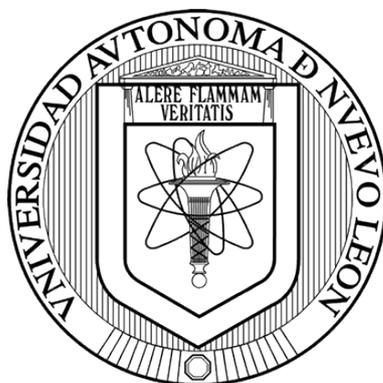


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE EXTRACTOS DE
PLANTAS DE USO MEDICINAL CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA
CONTRA *Trypanosoma cruzi*, AGENTE CAUSAL DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS

POR

Q.B.P. NANCY EDITH RODRÍGUEZ GARZA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

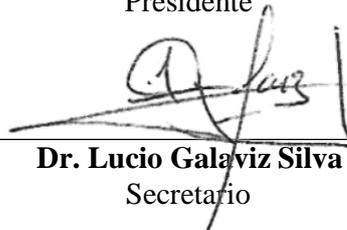
2021

**IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE EXTRACTOS DE
PLANTAS DE USO MEDICINAL CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA
CONTRA *Trypanosoma cruzi*, AGENTE CAUSAL DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS**

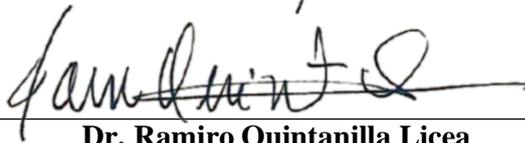
Comité de Tesis



Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Presidente



Dr. Lucio Galaviz Silva
Secretario



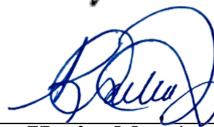
Dr. Ramiro Quintanilla Licea
Vocal



Dra. Itza Eloisa Luna Cruz
Vocal



Dra. Elva Teresa Aréchiga Carvajal
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

**IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS DE EXTRACTOS DE
PLANTAS DE USO MEDICINAL CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA
CONTRA *Trypanosoma cruzi*, AGENTE CAUSAL DE LA
ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Dirección de Tesis



Dra. Zinnia Judith Molina Garza
Director

**DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL CN1618-21

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICyT) por haberme otorgado el apoyo económico necesario para la realización de esta tesis.

A la Dra. Zinnia Molina por siempre creer en mí y alentarme a seguir adelante. Gracias por brindarme su confianza, apoyo, asesoría, orientación y tiempo.

Al Dr. Lucio Galaviz por su tiempo, ayuda, observaciones y sugerencias en la mejora de esta tesis.

Al Dr. Ramiro Quintanilla por su tiempo y valiosa orientación en el área de la fitoquímica.

A la Dra. Itza Luna por brindarme orientación en el área del cultivo celular.

A la Dra. Elva Aréchiga por las sugerencias en la mejora de esta tesis.

A la Biol. Lidia Baylón por tan amablemente donarnos las cepas de *Trypanosoma cruzi*.

A Ángel Torres por el gran apoyo que me brindo en el área de Fitoquímica.

A Mónica Garza por su paciencia y tiempo al enseñarme a realizar cultivos celulares.

A mis compañeros de laboratorio Gabriel, Jorge, Karen, Ángel, Mariana, Karla, Vida y Ana Cristina por brindarme su amistad, su apoyo y consejos.

A mis padres y hermanos por siempre brindarme su apoyo incondicional.

Y en general a todos mis maestros, amigos y compañeros que estuvieron apoyándome durante mi formación como MC y la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mis padres, Francisca Garza y Julio Rodríguez

A mis hermanos, Ana, Rocío y Julio

Y a mis sobrinos, Emiliano y Mariano

Sin ellos no sería la persona que soy.

"Quiero compartir con ustedes el secreto que me ha llevado a alcanzar todas mis metas: mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad"

- Louis Pasteur

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Generalidades de <i>T. cruzi</i>	3
Generalidades de la enfermedad de Chagas.....	5
Tratamiento contra la enfermedad de Chagas.....	8
Importancia de la etnobotánica	11
Generalidades de <i>S. molle</i>	12
Generalidades de <i>M. vulgare</i>	13
Generalidades de <i>E. heterophyllum</i>	14
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS.....	17
General	17
Específicos.....	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
Obtención del material vegetal	18
Obtención de los extractos metanólicos mediante extracción Soxhlet.....	18
Evaluación de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes	19
Evaluación de la actividad citotóxica sobre células Vero.....	20
Evaluación de la actividad tóxica sobre <i>Artemia salina</i>	22
Evaluación de la actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos.....	23
Particionamiento del extracto mediante extracciones Soxhlet continuas	24
Cromatografías en capa fina	25
Fraccionamiento mediante cromatografía en columna.....	26
Identificación de los compuestos químicos mediante GC-MS	28
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS	29

Rendimiento de los extractos metanólicos crudos	29
Actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de los extractos metanólicos crudos	29
Rendimiento de las particiones del extracto de <i>S. molle</i>	31
Actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las particiones del extracto de <i>S. molle</i>	31
Cromatografía en capa fina de las particiones del extracto de <i>S. molle</i>	33
Rendimiento de las fracciones colectivas obtenidas	35
Actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las fracciones colectivas ...	36
Cromatografías en capa fina de las fracciones colectivas.....	38
Identificación de los compuestos con actividad biológica contra <i>T. cruzi</i>	40
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES	49
PERSPECTIVAS.....	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO: CARTA DE INGRESO DE ESPECÍMENES AL HERBARIO UNL	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gradiente de elución utilizado para la partición hexánica.....	27
Tabla 2. Gradiente de elución utilizado para la partición clorofórmica.....	27
Tabla 3. Nomenclatura asignada a las fracciones colectivas obtenidas.....	28
Tabla 4. Rendimiento de los extractos metanólicos crudos.....	29
Tabla 5. Resultados de la actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de los extractos metanólicos crudos.....	29
Tabla 6. Rendimiento de las particiones obtenida del extracto de <i>S. molle</i>	31
Tabla 7. Actividad tripanosomicida de las particiones obtenida del extracto de <i>S. molle</i>	31
Tabla 8. Rendimiento de las fracciones colectivas de <i>S. molle</i>	35
Tabla 9. Actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las fracciones colectivas de <i>S. molle</i>	36
Tabla 10. Compuestos identificados en la fracción FC3C1 mediante GC-MS.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales especies de triatomínos vectores de <i>T. cruzi</i> en América.....	3
Figura 2. Estadios de <i>T. cruzi</i> . A) Epimastigote; B) Tripomastigote sanguíneo; C) Amastigotes.....	4
Figura 3. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> en triatomínos y en el humano.....	5
Figura 4. Distribución geográfica y casos estimados de enfermedad de Chagas en zonas no endémicas.....	6
Figura 5. Signo de Romana, signo distintivo de la enfermedad de Chagas.....	8
Figura 6. Fármacos utilizados contra la enfermedad de Chagas. A) Nifurtimix; B) Benznidazol.....	10
Figura 7. <i>Schinus molle</i> . A) Árbol; B) Hojas y frutos.....	12
Figura 8. <i>Marrubium vulgare</i>	13
Figura 9. <i>Eryngium heterophyllum</i>	14
Figura 10. Extracciones Soxhlet.....	18
Figura 11. Evaluación de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes mediante el método del MTT.....	20
Figura 12. Evaluación de la actividad citotóxica sobre células Vero mediante el método del MTT.....	22
Figura 13. Larvas de <i>A. salina</i>	23
Figura 14. Evaluación de la actividad hemolítica.....	24
Figura 15. Separación mediante cromatografía en capa fina.....	25
Figura 16. Cromatografía en columna.....	26
Figura 17. Gráfico de los resultados de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes de la cepa Nuevo León de los extractos metanólicos crudos.....	30
Figura 18. Gráfico de los resultados de la actividad citotóxica sobre células Vero de los extractos metanólicos crudos.....	30

Figura 19. Gráfico de los resultados de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes de la cepa Nuevo León de las particiones del extracto de <i>S. molle</i>	32
Figura 20. Gráfico de los resultados de la actividad citotóxica sobre células Vero de las particiones del extracto de <i>S. molle</i>	32
Figura 21. CCF de las particiones con hexano como eluente y vista bajo luz visible.....	33
Figura 22. CCF de las particiones con hexano como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.....	33
Figura 23. CCF de las particiones con hexano como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.....	33
Figura 24. CCF de las particiones con hexano como eluente y revelada con yodo.....	33
Figura 25. CCF de las particiones con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.....	33
Figura 26. CCF de las particiones con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.....	33
Figura 27. CCF de las particiones con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.....	33
Figura 28. CCF de las particiones con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y revelada con yodo.....	33
Figura 29. CCF de las particiones con cloroformo como eluente y vista bajo luz visible.....	34
Figura 30. CCF de las particiones con cloroformo como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.....	34
Figura 31. CCF de las particiones con cloroformo como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.....	34
Figura 32. CCF de las particiones con cloroformo como eluente y revelada con yodo.....	34
Figura 33. CCF de las particiones con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.....	34

Figura 34. CCF de las particiones con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.	34
Figura 35. CCF de las particiones con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.....	34
Figura 36. CCF de las particiones con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y revelada con yodo.....	34
Figura 37. CCF de las particiones con una mezcla de solvente como eluente y vista bajo luz visible.....	35
Figura 38. CCF de las particiones con una mezcla de solvente como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.....	35
Figura 39. CCF de las particiones con una mezcla de solvente como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.....	35
Figura 40. CCF de las particiones con una mezcla de solvente como eluente y revelada con yodo.....	35
Figura 41. Gráfico de los resultados de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes de la cepa Nuevo León de las fracciones colectivas del extracto de <i>S. molle</i>	37
Figura 42. Gráfico de los resultados de la actividad citotóxica sobre células Vero de las fracciones colectivas del extracto de <i>S. molle</i>	38
Figura 43. CCF de las FC de la 1ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.....	39
Figura 44. CCF de las FC de la 1ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.....	39
Figura 45. CCF de las FC de la 1ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.....	39
Figura 46. CCF de las FC de la 1ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y revelado con yodo.....	39
Figura 47. CCF de la 2ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.....	39
Figura 48. CCF de las FC de la 2da columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.....	39

Figura 49. CCF de las FC de la 2da columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.....	39
Figura 50. CCF de las FC de la 2da columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y revelado con yodo.....	39
Figura 51. CCF de las FC de la columna de la partición clorofórmica con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.....	40
Figura 52. CCF de las FC de la columna de la partición clorofórmica con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.....	40
Figura 53. CCF de las FC de la columna de la partición clorofórmica con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.	40
Figura 54. CCF de las FC de la columna de la partición clorofórmica con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y revelado con yodo.....	40
Figura 55. Cromatograma de GC-MS de la fracción FC3C1.....	40

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
<	Menor que
>	Mayor que
°C	Grados centígrados
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDC	Centers for Disease Control
CH ₅₀	Concentración hemolítica 50
CL ₅₀	Concentración letal 50
CL ₉₀	Concentración letal 90
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ECH	Enfermedad de Chagas
<i>et al.</i>	Y colaboradores
FC	Fracción colectiva
g	Gramo
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico

He	Helio
IS	Índice de selectividad
$K_2Cr_2O_7$	Dicromato de potasio
L	Litro
LIT	Liver Infusion Tryptose
m	Metro
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
nm	Nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Potencial de hidrógeno
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, representa un importante problema de salud pública en América Latina ya que afecta alrededor de 8 millones de personas. El tratamiento común para esta enfermedad es el uso de nifurtimox y benznidazol. No obstante, estos fármacos presentan baja eficacia clínica según la fase de la enfermedad y el genotipo del parásito, generan diversos efectos colaterales adversos y se ha demostrado que son citotóxicos y genotóxicos; por lo cual es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos. Por este motivo, el objetivo general de este trabajo fue identificar compuestos químicos presentes en extractos de plantas de uso medicinal con actividad biológica contra la forma epimastigote de *T. cruzi*. Para esto primeramente se obtuvieron los extractos metanólicos de *Schinus molle*, *Marrubium vulgare* y *Eryngium heterophyllum* mediante extracciones Soxhlet y se procedió a evaluar su actividad tripanosomicida sobre epimastigotes de la cepa Nuevo León, así como su actividad citotóxica, tóxica y hemolítica sobre células Vero, *Artemia salina* y eritrocitos humanos respectivamente. El extracto de *S. molle* fue el que presentó la mejor actividad tripanosomicida (CL_{50} 94 $\mu\text{g/mL}$, IS 2.25), por consiguiente, se seleccionó este extracto para particionarlo mediante extracciones Soxhlet continuas con hexano, cloroformo y metanol. Se evaluó la actividad de las particiones. Las particiones hexánica y clorofórmica fueron las que presentaron la mejor actividad tripanosomicida (CL_{50} 49 $\mu\text{g/mL}$, IS 1.74 y CL_{50} 20 $\mu\text{g/mL}$, IS 5.6), por lo cual se seleccionaron para fraccionarlas mediante cromatografías en columna. La fracción colectiva FC3C1 fue la que presentó la mejor actividad tripanosomicida (CL_{50} 21 $\mu\text{g/mL}$, IS 6.19), por tal motivo se procedió a identificar los compuestos químicos presentes en ella mediante GC-MS. Se identificaron un total de 20 compuestos presentes en la fracción. Se ha reportado que uno de los compuestos identificados, el epóxido trans-Z-alfa-bisaboleno, presenta alta actividad contra *Leishmania* sp. por consiguiente se considera que este compuesto podría ser uno de los responsables de la actividad tripanosomicida. No obstante, para identificar con certeza cuales son los compuestos que presentan la actividad tripanosomicida habrá que continuar con el fraccionamiento biodirigido o adquirir de manera comercial los compuestos identificados y evaluarlos.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, represents a major public health problem in Latin America, affecting around 8 million people. The common treatment for this disease is the use of nifurtimox and benznidazole. However, these drugs have low clinical efficacy depending on the stage of the disease and the genotype of the parasite, they generate various adverse side effects, and they have been shown to be cytotoxic and genotoxic. Therefore, it is necessary to search for new alternative treatments. For this reason, the general objective of this work was to identify chemical compounds with biological activity against the epimastigote form of *T. cruzi* in medicinal plant extracts. For this, the methanolic extracts of *Schinus molle*, *Marrubium vulgare* and *Eryngium heterophyllum* were obtained by Soxhlet extractions and their trypanosomicidal activity was evaluated on epimastigotes of the Nuevo León strain, as well as their cytotoxic, toxic, and hemolytic activity on Vero cells, *Artemia salina* and human erythrocytes, respectively. The *S. molle* extract was the one that presented the best trypanosomicidal activity (LC_{50} 94 μ g/mL, SI 2.25), for which this extract was selected for partitioning by continuous Soxhlet extractions with hexane, chloroform, and methanol. The trypanosomicidal, cytotoxic, toxic, and hemolytic activity of the partitions were evaluated. The hexane and chloroform partitions were those that presented the best activity (LC_{50} 49 μ g/mL, SI 1.74 and LC_{50} 20 μ g/mL, SI 5.6), for which these partitions were selected to be fractionated by column chromatography. The collective fraction FC3C1 was the one that presented the best trypanosomicidal activity (LC_{50} 21 μ g/mL, IS 6.19), for this reason the chemical compounds present in it were identified by GC-MS. A total of 20 compounds present in the fraction were identified. It has been reported that one of the identified compounds, the trans-Z-alpha-bisabolene epoxide, has high activity against *Leishmania* sp. for which it is thought that this compound could be one of those responsible for the trypanosomicidal activity. However, to identify with certainty which are the compounds that present the trypanosomicidal activity, it will be necessary to continue with the biodirected fractionation or to acquire commercially the identified compounds and to evaluate them.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana o mejor conocida como la enfermedad de Chagas (ECH) es una enfermedad zoonótica parasitaria causada por el protozooario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que hay alrededor de 8 millones de personas con esta enfermedad en el mundo. Asimismo, se estima que más de 10,000 personas mueren cada año a causa de ella y que más de 25 millones corren el riesgo de contraerla (OMS 2020).

La ECH se presenta principalmente en regiones endémicas de 21 países de América Latina, donde se incluye México. No obstante, en los últimos años se ha presentado con mayor frecuencia en Estados Unidos de América, Canadá, diversos países de Europa y algunos del Pacífico Occidental, esto debido a la movilidad de la población, la urbanización y la migración (OMS 2020).

La principal forma de adquirir el parásito en regiones endémicas, como América Latina, es a través del contacto con las heces del insecto vector infectado, el cual es un hematófago de la subfamilia Triatominae conocido comúnmente como chinche, que defeca cuando se alimenta de la sangre de los humanos. *Trypanosoma cruzi* también se transmite por transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y de forma congénita; estas son las principales formas de infección en zonas urbanas y en países no endémicos de la enfermedad. Asimismo, *T. cruzi* se puede transmitir a través del consumo de alimentos contaminados con el parásito ya sea por las heces u orina de los triatominos y mediante accidentes de laboratorio (OMS 2020).

Una vez que se adquiere al parásito, en la ECH comúnmente se distinguen dos fases clínicas, la aguda y la crónica. En la fase aguda el parásito se encuentra en circulación en el torrente sanguíneo. Esta fase se presenta inmediatamente después de la infección y puede durar varias semanas o meses, hasta que es negativa la parasitemia detectada microscópicamente. Puede ser asintomática o presentar síntomas inespecíficos como fiebre, cefalea y malestar general. En algunos casos pueden aparecer lesiones cutáneas en el sitio de inoculación, conocidos como chagomas, o un edema bpalpebral unilateral acompañado de conjuntivitis, que se conoce como signo de Romana. La muerte durante esta fase es poco común y sucede principalmente por meningoencefalitis o miocarditis, lo cual es más frecuente en pacientes inmunodeprimidos y niños pequeños (Molina *et al.* 2016).

La fase crónica comienza cuando la parasitemia cesa y ya no puede detectarse microscópicamente y las pruebas serológicas son positivas, esto sucede alrededor de 1-2 meses después de la infección. Durante esta fase la mayoría de las personas son asintomáticas, sin embargo, alrededor del 30-40% manifiestan complicaciones cardíacas, digestivas o mixtas décadas después de la infección, las cuales pueden ocasionar la muerte de la persona (Molina *et al.* 2016).

En la actualidad de manera comercial solo existen dos fármacos para tratar la ECH, estos son el nifurtimox y benznidazol. No obstante, estos son inadecuados ya que son poco eficaces durante la fase crónica de la enfermedad, deben utilizarse por largos periodos de tiempo y presentan frecuentemente efectos secundarios tales como síntomas gastrointestinales como pérdida de peso, náuseas y vómito; alteraciones hematológicas como disminución del número de leucocitos, granulocitos y plaquetas; alteraciones dermatológicas como eczema, rash y síndrome de Steven-Jhonson y alteraciones neurológicas como polineuropatías, por lo cual muchos pacientes abandonan el tratamiento (Jaramillo *et al.* 2017); además de que se ha demostrado que tanto el nifurtimox como el benznidazol son citotóxicos y genotóxicos (Buschini *et al.* 2009), por lo cual la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos es de suma importancia.

No obstante, el desarrollo de nuevos medicamentos antiparasitarios no ha sido prioridad para la industria farmacéutica ya que muchas de las enfermedades parasitarias se presentan en países pobres donde la gente no puede pagar un alto precio por los medicamentos. Una alternativa a los medicamentos sintéticos es la búsqueda de extractos de plantas con actividad antiparasitaria o metabolitos secundarios derivados de ellos (Wink 2012). Se sabe que más del 25% de los medicamentos utilizados durante las últimas tres décadas proceden directamente de plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados. Asimismo, cabe mencionar que de las aproximadamente 250,000 plantas que hay en el mundo, solamente entre el 5-15% han sido investigadas para buscar compuestos bioactivos (Rivas-Morales *et al.* 2016).

Por estas razones, un buen punto de partida para buscar productos naturales con actividad contra *T. cruzi* sería investigar algunas plantas mexicanas medicinales tales como *Schinus molle*, *Marrubium vulgare* y *Eryngium heterophyllum*.

ANTECEDENTES

Generalidades de *T. cruzi*

En 1909, el investigador brasileño Carlos Chagas descubrió al parásito *T. cruzi* en monos y en el triatomino *Panstrongylus megistus* en el municipio de Lassance en Brasil, mientras realizaba trabajos para controlar la malaria. Más adelante, observó al parásito en un lactante y describió el ciclo biológico, la patología, y la epidemiología de este parásito (Apt 2013).

Trypanosoma cruzi es un protozooario parásito hemoflagelado perteneciente a la familia Trypanosomatidae, el cual desarrolla su ciclo biológico en dos hospederos distintos. Uno es un invertebrado, representado por insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae, principalmente de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Figura 1); y el otro hospedero es un vertebrado, representado por mamíferos como el ser humano y animales silvestres y domésticos (Apt 2013).

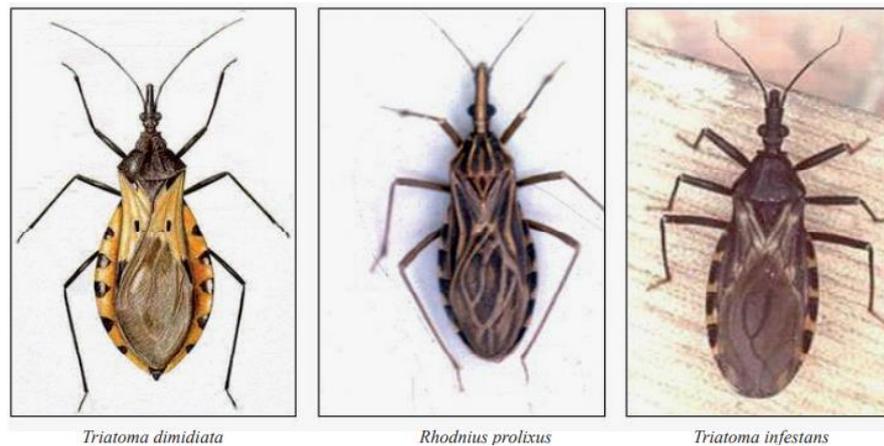


Figura 1. Principales especies de triatominos vectores de *T. cruzi* en América. Imagen tomada de Guhl (2009).

Durante su ciclo biológico, *T. cruzi* presenta cuatro estadios: epimastigote, tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo y amastigote, según el hospedero y lugar en donde se encuentra (Figura 2) (Apt 2013).

El epimastigote, se divide por fisión binaria en el del tubo digestivo del triatomino; es de aspecto fusiforme, con cinetoplasto y flagelo anterior al núcleo y presenta una corta membrana ondulante; esta forma también se desarrolla en medios de cultivo artificiales. Los tripomastigotes tanto metacíclicos como sanguíneos son fusiformes, miden alrededor de 20 μm , están provistos de flagelo, cinetoplasto

localizado posterior al núcleo y una membrana ondulante a lo largo de su cuerpo. Los tripomastigotes metacíclicos son la forma infectiva para los vertebrados y se encuentran en el intestino posterior del vector. Mientras que los tripomastigotes sanguíneos se encuentran en la sangre del mamífero infectado y son los responsables de infectar al vector durante su alimentación. Por último, el amastigote, el cual constituye la forma de división intracelular en los tejidos del hospedero mamífero, se encuentra frecuentemente en los tejidos del músculo cardíaco y del sistema neurovegetativo del tubo digestivo, es redondo, mide de 2-4 μm , posee núcleo y cinetoplasto (Vargas 2005).

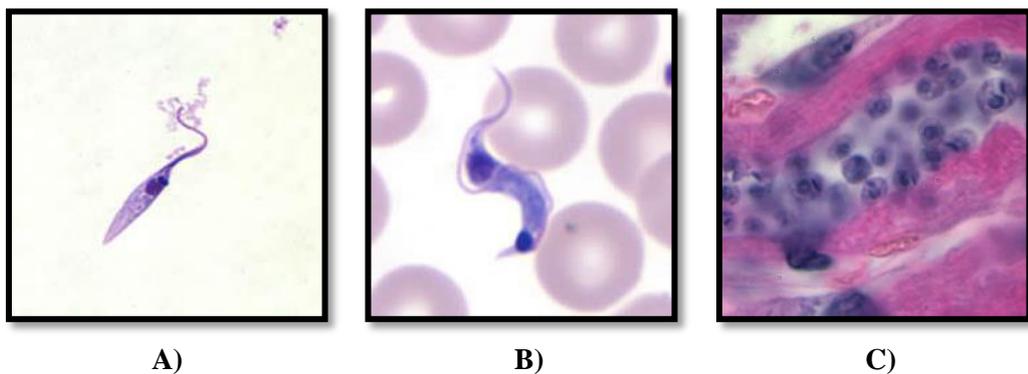


Figura 2. Estadios de *T. cruzi*. A) Epimastigote; B) Tripomastigote sanguíneo; C) Amastigotes. Imágenes tomadas del CDC (2019).

El ciclo de *T. cruzi* inicia cuando el triatomino pica al mamífero para alimentarse de sangre y libera tripomastigotes metacíclicos en sus deyecciones cerca del sitio de la herida. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan al hospedero por la herida que genera el triatomino al alimentarse o a través de membranas mucosas. Una vez que ingresan al hospedero, los tripomastigotes metacíclicos penetran las células cercanas al lugar de inoculación y se transforman en amastigotes, los cuales se dividen por fisión binaria. Los amastigotes se transforman en tripomastigotes sanguíneos y se liberan al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar células de diversos tejidos y se transforman en amastigotes en los nuevos sitios de infección. Posteriormente, un nuevo triatomino se puede infectar al alimentarse de sangre del mamífero que presenta los tripomastigotes sanguíneos circulantes. Los tripomastigotes ingeridos se convierten en epimastigotes en el intestino medio del triatomino, los cuales se dividen por fisión binaria longitudinal y se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior en un plazo de 15-30 días (Figura 3) (CDC 2019).

Trypanosoma cruzi infecta naturalmente a más de 180 especies de mamíferos, las cuales pertenecen a los órdenes Cingulata (armadillos), Rodentia (roedores), Lagomorpha (conejos), Chiroptera (murciélagos), Pilosa (osos perezosos y hormigueros), Didelphimorphia (marsupiales), Carnivora (mapache), Primates y Perisodactyla (García-Jordán *et al.* 2015).

Asimismo, *T. cruzi* también infecta al ser humano que, además de sufrir la enfermedad, actúa como reservorio. Los reservorios peridomésticos y domésticos de este parásito son *Felis domesticus* (gato), *Canis familiaris* (perro), *Oryctolagus cuniculus* (conejo), *Sus scrofa* (cerdo) *Capra hircus* (cabra) y *Cavia porcellus* (curí), mientras que los reservorios sinantrópicos son *Mus musculus* (ratón), *Rattus norvegicus* (rata parda) y *Rattus rattus* (rata negra) (García-Jordán *et al.* 2015).

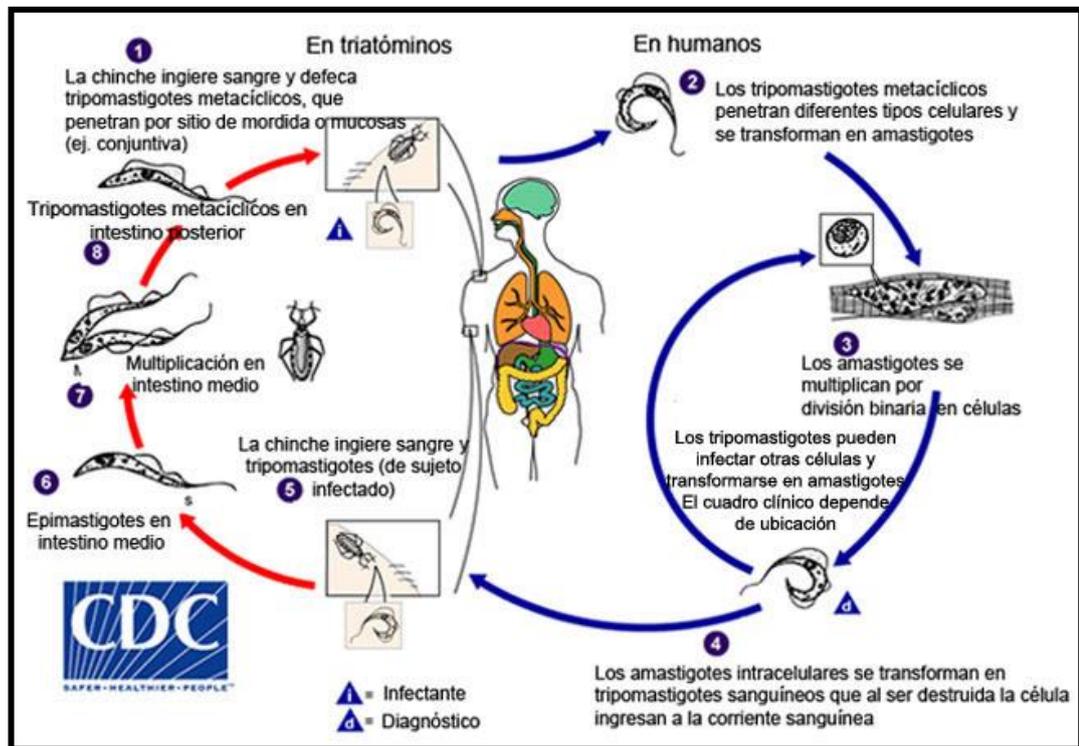


Figura 3. Ciclo biológico de *T. cruzi* en triatóminos y en el humano. Imagen tomada de Uribarren (2018).

Generalidades de la enfermedad de Chagas

La OMS estima que hay 8 millones de personas infectadas por *T. cruzi* en el mundo. Asimismo, se calcula que más de 10,000 personas mueren cada año a causa

de la ECH y que más de 25 millones de personas corren el riesgo de contraer esta enfermedad (OMS 2020).

La ECH se presenta principalmente en América Latina. Sin embargo, en las últimas décadas se ha diseminado a otros continentes (Figura 4) (OMS 2019). Lo anterior, como resultado de la migración, puesto que los migrantes son considerados un factor clave para la diseminación de esta enfermedad a otros países (Gascón *et al.* 2010), debido a que la prevalencia de la ECH en los países no endémicos es proporcional a la cantidad de inmigrantes que provienen de zonas endémicas, mientras que la prevalencia de portadores está determinada, a su vez, por la prevalencia de la enfermedad en el país de origen (Lucas y Barba 2009). En un estudio realizado en migrantes, se encontraron las siguientes seroprevalencias en las personas de acuerdo con su país de origen: Guatemala 37.5%, Honduras 22.6%, El Salvador 16% y México 8.7% (Montes-Rincón *et al.* 2018).

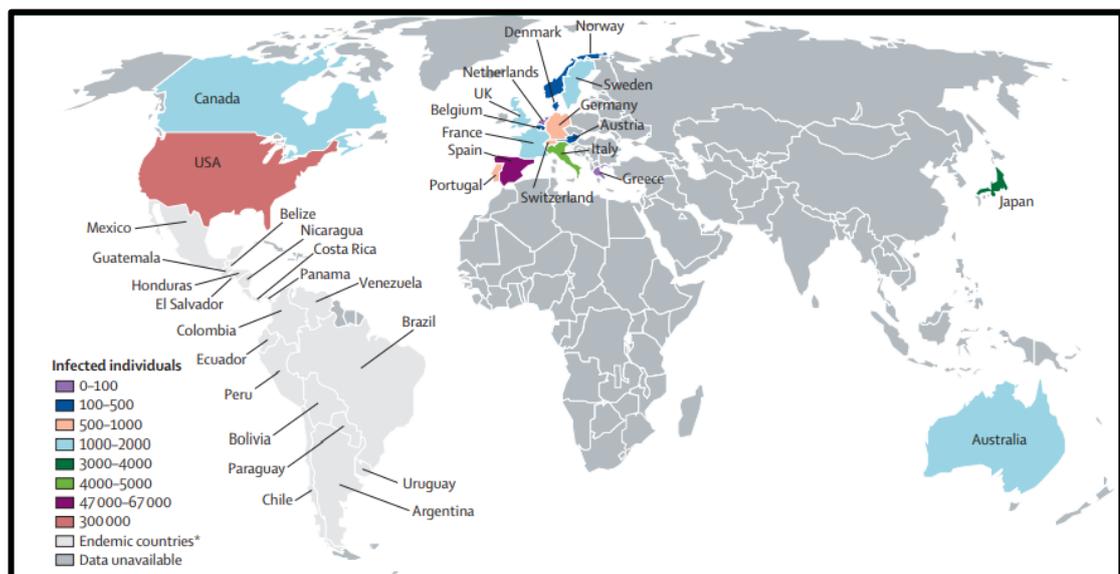


Figura 4. Distribución geográfica y casos estimados de enfermedad de Chagas en zonas no endémicas. Imagen tomada de Rassi (2010).

En América Latina *T. cruzi* se transmite principalmente por la vía vectorial, al tener el ser humano contacto con las heces u orina infectadas de los triatomíneos. Sin embargo, este parásito también se puede transmitir a través de transfusiones de sangre, trasplantes de órganos, verticalmente de la madre infectada al hijo durante el embarazo, por ingesta accidental de alimentos contaminados con este parásito y por accidentes de laboratorio (OPS 2018).

En un estudio realizado en donantes de sangre en el Hospital de Cardiología del Instituto Mexicano del Seguro Social en Monterrey, Nuevo León, se analizaron 1,000 muestras de sangre de donantes sanos para determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*, encontrándose una seropositividad del 2.8% (Galaviz-Silva *et al.* 2009). Por otra parte, en otro estudio donde se realizó la detección serológica de la infección por *T. cruzi*, se analizaron las muestras de 520 mujeres embarazadas y recién nacidos en el Hospital General Regional de León, Guanajuato, encontrándose una prevalencia del 4% en las madres, asimismo por medio de PCR se detectaron cuatro casos de recién nacidos positivos (Montes-Rincón *et al.* 2016).

Una vez que se adquiere al parásito, en la ECH comúnmente se distinguen dos fases clínicas, una aguda y una crónica. Ambas fases pueden ser asintomáticas o ser potencialmente mortales (OMS 2019).

La fase aguda se presenta en las primeras semanas o los primeros meses de la infección. Durante esta fase el parásito se encuentra circulando en sangre en cantidades detectables. Generalmente esta fase pasa inadvertida por ser asintomática o presentar solo signos y síntomas leves que no son exclusivos de la ECH. Los síntomas pueden incluir fiebre, fatiga, mialgia, cefalea y sarpullido, mientras que los signos pueden ser un leve agrandamiento del bazo o hígado, inflamación de los ganglios e inflamación local en el sitio por donde el parásito ingresó al cuerpo, lo que se conoce como chagoma. El signo más representativo de la ECH en la fase aguda se conoce como signo de Romaña, el cual consiste en un edema palpebral unilateral del lado de la cara donde el vector se alimentó y defecó (Figura 5). Si los síntomas se presentan durante la fase aguda, por lo regular cesan por sí solos en algunas semanas o meses. Durante la fase aguda, en raras ocasiones los niños pequeños mueren (<5%) por miocarditis o meningoencefalitis. Asimismo, esta fase también puede ocasionar complicaciones graves en las personas con el sistema inmunitario debilitado (CDC 2017).



Figura 5. Signo de Romaña, signo distintivo de la enfermedad de Chagas. Imagen tomada del CDC (2017).

Después de la fase aguda, se presenta la fase crónica, esta fase se desarrolla de 10 a 30 años posteriores a la infección inicial. Durante esta fase los parásitos penetran y se multiplican en las células de los tejidos, particularmente del sistema nervioso autónomo y de los músculos no estriados. La infección puede mantenerse asintomática durante muchos años o inclusive durante toda la vida. No obstante, algunas personas pueden presentar complicaciones cardíacas, como agrandamiento del corazón, insuficiencia cardíaca, alteraciones del ritmo o frecuencia cardíaca y en algunas ocasiones paros cardíacos, lo cual puede ocasionar la muerte súbita de la persona afectada; asimismo algunas personas pueden presentar complicaciones intestinales, como agrandamiento del esófago o del colon, las cuales pueden causar dificultades para comer o defecar. Estas complicaciones cardíacas e intestinales se presentan en aproximadamente el 30% de los casos (CDC 2017).

Tratamiento contra la enfermedad de Chagas

Para tratar la ECH únicamente existen dos fármacos, el benznidazol y el nifurtimox (Figura 6). No obstante, estos fármacos son inadecuados ya que presentan frecuentemente efectos secundarios graves, deben usarse por largos periodos de tiempo y son poco eficaces contra la infección crónica, ya que la efectividad del tratamiento parece disminuir con el tiempo desde la infección primaria, por lo cual la detección temprana es crucial (McPhee *et al.* 2013).

El nifurtimox fue el primer fármaco utilizado para tratar la ECH y se administra por vía oral en tres o cuatro dosis durante 60 a 90 días. Este fármaco presenta buena

efectividad en la fase aguda, sin embargo, las tasas de curación en la fase crónica indeterminada varían del 86% en niños menores de 14 años a 7– 8% en adultos. Mientras que el porcentaje de personas que presentan efectos adversos al estar bajo este tratamiento varia del 43–97.5%. Los efectos adversos más comunes son trastornos neurológicos como desorientación, irritabilidad, parestesias, insomnio, cambios de humor y neuropatía periférica; manifestaciones digestivas como vómito, náuseas, anorexia y pérdida de peso; y en algunas ocasiones fiebre y erupción cutánea. Por lo cual, el tratamiento se suspende en el 14.5-57.5% de los casos (Pérez-Molina y Molina 2018).

Generalmente se prefiere el uso del benznidazol sobre el nifurtimox debido a su mejor perfil de tolerabilidad, penetración en el tejido y eficacia. Este se administra por vía oral en dos o tres dosis, comúnmente durante 60 días. El benznidazol presenta buena actividad durante la fase aguda de la infección. La curación serológica en pacientes con la enfermedad congénita se consigue hasta en el 100% de los casos cuando estos son tratados durante el primer año de vida, asimismo durante la fase aguda se consigue una tasa de curación del 76%. Sin embargo, en la fase crónica, las tasas de curación son mucho más bajas, varían del 60-93% en niños de hasta 13 años, y del 2–40% en adultos. Los efectos adversos más comunes de este fármaco incluyen hipersensibilidad, principalmente en forma de erupción cutánea (29–50%), problemas digestivos (5–15%) y síntomas generales como anorexia, fatiga, dolor de cabeza y trastornos del sueño (40%). También genera neuropatía y depresión de la médula ósea, sin embargo, estos efectos adversos no son muy comunes. Con este fármaco, el tratamiento se interrumpe en el 9-29% de los casos (Pérez-Molina y Molina 2018).

En diversos estudios se ha demostrado que el nifurtimox y benznidazol presentan actividad cancerígena y mutagénica significativa, además de producir supresión de la médula ósea y hepatotoxicidad. Ambos fármacos son compuestos heterocíclicos que presentan un grupo nitro en su estructura. Los compuestos del grupo de los nitrofuranos, al cual pertenece el nifurtimox, no interactúan directamente con el ADN, sino que necesitan ser activados metabólicamente mediante enzimas hidroxilaminas que reducen su grupo funcional nitro. La acción tripanosomicida del nifurtimox se debe a la formación de radicales nitro-anión que interactúan con el ADN del parásito y producen su rompimiento; además durante este proceso se produce la formación de radicales de peroxinitrato y especies reactivas de oxígeno, los cuales son los causantes

de la alta toxicidad de este fármaco y de su potencial efecto mutagénico, genotóxico y cancerígeno. Por otra parte, los compuestos del grupo de los nitroimidazoles, al cual pertenece el benznidazol, deben su efecto a la reducción del grupo funcional nitro, así como a la producción de derivados hidroxilamina y radicales nitro-anión, los cuales desestabilizan la doble hélice del ADN y ocasionan el rompimiento de este. Lo cual explica el efecto mutagénico de este fármaco (Jaramillo *et al.* 2017).

Además, en diversos estudios realizados se ha encontrado que tanto el nifurtimox como el benznidazol generan ciclos de oxidoreducción que producen aniones superóxido y radicales hidroxilo, los cuales son altamente nocivos para las células. Asimismo, se ha encontrado que ambos fármacos pueden producir efectos genotóxicos significativos en células humanas, siendo las dosis más bajas requeridas para de generar daño en el ADN las que se encuentran normalmente dentro de las concentraciones plasmáticas de personas tratadas con estos fármacos. De igual manera, se ha demostrado que el benznidazol puede generar recombinación mitótica en cepas diploides del hongo *Aspergillus nidulans*, la cual posiblemente ocurre por la inducción de rompimientos en los cromosomas. Esto explica el efecto carcinogénico que presenta este fármaco (Jaramillo *et al.* 2017).

Es importante mencionar que, de estos dos medicamentos solamente el benznidazol está aprobado por la organización Food and Drug Administration (FDA) de Estados Unidos para tratar la ECH en pacientes de 2-12 años. Mientras que el uso del benznidazol para tratar un paciente fuera del rango de edad de 2-12 años, se basa en el diagnóstico clínico y la decisión de un médico. El nifurtimox no está aprobado actualmente por la FDA debido a su toxicidad (CDC 2019).

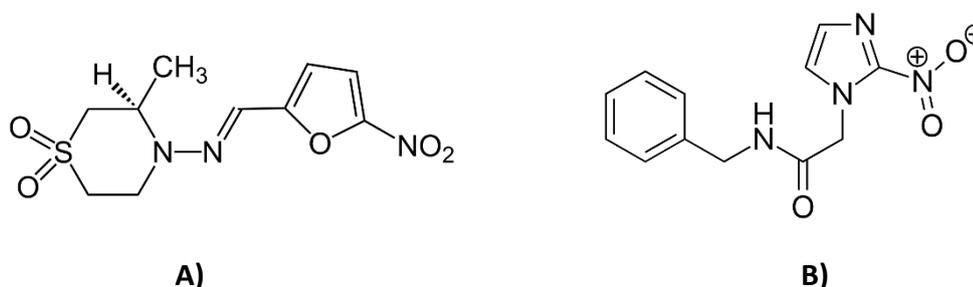


Figura 6. Fármacos utilizados contra la enfermedad de Chagas. A) Nifurtimix; B) Benznidazol.

Importancia de la etnobotánica

El uso de plantas medicinales es una práctica ancestral que ha sido utilizada para tratar diferentes tipos de padecimientos (Rodríguez y Barreto 2015). Actualmente, alrededor del 80% de las personas utilizan cotidianamente la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud mediante el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Bermúdez *et al.* 2005).

Durante las últimas décadas más del 25% de los medicamentos utilizados proceden directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados. Asimismo, es importante mencionar que de las aproximadamente 250,000 plantas medicinales que existen solamente se han investigados entre el 5% al 15% para buscar compuestos bioactivos. Por lo que se enfatiza el gran potencial que tienen las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos (Rivas-Morales *et al.* 2016).

El estudio de las plantas medicinales para beneficio del hombre forma parte de la etnobotánica (Bermúdez *et al.* 2005). Para estudiar la actividad biológica de una planta es necesario extraer los principios activos de ésta. La manera más sencilla para realizar esto es mediante una infusión o decocción. Sin embargo, para analizar las propiedades biológicas de una planta, es preferible recurrir a métodos de extracción más complejos, que sean reproducibles. Los métodos de extracción más utilizados son la maceración en frío o en calor, la lixiviación, el uso del aparato Soxhlet y la destilación por arrastre por vapor de agua (Rivas-Morales *et al.* 2016).

Posteriormente, si se quiere obtener los compuestos responsables de la actividad biológica, se puede realizar un asilamiento biodirigido. Este proceso consiste en el fraccionamiento de la muestra mediante diversas técnicas como extracciones Soxhlet continuas con solventes de distintas polaridades, cromatografías en columna, entre otras. Seguido se realiza el análisis mediante bioensayos de las fracciones obtenidas para identificar aquellas que contienen los compuestos activos y continuar su fraccionamiento hasta obtener los compuestos puros. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que muchas veces la actividad de un extracto se debe al sinergismo de los compuestos presentes en la muestra, por lo cual en algunos casos durante el asilamiento biodirigido se pierde la actividad del extracto (Castro 2016).

Generalidades de *S. molle*

Schinus molle L., comúnmente conocido como pirul, es un árbol perennifolio de la familia Anacardiaceae que mide normalmente 4-8 m de altura, pero puede llegar a medir hasta 15 m. Es originario de Perú, pero actualmente se encuentra distribuido en México, Centroamérica y algunas partes de Estados Unidos (Luna, 2012). Es una especie dioica, por lo cual presenta árboles femeninos que sólo producen flores pistiladas de las cuales derivan los frutos y árboles masculinos que sólo producen flores estaminadas. En México, los árboles de ambos sexos usualmente tienen flores durante todo el año, no obstante, sólo los árboles femeninos producen frutos en todas las estaciones (Figura 6) (Ramírez *et al.* 2015).

En la herbolaria mexicana se consumen las hojas de esta planta en forma de infusión para el tratamiento de enfermedades respiratorias, estomacales, hepáticas y reumáticas, además de tener actividad cicatrizante (Ramírez *et al.* 2015). De igual manera se ha utilizado en la medicina popular como antiséptico tópico, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral, antiespasmódico y como analgésico (Martins *et al.* 2014).

Además, se ha demostrado que posee actividad tripanosomicida contra epimastigotes de *T. cruzi*. Molina-Garza *et al.* (2014) reportaron una CL₅₀ de 16.31 µg/mL sobre la cepa CL Brener, mientras que Pérez *et al.* (2017) reportaron una CL₅₀ de 827 µg/mL sobre la cepa de Nuevo León.

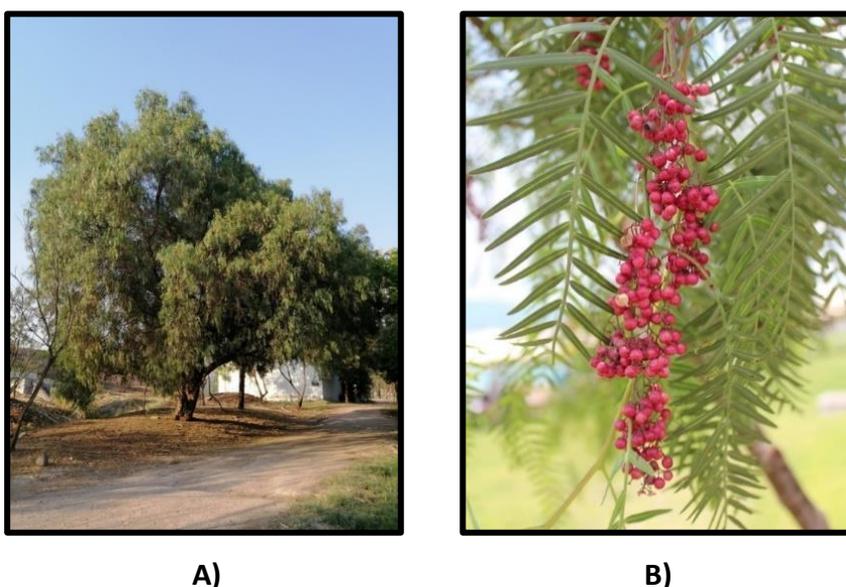


Figura 7. *Schinus molle*. A) Árbol; B) Hojas y frutos.

Generalidades de *M. vulgare*

Marrubium vulgare L., comúnmente conocido como marrubio, es una hierba perenne de la familia Lamiaceae. Es originaria de la India, pero actualmente se encuentra extensamente cultivada en las regiones templadas de ambos hemisferios. Crece junto a los caminos, al borde de los campos, al pie de los muros y en terrenos abandonados. Es una planta leñosa de 30 a 80 cm de alto, con gran cantidad de tallos cuadrados, simples o un poco ramificados, hojas redondeadas con bordes festoneados y nervaduras en reddecilla. Presenta flores blancas las cuales se agrupan en gran número en las axilas de las hojas superiores. Toda la planta tiene un color blanquecino debido a que presenta abundantes vellosidades, además desprende un olor característico de la planta (Figura 7) (Haiek y Tillett 2004).

Las hojas y los tallos florales jóvenes de esta planta se usan en la medicina tradicional comúnmente para tratar bronquitis, tos y resfriados. Además, posee efectos antisépticos, antiespasmódicos, antidiabéticos y diuréticos (Boudjelal *et al.* 2012). Asimismo, se ha demostrado que tiene actividad tripanosomicida contra epimastigotes de *T. cruzi*. Molina-Garza *et al.* (2014) reportaron una CL₅₀ de 22.66 µg/mL sobre la cepa CL Brener, mientras que Pérez *et al.* (2017) reportaron una CL₅₀ de 647 µg/mL sobre la cepa de Nuevo León.



Figura 8. *Marrubium vulgare*.

Generalidades de *E. heterophyllum*

Eryngium heterophyllum E., comúnmente conocida como hierba del sapo, es una hierba perenne pertenece a la familia Apiaceae. Mide de 20 a 60 cm de alto, con inflorescencias ramificadas a manera de panícula y flores numerosas de color azul a blanco (Figura 8). Se puede encontrar a la orilla de caminos, canales, en potreros, terrenos abandonados y áreas con disturbio. En México presente una distribución geografía amplia, encontrándose en muchos Estados del país (García-Ruíz 2013).

A esta planta se le atribuyen propiedades terapéuticas, en el tratamiento de diabetes, hipercolesterolemia y artritis (Carreón-Sánchez *et al.* 2013). Asimismo, se ha demostrado que posee actividad tripanosomicida contra epimastigotes de *T. cruzi*, ya que Molina-Garza *et al.* (2014) reportaron una CL₅₀ de 11.24 µg/mL sobre la cepa CL Brener.



Figura 9. *Eryngium heterophyllum*.

JUSTIFICACIÓN

La ECH, causada por el protozooario *T. cruzi*, afecta alrededor de 8 millones de personas y causa aproximadamente 10,000 muertes al año. Asimismo, se estima que 25 millones de personas están en riesgo de contraer esta enfermedad, por lo cual representa un importante problema de salud pública en América Latina. Actualmente el tratamiento común para esta enfermedad consiste solamente en el uso de nifurtimox y benznidazol. Sin embargo, estos fármacos presentan baja eficacia clínica durante la fase crónica de la enfermedad, generan diversos efectos colaterales adversos, son citotóxicos y genotóxicos, y además se ha reportado que algunas cepas de *T. cruzi* presentan resistencia ante estos fármacos; por estas razones es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos alternativos para tratar esta enfermedad. Las plantas poseen un gran potencial para obtener nuevos medicamentos, por lo cual la búsqueda de nuevos compuestos tripanosomicidas en plantas, tales como *S. molle*, *M. vulgare* y *E. heterophyllum* es una opción muy factible.

HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de *S. molle*, *M. vulgare* y *E. heterophyllum* poseen compuestos químicos que presentan actividad biológica contra la forma epimastigote de *T. cruzi*.

OBJETIVOS

General

- ✓ Identificar compuestos químicos presentes en los extractos de *S. molle*, *M. vulgare* o *E. heterophyllum* con actividad biológica contra la forma epimastigote de *T. cruzi*.

Específicos

1. Evaluar la actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de los extractos metanólicos de *S. molle*, *M. vulgare* y *E. heterophyllum*.
2. Aislar de forma biodirigida los compuestos bioactivos del extracto que presente la mejor actividad tripanosomicida.
3. Identificar los compuestos presentes en la fracción con la mejor actividad biológica contra *T. cruzi*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Las plantas de estudio se seleccionaron con base en estudios previos que reportan que poseen actividad tripanosomicida (Molina-Garza *et al.* 2014; Pérez *et al.* 2017). *Schinus molle*, *M. vulgare* y *E. heterophyllum* fueron colectadas en la localidad de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, México durante el mes de junio del 2020. Una vez colectadas, un ejemplar de cada planta se llevó al herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para su identificación y asignación de número de folio.

Obtención de los extractos metanólicos mediante extracción Soxhlet

La parte aérea de las plantas (hojas, tallos y flores) se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez secas se trituraron con la ayuda de un molino manual. Se pesaron 25 g del material vegetal en un cartucho de celulosa, el cual se colocó en el extractor Soxhlet. Como solvente de extracción se emplearon 500 mL de metanol absoluto. El extractor Soxhlet se montó sobre un agitador magnético para obtener agitación constante (Figura 10). La extracción se mantuvo por 48 h. Una vez terminado el tiempo de extracción se dejaron enfriar los extractos a temperatura ambiente y después se filtraron con la ayuda de un papel filtro (Whatman N°1). Posteriormente, se concentraron por medio de una evaporación a vacío mediante un rotavapor (Yamato Scientific RE-301-BOV) hasta obtener un volumen aproximado de 30 mL. Después se pasaron a un frasco y se dejó evaporar la totalidad del solvente a temperatura ambiente. Finalmente se almacenaron los extractos a 4 °C hasta su utilización.



Figura 10. Extracciones Soxhlet.

Evaluación de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes

La cepa Nuevo León de *T. cruzi* fue donada amablemente por la Biol. Lidia Baylón del CINVESTAV-CDMX. Esta se cultivó en el medio Liver Infusion Tryptose (LIT) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Estados Unidos). Se cosechó durante la fase de crecimiento exponencial, cuando los parásitos alcanzaron una densidad de 1.0×10^6 epimastigotes/mL (Valencia *et al.* 2011).

Se preparó una solución stock con 10-25 mg de cada uno de los extractos/particiones/fracciones disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). A partir de dicha solución stock se realizaron diluciones seriadas. La concentración de DMSO final en las concentraciones empleadas fue menor al 1% (Molina-Garza *et al.* 2014).

Los bioensayos se realizaron por duplicado en una placa estéril de 96 pozos. En cada pozo se depositaron 190 μ L del medio LIT con 1.0×10^6 epimastigotes/mL y 10 μ L de cada una de las diferentes concentraciones de cada extracto/partición/fracción con tres repeticiones de cada uno de los tratamientos. Para los extractos crudos se evaluaron concentraciones finales de 1500-10 μ g/mL; para las particiones de 1000-10 μ g/mL; mientras que para las fracciones 200-10 μ g/mL. Como blanco se utilizó medio LIT sin parásitos y cada una de las concentraciones del extracto/partición/fracción, como control positivo nifurtimox (10-50 μ g/mL) (Sigma-Aldrich) y como control negativo DMSO 1 % con un volumen igual al de los extractos. Las microplacas se incubaron por 72 h a 28 °C. El número de epimastigotes vivos se determinó mediante el método colorimétrico del bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich). Después de la incubación se adicionaron a cada pozo 10 μ L de MTT a una concentración de 5 mg/mL con metosulfato de fenazina (PMS) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0.22 mg/mL y se incubó la microplaca a 28°C por 75 min. Posteriormente, para la extracción del formazan a cada pozo se le agregaron 100 μ L de duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% - 0.1N HCl y la microplaca se dejó incubar por 4 h (Muelas-Serrano *et al.* 2000) (Figura 11). El número de epimastigotes vivos se determinó indirectamente al obtener la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas (Biochrom Asys UVM-340) y utilizarse la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de mortalidad} = \frac{(A_c - A_m) - (A_p - A_{pm})}{A_c - A_m} \times 100$$

Donde:

A_c = Promedio de las absorbancias del control negativo

A_m = Promedio de las absorbancias del medio LIT solo

A_p = Promedio de las absorbancias de cada tratamiento

A_{pm} = Promedio del blanco de cada tratamiento

Los resultados se expresaron como la concentración letal 50 (CL_{50}) y 90 (CL_{90}), la cual corresponde a la concentración en la que ocurre el 50 % y 90% de la muerte de los parásitos respectivamente, con un 95% de confianza. Estas concentraciones se determinaron al realizar un análisis de regresión dosis-respuesta en el programa SPSS 25.0 con un intervalo de confianza del 95% (Al-Adhroey *et al.* 2010).

Los extractos/particiones/fracciones se clasificaron como altamente activos ($CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), activos ($CL_{50} > 10 < 50 \mu\text{g/mL}$), moderadamente activos ($CL_{50} > 50 < 100 \mu\text{g/mL}$) y no activos ($CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (Osorio *et al.* 2007).

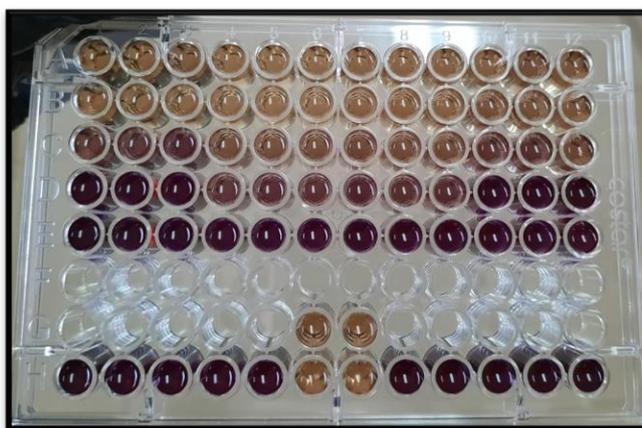


Figura 11. Evaluación de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes mediante el método del MTT.

Evaluación de la actividad citotóxica sobre células Vero

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* se utiliza para determinar si un extracto tendrá efectos tóxicos sobre células vivas (Neira *et al.* 2014). En este caso se emplearon células Vero, las cuales son células epiteliales de riñón de mono verde.

Las células Vero fueron donadas por el Banco de Células del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Las células se cultivaron a una densidad de 2.2×10^5 cel/mL en placas de 96 pozos en medio

RPMI (Gibco) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Estados Unidos) y se incubaron durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂ en atmosfera húmeda. Posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los tratamientos (1000–10 µg/mL) y como control negativo se utilizaron mantuvieron células sin los extractos. Las células se incubaron durante 24 h a 37°C con 5% de CO₂ en atmosfera húmeda. La citotoxicidad se determinó por el método de colorimétrico de MTT. Para esto se agregaron 20 µL de MTT a una concentración 5 mg/mL a cada pozo y de incubó la microplaca durante 1 h a 37°C con 5% de CO₂ en atmosfera húmeda. Posteriormente, para la extracción del formazan a cada pozo se le agregaron 100 µL de DMSO (Figura 12). Se tomó la absorbancia en un lector de microplacas (Biochrom Asys UVM-340) a 570 nm y el porcentaje de citotoxicidad se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de citotoxicidad} = \frac{\text{DO control negativo} - \text{DO tratamiento}}{\text{DO control negativo}} \times 100$$

Los resultados se expresaron como la concentración letal 50 (CL₅₀) con un 95% de confianza. Estas concentraciones se determinaron al realizar un análisis de regresión dosis-respuesta en el programa SPSS 25.0 (Al-Adhroey *et al.* 2010).

Los extractos/particiones/fracciones se clasificaron como altamente citotóxicos (CL₅₀<10 µg/mL), citotóxicos (CL₅₀>10<100 µg/mL), moderadamente citotóxicos (CL₅₀>100<1000 µg/mL) y potencialmente no citotóxicos (CL₅₀>1000 µg/mL) (Osorio *et al.* 2007).

Además, se calculó el índice de selectividad de los extractos, el cual indica la relación entre la CL₅₀ citotóxica y la CL₅₀ del microorganismo blanco (Dragonetti *et al.* 2008), en este caso *T. cruzi*. Para esto se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Índice de selectividad} = \frac{\text{CL}_{50} \text{ citotóxica}}{\text{CL}_{50} \text{ tripanosomicida}}$$

Los extractos/particiones/fracciones se consideraron como no selectivos contra *T. cruzi* (IS<2), moderadamente selectivos (IS>2<3) y selectivos (IS>3) (Valencia *et al.* 2011). Entre más alto sea el índice de selectividad, más activo será el extracto contra los parásitos que contra las células de la persona, lo cual reduce la aparición de efectos adversos ocasionados por el extracto (Sánchez *et al.* 2016).

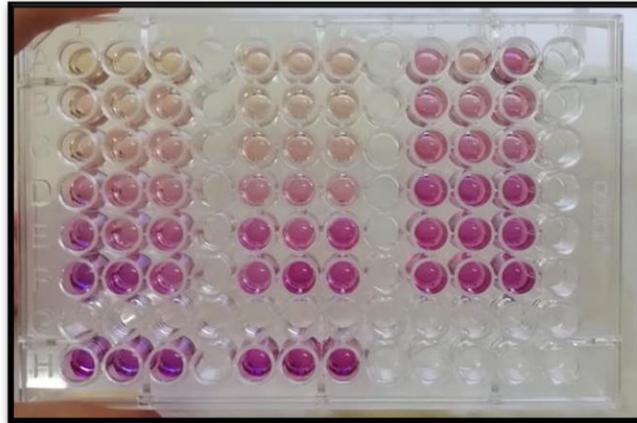


Figura 12. Evaluación de la actividad citotóxica sobre células Vero mediante el método del MTT.

Evaluación de la actividad tóxica sobre *Artemia salina*

El ensayo de letalidad de larvas de *A. salina* es considerado un instrumento útil para evaluar de manera preliminar la toxicidad de extractos naturales y frecuentemente se utiliza en fraccionamientos biodirigidos (Lagarto *et al.* 2001).

Para realizar este ensayo los quistes de *A. salina* (Royal, Estados Unidos) se incubaron en un microacuuario con solución salina al 3.7%, pH 8, entre 25-30 °C, aireada con una bomba para acuario y bajo régimen continuo de luz. El agua se suplementó con 0.75 g/L de extracto de levadura (BD Bioxon). Los quistes eclosionaron en 24 h y se obtuvo un gran número de larvas (nauplios). El bioensayo se realizó en placas de 24 pozos. A las 48 h después de eclosionar se transfirieron 10 larvas a cada pozo y se procedió a evaluar los extractos. Los extractos fueron evaluados por triplicado a concentraciones de 1000, 500, 100 y 10 µg/mL. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) a 100 µg/mL y como control negativo solución salina al 3.7%. Las microplacas se mantuvieron entre 25-30 °C durante 24 h bajo iluminación constante. Pasadas las 24 h de exposición se contó el número de larvas muertas y vivas (Figura 13). Con estos datos se realizó una prueba PROBIT en el programa SPSS 25.0 para determinar la concentración letal 50 (CL_{50}). Se considero válido el experimento si el porcentaje de mortalidad en los controles negativos no superó el 10 % (Fernández-Calienes *et al.* 2009).

Los extractos/particiones/fracciones se clasificaron como extremadamente tóxicos ($CL_{50} < 10$ µg/mL), muy tóxicos ($10 < CL_{50} < 100$), moderadamente tóxicos ($100 < CL_{50} < 1000$) y no tóxicos ($CL_{50} > 1000$ µg/mL) (Valdés-Iglesias *et al.* 2003).



Figura 13. Larvas de *A. salina*.

Evaluación de la actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos

El ensayo de hemólisis es una prueba de utilidad en el estudio de extractos de plantas, ya que un candidato a fármaco debe poder atravesar la membrana del eritrocito e interactuar con la hemoglobina intracelular sin que en este proceso se afecten la proteína y el eritrocito, tanto estructural como funcionalmente (Zohra y Fawzia 2014).

En este ensayo las muestras de sangre humana se obtuvieron de un voluntario sano y fueron colectadas en tubos con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer). Los glóbulos rojos recuperados a partir de la sangre se lavaron 3 veces con PBS (pH 7.2) y se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% en PBS estéril para el estudio hemolítico. La actividad hemolítica del extracto crudo se probó en condiciones *in vitro*, para cada extracto se agregaron varias concentraciones (1000–200 $\mu\text{g/ml}$) de extracto a una solución de PBS y luego recibieron una suspensión al 5% de eritrocitos humanos. Después de una incubación de 30 min a 37°C las células se centrifugaron (Thermo Scientific, Sorval Legen Micro 21R) y el sobrenadante se usó para medir la absorbancia de la hemoglobina liberada a 540 nm en un lector de microplacas (Biochrom Asys UVM-340) (Figura 14). Se prepararon dos controles sin extractos; el control negativo recibió PBS, mientras que el control positivo recibió agua destilada (Zohra y Fawzia 2014).

El valor promedio se calculó a partir de ensayos por triplicado. El porcentaje de hemólisis para cada muestra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{A_m - A_n}{A_p - A_n} \times 100$$

Donde:

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del control positivo

A_n = absorbancia del control negativo

La concentración hemolítica 50 (CH_{50}) se calculó al utilizar un modelo de regresión logística concentración-respuesta mediante el programa SPSS 25.0 (Hernández *et al.* 2014).

Se consideraron como no hemolíticos a los extractos que presentaron un porcentaje de hemólisis menor de 10% a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Martínez *et al.* 2013; Alonso-Geli *et al.* 2015).



Figura 14. Evaluación de la actividad hemolítica.

Particionamiento del extracto mediante extracciones Soxhlet continuas

Se seleccionó el extracto que presentó el mayor índice de selectividad contra *T. cruzi* para continuar con su procesamiento. Se pesaron 5 g del extracto metanólico de *S. molle* en un cartucho de celulosa, el cual se colocó en el extractor Soxhlet. El extractor Soxhlet se montó sobre un agitador magnético para obtener agitación constante. Primeramente, se utilizó como solvente de extracción 250 mL de hexano y la extracción se mantuvo por 24 h. Trascurrido el tiempo se retiró el hexano y se agregaron 250 mL de cloroformo y la extracción se mantuvo por 12 h. Finalmente se retiró el cloroformo y se agregaron 250 mL de metanol y la extracción se mantuvo por 12 h. Después de cada extracción la partición obtenida se dejó enfriar y se filtró con la ayuda de un papel filtro (Whatman N°1). Posteriormente, se concentró por medio de

una evaporación a vacío mediante un rotavapor (Yamato Scientific RE-301-BOV), hasta obtener un volumen aproximado de 30 mL. Después se pasó a un frasco y se dejó evaporar la totalidad del solvente a temperatura ambiente. Una vez obtenidas las tres particiones se almacenaron a 4 °C hasta su utilización.

Se utilizó la metodología anteriormente descrita para evaluar la actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las 3 particiones obtenidas.

Se realizaron cromatografía en capa fina de las particiones con diferentes eluentes para determinar la distribución de los compuestos presentes en ellas.

Cromatografías en capa fina

Se emplearon cromatoplasmas de sílica gel de 5x10 cm (Macherey-Nagel, Polygram SIL G/UV254), las cuales se dividieron con la ayuda de un lápiz según el número de muestras a analizar. Con un capilar se colocaron las muestras en las cromatoplasmas a una distancia de 1 cm del borde inferior. Se corrieron con 10 mL de eluente hasta llegar a 0.5 cm de la parte superior (Figura 15). Los eluentes empleados fueron los siguientes: para las particiones se utilizó hexano, hexano-cloroformo 1:1, cloroformo, cloroformo-acetato de etilo 1:1 y acetato de etilo; mientras que para las fracciones se utilizó hexano-cloroformo 1:1 y cloroformo:acetato de etilo 1:1.

Las cromatoplasmas se dejaron secar por mínimo 24 h y posteriormente se observaron bajo luz visible, así como con luz ultravioleta de onda corta (254 nm) y luz ultravioleta de onda larga (365 nm) con una lámpara de luz UV portátil; además se revelaron con yodo. Con esto se obtuvieron los R_f de los compuestos observados.



Figura 15. Separación mediante cromatografía en capa fina.

Fraccionamiento mediante cromatografía en columna

Se seleccionaron las particiones que presentaron la mejor actividad tripanosomicida para continuar con su procesamiento; las cuales fueron las particiones hexánica y clorofórmica. Se preparó una columna cromatográfica (330 mm x 28 mm) empacada con 20 g de sílica gel 60 G con un tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (Merck) y se colocaron en la parte superior 500 mg de la partición. Se hizo pasar 10 mL de un sistema de disolventes de menor a polaridad (Tablas 1 y 2) y se colectaron fracciones de 5 mL (Figura 16). De la partición hexánica se obtuvieron 62 fracciones, mientras que de la clorofórmica se obtuvieron 42.

Se dejó evaporar la totalidad del solvente y se realizaron cromatografías en capa fina de cada tercera fracción. Las fracciones con un perfil cromatográfico igual o similar se unieron para obtener en total 5 fracciones colectivas de cada columna (Tabla 3).

Finalmente, se evaluó la actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las fracciones colectivas que presentaron un rendimiento mayor a 10 mg, para esto se empleó la metodología anteriormente descrita.



Figura 16. Cromatografía en columna.

Tabla 1. Gradiente de elución utilizado para la partición hexánica.

Hexano 100%
Hexano-cloroformo 9:1
Hexano-cloroformo 8:2
Hexano-cloroformo 7:3
Hexano-cloroformo 6:4
Hexano-cloroformo 5:5
Hexano-cloroformo 4:6
Hexano-cloroformo 3:7
Hexano-cloroformo 2:8
Hexano-cloroformo 1:9
Cloroformo 100%
Cloroformo-acetato de etilo 9:1
Cloroformo-acetato de etilo 8:2
Cloroformo-acetato de etilo 7:3
Cloroformo-acetato de etilo 6:4
Cloroformo-acetato de etilo 5:5
Cloroformo-acetato de etilo 4:6
Cloroformo-acetato de etilo 3:7
Cloroformo-acetato de etilo 2:8
Cloroformo-acetato de etilo 1:9
Acetato de etilo 100%
Acetato de etilo-metanol 9:1
Acetato de etilo-metanol 8:2
Acetato de etilo-metanol 7:3
Acetato de etilo-metanol 6:4
Acetato de etilo-metanol 5:5
Acetato de etilo-metanol 4:6
Acetato de etilo-metanol 3:7
Acetato de etilo-metanol 2:8
Acetato de etilo-metanol 1:9
Metanol 100%

Tabla 2. Gradiente de elución utilizado para la partición clorofórmica

Cloroformo 100%
Cloroformo-acetato de etilo 9:1
Cloroformo-acetato de etilo 8:2
Cloroformo-acetato de etilo 7:3
Cloroformo-acetato de etilo 6:4
Cloroformo-acetato de etilo 5:5
Cloroformo-acetato de etilo 4:6
Cloroformo-acetato de etilo 3:7
Cloroformo-acetato de etilo 2:8
Cloroformo-acetato de etilo 1:9
Acetato de etilo 100%
Acetato de etilo-metanol 9:1
Acetato de etilo-metanol 8:2
Acetato de etilo-metanol 7:3
Acetato de etilo-metanol 6:4
Acetato de etilo-metanol 5:5
Acetato de etilo-metanol 4:6
Acetato de etilo-metanol 3:7
Acetato de etilo-metanol 2:8
Acetato de etilo-metanol 1:9
Metanol 100%

Tabla 3. Nomenclatura asignada a las fracciones colectivas obtenidas.

Columna	Fracciones unidas	Fracción Colectiva	Nomenclatura
Primera columna de la partición hexánica	8 a 11	Fracción Colectiva 1	FC1H1
	12 a 17	Fracción Colectiva 2	FC2H1
	18 a 26	Fracción Colectiva 3	FC3H1
	27 a 41	Fracción Colectiva 4	FC4H1
	41 a 62	Fracción Colectiva 5	FC5H1
Segunda columna de la partición hexánica	7 a 12	Fracción Colectiva 1	FC1H2
	13 a 18	Fracción Colectiva 2	FC2H2
	19 a 26	Fracción Colectiva 3	FC3H2
	27 a 41	Fracción Colectiva 4	FC4H2
	41 a 62	Fracción Colectiva 5	FC5H2
Columna de la partición clorofórmica	10 a 13	Fracción Colectiva 1	FC1C1
	14 a 22	Fracción Colectiva 2	FC2C1
	23 a 28	Fracción Colectiva 3	FC3C1
	28 a 35	Fracción Colectiva 4	FC4C1
	36 a 42	Fracción Colectiva 5	FC5C1

Identificación de los compuestos químicos mediante GC-MS

Se seleccionó la fracción con la mejor actividad tripanosomicida para identificar los compuestos presentes en ella. La identificación se realizó mediante GC-MS en el laboratorio de servicios externos del Instituto Politécnico Nacional.

Para el análisis se empleó un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A, con detector triple de masas Agilent Technologies 5975C y una columna Agilent 123-2332DB-23, 260 °C, 60 m x 320 µm x 0.25 µm. Las condiciones de funcionamiento fueron las siguientes: temperatura inicial del horno 170 °C durante 2 min, luego se incrementó 5 °C/min hasta llegar a 250 °C y se mantuvo durante 15 min. La temperatura del inyector fue 250 °C. Se utilizó He como gas acarreador con un flujo de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 2 µL.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba Tukey para determinar si hubo diferencia significativa entre la actividad tripanosomicida de los extractos, particiones y fracciones.

RESULTADOS

Rendimiento de los extractos metanólicos crudos

En la tabla 4 se muestra el rendimiento obtenido de los extractos metanólicos crudos de las tres plantas evaluadas. El extracto de *S. molle* fue el que presentó el mayor rendimiento (23.9%), seguido por *E. heterophyllum* (21.5%) y *M. vulgare* (20.7%).

Tabla 4. Rendimiento de los extractos metanólicos crudos.

No. de folio	Planta	Peso obtenido (g)	Rendimiento (%)
030596	<i>Eryngium heterophyllum</i>	5.380	21.5
030595	<i>Marrubium vulgare</i>	5.178	20.7
030594	<i>Schinus molle</i>	5.964	23.9

Actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de los extractos metanólicos crudos

En la tabla 5 se muestran los resultados de la actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de los extractos metanólicos crudos. Asimismo, en las figuras 17 y 18 se muestran las gráficas de los resultados de la actividad tripanosomicida y citotóxica. El extracto de *S. molle* fue el que mostró los mejores resultados, al presentar la mayor actividad tripanosomicida (CL₅₀ 94 µg/mL) y el mayor índice de selectividad contra *T. cruzi*. Por esta razón se seleccionó el extracto de *S. molle* para continuar con su procesamiento. Cabe mencionar que el nifurtimox presentó una CL₅₀ de 32 µg/mL.

Tabla 5. Resultados de la actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de los extractos metanólicos crudos.

Planta	Actividad tripanosomicida		Actividad citotóxica	Actividad tóxica	Actividad hemolítica	índice de selectividad
	CL ₅₀	CL ₉₀	CL ₅₀			
<i>Eryngium heterophyllum</i>	310 ^a (156 - 479) No activo	636 (539 - 701)	302 (223 - 382) Moderadamente citotóxico	>1000 No tóxico	>1000 No hemolítico	0.97 No selectivo
<i>Marrubium vulgare</i>	438 ^b (232 - 673) No activo	705 (669 - 822)	728 (661 - 841) Moderadamente citotóxico	>1000 No tóxico	153 (121 - 178) Hemolítico	1.62 No selectivo
<i>Schinus molle</i>	94 ^c (83 - 148) Moderadamente activo	255 (203 - 271)	212 (187 - 265) Moderadamente citotóxico	>1000 No tóxico	163 (143 - 181) Hemolítico	2.26 Moderadamente selectivo

Intervalo de confianza del 95% entre paréntesis

a, b, c Diferencia significativa (alfa = 0.05)

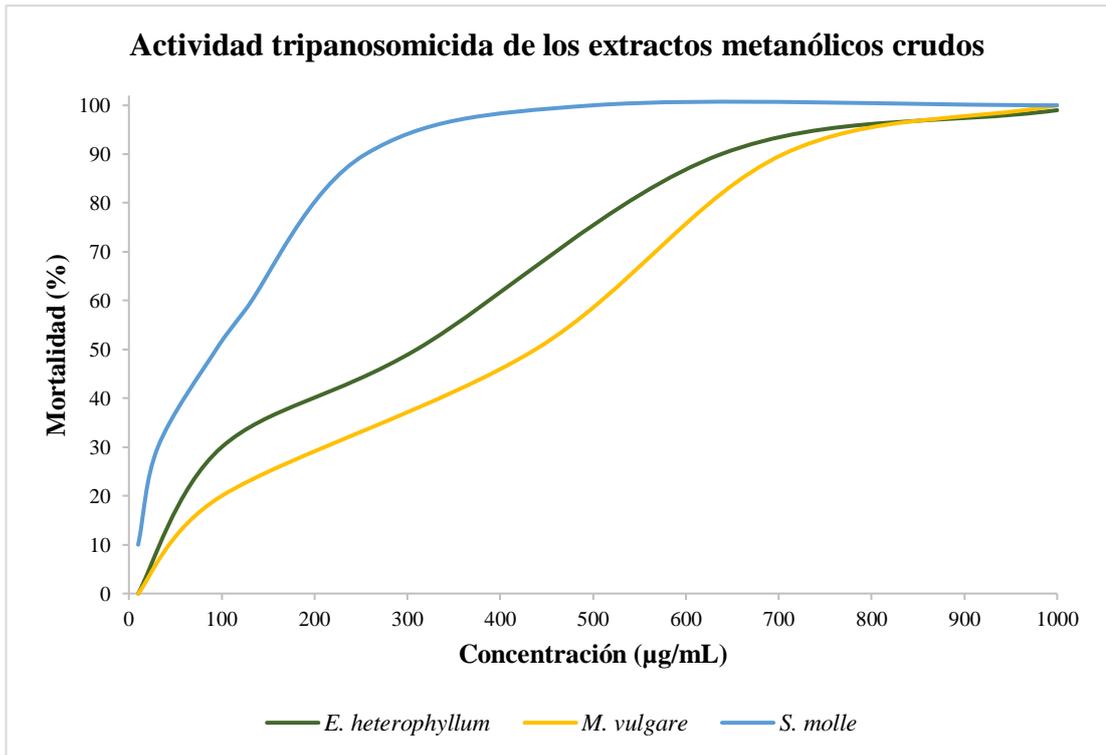


Figura 17. Gráfico de los resultados de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes de la cepa Nuevo León de los extractos metanólicos crudos.

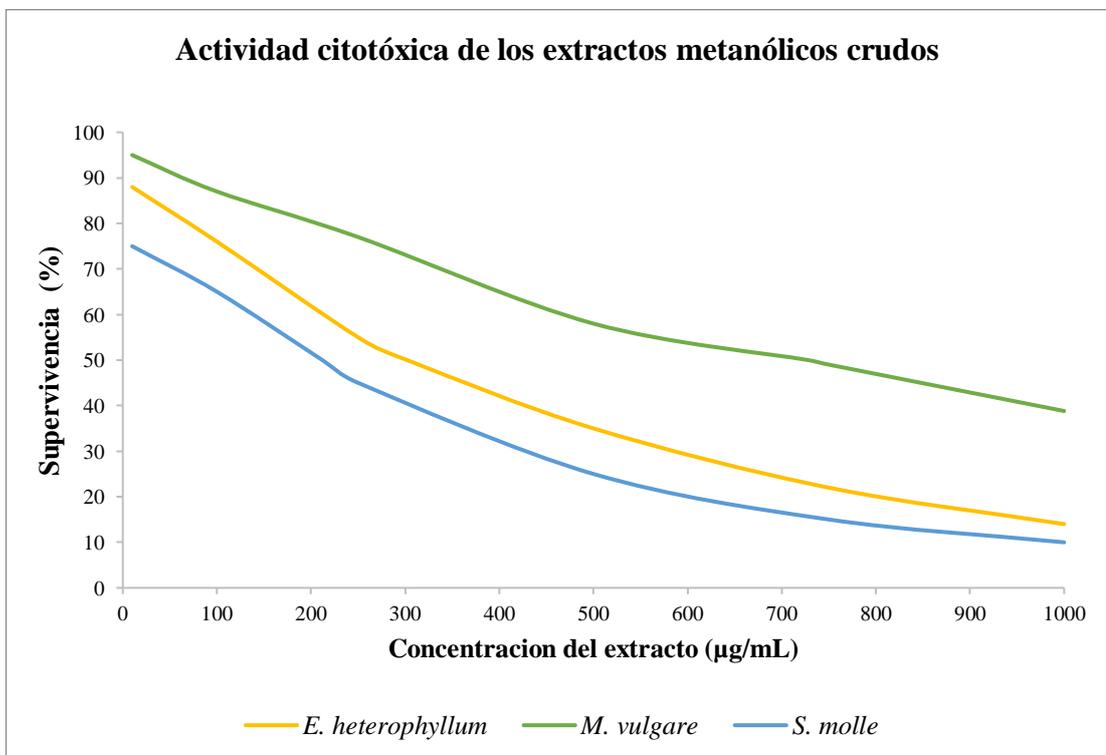


Figura 18. Gráfico de los resultados de la actividad citotóxica sobre células Vero de los extractos metanólicos crudos.

Rendimiento de las particiones del extracto de *S. molle*

En la tabla 6 se muestra el rendimiento obtenido de todas las particiones que se recuperaron del extracto de *S. molle*. La partición que presentó el mayor rendimiento fue la metanólica (42.4%), seguida de la hexánica (24.8%), la insoluble (19.9%) y la clorofórmica (8.3%). La partición insoluble como su nombre lo indica, no fue soluble en ningún solvente empleado, por lo cual no se pudo evaluar.

Tabla 6. Rendimiento de las particiones obtenida del extracto de *S. molle*.

Partición	Peso obtenido (g)	Rendimiento (%)
Hexánica	1.388	24.8
Clorofórmica	0.463	8.3
Metanólica	2.369	42.4
Insoluble	1.113	19.9

Actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las particiones del extracto de *S. molle*

En la tabla 7 se muestra la actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las particiones obtenidas del extracto de *S. molle*. De igual manera en las figuras 19 y 20 se muestran las gráficas de los resultados de la actividad tripanosomicida y citotóxica. La partición clorofórmica fue la que mostró los mejores resultados al presentar la mayor actividad tripanosomicida (CL₅₀ 20 µg/mL) y el mayor índice de selectividad contra *T. cruzi*, seguida por la partición hexánica (CL₅₀ 49 µg/mL), mientras que la fracción metanólica no presentó actividad tripanosomicida (CL₅₀ >1000 µg/mL). Motivo por el cual, se seleccionaron las particiones clorofórmica y hexánica para continuar con su fraccionamiento.

Tabla 7. Actividad tripanosomicida de las particiones obtenida del extracto de *S. molle*.

Partición	Actividad tripanosomicida (µg/mL)		Actividad citotóxica	Actividad toxica	Actividad hemolítica	índice de selectividad
	CL ₅₀	CL ₉₀				
Hexánica	49 ^a (24 - 78) Activo	85 (63 - 171)	85 (70 - 100) Citotóxico	632 (581 - 693) Moderadamente tóxico	235 (223 - 247) Hemolítico	1.73 No selectivo
Clorofórmica	20 ^b (15 - 24) Activo	43 (38 - 51)	112 (97 - 127) Moderadamente citotóxico	581 (564 - 599) Moderadamente tóxico	202 (188 - 216) Hemolítico	5.6 Selectivo
Metanólica	>1000 ^c	>1000	>1000 No citotóxico	>1000 No tóxico	>1000 No hemolítico	-

Intervalo de confianza del 95% entre paréntesis

^{a, b, c} Diferencia significativa (alfa = 0.05)

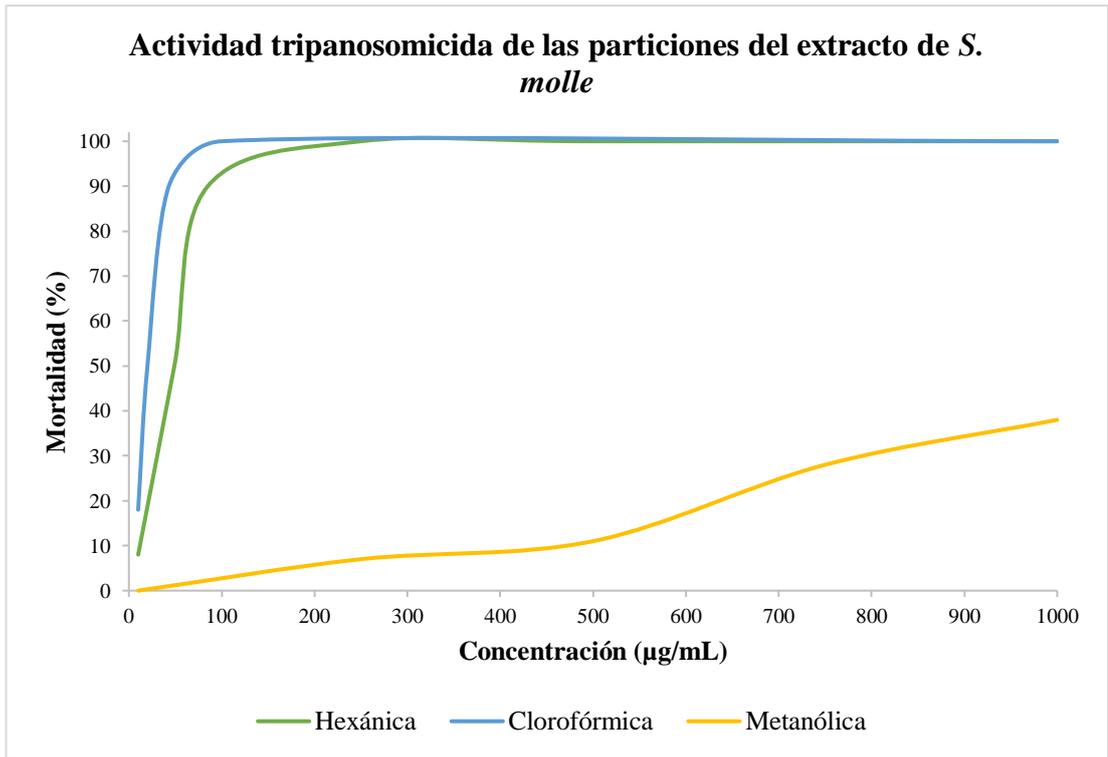


Figura 19. Gráfico de los resultados de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes de la cepa Nuevo León de las particiones del extracto de *S. molle*.

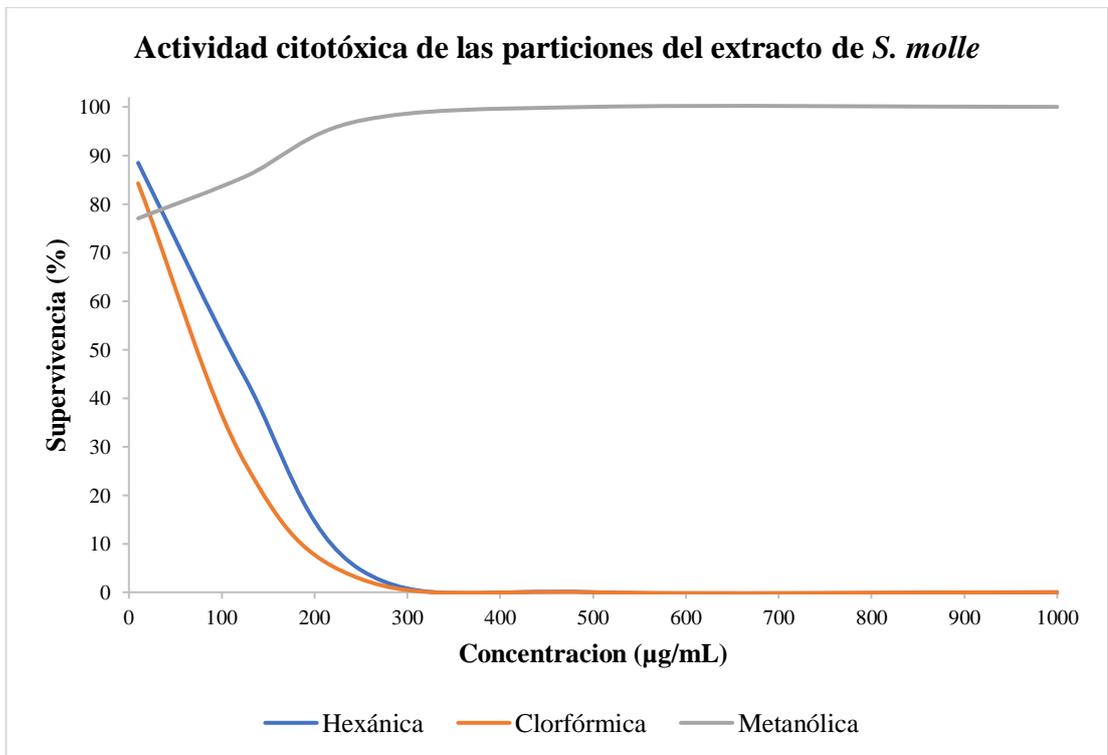


Figura 20. Gráfico de los resultados de la actividad citotóxica sobre células Vero de las particiones del extracto de *S. molle*.

Cromatografía en capa fina de las particiones del extracto de *S. molle*

En las siguientes imágenes (Fig. 21 - 40) se muestran las cromatografías en capa fina de las particiones del extracto de *S. molle*. Se utilizaron distintos solventes como eluentes y se observaron bajo luz visible, luz ultravioleta de onda corta (254 nm), luz ultravioleta de onda larga (365 nm), así como reveladas con yodo, con lo cual se determinó la distribución de los compuestos químicos presentes en las particiones y decidir cómo realizar las cromatografías en columna.

Eluente: hexano



Figura 21. CCF de las particiones con hexano como eluente y vista bajo luz visible.



Figura 22. CCF de las particiones con hexano como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.



Figura 23. CCF de las particiones con hexano como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.



Figura 24. CCF de las particiones con hexano como eluente y revelada con yodo.

Eluente: hexano-cloroformo 1:1



Figura 25. CCF de las particiones con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.



Figura 26. CCF de las particiones con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.

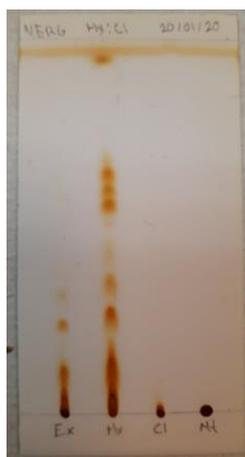


Figura 27. CCF de las particiones con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.

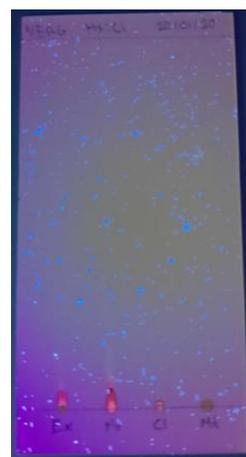


Figura 28. CCF de las particiones con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y revelada con yodo.

Eluente: cloroformo



Figura 28. CCF de las particiones con cloroformo como eluente y vista bajo luz visible.



Figura 30. CCF de las particiones con cloroformo como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.

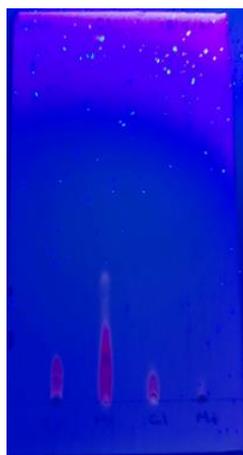


Figura 31. CCF de las particiones con cloroformo como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.

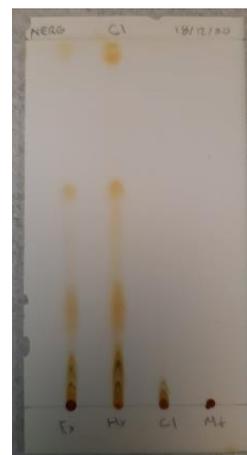


Figura 32. CCF de las particiones con cloroformo como eluente y revelada con yodo.

Eluente: cloroformo-acetato de etilo 1:1



Figura 33. CCF de las particiones con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.

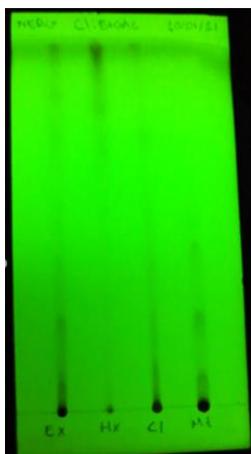


Figura 34. CCF de las particiones con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.

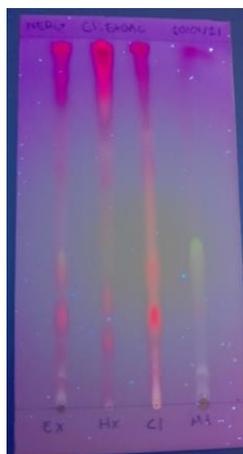


Figura 35. CCF de las particiones con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.

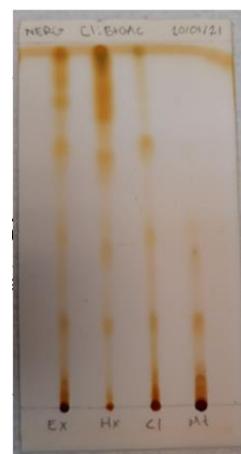


Figura 36. CCF de las particiones con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y revelada con yodo.

Eluente: acetato de etilo (94%), ácido fórmico (3%) y agua (3%)



Figura 37. CCF de las particiones con una mezcla de solvente como eluente y vista bajo luz visible.

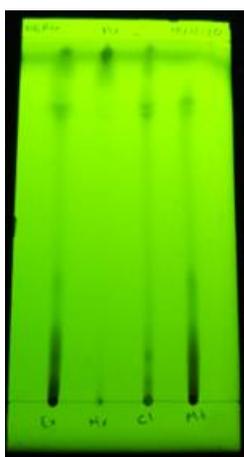


Figura 38. CCF de las particiones con una mezcla de solvente como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.



Figura 39. CCF de las particiones con una mezcla de solvente como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.

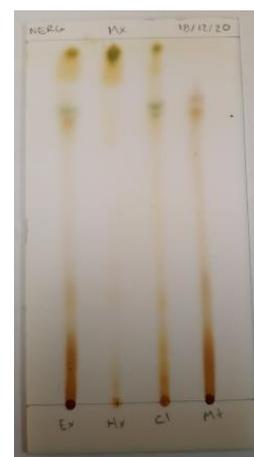


Figura 40. CCF de las particiones con una mezcla de solvente como eluente y revelada con yodo

Rendimiento de las fracciones colectivas obtenidas

En la tabla 8 se muestra el rendimiento conseguido de las fracciones colectivas obtenidas mediante las cromatografías en columna realizadas. Algunas fracciones colectivas, como la FC4H2, presentaron buen rendimiento por lo cual se logró evaluar su actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica sin dificultad, no obstante, algunas fracciones, como la FC1H1 presentaron muy bajo rendimiento por lo cual no se logró evaluarlas.

Tabla 8. Rendimiento de las fracciones colectivas de *S. molle*.

Fracción Colectiva	Peso obtenido (mg)	Rendimiento (%)
FC1H1	2	0.4
FC2H1	5	1
FC3H1	13	2.6
FC4H1	316	63.2
FC5H1	79	15.8
FC1H2	13	2.1
FC2H2	17	2.7
FC3H2	64	10.1
FC4H2	423	66.9
FC5H2	68	10.8
FC1C1	12	3.7
FC2C1	10	3.1
FC3C1	103	32.1
FC4C1	88	27.4
FC5C1	93	29.0

Actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las fracciones colectivas

En la tabla 9 se muestra la actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las fracciones colectivas obtenidas. Asimismo, en las figuras 41 y 42 se muestran las gráficas de los resultados de la actividad tripanosomicida y citotóxica. Solo se evaluaron las fracciones que presentaron un rendimiento mayor a 10 mg. La FC1H2 fue la que presentó la mayor actividad tripanosomicida (CL₅₀ 16 µg/mL), seguida por la FC3C1 (21 µg/mL) y FC5H2 (37 µg/mL). No obstante, la FC3C1 fue la que presentó el mayor índice de selectividad contra *T. cruzi*. Por esta razón se seleccionó esta fracción para identificar los compuestos químicos presentes en ella.

Tabla 9. Actividad tripanosomicida, citotóxica, tóxica y hemolítica de las fracciones colectivas de *S. molle*.

Fracción Colectiva	Actividad tripanosomicida (µg/mL)		Actividad citotóxica	Actividad tóxica	Actividad hemolítica	índice de selectividad
	CL ₅₀	CL ₉₀	CL ₅₀			
FC3H1	78 ^b (65 - 86) Moderadamente activo	141 (115 - 157)	-	-	-	-
FC4H1	63 ^b (50 - 72) Moderadamente activo	109 (102 - 119)	153 (141 - 162) Moderadamente citotóxico	607 (593 - 638) Moderadamente tóxico	378 (365 - 386) No hemolítico	2.43 Moderadamente selectivo
FC5H1	44 ^{ab} (37 - 51) Activo	91 (83 - 101)	96 (81 - 110) Citotóxico	432 (421 - 444) Moderadamente tóxico	242 (229 - 258) Hemolítico	2.18 Moderadamente selectivo
FC1H2	16 ^a (14 - 19) Activo	33 (29 - 39)	93 (80 - 101) Citotóxico	528 (512 - 543) Moderadamente tóxico	198 (172 - 215) Hemolítico	6 Selectivo
FC2H2	>200 ^c No activo	>200	144 (132 - 156) Moderadamente citotóxico	> 1000 No tóxico	> 1000 No hemolítico	-
FC3H2	75 ^b (61 - 82) Moderadamente activo	139 (113 - 153)	336 (208 - 553) Moderadamente citotóxico	743 (723 - 768) Moderadamente tóxico	>1000 No hemolítico	4.48 Selectivo
FC4H2	52 ^{ab} (49 - 65) Moderadamente activo	99 (89 - 105)	173 (162 - 185) Moderadamente citotóxico	632 (602 - 668) Moderadamente tóxico	354 (342 - 265) No hemolítico	3.33 Selectivo
FC5H2	37 ^{ab} (34 - 41) Activo	85 (68 - 94)	147 (137 - 172) Moderadamente citotóxico	681 (659 - 698) Moderadamente tóxico	237 (210 - 245) Hemolítico	3.97 Selectivo
FC1C1	>200 ^c No activo	>200	-	-	-	-
FC2C1	45 ^{ab} (39 - 52) Activo	124 (109 - 135)	-	-	-	-

FC3C1	21 ^a (19 - 23) Activo	36 (33 - 42)	130 (123 - 153) Moderadamente citotóxico	428 (421 - 442) Moderadamente tóxico	161 (149 - 174) Hemolítico	6.19 Selectivo
FC4C1	180 ^c (165 - 200) No activo	>200	156 (142 - 163) Moderadamente citotóxico	>1000 No tóxico	>1000 No hemolítico	0.86 No selectivo
FC5C1	>200 ^c No activo	>200	330 (309 - 354) Moderadamente citotóxico	513 (499 - 527) Moderadamente tóxico	311 (289 - 335) Hemolítico	-

Intervalo de confianza del 95% entre paréntesis

^{a, b, c} Diferencia significativa (alfa = 0.05)

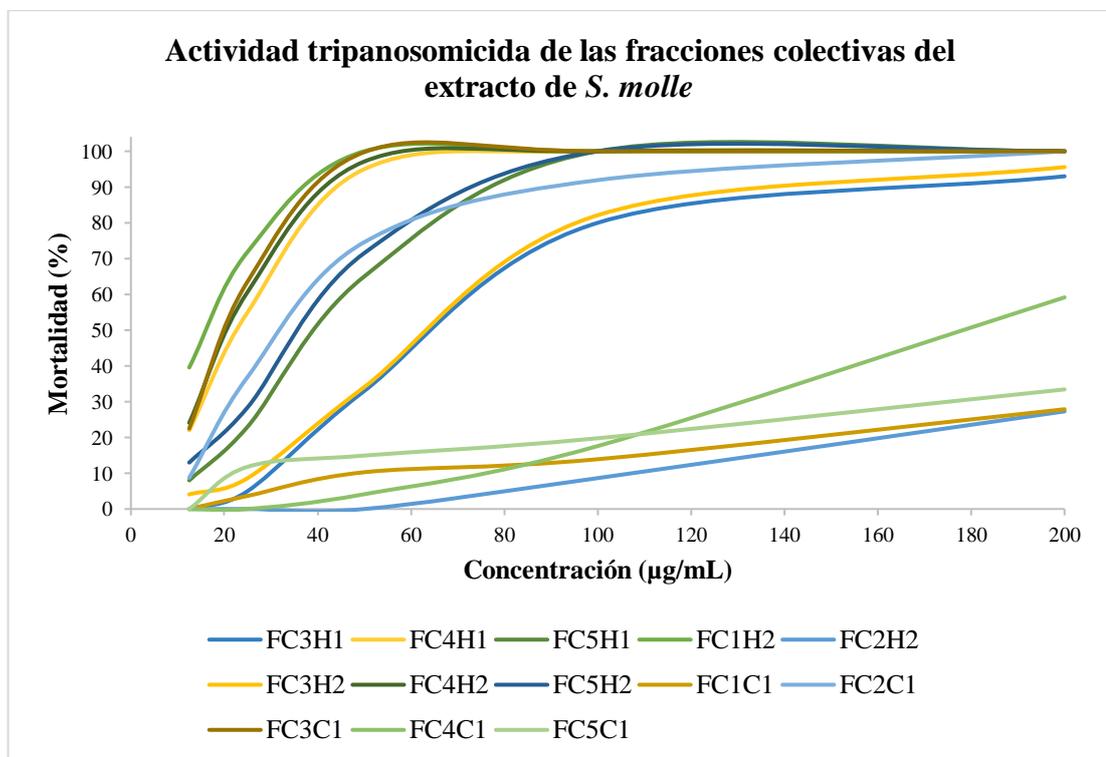


Figura 41. Gráfico de los resultados de la actividad tripanosomicida sobre epimastigotes de la cepa Nuevo León de las fracciones colectivas del extracto de *S. molle*.

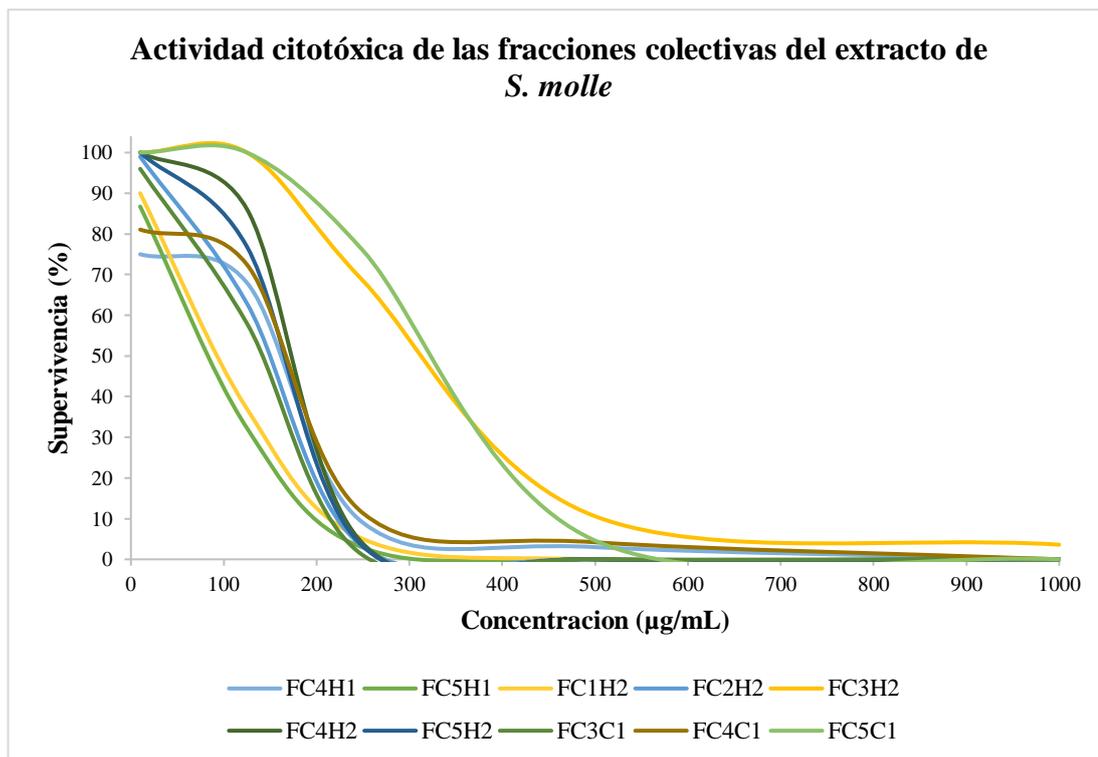


Figura 42. Gráfico de los resultados de la actividad citotóxica sobre células Vero de las fracciones colectivas del extracto de *S. molle*.

Cromatografías en capa fina de las fracciones colectivas

En las siguientes imágenes (Fig. 43 - 54) se muestran las cromatografías en capa fina de las fracciones colectivas vistas bajo luz visible, luz ultravioleta de onda corta (254 nm), luz ultravioleta de onda larga (365 nm) y reveladas con yodo, con lo cual se observó la distribución de los compuestos químicos presentes en las fracciones colectivas.

Primera columna de la partición hexánica



Figura 43. CCF de las FC de la 1ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.



Figura 44. CCF de las FC de la 1ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.



Figura 45. CCF de las FC de la 1ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.



Figura 46. CCF de las FC de la 1ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y revelado con yodo.

Segunda columna de la partición hexánica



Figura 47. CCF de las FC de la 2ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.

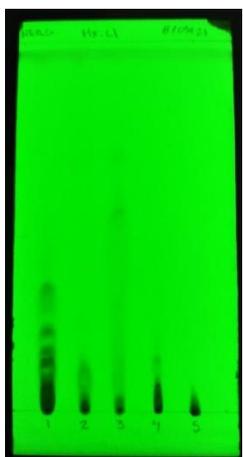


Figura 48. CCF de las FC de la 2ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.



Figura 49. CCF de las FC de la 2ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.

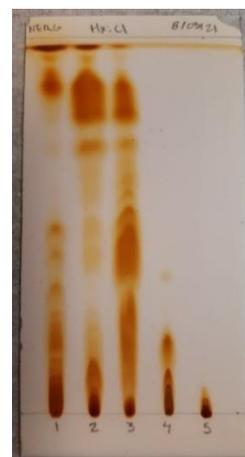


Figura 50. CCF de las FC de la 2ª columna de la partición hexánica con hexano-cloroformo 1:1 como eluente y revelado con yodo.

Columna de la partición clorofórmica

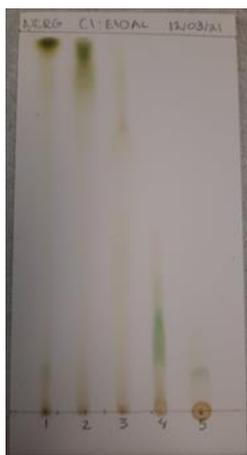


Figura 51. CCF de las FC de la columna de la partición clorofórmica con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz visible.

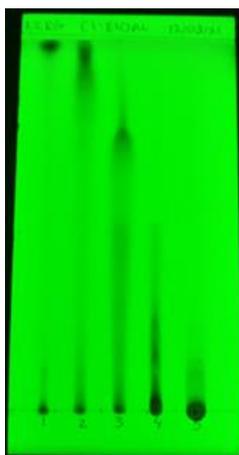


Figura 52. CCF de las FC de la columna de la partición clorofórmica con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 254 nm.



Figura 53. CCF de las FC de la columna de la partición clorofórmica con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y vista bajo luz UV a 365 nm.



Figura 54. CCF de las FC de la columna de la partición clorofórmica con cloroformo-acetato de etilo 1:1 como eluente y revelado con yodo.

Identificación de los compuestos con actividad biológica contra *T. cruzi*

En la figura 55 se muestra el cromatograma obtenido por la GC-MS de la fracción FC3C1, el cual permitió la identificación de 20 compuestos que se encuentran enlistados en la tabla 10.

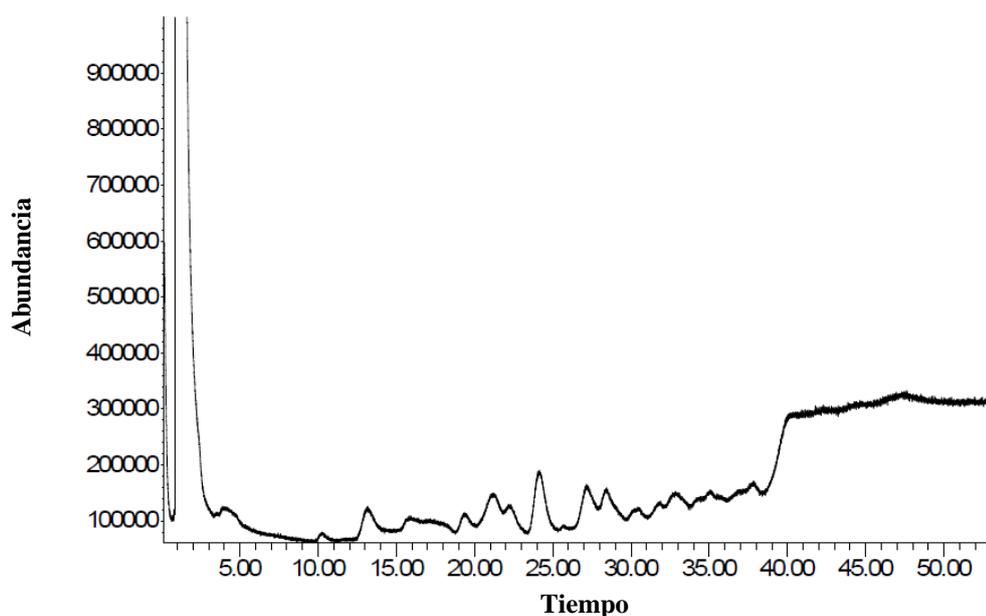
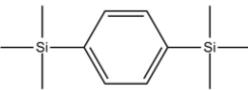
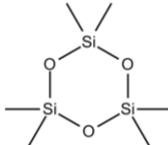
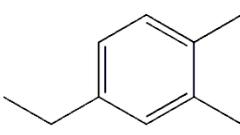
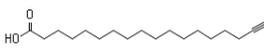
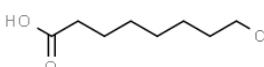
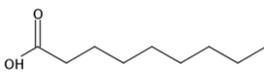
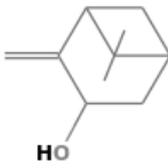
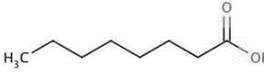
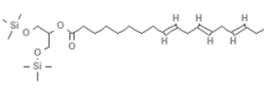
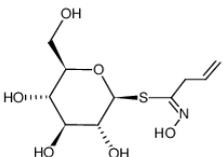
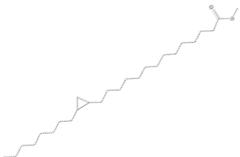
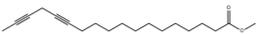
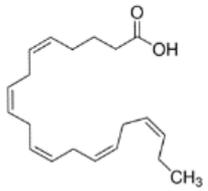
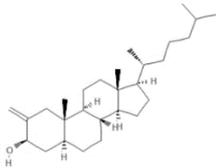
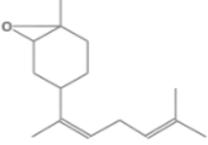
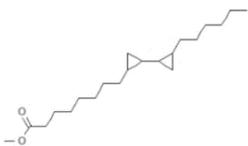
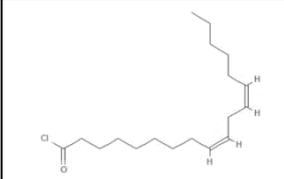
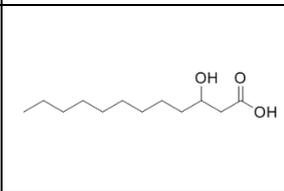
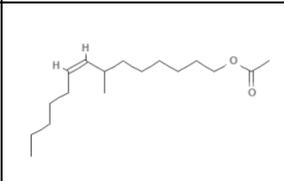


Figura 55. Cromatograma de GC-MS de la fracción FC3C1.

Tabla 10. Compuestos identificados en la fracción FC3C1 mediante GC-MS.

No.	Nombre del compuesto	Fórmula molecular	Estructura	Tiempo de retención (min)
1	1,4-Bis (trimetilsilil) benceno 1,4-Bis(trimethylsilyl)benzene	$C_{12}H_{22}Si_2$		3.993
2	Hexametilciclotrisiloxano Hexamethylcyclotrisiloxane	$C_6H_{18}O_3Si_3$		10.190
3	4-etil-1,2-dimetil-benceno Benzene, 4-ethyl-1,2-dimethyl-	$C_{10}H_{14}$		13.068
4	Ácido 17 - octadecínico 17-Octadecynoic acid	$C_{11}H_{20}O_2$		19.041
5	Ácido 8-clorocaprico 8-Chlorocapric acid	$C_8H_{15}ClO_2$		21.164
6	Ácido nonanoico Nonanoic acid	$C_9H_{18}O_2$		21.216
7	Isopinocarveol Isopinocarveol	$C_{10}H_{16}O$		22.303
8	Ácido octanoico Octanoic acid	$C_8H_{16}O_2$		24.100
9	Ácido 9,12,15 - octadecatrienoico, 2- [(trimetilsilil) oxi] -1- [[(trimetilsilil) oxi] metil] etil éster, (Z, Z, Z) - 9,12,15-Octadecatrienoic	$C_{27}H_{52}O_4Si_2$		25.725

	acid, 2- [(trimethylsilyl)oxy]-1- [[trimethylsilyl)oxy)methyl] ethyl ester, (Z,Z,Z)-			
10	Desulfosinigrina Desulphosinigrin	$C_{10}H_{17}NO_6S$		27.195
11	5,7-Dodecadiyna-1,12-diol 5,7-Dodecadiyn-1,12-diol	$C_{12}H_{18}O_2$		28.443
12	Ácido ciclopropanododecanoico, 2 - octil- metil éster Cyclopropanedodecanoic acid, 2-octyl-, methyl ester	$C_{24}H_{46}O_2$		31.870
13	Ácido 13,16- octadecadienoico, metil éster 13,16-Octadecadiynoic acid, methyl ester	$C_{19}H_{30}O_2$		32.900
14	Ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)- eicosa- 5,8,11,14,17-pentaenoico Cis-5,8,11,14,17- Eicosapentaenoic acid	$C_{20}H_{30}O_2$		34.313
15	Colestán-3-ol, 2-metileno -, (3β, 5α) Cholestan-3-ol, 2- methylene-, (3β,5α)	$C_{28}H_{48}O$		35.074
16	Epóxido trans-Z-α- bisaboleno Trans-Z-α-Bisabolene epoxide	$C_{15}H_{24}O$		36.974
17	Ácido [1,1' - biciclopropil] - 2 - octanoico, 2'- hexil-, metil ester [1,1'-Bicyclopropyl]-2- octanoic acid, 2'- hexyl-, methyl ester	$C_{21}H_{38}O_2$		36.865

18	(Z, Z) - 9,12-cloruro de octadecadienoilo 9,12-Octadecadienoyl chloride, (Z,Z)-	$C_{18}H_{31}ClO$		37.844
19	Ácido 3-hidroxi dodecanoico Dodecanoic acid, 3-hydroxy	$C_{12}H_{24}O_3$		40.127
20	Acetato de 7 - metil - Z - tetradecen - 1 - ol 7-Methyl-Z-tetradecen-1-ol acetate	$C_{17}H_{32}O_2$		41.157

DISCUSIÓN

Trypanosoma cruzi se clasifica en seis linajes o unidades taxonómicas discretas (TcI a TcVI). Los linajes TcI, TcIV y TcV se han asociados a cardiomiopatías, mientras que los linajes TcII, TcV y TcVI a problemas digestivos (Pérez *et al.* 2019). En este estudio se evaluaron los extractos contra la cepa de Nuevo León que pertenece al linaje TcI, el cual es el linaje más abundante en el continente americano y el que ha presentado mayor resistencia al benznidazol (Pérez *et al.* 2019).

Las plantas que se utilizaron en este estudio se seleccionaron por reportes previos que indican que presentan actividad tripanosomicida sobre epimastigotes de *T. cruzi* (Molina-Garza *et al.* 2014; Pérez *et al.* 2017). Sin embargo, los resultados que se obtuvieron difieren de los reportados anteriormente. En este trabajo, el extracto de *M. vulgare* presentó una CL₅₀ de 438 µg/mL, mientras que Molina *et al.* (2014) y Pérez *et al.* (2017) reportan una CL₅₀ de 23 y 647 µg/mL sobre las cepas CL Brener y Nuevo León respectivamente. Por otra parte, el extracto de *E. heterophyllum* presentó una CL₅₀ de 310 µg/mL, mientras que Molina *et al.* (2014) reportan una CL₅₀ de 11 µg/mL sobre la cepa CL Brener. Finalmente, el extracto de *S. molle* presentó una CL₅₀ de 94 µg/mL, mientras que Molina *et al.* (2014) y Pérez *et al.* (2017) reportan una CL₅₀ de 16 y 827 µg/mL sobre las cepas CL Brener y Nuevo León respectivamente. La diferencia entre los resultados obtenidos en este trabajo y los de Molina *et al.* (2014) podría deberse principalmente a que ellos utilizaron la cepa CL Brener, la cual pertenece al linaje TcVI (Zingales *et al.* 2009) y se ha reportado que distintos linajes de *T. cruzi* muestran diferente susceptibilidad ante distintos fármacos (Hamuy *et al.* 2013). Asimismo, la actividad biológica de una planta puede variar debido al lugar y temporada de colecta (Villareal *et al.* 2014). Además, la temperatura y el tiempo almacenamiento son dos importantes factores que afectan la actividad biológica de un extracto natural (Haouala *et al.* 2008), lo cual podría explicar la diferencia entre los resultados obtenidos en este estudio y los de Pérez *et al.* (2017) que también utilizaron la cepa Nuevo León.

Con base en los resultados obtenidos, se optó por realizar el aislamiento biodirigido de los compuestos con actividad tripanosomicida del extracto de *S. molle*. Se obtuvieron tres particiones con solventes de distinta polaridad, de las cuales, la partición metanólica no mostró actividad contra *T. cruzi* al presentar una CL₅₀ >1000

$\mu\text{g/mL}$, mientras que las particiones hexánica y clorofórmica si mostraron buena actividad, al presentar una CL_{50} de 49 y 20 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Por consiguiente, la actividad tripanosomicida de *S. molle* está dada por los compuestos no polares y medianamente polares, como los terpenos. Se considera que la actividad tripanosomicida de muchos extractos de plantas se debe principalmente a la presencia de terpenos, los cuales, debido a su carácter hidrofóbico, pueden difundirse a través de la membrana celular de parásito y afectar sus vías metabólicas y orgánulos. Asimismo, se ha reportado que los terpenos β -mirceno, α -pineno y limoneno poseen actividad tripanosomicida (Borges *et al.* 2018); estos tres compuestos se han identificado en extractos de *S. molle* (Deveci *et al.* 2010; Salem *et al.* 2016; Turchetti *et al.* 2020).

A partir de las particiones hexánica y clorofórmica se obtuvieron 15 fracciones colectivas. De estas fracciones las que mostraron mayor actividad tripanosomicida fueron la FC1H2 (CL_{50} 16 $\mu\text{g/mL}$), la FC3C1 (CL_{50} 21 $\mu\text{g/mL}$) y la FC5H2 (CL_{50} 37 $\mu\text{g/mL}$); las dos primeras presentaron mejor actividad que el fármaco de referencia utilizado para tratar la ECH, el nifrutimox, que presentó una CL_{50} de 32 $\mu\text{g/mL}$.

Por otra parte, en el ensayo de letalidad de larvas de *A. salina* los tres extractos metanólicos crudos de las plantas evaluadas mostraron no ser tóxicos al igual que la partición metanólica y las fracciones FC2H2 y FC4C1, mientras que las particiones hexánica, clorofórmica y las otras fracciones colectivas mostraron ser moderadamente tóxicas. Asimismo, en el ensayo de citotoxicidad sobre células Vero, solamente la partición metanólica mostró ser no citotóxica, sin embargo, tampoco presentó actividad tripanosomicida. Mientras que la partición hexánica y las fracciones FC1H2 y FC5H1 mostraron ser citotóxicas, y los tres extractos metanólicos crudos, así como la partición clorofórmica y las otras fracciones colectivas mostraron ser moderadamente citotóxicas. La acción citotóxica de un extracto natural o la demostración de que presenta toxicidad *in vivo* son limitaciones importantes en la búsqueda nuevos fármacos (Fernández-Calienes *et al.* 2009). No obstante, la partición clorofórmica y las fracciones FC1H2 y FC3C1, que fueron las que presentaron la mayor actividad tripanosomicida fueron medianamente tóxicas y citotóxicas; en contraste con el nifurtimox y benznidazol que se ha demostrado que son citotóxicos y genotóxicos (Buschini *et al.* 2009). Asimismo, cabe mencionar que el ensayo con *A. salina* ha demostrado buena correlación con los resultados de toxicidad aguda oral en ratones (Fernández-Calienes *et al.* 2009). Por lo que se pretende probar la actividad

tripanosomicida y citotóxica de los extractos con mejor actividad tripanosomicida en un modelo murino.

Además, se evaluó la actividad hemolítica, donde el extracto de *E. heterophyllum*, la partición metanólica y las fracciones FC4H1, FC2H2, FC3H2, FC4H2 y FC4C1 mostraron no ser hemolíticas, mientras que los otros extractos, particiones y fracciones colectivas fueron hemolíticas. La actividad hemolítica de los extractos crudos podría deberse a la presencia de saponinas, ya que estos compuestos pueden producir la lisis de eritrocitos (Guzmán *et al.* 2015).

Asimismo, se determinó el índice de selectividad, donde los extractos de *E. heterophyllum* y *M. vulgarre* fueron no selectivos contra *T. cruzi*, mientras que el extracto de *S. molle* fue moderadamente selectivo. De las particiones, la hexánica fue no selectiva y la clorofórmica fue altamente selectiva con un índice de 5.6. Y de las fracciones, la FC3C1 fue la más selectiva con un índice de 6.19. El índice que presentó la fracción FC3C es un valor alto, lo cual nos indica que presenta potencial como agente tripanosomicida, por lo tanto, se seleccionó para identificar los compuestos presentes en ella.

Es importante mencionar que *S. molle* es una especie dioica. En diversos estudios se ha encontrado que la composición química de esta planta varía conforme al sexo del árbol (Turchetti *et al.* 2020). En este estudio, se emplearon hojas y ramas provenientes de un árbol masculino de *S. molle*, los compuestos identificados más abundantes fueron el 1,4-Bis (trimetilsilil) benceno, el ácido 9,12,15-octadecatrienoico, 2-[(trimetilsilil) oxi]-1-[[[(trimetilsilil) oxi] metil] etil éster, (Z,Z,Z)-, la desulfosinigrina, el 5,7-dodecadiyna-1,12-diol y el acetato de 7-metil-Z-tetradecen-1-ol. En el extracto hexánico de hojas de *S. molle* colectadas en Turquía durante el invierno, los principales compuestos identificados fueron limoneno, β -thujona, P-cimeno, Germacreno D y δ -cadinene (Deveci *et al.* 2010). Por otra parte, en el extracto obtenido con diclorometano de ramas de *S. molle* colectadas en Egipto durante el verano, los compuestos más abundantes identificados fueron elemol, ácido acético, (1,2,3,4,5,6,7,8-octahidro-3,8,8-trimetilnaft-2-il) metil éster, 12-metil-E, E-3,13-octadecadien-1-ol, torreyol y éster dioctílico del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (Salem *et al.* 2016). Cabe mencionar, que ninguno de los compuestos que se identificaron en este estudio se han reportado con anterioridad en los extractos de *S.*

molle. Asimismo, en extractos de hojas de *S. molle* obtenidos con éter de petróleo y éter dietílico los compuestos más abundantes son los sesquiterpenos (Garzoli *et al.* 2019; Turchetti *et al.* 2020). En este estudio, de los 20 compuestos identificados, solo se identificó un sesquiterpeno, el epóxido trans-Z- α -bisaboleno. Esta diferencia en los compuestos identificados podría deberse a que la composición química de un extracto depende de la edad y genética planta, el lugar de colecta, la composición del suelo, el clima y la forma de almacenamiento de la planta y el extracto (Villareal *et al.* 2014); en la mayoría de los reportes de los compuestos identificados en *S. molle* son de plantas colectadas en Europa, Asia y África, mientras que en este estudio la planta se colectó en México.

La mayoría de los compuestos que se identificaron en la fracción FC3C1 se han encontrado en extractos que poseen actividad antimicrobiana de diversas plantas, como es el caso del 1,4-Bis (trimetilsilil) benceno (Deabes *et al.* 2021); el hexametilciclotrisiloxano (Keskin *et al.* 2012); el 4-etil-1,2-dimetil-benceno (Wintola y Afolayan 2017); el ácido 17- octadecínico (Cai *et al.* 2020); el ácido 8-clorocaprico (Fan *et al.* 2018); la desulfosinigrina (Ololade y Anuoluwa 2020); el 5,7-Dodecadiyna-1,12-diol (Hussein *et al.* 2016); el ácido ciclopropanodecanoico, 2-octil-metil éster (Al-Rubaye *et al.* 2017); el ácido 13,16-octadecadienoico, metil éster (Bentrad *et al.* 2017); el ácido [1,1' -biciclopropil]-2-octanoico, 2'-hexil-, metil éster (Rani y Kapoor 2019); el (Z,Z)-9,12-cloruro de octadecadienoilo (Abdel *et al.* 2019); el ácido 3-hidroxi dodecanoico (Idan *et al.* 2015) y el acetato de 7-metil-Z- tetradecen-1-ol (El-Khair *et al.* 2019).

Además, algunos de los compuestos identificados se han encontrado en extractos con actividad antiparasitaria, tales como el ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico con actividad contra *Trichomonas* sp. (Korosh *et al.* 2016); el colestán-3-ol, 2-metileno-, (3 β , 5 α) con actividad contra *Leishmania* sp. (Achakzai *et al.* 2019); el isopinocarveol con actividad contra *Acanthamoeba* sp. (Albouchi *et al.* 2017); y el epóxido trans-Z- α -bisaboleno con actividad contra *Leishmania* sp., cabe destacar que este último compuesto se ha evaluado de manera pura, donde presentó una CL₅₀ de 50 μ g/mL (Rodríguez-Chaves *et al.* 2018). Tanto *Leishmania* como *Trypanosoma* son protozoarios muy similares al ser ambos hemoflagelados y pertenecer a la familia Trypanosomatidae, por lo cual se piensa que el epóxido trans-Z- α -bisaboleno podría tener potencial tripanosomicida.

Por otra parte, se ha reportado que algunos de los compuestos identificados en su forma pura presentan actividad antifúngica como es el caso del ácido nonanoico (Jang *et al.* 2012) y el ácido octanoico (Zhang *et al.* 2019).

De los compuestos identificados, solo hubo uno que se ha identificado en extractos de diversas plantas, sin embargo, no se le atribuye ninguna propiedad, el cual es el ácido 9,12,15-octadecatrienoico, 2-[[trimetilsilil]oxi]-1-[[trimetilsilil]oxi] metil] etil éster, (Z,Z,Z) (Ganesh y Mohankumar 2017).

Para identificar con certeza el o los compuestos con actividad tripanosomicida se sugiere continuar el aislamiento biodirigido, con más cromatografías en columna y la evaluación de la actividad de las fracciones obtenidas. No obstante, hay que tener en cuenta que tal vez los compuestos de manera pura no tengan la misma actividad que la fracción ya que comúnmente la actividad biológica de un extracto natural se debe al sinergismo que se presenta entre sus compuestos. Asimismo, se considera que la toxicidad de los extractos es menor cuando se encuentran todos sus compuestos juntos que cuando se encuentran purificados (Shiva 2007).

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico crudo de *S. molle* y sus fracciones poseen alta actividad tripanosomicida contra la cepa Nuevo León de *T. cruzi*.
- La partición clorofórmica, así como las fracciones colectivas FC1H2 y FC3C1 de *S. molle* presentaron mayor actividad tripanosomicida que el nifurtimox.
- Es la primera vez que se reporta la presencia de los 20 compuestos identificados en un extracto de *S. molle*.
- De los compuestos identificados, se considera que el epóxido trans-Z-alfa-bisaboleno podría tener potencial actividad tripanosomicida.

PERSPECTIVAS

Se propone evaluar los extractos/particiones/fracciones de *S. molle*, sobre los diferentes linajes y estadios de *T. cruzi* (amastigotes) para determinar si son candidatos potenciales para el tratamiento de la ECH.

Asimismo, se sugiere continuar con el aislamiento biodirigido para purificar los compuestos obtenidos u obtenerlos de manera comercial y probar su actividad tripanosomicida y citotóxica *in vivo* en un modelo murino, debido a que el manejo farmacológico empleado en la actualidad ha mostrado ser insuficiente y con efectos mutagénicos y genotóxicos, por lo que estos compuestos podrían presentar propiedades prometedoras para la tratar la ECH.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel K, Ezdehar A, Shaza A. 2019. *Parkinsonia aculeate* Oil: GC-MS Analysis and Antimicrobial Activity. *The Pharmaceutical and Chemical Journal* 6(5):35-39.
- Achakzai J, Anwar M, Kakar A, Akhtar B, Akbar A, Kakar S, Khan J, Khan N, Khan G, Baloch N, Jan M, Panezai M. 2019. In Vitro Antileishmanial Activity and GC-MS Analysis of Whole Plant Hexane Fraction of *Achillea wilhelmsii* (WHFAW). *Journal of Chemistry* 2019:1-26.
- Al-Adhroey A, Nor Z, Al-Mekhlafi H, Mahmud, R. 2010. Median lethal dose, antimalarial activity, phytochemical screening and radical scavenging of methanolic *Lenguas galanga* rhizome extract. *Molecules* 15:8366-8376.
- Albouchi F, Sifaoui I, Reyes-Batlle M, Lopez-Arencibia A, Piñero J, Lorenzo-Morales J, Abderrabba M. 2017. Chemical composition and anti-Acanthamoeba activity of *Melaleuca stypelioides* essential oil. *Experimental Parasitology* 183:104-108.
- Alonso-Geli Y, Alonso-Moreno Y, Falcón-Diéguez J, Lucambio-Miró L, Castro-Piñol, M. 2015. Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica. *Revista Cubana de Química* 27(2):110–118.
- Al-Rubaye A, Kaizal A, Hameed I. 2017. Phytochemical Screening of Methanolic Leaves Extract of *Malva sylvestris*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 9(4):537-552.
- Apt W. 2013. *Parásitología humana*. McGraw Hill: México, p. 282.
- Bentrad N, Gaceb-Terrak R, Benmalek Y, Rahmania F. 2017. Studies on Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Bioactive Molecules from Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Pollens and Seeds. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14 (3):242-256.
- Bermúdez A, Olivera-Miranda M, Velázquez D. 2005. Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivo y enfoques actuales. *Interciencia* 30(8):453-459.
- Borges E, Fernandes C, Rodrigues V, de Melo C, Fonseca A, Dantas M. 2018. Chemical composition, anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of the essential oil from green fruits of *Protium ovatum* (BURSERACEAE). *Revista Drasilera de Fruticultura Jaboticaba* 40(1):1-8.
- Boudjelal A, Henchiri C, Siracusa L, Sari M, Ruberto G. 2012. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia* 83(2):286–292.
- Buschini A, Ferrarini L, Franzoni S, Galati S, Lazzaretti M, Mussi F, Northfleet C, Araújo M, Poli P. 2009. Genotoxicity reevaluation of three commercial

- nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *Journal of Parasitology Research* 2009:1-11.
- Cai J, Du B, Kang L, Guo J. 2020. Antimicrobial compounds from *Athyrium sinense* damage the cell membrane of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 93:76 -83.
- Carreón-Sánchez R, Marroquín-Segura R, Mora-Guevara J, Valadez-Sánchez C, Flores-Cabrera Y, Flores-Pimentel M, Hernández-Abad V. 2013. Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo): para comprobar su actividad hipoglucemiante y anti-inflamatoria. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas* 44(2):41-45.
- Castro I. 2016. Aislamiento biodirigido y caracterización de compuestos anti-*Helicobacter pylori* a partir de una planta usada en la medicina tradicional peruana. Tesis de doctorado. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.
- CDC. (2019). American Trypanosomiasis. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
- CDC. 2017. Hoja informativa detallada. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/informativa/detallada.html>
- Deabes M, El-Fatah S, Salem S, Naguib K. 2021. Antimicrobial activity of bioactive compounds extract from *Saussurea costus* against food spoilage microorganisms. *Egyptian Journal of Chemistry* 64 (6):2833-2843.
- Deveci O, Sukan A, Tuzun N, Hames E. 2010. Chemical composition, repellent and antimicrobial activity of *Schinus molle* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 4(21):2211–2216.
- Dragonetti M, Gris J, Moglioni A, Fernandez B. 2008. Estudio Teórico Preliminar de Fármacos Anti-VIH, Inhibidores No Nucleosídicos de la Transcriptasa Reversa. *Información Tecnológica* 19(2), 23-32.
- El- Khair R, Ghanemb M, Omran G, El-Din A. 2019. Qualitative GC-MS analysis and antimicrobial activity of volatiles from *Carthamus lanatus* (L.) growing in Egypt. *Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 4(1):6- 12.
- Fan L, Bakar M, Nor N, Rahim A, Bakar F, Sukari M. Comparison of Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils Extracted from Different Parts of Bambang (*Mangifera pajang*) Frui. *Asian Journal of Chemistry* 30(8):1743-1746.
- Fernández-Calienes A, Mendiola J, Monzote L, García M, Sariego I, Acuña D, Scull R, Gutiérrez Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 61(3):254-258.

- Galaviz-Silva L, Molina-Garza Z, González-Santos M, Mercado-Hernández R. 2009. Update on Seroprevalence of Anti- *Trypanosoma cruzi* Antibodies among Blood Donors in Northeast Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81(3):404-406.
- Ganesh M, Mohankumar M. 2017. Extraction and identification of bioactive components in *Sida cordata* (Burm.f.) using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Food Science and Technology* 54(10):3082–3091.
- García-Jordán N, Berrizbeiti M, Concepción J, Aldana E, Cáceres A, Quiñones W. 2015. Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica* 35(2):247-57.
- García-Ruíz I. 2013. Contribución al conocimiento del género *Eryngium* (Apiaceae) en el estado de Michoacán, México. *Acta botánica mexicana* 103:65-118.
- Garzoli S, Masci V, Ovidi E, Turchetti G, Zago D, Tiezzi A. 2019. Chemical Investigation of a Biologically Active *Schinus molle* L. Leaf Extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2019:1–6.
- Gascón J, Bern C, Pinazo M. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica* 115:22-27.
- Guhl F. (2009). Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Revista Biomedica* 20:228-234.
- Guzmán B, Tenorio R, Cruz D, Espinal C, Alvarado J, Mollinedo P. 2015. Saponins from *Chenopodium Quinoa* Willd and *Chenopodium Pallidicaule* Aellen as biocontrollers of phytopathogen fungi and hemolysis agents. *Revista Boliviana de Química* 32(1):8-14.
- Haiek G, Tillett S. 2004. El jardín medicinal de la revista Marrubio *Marrubium vulgare* L. *Revista Facultad de Farmacia* 67:39-40.
- Hamuy R, Acosta N, López E, Ferreira M, de Bilbao V. 2013. Determinación de la sensibilidad in vitro de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* al benznidazol y al extracto de hoja de la planta *Zanthoxylum chiloperone*. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud* 9(2): 16-25.
- Haouala R, Hawala S, El-Ayeb A, Khanfir R, Boughanmi N. 2008. Aqueous and organic extracts of *Trigonella foenum-graecum* L. inhibit the mycelia growth of fungi. *J Environ Sci* 20(12):1453-7.
- Hernández J, Luengas P, Otero V, Garavito, G. 2014. Actividad antiplasmódica y hemolítica de extractos etanólicos y fracciones obtenidas de *Cecropia membranacea* Trécul. y *Cecropia metensis* Cuatrec. (sin. *Cecropia peltata* var. *candida* Velásquez). *Revista Cubana de Medicina Tropical* 66(1): 58-70.

- Hussein H, Hameed I, Ibraheem O. 2016. Antimicrobial Activity and Spectral Chemical Analysis of Methanolic Leaves Extract of *Adiantum Capillus-Veneris* Using GC-MS and FTIR Spectroscopy. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(3): 369-385.
- Idan S, Al-Marzoqi A, Hameed I. 2015. Spectral analysis and anti-bacterial activity of methanolic fruit extract of *Citrullus colocynthis* using gas chromatography-mass spectrometry. *African Journal of Biotechnology* 14(46): 3131-3158.
- Jang Y, Jung J, Lee I, Kang S, Yun B. 2012. Nonanoic Acid, an Antifungal Compound from *Hibiscus syriacus* Ggoma. *Mycobiology* 40(2):145-146.
- Jaramillo L, Ruiz C, Martínez L, Vera S. 2017. Enfermedad de Chagas: una mirada alternativa al tratamiento. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 69(2): 1-13.
- Keskin D, Ceyhan N, Uğur A, Dbeys A. 2012. Antimicrobial activity and chemical constitutions of West Anatolian olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 10(2): 99-102.
- Korosh T, Jordan K, Wu J, Yarlett N, Upmacis R. 2016. Eicosapentaenoic Acid Modulates *Trichomonas vaginalis* Activity. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 63(2):153-61.
- Lagarto A, Silva R, Guerra I, Iglesias L. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8(5):395-400.
- Lucas R, Barba M. 2009. Prevalence of American tripanosomiasis in pregnant women from a health area of Valencia, Spain. 2005-2007. *RevEsp Salud Pública* 83:543-55.
- Luna C. 2012. Distribución e importancia maderera de la familia Anacardiaceas en el gran chago argentino. *Ra Ximhai* 8(3):83-95
- Martínez M, Mancuello C, Pereira C, González F, Prieto R, Álvarez S, Benítez B. 2013. Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* eichler sobre eritrocitos humanos. *Steviana* 5(12): 114–121.
- Martins M, Arantes S, Candeias F, Tinoco M, Cruz-Morais J. 2014. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology* 151(1):485–492.
- McPhee S, Papadakis M, Rabow M. 2013. Diagnóstico clínico y tratamiento, 50^a ed. McGraw Hill: México, p. 1423.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. 2016. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 34(2): 132-138.

- Molina-Garza Z, Bazaldúa-Rodríguez A, Quintanilla-Licea R, Galaviz-Silva L. 2014. AntiTrypanosoma cruzi activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta Tropica* 136:14-18.
- Montes-Rincón L, Galaviz-Silva L, González-Bravo, F, Molina-Garza Z. 2016. *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in pregnant women and screening by PCR and microhaematocrit in newborns from Guanajuato, Mexico. *Acta Tropica* 164:100–106.
- Montes-Rincón L, Galaviz-Silva L, Molina-Garza Z. 2018. Primer reporte de anticuerpos anti-Trypanosomacruzi en migrantes latinoamericanos en tránsito al cruce fronterizo México-USA. *Biomédica* 38(1):54-60.
- Muelas-Serrano S, Nogal-Ruiz J, Gómez-Barrio A. 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research* 86:999-1002.
- Neira L, Stashenko E, Escobar P. 2014. Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud* 46(1):15-22.
- Ololade Z, Anuoluwa I. 2020. Compositional Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Potential of the Seed of *Annona cinerea* Dunal Grown in Nigeria. *Global Journal Of Medical Research* 20:17-25.
- OMS. (2019). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Disponible en: [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- OMS. (2020). Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponible en: <https://www.who.int/chagas/disease/en/>
- OPS. (2018). Información general: Enfermedad de Chagas. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es
- Osorio E, Arango G, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, Paco M, Giménez A, Robledo S. 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology* 111(3):630-635.
- Pérez K, Galaviz L, Iracheta J, Lucero E, Molina Z. 2017. Actividad contra *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de extractos metanólicos de plantas de uso medicinal en México. *Revista de Biología Tropical* 65(4):1459-1469.
- Pérez V, Morales C, Vázquez J, Valladares B, Romero T, Cuervo J, Martínez I, Noguez J, Aparicio J. 2019. Caracterización molecular de aislados de *Trypanosoma cruzi* de triatomíneos recolectados en los municipios del Estado de Hidalgo, México. *Nova Scientia* 11(1):171-185.

- Pérez-Molina J, Molina I. 2018. Chagas disease. *The Lancet* 391(10115):82–94.
- Ramírez J, Avendaño M, Badano E. 2015. El pirul, el árbol que vino del sur. CONABIO. *Biodiversitas* 117:6-11
- Rani J, Kapoor M. 2019. Gas Chromatography-Mass Spectrometric Analysis and Identification of Bioactive Constituents of *Catharanthus roseus* and its Antioxidant Activity. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 12(3):461-465.
- Rassi A, Rassi A, Marin-Neto J. 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375(9723):1388–1402.
- Rivas-Morales C, Oranday-Cardenas M, Verde-Star M. 2016. Investigación en plantas de importancia médica. *OmniaScience: México*, p. 2.
- Rodríguez D, Barreto A. 2015. Propiedades biológicas de *Pedilanthus tithymaloides*: una alternativa natural de tratamiento. *CienciActual* 5:40-48.
- Rodríguez-Chaves D, Bagnarello-Madruga V, Alpizar-Cordero J, Calvo-Varga A, Cordero-Villalobos M, Chinchilla-Carmona M, Valerio-Campos I, Sánchez Porrás R. 2018. Actividad in vitro anti-Leishmania (Trypanosomatidae) del epóxido trans-Z- α -bisaboleno y del Safrol, en frutos de *Piper auritum* (Piperaceae). *Revista de Biología Tropical* 66(2):826-835.
- Salem M, Zayed M, Ali H, Abd M. 2016. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Schinus molle* wood branch growing in Egypt. *Journal of Wood Science* 62(6):548–561.
- Sánchez E, Vélez M, Restrepo M, Marín J, Gallego D. 2016. Tripanosomiasis americana, una mirada desde el tratamiento. *Anales de la Facultad de Medicina* 77(1):39-44
- Shiva C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Turchetti G, Garzoli S, Laghezza V, Sabia C, Iseppi R, Giacomello P, Tiezzi A, Ovidi E. 2020. Antimicrobial Testing of *Schinus molle* (L.) Leaf Extracts and Fractions Followed by GC-MS Investigation of Biological Active Fractions. *Molecules* 25(8):1-15.
- Uribarren T. (2018). Enfermedad de Chagas. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>
- Valdés-Iglesias O, Díaz N, Cabranes Y, Acevedo M, Areces A, Graña L, Díaz C. 2003. Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia* 16:36-45.

- Valencia L, Muñoz D, Robledo S, Echeverría F, Arango G, Vélez I, Triana O. 2011. Actividad tripanomicida y citotóxica de extractos de plantas colombinas. *Biomédica* 31:552-559.
- Vargas F. 2005. Epidemiología Molecular de la Tripanosomiasis Americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la región Norte y nororiental del Perú. Tesis de doctorado. Universidad de Granada, España.
- Villareal M, Cardoso-Taketa A, Ortiz A, Sharma A. 2014. Biotecnología para producir medicinas de plantas mexicanas. *Revista Digital Universitaria* 15(8): 1-15.
- Wink M. 2012. Medicinal Plants: A Source of Anti-Parasitic Secondary Metabolites. *Molecules* 17:12771-12791
- Wintola O, Afolayan A. 2017. Chemical Constituents and Biological Activities of Essential Oils of *Hydnora africana* Thumb Used to Treat Associated Infections and Diseases in South Africa. *Applied Sciences* 7:443.
- Zhang H, Dolan H, Ding Q, Wang S, Tikekar R. 2019. Antimicrobial action of octanoic acid against *Escherichia coli* O157:H7 during washing of baby spinach and grape tomatoes. *Food Research International* 125:108523.
- Zingales B, Andrade S, Briones M, Campbell D, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo A, Machado C, Miles M, Romanha A, Sturm N, Tibayrenc M, Schijman A. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(7):1051-1054.
- Zohra M, Fawzia A. 2014. Hemolytic activity of different herbal extracts used in Algeria. *International Journal of Pharma Sciences and Research* 5(08):495-500.

ANEXO

CARTA DE INGRESO DE ESPECÍMENES AL HERBARIO UNL



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA
HERBARIO UNL

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto me permito informar que la Dra. ZINNIA JUDITH MOLINA GARZA entregó al Herbario UNL tres (3) ejemplares de plantas colectadas en el Ejido Chihuahuita, Municipio Cadereyta Jiménez Nuevo León, como parte de un Proyecto de Investigación en tesis de maestría titulada "Identificación de compuestas activos de extractos de plantas de uso medicinal con actividad biológica contra las formas epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas". Se verificó identificación del material entregado y los resultados se muestran en la tabla siguiente con la relación de los Números de Folio registrados en la Colección.

MATERIAL VEGETAL

No. de Folio	Género	Especie	Familia
030594	<i>Schinus</i>	<i>molle</i>	Anacardiaceae
030595	<i>Marrubium</i>	<i>vulgare</i>	Lamiaceae
030596	<i>Eryngium</i>	<i>heterophyllum</i>	Apiaceae

Sin más por el momento, se extiende la presente para los fines que al interesado convengan.

ATENTAMENTE

Cd. Universitaria, a 4 de Mayo de 2021

Dr. Marco Antonio Guzmán Lucio
Jefe y Curador del Herbario UNL

c.c.p. archivo. Herbario UNL

Pedro de Alba y Manuel Barragán s/n
Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L.
Apartado Postal F-2 y F-38, C.P. 66451
Tels y Fax: 8329-4110 ext. 6456, 8298-2126 y 8114-3465