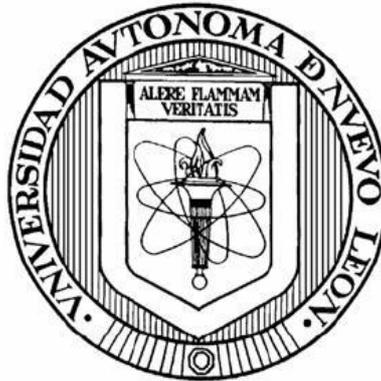


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SUBSTANCIAS
BIOACTIVAS DE *Haematoxylum brasiletto* (PALO DE BRASIL)
CONTRA *Trypanosoma cruzi*, CAUSANTE DE
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

POR

ÁNGEL DAVID TORRES HERNÁNDEZ

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

2021

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SUBSTANCIAS
BIOACTIVAS DE *Haematoxylum brasiletto* (PALO DE BRASIL)
CONTRA *Trypanosoma cruzi*, CAUSANTE DE
LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

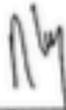
Comité de Tesis



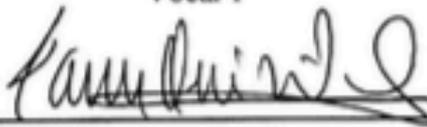
Dr. Lucio Galaviz-Silva
Presidente



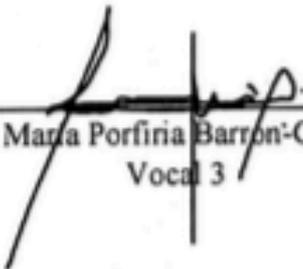
Dra. Zinnia Judith Molina-Garza
Secretario



Dr. Ricardo Gómez-Flores
Vocal 1



Dr. Ramiro Quintanilla-Licea
Vocal 2



Dra. María Porfiria Barrón-González
Vocal 3



Dra. Katiushka Arévalo-Niño
Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SUBSTANCIAS
BIOACTIVAS DE *Haematoxylum brasiletto* (PALO DE BRASIL)

CONTRA *Trypanosoma cruzi*, CAUSANTE DE

LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Dirección de Tesis



Dr. Lucio Galaviz-Silva
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 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Proyectos de Desarrollo Científico para atender Problemas Nacionales, **PN 2018-3157** del Dr. en C. Lucio Galaviz-Silva.
- El Programa de Apoyo a la investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL: Aislamiento e identificación de compuestos químicos provenientes de *Schinus molle* con actividad Tripanosomicida, Folio PAICyT-UANL CN1618-21 de la Dra. Zinnia Judith Molina-Garza.

Dedicatoria

A Dios por darme todo lo que tengo en la vida.

*A mi madre Ma. Consuelo Hernández Garza y a mi padre Eloy
Torres de León.*

Agradecimientos

A la **Doctora Zinnia Judith Molina-Garza** y al **Doctor Lucio-Galaviz Silva** por su confianza, su apoyo y asesoría sobre parasitología para realizar este proyecto de investigación.

Al **Doctor Ramiro Quintanilla-Licea** quien me brindó su confianza y me dio una vez más la oportunidad de poder retomar el aprendizaje sobre la Fitoquímica, así como su guía y asesoría.

A la **Doctora María Porfiria Barrón-González** y al **Doctor Ricardo Gómez-Flores** por su tiempo, por sus valiosas aportaciones a la tesis y sus enseñanzas.

Al **Prof. Harmut Laatsch** de la Universidad de Göttingen, Alemania, por su apoyo en la medición de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.

Al **Dr. José Luis Zacarias Hernández** y al **M.C. José Roberto Estupiñan Jiménez**, mis amigos que se convirtieron en hermanos.

Al **Dr. Aldo Fabio Bazaldua**, grandes pláticas, grandes consejos y gran compañerismo en el laboratorio de Fitoquímica desde el 2011.

A mis compañeros del **laboratorio de Patología Molecular y Experimental (LPME)** con quienes formé buenos lazos y un gran equipo de trabajo.

A todo el equipo de maravillosas personas que conforman el **departamento de posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas**, guías importantes en este camino.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto (No. CVU 950148).

Índice

Índice de tablas	III
Índice de figuras IIV	
Lista de símbolos y abreviaturas	V
Resumen	VIII
Abstract	VIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Enfermedad de Chagas	2
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
2.3 Transmisión vectorial	3
2.4 Transmisión secundaria	4
2.5 Tratamiento	5
2.6 El uso de plantas medicinales como alternativa: <i>Haematoxylum brasiletto</i>	6
2.7 Actividad bactericida de <i>Haematoxylum brasiletto</i>	7
2.8 Actividad anti-protozoaria de <i>Haematoxylum brasiletto</i>	9
2.9 Compuestos aislados de <i>H. brasiletto</i>	10
3. Justificación	11
4. Hipótesis	12
5. Objetivos	13
5.1 Objetivo general	13
5.2 Objetivo particulares	13
6. Material y métodos	14
6.1 Extractos	14
6.1.1 Obtención de material vegetal	14
6.1.2 Extracción Soxhlet metanólica	14
6.1.3 Extracción Soxhlet acuosa	14
6.1.4 Extracción por maceración con metanol	15
6.1.5 Extracción por maceración con agua	15
6.2 Pruebas cualitativas fitoquímicas	16
6.3 Pruebas biológicas	16
6.3.1 Ensayo <i>in vitro</i> de la actividad tripanosomicida de los extractos	16
6.3.2 Ensayo de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	17
6.3.3 Actividad hemolítica	18
6.4 Aislamiento biodirigido	19

6.4.1	Cromatografía en capa fina (CCF)	19
6.4.2	Partición preliminar de extractos por polaridad en equipo Soxhlet	19
6.4.3	Fraccionamiento por columna de Sephadex	19
6.4.4	Fraccionamiento por columna de sílica gel fase reversa	19
6.5	Análisis estadístico	20
6.6	Análisis espectrométrico y espectroscópico de los compuestos con actividad tripanosomicida	20
7.	Resultados	21
7.1	Extracciones	21
7.2	Fraccionamiento	25
7.2.1	Porcentajes de inhibición de los compuestos obtenidos	29
7.3	Análisis espectroscópico del compuesto C1	29
7.3.1	Análisis de espectrometría de masas	30
7.3.2	Análisis de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN	31
7.3.3	Análisis de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C -RMN	33
8.	Discusión	36
9.	Conclusión	39
10.	Anexo de figuras	40
11.	Bibliografía	43

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de las pruebas fitoquímicas utilizadas.	16
Tabla 2. Resultados de extractos iniciales de 25 g.	21
Tabla 3. Resultados de extracciones de 100 gr.	23
Tabla 4. Evaluación fitoquímica de <i>H. brasiletto</i> .	24
Tabla 5. Resultados de particiones del extracto crudo.	25
Tabla 6. Fracciones colectivas de la columna de sílica fase normal.	26
Tabla 7. Fracciones colectivas de la columna de Sephadex.	27
Tabla 8. Fracciones colectivas de la columna de sílica gel fase reversa. y 254 nm).	28
Tabla 9. Compuestos aislados.	29
Tabla 10. Resumen de señales ¹ H-RMN (CD ₃ OD, 600 MHz) compuesto C1.	32
Tabla 11. Resumen de señales ¹³ C-RMN (CD ₃ OD, 600 MHz) compuesto C1.	34

Índice de figuras

Figura 1. Extractos de <i>H. brasiletto</i> .	21
Figura 2. Comparación en CCF de las extracciones de 25 g (UV 254 nm).	22
Figura 3. Comparación entre extracciones de 25 g y 100 g (revelado UV 365 y 254 nm).	24
Figura 4. CCF de las particiones (revelado UV 365 y 254 nm).	25
Figura 5. CCF de las particiones (revelado UV 365 y 254 nm).	26
Figura 6. Sólido obtenido de filtrado.	26
Figura 7. CCF fracciones colectivas Sephadex (revelado UV 365 y 254 nm).	27
Figura 8. CCF fracciones colectivas sílica gel fase reversa (revelado UV 365).	28
Figura 9. Comparación entre FC1 y sólido obtenido (SM).	29
Figura 10. Porcentajes de inhibición compuestos aislados.	29
Figura 11. Espectro de masas HR-ESI-MS del compuesto C1.	30
Figura 12. Espectro de masas ESI-MS del compuesto C1.	31
Figura 13. Espectro de ¹ H-RMN (600 MHz, CD ₃ OD) C1.	31
Figura 14. Espectro de ¹³ C-RMN (600 MHz, CD ₃ OD) C1.	33
Figura 15. Posible fragmentación de molécula en dos iones moleculares. A) principal ion molecular B) ion molecular.	35
Figura 16. Propuesta de estructura para C1. 7-(((3,9,10-trihydroxy-7,11b-dihydroindeno[2,1-c]chromen-6a(6H)-yl)oxy)methoxy)-6,7,8,13-tetrahydrobenzo[<i>b,e</i>]oxonine-3,7,10,11-tetraol.	35

Lista de símbolos y abreviaturas

° C	Grados centígrados
%	Porcentaje
cm	Centímetro
nm	Nanómetro
m	Metro
ng	Nanogramo
µg	Microgramo
mg	Miligramo
g	Gramo
µL	Microlitro
mL	Mililitro
h	Hora
min	Minuto
rpm	Revoluciones por minuto
m/z	Relación Masa-Carga
MHz	MegaHertz
CCF	Cromatografía capa fina
<i>R_f</i>	Factor de retención (retention factor)
LIT	Infusión triptosa hígado (liver infusion tryptose)
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTT	Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
HCl	Ácido clorhídrico
CD ₃ O	Metanol deuterado
CL ₅₀	Concentración letal al 50 %
RMN	Resonancia magnética nuclear
COSY	Espectroscopía de correlación (correlation spectroscopy), técnica 2D de RMN
HMBC	Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples (heteronuclear multiple bond correlation), técnica 2D de RMN
HSQC	Coherencia heteronuclear cuántica simple (heteronuclear single quantum coherenc), técnica 2D de RMN
APT	Ensayo de unión a protón (attached proton test)

ELISA Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)

Resumen

El objetivo principal de este proyecto estuvo dirigido a la búsqueda de nuevas sustancias con actividad biológica contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico causal de la enfermedad, el cual partió del extracto acuoso y metanólico de la planta catalogada de uso medicinal tradicional *Haematoxylum brasiletto*. Los extractos obtenidos con equipo Soxhlet se analizaron contra epimastigotes de *T. cruzi* una CL_{50} de 121.01 y 229.40 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos acuosos y metanólicos respectivamente. Los extractos se consideran aptos para aplicación humana al no ser hemolíticos presentando una $CH_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ y no citotóxicos en modelo de *Artemia salina* al obtener una $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$. Con el uso de técnicas cromatográficas se logró aislar y purificar los compuestos C1, C2 y C3 que presentaron una CL_{50} de 5.84, 364.70 y 321.30 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. El análisis espectroscópico de ESI-MS, $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ (1D y 2D) permitió identificar al compuesto C1 como 7-(((3,9,10-trihydroxy-7,11b-dihydroindeno[2,1-c]chromen-6a(6H)-yl)oxy)methoxy)-6,7,8,13-tetrahydrodibenzo[b,e]oxonine-3,7,10,11-tetraol, un dímero formado por dos moléculas de naturaleza flavonoide con formula molecular $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$ y peso molecular de 602.59.

Abstract

The main objective of this project was directed to the search of new substances with biological activity against epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*, etiological causal agent of the disease, starting from the aqueous and methanolic extract of the traditional medicinal plant *Haematoxylum brasiletto*. The extracts obtained with Soxhlet equipment were analyzed against epimastigotes of *T. cruzi* obtaining a LC₅₀ of 121.01 and 229.40 µg/mL for the aqueous and methanolic extracts, respectively. The extracts were considered suitable for human application as they were not hemolytic, presenting a HC₅₀ >1000 µg/mL and not cytotoxic in the *Artemia salina* model, obtaining an LC₅₀ >1000 µg/mL. With the use of chromatographic techniques, it was possible to isolate and purify compounds C1, C2 and C3, which showed LC₅₀ of 5.84, 364.70 and 321.30 µg/mL, respectively. The ESI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopic analysis (1D and 2D) allowed the identification of compound C1 as 7-(((3,9,10-trihydroxy-7,11b-dihydroindeno[2,1-*c*]chromen-6a(6*H*)-yl)oxy)methoxy)-6,7,8,13-tetrahydrodibenzo[*b,e*] oxonine-3,7,10,11-tetraol, a dimer formed by two molecules of flavonoid nature with molecular formula C₃₃H₃₀O₁₁ and molecular weight of 602.59.

1. Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima entre 7 y 8 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi* en el mundo, principalmente en América Latina de los cuales 1.1 millones de casos corresponden a México. El parásito se encuentra principalmente en zonas endémicas de 21 países de América Latina, en donde se localiza el vector biológico, extendiéndose desde el Sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile (OMS 2020).

Sin embargo, en las últimas décadas la represión política y el estancamiento económico ha estimulado el flujo de migración de los países endémicos, convirtiéndose gradualmente en problema de salud global (Schmunis & Yadon 2010). En México, la urbanización progresiva de la población rural en la segunda mitad del siglo XX ha transformado a la enfermedad de Chagas en un importante problema social de salud urbana (OMS 2020).

Actualmente solo existen dos fármacos tripanosomicidas: Nifurtimox y Benznidazol, ambos controlados por la Secretaría de Salud (Sanabria-Calvo, 2015). Son fármacos tripanosomicidas para todas las formas del parásito, sin embargo pueden causar toxicidad sistémica y daño genético (Lopera-Valle *et al.* 2013; Maya *et al.* 2007).

La resistencia de *T. cruzi* contra Benznidazol y Nifurtimox, efectos secundarios y las pocas alternativas terapéuticas hacen de los productos naturales contenidos en extractos de plantas latinoamericanas, una importante fuente de nuevos compuestos con actividad tripanosomicida, representando un alternativa promisoría en el avance de nuevas y eficaces estrategias terapéuticas para la enfermedad de Chagas (Lopera-Valle *et al.* 2013; Monteón *et al.* 2009).

Los extractos metanólicos de *Haematoxylum brasiletto* han mostrado actividad biológica *in vitro* contra epimastigotes de dos cepas internacionales de *T. cruzi*, H6 (Abe *et al.* 2002) y CL Brener (Molina-Garza *et al.* 2014), así como contra una cepa local aislada de vectores triatomíneos provenientes del estado de Nuevo León, México (Pérez *et al.* 2017), sin embargo, no se ha logrado identificar el o los compuestos responsables de la actividad tripanosomicida.

2. Antecedentes

2.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas también conocida como Tripanosomiasis americana es un trastorno multisistémico que puede afectar el sistema cardiovascular, digestivo y el sistema nervioso central. Este padecimiento ha prevalecido a través del tiempo, de lo cual existe evidencia de ADN de su presencia desde hace más de 9000 años, encontrado en tejido de momias de la cultura precolombina de Los Andes que datan del año 7050 AC. Sin embargo, no fue hasta 1909, en Brasil, que su vector, curso clínico y agente etiológico fueron descubiertos y descritos por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (Echeverría & Morillo 2019).

La OMS estima que en el mundo hay entre 7 y 8 millones de personas infectadas por este parásito, la mayoría de América Latina, de los cuales 1.1 millones de casos corresponden a México. Se encuentra principalmente en zonas endémicas de 21 países de América Latina, en donde se localiza el vector biológico y se extiende desde el Sur de Estados Unidos, hasta Argentina y Chile (OMS 2020).

En las últimas décadas la represión política y estancamiento económico ha estimulado el flujo de migración de 17 de los 21 países endémicos convirtiéndose gradualmente en problema de salud global, observándose casos con mayor frecuencia en América del Norte, Japón, Australia y Europa (principalmente en Bélgica, España, Francia, Italia, Reino Unido y Suiza). Se ha estimado que hay una prevalencia de más de 300,000 individuos infectados en Estados Unidos, Canadá con más de 5,500, Europa con 80,000, Japón con 3,000 y Australia con 1,500 (Schmunis & Yadon 2010).

Estudios de la Dirección General de Epidemiología de México muestran que entre el 2007 y el 2016 hubo un incremento de casos en los Estados de Veracruz, Chiapas, Quintana Roo, Oaxaca, Morelos y Yucatán, con un total de 7,388 con proporción de 0.37 a 0.81 por cada 100,000 habitantes (Ibáñez *et al.* 2018).

2.2 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado miembro de la familia *Trypanosomatidae* (Phylum Euglenozoa - Clase Kinetoplastea). Presenta dos fases de desarrollo en el hospedero infectado: tripomastigote en sangre con longitud de 20 μm y amastigote intracelulares con un diámetro de 2 μm . También se presenta una fase multiplicativa en el vector, epimastigotes en el intestino de triatominos con un tamaño de 20 μm (Maya *et al.* 2007).

Se transmite al humano mediante la excreta de los triatominos al momento de alimentarse de sangre. El tripomastigote (forma infectiva de *T. cruzi*) ingresa en los humanos mediante las membranas mucosas o cortadas expuestas causadas al rascar la piel después de la picadura. Invade y se diferencia en la forma amastigote dentro de tejidos locales, especialmente hígado, intestino, bazo, ganglios linfáticos, sistema nervioso central, músculo cardíaco y esquelético. Al multiplicarse lisa las células de los tejidos y vuelven a la forma flagelada la cual invade los tejidos adyacentes dispersándose mediante el sistema linfático y circulatorio (Echeverría & Morillo 2019; Tyler & Engman 2003).

2.3 Transmisión vectorial

La enfermedad de Chagas es transmitida vectorialmente mediante los insectos triatominos, de la familia *Reduviidae*, orden *Hemiptera* (chinches), subfamilia *Triatominae*, también conocida como chinche besucona. Los vectores fueron identificados por primera vez en 1909 por Carlos Chagas (Rojo-Medina *et al.* 2018). En México, Hoffman (1928) reportó sobre la gran abundancia de *Triatoma dimidiata* en Veracruz, mientras que el doctor Luis Mazzoti en 1940 reportó los dos primeros casos reconocidos con enfermedad de Chagas (Velasco-Castrejón & Rivas-Sánchez 2008).

Estos insectos abundan en temporadas de primavera y verano debido a las condiciones favorables para su reproducción y desarrollo, suelen vivir en grietas, huecos de las paredes y los tejados de las casas en zonas rurales y suburbana, Suelen permanecer ocultos durante el día entrando en actividad

durante la noche, picando zonas expuestas de la piel y defecando cerca de la picadura (Rosal *et al.* 2018).

En México más del 96 % de los casos de transmisión es mediante vector, albergando una de las más diversas poblaciones de triatominos, con 39 especies documentadas en el país, y al menos 21 han sido reportados como portadores de *T. cruzi* (Carabarin-Lima *et al.* 2013).

En Nuevo León, Molina-Garza *et al.* (2007) resaltó la importancia de *Triatoma gerstaeckeri* como vector local, al obtener un 59.61 % de infección en vector mediante el uso de la técnica molecular PCR y del 51.92 % con técnica serológica ELISA. Así mismo en el (2014) demostró que existió un incremento de hasta diez veces en la prevalencia serológica específica para anticuerpos anti-*T. cruzi* al presentarse en un 1.93 % (52/2,688), predominando las comunidades suburbanas y rurales.

2.4 Transmisión secundaria

Otros mecanismos de transmisión no vectorial que también son importantes, especialmente en áreas no endémicas, incluyen transmisión vertical madre e hijo, trasplante de órganos, infecciones orales y transfusión de sangre; estos son los más problemáticos en áreas urbanizadas (Pereira-Nunes *et al.* 2013).

A pesar del inicio del examen serológico de donaciones de sangre o donantes para *T. cruzi* desde 1990 en la mayoría de los países de América latina, México finalmente solo incluyó el examen serológico obligatorio a nivel nacional en las Normas oficiales en 2012. Los cambios regulatorios y los servicios segmentados en México afectan el cumplimiento de estas pautas obligatorias de detección (Sánchez-González *et al.* 2016).

En México los porcentajes de prevalencia de la infección en mujeres embarazadas fueron de 7.32 % (106/1448) de casos en general. Oaxaca obtuvo un 4.4 % (35/794), Jalisco un 12.02 % (67/557) y la Ciudad de México un 4.12 % (4/97). En Oaxaca la infección de *T. cruzi* fue detectada en el 20 % (7/35) de los infantes nacidos de madres seropositivas y en 11.90 % (8/67) en Jalisco, mientras que en la ciudad de México no se encontraron casos. Por

lo tanto el rango de transmisión fue de 4.08 % (4/94) en Oaxaca y 9.1 % (3/33) en Jalisco (Jiménez-Cardoso *et al.* 2012).

Para determinar la magnitud de la enfermedad de Chagas en México, es recomendable un estudio amplio dentro de los grupos familiares de los donantes de sangre, ya que se han identificado casos de miembros seropositivos para *T. cruzi*, principalmente las parejas madre-hijo. En México, los porcentajes de transmisión de madre a hijo son de 0.8 %, 20 % y 11.90 % para los estados de Guanajuato, Oaxaca y Jalisco respectivamente, de las cuales al menos el 15.78 % de las madres tienen hijos seropositivos (Espinoza *et al.* 2019).

2.5 Tratamiento

La enfermedad de Chagas tiene dos fases diferenciadas: aguda y crónica. Ambas fases pueden ser asintomáticas y pasar desapercibidas por un periodo de tiempo largo, mostrando que un alto porcentaje de pacientes permanecen en forma indeterminada durante 10 o 30 años, e incluso de por vida. En México, gran parte de los casos crónicos asintomáticos son detectados en estudios epidemiológicos que van dirigidos principalmente a las áreas endémicas de Chagas (Echeverría & Morillo 2019).

Para el tratamiento de esta enfermedad actualmente solo existen dos fármacos tripanosomicidas: Nifurtimox y Benznidazol; ambos son controlados por la Secretaría de Salud y no existen comercialmente en ningún país. La duración del tratamiento recomendada es de 60 días y debe ser tratada en cualquiera de sus fases. La efectividad de los fármacos administrados en casos congénitos puede llegar a ser del 100 % si son tratados a tiempo, en fase aguda del 70 % al 75 % y en casos crónicos solo un 30 % tiene una probabilidad de curación (Sanabria-Calvo 2015).

Nifurtimox y Benznidazol son fármacos tripanosomicidas para todas las formas del parásito, sin embargo, pueden causar toxicidad sistémica y efectos adversos que incluyen anorexia, náuseas, vómito, dolores de cabeza, depresión del sistema nervioso central, ataques, vértigo, dermatitis,

mutagénesis y daño en el ADN humano (Lopera-Valle *et al.* 2013; Maya *et al.* 2007).

La vigilancia epidemiológica para la enfermedad de Chagas se ve limitada y retrasa el registro de casos debido a su complejidad; algunos factores o barreras que hacen difícil el acceso al tratamiento contra la tripanosomiasis en México son: el uso de un solo medicamento de segunda línea (Nifurtimox) proporcionado por el programa nacional desde 2009, problemas en la cadena de suministro de medicamentos y la exclusión del tratamiento dentro del paquete de intervenciones de salud del Seguro Popular a partir del 2012 (Manne *et al.* 2013).

2.6 El uso de plantas medicinales como alternativa:

Haematoxylum brasiletto

Factores como la resistencia de *T. cruzi* contra Benznidazol, los efectos secundarios y las pocas alternativas terapéuticas existentes en la actualidad, hacen de los extractos de plantas latinoamericanas una importante fuente de nuevos compuestos con posible actividad tripanosomicida, que permitan mejorar el perfil de seguridad y efectividad; además de ser económicamente accesibles, representan una alternativa promisoriosa en el avance de nuevas y eficaces estrategias terapéuticas para la enfermedad de Chagas (Lopera-Valle *et al.* 2013; Monteón *et al.* 2009).

Particularmente *H. brasiletto* es originario del norte de Granada en España y habita en climas cálidos, semicálidos, semiseco y templado. La especie se encuentra distribuida desde Sonora Central y Baja California, y al sur a lo largo de la costa oeste de México hasta Colombia y Venezuela (Johnson 1988). Dentro de los usos comerciales de *H. brasiletto* se incluye el uso del duramen para la extracción de colorantes para teñir algodón, lana y diversos productos farmacéuticos. Es altamente valorado para madera de aserrío. El fruto, cáscara y semillas se utilizan para la extracción de tintes, resinas, taninos para curtiduría, fibras para cuerdas, y extracción de pulpa de papel (CONAFOR 2020).

Los usos etnobotánicos de *H. brasiletto* datan del siglo XVI descritos dentro del Códice Florentino el cual menciona que algunas de las partes de *H. brasiletto* eran utilizadas para combatir fiebres, posteriormente en el siglo XVIII Juan de Esteyneffer refiere su uso contra la ictericia (Artschwager Kay 1977). El uso de la corteza y madera de *H. brasiletto* es el principal recurso para tratar padecimientos cardiovasculares. Se aconseja el uso para fortalecer la “sangre débil” debido a una mala nutrición que se manifiesta con anemia y manchas blancas. De la misma manera se emplea en malestares renales y digestivos como derrame de bilis, dolor de estómago, mal de dientes, úlcera gástrica y en dolor de bazo (BDMTM 2020). Dentro de la medicina tradicional de La Paz en Baja California, la infusión de *H. brasiletto* es preparada junto con nuez moscada y siete diferentes tipos de flores de cítricos, como remedio para controlar la presión sanguínea y circulación (Encarnación-Dimayuga & Agundez 1986).

2.7 Actividad bactericida de *Haematoxylum brasiletto*

Por otra parte, los primeros ensayos para determinar la actividad antimicrobiana de *H. brasiletto* se realizaron utilizando un extracto etanólico contra tres variedades de *Brucella* (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*), *Shigella flexneri* y *Staphylococcus aureus*. Durante el proceso se logró aislar el compuesto brazilina, concluyendo que la actividad biológica estaba mediada por el mismo (Sánchez-Marroquin *et al.* 1958).

El extracto acuoso de los tallos de *H. brasiletto* presentó actividad antimicrobiana contra *Salmonella typhi*, *Micrococcus pyogenes var. aureus* y *Escherichia coli*; no se descarta la posibilidad de que la actividad biológica está relacionada a las estructuras fenólicas de brazilina y hematoxilina o a los productos resultantes de su oxidación (brazileina y hemateina). Es posible que existan isómeros indistinguibles por espectrofotometría y cromatografía (Pratt & Yuzuriha 1959).

La caracterización de la brazilina se realizó mediante el análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear, la cual se comparó estructuralmente con el compuesto hematoxilina y se determinó la presencia

de un grupo hidroxilo adicional en hematoxilina. La rotación óptica presentó una estereoquímica idéntica en ambos compuestos (Cymerman Craig *et al.* 1965).

A partir de un extracto metanólico de la corteza de *H. brasiletto* y mediante una serie de diversas técnicas cromatográficas y espectroscópicas (¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, COSY, HMQC, HMBC, UV e IR), se obtuvo como resultado el aislamiento de la brazilina, hematoxilina y seis compuestos que no habían sido reportados para *H. brasiletto*: ácido cafeico, galato de metilo, ácido gálico, floroglucinol, ácido 4-hidroxicinámico y 5- metoxipsoraleno (Martínez-Luna 2001).

Haematoxylum brasiletto H. Karst. (Fabaceae) ha sido presentada como una alternativa contra las bacterias resistentes a antibióticos, al mostrar alta efectividad antimicrobiana contra *S. aureus* susceptible a meticilina y *S. aureus* resistente a meticilina (Yasunaka *et al.* 2005).

Contra *Vibrio cholera* 01 y 0139 (un microorganismo entérico) el extracto etanólico obtenido de la corteza de *H. brasiletto* presentó una concentración mínima inhibitoria de 0.30 a 0.40 mg/mL, que afectó la viabilidad del microorganismo y la producción de la toxina colérica (García *et al.* 2005).

Haematoxylum brasiletto ha reportado actividad contra la enterobacteria *Escherichia coli* O157:H7, demostrando efecto contra el crecimiento, adhesión y producción de la verotoxina de *E. coli*. Análisis cromatográficos permitieron purificar la fracción con actividad antimicrobiana, la cual se sometió a análisis espectroscópicos (RMN, COSY) demostrando la presencia de polifenoles que difieren de los ya reportados, tales como brazilina o brazileina (García *et al.* 2005).

La expresión de los genes de virulencia en *E. coli* enteroagregativa (EAEC 042) y *E. coli* hemorrágica (EHEC O157:H7) se vio reducida al determinar la actividad de un extracto etanólico de *H. brasiletto* y su compuesto principal brazilina que se obtuvo de manera comercial (García *et al.* 2016).

Los compuestos de *H. brasiletto*, aislados e identificados mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas por Martínez-Luna (2001), se probaron

contra tres variedades de *Staphylococcus aureus* (375, 310 y ATCC25923), *Enterococcus faecium* 379, *Bacillus subtilis* 327, *Escherichia coli* (442 y ATCC25922), *Klebsiella pneumonia* 422, *Pseudomonas aeruginosa* 339, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, incluida la levadura *Candida albicans* 54, reportando actividad antimicrobiana de cada uno contra 8 microorganismos de 12 (Rivero-Cruz 2008).

Las enfermedades periodontales y las caries son las principales patologías dentales que afectan a la humanidad, las cuales están influenciada por la formación de placa, originada por la presencia de bacterias. Rosas-Piñón (2012) confirmó la actividad antimicrobiana de *H. brasiletto* demostrada por Rivero-Cruz (2008) contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Este trabajo fue tomado en cuenta como uno de los principales en el uso de compuestos naturales contra el manejo de infecciones orales y mejora de la salud dental (Chinsebu 2016).

2.8 Actividad anti-protozoaria de *Haematoxylum brasiletto*

La actividad anti protozoaria, de *H. brasiletto* fue demostrada a partir de un extracto metanólico, el cual presentó actividad biológica contra trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, con un 80 % de inhibición en el crecimiento del parásito (Quintanilla-Licea *et al.* 2014).

Dentro de una serie de extractos de plantas obtenidos mediante metanol, metanol-cloruro de metileno y acetato de etilo, el extracto metanólico de *Haematoxylum brasiletto* mostró actividad biológica al inhibir el crecimiento de *T. cruzi* al 100 % a una concentración de 2 mg/mL y del 80-90 % con concentraciones de 1 mg/mL, contra una concentración de 2×10^6 epimastigotes/mL (Abe *et al.* 2002).

Dentro de los estudios de plantas medicinales contra *T. cruzi*, *H. brasiletto* ha sido destacado dentro de una bioprospección general de las drogas potencialmente tripanosomicidas entre los años 2000 al 2010 (Muschiatti *et al.* 2013).

De un estudio de 10 plantas medicinales para determinar su actividad tripanosomicida, el extracto metanólico de *H. brasiletto* fue uno de los extractos con mayor actividad biológica al presentar una concentración inhibitoria media de (IC₅₀) de 7.92 µg/mL contra epimastigotes de *T. cruzi* (CL Brener) (Molina-Garza *et al.* 2014).

En estudios posteriores *H. brasiletto* presentó actividad inhibitoria del 90 % (de 1 mg/mL) con una IC₅₀ de 0.543 mg/mL. contra una concentración de 1.5×10^6 epimastigotes/mL de *T. cruzi*, aislado de vectores triatomínos provenientes del estado de Nuevo León, México (Pérez *et al.* 2017).

2.9 Compuestos aislados de *H. brasiletto*

Hasta ahora se ha reportado para *H. brasiletto* ocho metabolitos los cuales están integrados por hematoxilina, brazileína, ácido cafeico, Galato de metilo, ácido gálico, floroglucinol, ácido 4-hidroxicinámico (ácido p-cumárico) y 5-metoxypsoraleno (bergapteno). Los compuestos mencionados fueron probados contra bacterias, sin embargo, no se ha determinado la actividad biológica de cada uno de ellos contra *T. cruzi* (Rivero-Cruz, 2008).

3. Justificación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el mundo existen entre 7 y 8 millones de personas infectadas con *Trypanosoma cruzi* (protozoo causante de la enfermedad de Chagas), de los cuales alrededor de 6 millones son correspondientes de América latina, 1.1 millones de los casos corresponden a México y el resto en menor proporción se encuentra dividido entre EUA y los continentes de Europa y Asia, que se han visto afectados principalmente por el flujo de migración de personas infectadas.

En México a pesar de que se han tomado medidas de control preventivas contra los principales vectores, los insectos triatomíneos, la urbanización progresiva de las poblaciones rurales endémicas, la falta de control sobre inmigrantes y las vías de transmisión secundarias han transformado a la enfermedad de Chagas en un problema social de salud urbana. Así mismo la falta de recursos económicos y la detección tardía de la enfermedad al no presentar una patología en corto plazo han sido un factor para catalogar a la enfermedad de Chagas como una de las principales enfermedades desatendidas u olvidadas.

Actualmente como tratamiento solo se cuenta con Nifurtimox y Benznidazol, dos medicamentos que a pesar de existir un problema de desabasto por parte de la Secretaría de Salud estos cuentan con una serie de efectos secundarios perjudiciales para la salud humana, que pueden llegar a causar toxicidad sistémica y daño genético.

Debido a las pocas alternativas terapéuticas y a la creciente necesidad de obtener nuevos compuestos con actividad tripanosomicida, este estudio se centra en el aislamiento, purificación e identificación de metabolitos secundarios presentes en extractos de *Haematoxylum brasiletto* contra el parásito *T. cruzi*, representando una alternativa promisorio en el avance de nuevas y eficaces estrategias terapéuticas contra la enfermedad de Chagas.

4. Hipótesis

Los compuestos presentes en los extractos metanólicos y acuosos de *Haematoxylum brasiletto* presentan actividad biológica contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Realizar un aislamiento biodirigido de los compuestos presentes en los extractos metanólicos y acuosos de *Haematoxylum brasiletto*, responsables de la actividad antiparasitaria contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

5.2 Objetivo particulares

- Obtener extractos metanólicos y acuosos de *H. brasiletto* por medio de la técnica de extracción Soxhlet y por maceración
- Evaluar la actividad tripanosomicida de los extractos obtenidos de *H. brasiletto*.
- Realizar fraccionamiento biodirigido por medio de cromatografía en columna del extracto de *H. brasiletto* que presente la mayor inhibición contra epimastigotes de *T. cruzi*.
- Aislar y purificar compuestos con actividad tripanosomicida por medio de técnicas cromatográficas y determinar la estructura de los compuestos bioactivos aislados empleando técnicas espectroscópicas como ^1H -RMN, ^{13}C -RMN de una dimensión (1D) y de 2D (COSY; HSQC, HMBC y NOESY).

6. Material y métodos

6.1 Extractos

6.1.1 Obtención de material vegetal

La corteza de *Haematoxylum brasiletto* fue adquirida de manera comercial en la tienda PACALLI ubicada en Monterrey, Nuevo León, México. Una muestra de la planta fue depositada en el herbario del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en donde se le asignó un número de identificación (30645).

6.1.2 Extracción Soxhlet metanólica

Se utilizaron 25 g de material vegetal los cuales se colocaron en un cartucho de celulosa dentro del extractor Soxhlet. Como solvente de extracción se utilizaron 500 mL de metanol mismo que se llevó a punto de ebullición de 65 °C con el uso de una manta térmica. La extracción se inició al condensar el solvente dentro del extractor Soxhlet, la cual se mantuvo durante 48 h (Sarker *et al.*, 2006). Terminado el tiempo de extracción se dejó enfriar el extracto a temperatura ambiente y se filtró con papel filtro Whatman N° 1. El concentrado del extracto se realizó en un rotavapor Yamato modelo RE301/VR300 llevándolo a un volumen final de 40 mL. El extracto se pasó a un frasco previamente pesado y se finalizó la concentración en un desecador de vidrio a vacío.

6.1.3 Extracción Soxhlet acuosa

Se utilizaron 25 g de material vegetal los cuales se colocaron en un cartucho de celulosa dentro del extractor Soxhlet. Como solvente de extracción se utilizaron 500 mL de agua destilada misma que se llevó a punto de ebullición de 100 °C con el uso de una manta térmica. La extracción se inició al condensar el solvente dentro del extractor Soxhlet la cual se mantuvo durante 10 ciclos de recirculación (Sarker *et al.*, 2006). El extracto se enfrió a temperatura ambiente, se filtró con papel filtro Whatman N° 1 y se distribuyó en seis vasos de precipitado. El extracto acuoso se almacenó en congelación en un ultracongelador Thermo Scientific modelo TSU300D a una temperatura de -80 °C en un durante 24 h y posteriormente se liofilizó en un equipo

Benchtop Pro/SP Scientific. El extracto liofilizado se recuperó en un frasco previamente pesado.

6.1.4 Extracción por maceración con metanol

Se utilizaron 25 g de material vegetal los cuales se añadieron a 500 mL de metanol utilizando un matraz bola de capacidad de 1 L. La extracción se mantuvo aislada de la luz, a temperatura ambiente y en agitación constante utilizando un agitador magnético durante 72 h (Azmir *et al.*, 2013). Terminado el tiempo de extracción se filtró con papel filtro Whatman N° 1. El concentrado del extracto se realizó en un rotavapor Yamato modelo RE301/VR300 llevándolo a un volumen final de 40 mL. El extracto se pasó a un frasco previamente pesado y se finalizó la concentración en un desecador de vidrio a vacío.

6.1.5 Extracción por maceración con agua

Se añadieron 500 mL de agua destilada en un matraz bola de 1 L. Se utilizó una manta térmica el solvente se calentó a punto de ebullición de 100 °C y se retiró de la fuente de calor. Al solvente se le añadió 25 g de material vegetal y se inició la extracción manteniéndose en agitación durante 30 min (Azmir *et al.*, 2013). El extracto se enfrió a temperatura ambiente, se filtró con papel filtro Whatman N° 1 y se distribuyó en seis vasos de precipitado. El extracto acuoso se almacenó en congelación en el ultracongelador a una temperatura de -80 °C durante 24 h y posteriormente el extracto liofilizado se recuperó en un frasco previamente pesado.

6.2 Pruebas cualitativas fitoquímicas

Se realizó un screening fitoquímico del extracto metanólico de *H. brasiletto* para analizar los tipos de compuestos orgánicos de manera cualitativa. El extracto se analizó bajo el estándar químico (Tabla 1) descrito por Shaik y Patil (2020) para determinar cumarinas, sesquiterpenos, quinonas, taninos, saponinas, esteroides, carbohidratos, flavonoides y alcaloides.

Tabla 1. Descripción de las pruebas fitoquímicas utilizadas.

Metabolito	Prueba	Prueba positiva
Cumarinas	NaOH 10 %	Color amarillo
Sesquiterpenos	Baljet	Cambio color rosa
Quinonas	H ₂ SO ₄	Cambio color naranja
Taninos	FeCl ₂	Coloración oscura
Saponinas	Fuerza mecánica	Formación espuma
Esteroides	Lieberman Burchard	Cambio de coloración rosa
Flavonoides	Shinoda	Coloración rojiza- naranja
Alcaloides	Dragendorff	Coloración naranja en cromatografía
Carbohidratos	Antrona	Formación de anillo azul oscuro

6.3 Pruebas biológicas

6.3.1 Ensayo *in vitro* de la actividad tripanosomicida de los extractos

Los cultivos axénicos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* se mantuvieron en conservación en medio LIT suplementado con suero fetal 10 %, y fueron incubados a una temperatura de 27 °C hasta obtener una densidad celular de 1.5×10^6 epimastigotes/ mL durante su fase exponencial.

Se preparó una solución madre de cada extracto o fracción de 12 mg, disueltos en DMSO 1 %. Los ensayos biológicos se realizaron por triplicado utilizando una placa de 96 pozos ELISA, con 200 μ L de la solución medio (parásitos) y extracto a concentraciones de 600 μ g/mL, 300 μ g/mL, 150 μ g/mL, 75 μ g/mL, 37.5 μ g/mL y 18.75 μ g/mL.

Se utilizó Nifurtimox (Sigma Aldrich, Cat. 45-N3415) a una concentración de 10 ng/mL como control positivo; como control negativo se utilizó DMSO

5 % y metanol como control extra. Como control blanco se utilizó medio de cultivo sin parásitos (Muelas-Serrano *et al.*, 2000).

La viabilidad de los parásitos se evaluó mediante el método colorimétrico de MTT (Sigma Aldrich, Cat. 45-M2128). Se agregaron 10 µL de solución MTT/buffer fosfatos pH 7.2 (0.5 mg/mL) en cada pocillo de las diferentes concentraciones retadas contra el parásito y se incubó a 27 °C durante 75 min y posteriormente se realizó la extracción del formazan con SDS 10 % disuelto en HCl 0.01 N, y se incubó durante 30 min (Muelas-Serrano *et al.*, 2000).

El número de epimastigotes vivos se determinó por el valor de la absorbancia (DO) en un lector de placas Biochrome (ASYS-UVM 340 HD, Cambridge, UK) a 570 nm. Los resultados se expresaron como la concentración letal 50 (CL₅₀), que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50 % de muerte celular (Muelas-Serrano *et al.*, 2000).

6.3.2 Ensayo de toxicidad en *Artemia salina*

Se expusieron grupos de metanauplios con 48 h de eclosión a las concentraciones de 1,000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL y 100 µg/mL durante 24 h a temperatura ambiente y luz continua. Se prepararon placas de 96 pozos y se añadió a cada uno 200 µL de agua salina con extracto de levadura y la dilución de extracto correspondiente, posteriormente se transfirieron 10 larvas a cada pozo. Al finalizar las 24 h de exposición, se contabilizó el número de organismos muertos y se realizó una regresión Probit. Las larvas se consideraron muertas si no exhibían movimiento durante varios segundos de observación al microscopio estereoscopio. El experimento se consideró válido si el porcentaje de mortalidad en los controles no excedió de 10 % (Balinado & Chan, 2019).

6.3.3 Actividad hemolítica

Mediante una donación voluntaria se recolectó sangre tipo O + en tres tubos al vacío con heparina. La sangre se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 min en una centrifuga (BECKMAN COULTER, Allegra X-12R) para separar el plasma de los eritrocitos. Retirado el plasma se continuó con cinco lavados de los eritrocitos a una concentración 1:1 utilizando una solución buffer de fosfatos pH 7.4, durante cada lavado retiró el buffer centrifugando los tubos a 1,000 rpm durante 5 min. Este proceso se repitió hasta que la solución buffer no presentara coloración.

Para el ensayo de hemólisis se trabajó con una solución al 5 % de eritrocitos/ buffer pH 7.40; la solución se obtuvo al añadir 1 mL de eritrocitos sin plasma (previamente tratados) en 19 mL de buffer pH 7.4. Se pesaron 50 mg de cada uno de los extractos en un vial de vidrio utilizando una balanza analítica; los extractos metanólicos se diluyeron en 1 mL de metanol destilado y los extractos acuosos se diluyeron utilizando 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.40.

Por extracto, se realizaron pruebas por triplicado en microtubos Eppendorf de 1.50 mL para cada una de las concentraciones de 1,000 µg/mL, 800 µg/mL, 600 µg/mL, 400 µg/mL y 200 µg/mL. Como blancos se utilizaron los extractos metanólicos y acuosos en buffer de fosfatos sin añadir solución de eritrocitos al 5 %.

Las muestras se cubrieron con papel aluminio y se incubaron a 37 °C durante 30 min en una incubadora (BINDER), terminado el tiempo de incubación las muestras se sacaron y se mantuvieron en refrigeración a -4 °C durante 10 min y posteriormente se centrifugaron en una centrifuga (SPECTRAFUGE 16M) durante 5 min a 13,000 rpm. La lectura de las absorbancias se realizó colocando la placa de 96 pozos sin tapa en un lector de placas Biochrome (ASYS-UVM 340 HD) a 540 nm.

Se consideraron como no hemolíticos a los extractos que presentaron un porcentaje de hemólisis menor de 10 % a 1000 µg/mL (Martínez *et al.*, 2013; Alonso-Geli *et al.*, 2015).

6.4 Aislamiento biodirigido

6.4.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

El rastreo de metabolitos presentes en los extractos y las fracciones obtenidas se realizó utilizando cromatografía en capa fina. Se utilizaron placas de sílica gel en soporte de vidrio (TLC Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck). Se realizó una elución mediante una fase móvil (v/v) de acetato de etilo: agua: ácido fórmico (9.4:0.3:0.3). El revelado de la cromatoplaqueta se realizó en luz visible, en luz ultravioleta de longitud de onda corta (UV 254 nm), longitud de onda larga (365 nm) y en vapores de yodo (Sarker *et al.*, 2006).

6.4.2 Partición preliminar de extractos por polaridad en equipo Soxhlet

Los extractos obtenidos se pulverizaron y se pesaron en un cartucho de celulosa, el cual se colocó dentro de un extractor Soxhlet. Se utilizó 500 mL de hexano como solvente inicial de polaridad baja, mismo que se sometió a punto de ebullición y se mantuvo una extracción durante 24 h. Posteriormente sin extraer el cartucho de celulosa se cambió el matraz bola utilizando 500 mL cloroformo como solvente de polaridad media en una extracción de 24 h. Finalmente se utilizó 500 mL de metanol el cual se mantuvo durante 24 h completando la partición.

6.4.3 Fraccionamiento por columna de Sephadex

Se realizó un fraccionamiento por exclusión molecular (Sarker *et al.*, 2006) de la partición con mejor actividad, utilizando una columna de vidrio de 1.5 m utilizando 40 g de Sephadex como fase estacionaria suspendida en metanol. Las eluciones se realizaron utilizando metanol 100 %, a un flujo de 20 gotas por min, recolectando fracciones de 2.5 mL. Las fracciones similares se analizaron mediante CCF y se mezclaron en fracciones colectivas en frascos previamente pesados.

6.4.4 Fraccionamiento por columna de sílica gel fase reversa

Los compuestos presentes en las fracciones colectivas se procesaron en columnas de sílica gel fase reversa para una separación por polaridad (Sarker *et al.*, 2006). Se utilizó una columna de vidrio de 40 cm y 15 g de fase

estacionaria suspendida en metanol. Las eluciones se realizaron utilizando metanol 100 %, a un flujo de 20 gotas por min, recolectando fracciones de 2.5 mL. Las fracciones similares se analizaron mediante CCF y se mezclaron en fracciones colectivas en frascos previamente pesados.

6.5 Análisis estadístico

Se hizo uso del análisis de regresión lineal Probit, se analizó la relación dosis-respuesta obtenida de los ensayos biológicos y se calculó la concentración letal 50 (CL₅₀) de los extractos y fracciones analizadas (Lei & Sun, 2018). El análisis se realizó utilizando la función Probit del programa estadístico IBM SPSS Statistics Version 25.0. Para determinar si existe diferencia significativa entre los métodos utilizados ($P < 0.05$ %) seguido por la prueba de comparación múltiple de Tuckey con un nivel de significancia menor al 5 % para los análisis realizados.

6.6 Análisis espectrométrico y espectroscópico de los compuestos con actividad tripanosomicida

Una vez determinada la actividad tripanosomicida el compuesto aislado con mejor actividad, se sometió a un análisis espectroscópico y espectrométrico, lo cual nos ayudó a determinar la estructura del compuesto. Para el desarrollo de esta investigación se empleó un equipo VARIAN INOVA-600 para la obtención de espectros de RMN a 600 MHz de protones (¹H-RMN) y de carbono-13 (¹³C-RMN) y un equipo Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer para los espectros de Masas.

7. Resultados

7.1 Extracciones

De las extracciones iniciales de 25 g (Fig.1) se obtuvieron los rendimientos y se determinó el porcentaje de inhibición a 150 µg/mL (Tabla 2) y se realizó la comparación en cromatografía de capa fina para determinar el perfil de compuestos presentes (Fig. 2).



Figura 1. Extractos de *H. brasiletto*.

Tabla 2. Resultados de extractos iniciales de 25 g.

Extracción	Rendimiento	<i>Trypanosoma cruzi</i> inhibición a 150 µg/mL
Metanólica Soxhlet (SxM)	15.20 %	88.62 % *
Acuosa Soxhlet (SxAq)	10.28 %	76.50 %
Metanólica maceración (McM)	10.26 %	71.69 % *
Acuosa maceración (McAq)	5.04 %	76.53 %

* Diferencia significativa (alfa = 0.05)

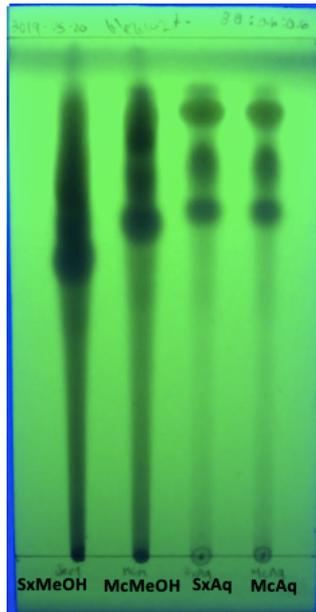


Figura 2. Comparación en CCF de las extracciones de 25 g (UV 254 nm).

De las extracciones realizadas a partir de 100 g, el extracto metanólico obtuvo un rendimiento de 14.57 % de extracción, mayor en comparación con el 5.63 % obtenido del extracto acuoso. La actividad biológica contra *T. cruzi*, *Artemia salina*, así como la capacidad hemolítica se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados de extracciones de 100 gr.

Extracción	Rendimiento	<i>Trypanosoma cruzi</i> CL₅₀ (µg/mL)	<i>Artemia salina</i> CL₅₀ (µg/mL)	Capacidad hemolítica CH₅₀ (µg/mL)
Metanólica Soxhlet (SM) 100 g	14.57 %	229.4*	>1000	>1000
Acuosa maceración (MA) 100 g	5.63 %	121.01*	>1000	>1000

* Diferencia significativa (alfa = 0.05)

Como resultado de las pruebas cualitativas fitoquímicas se identificó la presencia de sesquiterpenos, quinonas, taninos, carbohidratos y flavonoides (Tabla 4), mientras que el análisis de los extractos en cromatografía en capa nos demostró que ambos extractos presentan un perfil similar de compuestos (Fig. 3).

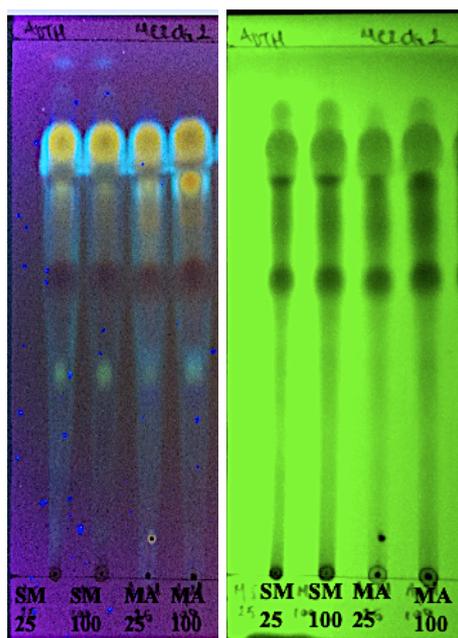


Figura 3. Comparación entre extracciones de 25 g y 100 g (revelado UV 365 y 254 nm).

Tabla 4. Evaluación fitoquímica de *H. brasiletto*.

Metabolito Secundario	Resultado
Cumarinas	-
Sesquiterpenos	+
Quinonas	+
Taninos	+
Saponinas	-
Esteroles	-
Carbohidratos	+
Flavonoides	+
Alcaloides	-

(+) Presencia (-) Ausencia

7.2 Fraccionamiento

Se realizó un proceso de partición de un total de 39 g de extractos (acuosos y metanólicos) en los cuales se utilizó hexano, cloroformo y metanol para hacer una separación preliminar de los componentes del extracto en base a su polaridad (fig. 4). Para las particiones metanólica, clorofórmica y hexánica se obtuvo una CL_{50} de 107.899 $\mu\text{g/mL}$, 123.728 $\mu\text{g/mL}$ y 419.934 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de particiones del extracto crudo.

Partición	Rendimiento	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Hexano	1.11 %	419.934*
Cloroformo	0.50 %	123.728*
Metanol	94.59 %	107.899*

* Diferencia significativa (alfa = 0.05)

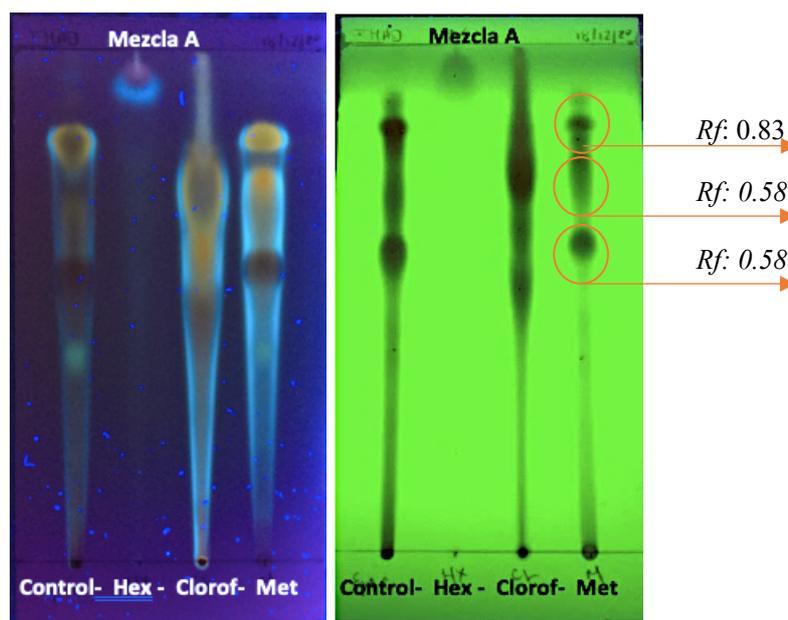


Figura 4. CCF de las particiones (revelado UV 365 y 254 nm).

Se tomó 500 mg de la partición metanólica y se fraccionó en columna de sílica gel de 20 g de fase normal, se obtuvieron dos fracciones colectivas (FC1 y FC2) de la cual FC1 presentó la mejor actividad con una CL_{50} de 311.85 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 6), así como la presencia mayoritaria de compuestos (Fig. 5) con los siguientes R_f : 0.619, 0.738, 0.810, 0.845.

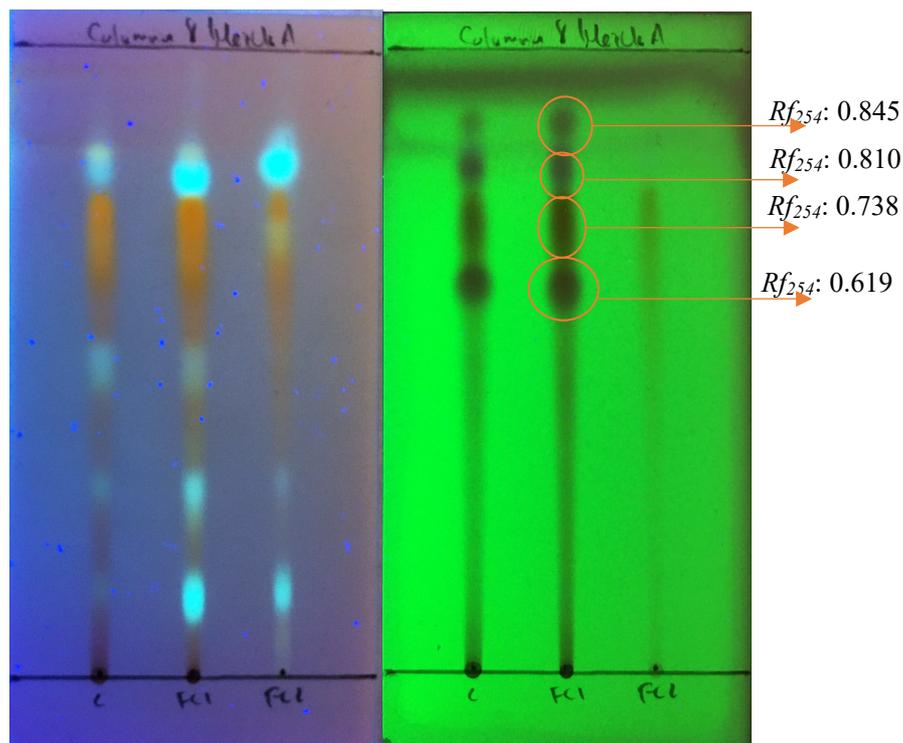


Figura 5. CCF de las particiones (revelado UV 365 y 254 nm)

Tabla 6. Fracciones colectivas de la columna de sílica fase normal.

Fracciones colectivas	Rango de fracciones	Rendimiento (mg)	CL ₅₀ (µg/mL)
FC1	5-8	469	311.85*
FC2	9-28	22	448.139*

* Diferencia significativa (alfa = 0.05)

Se realizó una serie de 20 columnas cromatográficas de 1 g de partición metanólica en el cual se repitió el proceso de fraccionamiento con sílica gel fase normal hasta obtener 15 mg de FC1. El conjunto de fracciones FC1 se diluyó y se filtró previamente a su fraccionamiento. Del filtrado se logró recuperar un sólido (Fig. 6) color oscuro (parcialmente soluble en metanol).



Figura 6. Sólido obtenido de filtrado.

Del stock de FC1 se tomó 1 g y se fraccionó en columna de Sephadex de la cual se obtuvo 8 fracciones colectivas en total, de las cuales solo se analizaron las que obtuvieron mejor rendimiento (Tabla 6).

Tabla 7. Fracciones colectivas de la columna de Sephadex.

Fracciones colectivas	Rango de fracciones	Rendimiento (mg)	CL ₅₀ (µg/mL)
FC1S	17-24	16	-
FC2S	25-30	12	-
FC3S	31-34	13	-
FC4S	35-38	70	1895.1 *
FC5S	39-44	176	520.47 *
FC6S	45-47	15	-
FC7S	48-68	44	267.12 *
FC8S	69-100	127	364.7 *

- No se determinó actividad por poco rendimiento; * Diferencia significativa (alfa = 0.05)

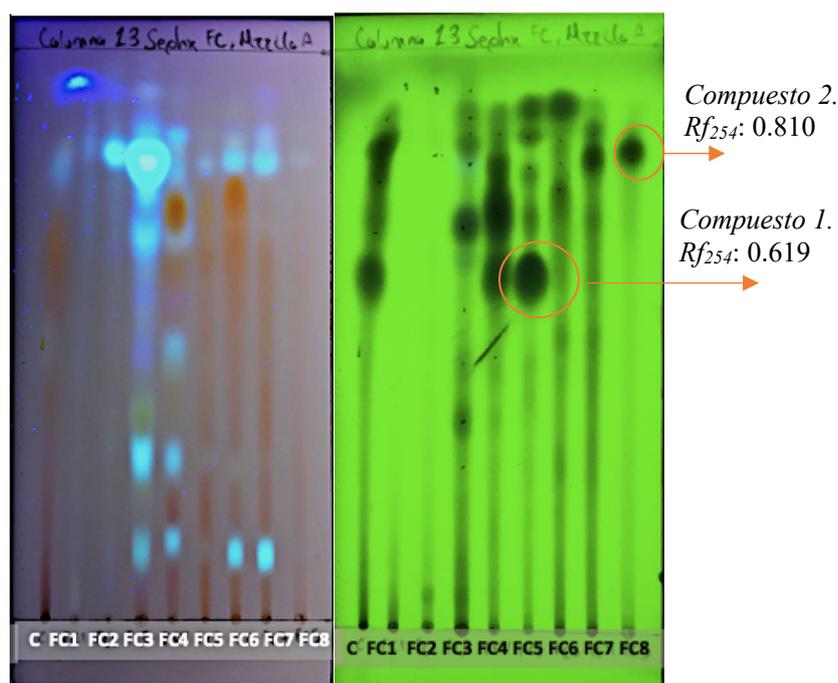


Figura 7. CCF fracciones colectivas Sephadex (revelado UV 365 y 254 nm).

Se continuó el fraccionamiento con la fracción FC5S (Fig. 6) que mostró un rendimiento mayor a 100 mg y la presencia de un compuesto mayoritario (R_f : 0.619). La fracción se sometió a fraccionamiento en columna de sílica gel

fase reversa, de la cual se logró obtener 5 fracciones colectivas y la purificación de un compuesto presente en la fracción FC2R el cual se denominó **Compuesto 1 (C1)**. Este compuesto presentó un R_f de 0.619 (Fig. 8) y una CL_{50} de 5.84 $\mu\text{g/mL}$ (T7).

Tabla 8. Fracciones colectivas de la columna de sílica gel fase reversa.

Fracciones colectivas	Rango de fracciones	Rendimiento (mg)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
FC1R	1-5	7	-
FC2R	6-8	18	5.84
FC3R	9-11	89	**
FC4R	12	5	-
FC5R	13-20	5	-

- No se determinó actividad por poco rendimiento
 **Muestra utilizada para fraccionamiento

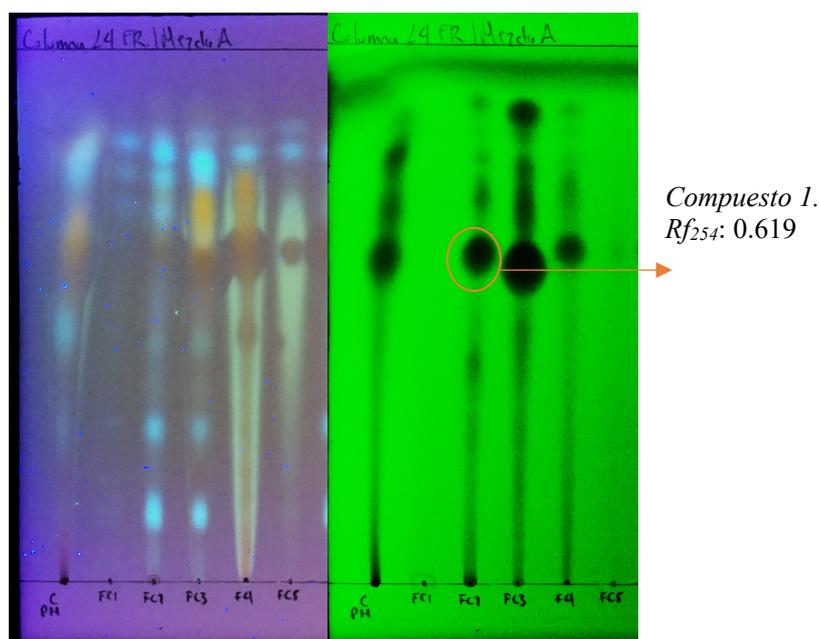


Figura 8. CCF fracciones colectivas sílica gel fase reversa (revelado UV 365 y 254 nm).

El segundo compuesto purificado se obtuvo de la fracción colectiva FC8S, este aislado se nombró **Compuesto 2 (C2)** y presentó un R_f de 0.810 (Fig. 7) y una CL_{50} de 364.70 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 6).

Un tercer compuesto, denominado **Compuesto 3 (C3)** se encuentra presente en el sólido obtenido del filtrado de la fracción colectiva 1 (Fig. 6). Este

compuesto presentó un R_f de 0.774 (Fig. 9) y una CL_{50} de 321.30 $\mu\text{g/mL}$ (Tabla 8).

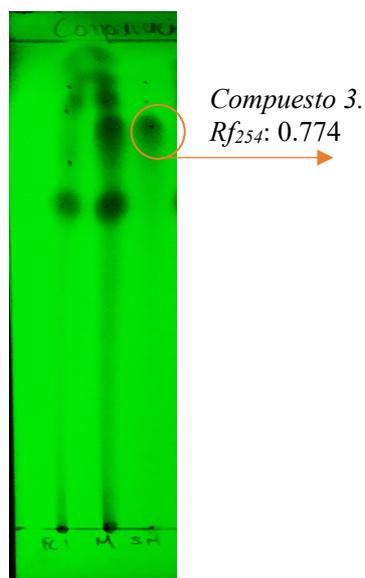


Figura 9. Comparación entre FC1 y sólido obtenido (SM).

7.2.1 Porcentajes de inhibición de los compuestos obtenidos

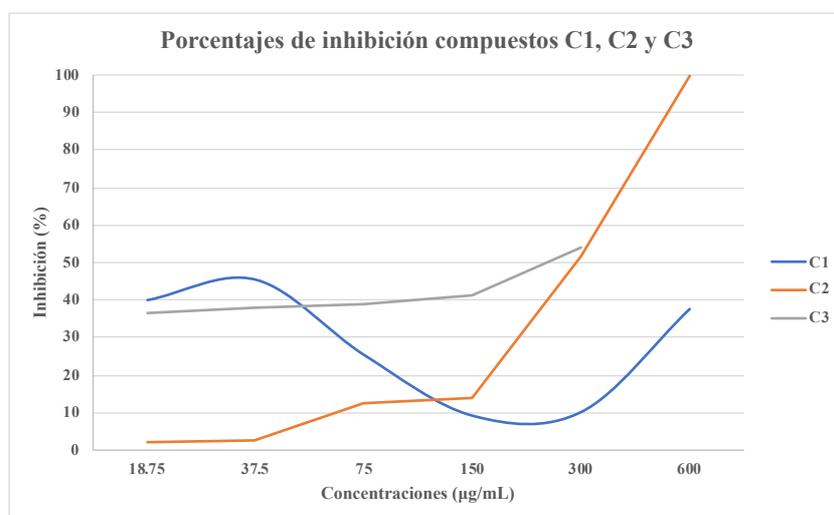


Figura 10. Porcentajes de inhibición compuestos aislados.

Tabla 9. Compuestos aislados.

Fracciones colectivas	Rendimiento (mg)	R_f	CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
C1	18	0.810	5.84*
C2	127	0.619	364.70*
C3	280	0.774	321.30*

* Diferencia significativa ($\alpha = 0.05$)

7.3 Análisis espectroscópico del compuesto C1

7.3.1 Análisis de espectrometría de masas

En la Figura 11 se muestra un espectro de alta resolución por el método de ionización por electrospray (HR-ESI-MS) en el cual se puede observar el aducto del ion molecular con un protón $[M+H]^+$ a m/z de 305.10197, así como los aductos $[M+NH_4]^+$ a m/z de 322.12851, $[M+Na]^+$ a m/z de 327.08391 y $[M+K]^+$ a m/z de 343.05785. Esto permite la identificación del peso del compuesto al restar el peso del protón y del ion sodio respectivamente obteniendo una masa de 304.1 uma.

La detección de cationes (Fig.12) y aniones (anexo 2) por medio del espectro de masas (ESI-MS) permite confirmar la masa del compuesto al presentar el aducto $[M+Na]^+$ a m/z de 327.1 y el aducto $[2M+Na]^+$ a m/z de 630.9. Por lo tanto, se propone la fórmula molecular para C1 de $C_{16}H_{16}O_6$. Sin embargo, de igual manera se observan dos aductos para un segundo ion molecular de $[M_2+Na]^+$ a m/z de 357.1 y $[M_1+M_2+Na]^+$ a m/z de 661.9 (Fig. 12). Calculando una masa de 334.1 uma, para el segundo ion molecular. Esto puede ser debido a una posible fragmentación secundaria.

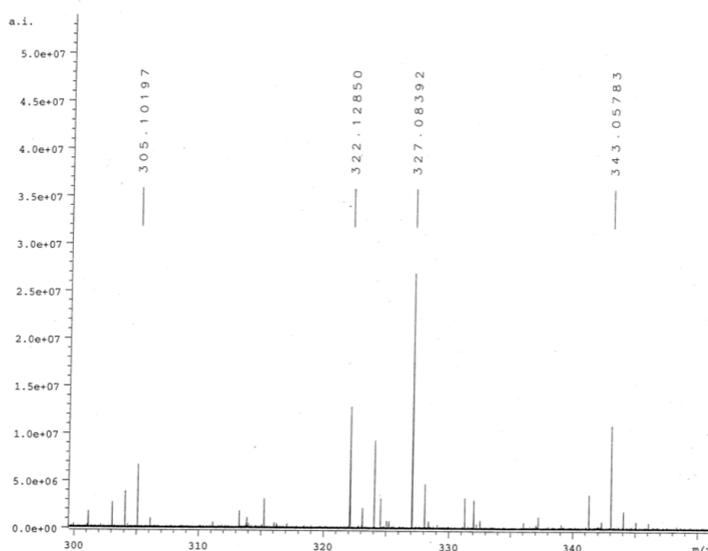


Figura 11. Espectro de masas HR-ESI-MS del compuesto C1.

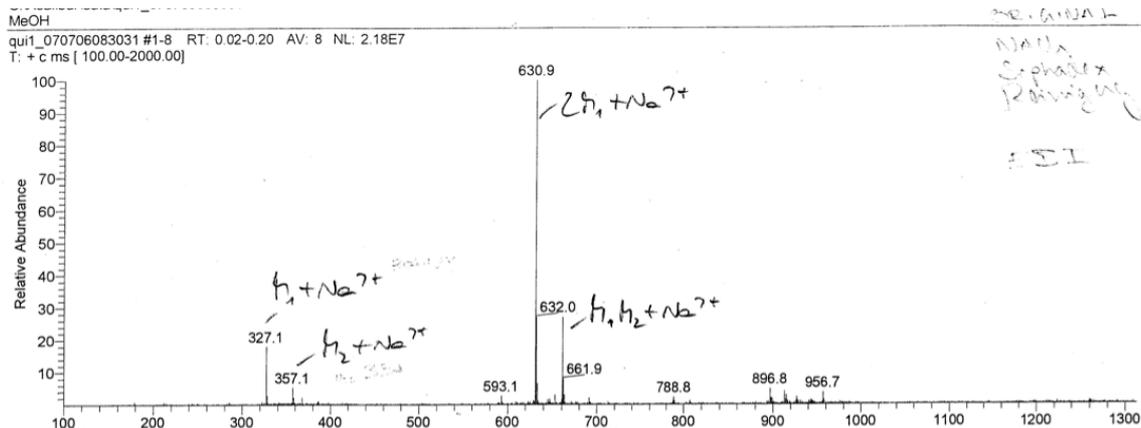


Figura 12. Espectro de masas ESI-MS del compuesto C1.

7.3.2 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear ^1H -RMN

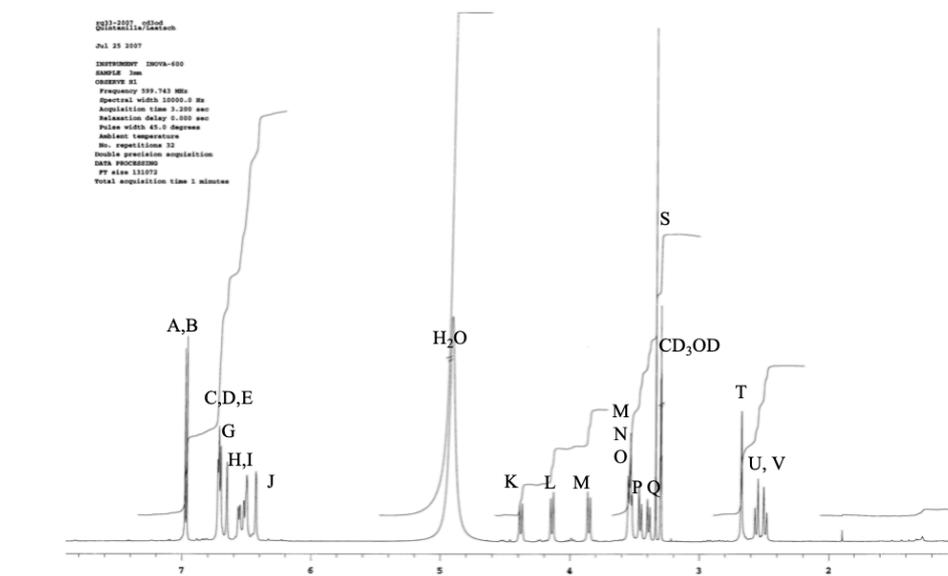


Figura 13. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CD_3OD) C1.

Para el análisis del espectro de ^1H -RMN (Fig. 13), inicialmente se procedió a identificar la señal correspondiente para el solvente a 3.31 ppm y señal correspondiente para residuos de agua a 4.84 ppm. Las señales de la A a la J integran para diez metinos (CH) de protones que conforman cuatro anillos aromáticos, mientras que la señal S da una integración para un metino alifático. Las señales K-R y T-V tienen una integración para once protones de metilenos (CH_2) alifáticos presentes en un anillo abierto. El espectro de dos

dimensiones COSY (anexo 4) muestra una correlación ^1H - ^1H entre las señales A- G, B-H, K-N, L-M, N-R, P-N, Q-O, U-V, mientras que las correlación ^1H - ^{13}C obtenidas por el espectro HMBC (anexo 6) se resume en la Tabla 10.

Tabla 10. Resumen de señales ^1H -RMN (CD_3OD , 600 MHz) compuesto C1.

^1H -RMN					
Señal	Ppm	M	Tipo C	COSY	HMBC
A	6.97	d	CH	g	C1, C2, C3, C4, C10, C11, C12
B	6.97	d	CH	h	C1, C2, C3, C4, C10, C11, C12
C	6.73	s	CH		C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14
D	6.72	s	CH		C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14
E	6.71	s	CH		C5, C6, C7, C8, C10, C11, C12, C14, C16
F	6.66	s	CH		C5, C6, C7, C8, C13, C15
G	6.56	d	CH		C15, C23,
H	6.52	d	CH		C16, C21, C24
I	6.50	s	CH		C1, C3, C4, C15
J	6.43	s	CH		C2, C3, C4, C16, C22
K	4.38	d	CH_2	n	C1, C27, C30, 32
L	4.14	d	CH_2	m	C2, C3, C4, C28, C29, C33
M	3.85	d	CH_2		C2, C3, C4, C29, C33
N	3.55	d	CH_2	r	C25, C26, C27, C30, C32, C33
O	3.54	s	CH_2		C25, C26, C27, C30, C31, C32
P	3.53	d	CH_2	n	C1, C25, C26, C27, C30, C32, C33
Q	3.46	d	CH_2	o	C26, C28, C33
R	3.39	d	CH_2		C32
S	3.34	s	CH		
T	2.67	s	CH_2		C18, C25, C30
U	2.56	d	CH_2	v	C17, C26, C28,
V	2.50	d	CH_2	u	C17, C26, C28, C29

7.3.3 Análisis de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C -RMN

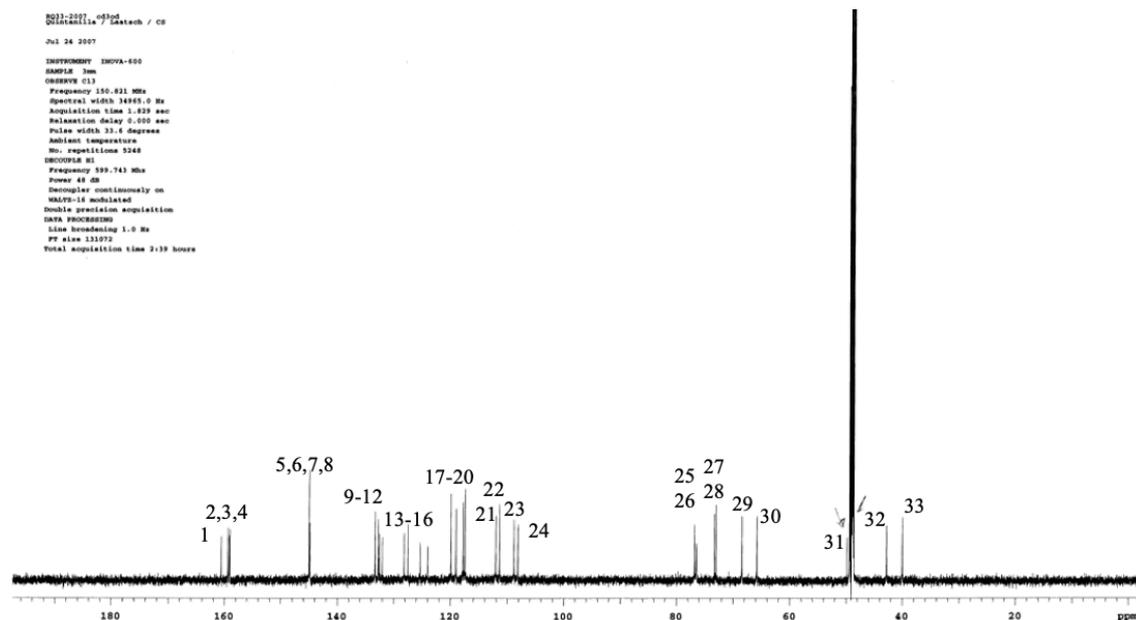


Figura 14. Espectro de ^{13}C -RMN (600 MHz, CD_3OD) C1.

La descripción del espectro inició con la identificación de la señal correspondiente para el solvente CD_3OD (fig. 14) con un desplazamiento de 49.43 a 48.58 ppm. Descartado el solvente, se identificaron 33 señales (tabla 11) que conforman al compuesto en estudio. Los carbonos 1-4 presentan un desplazamiento superior a 150 ppm característico a la unión de un átomo más electronegativo. Las señales 5- 24 se encuentran dentro de la región de carbonos aromáticos y las señales de 25-33 corresponden a carbonos alifáticos.

El espectro complementario de APT (anexo 3) permitió diferenciar los carbonos cuaternarios y metilenos presentes en 16 señales positivas (arriba), de metinos y metilos al presentar 17 señales negativas (abajo). La diferenciación entre carbono cuaternario y grupos funcionales se complementó con el espectro de HSQC (anexo 5) lo cual permitió ver el acoplamiento ^1H - ^{13}C . Se obtuvo una correlación para 16 carbonos cuaternarios (C_q) aromáticos, 10 metinos (CH) aromáticos y 1 alifático, 6 metilenos (CH_2) alifáticos.

Tabla 11. Resumen de señales ^{13}C -RMN (CD_3OD , 600 MHz) compuesto C1.

^{13}C -RMN				
No. Señal	ppm	Tipo C	HSQC	COSY
1	160.61	C_q		
2	159.42	C_q		
3	159.20	C_q		
4	159.08	C_q		
5	145.05	C_q		
6	145.05	C_q		
7	144.94	C_q		
8	144.89	C_q		
9	133.31	CH	A	g
10	132.74	CH	B	h
11	132.56	C_q		
12	132.05	C_q		
13	128.17	C_q		
14	127.50	C_q		
15	125.33	C_q		
16	124.00	C_q		
17	119.94	CH	E	
18	119.07	CH	C	
19	117.84	CH	F	
20	117.52	CH	D	
21	112.09	CH	G	
22	111.47	CH	H	
23	108.84	CH	I	
24	108.17	CH	J	
25	76.83	CH_2	K, P	n
26	76.48	CH_2	L, M	m
27	73.28	C_q		
28	72.99	C_q		
29	68.44	CH_2	O, Q	o
30	65.80	CH_2	N, R	r
31	49.85	CH	S	
32	42.77	CH_2	T	
33	40.01	CH_2	U, V	v-u

Dado que en el espectro de RMN se observan 33 señales para carbonos, permite retomar la posibilidad de que este compuesto esta conformado por

dos moléculas de 16 carbonos unidas por un carbono (CH) adicional, tal como parece indicar la presencia de $[M_1]^+$ y $[M_2]^+$ el espectro de masas (Fig. 15).

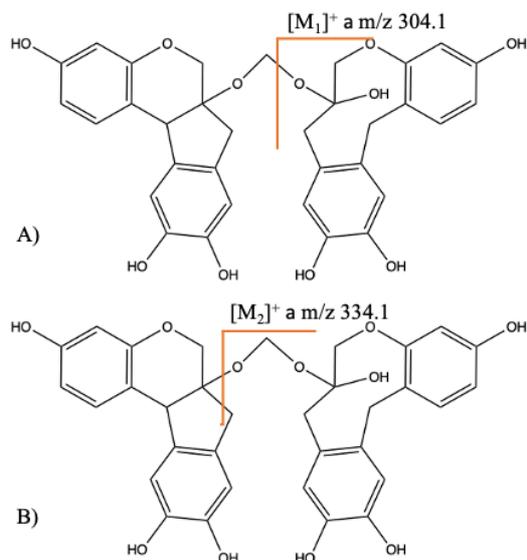


Figura 15. Posible fragmentación de molécula en dos iones moleculares.

A) Fragmentación correspondiente a ion molecular $[M_1]^+$ B) Posible fragmentación secundaria $[M_2]^+$.

Con esta información se propone la estructura de del compuesto C1 como 7-(((3,9,10-trihydroxy-7,11b-dihydroindeno[2,1-c]chromen-6a(6H)-yl)oxy)methoxy)-6,7,8,13-tetrahydrodibenzo[b,e]oxonine-3,7,10,11-tetraol, un dímero formado por dos moléculas de naturaleza flavonoide de fórmula molecular $C_{33}H_{30}O_{11}$ y un peso molecular de 602.59 uma (Fig.16). El diseño de la estructura y el nombre se obtuvieron por medio del programa ChemDraw Profesional 16.0.

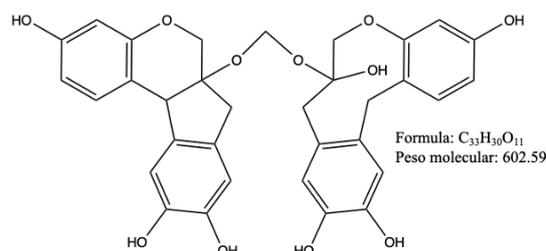


Figura 16. Propuesta de estructura para C1. 7-(((3,9,10-trihydroxy-7,11b-dihydroindeno[2,1-c]chromen-6a(6H)-yl)oxy)methoxy)-6,7,8,13-tetrahydrodibenzo[b,e]oxonine-3,7,10,11-tetraol.

8. Discusión

A 110 años de su descubrimiento, la enfermedad de Chagas causada por el agente etiológico *Trypanosoma cruzi* hoy en día prevalece como un problema importante de salud en América Latina, continente de mayor prevalencia, llegando a globalizarse impactando en regiones no endémicas debido al movimiento migratorio (Martínez-Peinado *et al.*, 2021).

La toxicidad sistémica de los fármacos utilizados contra *T. cruzi*, es producida como efecto secundario contra el humano debido a la generación de radicales libres (nitrilos de cadena abierta) que interactúan con enzimas celulares causado por la reducción de Nifurtimox y la producción de metabolitos electrófilos (glioxal) que forman aductos con guanosina evitando la formación de nuevas cadenas de ADN por parte de Benznidazol, resultando así a la interrupción del tratamiento en un 10- 30 % por parte de los pacientes (García-Huertas & Cardona-Castro, 2021); lo cual induce en la búsqueda de una terapia alterna de menor toxicidad contra la enfermedad de Chagas intensificando la investigación de nuevos compuestos obtenidos a partir de plantas (Martínez-Peinado *et al.*, 2021).

Los extractos acuosos y metanólicos de *Haematoxylum brasiletto* obtenidos en equipo Soxhlet obtuvieron mejores rendimientos en comparación con la con la técnica de maceración (Tabla 2). Se ha demostrado que el uso de Soxhlet combinado con solventes polares como metanol permite obtener mayores rendimientos sobre otras técnicas (Adam *et al.*, 2019).

El análisis de los extractos acuosos y metanólicos contra epimastigotes de *T. cruzi* resultó en una mejor actividad para el extracto acuoso con una CL₅₀ de 121 µg/mL y 229.4 µg/mL para el extracto metanólico, lo cual sobresale en comparación con el obtenido por Pérez *et al.* (2017) de 543 µg/mL.

Los extractos se clasificaron como no hemolíticos al presentar una CH₅₀ >1000 µg/mL, significando que el extracto atravesar la membrana celular e

interactuar con la hemoglobina intracelular evitando que en este proceso se afecte el glóbulo rojo estructural y funcionalmente (Martínez *et al.*, 2013) y no citotóxicos en modelo de *Artemia salina* con una $CL_{50} >1000 \mu\text{g/mL}$ (Balinado & Chan, 2019). Estas características le permiten al extracto ser apto para aplicación humana como suplemento etnofarmacológico contra la enfermedad de Chagas (Martínez-Peinado *et al.*, 2021).

El extracto crudo de *H. brasiletto* dio positivo para taninos, flavonoides y terpenos, en su mayoría compuestos fenólicos para las pruebas cualitativas realizadas (Tabla 4). La mayoría de los reportes de extractos de plantas contra *T. cruzi* han estudiado la actividad de compuestos aislados como los son alcaloides, flavonoides, diterpenos y sesquiterpenlactonas (Martínez-Peinado *et al.*, 2021; Pérez *et al.*, 2017)

La mezcla de moléculas en el extracto crudo puede interferir con la potencia terapéutica de ciertas fracciones o metabolitos secundarios activos disminuyendo la actividad biológica, por ejemplo, la presencia de taninos puede frenar la absorción de proteínas y alcaloides, o pueden inducir enzimas (citocromo P450) que interfieran con el correcto metabolismo del compuesto, llegando a reducir su efecto terapéutico. La obtención de una fracción o un molécula bioactiva sólo se lleva a cabo el aislamiento, la caracterización y la estandarización adecuados (Palit, 2018). Para el aislamiento de los metabolitos secundarios se llevó a cabo un fraccionamiento biodirigido con base a su actividad, el cual partió del extracto metanólico crudo (Malviya & Malviya, 2017), esto nos permitió obtener los compuestos denominados C1, C2, y C3. El compuesto con mejor actividad contra epimastigotes de *T. cruzi* fue el compuesto C1 con una CL_{50} de $5.84 \mu\text{g/mL}$ en comparación con 364.70 y $321.30 \mu\text{g/mL}$ obtenidos para C2 y C3 respectivamente.

La combinación en el análisis espectroscópico de C1 con las técnicas ESI-MS, $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ (1D y 2D) utilizadas en elucidación de estructuras orgánicas (Abubakar & Haque, 2020), permitió proponer una estructura conformado por un dímero de dos moléculas de naturaleza flavonoide de 33 carbonos (fig. 15) con un peso molecular de 602.59 y fórmula molecular

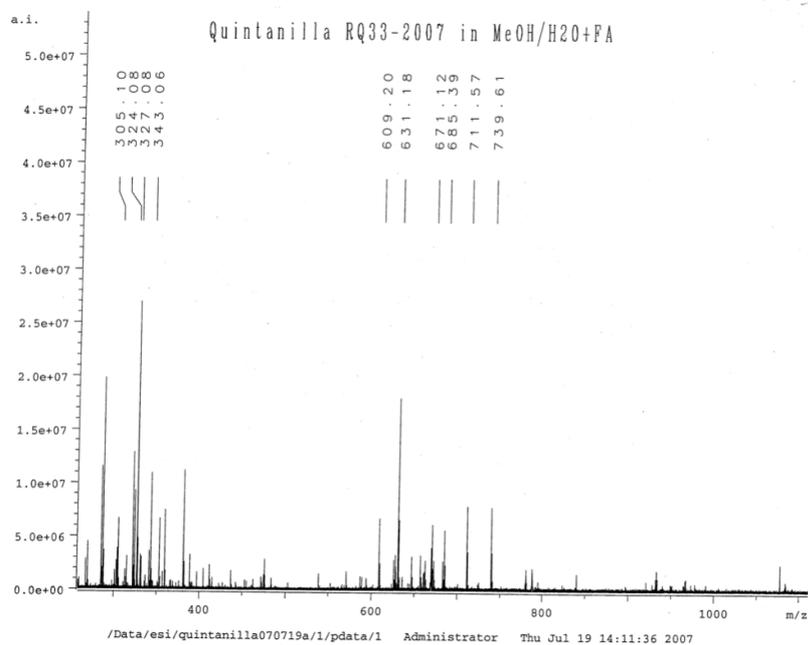
C₃₃H₃₀O₁₁. Esta propuesta no concuerda con los metabolitos secundarios reportados previamente por Rivero-Cruz (2008) para *H. brasiletto*.

Los mecanismos que podrían explicar la actividad tripanocida de flavonoides, conocidos por ser buenos antioxidantes, es que bajo ciertas condiciones pueden producir especies reactivas de oxígeno. El parásito *T. cruzi* es susceptible a los fármacos capaces de generar especies reactivas de oxígeno porque carece de mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. De igual manera los flavonoides tienen capacidad de interactuar con enzimas como la GAPDH del parásito inhibiendo la vía principal de producción de ATP (Grael *et al.*, 2005).

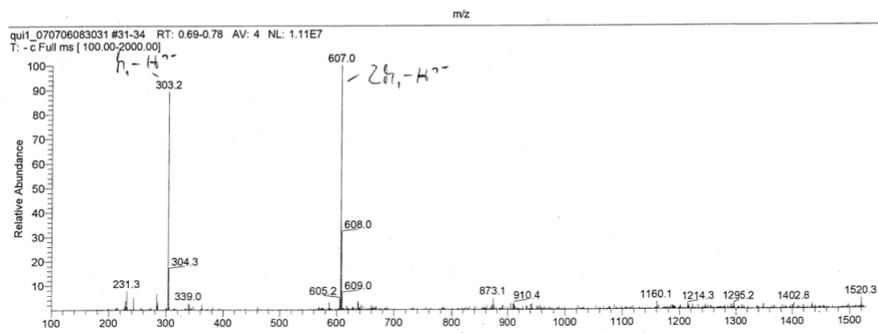
9. Conclusiones

- El uso del equipo Soxhlet permitió la obtención de mejores rendimientos al realizar las extracciones de *H. brasiletto*.
- Se evaluó la actividad tripanosomicida de los extractos de *H. brasiletto* y se obtuvo una CL_{50} de 121.01 y 229.40 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos acuosos y metanólicos respectivamente, así mismo se consideran aptos para uso tradicional al no ser hemolíticos ($CH_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) y no citotóxicos ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$).
- El fraccionamiento biodirigido del extracto de *H. brasiletto* con el uso de técnicas cromatográficas, permitió el aislamiento y purificación de los compuestos C1, C2 y C3, los cuales presentaron una CL_{50} de 5.84, 364.70 y 321.30 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
- El análisis del compuesto C1 con las técnicas espectroscópicas ESI-MS, $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ (1D y 2D), permitió obtener el peso molecular de 602.59 y su fórmula $\text{C}_{33}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$. Así mismo se propuso la estructura molecular de un dímero de dos moléculas de naturaleza flavonoide identificado como 7-(((3,9,10-trihydroxy-7,11b-dihydroindeno[2,1-c]chromen-6a(6H)-yl)oxy)methoxy)-6,7,8,13-tetrahydrodibenzo[b,e]oxonine-3,7,10,11-tetraol.

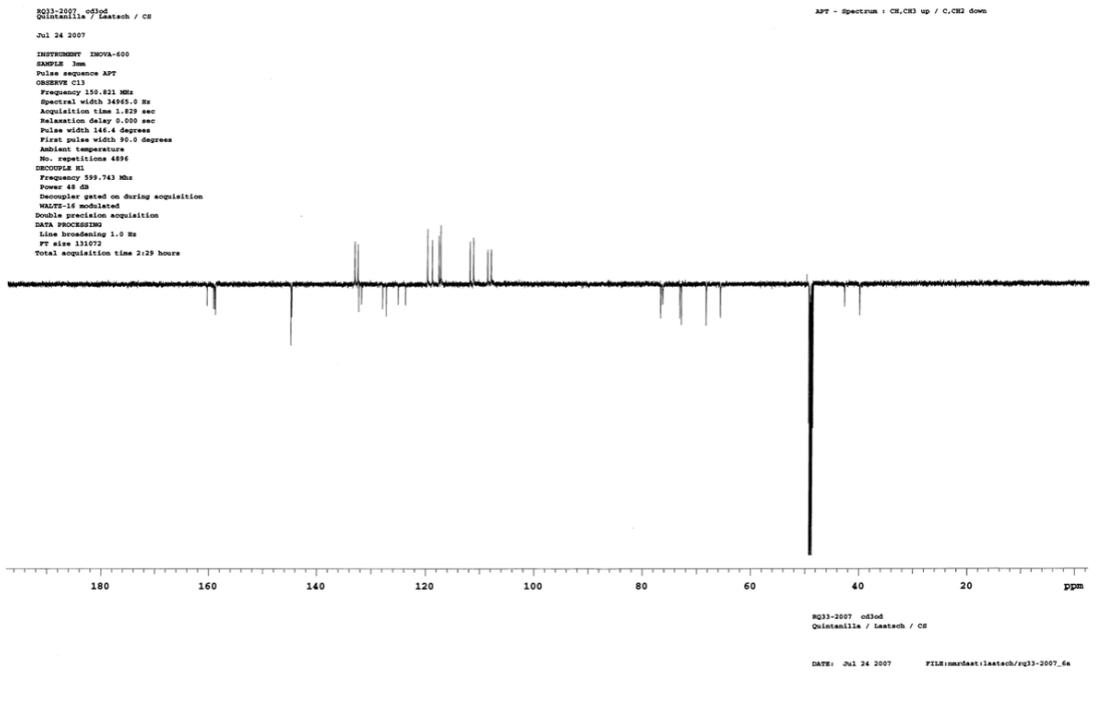
10. Anexo de figuras



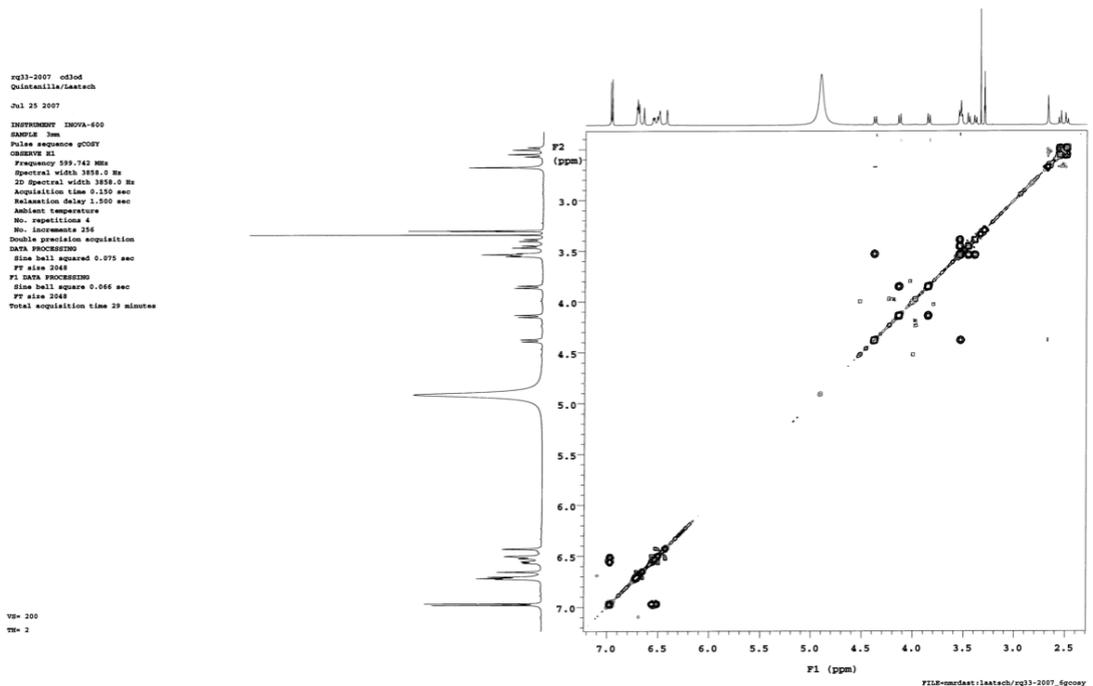
Anexo 1. Espectro de masas HR-ESI-MS del compuesto C1. Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



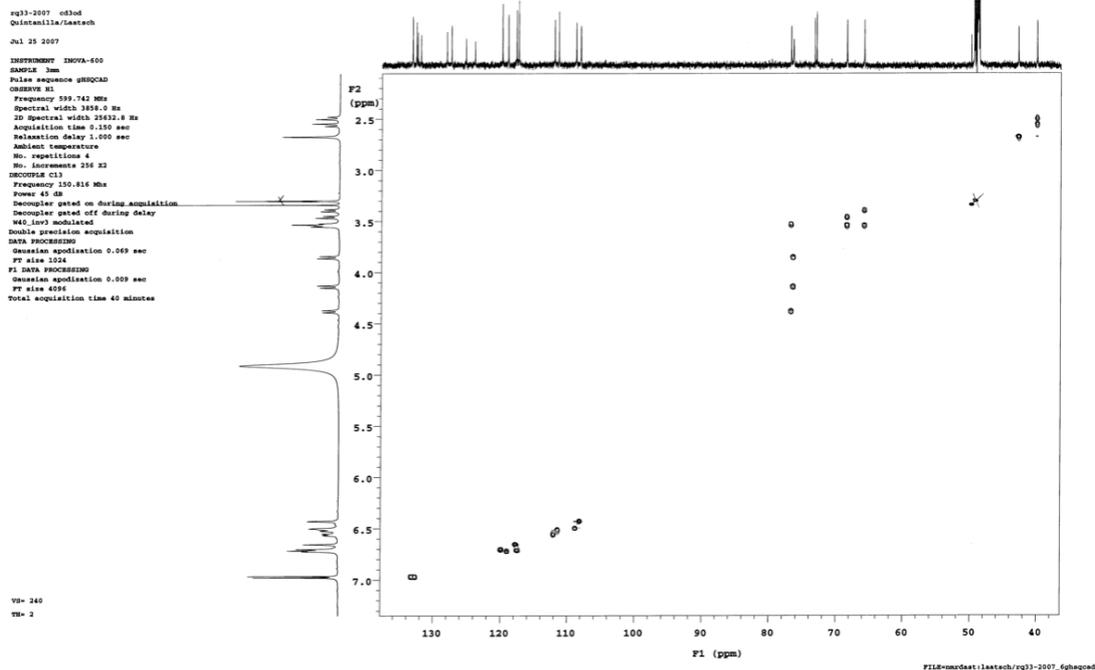
Anexo 2. Espectro de masas ESI-MS (-) del compuesto C1. Bruker FTICR 4.7 T Mass spectrometer.



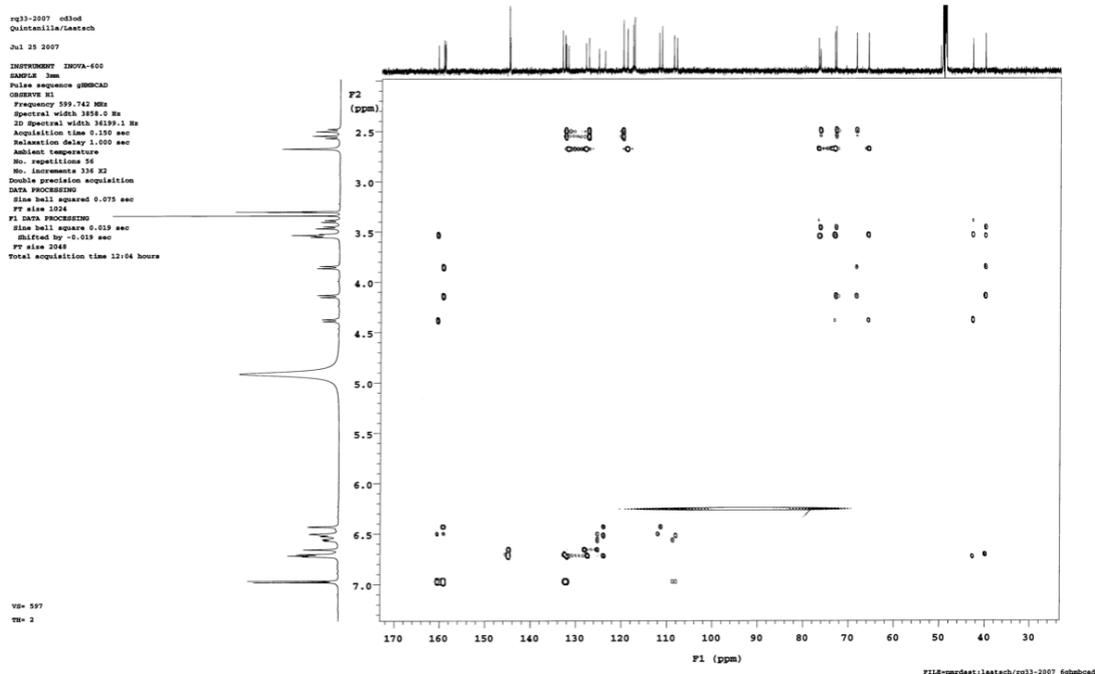
Anexo 3. Espectro APT de ^{13}C -RMN (600 MHz, CD_3OD). VARIAN INOVA-600.



Anexo 4. Espectro COSY (600 MHz, CD_3OD). VARIAN INOVA-600.



Anexo 5. Espectro HSQC (600 MHz, CD₃OD). VARIAN INOVA-600.



Anexo 6. Espectro HMBC (600 MHz, CD₃OD). VARIAN INOVA-600.

11. Bibliografía

- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jimenez-Estrada, M., & Reyes-Chilpa, R. (2002). Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(9), 1188–1191. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1188>
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Adam, O. A. O., Abadi, R. S. M., & Ayoub, S. M. H. (2019). Effect of extraction method and solvents on yield and antioxidant activity of certain sudanese medicinal plant extracts. *The Journal of Phytopharmacology*, 8(5), 248–252. <https://doi.org/10.31254/phyto.2019.8507>
- Alonso-Geli, Y., Alonso-Moreno, Y., Falcón-Diéguéz, J. E., 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.
- Artschwager Kay, M. (1977). The florilegio medicinal : Source of southwest ethnomedicine. *The American Society for Ethnohistory*, 24(3), 251–259.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>

- Balinado, L. O., & Chan, M. A. (2019). Assessment of cytotoxic activity of five common Philippine medicinal plants using brine shrimp lethality assay. *Mindanao Journal of Science and Technology*, 17, 138–152.
- BDMTM. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2019). *Haematoxylon brasiletto* H. Karst. [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=4&t=palo de Brasil](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=4&t=palo%20de%20Brasil)
- Carabarin-Lima, A., González-Vázquez, M. C., Rodríguez-Morales, O., Baylón-Pacheco, L., Rosales-Encina, J. L., Reyes-López, P. A., & Arce-Fonseca, M. (2013). Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Tropica*, 127(2), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.007>
- Chinsembu, K. C. (2016). Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Tropica*, 154, 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.10.019>
- CONAFOR. Comisión Nacional Forestal. (2019). *Haematoxylum brasiletto* H. Karst. https://www.cnf.gob.mx:8443/snif/especies_forestal
- Cymerman Craig, J., Naik, A. R., Pratt, R., Johnson, E., & Bhacca, N. S. (1965). Nuclear magnetic resonance spectra and stereochemistry of the antibacterial principle from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Organic Chemistry*, 30(5), 1573–1576. <https://doi.org/10.1021/jo01016a058>
- Echeverria, L. E., & Morillo, C. A. (2019). American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>
- Encarnación-Dimayuga, R., & Agundez, J. (1986). Traditional medicine of

Baja California Sur (México) I. *Journal of Ethnopharmacology*, 17, 183–193. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2030592>

Espinoza, B., Martínez, I., & Schabib-Hany, M. (2019). First report of family clusters of Chagas disease seropositive blood donors in Mexico City and their epidemiological relevance. *Acta Tropica*, 193(2), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.014>

García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J. Á., Feng, P., & Heredia, N. (2016). Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 59, 124–132. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.001>

García-Huertas, P., & Cardona-Castro, N. (2021). Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 142(August), 112020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>

García, S., Alarcón, G., Gómez, M., & Heredia, N. (2005). *Haematoxylon brasiletto* extracts inhibit growth, enterotoxin production, and adhesion of *Vibrio cholerae*. *Food Biotechnology*, 19(1), 15–26. <https://doi.org/10.1081/FBT-200049051>

Grael, C. F. F., Albuquerque, S., & Lopes, J. L. C. (2005). Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia*, 76, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2004.10.013>

Ibáñez-Cervantes, G., León-García, G., Castro-Escarpulli, G., Mancilla-Ramírez, J., Victoria-Acosta, G., Cureño-Díaz, M. A., Sosa-Hernández, O., & Bello-López, J. M. (2018). Evolution of incidence and geographical distribution of Chagas disease in Mexico during a decade (2007-2016). *Epidemiology and Infection*, 147(41), 1–7.

<https://doi.org/10.1017/S0950268818002984>

Jiménez-Cardoso, E., Campos-Valdéz, G., Cortes-Campos, A., de la Luz-Sanchez, R., Rivera-Mendoza, C., Plascencia-Hernández, A., Hernández-Ramírez, M., Ruiz-Habana, J., Bonilla-González, E., Matzumura, P. D., & Carlier, Y. (2012). Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: A problem of public health little studied in Mexico. *Experimental Parasitology*, *131*(4), 425–432.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.05.013>

Johnson, M. B. (1988). *Horticultural characteristics of seven sonoran desert woody legumes which show potential for southwestern landscaping*. University of Arizona.

Lei, C., & Sun, X. (2018). Comparing lethal dose ratios using probit regression with arbitrary slopes. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *19*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0250-1>

Lopera-Valle, J., Rojas-Jiménez, S., Ochoa-Mejía, M., Pamplona-Sierra, A. P., & Marin-Castro, A. E. (2013). Actividad tripanocida de plantas latinoamericanas, una futura alternativa terapéutica para la Enfermedad de Chagas. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, *72*(1), 22–30.

Malviya, N., & Malviya, S. (2017). Bioassay guided fractionation-an emerging technique influence the isolation, identification and characterization of lead phytomolecules. *International Journal of Hospital Pharmacy*, 1–6. <https://doi.org/10.28933/ijhp-2017-07-0901>

Manne, J. M., Snively, C. S., Ramsey, J. M., Salgado, M. O., Bärnighausen, T., & Reich, M. R. (2013). Barriers to treatment access for Chagas Disease in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002488>

Martinez-Luna, E. (2001). Compuestos antimicrobianos aislados de las

especies *Iostephane heterophylla* (Cav) Benth. (Asteraceae) y *Hematoxylon brasiletto* Karst. (Leguminosae). Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez-Peinado, N., Cortes-Serra, N., Tallini, L. R., Pinazo, M. J., Gascon, J., Bastida, J., & Alonso-Padilla, J. (2021). Amaryllidaceae plants: a potential natural resource for the treatment of Chagas disease. *Parasites & Vectors*, 14(1), 337. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04837-9>

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.

Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., & Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 146(4), 601–620. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>

Molina-Garza, Zinnia J., Rosales-Encina, J. L., Mercado-Hernández, R., Molina-Garza, D. P., Gomez-Flores, R., & Galaviz-Silva, L. (2014). Association of *Trypanosoma cruzi* infection with risk factors and electrocardiographic abnormalities in northeast Mexico. *BMC Infectious Diseases*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-117>

Molina-Garza, Zinnia Judith, Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Quintanilla-Licea, R., & Galaviz-Silva, L. (2014). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta Tropica*, 136(1), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.006>

Molina-Garza, Zinnia Judith, Rosales-Encina, J. L., Galaviz-Silva, L., & Molina-Garza, D. (2007). Prevalencia de *Trypanosoma cruzi* en

triatominos silvestres de Nuevo León, México. *Salud Publica de Mexico*, 49(1), 37–44. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342007000100006>

Monteón, V., Godínez, S., Cruz-Zetina, G., Balmes, J., López, R., & Hernández, Ó. (2009). Caracterización biológica de aislados mexicanos de *Trypanosoma cruzi*: metaciclologénesis, parasitemia y resistencia contra benznidazol. *Revista Biomedica*, 20(3), 206–214. <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb092035.pdf>

Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. J., & Gómez-Barrio, A. (2000). Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 86(12), 999–1002. <https://doi.org/10.1007/PL00008532>

Muschietti, L. V., Sülsen, V. P., & Martino, V. S. (2013). Bioprospection of potential trypanocidal drugs: A scientific literature survey over the period 2000-2010. *Studies in Natural Products Chemistry*, 39, 297–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62615-8.00009-6>

OMS. Organización Mundial de la Salud. (2020). *Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)*. <https://www.who.int/chagas/en/>

Palit, P. (2018). Bioactivity guided phyto-fractions: an emerging natural drug discovery tool for safe and effective disease management. In S. C. Mandal, V. Mandal, & T. Konishi (Eds.), *Natural Products and Drug Discovery: An Integrated Approach* (1st Editio, pp. 57–71). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2016-0-02061-2>

Pereira-Nunes, M. C., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>

Pérez, K. C., Galaviz, L., Iracheta, J. M., Lucero, E. A., & Molina, Z. J.

- (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. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i4.27153>
- Pratt, R., & Yuzuriha, Y. (1959). Antibacterial activity of the heartwood of *Haematoxylon braziletto*. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 48(1), 69–72.
- Quintanilla-Licea, R., Mata-Cárdenas, B. D., Vargas-Villarreal, J., Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Ángeles-Hernández, I. K., Garza-González, J. N., & Hernández-García, M. E. (2014). Antiprotozoal activity against *Entamoeba histolytica* of plants used in northeast mexican traditional medicine. Bioactive compounds from *Lippia graveolens* and *Ruta chalepensis*. *Molecules*, 19(12), 21044–21065. <https://doi.org/10.3390/molecules191221044>
- Rivero-Cruz, J. F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 99–103. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.005>
- Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Medica de Mexico*, 154(5), 605–612. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004515>
- Rosal, G. G., Noguera-Torres, B., Villagrán, M. E., de Diego-Cabrera, J. A., Montañez-Valdez, O. D., & Martínez-Ibarra, J. A. (2018). Chagas disease: Importance of rats as reservoir hosts of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) in western Mexico. *Journal of Infection and Public Health*, 11(2), 230–233. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.07.017>
- Rosas-Piñón, Y., Mejía, A., Díaz-Ruiz, G., Aguilar, M. I., Sánchez-Nieto, S., & Rivero-Cruz, J. F. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the altiplane region of Mexico for the treatment

of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.020>

Sanabria-Calvo, M. (2015). Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas. *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica*, 71(616), 539–544.

Sánchez-González, G., Figueroa-Lara, A., Elizondo-Cano, M., Wilson, L., Novelo-Garza, B., Valiente-Banuet, L., & Ramsey, J. M. (2016). Cost-effectiveness of blood donation screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004528>

Sánchez-Marroquin, A., Garcia, L., & Mendez, M. (1958). Brazilin, antibacterial substance from *Haematoxylon brasiletto*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 1, 225–232.

Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (2006). *Natural Products Isolation* (2^o edition). Humana Press.

Schmunis, G. A., & Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, 115(1–2), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>

Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2003). The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 31, 472–481.

Velasco-Castrejón, Ó., & Rivas-Sánchez, B. (2008). Apuntes para la historia de Chagas en México. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 65, 57–79.

Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Estrada-Muñiz, E., Aguilar, A., & Reyes-Chilpa, R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and

purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2), 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.014>