxi-dihidroobscurinervina



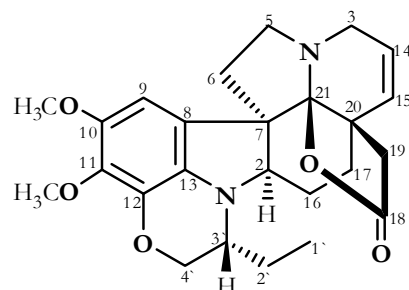
26
E-akuamidina



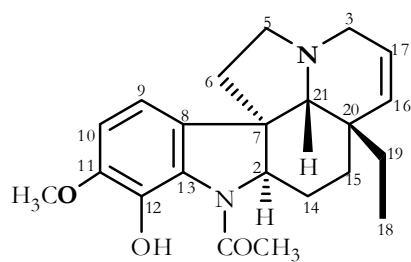
27
Pagicerina



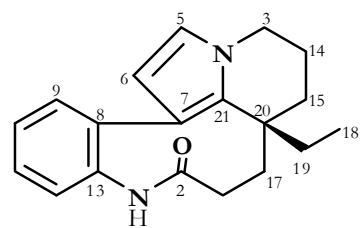
28
Aspidodasicarpina



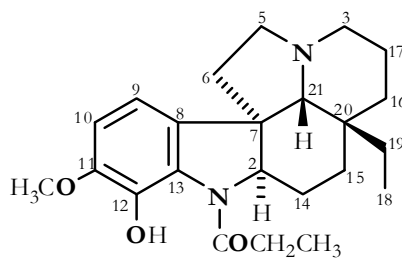
29
14,15-dehidroalalakina



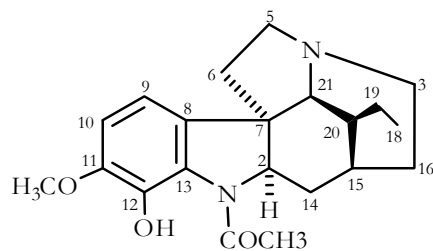
30
Aspidocarpina



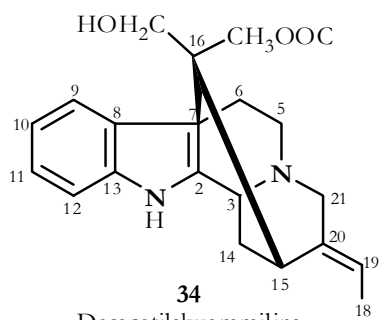
31
Rhazinilam



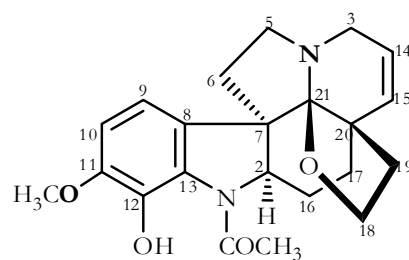
32
Aspidolimina



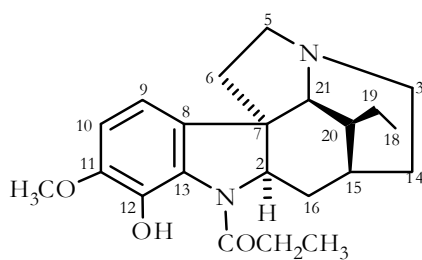
33
19,29-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina



34
Desacetilakummlina



35
Aspidolimidina

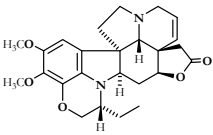
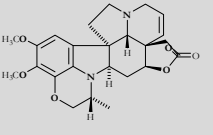
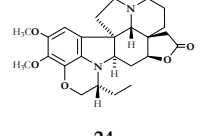
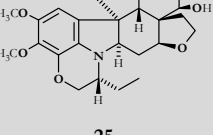
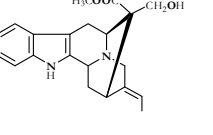
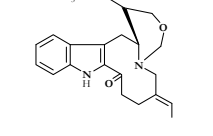


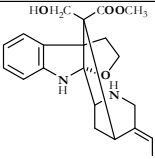
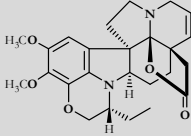
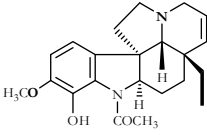
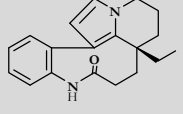
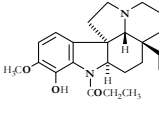
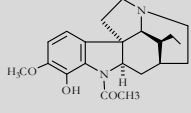
36
19,20-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina

Doce de los quince alcaloides aislados se ensayaron cuatro del extracto etanólico de las hojas (**22-25**), cinco del extracto de la corteza (**26-29** y **33**) y cuatro de la corteza de la raíz (**30-32**), (Tabla 19).

Tabla 19. Actividad antiparasitaria y citotóxica de los alcaloides **22-23**.

Los resultados se expresan en ED₅₀ (µg/ml).

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
 22	0.71	≈100	>100	>100
 23	0.79	≈100	>100	32.87 (20.23-53.41)
 24	0.12	≈100	>100	>100
 25	0.79	≈100	>100	>100
 26	0.16	>100	>100	>100
 27	1.62	>100	>100	>100

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
 28	37.62	≈100	>100	>100
 29	0.89	≈100	>100	≈100
 30	0.76	2.95 (2.21-3.95)	≈100	62.68 (23.41-167.79)
 31	0.13	53.42 (32.7-87.07)	17.23 (13.71-21.65)	ne
 32	0.89	4.91 (3.15-7.66)	≈100	25.48 (11.13-58.30)
 33	0.15	20.97 (18.23-24.14)	>100	≈100
Nifurtimox			3.39 (1.40-8.19)	13.91 (9.09-21.30)
Anfotericina B		0.04 (0.01-0.12)		10.25 (5.36-19.61)

ED₅₀= Dosis eficaz, necesaria para eliminar el 50% de las células/parásitos. Nifurtimox y Anfotericina B= fármacos de referencia. Entre paréntesis límites de confianza del 95%. ne= No ensayado por falta de disponibilidad.

Cuatro de los alcaloides ensayados presentaron actividad antiparasitaria (**30-33**). Los alcaloides **30** y **32**, aislados de la corteza de la raíz, son muy activos frente a *L.*

infantum, de forma similar al alcaloide **15** aislado de *G. reticulatum*. **30** y **32** no presentan actividad frente a *T. cruzi*, y la citototoxicidad es moderada. Es posible que el metoxilo en el carbono 11 anule el efecto frente a *T. cruzi* de los alcaloides **30** y **32** con respecto al alcaloide **15**.

En cuanto a los antecedentes publicados podemos mencionar que se ha descrito actividad frente a *P. falciparum* resistente a la cloroquina de **aspidospermidina** y **aspidospermina**, que están estructuralmente relacionados con los alcaloides **15**, **30** y **32**¹³³. El compuesto **31**, extraído de de la corteza de la raíz, muestra mayor actividad frente a *T. cruzi* que frente a *L. infantum*, no se ha realizado el ensayo de citotoxicidad por no disponer de cantidad necesaria del producto, pero se ha descrito anteriormente que es citotóxico frente a células KB¹³⁷.

Del grupo estructural **22-25**, aislado de las hojas y corteza, cabe mencionar la falta de actividad antiparasitaria y la citotoxicidad moderada demostrada por el compuesto **23**. No se encontraron referencias previas de actividades biológicas de ninguno de estos compuestos. El compuesto **33**, aislado de la corteza y de la corteza de la raíz, resulto ser activo frente a *L. infantum*, no es toxico frente a CHO y no se han encontrado referencias previas de actividad biológica.

Nuestros resultados demuestran que los alcaloides activos se aislaron de la corteza de la raíz y de la corteza. El extracto de corteza demostró ser muy activo lo que sugiere que puede haber efectos sinérgicos entre sus componentes. No se pudo ensayar el extracto de la corteza de la raíz por falta de disponibilidad.

¹³⁷ Subramanian, G.; Hiraku, O.; Hayashi, M.; Koyano, T.; Komiyama, K.; Kam, T. S. 2007. Biologically active aspidofractinine alkaloids from *Kopsia singaporensis*. J. Nat. Prod. 70, 1783-1789.

3.3. *Aspidosperma spruceanum*

De los extractos ensayados (Tabla 23) podemos decir que el EAAH, presentó una moderada actividad frente a *T. cruzi* y ninguna frente a *L. infantum*, además de una citotoxicidad moderada frente a CHO. El EABH presentó una importante actividad frente a *L. infantum*, siendo activo a las tres concentraciones ensayadas y no resultó citotóxico frente a CHO a las dos concentraciones más bajas ensayadas. El extracto alcaloidal neutro de hojas (EANH), solo mostró actividad frente a *L. infantum* a la mayor concentración ensayada, y no es citotóxico frente a CHO. El EEC presentó muy buena actividad frente a *L. infantum*, siendo activo a las tres concentraciones ensayadas; también resultó activo frente a *T. cruzi*, pero en este caso sólo a las dos concentraciones más altas a las que se ensayó. En cuanto a la citotoxicidad, este ensayo no se pudo realizar por falta de disponibilidad del extracto. Estos resultados sugieren la presencia de otros componentes activos no alcaloidales en la corteza de *A. spruceanum*. Los extractos alcaloidales ácido y neutro, muestran una actividad similar y moderada frente a ambos parásitos, siendo más citotóxico el neutro, el EABC mostró actividad frente a *L. infantum* a las dos concentraciones más altas ensayadas y no resultó citotóxico frente a CHO. En general podemos decir que los extractos tanto de hojas como de corteza son los más interesantes.

Tabla 20. Actividad antiparasitaria y citotóxica de extractos alcaloidales de *A. spruceanum*.

Extracto	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% de mortalidad		% de viabilidad
		<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
EAAH	800	49.40 \pm 1.7	94.32\pm0.8	0
	400	3.98 \pm 0.4	76.69\pm1.0	32.91 \pm 2.5
	200	0	0	78.46\pm6.2
EANH	800	78.31\pm2.0	12.49 \pm 2.5	0.74 \pm 0.5
	400	32.83 \pm 1.5	0	98.32\pm0.02
	200	11.69 \pm 1.3	0	98.44\pm0.02
EABH	800	98.27\pm0.5	23.44 \pm 0.4	2.45 \pm 1.2
	400	99.56\pm0.2	0	98.17\pm0.01
	200	77.73\pm1.0	0	98.54\pm0.04
EEC	800	95.85\pm0.5	100\pm0.4	
	400	97.61\pm0.4	93.02\pm1.2	ne
	200	94.48\pm0.6	31.64 \pm 0.7	
EAAC	800	88.02\pm2.1	61.86\pm1.4	0
	400	48.26 \pm 1.5	17.27 \pm 0.7	98.29\pm 0.02
	200	21.28 \pm 1.3	0	98.44\pm0.01
EANC	800	98.09\pm0.4	74.66\pm0.3	0.79 \pm 0.8
	400	67.47 \pm 0.9	7.67 \pm 7.7	22.62 \pm 13.7
	200	22.97 \pm 6.1	0	77.09\pm7.8
EABC	800	95.60\pm0.3	26.43 \pm 0.1	9.86 \pm 1.4
	400	79.97\pm0.2	6.92 \pm 0.9	98.37\pm0.03
	200	16.49 \pm 2.4	1.35 \pm 0.9	98.46\pm0.02

EAAH, extracto alcaloidal ácido hojas. EANH, extracto alcaloidal neutro hojas, EABH, extracto alcaloidal básico hojas. EEC, extracto etanólico corteza. EAAC, extracto alcaloidal ácido corteza. EABC, extracto alcaloidal básico corteza. EABC, extracto alcaloidal básico corteza. ne= No ensayado

3.3.1. Alcaloides aislados de *Aspidosperma spruceanum*

En un trabajo previo de la corteza y de la corteza de la raíz de *Aspidosperma spruceanum* se aislaron un total de siete alcaloides (37-43)¹²⁹; por falta de disponibilidad no se han aislado alcaloides de los extractos de hojas, que también son fuente de alcaloides con potencial antiparasitario.

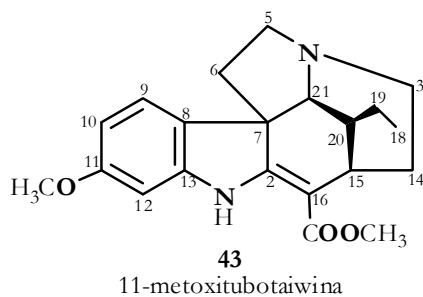
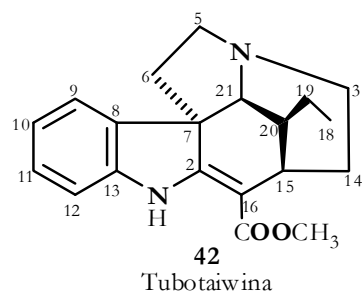
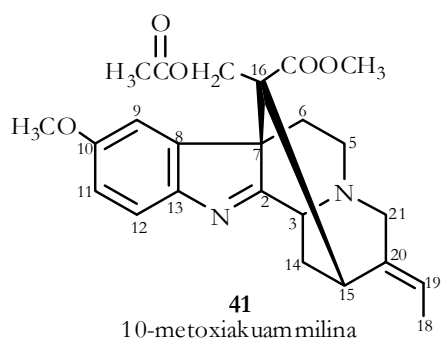
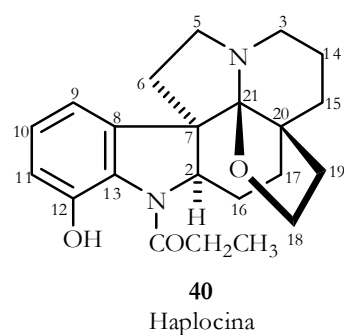
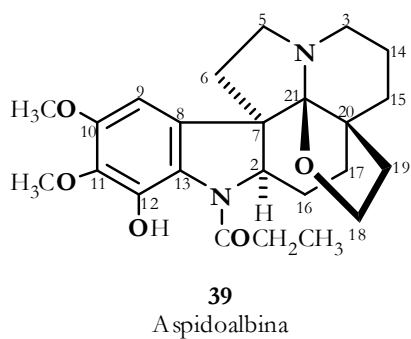
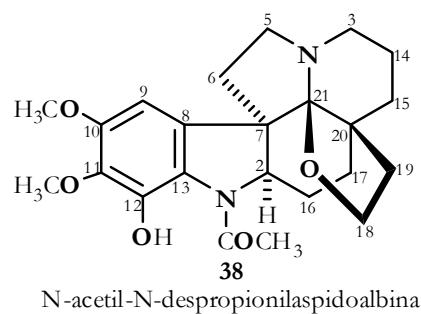
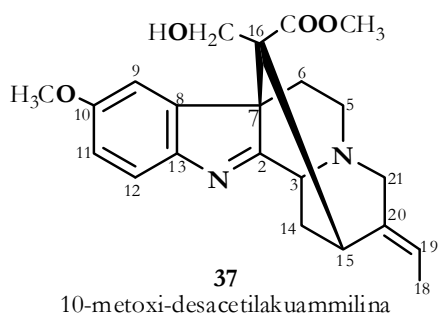
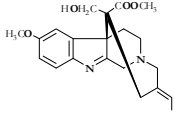
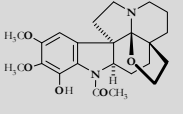
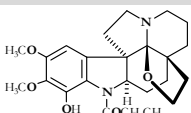
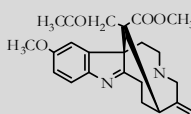
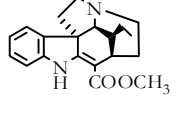
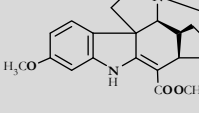
Estructura de los Alcaloides aislados de *Aspidosperma spruceanum*

Tabla 21. Actividad antiparasitaria y citotóxica de los alcaloides 33-47

Los resultados se expresan en ED₅₀ (µg/ml).

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
 37	0.32	> 100	>100	>100
 38	0.19	> 100	>100	>100
 39	0.09	35.25 (22.49-55.24)	>100	>100
 41	0.12	≈100	>100	>100
 42	0.19	5.89 (4.65-7.48)	>100	>100
 43	0.10	11.19 (9.21-13.59)	>100	>100
Nifurtimox			3.39 (1.40-8.19)	13.91 (9.09-21.30)
Anfotericina B		0.04 (0.01-0.12)		10.25 (5.36-19.61)

ED₅₀= Dosis eficaz, necesaria para eliminar el 50% de las células/parásitos. Nifurtimox y Anfotericina B= fármacos de referencia. Entre paréntesis límites de confianza del 95%.
 ne= No ensayado por falta de disponibilidad.

Sólo tres compuestos (**39**, **42** y **43**) presentaron actividad antiparasitaria frente a *L. infantum*, ninguna frente a *T. cruzi* y no muestran citotoxicidad frente a CHO (Tabla 21). El compuesto **39** presentó actividad moderada frente a *L. infantum*. Este compuesto, aislado tanto de la corteza como de la corteza de la raíz de *A. spruceanum*; también ha sido aislado del tallo de *A. megalocarpon*, presentando actividad antiplasmodial moderada frente a cepas de *P. falciparum* sensible a cloroquina y ninguna frente a cepas resistentes¹³⁸. Algunos autores apuntan que la presencia de un anillo tetrahydrofurano en los C-18 y C-19 puede ser la causa de la disminución de la actividad antiplasmodial y el aumento de la citotoxicidad en fibroblastos (NIH3T3)¹³³. La misma influencia del anillo tetrahydrofurano se ha descrito para el compuesto **40**¹³³ que no pudo ser ensayado por falta disponibilidad. En nuestro caso los compuestos **38** y **39** presentan el mismo anillo, **38** no muestra actividad de ningún tipo a diferencia del compuesto **39** que es activo frente a *L. infantum*, por lo que podemos pensar que el grupo $\text{NCOCH}_2\text{CH}_3$ presente en **39** y que le confiere mayor liposolubilidad sea el responsable de su actividad moderada frente a *Leishmania*.

Los compuestos **42** y **43** también resultaron activos frente a *L. infantum*, siendo el más activo de los dos el **42**, lo que sugiere que la presencia de un grupo metoxilo en el C-11 del compuesto **43** reduce la actividad. Se ha descrito que tanto el compuesto **42** como el **43** al unirse a receptores opiáceos producen efectos analgésicos¹³⁹. Además se conoce que el compuesto **42** inhibe *in vitro* la actividad acetilcolinesterasa¹⁴⁰.

¹³⁸ Mitaine, A. C.; Weniger, B.; Sauvain, M.; Lucumi, E.; Aragón, R.; Zeches-Hanrot, M. Z. 1998. Indol alkaloids from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. Plant. Med. 64, 487.

¹³⁹ Ingkaniman, K.; Ijzerman, A. P.; Taesotikul, T.; Verpoorte, R. 1999. Isolation of opioid-active compounds from *Tabernaemontana pachysiphon* leaves. J. Pharm. Pharmacol. 51, 1441-1446.

¹⁴⁰ Mohamad A.; Mroue, K. L.; Euler, M. L. A.; Ghuman, M. A.; Alam, M. 1996. Indol Alkaloid of *Haplophytum crooksii*. J. Nat. Prod. 59, 890-893.

3.4. *Aspidosperma schultesii*

La Tabla 22 muestra que los extractos más activos frente a ambos parásitos son EAAH y EAAC, a las dos concentraciones más altas ensayadas. Por su parte, el EABC presentó mucha más actividad frente a *L. infantum* en relación con los dos extractos anteriores, pero ninguna frente a *T. cruzi*. Todos los extractos ensayados presentaron toxicidad frente a CHO.

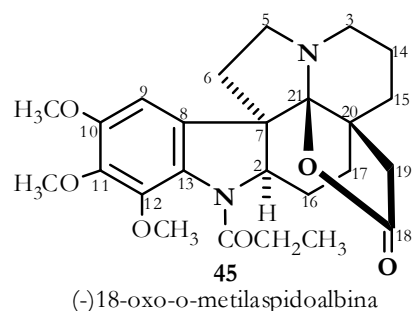
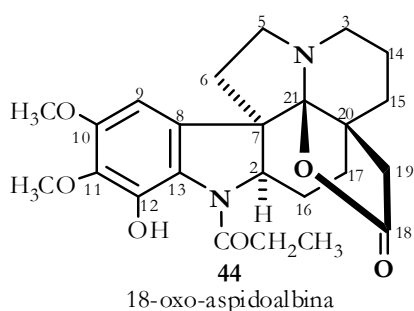
Tabla 22. Actividad antiparasitaria y citotóxica de extractos alcaloidales de *A. schultesii*.

Extracto	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% de mortalidad		% de viabilidad
		<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
EAAH	800	73.06\pm1.2	90.38\pm0.4	10.97 \pm 1.5
	400	72.84\pm1.2	82.68\pm1.0	9.08 \pm 1.4
	200	52.09 \pm 3.3	52.25 \pm 0.6	0
EAAC	800	83.84\pm0.3	91.84\pm1.4	0
	400	67.19\pm1.9	74.03\pm1.2	0
	200	26.14 \pm 3.3	44.83 \pm 1.3	39.06 \pm 1.8
EANC	800	68.63\pm0.9	0	1.03 \pm 0.1
	400	28.81 \pm 10.7	0	7.11 \pm 4.7
	200	19.16 \pm 0.2	0	49.61 \pm 5.6
EABC	800	94.79\pm0.6	27.56 \pm 5.3	0
	400	92.44\pm0.7	21.99 \pm 9.8	15.9 \pm 5.6
	200	12.03 \pm 3.5	0	34.35 \pm 2.8

EAAH, extracto alcaloidal ácido hojas. EAAC, extracto alcaloidal ácido corteza. EANC, extracto alcaloidal neutro corteza. EABC, extracto alcaloidal básico corteza

3.4.1. Alcaloides aislados de *Aspidosperma schultesii*

En un estudio previo del extracto alcaloidal de corteza de *A. schultesii* se han aislado dos compuestos alcaloidales, **18-oxo-aspidoalbina (44)**, y **(-)-18-oxo-O-metilaspidoalbina (45)**¹²⁹.

Estructura de los Alcaloides aislados de *Aspidosperma schultessi*

Los alcaloides **44** y **45** aislados de la corteza y relacionados estructuralmente con **haplocina** (**40**), no presentaron actividad significativa frente a los parásitos ensayados, lo que sugiere la presencia de otros alcaloides activos en los extractos de esta planta.

3.5. *Aspidosperma rigidum*

El extracto etanólico de hojas de *A. rigidum* resultó ser muy activo frente a *T. cruzi*, moderadamente activo frente a *L. infantum*, y citotóxico frente a CHO, (Tabla 23).

Se ha descrito elevada actividad del extracto de corteza de *A. rigidum* frente a *P. falciparum* cloroquina resistente y ninguna actividad frente a *L. mayor*¹⁴¹.

Tabla 23. Actividad antiparasitaria y citotóxica del extracto alcaloidal de *A. rigidum*.

Extracto	Concentración ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% de mortalidad		% de viabilidad
		<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
EEH	800	65.22 \pm 0.9	91.35 \pm 0.9	16.50 \pm 5.4
	400	34.61 \pm 1.1	77.55 \pm 0.7	14.96 \pm 5.1
	200	1.81 \pm 0.5	35.49 \pm 3.9	24.48 \pm 2.5

¹⁴¹Kvist, L. P.; Christensen, S. B.; Rasmussen, H. B.; Mejia, K.; González, A. 2006. Identification and evolution of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. J. Ethnopharmacol. 106, 390-402.

3.5.1. Alcaloides aislados de *Aspidosperma schultesii*

Del extracto de *A. rigidum*, se han aislado seis compuestos, **caboxina A** (46), **caboxina B** (47), **isocaboxina B** (48), **carapanaubina** (49), **isocarapanaubina** (50) y **haplocidina** (51)¹²⁹, cuatro del extracto alcaloidal de las hojas (46, 47, 48 y 49) y tres del extracto alcaloidal de la corteza (49, 50 y 51).

Estructura de los Alcaloides aislados de *Aspidosperma rigidum*

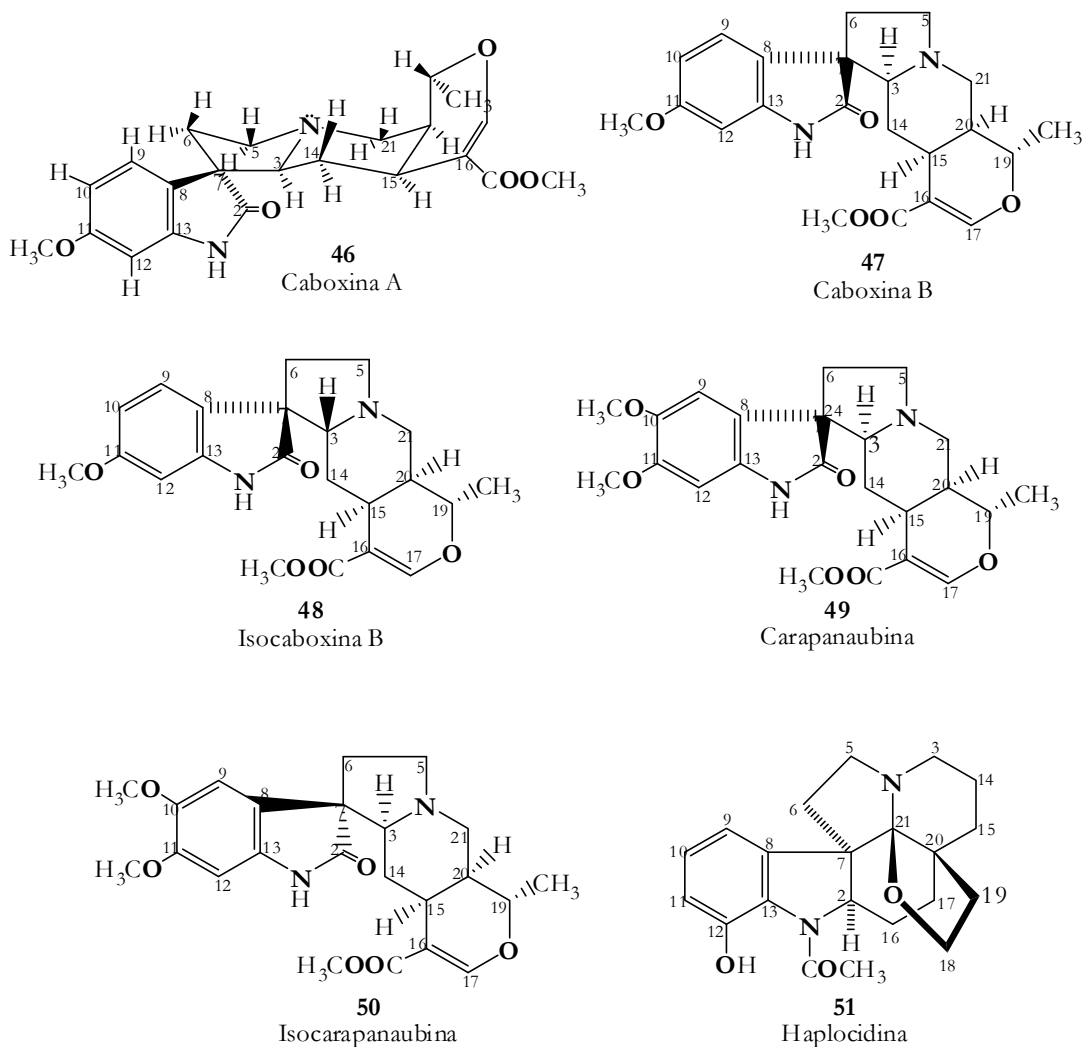
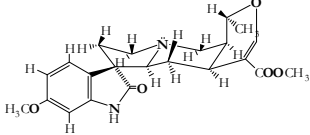
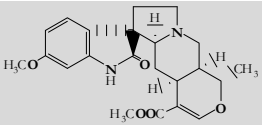
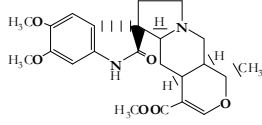
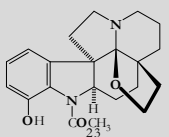


Tabla 24. Actividad antiparasitaria y citotóxica de alcaloides aislados de *A. rigidum*. Los resultados se expresan en ED₅₀ (µg/ml).

Compuesto	Rendimiento (%)	<i>L. infantum</i>	<i>T. cruzi</i>	CHO
 <p>46</p>	2.45	82.13±1.8 ^a	69.92±4.3 ^a	34.9±0.1 ^a
 <p>47</p>	1.11	> 100	10.59 (7.96-14.11)	10.3±0.01 ^a
 <p>49</p>	0.82	>100	>100	0.62±0.0 ^a
 <p>51</p>	0.71	>100	>100	ne
Nifurtimox			3.39 (1.40-8.19)	13.91 (9.09-21.30)
Anfotericina B		0.04 (0.01-0.12)		10.25 (5.36-19.61)

ED₅₀= Dosis eficaz, necesaria para eliminar el 50% de las células/parásitos. Nifurtimox y Anfotericina B= fármacos de referencia. Entre paréntesis límites de confianza del 95%. ne= No ensayado por falta de disponibilidad. ^a= Porcentaje de mortalidad a 100 µg/ml.

De los alcaloides ensayados dos presentaron actividad antiparasitaria. El compuesto **46** presentó escasa actividad frente a los dos parásitos ensayados y resultó ser moderadamente citotóxico frente a CHO, no se calculó la ED₅₀ por no disponer de cantidad suficiente de producto. El compuesto **47** mostró actividad significativa frente a *T. cruzi*, por lo que se le puede considerar como un tripanocida efectivo con toxicidad asociada. No resultó activo frente a *L. infantum*, por lo que se puede apuntar una

interesante selectividad en la acción frente a *T. cruzi*. La actividad de **46** y **47** puede ser atribuida a la presencia de un grupo metoxilo en el carbono 11. El compuesto **49** carece de actividad frente a ambos parásitos ensayados y es citotóxico posiblemente debido a la presencia de un grupo metoxilo adicional en el carbono 10. El compuesto **51**, también carece de actividad frente a los parásitos ensayados y no se ensayó frente a células CHO, por falta de disponibilidad. Esta falta de actividad puede deberse a la presencia de un anillo tetrahydrofurano entre C18 y C19; se ha descrito que la presencia de este anillo disminuye la actividad antiplasmodial¹³³.

La única actividad biológica publicada de extractos de *A. rigidum* es antiplasmodial, y es atribuida a los alcaloides que contiene¹⁴².

¹⁴²Oliveira, F. Q.; Junqueira, R. G.; Stehmann, J. R.; Brandão, M. G. L. 2003. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 5, 23-31

Conclusiones

Conclusiones:

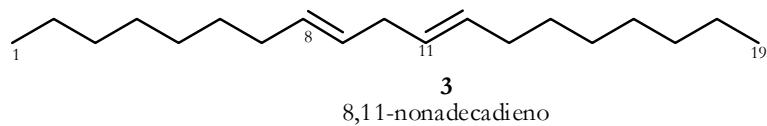
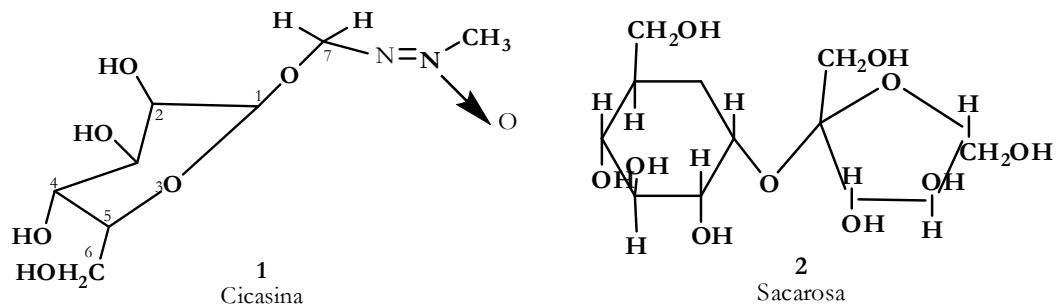
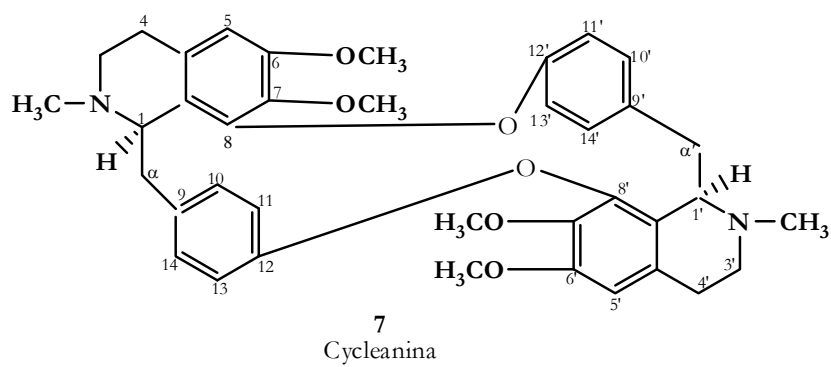
1. Los diferentes extractos de las plantas ensayadas mostraron importante actividad frente a *Leishmania infantum*, *Trypanosoma cruzi* y frente a insectos diana (*Leptinotarsa decemlineata*, *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*), a excepción de *Paullinea clavigera* que no muestra actividad insecticida. Estos resultados nos sugieren la presencia de principios activos en estas plantas que son usadas de forma tradicional en tratamiento de enfermedades.
2. El extracto de corteza de *Cedrela odorata* mostró la mayor actividad antiparasitaria frente a ambos protozoos, seguido del extracto de *Chondodendron tomentosum* que mostró actividad selectiva frente a *Leishmania infantum*.
3. Los extractos de *Tabebuia serratifolia* y *Zamia ulei* son activos frente a ambos parásitos dando fundamento al uso tradicional que se hace de estas plantas para el tratamiento de la leishmaniasis.
4. Los extractos de *Aristolochia pilosa*, *Tradescantia zebrina* y *Chondodendron tomentosum* presentan propiedades antialimentarias.
5. De los tres alcaloides del tipo bisbencilisoquinolinas aislados del extracto alcaloidal de *Chondodendron tomentosum*, **cycleanina (7)** muestra actividad frente a *Leishmania infantum* inferior a la de los fármacos de referencia, con menor citotoxicidad inespecífica. Por su parte, **chondrocurina (8)** y **12-0-metil(+)-curina (9)** son activos frente a ambos parásitos. Estos alcaloides son los responsables de la actividad que presenta el extracto.
6. Del extracto etanólico de *Tabebuia serratifolia* se obtuvieron tres mezclas y dos naftoquinonas denominadas **2-(1-hidroietil)-4H,9H,nafto[2,3-b]furano-4,9-diona (10)** y **2-acetil-4H, 9H-nafto[2,3-b] furano-4,9- diona (11)**. La **mezcla 1**, es activa sólo frente a *Leishmania infantum* y la **mezcla 3** presenta importante

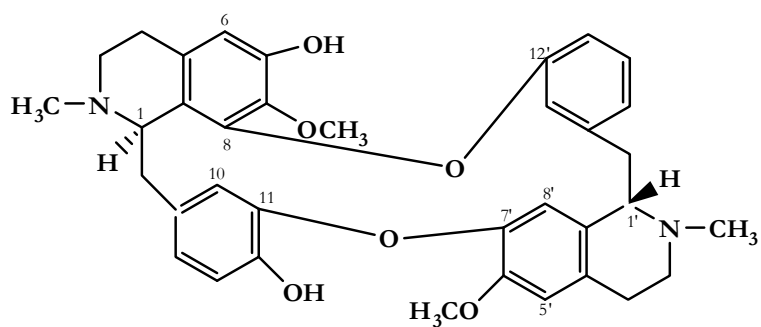
actividad frente a ambos parásitos. Las naftoquinonas **10** y **11** son activas frente a los dos parásitos, siendo esta actividad mayor que la de los fármacos de referencia. Es la primera vez que se describe la actividad de estos compuestos frente a *Leishmania infantum*.

7. Los diferentes extractos de *Geissospermum reticulatum* son activos frente a *Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi*. **12-Hidroxi-N-acetilaspidospermidina (15)** y **desacetil-N-butanoilgeissospermidina (18)** presentan actividad antiparasitaria, siendo por tanto los que confieren la actividad al extracto del que proceden.
8. Todos los extractos de las diferentes especies de *Aspidosperma* ensayadas mostraron actividad antiparasitaria. Cuatro de los doce alcaloides ensayados de *A. desmantum* mostraron actividad. **Aspidocarpina (30)**, **rhazinilam (31)**, **aspidolimina (32)** y **19,29-dihidro-11metoxi-(+)-limatinina (33)** presentaron importante actividad frente a *Leishmania infantum* y **31** mostró actividad frente a *Trypanosoma cruzi*.
9. Tres alcaloides de *Aspidosperma spruceanum*, **aspidoalbina (39)**, **tubotaiwina (42)** y **11-metoxitubotaiwina (43)**, fueron activos frente a *Leishmania infantum*, siendo **42** el más activo sin toxicidad asociada.
10. Los compuestos **caboxina A (46)** y **B (47)** de *Aspidosperma rigidum* mostraron actividad antiparasitaria, siendo **47** un tripanocida efectivo sin toxicidad asociada.

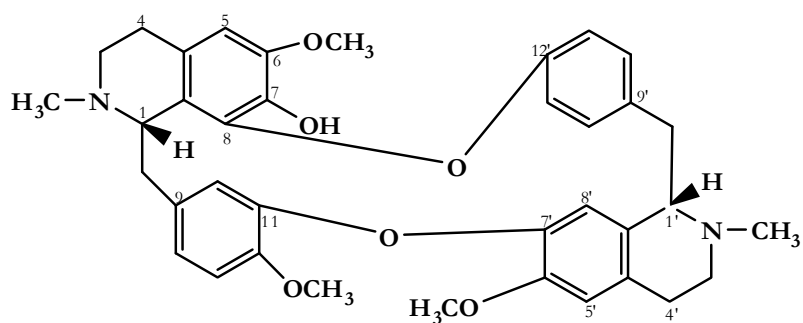
Anexos

1. Productos ensayados

Zamia ulei*Chondodendron tomentosum*

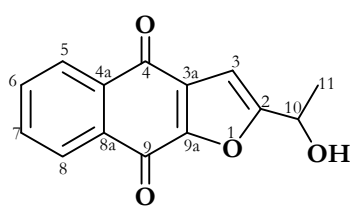


8
Chondrocurina

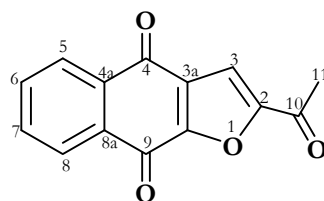


9
12-O-metil-curina (S,S')

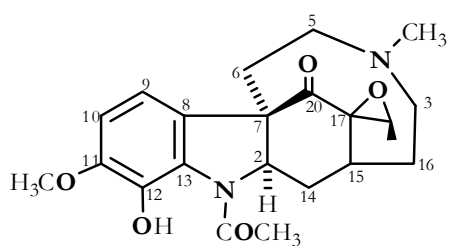
Tabebuia serratifolia



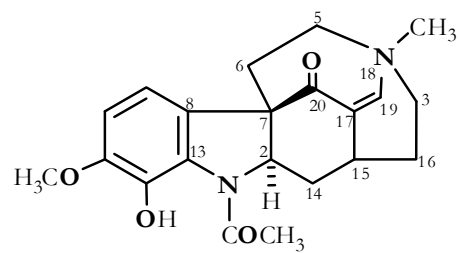
10
2-(1-hidroxi-etil)-4H,9H-nafto-[2,3-b]furano-4,9-diona



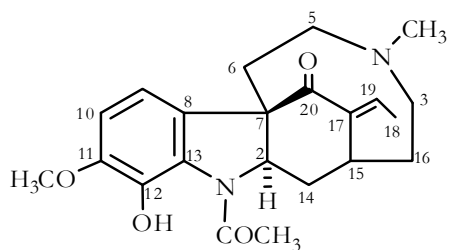
11
2-acetil-4H,9H-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona

Geissospermum reticulatum

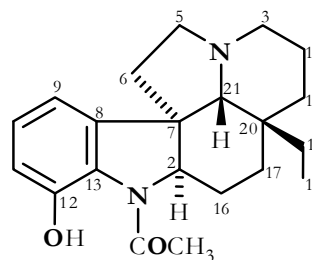
12
Geissosreticulina



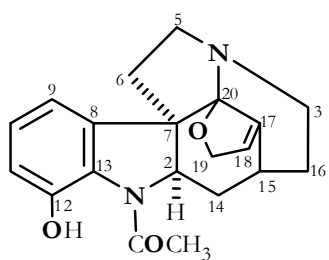
13
(Z) 10-desmetoxi-12-hidroxigeissosvellina



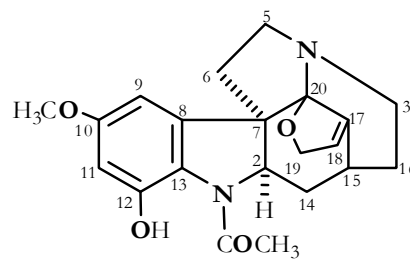
14
(E) 10-desmetoxi-12-hidroxigeissosvellina



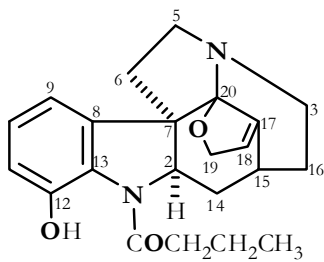
15
12-hidrox-N-acetilapidospermidina



16
Geissospermidina

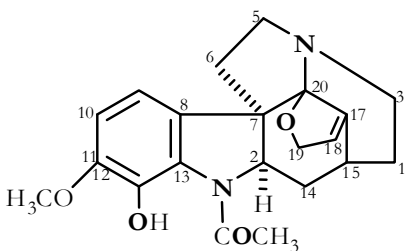


17
10-metoxigeissospermidina



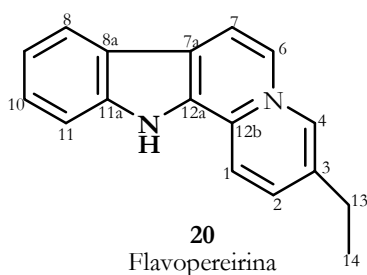
18

N-desacetil-N-butanoilgeissospermidina



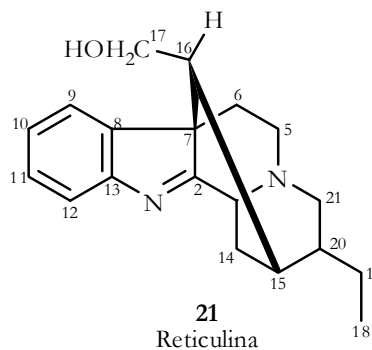
19

11-Metoxigeissospermidina



20

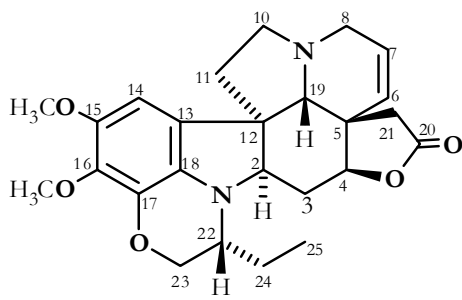
Flavopereirina



21

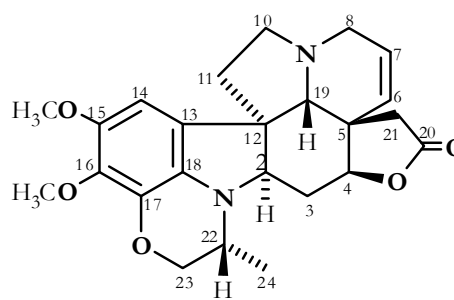
Reticulina

Aspidosperma desmantum



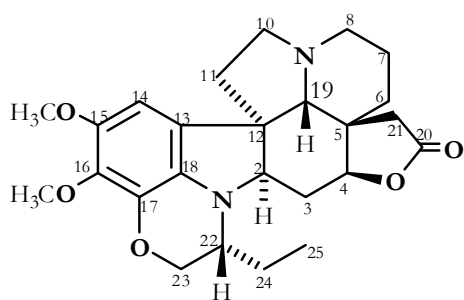
22

Obscurinervina

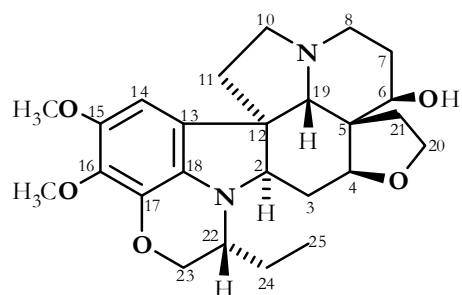


23

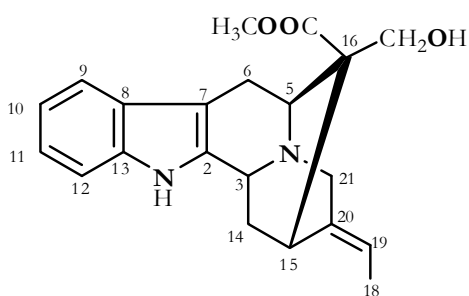
Obscurinervidina



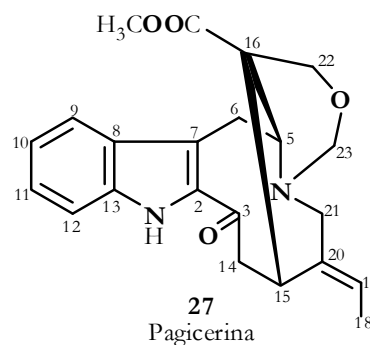
24
Dihidroobscurinervina



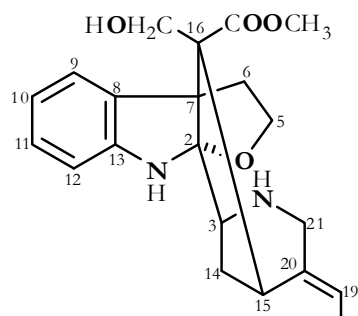
25
6β-hidroxi-dihidroobscurinervina



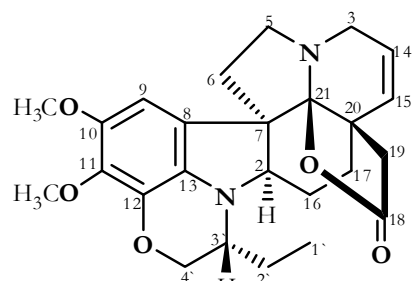
26
E-akuammidina



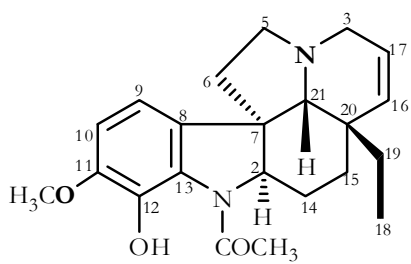
27
Pagicerina



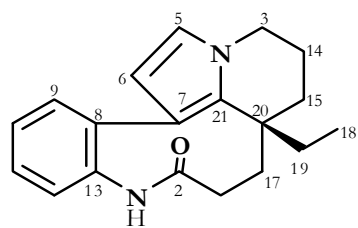
28
Aspidodasicarpina



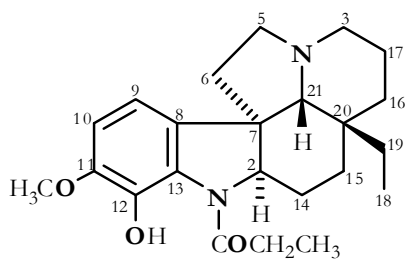
29
14,15-dehidroalalakina



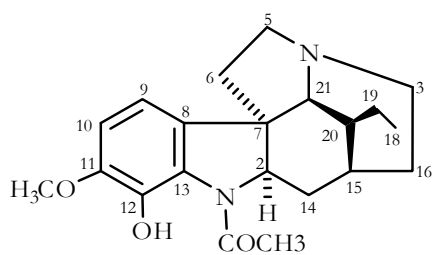
30
Aspidocarpina



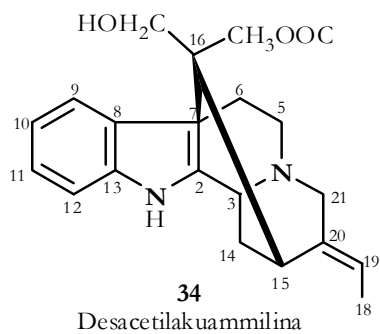
31
Rhazinilam



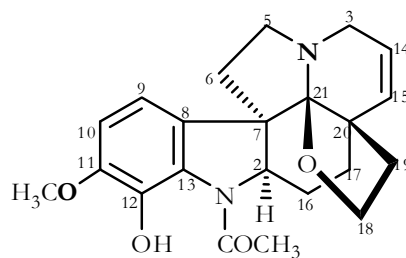
32
Aspidolimina



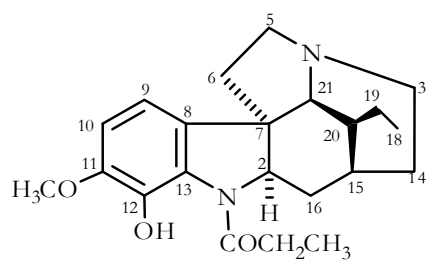
33
19,29-dihidro-11-metoxi-(+)-limatinina



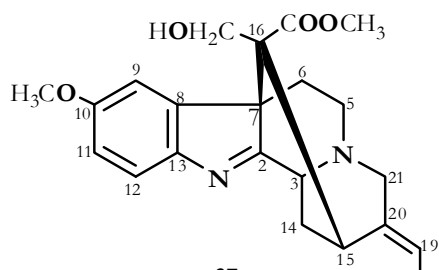
34
Desacetilakuammilina



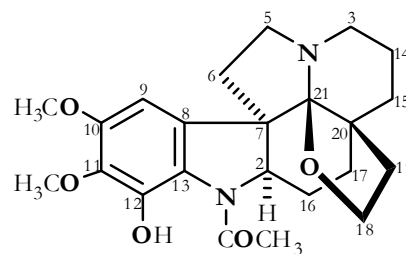
35
Aspidolimidina

**36**

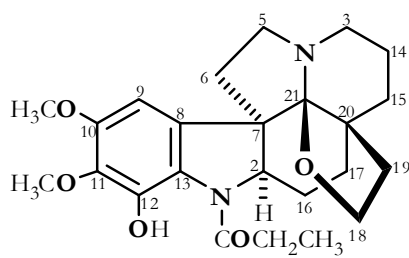
19,29-dihidro-11-metoxi-(+)-limatina

Aspidosperma sprucenum**37**

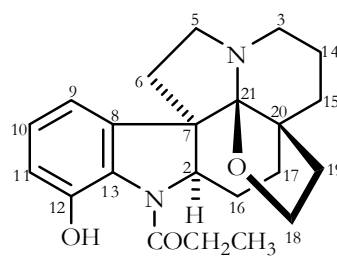
10-metoxi-desacetilakuummiliina

**38**

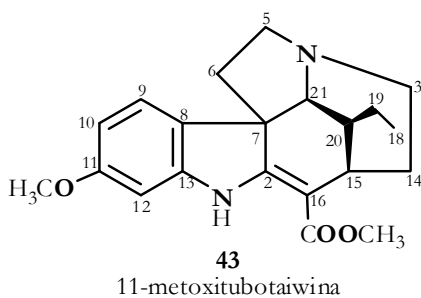
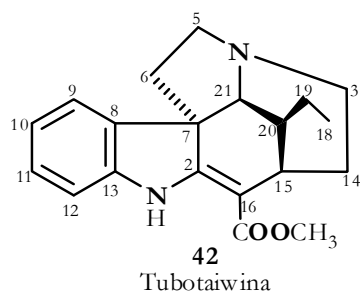
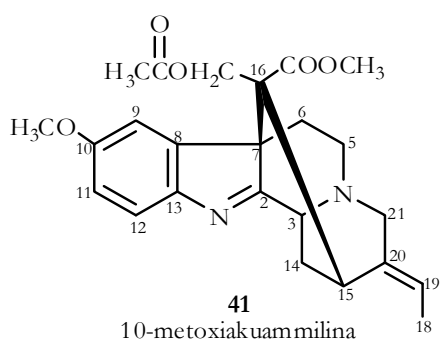
N-acetil-N-despropionilaspidoalbina

**39**

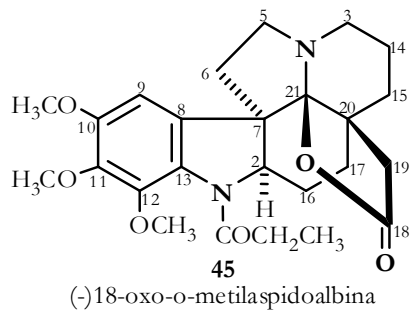
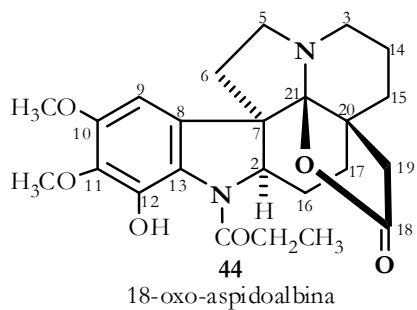
Aspidoalbina

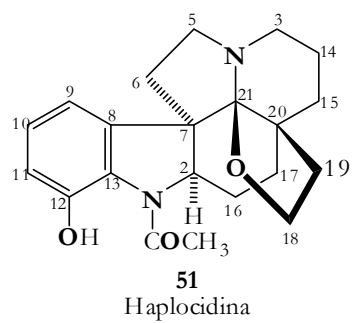
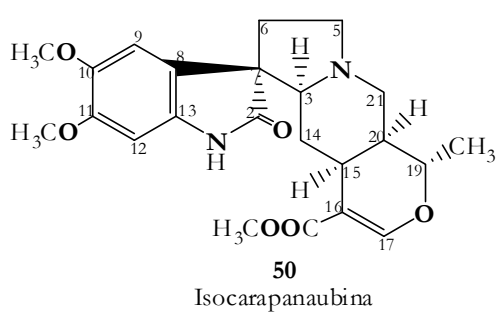
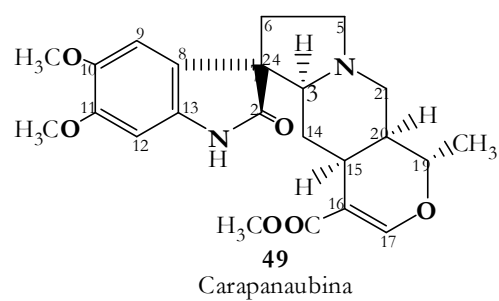
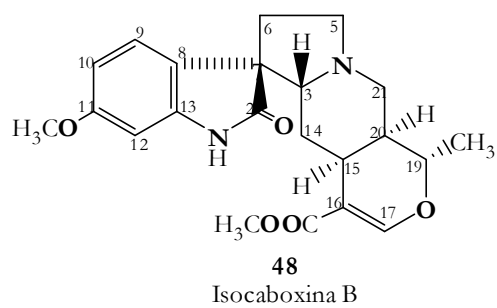
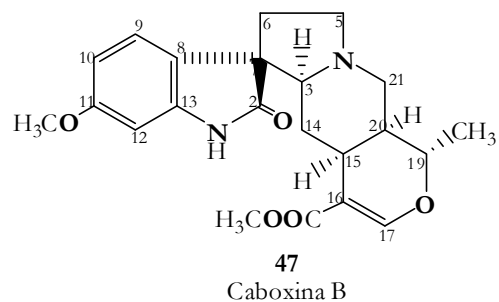
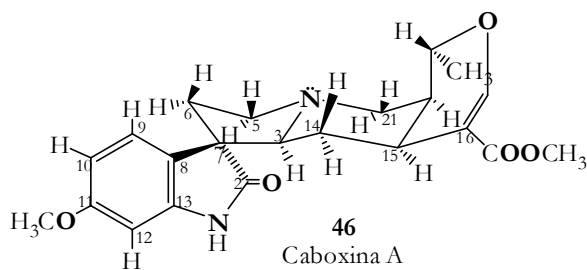
**40**

Haplocina



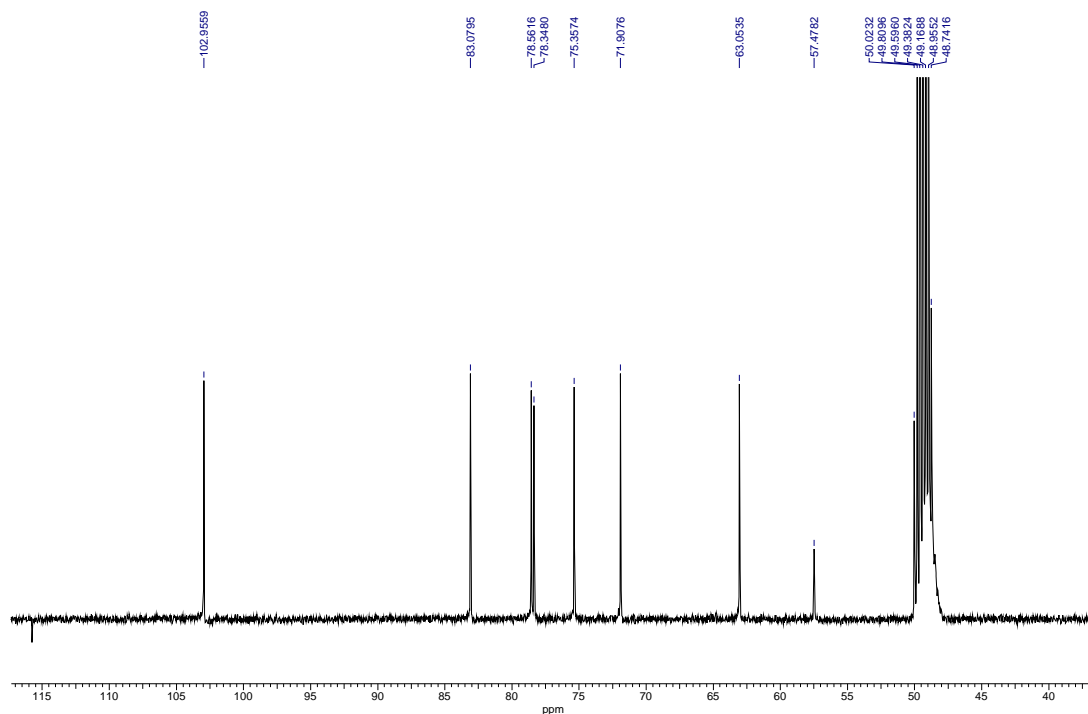
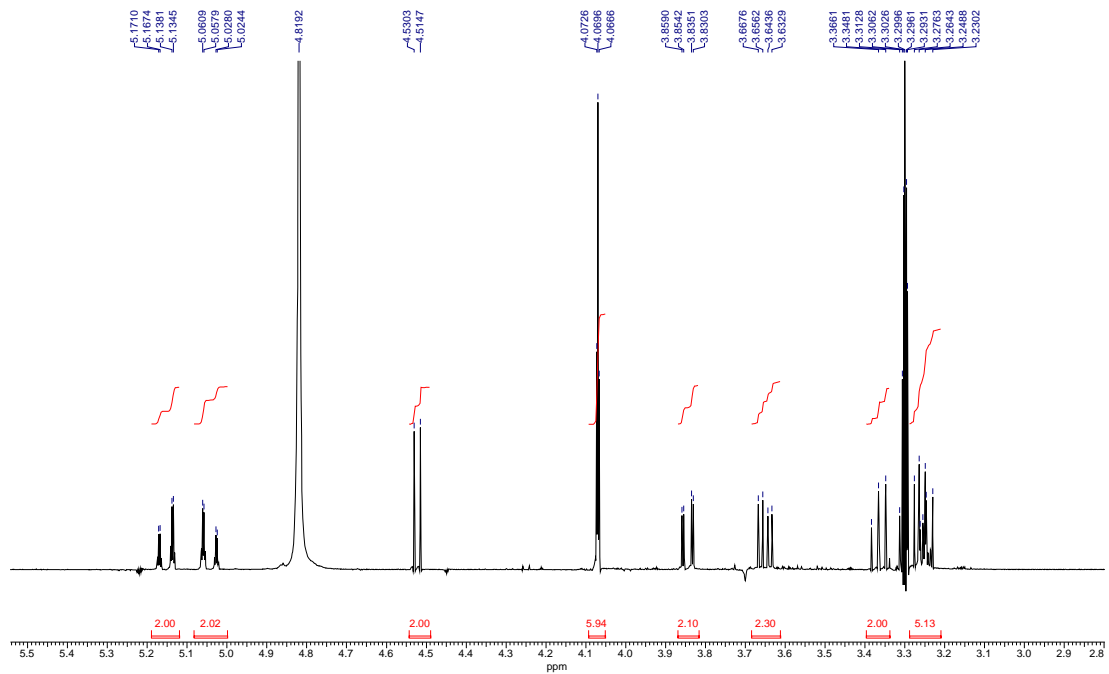
Aspidosperma schultesii



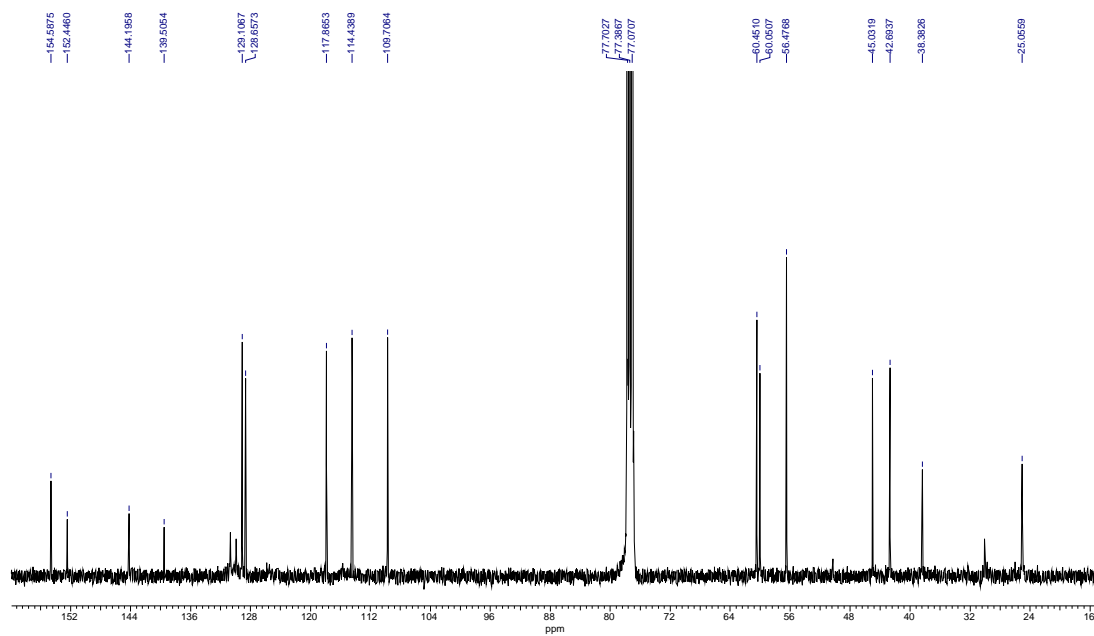
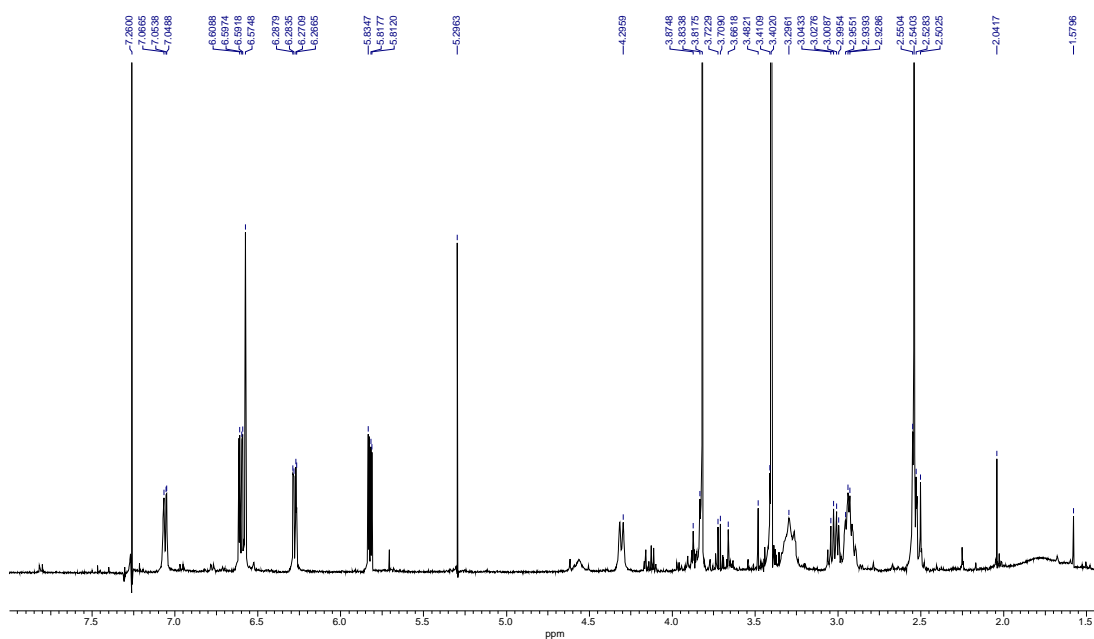
Aspidosperma rigidum

2. Espectros de RMN de ¹H

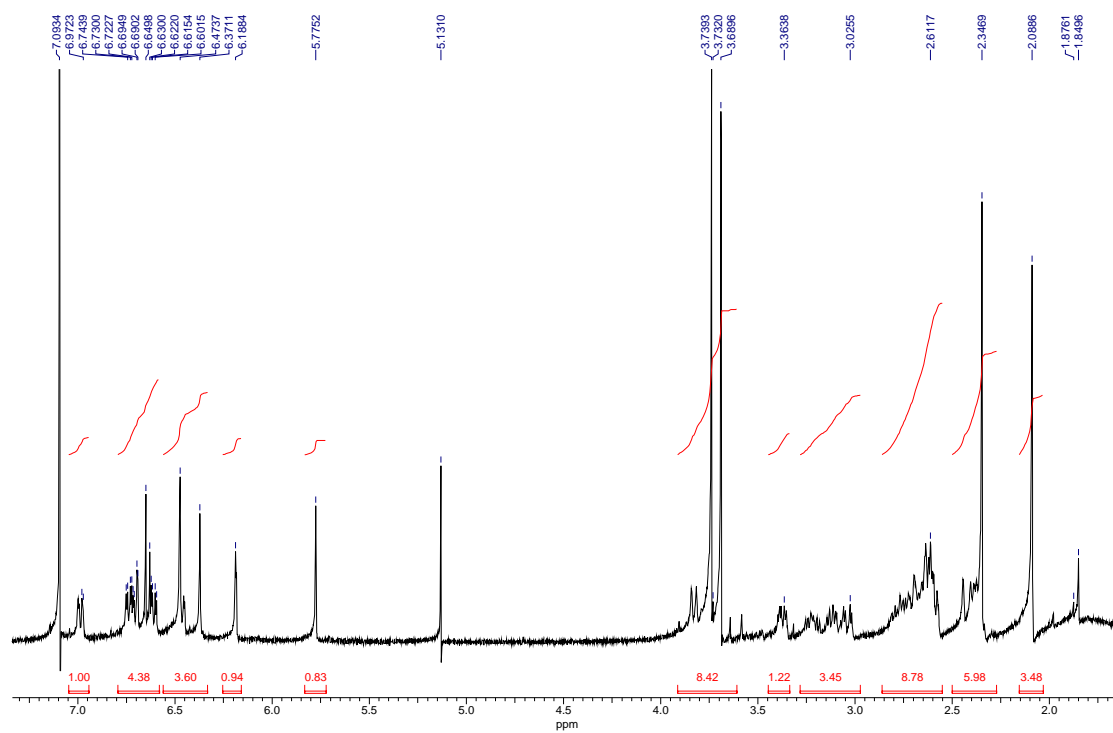
Cycasina (1)



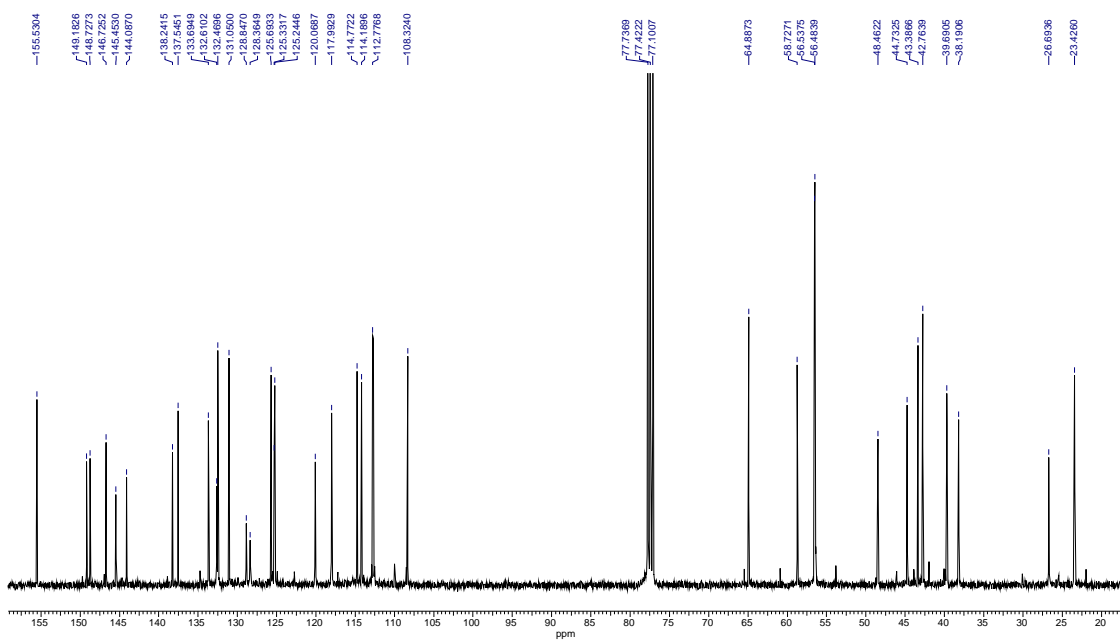
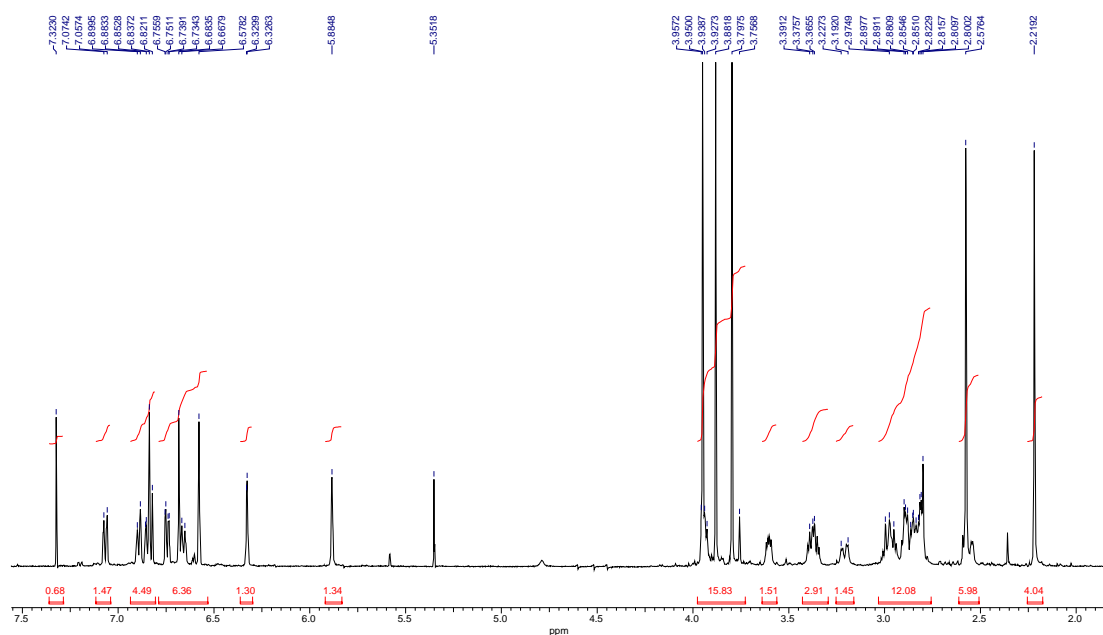
Cycleanina (7)



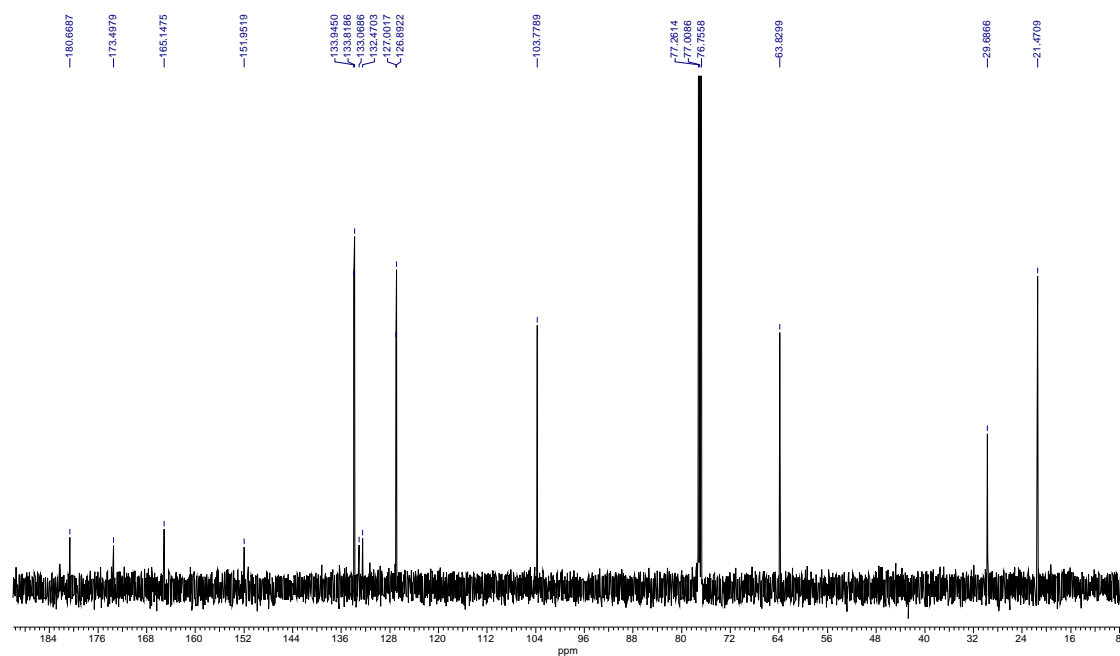
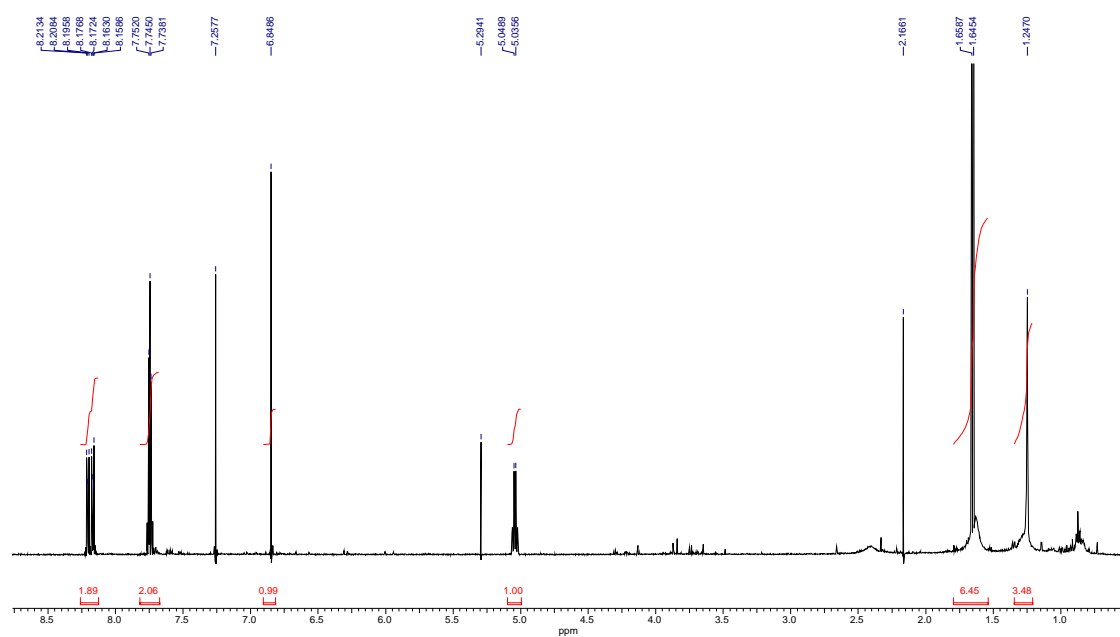
Chondrocurina (8)



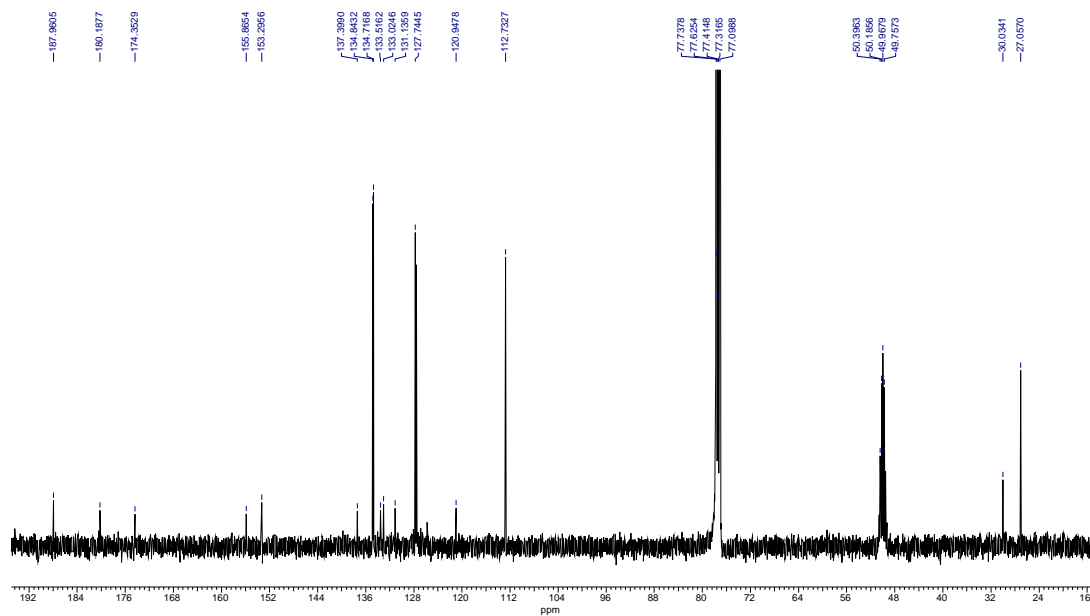
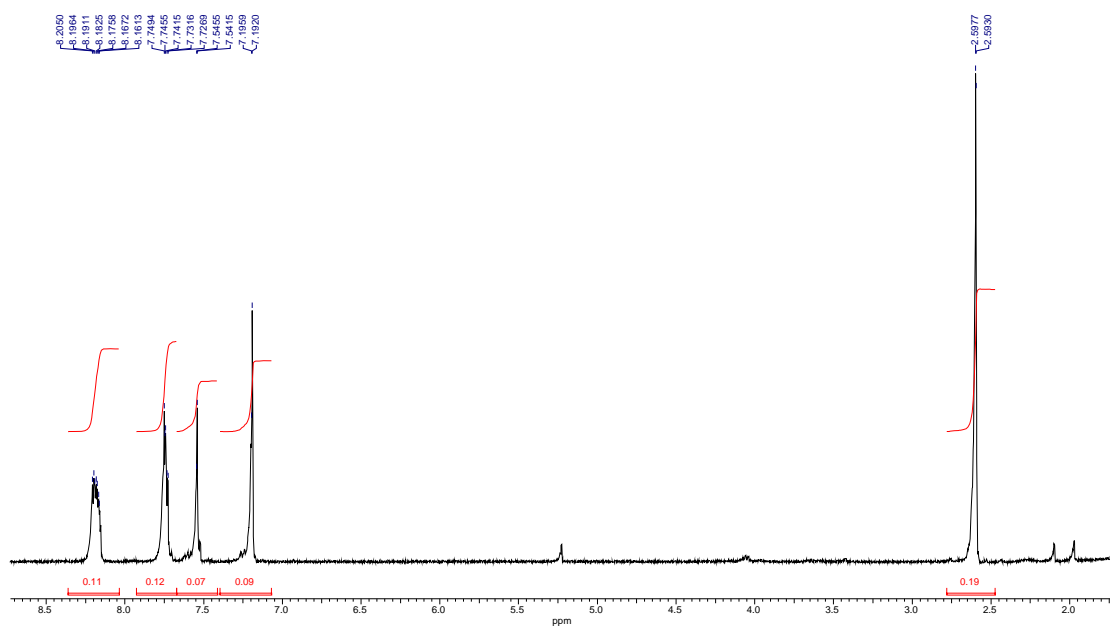
12-O-metil(+)-curina (9)



2-(1-hidroxietyl)-4H,9H-nafto[2,3-b]furano-4,9-diona (10)



2-acetil-4H, 9H-nafto [2,3-b] furano-4,9-diona (11)



Abreviaturas

Abreviaturas

- AcOEt: Acetato de etilo.
- AE: Actividad antiepimastigote.
- $[\alpha]_D$: Actividad óptica.
- AP: Actividad antipromastigote.
- BYDV: Virus de la hoja manchada de maíz.
- CC: Cromatografía en columna de gravedad (Column Chromatography).
- CCF: Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography).
- CHCl_3 : Cloroformo.
- CH_2Cl_2 : Diclorometano.
- CHO: Células de ovario de hamster chino.
- ^{13}C NMR: Resonancia magnética nuclear de ^{13}C .
- COSY: Espectroscopía de correlación ^1H - ^1H .
- δ : Desplazamiento químico relativo al TMS.
- DE_{50} : Dosis a la que se produce el 50% del efecto que se mide.
- DMSO: Dimetil sulfóxido.
- ECACC: Colección Europea de Cultivos Celulares.
- EM: Espectroscopía de masas.
- EMAR: Espectroscopía de masas de alta resolución.
- FR: Índice de consumo (Feeding Reduction).
- GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (Gas Chromatography-Mass Spectrum).
- HMBC: Correlación heteronuclear a multiple enlace ^1H - ^{13}C .
- ^1H NMR: Resonancia magnética nuclear de Protón.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography).
- HSQC: Correlación heteronuclear a un enlace ^1H - ^{13}C .
- Hz: Hertzios.

- IE: Impacto electrónico.
- LIT: Liver Infusion Tryptose.
- L:O: Relación luz: oscuridad.
- MeOH: Metanol.
- MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromo.
- MS: Espectro de masas (Mass Spectrum).
- MYF_b: Tintura de yodo.
- m/z: relación carga/masa.
- n-Hex: n-hexano.
- NOESY: Correlación homonuclear bidimensional NOE en sistemas de referencia rotante.
- PBS: Tampón fosfato salino (phosphate buffer saline).
- PDA: Potate dextrose agar.
- P.f.: Punto de fusión.
- PMS: Fenacina metosulfato.
- ppm: Partes por millón.
- RPMI: Medio de cultivo "Roswell Park Memorial Institute".
- rpm: Revoluciones por minuto.
- SBF: Suero bovino fetal.
- SDS: Dodecil sulfato sódico.
- Sf9: Células de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*.
- SI: Índice de inhibición del asentamiento (Settling Inhibition Index).
- CEM: Cromatografía de exclusión molecular.
- VLC: Cromatografía líquida de vacío (Vacuum Liquid Chromatography).