

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

“DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES QUÍMICOS  
RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE  
*Lantana camara* Y DESARROLLO DE UN EXTRACTO  
CUANTIFICADO”

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

**Doctora en Ciencias Químico Biológicas**

Presenta

M. en C. Ronna Delgado Altamirano

Dirigida por:

Dra. Alejandra Rojas Molina

Querétaro, Qro. Octubre 2019





Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado en Ciencias Químico Biológicas

DETERMINACIÓN DE LOS MARCADORES QUÍMICOS RELACIONADOS CON  
LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE *Lantana camara* Y DESARROLLO DE UN  
EXTRACTO CUANTIFICADO

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Doctora en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta:**

M. en C. Ronna Delgado Altamirano

**Dirigida por:**

Dra. Alejandra Rojas Molina

SINODALES

Dra. Alejandra Rojas Molina

Presidente

Dr. César Ibarra Alvarado

Secretario

Dr. José Fausto Rivero Cruz

Vocal

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Suplente

Dra. Juana Isela Rojas Molina

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Octubre 2019

México

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Para mi mamá, por ser mi apoyo,  
mi guía, mi consejera y  
mi soporte más importante, siempre.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asignación de la beca de doctorado (Julio 2015-Julio 2019), CVU 557043.

Al Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación de la Universidad Autónoma de Querétaro (FOFI-FCQ-2018-11).

Al Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el servicio prestado para la identificación y elucidación estructural de los compuestos bioactivos de *L. camara*, así como su estudio metabolómico, CONACYT (Proyecto 0224747) y UNAM.

Al Laboratorio de Inmunoparasitología y al Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad para evaluar tanto *in vitro* como *in vivo*, todos los extractos, fracciones y compuestos de *L. camara*, sobre la cepa Lacandona de *Leishmania mexicana*.

Al Laboratorio de Investigación Química y Farmacológica de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, por permitirme formarme en el ámbito de la investigación desde mis primeros pasos.

A mis sinodales: el Dr. César Ibarra Alvarado, el Dr. Mamadou Moustapha Bah, el Dr. José Fausto Rivero Cruz y la Dra. Juana Isela Rojas Molina; por haberme tenido la paciencia, la empatía y el interés para compartirme, tan amablemente, su conocimiento. Por cuestionarme y por ayudarme a desarrollar de la mejor manera posible este proyecto.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser, por abrirme tan espléndidamente las puertas de su laboratorio, por acogerme como una más de sus alumnas, por permitir desarrollarme aún más en el campo de la leishmaniasis, un tema que me apasiona.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez por ser mi guía en la evaluación leishmanicida, por motivarme a lograr más cosas, tanto personales como académicas, por escucharme siempre que lo necesité y por darme palabras cálidas cuando me sentí desorientada.

A la Dra. Nuria Esturau Escofet por recibirme tan cándidamente en su laboratorio, por impulsarme y motivarme a construir una mejor vida académica y laboral. Por ser el parteaguas en mi futuro como investigadora, por mostrarme la pasión por la metabolómica, por recordarme perseguir mis sueños profesionales y por ser ejemplo a seguir.

A la Dra. Alejandra Rojas Molina, la persona más representativa en mi formación académica. Le agradezco infinitamente por estos casi 7 años de trabajo en equipo que, con sus buenos y malos momentos, me forjaron en muchos sentidos. Gracias por demostrarme que el camino de la investigación es el que debo seguir. Gracias por los consejos, los (pocos) regaños, las pláticas, las planeaciones, las búsquedas de presupuesto pero, sobre todo, por haberse mantenido humana conmigo durante los momentos más complicados y decisivos para mí. Gracias por darme las armas para poder comenzar mi vida profesional.

A mi mamá por estar siempre para mí, para cualquier cosa. Por ser el apoyo incondicional para mí, por escucharme, por orientarme, por regañarme, por motivarme siempre a llegar lejos. Por recordarme que mi único límite soy yo misma. Gracias por convertirme en lo que soy hoy.

A Ulises, por motivarme a salir de mi zona de confort, a dejar pasar los miedos y a retarme a mí misma, a pesar de ser mi hermano menor.

A mi tía Vicenta y a mi primo Domingo, por darme un techo, comida y cariño durante los últimos 6 meses de mi estancia. Me sentí como en casa.

A Ana, mi mejor amiga por más de la mitad de nuestras vidas. Gracias por ser tú y todo lo que me aportas. Gracias por recibirme en tu casa, por apoyarme, por darme consejos, comprenderme y entenderme. Por recordarme lo que soy y que no logro ver. Agradezco infinitamente tu presencia en mi vida.

A Jesús, por ser mi compañero por 5 años, por mostrarme mi valor como persona, por haber sido mi pilar más fuerte durante las situaciones complicadas que me tocó afrontar. Por escucharme cada vez que lo necesité, por hacerme sonreír incluso en las veces que no podía o no quería hacerlo. Te deseo una vida plena y feliz a donde quiera que vayas. Siempre serás parte importante de mi vida.

A Caro, una excelente amiga. Gracias por darme palabras tan sabias en lo académico, en lo personal. Gracias por las largas pláticas, aún en la distancia; por mostrarme que el mundo es más grande de lo que creí y que uno labra su propio destino, nadie más. Te admiro mucho, Caro y espero verte convertida en una gran investigadora dentro de poco.

A Luis Fernando, por todas las horas de HPLC, de paciencia, de frustración, de trabajo en equipo y al final de éxito, que hemos compartido en los últimos meses. Te has vuelto un amigo invaluable para mí, mi Pepe Grillo. Te agradezco infinitamente por motivarme a seguir adelante pese a las situaciones adversas. Por ser tan divertido y tan centrado al mismo tiempo. Espero colaborar en el futuro contigo.

A Alex, a Francisco, a Rosy, a Gio por ser, más que compañeros de laboratorio, grandes amigos que me apoyaron en muchos sentidos.

A Lalo, por ser mi compañero y amigo de café, de conocimiento, de reflexiones y de frustraciones. Por ser el excelente amigo que eres. Teníamos caminos muy distintos y al final, la química de productos naturales nos encontró. Gracias por todo lo que me has aportado.

A Rosa, a Juan y a Nadia, por ser parte de mi familia, quienes me acogieron durante todo el año que duró mi estancia, por escucharme, por apoyarme, por hacerme reír, por las tardes de sushi, por las bromas, por el tiempo. Son seres humanos increíbles que sé que lograrán cosas grandiosas y espero estar ahí para compartir esos éxitos.

A Martha, una mujer sumamente valiosa, talentosa, inteligente, trabajadora y dedicada que ha sido inspiración para mí. Que, aunque no nos conocemos del todo, hemos hecho un match excelente y deseo seguir cultivando esa amistad.

A Rocely y a Cris, por brindarme apoyo moral y guía emocional, en aquellos momentos en los que sentía que los problemas me sobrepasaban. Las llevo en mi corazón.

A Dios, por ponerme siempre en el camino correcto, a pesar de que yo no lo crea así.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Situación mundial de la leishmaniasis	2
2.2 <i>Lantana camara</i>	13
2.2.1 Usos etnofarmacológicos/etnobotánicos	15
2.2.2 Composición química	16
2.2.3 Actividad biológica presentada por compuestos obtenidos a partir de especímenes de <i>L. camara</i>	20
2.2.3.1 Actividad leishmanicida de compuestos presentes en <i>L. camara</i>	21
2.2.4 Toxicidad	24
2.2.5 Variación del perfil fitoquímico	25
2.3 Metabolómica de plantas	27
2.3.1 Resonancia magnética nuclear	28
2.3.2 Marcadores químicos	30
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	35
5.1 General	35
5.2 Específicos	35
6. METODOLOGÍA	36

6.1 Colecta de <i>Lantana camara</i>	36
6.2 Preparación del extracto de diclorometano de <i>L. camara</i>	36
6.3 Fraccionamiento del extracto de diclorometano de <i>L. camara</i> por cromatografía en columna abierta	37
6.4 Evaluación de la actividad leishmanicida	37
6.4.1 Parásitos	37
6.4.2 Actividad leishmanicida sobre promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	37
6.4.3 Análisis estadístico de la actividad leishmanicida	40
6.5 Aislamiento, purificación e identificación de los compuestos mayoritarios contenidos en las fracciones con la mejor actividad leishmanicida	41
6.5.1 Identificación de los componentes mayoritarios de la fracción FII por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	41
6.5.2 Aislamiento y purificación de los componentes mayoritarios de las fracciones FX, FXI y FXV por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a arreglo de diodos (HPLC-DAD)	41
6.5.3 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la elucidación estructural de los compuestos obtenidos a partir de las fracciones FX, FXI y FXV	43
6.6 Análisis metabólico de los extractos obtenidos a partir de especímenes de <i>L. camara</i> recolectados en diferentes épocas del año	44
6.6.1 Preparación de los extractos	44
6.6.2 Perfil químico cualitativo por cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos a partir de distintas colectas de <i>L. camara</i>	45

6.6.3 Perfil químico por resonancia magnética nuclear de los extractos obtenidos a partir de distintas colectas de <i>L. camara</i>	45
6.6.4 Procesamiento de los datos para el análisis multivariado	46
6.6.5 Análisis estadístico multivariado	46
6.7 Desarrollo y validación del método analítico para el marcador químico	47
6.7.1. Selección del marcador químico	47
6.7.2 Determinación de la concentración de los ácidos lantanílico y camárico como marcadores químicos de los extractos de <i>L. camara</i>	48
6.7.2.1 Preparación de los extractos de <i>L. camara</i> para su inyección en HPLC	48
6.7.2.2 Cuantificación del marcador químico	49
6.7.2.3 Validación del método analítico para la detección y cuantificación de los ácidos lantanílico y camárico	49
6.8 Preparación de las formulaciones farmacéuticas para la administración tópica de los extractos y compuestos aislados de <i>L. camara</i>	51
6.9 Evaluación <i>in vivo</i> de extractos activos de <i>L. camara</i>	52
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	54
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
8.1 Actividad leishmanicida del extracto de diclorometano de <i>L. camara</i> sobre promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	55
8.2 Identificación de los componentes mayoritarios de la fracción FII por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	58



8.3 Aislamiento, purificación e identificación de los componentes mayoritarios de las fracciones FX, FXI y FXV por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a arreglo de diodos (HPLC-DAD)	59
8.4 Actividad leishmanicida de los compuestos aislados a partir de las fracciones activas del extracto de diclorometano de <i>L. camara</i>	65
8.5 Análisis metabolómico y quimiométrico de los extractos obtenidos a partir de especímenes de <i>L. camara</i> recolectados en diferentes épocas del año	77
8.5.1 Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos a partir de <i>L. camara</i> recolectada en diferentes épocas del año	77
8.5.2 Evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos obtenidos a partir de <i>L. camara</i> recolectada en diferentes épocas del año	79
8.5.3 Análisis de <sup>1</sup> H-RMN de los estándares	81
8.5.4 Perfil químico por RMN de los extractos obtenidos a partir de distintas colectas de <i>L. camara</i>	84
8.5.5 Procesamiento de los datos para el análisis multivariado	88
8.5.6 Análisis estadístico multivariado	88
8.6 Desarrollo y validación del método analítico para el marcador químico	93
8.6.1 Selección del marcador químico	93
8.6.2 Validación del método analítico para la detección y cuantificación de los marcadores químicos	94
8.6.3 Cuantificación del marcador químico	96

8.7 Evaluación <i>in vivo</i> de dos extractos cuantificados de <i>L. camara</i> y algunos de los compuestos identificados	98
9. CONCLUSIONES	105
10. PERSPECTIVAS	107
ANEXO I. Compuestos aislados de <i>Lantana camara</i> con actividad biológica	108
ANEXO II. Espectros de RMN del ácido lantanílico (8)	111
ANEXO III. Espectros de RMN del ácido camárico (9)	116
ANEXO IV. Espectros de RMN del lantadeno B (10)	121
ANEXO V. Espectros de RMN del bis(2-etilhexil)ftalato	126
ANEXO VI. Espectros protónicos de los estándares identificados en las fracciones activas de <i>L. camara</i>	131
ANEXO VII. Fotografías representativas de los cortes histopatológicos de los cojinetes plantares de ratones BALB/ infectados con <i>Leishmania mexicana</i> ( $1 \times 10^6$ parásitos) tras 5 semanas de tratamiento. Cada fotografía es representativa en morfología y número de parásitos, de acuerdo al promedio para cada grupo	135
BIBLIOGRAFÍA	144

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Fármacos empleados actualmente para el tratamiento de la leishmaniasis, estructuras, dosis, blanco farmacológico, mecanismo de acción y efectos adversos.	4
2	Productos naturales representativos con actividad leishmanicida significativa.	7
3	Compuestos aislados de <i>L. camara</i> y actividad biológica.	20
4	Triterpenos aislados de <i>L. camara</i> con actividad leishmanicida.	22
5	Actividad biológica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de diclorometano de <i>Lantana camara</i> sobre <i>A. salina</i> (CL <sub>50</sub> ), macrófagos peritoneales de ratón BALB/c (CC <sub>50</sub> ) y amastigotes de <i>L. amazonensis</i> (CI <sub>50</sub> ).	24
6	Variación de la composición del aceite esencial de <i>L. camara</i> colectada en distintos países y años.	26
7	Variación de terpenoides (porcentaje) en el aceite esencial de <i>L. camara</i> colectadas en distintas épocas del año.	27
8	Variación de lantadenos (mg/g peso seco) en extractos metanólicos de distintas variedades de <i>L. camara</i> , y diferentes etapas de desarrollo.	27
9	Programa del gradiente cromatográfico para la cuantificación de ácido lantanílico y ácido camárico.	48
10	Grupos experimentales de ratones para la evaluación <i>in vivo</i> de los extractos y compuestos aislados de <i>L. camara</i> .	52
11	Valores de CC <sub>50</sub> y CI <sub>50</sub> para el extracto crudo y las 18 fracciones cromatográficas de <i>L. camara</i>	56
12	Asignación y acoplamientos de <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C para el pico A: ácido lantanílico.	61

13	Asignación y acoplamientos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el pico B: ácido camárico.	63
14	Asignación y acoplamientos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el pico C: lantadeno B.	64
15	Asignación y acoplamientos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el pico E: bis(2-etilhexil)ftalato.	65
16	Actividad leishmanicida de los componentes mayoritarios de las fracciones FII, FX, FXI y FXV.	65
17	Actividad leishmanicida de 10 extractos de diclorometano de <i>L. camara</i> colectada en diferentes meses durante la época de floración.	79
18	Desplazamientos químicos en el espectro de $^1\text{H}$ -RMN del eicosano.	81
19	Desplazamientos químicos en el espectro de $^1\text{H}$ -RMN del escualeno.	81
20	Desplazamientos químicos en el espectro de $^1\text{H}$ -RMN de la $\beta$ -ionona.	82
21	Desplazamientos químicos en el espectro de $^1\text{H}$ -RMN del óxido de cariofileno.	82
22	Desplazamientos químicos en el espectro de $^1\text{H}$ -RMN del ácido tíglico.	83
23	Desplazamientos químicos en el espectro de $^1\text{H}$ -RMN del ácido hexanoico.	83
24	Asignación de las señales que están correlacionadas con la actividad leishmanicida de los extractos de diclorometano de <i>L. camara</i> .	90
25	Resumen de los parámetros para la validación del método de HPLC para la detección y cuantificación de los marcadores químicos	95

- 26 Cuantificación de ácido lantanílico y ácido camárico en los extractos de diclorometano de las distintas colectas de *L. camara* 97
- 27 Diferencias estadísticamente significativas al final del tratamiento con los extractos o compuestos vs el control sin tratamiento (ANOVA de una vía de comparaciones múltiples con análisis post-hoc de Tukey) 103

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Variedades de <i>Lantana camara</i> L.	14
2	Compuestos representativos de <i>Lantana camara</i> .	17
3	Monoterpenos y sesquiterpenos comúnmente presentes en el aceite esencial de <i>L. camara</i> .	18
4	Principales triterpenos encontrados en <i>L. camara</i> .	19
5	Placa cromatográfica revelada con reactivo de Liebermann-Burchard de las fracciones obtenidas a partir del extracto de diclorometano de <i>L. camara</i> y su aceite esencial. Lc (extracto completo), FI-FXVIII (fracciones) y AE (aceite esencial).	23
6	Estructuras químicas de los 10 componentes mayoritarios de la FII. Los números en negritas indican aquellos compuestos que estaban disponibles comercialmente y que fueron evaluados individualmente frente a <i>L. mexicana</i> .	58
7	Cromatograma de las fracciones FX, FXI, FXV y FXVI. Fase estacionaria: X-Terra RP-18, 4.6x150 mm, 3.5 $\mu$ m; Fase móvil: 70% ACN, 30% H <sub>2</sub> O (0.1% TFA); Flujo: 1 mL/min; $\lambda$ = 210 nm.	59
8	Cromatograma de la purificación de los picos de la FXV. Fase estacionaria: X-Terra RP-18, 4.6x150 mm, 3.5 $\mu$ m; Fase móvil: 60% ACN, 40% H <sub>2</sub> O (0.1% TFA); Flujo: 1 mL/min (0-3 min), 1.8 mL/min (3-10 min), 1 mL/min (10-13 min); $\lambda$ = 210 nm.	60
9	Estructuras químicas de los componentes mayoritarios de la FXV. Los números en negritas indican aquellos compuestos que fueron evaluados frente a <i>L. mexicana</i> .	61
10	Núcleo oleanano, base de los triterpenos activos obtenidos del extracto de diclorometano de <i>L. camara</i> .	68
11	Triterpenos previamente aislados de un espécimen pakistaní de <i>L. camara</i> .	69

12	Saponinas triterpénicas de tipo oleanano con actividad leishmanicida aisladas de <i>Hedera helix</i> .	71
13	Triterpenos de tipo oleanano con actividad leishmanicida.	72
14	Ruta metabólica para la biosíntesis de los esteroles membranales identificados en <i>Leishmania</i> spp.	74
15	Triterpenos de tipo oleanano con actividad inhibitoria <i>in silico</i> de CYP51.	75
16	Placa de cromatografía en capa fina de los extractos de <i>L. camara</i> . 1: Marzo 2014, 2: Enero 2015, 3: Junio 2015, 4: Agosto 2015, 5: Agosto b 2015, 6: Septiembre 2015, 7: Octubre 2015, 8: Noviembre 2015, 9: Diciembre de 2015 y 10: Septiembre 2016. A) Placa eluida con hexano:acetato de etilo (3:2), sin revelar; B) Placa eluida con hexano:acetato de etilo (3:2), revelada con reactivo de Liebermann-Burchard; C) Placa eluida con tolueno:éter (1:1) saturado con ácido acético al 10%, sin revelar; C) Placa eluida con tolueno:éter (1:1) saturado con ácido acético al 10%, revelada con reactivo de Liebermann-Burchard.	78
17	Comparación de los valores de $CI_{50}$ de los extractos de <i>L. camara</i> sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> . ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, con análisis post-hoc de Tukey, $p < 0.0001$ , $n = 3$ .	80
18	Espectros $^1H$ -RMN (700 MHz, $CDCl_3$ , 25 °C) de los extractos de las distintas colectas de <i>L. camara</i> .	84
19	Espectros $^1H$ -RMN (700 MHz, $CDCl_3$ , 25 °C) de 30 mg de extracto en $CDCl_3$ . A) Extracto muy activo (Septiembre 2015). B) Extracto medianamente activo (Junio 2015). C) Extracto poco activo (Agosto b 2015).	85

20	Espectros apilados de $^1\text{H}$ -RMN de los extractos de las distintas colectas de <i>L. camara</i> .	87
21	Espectros de $^1\text{H}$ -RMN superpuestos procesados de los extractos de las distintas colectas de <i>L. camara</i> para el análisis multivariado.	88
22	Gráfica de scores de los 3 componentes principales en el análisis de componentes principales (PCA), mostrando los agrupamientos naturales de los extractos, correlacionando su actividad leishmanicida con su perfil espectral.	89
23	Gráfica de la actividad leishmanicida predicha vs la actividad leishmanicida medida, de los extractos de diclorometano de <i>L. camara</i> colectada en diferentes épocas del año, considerando la región del espectro de RMN de 0.6–6.1 ppm.	93
24	Curva de calibración para establecer la linealidad del sistema. A) Cromatogramas para cada una de las concentraciones. B) Curva de calibración.	95
25	Cromatogramas representativos de la cuantificación de ácido lantanílico y ácido camárico en los extractos de diclorometano de <i>L. camara</i> colectada en distintas épocas del año.	97
26	Efecto del tratamiento sobre el tamaño del cojinete plantar en los distintos grupos de ratones infectados con <i>Leishmania mexicana</i> .	99
27	Compuestos de origen vegetal con actividad inmunomoduladora en leishmaniasis.	102
28	Efecto del tratamiento sobre la carga parasitaria en los distintos grupos de ratones infectados con <i>Leishmania mexicana</i> .	103



## RESUMEN

Las leishmaniasis son parasitosis ocasionadas por protozoarios del género *Leishmania* y son transmitidas por la picadura de flebotominos. Estas enfermedades afectan, aproximadamente, a 15 millones de personas en 98 países, incluido México. Desde 1913, los compuestos antimoniales han sido los medicamentos de primera elección. Sin embargo, éstos presentan cardiotoxicidad y los parásitos han desarrollado resistencia. Por otra parte, los fármacos de segunda línea presentan numerosas desventajas que reducen su potencial para combatir estas enfermedades. Una de las estrategias actuales para el desarrollo de nuevos fármacos para tratar leishmaniasis involucra el uso de plantas medicinales de las regiones endémicas de la enfermedad. En 2015, nuestro grupo de investigación reportó que el extracto de diclorometano de *Lantana camara* poseía una importante actividad leishmanicida contra *Leishmania amazonensis* ( $CI_{50} = 21.8 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$ ,  $IS > 9$ ). No obstante, los compuestos responsables de la actividad no habían sido identificados. En el presente trabajo, se planteó identificar los compuestos presentes en el extracto de *L. camara* relacionados con su actividad leishmanicida y mediante un análisis metabólico, seleccionar los marcadores químicos idóneos para construir y validar un método analítico para la obtención de un extracto cuantificado y el desarrollo de una forma farmacéutica para el tratamiento de leishmaniasis cutánea. El fraccionamiento del extracto por cromatografía en columna abierta rindió 18 fracciones (FI-FXVIII), de las cuales las fracciones FII, FX, FXI y FXV mostraron un mejor efecto leishmanicida. Como principales componentes de estas fracciones, se identificaron los siguientes compuestos: eicosano, escualeno, ácido tíglico,  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\beta$ -ionona, ácido hexanoico, ácido lantanílico, ácido camárico y lantadeno B. De éstos, los últimos tres poseían la actividad leishmanicida más potente ( $CI_{50} < 25 \mu\text{M}$ ). A través de un estudio metabólico por RMN, se determinó el perfil químico de distintas colectas de *L. camara*. Mediante quimiometría, se logró establecer que la concentración de estos tres triterpenos está directamente relacionada con el potencial leishmanicida de los extractos. Este hallazgo, permitió seleccionar a estos compuestos como marcadores químicos bioactivos para el desarrollo de una forma farmacéutica para el tratamiento de leishmaniasis cutánea. La evaluación *in vivo* del extracto cuantificado, que contenía la mayor cantidad de triterpenos, disminuyó la carga parasitaria a un 47%.

Palabras clave: *Lantana camara*, terpenoides, actividad leishmanicida, metabólica, quimiometría.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are parasitic diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania* and they are transmitted through the bite of phlebotomins. These diseases affect about 15 million people in 98 countries, including Mexico. Since 1913, antimonial compounds have been used as first line drugs. Nevertheless, they present cardiotoxicity, and parasites have developed resistance. On the other hand, second line drugs possess several disadvantages, which diminish their potential to heal these diseases. One of the current strategies for the development of new leishmaniasis treatments involves the use of medicinal plants from endemic areas. In 2015, our investigation group reported that the dichloromethane extract from *Lantana camara* elicited an important leishmanicidal effect against *Leishmania amazonensis* ( $IC_{50} = 21.8 \pm 2.4 \mu\text{g/mL}$ , IS > 9). However, the compounds responsible for that activity had not been identified. The aim of the present study was to identify the main compounds related to the leishmanicidal activity of the *L. camara* extract and, by conducting a metabolomics analysis, to select the optimal chemical markers to establish and validate an analytical method for obtaining a quantified extract and developing a pharmaceutical form for cutaneous leishmaniasis treatment. The chromatographic fractionation of the extract yielded 18 fractions (FI-FXVIII), from which, FII, FX, FXI and, FXV, showed the best leishmanicidal effect. Eicosane, squalene, tiglic acid,  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide,  $\beta$ -ionone, hexanoic acid, lantanilic acid, camaric acid and lantadene B, were identified as the main compounds in these fractions. The last three ones, presented the most potent antileishmanial activity ( $IC_{50} < 25 \mu\text{M}$ ). Through a NMR-based metabolomics approach, the chemical profile of different harvestings from *L. camara* was determined. On the other hand, the chemometrics analysis directly correlated the leishmanicidal activity with the three triterpenes' concentrations. This finding allowed to select these compounds as bioactive chemical markers for the development of a pharmaceutical form for the cutaneous leishmaniasis treatment. The extract containing the highest concentration of triterpenes diminished the parasitic load to a 47% in the *in vivo* leishmaniasis model.

Key words: *Lantana camara*, terpenoids, leishmanicidal activity, metabolomics, chemometrics.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las leishmaniasis son consideradas por la Organización Mundial de la Salud, como un grupo de enfermedades tropicales desatendidas, debido a que afectan a un número reducido de personas en el mundo, específicamente en países pobres o en vías de desarrollo. El tratamiento de primera línea que se usa actualmente consiste en compuestos de antimonio pentavalente, los cuales son altamente tóxicos y en algunos países ya no son efectivos. Los medicamentos de segunda línea son anfotericina B, miltefosina y pentamidina; sin embargo, éstos son costosos y de uso limitado, debido a su toxicidad. Por este motivo, la búsqueda de nuevas moléculas para el tratamiento de los distintos tipos de leishmaniasis ha recurrido a distintas estrategias, tales como la semisíntesis y la síntesis total de compuestos activos, el desarrollo de vacunas, el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos y, de manera importante, los productos naturales. En una investigación previa a este proyecto, nuestro grupo de investigación evaluó la actividad leishmanicida sobre *Leishmania amazonensis* de 10 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana como antiparasitarias. El extracto que mostró el mejor índice de selectividad (IS) fue el de diclorometano de *Lantana camara*. Posteriormente, se realizó el fraccionamiento cromatográfico del extracto, a partir del cual se obtuvieron 18 fracciones, de las cuales 16 poseían actividad leishmanicida, con un índice de selectividad,  $IS > 5$  y 5, un  $IS > 10$ . En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue identificar el marcador químico idóneo relacionado con la actividad leishmanicida de *L. camara* y establecer un método analítico para su identificación y cuantificación para el desarrollo de un extracto estandarizado. Con este objetivo propuesto, las fracciones cromatográficas que presentaron una actividad leishmanicida más alta que la del extracto ( $CI_{50} < 22 \mu\text{g/mL}$ ,  $IS > 10$ ) fueron analizadas para purificar e identificar los componentes responsables del efecto farmacológico, los cuales podrían ser candidatos para ser seleccionados como marcadores químicos de esta especie para el desarrollo de un extracto cuantificado con actividad leishmanicida. Por otra parte, debido a que se ha demostrado que la

síntesis de metabolitos secundarios en *L. camara* se modifica de acuerdo con la temporada del año o la distribución geográfica, era necesario definir las condiciones bajo las cuales la presencia y concentración de compuestos con actividad leishmanicida eran las óptimas. En este sentido, se realizó un análisis metabólico de los extractos preparados a partir de especímenes de *L. camara* recolectados en diferentes etapas del año 2015, empleando cromatografía en capa fina y resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H-RMN}$ ). Este análisis también permitió seleccionar el marcador químico idóneo para el cual se desarrolló y validó un método analítico, que podrá ser utilizado para control de calidad de extractos estandarizados preparados a partir de *L. camara*. Este trabajo constituye el punto de partida para el desarrollo de un extracto cuantificado que podrá ser utilizado, en estudios posteriores para la elaboración de fitofármacos útiles para el tratamiento de la leishmaniasis.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Situación mundial de la leishmaniasis**

La leishmaniasis es una enfermedad antroponóptica ocasionada por protozoarios del género *Leishmania*. Es transmitida por la picadura de la mosca arenera de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (den Boer et al., 2011). De acuerdo con sus manifestaciones clínicas, puede ser clasificada en tres grupos: cutánea, mucocutánea y visceral (Monzote, 2009).

La forma cutánea está caracterizada por úlceras localizadas en cara y extremidades, las cuales, incluso después de sanar, pueden desfigurar y causar estigma social (Handler et al., 2015).

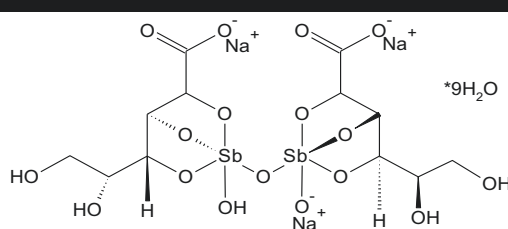
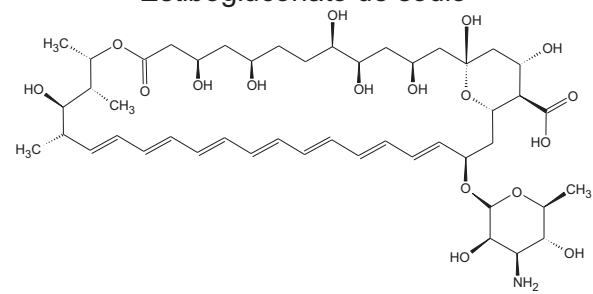
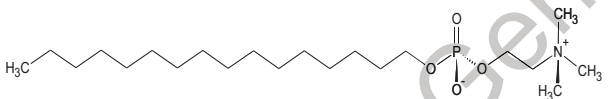
Por otro lado, la leishmaniasis mucocutánea es encontrada principalmente en el continente americano; puede presentarse años después de que las lesiones cutáneas han desaparecido. Como el nombre lo indica, ataca a tejidos de tipo mucoide, como nariz y boca, ocasionando congestión nasal, sangrado, inflamación

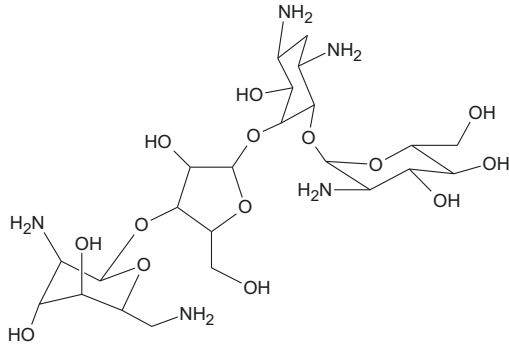
o erosión de la mucosa, además de perforación del septo nasal. La boca es comúnmente menos afectada que la nariz, pero se puede presentar destrucción de la boca y la faringe (Handler et al., 2015).

La leishmaniasis visceral es también conocida como kala-azar y es ocasionada por especies del complejo de *Leishmania donovani*. El periodo de incubación va desde 2 a 6 meses, incluso hasta varios años. El paciente presenta fiebre, pérdida de peso y organomegalia, que persiste por meses, sobre todo en bazo y en menor medida en hígado. En algunas regiones de Sudán es observable linfadenopatía; mientras que en Asia del Sur se presenta el oscurecimiento de la piel, de ahí el nombre de kala-azar (que significa fiebre negra en hindi). También se presenta anemia, trombocitopenia y neutropenia, derivadas de la supresión de médula ósea, entre otras manifestaciones clínicas (van Griensven and Diro, 2012).

Se estima que en el mundo existen alrededor de 13 millones de personas afectadas por leishmaniasis, las cuales viven en países en vías de desarrollo. La mayoría de los casos corresponden a la forma cutánea y un mínimo porcentaje, a la forma visceral (Tiuman et al., 2011). Desde 1923 hasta la fecha, el tratamiento de la leishmaniasis ha consistido en compuestos orgánicos de antimonio pentavalente (Sundar y Chakravarty, 2010), siendo el estibogluconato de sodio y el antimoniato de meglumina, los utilizados de primera línea (Rajasekaran y Chen, 2015). Sin embargo, una de las principales desventajas de estos fármacos es que tienen efectos adversos tales como cardiotoxicidad (Sundar y Chakravarty, 2010), además de que en algunos países, como India, algunas cepas ya han desarrollado resistencia. Debido a esta situación, han surgido fármacos de segunda línea con menos efectos adversos pero que son muy costosos. Ejemplos de éstos son la anfotericina B, la pentamidina y la miltefosina (Cuadro 1) (Singh et al., 2014; Perrone et al., 2015).

Cuadro 1. Fármacos empleados actualmente para el tratamiento de la leishmaniasis, estructuras, dosis, blanco farmacológico, mecanismo de acción y efectos adversos.

Fármaco	Dosis	Blanco farmacológico	Mecanismo de acción	Desventajas
 <p>Estibogluconato de sodio</p>	20 mg/kg, diario por 30 días, vía intramuscular.	Tripanotión reductasa	Sb (III) inhibe la tripanotión reductasa, exponiendo al parásito a estrés oxidativo.	Resistencia, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, pancreatitis
 <p>Anfotericina B</p>	0.75-1.0 mg/kg, 15-20 infusiones diario o alternado, vía intravenosa.	Metabolismo de esteroides	Forma complejos con esteroides 24-sustituidos y ergosterol en la membrana celular creando poros y ocasionando un desbalance de iones y muerte celular.	No es efectiva en todas las especies de <i>Leishmania</i> , daño pancreático, taquicardia. Necesita cadena de frío.
 <p>Miltefosina</p>	100-150 mg diario por 30 días, vía oral.	Metabolismo del inositol	Interactúa con la membrana celular y activa fosfolipasa.	Potencial desarrollo de resistencia, teratogenicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, vómito y diarrea.



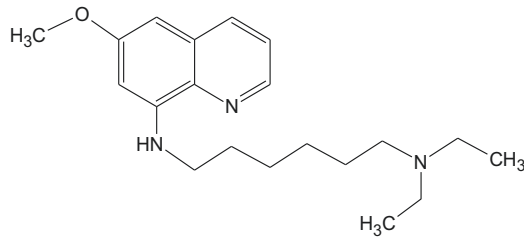
Paromomicina

16 mg/kg por 12 días o 20 mg/kg por 17 días, vía intramuscular.

Síntesis de proteínas.

Inhibe la síntesis de proteínas por su unión con la subunidad 30S del ribosoma, además de que afecta a la mitocondria.

Eficacia dependiente de especie, nefrotoxicidad severa y hepatotoxicidad.



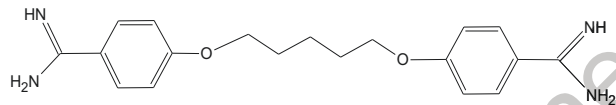
Sitamaquina

1.72-2 mg/kg diario por 28 días.

Cadena respiratoria mitocondrial.

El mecanismo no está elucidado, pero podría afectar la cadena respiratoria mitocondrial.

Pocos estudios sobre eficacia, mecanismo de acción y efectos tóxicos.



Pentamidina

2 mg/kg diario, una semana, vía intramuscular.

ADN del kinetoplasto.

El efecto primario es incierto, pero puede acumularse en el parásito y modificar el ADN del kinetoplasto.

Eficacia dependiente de especie, daño pancreático y cardiovascular.

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

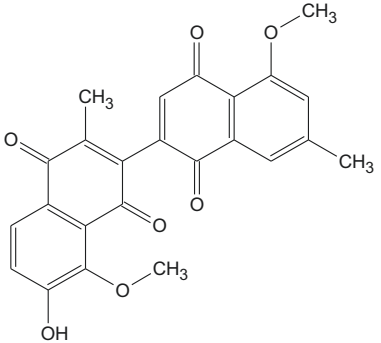
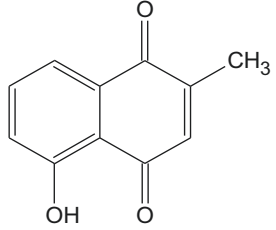


Por otro lado, el desarrollo de una vacuna ha sido alentado, debido a que la mayoría de las personas que se han recuperado de la infección por *Leishmania* sp., han adquirido inmunidad, además de que la relación costo-beneficio es más alta que en el caso de la quimioterapia; sin embargo, hasta el momento no existe una vacuna aprobada para la leishmaniasis humana y aunque varias vacunas han sido llevadas a estudios clínicos, la mayoría continúan en investigación temprana y desarrollo. Idealmente, una vacuna efectiva contra leishmaniasis debe permitir una inmunidad de larga duración que limite el uso de la quimioterapia y que involucre una respuesta inmune balanceada  $T_{h1}$  y  $T_{h2}$  a partir de la vacunación (Gillespie et al., 2016).

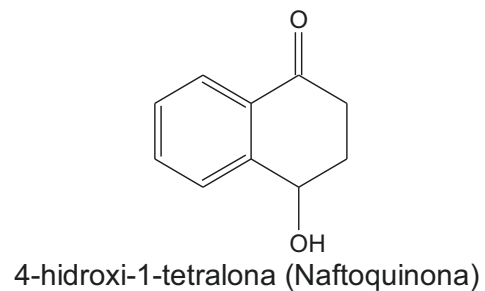
Por esta razón, diversos grupos científicos han retomado la investigación sobre plantas utilizadas etnomédicamente contra leishmania u otros parásitos para obtener moléculas prototipo, que por sí solas o mediante modificaciones estructurales puedan combatir la leishmaniasis. Compuestos pertenecientes a las familias de quinonas, alcaloides, terpenos, saponinas y fenoles, han mostrado tener importante actividad antiparasitaria y un mecanismo de acción altamente selectivo (Singh et al., 2014). En el Cuadro 2, se encuentran algunos de los productos naturales más representativos que poseen actividad leishmanicida.



Cuadro 2. Productos naturales representativos con actividad leishmanicida significativa (Singh et al., 2014).

Compuesto (Familia)	Aislado de	Actividad <i>in vitro</i> (Especie de <i>Leishmania</i> ; CI <sub>50</sub> )	Actividad <i>in vivo</i>	Mecanismo de acción
 Burmanina A (Naftoquinona)	<i>Diospyros burmanica</i>	<i>L. major</i> 0,053 ± 2.7 x 10 <sup>-3</sup> μM	ND	ND
 Plumbagina (Naftoquinona)	<i>Plumbago spp.</i>	<i>L. donovani</i> 2.24 μM <i>L. amazonensis</i> 5.87 μM	<i>L. amazonensis</i> 2.5 mg/kg/día <i>L. venezuelensis</i> 5 mg/kg/día	Perturbación de la cadena de transporte de electrones y generación de radicales libres

Dirección General de Bibliotecas UJAQ

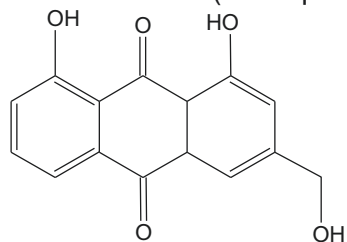


*Ampelocera edentula*

Cl<sub>90</sub>  
*L. braziliensis*  
 10 μM  
*L. amazonensis*  
 61 μM  
*L. donovani*  
 65 μM

*L. amazonensis*  
 y  
*L. venezuelensis*  
 25 mg/kg/día

ND



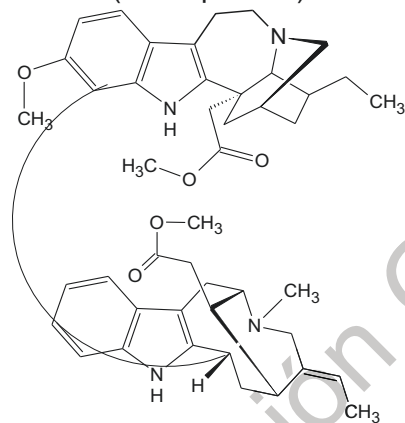
Aloe-emodina  
 (Antraquinona)

*Stephania dinklagei*

*L. donovani*  
 90 μM

ND

ND



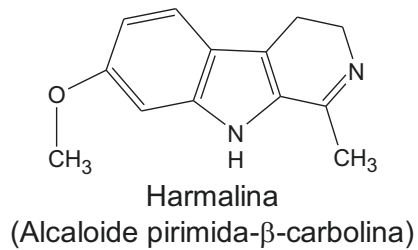
*Conopharyngia durissima*

*L. amazonensis*  
 100 μM

*L. amazonensis*  
 40 mg/kg/día

ND

Conodurina  
 (Alcaloide indólico)

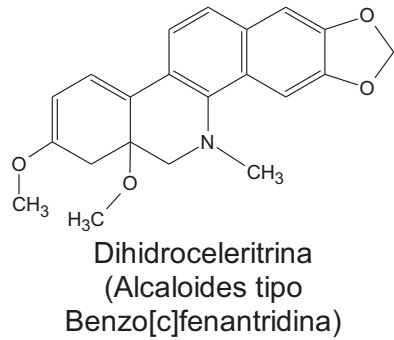


*Peganum harmala*

*L. guyanensis*  
1.16 μM

ND

Se intercala entre el ADN del parásito

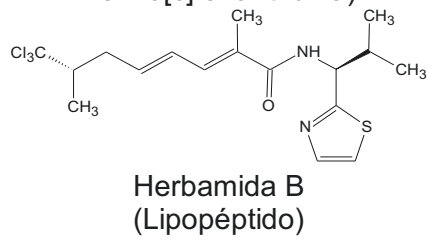


*Garcinia lucida*

*L. donovani*  
2.0 μM

ND

ND

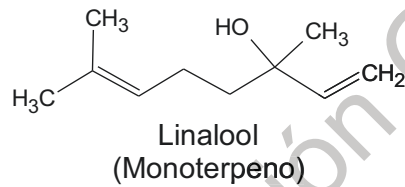


*Lyngbya majuscula*

*L. donovani*  
1.5 μM

ND

ND

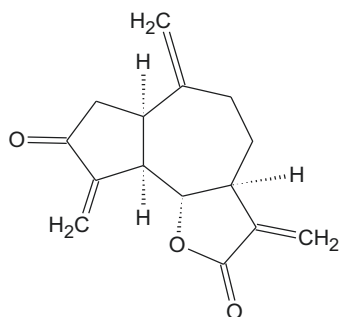


*Croton cajucara*

*L. amazonensis*  
15 ng/mL

ND

Destrucción del kinetoplasto e hinchamiento de la mitocondria y posteriormente, lisis del parásito



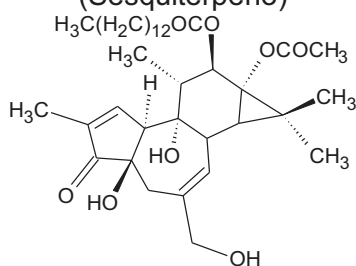
Dehidrozaluzanina C  
(Sesquiterpeno)

*Munnozia maronii*

11 especies de  
*Leishmania*  
10.23 – 40.93  $\mu$ M

*L. amazonensis*  
100 mg/kg/día

ND



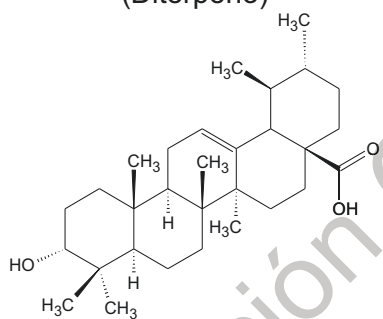
12-miristato de 13-acetato de forbol  
(Diterpeno)

*Croton cajucara*

*L. amazonensis*  
32.42 nM

ND

Cambios  
estructurales  
derivados de la  
activación de la  
PKC



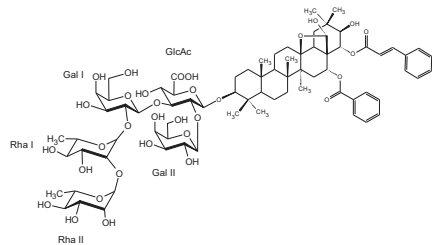
Ácido epi-oleanólico  
(Triterpeno)

*Celaenodendron  
mexicanum*

*L. donovani*  
18.8  $\mu$ M

ND

ND



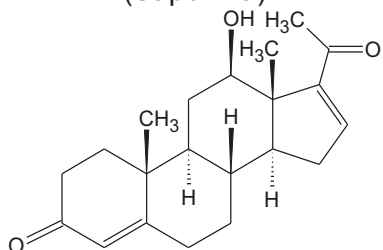
Mesabálido III  
(Saponina)

*Maesa balansae*

*L. infantum*  
5 nM

*L. infantum*  
0.4 mg/kg/día

ND



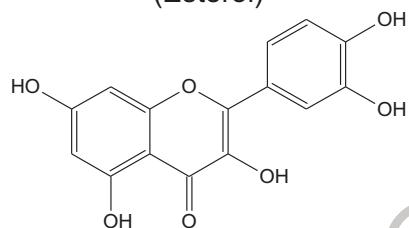
6,7-dihidroneridienona  
(Esterol)

*Pentalinon andrieuxii*

*L. mexicana*  
0.03  $\mu$ M

ND

ND



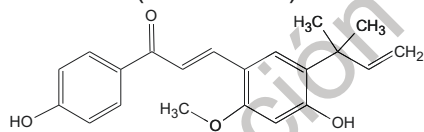
Quercetina  
(Flavonoide)

ND

ND

ND

Inhibición de la arginasa por interacción con la L-arginina y el cofactor  $Mn^{2+}$



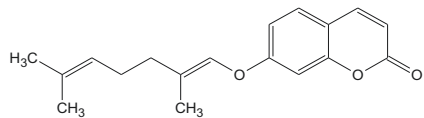
Licochalcona A  
(Chalcona)

ND

*L. major*  
21  $\mu$ M  
*L. donovani*  
2.7  $\mu$ M

*L. major*  
20 mg/kg/día

Alteración de la ultraestructura de la mitocondria seguido de daño de la cadena respiratoria



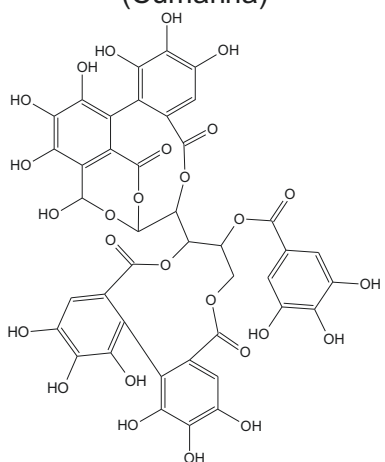
**Aurapteno  
(Cumarina)**

*Ferula szowitsiana*

*L. major*  
13.3  $\mu$ M

ND

ND



**Casuarinina  
(Tanino)**

*Punica granatum*  
*Casuarina* spp.  
*Stachyurus* spp.

*L. donovani*  
0.52  $\mu$ M

ND

ND

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Recientemente, nuestro grupo de investigación estudió el efecto leishmanicida *in vitro* de 10 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana contra diversas parasitosis. Las plantas seleccionadas fueron: *Acacia farnesiana* (Huizache), *Bahinia variegata* (Pata de vaca), *Bouvardia ternifolia* (Trompetilla), *Caesalpinia pulcherrima* (Tabachín), *Conyza filaginoides* (Simonillo), *Lantana camara* (Alfombrilla), *Portulaca oleracea* (Verdolaga), *Prosopis laevigata* (Mezquite), *Psidium guajava* (Guayaba) y *Schinus molle* (Pirul). Se prepararon 3 extractos diferentes de cada planta con el objetivo de obtener metabolitos de distintas polaridades: diclorometano (baja polaridad), diclorometano/metanol (1:1) (mediana polaridad) y agua (polar). Los 30 extractos fueron evaluados en la cepa de *Leishmania amazonensis* cepa MHOM/77BR/LTB0016 ( $CI_{50}$ ) y también se determinó su citotoxicidad en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c ( $CC_{50}$ ), para calcular el índice de selectividad (IS). De acuerdo al IS, los extractos fueron clasificados en 16 inactivos ( $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ ), 7 inespecíficos ( $1 < IS < 5$ ), 3 tóxicos ( $IS < 1$ ) y 4 activos ( $IS > 5$ ). Los 4 extractos activos fueron: los extractos de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  de *S. molle* ( $IS = 5$  y  $6$ , respectivamente), el extracto acuoso de *P. laevigata* ( $IS = 7$ ) y el extracto de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *L. camara* ( $IS > 9$ ) (Delgado-Altamirano et al., 2017). Debido a que el extracto de diclorometano de *L. camara* presentó el mayor índice de selectividad, se procedió a realizar el estudio fitoquímico biodirigido de esta planta.

## 2.2 *Lantana camara* (L.)

El género *Lantana* fue descrito por primera vez en 1753 por Linnaeus, contenía 7 especies: 6 de Sudamérica y 1 de Etiopía. El género *Lantana* es principalmente nativo de las regiones subtropicales y tropicales de América, sin embargo, existen algunas variedades naturales de Asia y África. Actualmente, se encuentra distribuida en 50 países donde muchas especies son cultivadas bajo cientos de nombres. La cantidad de especies de *Lantana* varía de 50 a 270, no obstante, parece ser un mejor estimado 150 especies. El género es particularmente difícil de clasificar taxonómicamente debido a que las especies no son estables y tienen una

gran capacidad de hibridación. La forma de las inflorescencias cambia con la edad y el color de las flores puede cambiar con la edad y la madurez. El espécimen más comúnmente conocido es el rojo, pues es la variedad más ampliamente distribuida. No obstante, puede presentarse como una planta leñosa con flores de varios colores: rojo, violeta, rosa, blanco, amarillo y anaranjado (Figura 1) (Weyerstahl et al., 1999; Santos, 2002; Queensland, 2003).



Figura 1. Variedades de *Lantana camara* L.

Siendo una planta nativa de América tropical y subtropical, exploradores holandeses la introdujeron desde Brasil hasta Holanda hacia 1600 y para el fin de ese siglo, ya había sido llevada a distintas partes de Europa, Gran Bretaña y Norteamérica. Posteriormente, fue importada en Hawaii como flor de jardín y rápidamente fue extendida a las islas del Pacífico, Australia y el sur de Asia. De igual manera, de Natal (ciudad de Sudáfrica) las semillas fueron esparcidas por aves a áreas más cálidas del mismo país (Ghisalberti, 2000).



Se ha observado que *L. camara* es una planta agresiva y una maleza invasora que ha entrado en vastas extensiones de pastos, huertos y bosques en muchas regiones tropicales y subtropicales, lo cual se ve favorecido gracias a que no posee predadores naturales y es prácticamente inmune al ataque de herbívoros, debido a los metabolitos secundarios que sintetiza (Sousa and Costa, 2012). Se estima que 4 millones de hectáreas en Australia y 160,000 en Hawaii han sido infestadas por esta planta. Por esta razón, *L. camara* es considerada una de las 10 malezas más nocivas en el mundo (Ghisalberti, 2000). Sin embargo, esta facilidad de crecimiento es lo que la hace una excelente candidata para su explotación como fuente de compuestos bioactivos.

#### 2.2.1 Usos etnofarmacológicos/etnobotánicos

Debido a su amplia distribución alrededor del mundo, *L. camara* ha sido utilizada de manera tradicional contra una gran variedad de afecciones. Un té preparado a partir de las hojas y las flores es usado contra la fiebre, la influenza y el dolor de estómago. En América Central y del Sur, las hojas se preparan en cataplasmas para tratar raspaduras, varicela y sarampión. Así mismo, la fiebre, el resfriado, el reumatismo, el asma y la presión arterial alta son tratadas con diferentes preparaciones de la planta. En Ghana, la infusión de la planta completa se usa para tratar la bronquitis y la raíz pulverizada en leche, se da a los niños para el dolor de estómago. En algunos países asiáticos, las hojas son usadas para el tratamiento de cortaduras, reumatismo, úlceras y también como vermífugo. Las decocciones son aplicadas externamente en los casos de lepra y sarna. Se ha proclamado que las hojas de *L. camara* poseen un esteroide, la lancamarona, el cual exhibe propiedades cardiotónicas y que la lantamina, un alcaloide de la corteza del tallo y las raíces, posee actividad antipirética y antiespasmódica, comparables a las de la quinina (Ghisalberti, 2000).

En México, esta planta se utiliza en padecimientos gastrointestinales como dolor e inflamación estomacal, dolor de intestino, dolor de muelas, afecciones de hígado,

derrame de bilis, amibas y vómito. En Chiapas, Puebla y Veracruz se usa para tratar la diarrea fuerte y aguda, caracterizada por evacuaciones semilíquidas o líquidas ocasionadas por alimentos en mal estado o mal cocidos. Se recomienda tomar un té preparado con las hojas, ramas o raíces de esta planta, y suele acompañarse de *Helianthemum glomeratum* (cenicilla), *Cyperus hermaphroditus* (tule), *Verbena litoralis* (verbena) o *Baccharis serratifolia* (hierba del carbonero) y *B. trinervis* (cuquelite) o con hojas de *Psidium guajava* (guayaba) y pedacitos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2019).

Para aliviar el cólico, dolor característico de la colitis que suele acompañarse de retortijones, se bebe el cocimiento de las hojas; o bien, éstas se mastican crudas; o se usa la decocción de las ramas administrada por vía oral. Entre los mixes, totonacos y zapotecos, la llaman comúnmente orozú y la utilizan para la curación de la disentería (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2019).

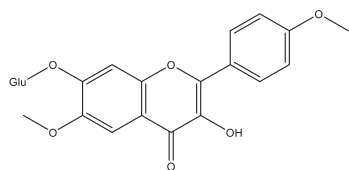
En afecciones respiratorias como catarro y tos ferina, se usan sólo las ramas en cocimiento o combinadas con *Baccharis vaccinioides* (meste) y hojas de ciprés; cuando la mucosidad es roja, esta infusión se toma caliente (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2019).

### 2.2.2 Composición química

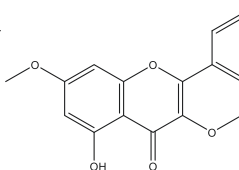
El estudio de la composición fitoquímica de *L. camara* fue alentado desde el descubrimiento de la presencia de compuestos tóxicos en ciertas variedades, que ocasionaban la muerte de ganado, generando importantes pérdidas económicas a los dueños de los animales (Ghisalberti, 2000).

Los principales productos naturales que se han encontrado de *L. camara* pertenecen a los grupos de los flavonoides, glicósidos iridoides, oligosacáridos, fenilpropanoides glicosilados, naftoquinonas y terpenoides (Sharma et al., 2007). Ejemplos de estos compuestos se muestran en la Figura 2.

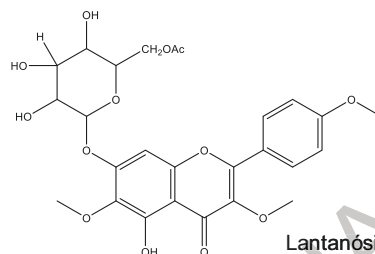
## Flavonoides



Camarósido

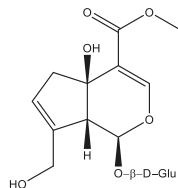


Camarósido

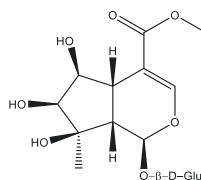


Lantanósido

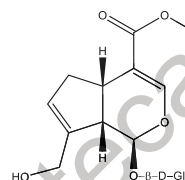
## Iridoides glicosilados



Theviridósido

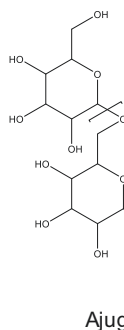


Lamiridósido

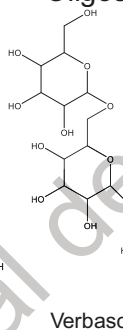


Genipósido

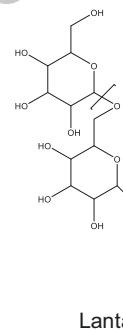
## Oligosacáridos



Ajugosa

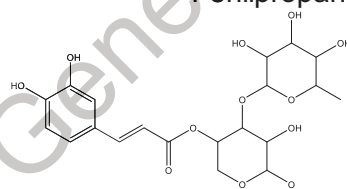


Verbascotetracosa

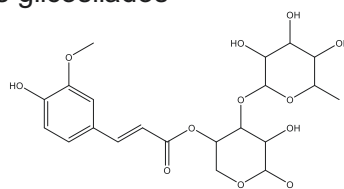


Lantanosa A

## Fenilpropanoides glicosilados

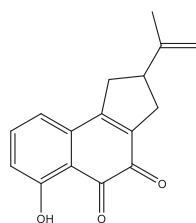


Verbascósido

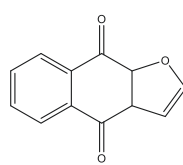


Martínósido

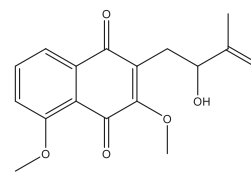
## Naftoquinonas



Lantalucratina A



Furano-1,4-naftoquinona



Lantalucratina B

Figura 2. Compuestos representativos de *Lantana camara*.

Dentro de la familia de los terpenoides, *L. camara* presenta monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos; siendo estos últimos los que han recibido mayor interés por parte de diversos grupos de investigación, ya que a dicho grupo pertenecen las toxinas presentes en la planta. Tanto los monoterpenos como los sesquiterpenos han sido encontrados, principalmente, en el aceite esencial de partes aéreas. Algunos de los monoterpenos más comunes encontrados en el aceite son el sabineno, el  $\beta$ -pineno y el 1,8-cineol; mientras que del grupo de los sesquiterpenos se encuentran el  $\alpha$ - y  $\beta$ -cariofileno, el  $\alpha$ -curcumeno, el  $\beta$ -elemeno, el germacreno D y la davanona (Figura 3) (Misra and Laatsch, 2000; Sefidkon, 2002a; Alitonou et al., 2004; Randrianalijaona et al., 2005; Machado et al., 2010; Baroty et al., 2014).

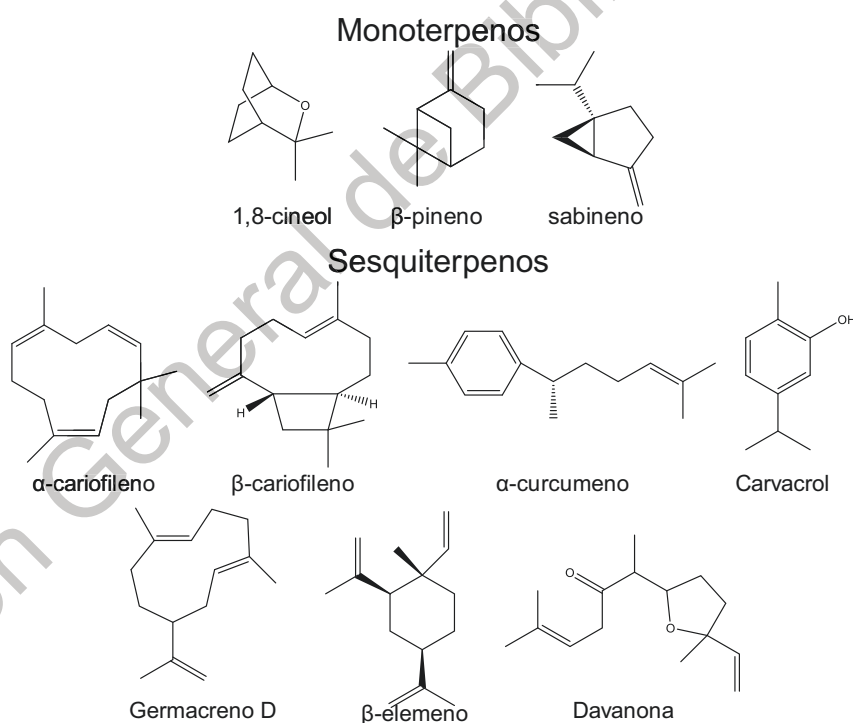


Figura 3. Monoterpenos y sesquiterpenos comúnmente presentes en el aceite esencial de *L. camara*.

En lo que respecta a los triterpenos, la mayoría de ellos han sido aislados de las hojas de *L. camara*, son pentacíclicos y pertenecen a las series oleanano, principalmente; y en menor proporción a la serie ursano y lupano (Sharma et al.,

2007). Se conoce un total de 74 triterpenoides; 69 pentacíclicos (39 de núcleo oleanano, 25 ursano y 5 lupano) y 5 tetracíclicos (núcleo eufano) (Sousa and Costa, 2012). Se sabe que, en las hojas de la variedad roja de *L. camara*, los lantadenos A, B, C y D son los componentes mayoritarios (Figura 4), mientras que los lantadenos reducidos A y B son minoritarios. En la variedad rosa se encuentran ausentes los lantadenos A y B. Por otro lado, el perfil de triterpenos de las raíces es diferente al de las hojas, ya que el ácido oleanólico y el ácido oleanónico, son los componentes mayoritarios. Algunas otras variedades de *L. camara* de origen chino muestran la presencia de ácido lantoico y otros triterpenos derivados del ácido oleanólico y ursólico (Sharma et al., 2007), lo que muestra que la distribución geográfica influye en el perfil fitoquímico de la planta. Otro factor que influye en el perfil de los compuestos encontrados en los extractos de *L. camara* es el periodo estacional, fenómeno observado y reportado por Randrianalijaona y col. en 2005.

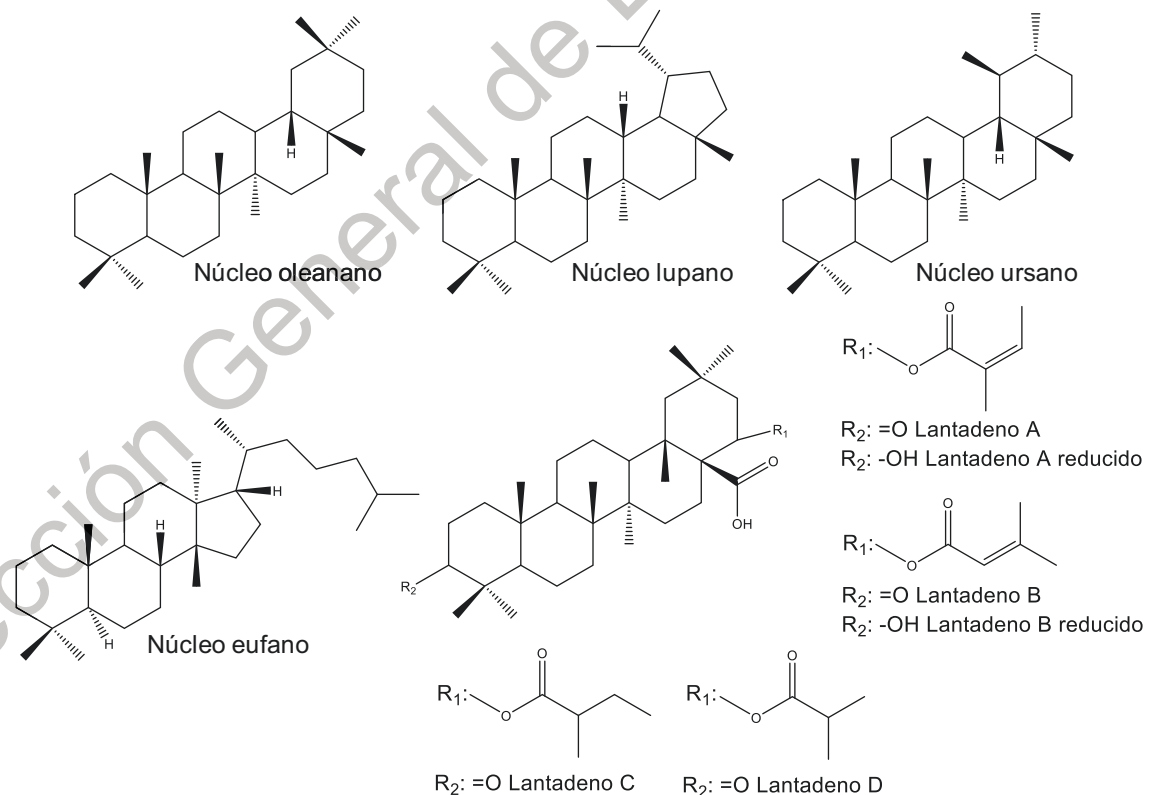


Figura 4. Principales triterpenos encontrados en *L. camara*.

2.2.3 Actividad biológica presentada por compuestos obtenidos a partir de especímenes de *L. camara*

En diversos estudios hechos en especímenes de *L. camara* obtenidos de distintos puntos geográficos, se han logrado identificar diferentes compuestos con una amplia gama de actividades biológicas y farmacológicas. En el Cuadro 3 se muestran algunos de ellos, mientras que sus estructuras se enlistan en el Anexo I.

Cuadro 3. Compuestos aislados de *L. camara* y actividad biológica (Modificado de Sharma et al., 2007).

Compuesto	Parte de la planta	Actividad biológica
<b>Flavonoides</b>		
Camarásido	Hojas	Antitumoral
Linarósido	Partes aéreas	Nematicida
Lantanósido	Partes aéreas	Nematicida
<b>Fenilpropanoides glicosilados</b>		
Verbascósido	Hojas	Inhibidor de la proteínkinasa C y antitumoral
Martinósido	Hojas y ramas pequeñas	Cardioactivo
Lantanásido	Hojas	Antitumoral
<b>Triterpenos</b>		
Lantadeno A	Hojas, tallos y raíces	Hepatotóxico, antimicrobiano, antiviral, antitumoral, antituberculoso y alelopático
Lantadeno B	Hojas, tallos y raíces	Hepatotóxico, antimicrobiano, antiviral, antitumoral y alelopático
Lantadeno C	Hojas y tallos	Hepatotóxico y antiviral
Lantadeno A reducido	Hojas y tallos	Hepatotóxico y antiviral
Lantadeno B reducido	Hojas y tallos	Antiviral
Icterogenina	Hojas y tallos	Hepatotóxico
Ácido oleanónico	Hojas, tallos y raíces	Inhibe la síntesis de leucotrienos y anti-inflamatorio

Ácido oleanólico	Hojas, tallos y raíces	Antimicrobiano, hepatoprotector, anti-inflamatorio, antihiperlipidémico, antitumoral e inhibición de la fosforilasa de glucógeno
Ácido ursólico	Hojas y raíces	Antimicrobiano, hepatoprotector, anti-inflamatorio, antihiperlipidémico, antitumoral y antibacterial
Ácido 4-epihederagónico	Hojas, tallos y raíces	Antimicrobiano
Ácido 24-hidroxi-3-oxours-12-en-28-oico	Hojas, tallos y raíces	Antimicrobiano
Ácido 22 $\beta$ -hidroxi-3-oxoolean-12-en-28-oico	Hojas y tallos	Antiviral
Ácido 22 $\beta$ -dimetilacriloiloxilantanólico	Hojas	Antimutagénico
Ácido 22 $\beta$ -acetoxilántico	Hojas	Antibacterial
Ácido camarínico	Partes aéreas	Nematicida
Triterpenoides eufánicos que contienen lactona cíclica 5,5-trans, fusionada	Hojas	Antitrombina
<b>Componentes del aceite esencial</b>		
(E)-cariofileno, $\gamma$ -cadineno, $\alpha$ -pineno, ocimeno, germacreno D	Partes aéreas	Antibacterial
<b>Compuestos alelopáticos</b>		
Umbeliferona, 6-metilcumarina, ácido salicílico, ácido genístico, ácido $\alpha$ -resorcílico, ácido $\beta$ -resorcílico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, vainillina, ácido ferúlico, quercetina	Hojas	Fitotóxico

#### 2.2.3.1 Actividad leishmanicida de compuestos presentes en *L. camara*

Existen pocos reportes sobre la actividad leishmanicida de *L. camara*. En lo que respecta a los compuestos volátiles, Machado y col., en 2012, publicaron que el aceite esencial de *L. camara* colectada en Brasil poseía una potente actividad contra promastigotes de *Leishmania amazonensis* y *L. chagasi*, con una CI<sub>50</sub> de 0.25  $\pm$

0.08 y  $18.00 \pm 4.00$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, comparado con  $0.90 \pm 0.5$  y  $1.91 \pm 0.02$   $\mu\text{g/mL}$  de anfotericina B, para cada una de las cepas. Se encontró que los principales componentes del aceite esencial pertenecían a la familia de los sesquiterpenos, siendo el germacreno D, el  $\beta$ -cariofileno y el (E,E)-farneseno, los compuestos mayoritarios y los probables responsables de la actividad (Machado et al., 2010). Por otro lado, en cuanto a los compuestos no volátiles, Begum y col., en 2014 encontraron 8 triterpenos con actividad sobre promastigotes de *Leishmania major*, obtenidos a partir del extracto metanólico de *L. camara* variedad roja, recolectada en Pakistán (Begum et al., 2014). Las concentraciones inhibitorias medias ( $\text{CI}_{50}$ ) obtenidas para estos triterpenos se muestran en el Cuadro 4. En dicho estudio se encontró que el ácido ursólico y el lantadeno A son los más potentes.

Cuadro 4. Triterpenos aislados de *L. camara* con actividad leishmanicida. (Modificado de Begum et al., 2014).

Compuesto	$\text{CI}_{50} \pm \text{DE}$ ( $\mu\text{M}$ )
Ácido lantanílico	$164.00 \pm 0.80$
Ácido lantoico	$97.00 \pm 0.02$
Ácido oleanólico	$53.00 \pm 0.02$
Ácido ursólico	$12.40 \pm 0.03$
Lantadeno A	$20.40 \pm 0.10$
Ácido betulínico	$101.00 \pm 0.30$
Ácido lantanílico	$21.30 \pm 0.02$
Ácido camarínico	$89.00 \pm 0.30$
Anfotericina B	$0.31 \pm 0.10$
Pentamidina	$15.00 \pm 0.10$

En cuanto a la actividad leishmanicida mostrada por *L. camara* colectada en Querétaro, nuestro grupo de investigación encontró que ni el extracto acuoso, ni el de diclorometano:metanol (1:1) poseen actividad contra *L. amazonensis*. Sin embargo, el extracto no polar de diclorometano sí presentó actividad y selectividad contra promastigotes y amastigotes intracelulares de esta especie de *Leishmania*. Dicho extracto tuvo un índice de selectividad (IS) mayor a 9, una concentración inhibitoria media sobre promastigotes y amastigotes de  $11.7 \pm 4.4$  y  $20.7 \pm 1.3$   $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. El perfil fitoquímico cualitativo de este extracto indicó la presencia de terpenos, principalmente; mientras que flavonoides, alcaloides y



glicósidos cardiotónicos se encontraron ausentes. Con el fin de evaluar la actividad de los compuestos volátiles presentes en el extracto, se preparó el aceite esencial de *L. camara*, el cual tuvo una concentración inhibitoria media para promastigotes de  $19.4 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$  y de  $20.7 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$  para amastigotes, no obstante su IS lo cataloga como inespecífico (IS=3), por lo que se concluyó que los componentes volátiles mayoritarios presentes en el aceite esencial ( $\beta$ -cariofileno, 13.27%; carvacrol, 7.95%;  $\alpha$ -curcumeno, 7.95%; fitol, 5.73;  $\alpha$ -muuroleno, 5.54%; compuestos más abundantes), de los cuales algunos están presentes en el extracto de diclorometano, no contribuyen de manera significativa a la actividad leishmanicida. Cuando se realizó el fraccionamiento del extracto de diclorometano por cromatografía en columna abierta (Figura 5), se observó que la actividad leishmanicida se repartía en 16 de las 18 fracciones obtenidas (Cuadro 5), en tanto que los IS más altos se concentraron en las fracciones con metabolitos de peso molecular mayor a 460 g/mol con un  $R_f < 0.5$ . De acuerdo a un análisis fitoquímico cualitativo que se realizó, los compuestos mayoritarios presentes en las fracciones con mayor actividad leishmanicida son triterpenos.

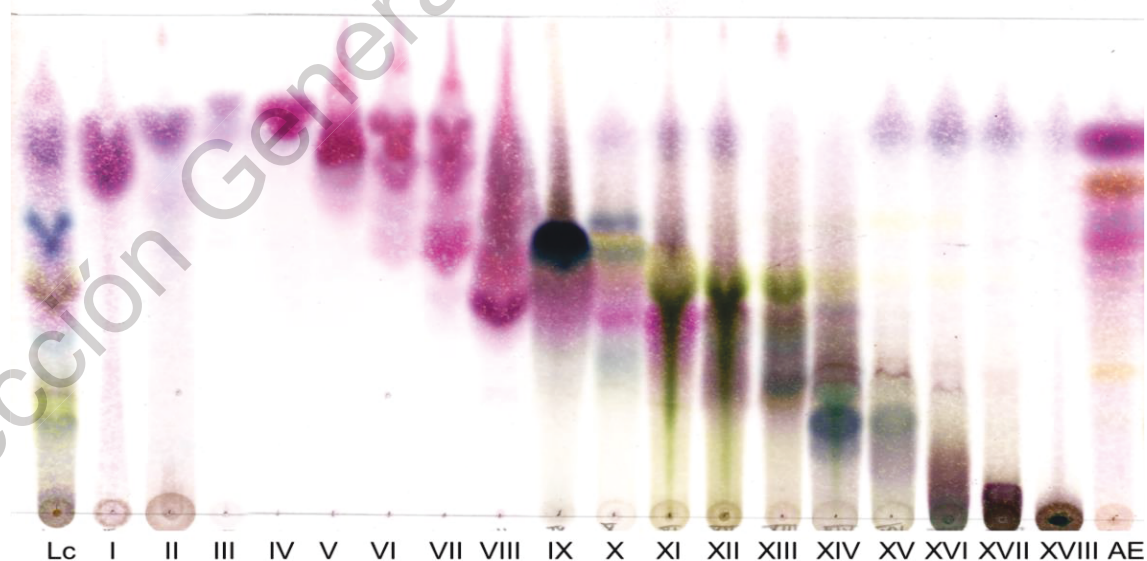


Figura 5. Placa cromatográfica revelada con reactivo de Liebermann-Burchard de las fracciones obtenidas a partir del extracto de diclorometano de *L. camara* y su aceite esencial. Lc (extracto completo), FI-FXVIII (fracciones) y AE (aceite esencial).

Cuadro 5. Actividad biológica de las fracciones obtenidas a partir del extracto de diclorometano de *Lantana camara* sobre *A. salina* (CL<sub>50</sub>), macrófagos peritoneales de ratón BALB/c (CC<sub>50</sub>) y amastigotes de *L. amazonensis* (Cl<sub>50</sub>).

Fracción/Extracto	CL <sub>50</sub> ± DE (µg/mL)	CC <sub>50</sub> ± DE (µg/mL)	Cl <sub>50</sub> ± DE (µg/mL)	IS
Extracto de DCM	20.70 ± 1.30	> 100	21.8 ± 2.4	> 9
Aceite esencial	125.0 ± 1.35	52.9 ± 2.1	17.0 ± 1.6	3
FI	530.8 ± 1.99	65.2 ± 2.3	12.2 ± 1.8	> 5
FII	91.5 ± 1.43	> 100	9.1 ± 3.4	> 11
FIII	> 1000	> 100	18.3 ± 1.5	> 5
FIV	> 1000	> 100	30.2 ± 3.5	> 3
FV	> 1000	> 100	17.9 ± 3.8	> 6
FVI	> 1000	> 100	21.5 ± 4.3	> 5
FVII	> 1000	96.8 ± 2.2	17.9 ± 2.5	> 5
FVIII	> 1000	92.3 ± 3.1	24.7 ± 2.9	> 4
FIX	> 1000	> 100	18.6 ± 1.5	> 5
FX	679.6 ± 6.03	> 100	7.9 ± 0.3	> 13
FXI	735.6 ± 4.35	> 100	8.0 ± 1.1	> 12
FXII	> 1000	> 100	16.7 ± 3.7	> 6
FXIII	> 1000	82.2 ± 2.6	12.1 ± 0.7	> 7
FXIV	4.22 ± 1.21	> 100	10.1 ± 1.9	> 10
FXV	1.06 ± 1.49	> 100	15.0 ± 2.1	> 7
FXVI	21.8 ± 1.44	> 100	8.5 ± 1.7	> 12
FXVII	831.0 ± 4.25	> 100	19.8 ± 3.9	> 5
FXVIII	> 1000	> 100	15.6 ± 4.7	> 6

#### 2.2.4 Toxicidad

*L. camara* es una especie vegetal que representa una amenaza para el ganado, ya que provoca hepatotoxicidad y fotosensibilización en los animales de pastoreo, además de que ejerce una acción alelopática sobre pastos y vegetación útiles para pastoreo, ocasionando escasez de forraje. La incidencia del envenenamiento por esta especie varía de unos cuantos casos esporádicos a través de los años hasta importantes brotes durante la época de sequías o inundaciones cuando el forraje es escaso. El envenenamiento también ha sido observado durante el transporte de animales desde regiones libres a regiones infestadas de *Lantana*, así como el pastoreo en localidades infestadas por *Lantana*, después de un periodo de alimentación en establo.

Inmediatamente después de comer el follaje de *Lantana*, los animales sufren desde constipación hasta pérdida del apetito dentro de las primeras 2 h. En las siguientes 24 a 48 h, los animales parecen sedados y se tornan fotosensibles. Subsecuentemente, los párpados, el hocico y otras partes sin pelo, se hinchan. El curso de la enfermedad y la severidad de los síntomas dependen de la cantidad de follaje ingerida. En cuanto a la vulnerabilidad de las especies al envenenamiento por esta planta, se ha demostrado que este fenómeno es observado en ganado vacuno, búfalos, ovejas y cabras; todos animales rumiantes. Sin embargo, se ha encontrado que las cabras muestran ser menos vulnerables que los otros animales. Esto parece ser algo inherente a factores hasta ahora no caracterizados que les permiten resistir, por lo menos en cierto grado, el daño ocasionado por *Lantana*. Cabras nativas de Taiwán fueron tolerantes al envenenamiento por *L. camara*, ya que incluso la encontraron desagradable. En 1990 se reportó que tanto caballos como ratas macho son resistentes al envenenamiento por *Lantana*; sin embargo, en otro estudio realizado en 1994 se registró el envenenamiento de caballos. Se ha atribuido la resistencia de las ratas macho a la presencia de altos niveles de testosterona. Corderos recién nacidos y terneros parecen ser también resistentes al envenenamiento por lantadeno A (Sharma et al., 2007). Debido a esta inconsistencia en los efectos tóxicos producidos por *L. camara*, así como por la variabilidad en la composición fitoquímica de la planta, es necesario establecer la toxicidad de los especímenes recolectados por nuestro grupo de investigación.

#### 2.2.5 Variaciones en el perfil fitoquímico de *L. camara*

Existen algunos estudios enfocados a demostrar que la composición de *L. camara* varía de acuerdo al estadio de madurez de la planta (O.P. Sharma et al., 2000), las variantes dentro de una misma especie (Sharma et al., 1991), la estación del año (Randrianalijaona et al., 2005) y el lugar de colecta (Satyal et al., 2016). La mayoría de estos reportes se han centrado en la variabilidad de la composición de los aceites esenciales (Cuadros 6 y 7) y son pocos los que muestran componentes de menor volatilidad (Cuadro 8), por lo que es importante continuar con el estudio de *L.*

camara, ya que no existen, a la fecha, estudios en los que se correlacione la estructura química con la actividad leishmanicida.

Cuadro 6. Variación de la composición del aceite esencial de *L. camara* colectada en distintos países y años.

México (2014)	Egipto (Baroty et al., 2014)	Brasil (Machado et al., 2010)	Benín (Alitonou et al., 2004)	Irán (Sefidkon, 2002b)	India (Misra and Laatsch, 2000)
$\beta$ -cariofileno (11.88%)	Davanona (23.37%)	Germacren o D (24.90%)	$\beta$ -cariofileno (18.50%)	Sabineno (16.50%)	$\alpha$ -selineno (8.11%)
Carvacrol (7.11%)	$\beta$ -cariofileno (22.96%)	$\beta$ -cariofileno (14.31%)	Sabineno (18.10%)	$\beta$ -cariofileno (14.00%)	Isolongifeno (7.79%)
$\alpha$ -curcumeno (6.33%)	$\alpha$ -cariofileno (14.32%)	(E,E)-farneseno (11.58%)	$\alpha$ -cariofileno (10.00%)	1.8-cineol (10.00%)	Eudesma-3,11-dieno (7.12%)
Fitol (5.12%)	Z-cariofileno (8.18%)	$\alpha$ -cariofileno (8.34%)	1.8-cineol (9.00%)	Biciclogerma-creno (8.1%)	$\beta$ -gurjuneno (6.73%)
$\alpha$ -muuroloeno (4.95%)	$\alpha$ -curcumeno (6.33%)	No Identificado (5.78%)	$\delta$ -Guaieno (5.00%)	$\alpha$ -cariofileno (6.00%)	$\delta$ -cadineno (6.47%)
Davanona (4.25%)	$\beta$ -copaeno (4.43%)	(Z,E)- $\alpha$ -farneseno (5.03%)	Transneridol (4.0%)	Germacren D (3.60%)	$\gamma$ -cadineno (5.59%)
Óxido de cariofileno (3.55%)	$\beta$ -elemeno (3.51%)	(E)- $\beta$ -farneseno (4.04%)	$\tau$ -muurool (2.30%)	$\alpha$ -pineno (3.50%)	Sabineno (4.51%)
$\alpha$ -cariofileno (3.38%)	$\beta$ -patabuleno (2.3%)	$\beta$ -sesquifelandreno (3.35%)	Germacren o D (2.00%)	(E)-neridol (3.10%)	Guaieno (4.15%)
Alcohol bencílico (2.69%)	$\alpha$ -elemeno (1.99%)	$\beta$ -elemeno (2.27%)	Davanona (1.60%)	$\beta$ -pineno (2.30%)	Alcohol sesquiterpénico (4.03%)
(+)-epibiclosesquifelandreno (2.26%)	Sabineno (1.33%)	2-pentadecinol (1.38%)	$\beta$ -pineno (1.60%)	$\delta$ -3-careno (2.1%)	$\alpha$ -felandreno (3.52%)

Cuadro 7. Variación de terpenoides (porcentaje) en el aceite esencial de *L. camara* colectados en distintas épocas del año (Randrianalijaona et al., 2005).

Terpenoide	Temporada de lluvias		Temporada Intermedia		Temporada de Sequía	
	Lantana rosa-morada	Lantana amarilla-naranja	Lantana rosa-morada	Lantana amarilla-naranja	Lantana rosa-morada	Lantana amarilla-naranja
Sabineno	9.38 ± 3.13	14.27 ± 3.24	10.03 ± 1.98	8.97 ± 6.23	11.23 ± 2.63	13.79 ± 2.55
Linalool	5.03 ± 1.59	0.37 ± 0.37	6.13 ± 1.33	1.43 ± 0.34	4.81 ± 1.81	0.58 ± 0.21
β-bisaboleno	2.30 ± 0.48	14.68 ± 1.72	1.66 ± 0.97	13.56 ± 6.00	1.82 ± 0.52	14.93 ± 1.66
Davanona	22.93 ± 4.24	-	25.95 ± 2.17	0.66 ± 1.45	22.57 ± 6.16	-
β-cariofileno	13.64 ± 1.91	30.85 ± 4.05	11.72 ± 2.53	25.85 ± 7.70	11.28 ± 2.43	29.84 ± 3.05

Cuadro 8. Variación de lantadenos (mg/g peso seco) en extractos metanólicos de distintas variedades de *L. camara*, (Sharma et al., 1991) y diferentes etapas de desarrollo (O.P. Sharma et al., 2000).

Compuesto	Lantana blanca	Lantana amarilla-rosa	Lantana amarilla-roja	Hojas jóvenes	Hojas maduras
Lantadeno A	8.83 ± 1.02	0.37 ± 0.12	37.50 ± 2.55	4.91 ± 0.06	8.05 ± 0.52
Lantadeno B	11.43 ± 1.38	3.53 ± 0.61	32.33 ± 2.05	3.47 ± 0.03	5.22 ± 0.37
Lantadeno C	6.00 ± 0.55	-	19.33 ± 1.70	1.91 ± 0.10	4.24 ± 0.39
Lantadeno D	0.40 ± 0.08	4.20 ± 0.65	8.30 ± 1.25	0.49 ± 0.05	1.77 ± 0.19
Lantadeno reducido A	-	-	-	0.19 ± 0.02	0.28 ± 0.04
Lantadeno reducido B	-	-	-	0.13 ± 0.01	0.18 ± 0.01
Ácido 22β-hidroxioleanólico	-	-	-	0.82 ± 0.11	1.67 ± 0.03

### 2.3 Metabolómica de plantas

El metaboloma de un organismo es la compilación de todos sus metabolitos de bajo peso molecular (300 a 3000 Da). Las biomoléculas poliméricas, tales como polisacáridos, lignanos, péptidos, proteínas, ADN y ARN, están excluidos de esta

categoría. Los metabolitos comprenden un grupo más heterogéneo que el de las biomacromoléculas en términos de propiedades físicas y químicas, variando ampliamente con respecto a su tamaño, polaridad, cantidad y estabilidad (Kim et al., 2011).

Un análisis metabolómico posibilita el conocimiento de la presencia y concentración de los metabolitos biosintetizados por un organismo en un momento determinado y bajo condiciones específicas. De tal manera que el análisis de un gran número de muestras podría facilitar la identificación de patrones de metabolitos marcadores que son característicos de una especie, un cultivo, cierta fase de desarrollo, o condiciones, tales como un estado de enfermedad, estrés o cambios diarios o estacionales. Las variables que pueden influenciar la biosíntesis de los metabolitos producidos por un organismo, pueden dividirse en tres grupos principales: a) características metabólicas de un genotipo; b) fases de desarrollo y c) factores ambientales (Kim et al., 2011).

Los recientes avances en la tecnología analítica han posibilitado el desarrollo de diferentes plataformas para el análisis metabolómico. Dentro de éstas, los análisis basados en la espectrometría de masas (EM) y la resonancia magnética nuclear (RMN) son los métodos generalmente preferidos, ya que están basados en las propiedades físicas de los compuestos, las cuales no están influenciadas por factores externos y, por ende, son reproducibles. Ambas técnicas pueden ser acopladas a técnicas cromatográficas de separación para aumentar la resolución, tales como cromatografía de líquidos (CL-EM; CL-RMN), cromatografía de gases (CG-EM) y extracción en fase sólida (CL-EFS-RMN) (Kim et al., 2011).

### 2.3.1 Resonancia magnética nuclear

La metabolómica basada en la resonancia magnética nuclear (RMN) es una importante herramienta para el estudio de sistemas biológicos y ha sido aplicada en varios organismos, incluyendo animales, plantas y microbios, ya que es capaz de proveer un punto de vista “holístico” de los metabolitos bajo ciertas condiciones, lo



que aporta una excelente ventaja para los estudios metabolómicos (Kim et al., 2011).

La resonancia magnética nuclear de protones ( $^1\text{H}$ -RMN) ha sido el método más empleado para la obtención de perfiles metabolómicos, debido a que es rápido y simple. Actualmente, es la técnica más usada como herramienta analítica para distintas aplicaciones en la metabolómica de plantas, como es el control de calidad, la clasificación y caracterización quimiotaxonómica, el análisis de la equivalencia genética de plantas modificadas y la interacción con otros organismos y el ambiente (Markley et al., 2017). La EM tiene mayor sensibilidad que la RMN, no obstante, la RMN es particularmente útil cuando no se requiere una alta sensibilidad; tal como sucede en el control de calidad de plantas medicinales y preparaciones farmacéuticas y tabletas. Una de las mayores ventajas del análisis por RMN es la facilidad de cuantificación. Dado que la intensidad de la señal es únicamente determinada por la concentración molar, la RMN también ofrece información sobre la cantidad absoluta de metabolitos y, así, la proporción y abundancia de los componentes en una mezcla puede ser determinada (Worley and Powers, 2013). Además, la RMN es un método analítico que proporciona la más exhaustiva información estructural de una molécula, incluyendo los detalles estereoquímicos. La principal desventaja de la RMN radica en su baja sensibilidad comparada con la EM. Sin embargo, el reciente desarrollo tecnológico ha permitido un considerable incremento en la sensibilidad, incluyendo mejoramiento en el hardware. La sensibilidad, en realidad no es un problema severo, ya que un perfil de RMN puede ser obtenido a partir de 10 a 50 mg de biomasa. El solapamiento de señales es un problema en el espectro complejo de extractos de plantas. Para una mejor resolución de las señales, se puede usar la RMN en sus diferentes modalidades bidimensionales (Kim et al., 2011).

Una nueva característica de la metabolómica, comparada con el perfilado convencional tradicional, es la aplicación de métodos quimiométricos para analizar y sistematizar la información contenida en una gran cantidad de datos obtenidos a

partir del análisis metabolómico, lo cual posibilita su interpretación en términos de su significado biológico. Este sentido biológico se logra mediante la identificación de las señales espectroscópicas más importantes, las cuales corresponden a compuestos marcadores para una condición dada del organismo estudiado. En general, la identificación de la señal del metabolito es realizada mediante la comparación con compuestos de referencia. Los metabolitos primarios comunes (azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos) pueden ser fácilmente identificados. Por otra parte, la identificación de metabolitos secundarios (flavonoides, fenilpropanoides, saponinas, terpenos, alcaloides) es útil cuando se trata de dar un panorama interno (estado metabolómico) de los sistemas biológicos objeto de estudio. El problema con la identificación de metabolitos secundarios radica en la complejidad de sus estructuras y su restringida aparición en unos cuantos organismos diferentes. El solapamiento de señales en un espectro de RMN de una mezcla dificulta la elucidación estructural de compuestos minoritarios; por esta razón, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) frecuentemente se combina con la RMN para facilitar la identificación (Kim et al., 2011).

### 2.3.2 Marcadores químicos

Los medicamentos herbales, también conocidos como medicamentos botánicos o fitomedicamentos, se definen como productos medicinales de plantas obtenidos de sus raíces, hojas, corteza, semillas, bayas o flores que pueden mejorar la salud o curar enfermedades. Se sabe que la inconsistencia de la composición química de los medicamentos herbales produce casos ocasionales de intoxicación debido a adulterantes o a componentes tóxicos. El control de calidad de estos medicamentos apunta a asegurar su concentración, seguridad y eficacia. Se ha demostrado que la huella química dactilar de estos medicamentos es una técnica poderosa para el control de calidad de los extractos herbales. Una huella digital química es un patrón único que indica la presencia de múltiples marcadores químicos dentro de una muestra (Li et al., 2008).



La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) clasifica a los marcadores químicos en marcadores analíticos y marcadores activos. Los marcadores analíticos son los constituyentes o grupos de constituyentes que sirven únicamente para propósitos analíticos, mientras que los marcadores activos son los constituyentes o grupos de constituyentes que contribuyen a la actividad terapéutica (Li et al., 2008). Existen otras clasificaciones en las que se proponen distintas categorías, que incluyen: a) principios activos, los cuales poseen actividades clínicas conocidas; b) marcadores activos, que contribuyen a la eficacia clínica; c) marcadores analíticos, que no poseen actividad clínica, ni farmacológica y d) marcadores negativos, que muestran propiedades alergénicas o tóxicas. Todos los marcadores pueden contribuir a la evaluación farmacológica, estandarización y determinación de la seguridad de las medicinas herbales (Srinivasan, 2006). En cuanto a los grupos de marcadores, éstos tienen estructuras químicas y/o propiedades físicas similares. Sin embargo, las actividades farmacológicas de los componentes individuales no tienen que ser necesariamente conocidas (Chan et al., 2007).

Li y cols. (2008) proponen la clasificación de los marcadores químicos en 8 categorías:

1. Componentes terapéuticos: poseen los efectos terapéuticos directos de una medicina herbal. Pueden ser usados para evaluaciones cualitativas y cuantitativas.
2. Componentes bioactivos: son compuestos que pueden ser similares o estructuralmente diferentes. De manera individual, pueden no ejercer directamente los efectos terapéuticos. Sin embargo, la combinación de sus bioactividades, contribuye a los efectos terapéuticos.
3. Componentes sinérgicos: no contribuyen a los efectos terapéuticos, ni están relacionados con la actividad biológica; sin embargo, actúan sinérgicamente para reforzar las bioactividades de otros compuestos y de este modo modulan los efectos terapéuticos del medicamento herbal.

4. Componentes característicos: pueden contribuir a los efectos terapéuticos. Son componentes específicos y/o únicos de un medicamento herbal.
5. Componentes principales: son los más abundantes en un medicamento herbal (o significativamente más abundantes que otros componentes). No son componentes característicos y su actividad biológica puede o no ser conocida.
6. Componentes correlativos: tienen una estrecha relación unos con otros. Estos compuestos pueden ser los precursores, productos o metabolitos de una reacción química o enzimática.
7. Componentes tóxicos: poseen actividades biológicas consideradas como efectos adversos.
8. Componentes generales acoplados con “huellas dactilares”: son compuestos específicos de determinadas especies, géneros o familias particulares. Estos compuestos pueden ser usados como huellas dactilares para propósitos de control de calidad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La falta de un tratamiento eficaz y no tóxico para el tratamiento de las leishmaniasis ha propiciado que distintos grupos de investigación en el mundo volteen la mirada hacia las plantas utilizadas en la medicina tradicional de las diferentes culturas. En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se encontró que de 10 plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana contra parásitos, *Lantana camara* demostró tener la mejor actividad (índice de selectividad mayor a 9) contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis*, agente causal de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en algunos países de América y que posee una gran similitud genética con *L. mexicana*, una de las especies de *Leishmania* que es endémica de nuestro país. Nuestro grupo de trabajo también encontró que *L. camara* posee metabolitos secundarios volátiles, semivolátiles y no volátiles de baja polaridad, con un amplio rango de pesos moleculares, a los cuales podía atribuirse el significativo efecto leishmanicida que presentaba el extracto de diclorometano obtenido a partir de esta especie vegetal. Con base en estos antecedentes, resulta evidente que *L. camara* constituye una fuente importante de metabolitos activos, los cuales aún no han sido identificados y que pueden ser utilizados como marcadores químicos para el desarrollo de un extracto estandarizado con actividad leishmanicida preparado a partir de *L. camara*, el cual eventualmente permitiría la formulación de una forma farmacéutica para su evaluación en un modelo *in vivo* que representará un precedente en el uso de productos naturales para el tratamiento de esta parasitosis.

#### **4. HIPÓTESIS**

El extracto de diclorometano de *L. camara* posee terpenos con actividad leishmanicida, los cuales pueden ser identificados y cuantificados mediante un método analítico validado, para el desarrollo de un extracto cuantificado con efecto anti-leishmanial.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el marcador químico idóneo relacionado con la actividad leishmanicida de *L. camara* y establecer un método analítico para su identificación y cuantificación para el desarrollo de un extracto cuantificado.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

5.2.1 Purificar e identificar los compuestos mayoritarios responsables del efecto leishmanicida presentado por el extracto de diclorometano de *Lantana camara*.

5.2.2 Determinar el perfil metabolómico del extracto de diclorometano de *L. camara* recolectada en diferentes estaciones del año, mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas y correlacionarlo con la actividad leishmanicida.

5.2.3 Desarrollar y validar un método analítico que permita la detección y cuantificación del marcador químico seleccionado del extracto de *L. camara*.

5.2.4 Obtener una forma farmacéutica a partir del extracto cuantificado de *L. camara*.

5.2.5 Determinar la actividad leishmanicida del extracto cuantificado, algunos de los componentes activos de *L. camara* y de la forma farmacéutica desarrollada.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Colecta de *Lantana camara*

Las partes aéreas de *Lantana camara* fueron colectadas en diferentes meses, en la primera semana de cada mes a las 12 pm, en los jardines de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México (20°35'25.4" N, 100°24'38.3" W); durante la época de floración: Marzo 2014, 2015: Enero, Junio, Agosto, Agosto b, Septiembre, Octubre, Noviembre y Diciembre; y Septiembre 2016. *L. camara* fue previamente identificada por la Dra. Heike Vibrans. Un espécimen fue depositado en el Herbario Nacional de México (MEXU), No. de voucher 1414005.

### 6.2 Preparación de los extractos de diclorometano de *L. camara*

El material vegetal de cada colecta fue secado a temperatura ambiente (25 °C) a la sombra durante 3 semanas. Posteriormente, el material seco fue triturado en un molino eléctrico IKA MF 10 con una malla de 0.5 mm de diámetro de poro. Para la preparación del extracto, 250 g de material vegetal seco y molido se sometieron a maceración con 900 mL de diclorometano a temperatura ambiente durante una semana. Después de este tiempo, el solvente fue removido por filtración y el material vegetal residual fue extraído por segunda vez con 900 mL del mismo solvente por una semana más. Los extractos fueron mezclados y el solvente fue removido en un rotavapor (BÜCHI R-114, St. Gallen, Suiza). Cada uno de los extractos secos se almacenó en viales de 20 mL a 4 °C.

Para el estudio metabolómico, se obtuvieron 3 replicados de extracción independientes entre sí para cada una de las muestras, siguiendo el proceso anterior.

### 6.3 Fraccionamiento del extracto de diclorometano de *L. camara* por cromatografía en columna abierta

Para el estudio fitoquímico biodirigido se utilizó el material vegetal colectado en Marzo de 2014. Cien gramos del extracto seco fueron adsorbidos en 50 g de gel de sílice (Kieselgel 60 Machery-Nagel, tamaño de partícula 0.0063-0.2 mm). Posteriormente, el extracto adsorbido fue colocado en una columna previamente empacada con 950 g gel de sílice y hexano. El volumen muerto fue de 2 L. La secuencia de fase móvil utilizada para la elución de la columna fue una mezcla de hexano:acetato de etilo en diferentes proporciones (100:0, 98:2, 95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1 y 0:100). Finalmente, los compuestos más polares fueron eluidos con 2 volúmenes muertos de metanol.

Se colectaron un total de 325 fracciones de 250 mL cada una. Estas fracciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina para establecer su similitud química (fase estacionaria: placas de aluminio recubiertas con sílica gel tamaño de partícula: 8.0-12.0  $\mu\text{m}$ , tamaño de poro: 60 Å, 200  $\mu\text{m}$  de grosor, Sigma-Aldrich; fase móvil: hexano:acetato de etilo (3:2); revelador: reactivo de Liebermann-Burchard). Las 325 fracciones fueron agrupadas en 18 fracciones finales (FI-FXVIII). Las fracciones fueron rotaevaporadas y almacenadas en frascos ámbar a 4 °C, hasta su uso en la evaluación de la actividad leishmanicida.

### 6.4 Evaluación de la actividad leishmanicida

#### 6.4.1 Parásitos

Promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* fueron obtenidos originalmente de lesiones de un paciente de Quintana Roo, México, con leishmaniasis cutánea localizada.

Los parásitos fueron cultivados axénicamente en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>. Los promastigotes fueron cultivados en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal

bovino inactivado por calor a 26 °C; mientras que los amastigotes fueron cultivados en medio Grace suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado por calor a 33 °C. Cada 4 días se hizo pase a la cepa (fase estacionaria): se lavaron  $5 \times 10^6$  parásitos (se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 1 mL de PBS 1X y se volvió a centrifugar a 4000 rpm durante 10 min, este paso se repitió 2 veces más) y se sembraron en una caja de cultivo nueva con 10 mL de medio fresco suplementado como correspondía. No se utilizaron cultivos que hubiesen tenido más de 6 pases.

Para mantener la virulencia de la cepa, se inocularon  $1 \times 10^6$  promastigotes en fase estacionaria contenidos en 10  $\mu$ L de PBS 1X en el cojinete plantar de un ratón BALB/c. Al cabo de 6 semanas de evolución de la infección el ratón fue sacrificado por dislocación cervical y el cojinete plantar se maceró con medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 20% de antibióticos.

#### 6.4.2 Actividad leishmanicida sobre promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*

-Para extractos y fracciones: Se preparó una solución stock a una concentración de 20 mg/mL en DMSO para promastigotes y en etanol 96 °GL para amastigotes.

Se etiquetaron 7 tubos Falcon® estériles de 5 mL con las concentraciones: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 0  $\mu$ g/mL. En el tubo etiquetado como 200  $\mu$ g/mL, se colocaron 3950  $\mu$ L de medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 40  $\mu$ L de la solución stock y se mezcló perfectamente. En los tubos restantes (100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 0  $\mu$ g/mL) se colocaron 1990  $\mu$ L de medio suplementado. A partir de la solución de 200  $\mu$ g/mL se prepararon diluciones 1:2 en los tubos de 100 a 6.25  $\mu$ g/mL, transfiriendo 2000  $\mu$ L del tubo de 200  $\mu$ g/mL al de 100  $\mu$ g/mL, se mezcló homogéneamente y ahora se tomaron 2000  $\mu$ L al tubo de 50  $\mu$ g/mL y así sucesivamente hasta llegar al tubo de 6.25  $\mu$ g/mL. De este último tubo se toman 2000  $\mu$ L y se descartan. En el tubo de 0  $\mu$ g/mL no se adicionó ningún



extracto o fracción, sólo los 1990 µL de medio 199. En este punto todos los tubos contenían 1990 µL. Se adicionaron 10 µL de medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino que contenían  $2 \times 10^6$  parásitos. De esta forma quedaron contenidos  $1 \times 10^6$  parásitos/mL en cada tubo. Los tubos se incubaron por 72 h a 26 °C. Transcurrido este tiempo, se prepararon diluciones de cada uno de los cultivos 1:200 con glutaraldehído al 0.1% en PBS para fijar a los parásitos. Posteriormente, esta dilución se contó en una cámara de Neubauer. El número de parásitos se estableció promediando la cuenta de 3 cuadrantes de la cámara y utilizando la fórmula:

$$\text{Número de parásitos/mL} = \bar{x} * FD * 10,000 * 1 \text{ mL}$$

Donde,

$\bar{x}$ : promedio de la cuenta de parásitos en 3 cuadrantes de la cámara de Neubauer

FD: factor de dilución= (volumen final de la muestra tras adicionar el glutaraldehído/volumen inicial, en este caso FD= 200)

-Para compuestos puros: Se preparó una solución stock a una concentración de 0.05 M en DMSO para promastigotes y en etanol 96 °GL para amastigotes.

Se etiquetaron 7 tubos Falcon® estériles de 5 mL con las concentraciones: 500, 200, 100, 50, 25, 10, 1 y 0 µM. Para las concentraciones 500, 200 y 100 µM se colocaron las siguientes cantidades de medio y stock.

Concentración (µM)	µL de medio	µL de solución Stock 0.05 M
500	1970 (2 x 985 µL)	20
200	1982 (2 x 991 µL)	8
100	3500 (4 x 875 µL)	7

De la concentración de 100 µM se prepararon 3500 µL, ya que a partir de esta solución se prepararon las concentraciones de 50, 10 y 1 µM:

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{L}$ de medio	$\mu\text{L}$ de solución 100 $\mu\text{M}$
50	990	1000
10	1790 (2 x 895 $\mu\text{L}$ )	200
1	1970 (2 x 985 $\mu\text{L}$ )	20
0	1990 (2 x 995 $\mu\text{L}$ )	-

Una vez terminada la preparación de las concentraciones, se adicionaron  $2 \times 10^6$  parásitos (contenidos en 10  $\mu\text{L}$  de medio) a cada tubo. En este punto, todos los tubos tienen un volumen de 2000  $\mu\text{L}$ . Se homogeneizó bien y se incubó a 26 °C para promastigotes y a 33 °C para amastigotes.

Para ambos tipos de ensayos se utilizó como control negativo el mismo volumen de DMSO que para los ensayos en promastigotes y de etanol 96 °GL para amastigotes, mientras que como control positivo se utilizó Glucantime® en las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 15, 30 y 50 mg/mL.

#### 6.4.3 Análisis estadístico de la actividad leishmanicida

Cada uno de los ensayos de actividad leishmanicida fueron realizados por triplicado. Los valores de  $\text{CI}_{50}$  fueron establecidos a partir de las curvas de regresión dosis-respuesta en el software GraphPad Prism 6.0. Todos los resultados fueron expresados como la media y una desviación estándar. Se aplicó un análisis de ANOVA de comparaciones múltiples de una vía con ensayo post-hoc de Tukey para comparar las  $\text{CI}_{50}$  entre los extractos y entre los compuestos puros. Se consideró una  $p < 0.05$  para las fracciones y una  $p < 0.0001$  para los compuestos puros y para los extractos de distintas colectas.

6.5 Aislamiento, purificación e identificación de los compuestos mayoritarios contenidos en las fracciones con la mejor actividad leishmanicida

6.5.1 Identificación de los componentes mayoritarios de la fracción FII por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

El análisis de FII se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent serie 7890A (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA). La temperatura del puerto de inyección y del detector fue de 230 °C. El modo de inyección fue realizado con Split (20:1). Como columna cromatográfica se utilizó una columna capilar HP-5MS de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de grosor (Agilent Technologies, Inc.). Para el análisis se empleó una rampa de temperatura, para la cual la temperatura del horno fue programada como sigue: temperatura inicial 40 °C durante 5 minutos; posteriormente, la temperatura fue elevada a razón de 5 °C/min hasta alcanzar los 230 °C. Finalmente, esta temperatura fue mantenida por 15 minutos más. Como gas acarreador se utilizó helio a un flujo constante de 1 mL/min. La abundancia relativa de cada compuesto fue determinada por su área bajo la curva. Para el análisis mediante espectrometría de masas, se utilizó un espectrómetro de masas de impacto electrónico Agilent serie 5975C con analizador de cuadrupolo. Las temperaturas de la fuente de iones y del cuadrupolo fueron de 230 y 250 °C, respectivamente. La temperatura de la línea de transferencia fue fijada a 280 °C. Se realizó un barrido completo de las masas en un rango de 33 a 300 uma, con un análisis de escaneo a razón de 5.2 s<sup>-1</sup> y un voltaje de ionización de 70 eV. Se empleó el software MSD Chemstation E.0100237 para el análisis de los datos. La identificación de los compuestos fue realizada comparando los datos espectrales con los reportados en la librería de espectros de masas del NIS/EPA/NIH, versión 1.7, USA.

6.5.2 Aislamiento y purificación de los componentes mayoritarios de las fracciones FX, FXI y FXV por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a arreglo de diodos (HPLC-DAD)

A las fracciones FX, FXI y FXV se les removieron las clorofilas. Para las fracciones FX y FXI se realizó una partición con hexano:metanol:agua (4:1:1).

Fracción FX: Las clorofilas se eliminaron por partición con hexano:metanol:agua, sin embargo, no fue posible cristalizar ningún compuesto, por lo que la fracción libre de clorofilas fue sometida a un análisis comparativo con los compuestos identificados en las fracciones XI y XV.

Fracción FXI: Tras la partición con estos solventes, se formaron 3 fases, la fase hexánica en la que quedaron la mayoría de las clorofilas, una interfase gelatinosa de color café oscuro y la fase acuosa/metanólica, de color café límpido. La fase acuosa se concentró y se pasó por una columna cromatográfica abierta de Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich), la cual fue eluida con MeOH. Se obtuvieron 29 fracciones de 30 mL. Las fracciones 2-14 tuvieron un menor contenido de clorofilas, por lo que se decidió juntarlas y evaporar el solvente. Una vez evaporado el metanol se empezaron a observar unas agujas, las cuales fueron lavadas con hexano frío para eliminar las clorofilas residuales. De estas agujas se obtuvieron 27.7 mg, las cuales se sometieron a un análisis por resonancia magnética nuclear para la identificación estructural.

Fracción FXV: Las clorofilas de esta fracción fueron removidas por filtración y lavados con acetato de etilo frío. Este procedimiento rindió 200 mg de un polvo blanco amorfo, que era la mezcla de 2 compuestos según el perfil cromatográfico obtenido por de HPLC-DAD hecho bajo las siguientes condiciones.

Una vez eliminadas las clorofilas de las fracciones FX, FXI y FXV; éstas fueron sometidas a un análisis por HPLC-DAD (bomba 600, controlador 600S y detector

de arreglo de diodos (DAD) 2998, Waters). Se utilizó una columna en fase reversa C-18 (RP-18 Xterra Shield, 125 Å tamaño de partícula, 3.5 µm diámetro interno, 4.6x150 mm) con un método isocrático 70% acetonitrilo, 30% agua acidulada con 0.1% de ácido trifluoroacético, a un flujo de 1 mL/min,  $\lambda = 210$  nm. El tiempo de corrida fue de 24 minutos. De esta manera se logró establecer que la fracción 10 estaba constituida mayoritariamente por 4 compuestos: A ( $t_R = 8.5$  min), B ( $t_R = 9.0$  min), C ( $t_R = 15.75$  min) y D ( $t_R = 17.4$  min); mientras que las agujas aisladas de la fracción FXI correspondían al pico de la fracción X denominado como C y, finalmente, la fracción FXV presentaba los picos A y B.

Para purificar los compuestos A y B de la fracción, se realizaron inyecciones continuas, utilizando como fase móvil 60% acetonitrilo, 40% agua acidulada con 0.1% de ácido trifluoroacético con el siguiente gradiente de flujo: 0-3 min: 1 mL/min, 3-9.4 min: 1.8 mL/min y finalmente, 9.4-14.5 min: 1 mL/min. Los tiempos de retención de los compuestos A y B bajo estas condiciones fueron 11.3 min y 12.3 min, respectivamente. Adicionalmente, bajo estas condiciones aparecieron 2 picos más (E y F), los cuales tuvieron un tiempo de retención de 1.90 min y 2.5 min, respectivamente. Los 4 picos de la fracción fueron colectados, el acetonitrilo fue eliminado por rotaevaporación, mientras que el agua se eliminó por liofilización. Todos los picos fueron analizados por resonancia magnética nuclear para su identificación.

#### 6.5.3 Análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para la elucidación estructural de los compuestos obtenidos a partir de las fracciones X, XI y XV

Los espectros de RMN fueron obtenidos en un espectrómetro Avance III HD 700 operando a una frecuencia de  $^1\text{H}$  de 699.99 MHz (Bruker, Billerica, MA, EUA) equipado con una criosonda TCI de gradiente de eje z de 5 mm. Los experimentos de RMN fueron adquiridos utilizando la secuencia de pulsos estándar de Bruker a concentraciones de 26.42 (pico A), 12.14 (pico B), 21.43 (pico C), 12.43 (pico E) y 4.28 (pico F) mg/mL, respectivamente; en  $\text{CDCl}_3$  en tubos de RMN de 5 mm a 298

K. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se reportaron en ppm relativas a la resonancia del solvente utilizado como estándar interno ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta_{\text{H}} = 7.26$ ,  $\delta_{\text{C}} = 77.16$  ppm). Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están dadas en Hertz (Hz). Las condiciones de pulso fueron las siguientes: para el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ ; secuencia de pulso = *zg30*, ancho espectral (*sw*) = 14,098 Hz, retraso de la relajación (*d1*) = 2 s, pulso  $\pi/2$  para  $^1\text{H}$  (*p1*) = 7.8  $\mu\text{s}$ , tiempo de adquisición (*aq*) = 2.3 s, número de puntos de datos (*TD*) = 64 K, resolución espectral (*HZpPT*) = 0.22 Hz/punto, número de scans (*ns*) = 16, scans ficticios (*DS*) = 2. Para el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ ; secuencia de pulso = *zgpg30*, *sw* = 43,103 Hz, *d1* = 5 s, pulso  $\pi/2$  para  $^1\text{H}$  (*p3*) = 11.2  $\mu\text{s}$ , *aq* = 1 s, *TD* = 84 K, *HZpPT* = 0.66 Hz/punto. Para el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY; secuencia de pulso = *cosygpmfppqf*, *sw* = 6,849 Hz (*F1*) y 6,849 Hz (*F2*), *d1* = 1.3 s, *aq* = 0.3 s, *ns* por incremento = 8, *TD* = 8 K, x 128 (*t2* x *t1*), *HZpPT* = 3.34 Hz/punto. Para el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC con edición de multiplicidad; secuencia de pulso = *hsqcedetgpsisp2.3*, *sw* = 6,849 Hz (*F1*) y 26,455 Hz (*F2*), *d1* = 1.9 s, *aq* = 0.15 s, *ns* por incremento = 8, *TD* = 2 K, x 128 (*t2* x *t1*), *HZpPT* = 6.69 Hz/punto para  $^1\text{H}$  y 25.83 para  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{JCH}$  optimizada para 145.0 Hz. Para el espectro de RMN de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC con edición de multiplicidad; secuencia de pulso = *hmbcetgpl3nd*, *sw* = 6,849 Hz (*F1*) y 42,373 Hz (*F2*), *d1* = 1.4 s, *aq* = 0.3 s, *ns* por incremento = 16, *TD* = 4 K, x 160 (*t2* x *t1*), *HZpPT* = 3.34 Hz/punto para  $^1\text{H}$  y 20.69 para  $^{13}\text{C}$ ,  $^n\text{JCH}$  optimizada para 8.0 Hz.

6.6 Análisis metabólico de los extractos obtenidos a partir de especímenes de *L. camara* recolectados en diferentes épocas del año

#### 6.6.1 Preparación de los extractos

Los extractos de cada una de las colectas de *L. camara* fueron obtenidos como se indicó en el punto 6.2.

### 6.6.2 Perfil químico cualitativo por cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos a partir de distintas colectas de *L. camara*

Para la cromatografía en capa fina, 20 mg de cada uno de los extractos fueron reconstituidos en 1000  $\mu\text{L}$  de diclorometano para su aplicación en placas de aluminio recubiertas con sílica gel 60 (grosor de capa: 200  $\mu\text{m}$ , tamaño de poro: 8 – 12  $\mu\text{m}$ , sin indicador de fluorescencia). Se utilizaron 2 sistemas de solventes como fase móvil: 1) hexano:acetato de etilo (3:2) y 2) tolueno:éter etílico (1:1) saturado con ácido acético al 10% en agua. Las placas cromatográficas fueron inspeccionadas bajo luz UV (UV lamp 260/366 nm, San Gabriel, CA, EUA). Posteriormente, fueron rociadas con reactivo de Liebermann-Burchard para visualizar terpenoides.

### 6.6.3 Perfil químico por resonancia magnética nuclear de los extractos obtenidos a partir de distintas colectas de *L. camara*

De cada uno de los extractos secos, se pesaron 30 mg y cada uno fue disuelto en 700  $\mu\text{L}$  de  $\text{CDCl}_3$ . Como estándares químicos, se emplearon los compuestos identificados de las fracciones FII, FX, FXI y FXV: eicosano, escualeno,  $\beta$ -ionona, óxido de cariofileno,  $\beta$ -cariofileno, ácido hexanoico, ácido tíglico, lantadeno B, ácido lantanílico y ácido camárico. Estos estándares fueron preparados de la misma forma que los extractos. Posteriormente, cada muestra fue transferida a tubos de RMN de 5 mm. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónicos fueron obtenidos en un espectrómetro Avance III HD 700 operando a una frecuencia de  $^1\text{H}$  de 699.99 MHz (Bruker, Billerica, MA, EUA) equipado con una criosonda TCI de gradiente de eje z de 5 mm. Los experimentos de RMN fueron adquiridos utilizando la secuencia de pulsos estándar de Bruker; secuencia de pulso = *zg30*, ancho espectral (sw) = 14,098 Hz, retraso de la relajación (d1) = 4 s, pulso  $\pi/2$  para  $^1\text{H}$  (p1) = 7.8  $\mu\text{s}$ , tiempo de adquisición (aq) = 2.3 s, número de puntos de datos (TD) = 64 K, resolución espectral (HZpPT) = 0.22 Hz/punto, número de scans (ns) = 128, scans ficticios (DS) = 2. Los espectros FID fueron multiplicados por una función exponencial con un



ensanchamiento de línea de 0.3 Hz antes de aplicar la transformada de Fourier. La fase de los espectros fue corregida manualmente, mientras que para la corrección de la línea base se aplicó un ajuste polinomial, utilizando TopSpin 3.5 pl 6. Una vez hecho esto, los espectros fueron referenciados a la señal del metileno del eicosano (1.26 ppm).

#### 6.6.4 Procesamiento de los datos para el análisis multivariado

Utilizando el software Chenomx® (Alberta, Canadá), cada espectro protónico fue subdividido en bins de 0.04 ppm en el rango de 0 a 11 ppm. Los espectros procesados fueron normalizados considerando el total de área. La señal residual del cloroformo (7.18 – 7.34 ppm) fue excluida.

#### 6.6.5 Análisis estadístico multivariado

Todos los análisis estadísticos de los datos fueron realizados en MathLab-based PLS Toolbox Software (Eigenvector Research, Inc. Versión: 8.7, 1995-2019). Los datos adquiridos fueron escalados con Pareto y las señales correspondientes a la impureza del bis(2-etilhexil) ftalato (7.52 – 7.56 y 7.68 – 7.72 ppm, véase Anexo V) fueron excluidas del análisis de componentes principales (PCA), una técnica de análisis exploratorio de los datos, para detectar patrones naturales de agrupamiento.

Para el análisis discriminante, se construyeron los modelos de mínimos cuadrados parciales (PLS) y de análisis discriminante de proyecciones ortogonales en estructuras latentes (OPLS-DA), que mejor explicaran las diferencias entre los grupos de estudio. La predictibilidad de cada modelo fue evaluada por el valor de  $Q^2$  (cum). Un valor de  $Q^2 > 0.4$  está generalmente aceptado para modelado de estudios biológicos (Waterman et al., 2010). Las señales que marcan la diferencia entre los grupos fueron identificadas utilizando las gráficas de “loadings” o patrones espectrales, las cuales muestran la importancia de las variables x en la matriz. Los metabolitos correspondientes fueron identificados utilizando los espectros de los 10



estándares: eicosano, escualeno,  $\beta$ -ionona, óxido de cariofileno,  $\beta$ -cariofileno, ácido hexanoico, ácido tíglico, lantadeno B, ácido lantanílico y ácido camárico.

Para el análisis predictivo, los datos fueron escalados utilizando varianza unitaria (UV). Los modelos de PLS y OPLS fueron empleados para identificar las relaciones fundamentales entre las dos matrices de datos: X, señales espectrales y Y, actividad leishmanicida). La calidad de los modelos fue evaluada mediante las herramientas diagnósticas: la variación modelada en la matriz X,  $R^2X$  (cum); la proporción de la varianza de la variable respuesta que es explicada por el modelo  $R^2Y$  (cum); y el parámetro de capacidad predictiva del modelo  $Q^2$  (cum).

## 6.7 Desarrollo y validación del método analítico para el marcador químico

### 6.7.1 Selección del marcador químico

Para la selección del marcador químico apropiado para el desarrollo del método analítico que se empleará en las pruebas de control de calidad, se consideraron los siguientes criterios: a) presencia constante del compuesto en especímenes de la especie vegetal provenientes de diferentes recolectas; b) abundancia del compuesto y c) contar con un método de detección y cuantificación sencillo, específico y sensible (Song et al., 2013). Los compuestos que cubrieron estas características, fueron el ácido lantanílico y el ácido camárico, cuya concentración, además, estaba directamente relacionada a una mejor actividad leishmanicida, según el análisis metabolómico.

Las condiciones cromatográficas (Cuadro 9) que fueron utilizadas para cuantificar estos compuestos, así como para la validación del método analítico fueron:

-Fase Estacionara: X-Terra RP-18; 4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ m

-Programa gradiente:

Cuadro 9. Programa del gradiente cromatográfico para la cuantificación de ácido lantanílico y ácido camárico

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%Acetonitrilo	%H <sub>2</sub> O (0.1% TFA)
0 – 13	0.5	77	23
13 – 15	0.5	80	20
15 – 18	1	77	23
18 – 25	0.5	77	23

TFA: Ácido Trifluoroacético

-Longitud de onda para la detección: 215 nm

-Tiempo de corrida: 25 min

6.7.2 Determinación de la concentración de los ácidos lantanílico y camárico como marcadores químicos de los extractos de *L. camara*

6.7.2.1 Preparación de los extractos de *L. camara* para su inyección en HPLC

Previo a la inyección de los extractos de diclorometano de *L. camara* colectada en diferentes épocas del año, se removieron las clorofilas contenidas en ellos.

Para la remoción de clorofilas se pesaron, por separado, 350 mg de cada uno de los extractos completos. Los 350 mg fueron resuspendidos en 5 mL de diclorometano JT Baker grado ACS (extracto verde negruzco). Para cada uno de los extractos se preparó una columna de carbón activado: en una jeringa de vidrio de 10 mL se colocó un disco de papel filtro Whatman No. 54, seguido de 2 cm<sup>3</sup> de algodón y 3 cm<sup>3</sup> de carbón activado. Cada capa fue previamente compactada con ayuda del émbolo. Para preparar la columna, se pasaron 10 mL de diclorometano. Una vez humedecida la columna, se procedió a pasar el extracto crudo resuspendido en diclorometano. A continuación, se siguió lavando la columna con diclorometano puro, hasta recuperar un volumen de 50 mL. El extracto libre de clorofilas presentaba un color desde transparente hasta amarillo ambarino. Este extracto fue concentrado a presión reducida en rotavapor. En promedio, fue posible

recuperar alrededor de 152 mg de extracto seco libre de clorofilas, para su inyección en HPLC.

#### 6.7.2.2 Cuantificación del marcador químico

Se elaboró una curva de calibración con diferentes concentraciones de la mezcla de ácido lantanílico y ácido camárico aislada a partir de la fracción FXV (proporción 79:21, ácido lantanílico:ácido camárico; determinado por RMN). Las concentraciones utilizadas para la curva de calibración fueron: 15, 30, 45, 60, 75 y 90  $\mu\text{g}$  mezcla/mL.

#### 6.7.3 Validación del método analítico para la detección y cuantificación de los ácidos lantanílico y camárico

Para la validación del método analítico se realizaron las siguientes pruebas analíticas y estadísticas:

- Linealidad del Sistema: Se prepararon por sextuplicado cada una de las concentraciones utilizadas en la curva de calibración (15, 30, 45, 60, 75 y 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). De cada cromatograma obtenido a 215 nm, se obtuvo el área bajo la curva para cada uno de los picos correspondientes al ácido lantanílico ( $t_R = 11.12$  min) y al ácido camárico ( $t_R = 11.69$  min). Se calcularon los parámetros  $b_1$ ,  $b_0$ ,  $r^2$  e  $IC(\beta_1)$ . Los criterios de aceptación de cada una de las curvas de calibración fueron:  $r^2 \geq 0.98$  e  $IC(\beta_1)$  no incluye a cero.
- Adecuabilidad del Sistema: Se inyectó por quintuplicado el estándar de 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , preparado por diluciones independientes y se determinó el área bajo la curva obtenida en cada cromatograma para cada inyección. Se calcularon los siguientes parámetros cromatográficos: factor de capacidad ( $K'$ ), resolución ( $R$ ), retención relativa ( $R_r$ ), factor de coelución ( $T$ ) y número de platos teóricos ( $N$ ). Los criterios de aceptación fueron:  $CV \leq 2\%$  para la respuesta analítica,  $K' > 2$ ,  $R > 2$  y  $T < 2$ .

- Precisión del Sistema: Se inyectó por sextuplicado el estándar de concentración de 40 µg/mL, preparado por diluciones independientes y se determinó el área bajo la curva obtenida en cada cromatograma para cada inyección. Se calculó la S y el CV para las inyecciones. El criterio de aceptación fue  $CV \leq 1.5\%$ .
- Límite de Detección y Límite de Cuantificación del Sistema: Se prepararon, por sextuplicado, 4 concentraciones más pequeñas que las utilizadas para la determinación de la linealidad del sistema (3, 7, 10 y 13 µg/mL). Por otro lado, se prepararon 6 blancos (fase móvil 77:23 ACN/H<sub>2</sub>O 0.1% TFA). Se obtuvieron las áreas bajo la curva de todas las muestras y se construyeron las curvas de calibración, sin incluir los blancos, y se calcularon los parámetros  $b_1$ ,  $r^2$  e  $IC(\beta_1)$ .

$$LD = \frac{b_0 + 3S_{b_0}}{\bar{m} \text{ a altas concentraciones} * \sqrt{n}} \quad LC = \frac{b_0 + 10S_{b_0}}{\bar{m} \text{ a altas concentraciones} * \sqrt{n}}$$

- Linealidad del Método: Se prepararon 3 muestras de analito (250 µg/mL de un pool de los extractos de *L. camara* libres de clorofilas) adicionado con 15, 30 y 45 µg/mL de la mezcla de estándares. Se determinó el área bajo la curva para cada una de las muestras. Se calcularon los parámetros:  $b_1$ ,  $b_0$ ,  $r^2$ ,  $IC(\beta_1)$ ,  $IC(\beta_0)$  y  $CV_{y/x}$ ; así como la cantidad adicionada vs la cantidad recuperada. Los criterios de aceptación de esta etapa de la prueba fueron:  $r^2 \geq 0.98$ ,  $IC(\beta_1)$  debe incluir la unidad,  $IC(\beta_0)$  debe incluir el cero y  $CV_{y/x} \leq 2\%$ . Por otro lado, se calculó el porcentaje de recobro de cada una de las muestras; así como sus parámetros  $\hat{y}$ , S, CV e  $IC(\mu)$ . Los criterios de aceptación de esta etapa de la prueba fueron:  $IC(\mu)$  debe de tener un valor entre 98 y 102% y  $CV \leq 2\%$ .
- Precisión del Método: Se analizó por triplicado una concentración de 60 µg/mL de la mezcla de estándares y se determinó su área bajo la curva, en dos días diferentes por dos analistas diferentes. Se calcularon los parámetros  $\hat{y}$ , S y CV. El criterio de aceptación fue  $CV \leq 2\%$ .

- Exactitud y Repetibilidad del Método: Se prepararon de manera independiente, 6 muestras de analito (250 µg/mL de un pool de los extractos de *L. camara* libres de clorofilas) adicionado con 30 µg/mL de la mezcla de estándares y se determinó su área bajo la curva. Se calculó el porcentaje de recobro de cada una de las muestras, al obtener el cociente de la cantidad recuperada respecto a la cantidad adicionada, expresada en porcentaje; así como sus parámetros  $\hat{y}$ , S, CV e IC( $\mu$ ). Los criterios de aceptación fueron  $98\% \leq IC(\mu) \leq 102\%$  y  $CV \leq 2\%$ .
- Estabilidad de la Muestra: Se colocaron 3 tubos eppendorf independientes, cada uno con 5 mg del pool de extractos de *L. camara* libres de clorofilas. Estos tubos fueron incubados a 40 °C, durante 2 meses. Cada 15 días se tomó una alícuota para evaluar la estabilidad de los compuestos, mediante el método validado anteriormente.

#### 6.8 Preparación de las formulaciones farmacéuticas para la administración tópica de los extractos y compuestos aislados de *L. camara*

Considerando las propiedades fisicoquímicas de los extractos de diclorometano de *L. camara*, se decidió formular una crema que tuviera propiedades oclusivas, que evitaran la evaporación de los principios activos y propiedades que ayudaran a la permeabilidad de la piel para mejorar la absorción de los extractos. La crema formulada era una emulsión aceite en agua: Parte A) 35 g de aceite mineral ligero, 12 g de cera de abeja, 10 g de miristato de isopropilo, 5 g de parafina, 1 g de lanolina y 0.2 g de propilparabeno; Parte B) 35.7 g de agua destilada, 1 g de bórax, 0.2 g de metilparabeno y 0.2 g de vitamina E. Cada una de las partes fue calentada a baño maría a 72 °C, una vez alcanzada esta temperatura, ambas partes fueron mezcladas y homogeneizadas con ayuda de una licuadora de mano hasta observar una sola fase de color blanquecino. La crema fue envasada en recipientes plásticos ámbar y almacenada a temperatura ambiente hasta su uso. Para preparar la crema con extracto o con ácido lantanílico y ácido camárico, se consideró un volumen de 20 µL de vehículo (crema únicamente) más 3 mg de extracto o 3 mg de ácido

lantánico + ácido camárico (79:21). La preparación de estas cremas compuestas se hizo con ayuda de un sistema de dos jeringas conectadas entre sí a través de una manguerilla, hasta lograr una mezcla homogénea. La crema preparada fue almacenada a 4 °C en una jeringa de plástico para insulina, para facilitar su posterior aplicación en animales.

#### 6.9 Evaluación *in vivo* de extractos activos de *L. camara*

El protocolo de manejo de animales fue realizado conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, y fue aprobado por la Comisión de Investigación y de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo el número de dictamen FM/DI088/2017, con vigencia del 6 de febrero de 2018 al 6 de febrero de 2021. Para la evaluación de la actividad leishmanicida *in vivo*, se utilizaron ratones machos BALB/c de 28 g de peso corporal. Los ratones fueron infectados con  $1 \times 10^6$  promastigotes en fase metacíclica, contenidos en 10  $\mu$ L de PBS 1X, con ayuda de una jeringa de insulina, en el cojinete plantar de la pata trasera derecha. Se formaron los siguientes grupos, con 4 miembros cada uno (Cuadro 10). El inicio de los tratamientos comenzó a los 30 días post-infección (t = 0 días).

Cuadro 10. Grupos experimentales de ratones para la evaluación *in vivo* de los extractos y compuestos aislados de *L. camara*

Grupo	Descripción	Dosis
1	Control sin tratamiento	-
2	Vehículo 1	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 1
3	Vehículo 2	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 2
4	Marzo 2014	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 1
5	Marzo 2014	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 2
6	Marzo 2014	7 mg/20 $\mu$ L vehículo 2
7	Septiembre 2015	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 1
8	$\beta$ -cariofileno	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 1
9	Óxido de cariofileno	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 1
10	$\beta$ -ionona	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 1
11	Escualeno	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 1
12	Ácido lantánico + ácido camárico (79:21)	3 mg/20 $\mu$ L vehículo 1

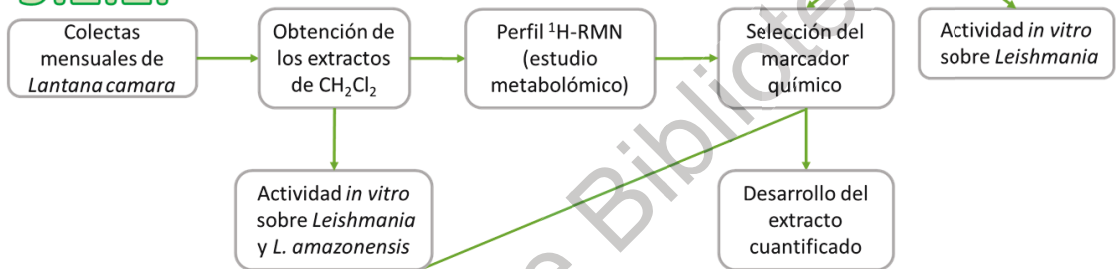
Los ratones recibieron el tratamiento una vez al día, de lunes a viernes, durante 5 semanas. Cada semana se midió el grosor del cojinete plantar con ayuda de un vernier. Al cabo de las 5 semanas, los ratones fueron anestesiados con Isoflurano inhalado y sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, se cortó el cojinete plantar y se fijó en formol al 10% para su subsecuente encapsulación en parafina y tinción de Giemsa. De estas preparaciones histopatológicas se hicieron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de grosor y fueron fijados en laminillas para su posterior observación. De estos cortes se tomaron 8 fotografías con un aumento de 60X, para cubrir un área de 1  $\text{mm}^2$  de tejido. El porcentaje de reducción en el tamaño de la lesión y en la carga parasitaria fue calculado con base en las mediciones obtenidas para el grupo control sin tratamiento.

## 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 5.2.1.



### 5.2.2.

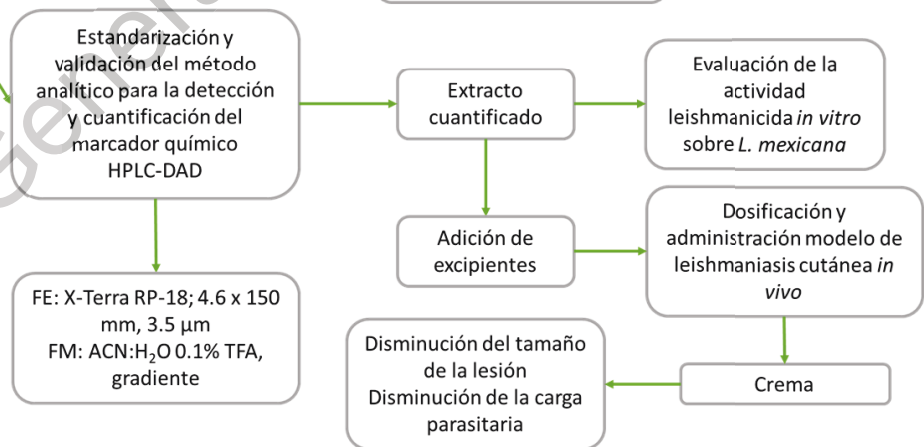


### 5.2.3.



### 5.2.4. y

### 5.2.5





## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Actividad leishmanicida del extracto de diclorometano de *L. camara* sobre promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*

En el presente trabajo, se evaluó la actividad leishmanicida del extracto de diclorometano de las partes aéreas de *L. camara* var. *aculeata* (L.) colectada en el centro de México, sobre *L. mexicana*, con el fin de determinar si esta cepa de *Leishmania* era susceptible al efecto de este extracto, como previamente había sido encontrado para *L. amazonensis*, ya que ambas especies pertenecen al mismo complejo de *Leishmania* (*Leishmania mexicana*) (Akhoundi et al., 2016). En este estudio se encontró que, a pesar de tener un parentesco filogenético, ambas cepas poseen una susceptibilidad diferente al extracto completo, siendo *L. mexicana* más resistente que *L. amazonensis*. De hecho, la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) del extracto para *L. mexicana* (CI<sub>50</sub> = 42.6 ± 1.9 µg/mL) fue aproximadamente el doble de la encontrada para *L. amazonensis* (CI<sub>50</sub> = 21.8 ± 2.4 µg/mL). En un reporte previo, se encontró que los amastigotes de *L. amazonensis* son más resistentes que los promastigotes, ya que la CI<sub>50</sub> para amastigotes es más alta que para promastigotes (Delgado-Altamirano et al., 2017). En contraste, los promastigotes de *L. mexicana* son más resistentes que sus amastigotes, ya que la CI<sub>50</sub> para las fracciones más activas (FII, FX, FXI y FXV) estuvo por debajo de 12.5 µg/mL. Es un hecho bien documentado, que las especies de *Leishmania* presentan grandes diferencias en la susceptibilidad a los fármacos de referencia (Perez-Franco et al., 2016; Ghobakhloo et al., 2017; Mahmoudvand et al., 2017; Martín-Montes et al., 2017). Incluso entre cepas dentro de una misma especie, existen diferencias de sensibilidad a fármacos antileishmaniales (Ginouvé et al., 2017). A la fecha, los mecanismos que ocasionan este fenómeno, no han sido elucidados.

Es importante resaltar que el extracto de diclorometano de *L. camara* (CI<sub>50</sub> = 42.6 ± 1.9 µg/mL) fue más selectivo y, resultó ser aproximadamente 100 veces más potente que el fármaco de referencia (Glucantime®, CI<sub>50</sub> = 4019.7 ± 140.4 µg/mL)

en *L. mexicana*. En contraste, en un estudio publicado por Begum y cols., en 2014, se encontró que un extracto metanólico preparado a partir de un espécimen pakistani de *L. camara*, mostró una  $CI_{50} = 42 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$  sobre promastigotes de *L. major*, similar a lo observado por nuestro grupo de investigación (Begum et al., 2014). No obstante, este extracto fue considerablemente menos potente que los fármacos de referencia pentamidina ( $CI_{50} = 5.1 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ ) y anfotericina B ( $CI_{50} = 0.3 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ ). Esto evidencia el potencial del extracto obtenido del espécimen mexicano de *L. camara*, para el desarrollo de un fitomedicamento anti-leishmanial o como fuente de productos naturales con actividad leishmanicida.

Una vez demostrado el potencial leishmanicida del extracto, éste fue fraccionado por cromatografía en columna abierta en 18 fracciones finales (FI–FXVIII), de acuerdo a su similitud cromatográfica. Todas las fracciones cromatográficas fueron evaluadas sobre promastigotes de *L. mexicana* y amastigotes de *L. amazonensis*. Adicionalmente, la citotoxicidad de cada una de las fracciones fue evaluada sobre macrófagos peritoneales de ratones BALB/c (Delgado-Altamirano, 2015). Los resultados de estas evaluaciones se presentan en el Cuadro 11.

Cuadro 11. Valores de  $CC_{50}$  y  $CI_{50}$  para el extracto crudo y las 18 fracciones cromatográficas de *L. camara*

Extracto o Fracción	$CC_{50} \pm SD$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) BALB/c macrófagos peritoneales*	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) Amastigotes de <i>L. amazonensis</i> *	IS en <i>L. amazonensis</i> *	$IC_{50} \pm SD$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) Promastigotes de <i>L. mexicana</i>	IS en <i>L. mexicana</i>
Extracto crudo	> 100	$21.8 \pm 2.4$	> 5	$42.6 \pm 1.9$	> 2
FI	$65.2 \pm 2.3$	$12.2 \pm 1.8$	5	> 200	< 0.5
<b>FII</b>	> 100	<b><math>9.1 \pm 3.4</math></b>	<b>&gt; 11</b>	$132.1 \pm 7.9$	0.49
FIII	> 100	$18.3 \pm 1.5$	> 5	> 200	N.C.
FIV	> 100	$30.2 \pm 3.5$	> 3	> 200	< 0.5
FV	> 100	$17.9 \pm 3.8$	> 6	> 200	< 0.5
FVI	> 100	$21.5 \pm 4.3$	> 5	> 200	< 0.5
FVII	$96.8 \pm 2.2$	$17.9 \pm 2.5$	> 5	> 200	< 0.5
FVIII	$92.3 \pm 3.1$	$24.7 \pm 2.9$	> 4	> 200	< 0.5
FIX	> 100	$18.6 \pm 1.5$	> 5	$96.0 \pm 1.6$	> 1
<b>FX</b>	> 100	<b><math>7.9 \pm 0.3</math></b>	<b>&gt; 13</b>	<b><math>11.2 \pm 2.2</math></b>	<b>&gt; 9</b>
<b>FXI</b>	> 100	<b><math>8.0 \pm 1.1</math></b>	<b>&gt; 13</b>	<b><math>22.0 \pm 9.3</math></b>	<b>&gt; 4</b>
FXII	> 100	$16.7 \pm 3.7$	> 6	$87.3 \pm 2.1$	> 1

FXIII	82.2 ± 2.6	12.1 ± 0.7	> 7	83.3 ± 6.9	1
FXIV	60.8 ± 1.4	15.1 ± 1.0	> 4	89.4 ± 2.4	N.C.
<b>FXV</b>	> 100	23.6 ± 2.6	> 4	<b>2.8 ± 0.5</b>	<b>&gt; 35</b>
<b>FXVI</b>	> 100	<b>8.5 ± 1.7</b>	<b>&gt; 12</b>	<b>16.5 ± 1.6</b>	<b>&gt; 6</b>
FXVII	> 100	19.8 ± 3.9	> 5	157.8 ± 15.5	< 0.6
FXVIII	> 100	15.6 ± 4.7	> 6	> 200	< 0.5
Pentamidina	11.7 ± 1.7	1.3 ± 0.1	9	N.D.	N.D.
Glucantime®	60.0 ± 3.0	N.D.	N.D.	4,019.7 ± 140.4	0.015

CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica media. IC<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria media. IS: Índice de selectividad. N.C.: No calculado. N.D.: No determinado. \*: publicado previamente en (Delgado-Altamirano, 2015). ANOVA de dos vías con análisis post-hoc de Tukey, p<0.05. Las letras en negritas indican las fracciones más activas para cada una de las cepas de *Leishmania*

Las fracciones FII, FX, FXI, FXV y FXVI fueron las más activas y selectivas frente a las dos especies de *Leishmania*. Se ha establecido en ensayos de cribado contra microorganismos infecciosos que, un extracto crudo o fracción que muestra valores de CI<sub>50</sub> ≤ 100 µg/mL y de IS ≥ 5, es un candidato potencial para seguir siendo investigado en su actividad antimicrobiana (Cos et al., 2006; Delgado-Altamirano et al., 2017; Ginouvès et al., 2017).

En concordancia con lo encontrado para el extracto crudo, en general, *L. mexicana* resultó ser más resistente que *L. amazonensis* al efecto de las fracciones. No obstante, FX, FXI y FXVI fueron igualmente activas en ambas cepas de *Leishmania*. Interesantemente, la actividad leishmanicida de estas fracciones fue significativamente más alta en amastigotes de *L. mexicana* (CI<sub>50</sub> < 12.5 µg/mL), en comparación con los promastigotes de esta misma especie. Una tendencia similar fue observada en el caso del extracto crudo. Por esta razón, los siguientes análisis de la actividad leishmanicida se realizaron sobre promastigotes, ya que estos fueron los más resistentes al efecto de los extractos y las fracciones. La FXV mostró el efecto más potente y el mejor índice de selectividad frente a los promastigotes de *L. mexicana*.

Un análisis cromatográfico de las fracciones más activas (FII, FX, FXI, FXV y FXVI) fue llevado a cabo para encontrar los compuestos responsables de la actividad biológica. Es importante mencionar que FXVI mostró un perfil cromatográfico

equivalente a FXV; sin embargo, debido al bajo rendimiento de FXVI, FXV fue seleccionada para el estudio subsecuente.

## 8.2 Identificación de los componentes mayoritarios de la fracción FII por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

El análisis de CG-EM de FII permitió la identificación de 55 compuestos, los cuales fueron clasificados como monoterpenos (4.18%), sesquiterpenos (22.69%), diterpenos (3.53%), triterpenos (19.57%), hidrocarburos (46.46%) y otros (3.67%). Los 10 componentes mayoritarios presentes en la FII fueron eicosano (24.08%), escualeno (19.57%), octacosano (6.63%),  $\beta$ -ionona (4.50%),  $\alpha$ -curcumeno (4.37%), dihidroactinólido (2.86%), óxido de cariofileno (2.18%), ácido tíglico (2.18%),  $\beta$ -cariofileno (1.02%) y ácido hexanoico (1.00%) (Figura 6). Los compuestos disponibles comercialmente, fueron adquiridos para su evaluación individual sobre *Leishmania* (Figura 6, números en negritas).

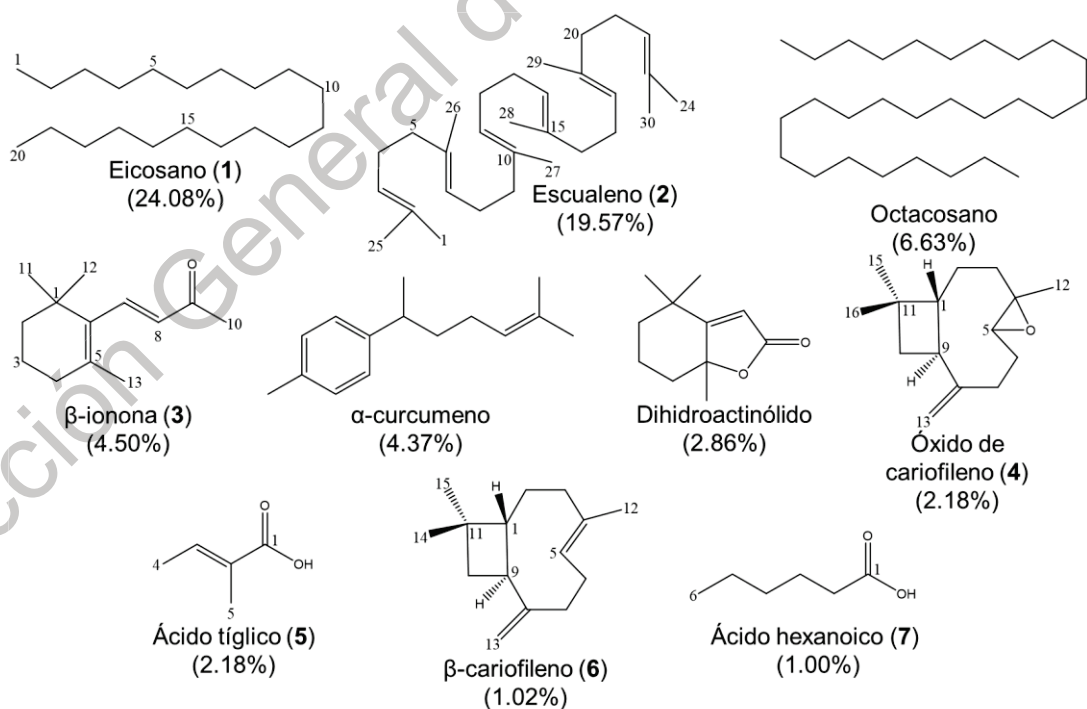


Figura 6. Estructuras químicas de los 10 componentes mayoritarios de la FII. Los números en negritas indican aquellos compuestos que estaban disponibles comercialmente y que fueron evaluados individualmente frente a *L. mexicana*.

8.3 Aislamiento, purificación e identificación de los componentes mayoritarios de las fracciones FX, FXI y FXV por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a arreglo de diodos (HPLC-DAD)

Para realizar la cromatografía de líquidos de alta resolución de las fracciones FX, FXI y FXV, se removieron las clorofilas como se indicó en la metodología. Una vez limpias las fracciones, éstas se sometieron a las condiciones establecidas previamente para su separación. La FX presentó 4 picos: A ( $t_R = 8.5$  min), B ( $t_R = 9.0$  min), C ( $t_R = 15.75$  min) y D ( $t_R = 17.4$  min). La FXI sólo presentaba 1 pico: C ( $t_R = 15.75$  min) del que fue posible aislar unas agujas que fueron analizadas por RMN. Finalmente, la fracción FXV presentaba los picos A ( $t_R = 8.5$  min) y B ( $t_R = 9.0$  min). Los cromatogramas se muestran en la Figura 7.

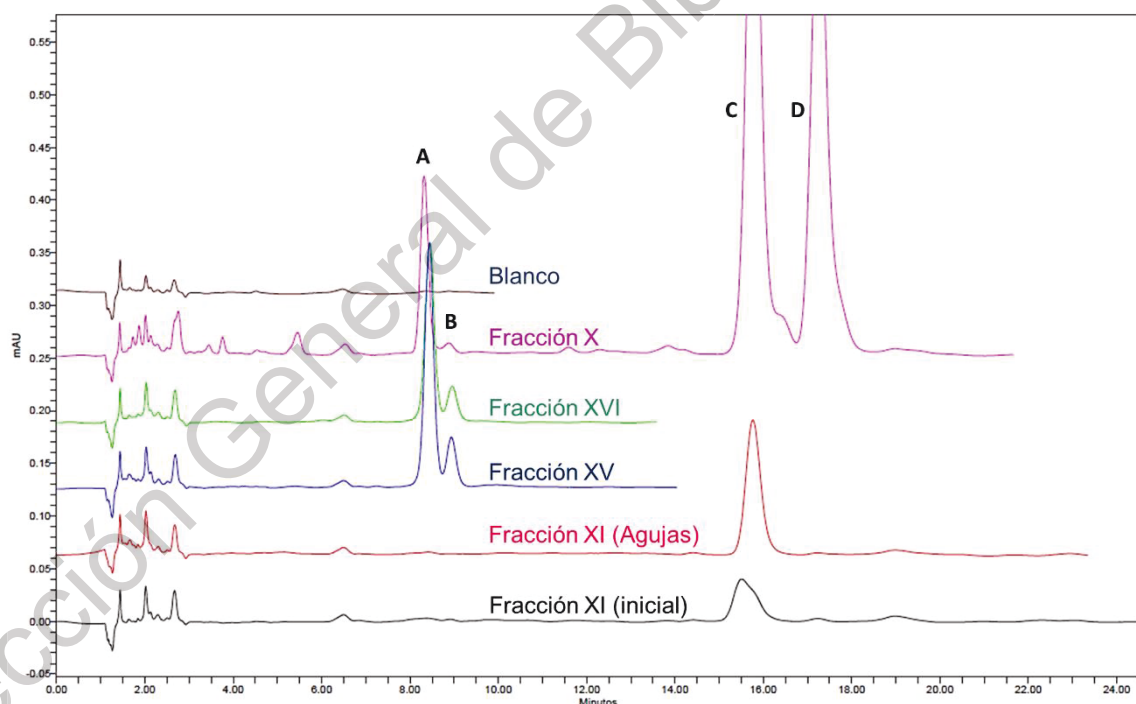


Figura 7. Cromatograma de las fracciones FX, FXI, FXV y FXVI. Fase estacionaria: X-Terra RP-18, 4.6x150 mm, 3.5  $\mu$ m; Fase móvil: 70% ACN, 30% H<sub>2</sub>O (0.1% TFA); Flujo: 1 mL/min;  $\lambda = 210$  nm.

La purificación de los compuestos A y B a partir de FXV, permitió la identificación de 2 picos adicionales: E ( $t_R = 1.90$  min) y F ( $t_R = 2.5$  min). Se requirieron 850

inyecciones para obtener las siguientes cantidades: 8.7 mg (pico E), 3.0 mg (pico F), 18.5 mg (pico A) y 8.5 mg (pico B) (Figura 8). Los 6 picos fueron analizados por resonancia magnética nuclear para su identificación.

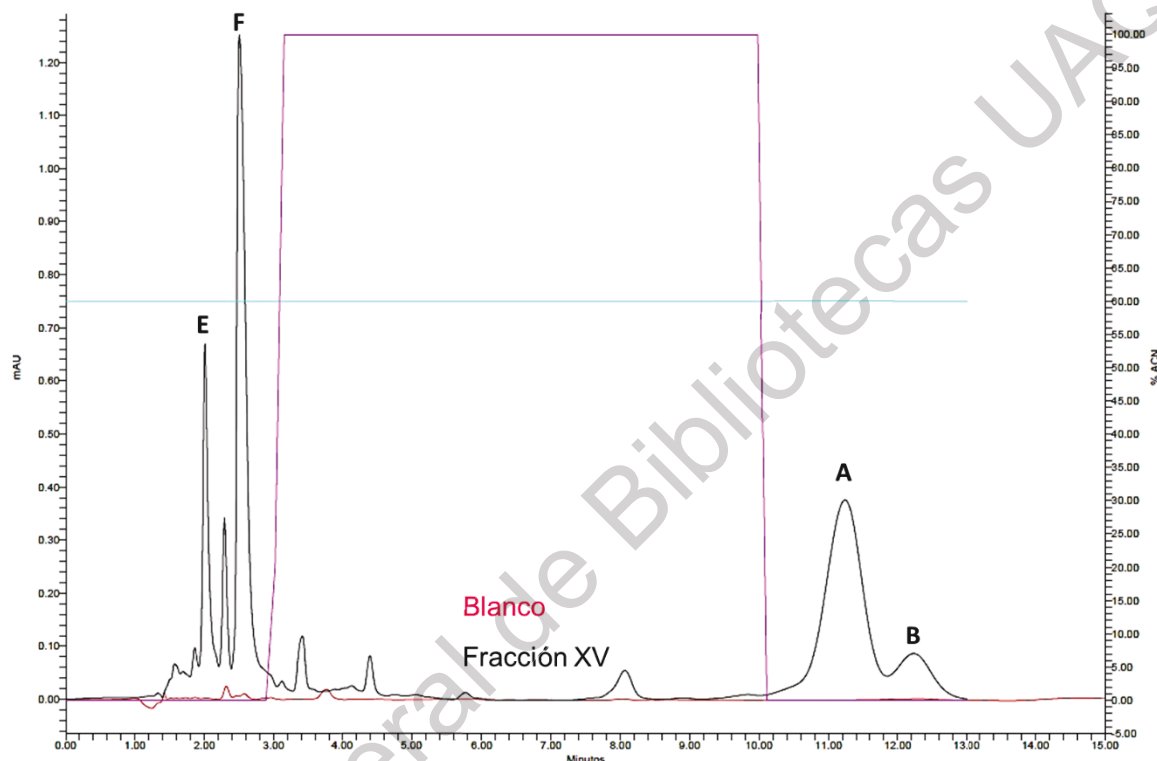


Figura 8. Cromatograma de la purificación de los picos de la FXV. Fase estacionaria: X-Terra RP-18, 4.6x150 mm, 3.5  $\mu$ m; Fase móvil: 60% ACN, 40% H<sub>2</sub>O (0.1% TFA); Flujo: 1 mL/min (0-3 min), 1.8 mL/min (3-10 min), 1 mL/min (10-13 min);  $\lambda$  = 210 nm.

En la Figura 9 se muestran las estructuras de los compuestos correspondientes a los picos A–F. El análisis de RMN de los picos A, B y C, permitió identificarlos como triterpenos: ácido lantanílico (Cuadro 12), ácido camárico (Cuadro 13) y lantadeno B (Cuadro 14), respectivamente (Delgado-Altamirano et al., 2019b; Delgado-Altamirano et al., 2019a). El pico E correspondía a una impureza de bis(2-etilhexilftalato) (Cuadro 15). Tanto el pico D como el F no pudieron ser identificados. No obstante, el pico D corresponde probablemente a algún otro triterpeno. Por otro lado, los espectros de RMN revelaron que el pico F era una mezcla de impurezas

no identificables. Los espectros de RMN de cada uno de los compuestos se encuentran en los Anexos II, III y IV.

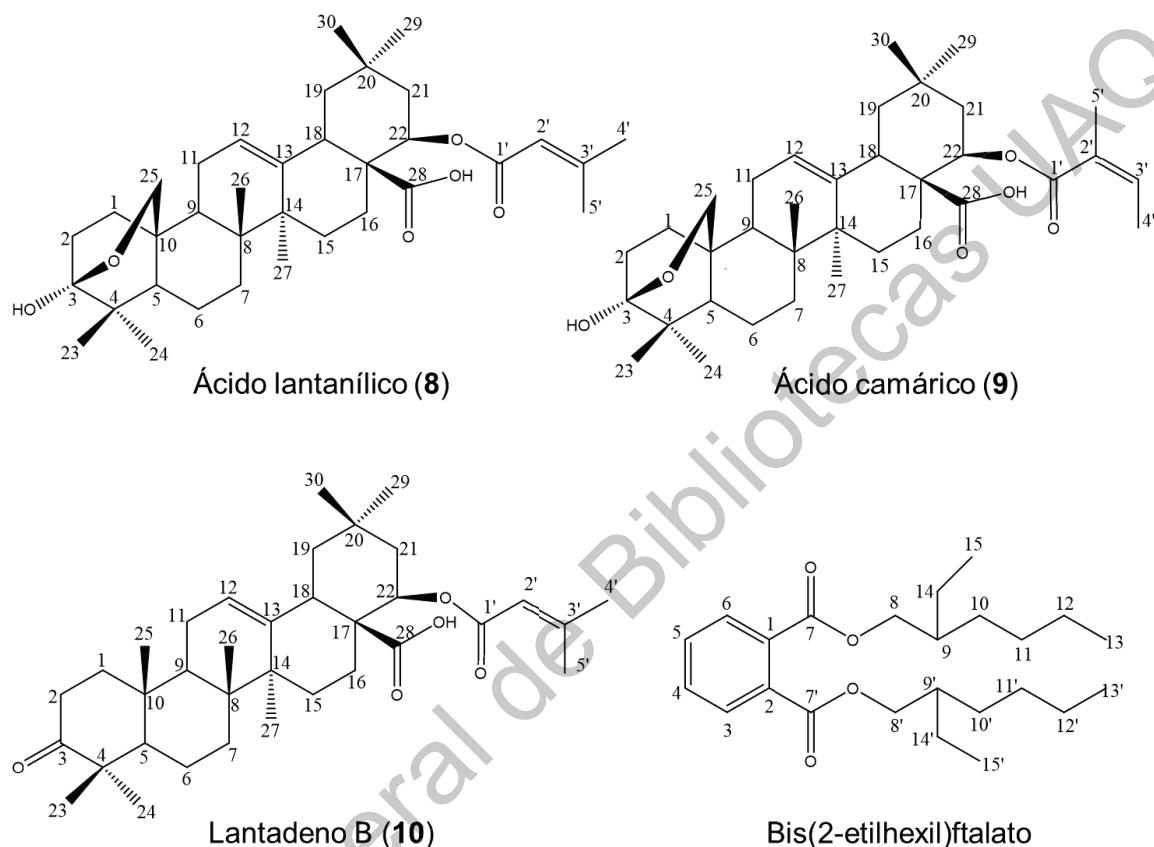


Figura 9. Estructuras químicas de los componentes mayoritarios de la FXV. Los números en negritas indican aquellos compuestos que fueron evaluados frente a *L. mexicana*.

Cuadro 12. Asignación y acoplamientos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el pico A: ácido lantanílico.

Posición	$\delta_{\text{C}}$ en ppm	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, ( $J$ en Hz)	COSY	HMBC
1a	34.85	2.15 <sup>a</sup> , m	1b, 2a, 2b	2, 3, 5, 10, 25
1b		1.20 <sup>a</sup> , m	1a, 2a, 2b, 25a, 25b	
2a	29.37 <sup>s</sup>	2.16 <sup>a,s</sup> , m	1a, 1b, 2b	1, 3, 10
2b		1.71 <sup>s</sup> , m	1a, 1b, 2a, 25a	
3	98.94	-	-	-
4	40.41 <sup>s</sup>	-	-	-



5	50.46	1.21 <sup>a</sup> , m	6a, 6b, 25a, 25b	4, 6, 10, 23, 24, 25
6a	19.86	1.52 <sup>a</sup> , m	5, 7a, 7b	5, 7, 8, 10
6b				
7a	31.21	1.36, m	6a, 6b	5, 6, 8, 26
7b				
8	38.88 <sup>§</sup>	-	-	-
9	42.22 <sup>§</sup>	1.69 <sup>§</sup> , m	11a, 11b, 25a	1, 5, 10, 11, 14, 26
10	35.24	-	-	-
11a	23.90	2.02, m	9, 11b, 12	8, 9, 12, 13
11b		1.79, m	9, 11a, 12	5, 8, 9, 10, 12, 13
12	122.82	5.39, t (3.6)	11a, 11b	9, 11, 13, 14, 18
13	143.06	-	-	-
14	42.12 <sup>§</sup>	-	-	-
15a	27.93 <sup>§</sup>	1.52 <sup>a§</sup> , m	15b, 16a, 16b	14, 16, 17, 27
15b		1.23 <sup>§</sup> , m	15a, 16a, 16b	
16a	24.25	1.87, td (13.4, 3.5)	15a, 15b	14, 15, 17, 18, 22, 28
16b				
17	50.94	-	-	-
18	39.40	3.04, dd (13.8, 4.0)	19a, 19b	12, 13, 14, 16, 17, 19, 28
19a	45.91	1.74 <sup>a</sup> , m	18, 19b	17, 18, 20, 29, 30
19b		1.29, m	18, 19a, 29	17, 20, 21, 22, 29
20	30.51	-	-	-
21a	37.93	1.75 <sup>a</sup> , m	21b, 22 $\alpha$	17, 19, 20, 22, 29, 30
21b		1.49, m	21a, 22 $\alpha$	19, 20, 29, 30
22 $\alpha$	75.35	5.03, t (3.2)	21a, 21b	16, 17, 18, 20, 21, 28, 1'
23	27.37	1.03, s	24	3, 4, 5, 24
24	18.40 <sup>§</sup>	0.96 <sup>§</sup> , s	23	3, 4, 5, 6, 23
25a	68.33	4.25, dd (9.1, 3.2)	1b, 5, 9, 25b	1, 2, 8, 11
25b		3.91, dd (9.1, 1.5)	1b, 5, 25a	1, 3, 5
26	17.46 <sup>§</sup>	0.77 <sup>§</sup> , s	-	7, 8, 9, 14
27	25.46 <sup>§</sup>	1.16 <sup>§</sup> , s	-	8, 14, 15
28	177.27	-	-	-
29	33.88	0.88, s	19b, 30	19, 20, 21, 22, 30
30	26.38 <sup>§</sup>	1.01 <sup>§</sup> , s	19a, 21a, 29	19, 20, 21, 29
1'	165.50	-	-	-
2'	116.08	5.57, hept (1.2)	4', 5'	1', 3', 4', 5'
3'	157.50	-	-	-
4'	27.58	1.85, d (1.1)	2', 5'	1', 2', 3', 5'
5'	20.38	2.14 <sup>a</sup> , d (1.1)	2', 4'	1', 2', 3', 4'

<sup>a</sup>Señal solapada

<sup>§</sup>Señal reasignada con respecto a lo publicado por (Siddiqui et al., 1995).



Cuadro 13. Asignación y acoplamientos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el pico B: ácido camárico.

Posición	$\delta_{\text{C}}$ en ppm	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)	COSY	HMBC
1a		2.15 <sup>a</sup> , m	1b, 2a, 2b	
1b	34.86	1.20 <sup>a</sup> , m	1a, 2a, 2b, 25a, 25b	2, 3, 5, 25
2a		2.15 <sup>a§</sup> , m	1a, 1b, 2b	
2b	29.52 <sup>§</sup>	1.71 <sup>a§</sup> , m	1a, 1b, 2a, 25a	1, 3, 4, 23, 25
3	98.78	-	-	1, 2, 23, 24, 25
4	40.41 <sup>§</sup>	-	-	23, 24
5	50.49	1.21 <sup>a</sup> , m	6a, 6b, 25a, 25b	1, 6, 7, 23, 24, 25
6a		1.52 <sup>a</sup> , m	5, 7a, 7b	24
6b	19.85			
7a		1.37, m	6a, 6b	26
7b	31.20			
8	38.47 <sup>§</sup>	-	-	9, 11, 26, 27
9	42.21 <sup>§</sup>	1.70 <sup>a§</sup> , m	11a, 11b, 25a	8, 10, 11, 12, 25, 26
10	35.27	-	-	1, 2, 25
11a		2.01, s	9, 11b, 12	
11b	23.90	1.81, m	9, 11a, 12	8, 9, 12, 13
12	122.95	5.41, br t (3.4)	11a, 11b	9, 11, 14, 18
13	143.03	-	-	11, 18, 27
14	42.12	-	-	9, 12, 15, 18, 26, 27
15a		1.52 <sup>a§</sup> , m	15b, 16a, 16b	
15b	27.92 <sup>§</sup>	1.25 <sup>§</sup> , m	15a, 16a, 16b	14, 16, 27
16a		1.89, td (13.5, 3.4)	15a, 15b	15, 17, 18, 28
16b	24.32			
17	50.91	-	-	15, 16, 18, 19, 22
18	39.42	3.06, dd (14.0, 4.1)	19a, 19b	12, 13, 14, 16, 17, 19, 22, 28
19a		1.74 <sup>a</sup> , m	18, 19b	
19b	45.89	1.29, m	18, 19a, 29	17, 18, 20, 29, 30
20	30.21	-	-	19, 21, 22, 29, 30
21a		1.76 <sup>a</sup> , m	21b, 22 $\alpha$	
21b	38.00	1.52 <sup>a</sup> , m	21a, 22 $\alpha$	17, 20, 22, 29, 30
22 $\alpha$	76.05	5.09, t (3.2)	21a, 21b	16, 17, 18, 20, 21, 29, 1'
23	27.39	1.03, s	24	1, 2, 3, 4, 5, 24
24	18.39 <sup>§</sup>	0.97 <sup>§</sup> , s	23	3, 4, 5, 6, 23
25a		4.25, dd (8.6, 2.7)	1b, 5, 25b	
25b	67.89	3.90, dd (8.6, 1.5)	1b, 5, 25a	1, 2, 3, 5, 9
26	17.38 <sup>§</sup>	0.77 <sup>§</sup> , s	-	7, 8, 9, 14
27	25.47 <sup>§</sup>	1.16 <sup>§</sup> , s	-	8, 13, 14, 15
28	177.08	-	-	16, 18
29	33.84	0.90, s	19b, 30	19, 20, 21, 22, 30
30	26.26 <sup>§</sup>	1.01 <sup>§</sup> , s	29	19, 20, 21, 29
1'	166.60	-	-	22, 4', 5'
2'	127.85	-	-	4', 5'
3'	138.92	6.01, qq (7.3, 1.5)	4' 5'	2', 4', 5'
4'	15.80	1.97, dq (7.3, 1.5)	3', 5'	2', 3'
5'	20.65	1.81, quint (1.5)	3', 4'	1', 2', 3'

<sup>a</sup>Señal solapada

<sup>§</sup>Señal reasignada con respecto a lo publicado por (Siddiqui et al., 1995).

Cuadro 14. Asignación y acoplamientos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el pico C: lantadeno B.

Posición	$\delta_{\text{C}}$ en ppm	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)	COSY	HMBC
1a	39.32	1.90, m	1b, 2a, 2b	3, 5, 10
1b		1.41, m	1a, 2a, 2b	3, 9, 10, 25
2a	34.29	2.55, ddd (15.8, 11.2, 7.2)	1a, 1b, 2b	1, 3
2b		2.37, ddd (15.8, 6.7, 3.6)	1a, 1b, 2a	3, 10
3	217.81	-	-	-
4	47.59	-	-	-
5	55.47	1.32, m	6	4, 6, 10, 23, 24, 25
6	19.59	1.49, m	5, 7a, 7b	5, 8, 10
7a	32.43	1.50, m	6, 7b	8
7b		1.30, m	6, 7a	5, 8, 9, 26
8	39.40	-	-	-
9	47.03	1.66, dd (11.2, 6.4)	11	11
10	36.92	-	-	-
11	23.71	1.96, m	9, 12	8, 12, 13,
12	122.52	5.38, t (3.5)	11	9, 14, 18
13	143.22	-	-	-
14	42.22	-	-	-
15a	27.76 <sup>s</sup>	1.56, m	15b, 16	27
15b		1.14, m	15a, 16	8, 14
16	24.28	1.88, m	15a, 15b	15a, 15b
		1.81, m	15a, 15b	
17	50.73	-	-	-
18	38.75	3.03, dd (13.7, 4.4)	12, 19a, 19b	12, 13, 16, 17, 19
19a	46.13	1.71, m	18	17, 18, 20, 29, 30
19b		1.30, m		
20	30.21	-	-	-
21a	37.80	1.74, m	22	17, 20, 29, 30
21b		1.47, m		20, 30
22 $\alpha$	75.37	5.04, t (3.1)	21a, 21b	18, 20
23	26.60	1.09, s	24	3
24	21.64	1.04, s	23	3
25	15.30	1.06, s	-	5
26	17.00	0.84, s	-	7, 8, 9, 14
27	25.90	1.17, s	-	13
28	178.72	-	-	-
29	33.88	0.88, s	30	19, 20, 21, 30
30	26.43	1.00, s	29	19, 20, 21, 29
1'	165.46	-	-	-
2'	116.12	5.56, p (1.2)	4', 5'	4', 5'
3'	157.20	-	-	-
4'	20.38	2.13, d (1.2)	2'	1', 2', 3', 5'
5'	27.57	1.84, d (1.3)	2'	2', 3', 4'

Cuadro 15. Asignación y acoplamientos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el pico E: bis(2-  
etilhexil)ftalato.

Posición	$\delta_{\text{C}}$ en ppm	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)	COSY	HMBC
1, 2	132.61	-	-	-
3, 6	128.96	7.71, dd (5.7, 3.3)	4, 5	4, 5, 7, 7'
4, 5	131.04	7.53, dd (5.7, 3.3)	3, 6	1, 2, 3, 6
7, 7'	167.92	-	-	-
8, 8'	68.32	4.22, qdd (11.0, 5.7, 1.0)	9, 9'	7, 7', 9, 9', 10, 10', 14, 14'
9, 9'	38.88	1.68, dt (12.37, 6.18)	8, 8', 10, 10'	8, 8', 10, 10', 11, 11', 15, 15'
10, 10'	30.51	1.36, m	9, 9', 11, 11'	11, 11', 12, 12'
11, 11'	29.08	1.31, m	10, 10', 12, 12'	12, 12', 13, 13'
12, 12'	23.14	1.32, m	11, 11', 13, 13'	10, 10', 11, 11'
13, 13'	14.20	0.89, t (7.1)	12, 12'	11, 11', 12, 12'
14, 14'	23.90	1.42, m	9, 9', 15, 15'	8, 8', 9, 9', 10, 10', 15, 15'
15, 15'	11.11	0.92, t (7.5)	14, 14'	9, 9', 14, 14'

#### 8.4 Actividad leishmanicida de los compuestos aislados a partir de las fracciones activas del extracto de diclorometano de *L. camara*

Una vez purificados e identificados los componentes mayoritarios de las fracciones FII, FX, FXI y FXV, se evaluó su actividad leishmanicida sobre promastigotes de *L. mexicana*, ya que este estadio fue el que mostró una mayor resistencia al efecto de las fracciones completas. En el Cuadro 16 se muestran las  $\text{Cl}_{50}$  para los 10 compuestos.

Cuadro 16. Actividad leishmanicida de los componentes mayoritarios de las fracciones FII, FX, FXI y FXV.

Fracción	Compuesto	$\text{Cl}_{50} \pm \text{DE}$ ( $\mu\text{M}$ ) Promastigotes <i>L. mexicana</i>
FII	Eicosano (1)	$> 500^{\text{a}}$
	Escualeno (2)	$> 500^{\text{a}}$
	$\beta$ - ionona (3)	$80.80 \pm 7.09^{\text{b}}$
	Óxido de cariofileno (4)	$81.62 \pm 2.16^{\text{b}}$
	Ácido tíglico (5)	$> 500^{\text{a}}$
	$\beta$ - cariofileno (6)	$74.43 \pm 4.38^{\text{b}}$
	Ácido hexanoico (7)	$42.96 \pm 6.02^{\text{c}}$
FX, FXV	Ácido lantanílico (8)/ ácido camárico (9) (79% 21%)	$12.02 \pm 0.36^{\text{d}}$ $(9.50 \pm 0.28, \text{ácido lantanílico})$ $(2.52 \pm 0.08, \text{ácido camárico})$

FX, FXI	Lantadeno B (10)	23.45 ± 2.15 <sup>d</sup>
Control positivo	Glucantime®	11,000.00 ± 2.15 <sup>e</sup>

Las letras en superíndice (a, b, c, d y e) indican diferencia estadísticamente significativa entre las CI<sub>50</sub> de los compuestos puros, a través de un análisis ANOVA de una vía con prueba post-hoc de Tukey, p<0.0001.

De estos 10 compuestos, tres han sido previamente evaluados sobre otras especies de *Leishmania*: óxido de cariofileno (4), β-cariofileno (3) y ácido lantanílico (8). Por otro lado, los resultados encontrados en este trabajo para el eicosano (1), el escualeno (2), la β-ionona (3), el ácido hexanoico (7), el ácido tíglico (5), el ácido camárico (9) y el lantadeno B (10), constituyen el primer reporte sobre su actividad leishmanicida.

El óxido de cariofileno (4), ha sido ampliamente estudiado por Monzote y cols., quienes lo han evaluado sobre *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), encontrando una CI<sub>50</sub> = 22.2 ± 10.4 μM para promastigotes y una CI<sub>50</sub> = 20.0 ± 1.8 μM para amastigotes (Monzote et al., 2014a). Por otro lado, este mismo grupo de investigación encontró que para promastigotes de *L. tarentolae* (P10), una especie de *Sauroleishmania*, la CI<sub>50</sub> era de 36.0 ± 17.6 μM (Monzote et al., 2018). Con base en sus estudios, ellos han propuesto que los mecanismos de acción, por los cuales actúa el óxido de cariofileno, involucran una potenciación de los radicales superóxido, un decremento del consumo de oxígeno de los promastigotes y la inhibición del complejo III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Monzote et al., 2018).

Considerando los valores de CI<sub>50</sub> obtenidos para el óxido de cariofileno para las distintas cepas de *Leishmania*, *L. tarentolae*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*, esta última especie de *Leishmania* ha mostrado ser la más resistente a este sesquiterpeno, pues su CI<sub>50</sub> es la más alta (CI<sub>50</sub> = 81.62 ± 2.16 μM, Cuadro 16), lo que confirma que, a pesar de que *L. amazonensis* y *L. mexicana* pertenecen al mismo complejo (*L. mexicana*), presentan susceptibilidades diferentes a fármacos.

Se ha establecido que un compuesto puro puede ser considerado como un potencial agente anti-infectivo, cuando su valor de  $CI_{50}$  es igual o menor a  $25 \mu\text{M}$  (Cos et al., 2006). De esta forma, se considera que el óxido de cariofileno (**4**) es activo contra *L. tarentolae* y *L. amazonensis*, pero no frente a *L. mexicana*, de manera *in vitro*. Por otra parte, Monzote y cols., evaluaron el efecto *in vivo* de **4** en un modelo de leishmaniasis cutánea ocasionada por *L. amazonensis*, en ratones BALB/c. Ellos administraron una dosis intralesional de  $30 \text{ mg/kg/día}$  durante 14 días y observaron un 74% de reducción en el tamaño de la lesión, mientras que en el grupo control tratado con Glucantime, sólo se observó un 60% de disminución del tamaño de la lesión. En este mismo experimento, se observó que el óxido de cariofileno tenía la capacidad de reducir la carga parasitaria en un 90%, mientras que el Glucantime sólo logró una reducción del 50% (Monzote et al., 2014b). Estos datos indican el alto valor del óxido de cariofileno como agente leishmanicida para el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de leishmaniasis cutánea; no obstante, es necesario evaluar otras vías de administración además de la vía intralesional, ya que este tipo de administración sigue representando una importante desventaja en el apego del paciente al tratamiento, ya que requiere de personal médico calificado que lo aplique (DNDi, 2018).

Otro compuesto íntimamente relacionado al óxido de cariofileno, es el  $\beta$ -cariofileno (**5**), la forma reducida de **4**. Este compuesto fue previamente identificado por Soares y cols., como uno de los componentes mayoritarios del aceite de *Copaiba* spp., el cual exhibía una significativa actividad leishmanicida contra *L. amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa), ya que poseía una  $CI_{50} = 6.36 \mu\text{M}$  y un índice de selectividad de 49 (Soares et al., 2013). La comparación entre los resultados obtenidos por Soares y cols., con lo obtenido en el presente trabajo muestra, una vez más, que *L. mexicana* es más resistente que esta cepa de *L. amazonensis* al efecto leishmanicida del  $\beta$ -cariofileno. Hasta el momento, los mecanismos por los cuales **5** ejerce su actividad contra *Leishmania*, siguen sin ser elucidados ni tampoco se ha evaluado su actividad leishmanicida *in vivo*.

De todos los compuestos detectados en las fracciones bioactivas del extracto de diclorometano del *L. camara* var. *aculeata* cultivar amarillo-rosado, los triterpenos de tipo oleanano (Figura 10); el lantadeno B (**10**) y la mezcla de ácido lantanílico (**8**) y ácido camárico (**9**) fueron los más activos.

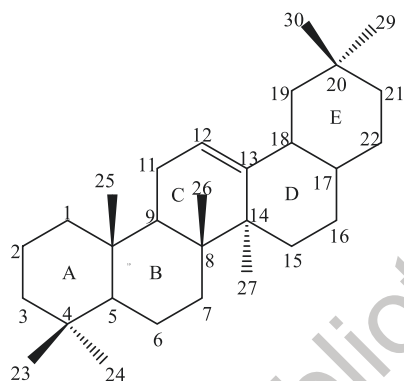


Figura 10. Núcleo oleanano, base de los triterpenos activos obtenidos del extracto de diclorometano de *L. camara*.

Previamente, Begum y cols., aislaron 4 triterpenos de tipo oleanano (ácido lantanílico, ácido oleanólico, lantadeno A y ácido lantanílico), 3 de tipo ursano (ácido lantoico, ácido ursólico y ácido camarínico) y 1 de tipo lupano (ácido betulínico), a partir del extracto metanólico de un cultivar de *L. camara* de Pakistán (Figura 11).

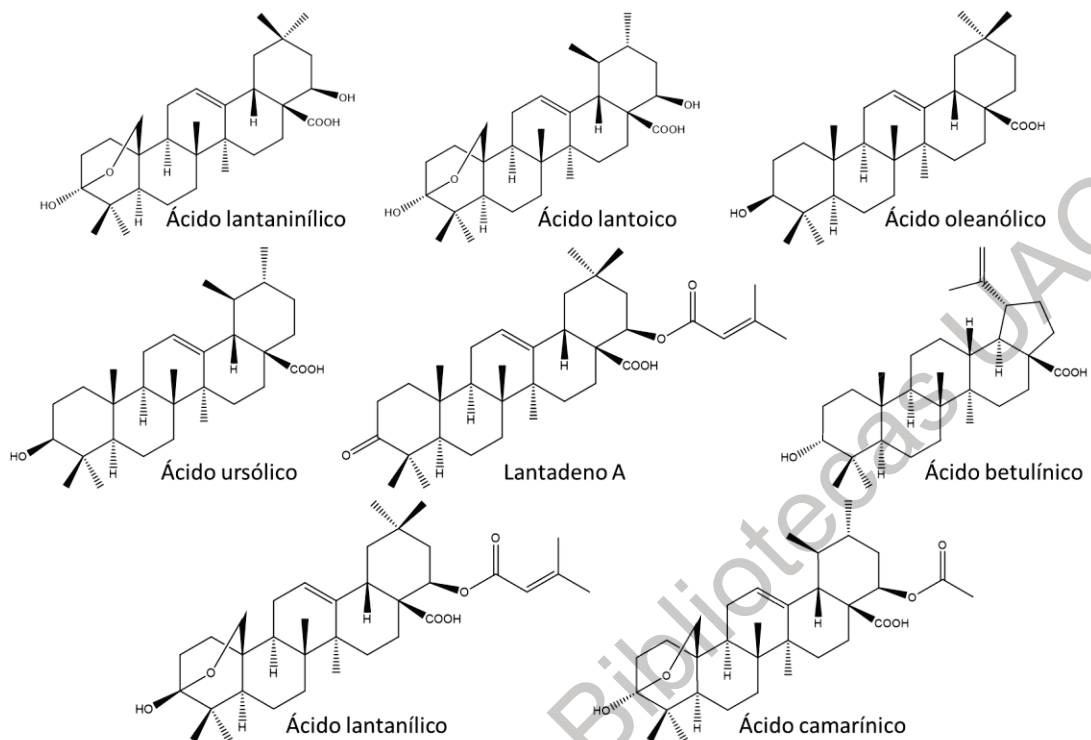


Figura 11. Triterpenos previamente aislados de un espécimen pakistaní de *L. camara*.

Ellos evaluaron la actividad leishmanicida *in vitro* de estos 8 triterpenos sobre promastigotes de *L. major*, agente causal de leishmaniasis cutánea en el Viejo Mundo, y encontraron que el compuesto más potente era el ácido ursólico ( $CI_{50} = 12.4 \pm 0.03 \mu M$ ). Considerando sólo los triterpenos de tipo oleanano aislados por Begum y cols., el ácido lantanílico y el lantadeno A fueron los más potentes, con concentraciones inhibitorias medias de  $21.3 \pm 0.02 \mu M$  y  $20.4 \pm 0.01 \mu M$ , respectivamente. Por otra parte, el ácido oleanólico ( $CI_{50} = 53.0 \pm 0.02 \mu M$ ) y el ácido lantaninílico ( $CI_{50} = 164.0 \pm 0.8 \mu M$ ) fueron significativamente menos potentes (Begum et al., 2014). En los resultados obtenidos en el presente trabajo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de  $CI_{50}$  del lantadeno B, del ácido lantanílico y del ácido camárico. Sin embargo, la  $CI_{50}$  de la mezcla de ácidos lantanílico y camárico, fue aproximadamente 2 veces más potente que la exhibida por el lantadeno B. Tanto el ácido lantanílico como el lantadeno B poseen una ramificación 3,3-dimetilacrilato en el C-22, mientras que el ácido

camárico, un isómero del ácido lantanílico, presenta una ramificación *trans*-2,3-dimetilacrilato. La principal diferencia estructural entre estos dos ácidos triterpénicos y el lantadeno B es la presencia de un grupo hidroxilo en el C-3. Considerando esta característica estructural, puede hipotetizarse que la presencia de este grupo donador de puentes de hidrógeno en el ácido lantanílico, representa un elemento farmacofórico, ya que esto incrementa su capacidad leishmanicida al doble, en comparación con el lantadeno B. Esta hipótesis se ve reforzada por los hallazgos realizados en estudios previos que involucran la evaluación de la actividad leishmanicida de otros triterpenos de tipo oleanano, aislados de otras especies de plantas.

Ridoux y cols. analizaron la actividad de 3 saponinas de tipo oleanano, aisladas de *Hedera helix* (L.):  $\alpha$ -hederina,  $\beta$ -hederina y hederacolchisido A<sub>1</sub> (Figura 12), frente a *L. mexicana* (MHOM/MX/95/NAN1). De estas tres saponinas, el hederacolchisido A<sub>1</sub> mostró el mejor potencial leishmanicida, seguido de la  $\alpha$ -hederina y la  $\beta$ -hederina.

Dentro de este grupo de compuestos, el número de unidades de azúcar unidas al C-3 influye significativamente sobre el efecto anti-leishmanial, ya que el hederacolchisido A<sub>1</sub> que posee un grupo trisacárido posee una mejor actividad que las otras dos saponinas que sólo poseen una porción disacárida. Por otro lado, la única diferencia entre la  $\alpha$ - y la  $\beta$ -hederina es la presencia de un grupo hidroxilo en la posición C-24, el cual está espacialmente próximo a C-3. Esto sugiere que la presencia de un número más grande de donadores de puentes de hidrógeno en/alrededor del anillo A, mejora la actividad leishmanicida de este tipo de compuestos.



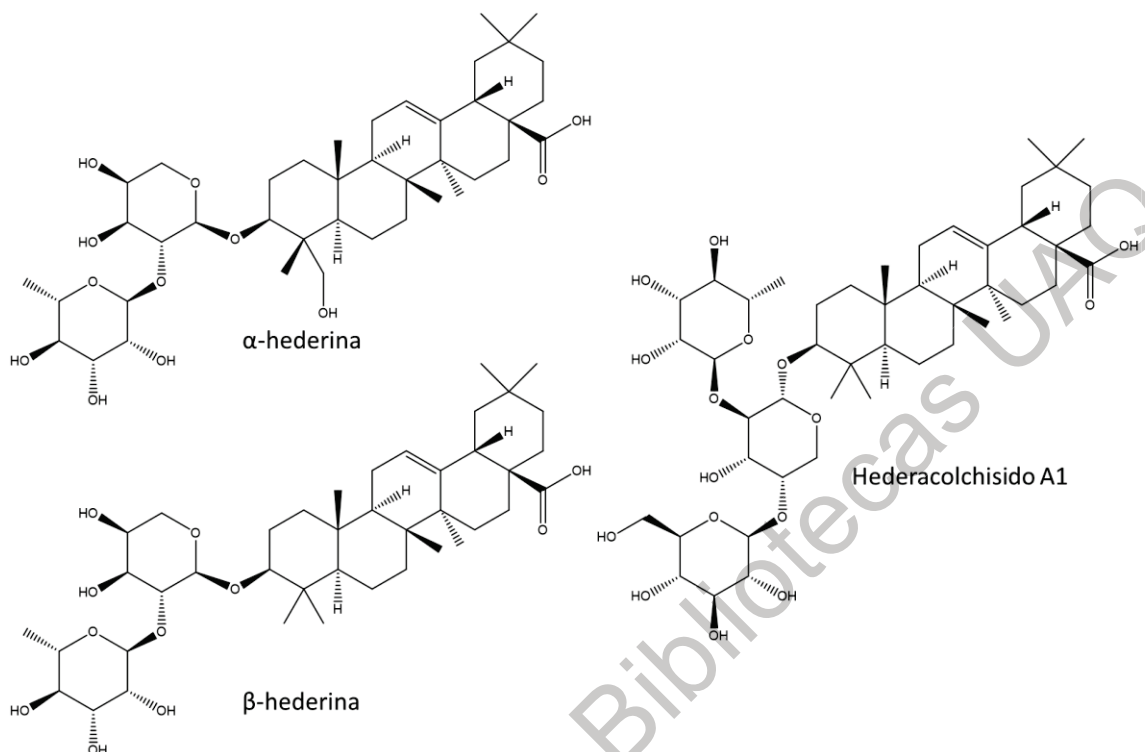


Figura 12. Saponinas triterpénicas de tipo oleanano con actividad leishmanicida aisladas de *Hedera helix*.

Un patrón similar fue observado por Torres-Santos y cols., quienes evaluaron el efecto leishmanicida de diferentes triterpenos de tipo ursano y oleanano sobre *L. amazonensis* (MPRO/BR/72/M1841 cepa LV79). Ellos encontraron que la  $3\beta$  hidroxilación del ácido oleanólico, del ácido torméntico y del ácido  $2\alpha,3\beta$ -hidroxiolean-12-en-28-oico contribuía, de manera importante, a la actividad leishmanicida de estos compuestos, mientras que la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones C- $2\alpha$  y C-19, no eran determinantes para la actividad (Torres-Santos et al., 2004). Otro estudio llevado a cabo con triterpenos tipo  $2\alpha,3\beta$ -hidroxioleananos, mostró que el ácido maslínico poseía una mejor actividad que el ácido oleanólico contra amastigotes de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016); no obstante, se observó el efecto inverso en amastigotes de *L. infantum* (MHOM/ES/1996/BCN-143) (Sifaoui et al., 2017). Adicionalmente, Gnoatto y cols. demostraron que la  $3\beta$ -acetilación del ácido oleanólico incrementó aproximadamente 5 veces su actividad leishmanicida contra *L. amazonensis*

(MHOM/BR/1987/BA), pero no contra *L. infantum* (MCAN/GR/82/LEM497) (Gnoatto et al., 2008). Estos resultados evidencian que el efecto leishmanicida de los triterpenos pentacíclicos del tipo oleanano es dependiente de la especie y de la cepa de los parásitos. No sólo la presencia, sino también la estereoquímica de los grupos hidroxilo en la posición C-3 tiene una fuerte influencia en el efecto sobre *Leishmania*, ya que se ha demostrado que el ácido oleanólico ( $CI_{50} = 91 \text{ nM}$ ) es aproximadamente 200 veces más potente que su isómero correspondiente, el ácido *epi*-oleanólico ( $CI_{50} = 18.8 \text{ } \mu\text{M}$ ), contra promastigotes de *L. donovani* (Camacho et al., 2000; Tan et al., 2002), lo cual sugiere la interacción de estos compuestos con una diana molecular. En la Figura 13 se muestran las estructuras de estos triterpenos.

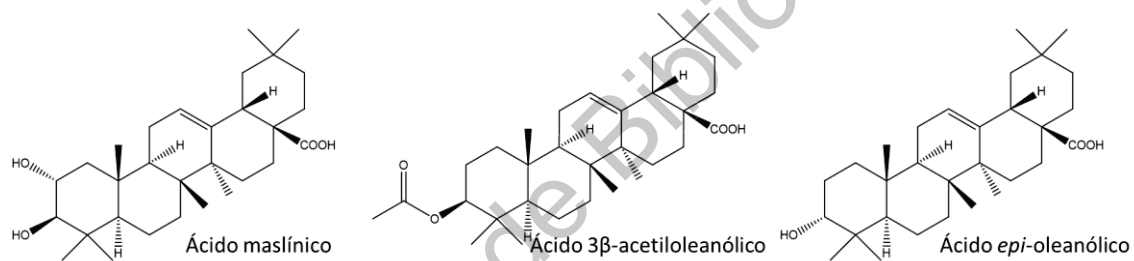


Figura 13. Triterpenos de tipo oleanano con actividad leishmanicida.

Las investigaciones que se han realizado para elucidar los mecanismos de acción de moléculas con actividad leishmanicida indican que éstas interactúan con blancos que participan en rutas metabólicas esenciales para la supervivencia del parásito, tales como la ruta de la glioxalasa, del tripanotión, de la dihidrofolatorreductasa (DHFR), de las topoisomerasas, de las metacaspasas, de las MAP cinasas, de las poliaminas, de las purinas, de la glucólisis y de los esteroides (Singh et al., 2014; Tiwari et al., 2017). Algunos productos naturales y compuestos sintéticos que han mostrado tener actividad a través de estas vías incluyen flavonas (glioxalasa), antimoniales trivalentes, azoles y alcaloides tipo isoquinolina (tripanotión), antimoniales pentavalentes y lupano (topoisomerasa I y IB, respectivamente), staurosporina (MAP cinasas), alopurinol e iminorbitol (purinas), y estatinas, biofosfonato, azasteroides y azoles (biosíntesis de esteroides) (De Souza and Rodrigues, 2009; McCall et al., 2015; Tiwari et al., 2017).

En lo concerniente a triterpenos de tipo oleanano, actualmente no existe información sobre su mecanismo de acción. Sin embargo, en un estudio con ácido oleanólico, Torres-Santos y cols., encontraron que este compuesto no induce la producción de NO en macrófagos (Torres-Santos et al., 2004). Posteriormente, Souza y cols. confirmaron este resultado cuando demostraron que el ácido oleanólico; el cual posee una buena actividad contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. infantum* ( $CI_{50} < 70 \mu\text{M}$  en promastigotes y amastigotes), no provoca la activación de macrófagos asistida por IFN- $\gamma$ . Estos hallazgos indican que este tipo de triterpenos actúan en dianas moleculares propias de *Leishmania* y no de los macrófagos. Adicionalmente, el mismo grupo de investigación realizó experimentos de acoplamiento molecular para explorar la posibilidad de que el ácido oleanólico fuera capaz de unirse a la citocromo-14 $\alpha$ -desmetilasa de esteroides (CYP51), una enzima involucrada en la síntesis del ergosterol, el esteroide más importante de la membrana celular de este tipo de parásitos (Figura 14). Ellos encontraron que este triterpeno interactúa en una manera similar al lanosterol, el sustrato natural de esta enzima. Sin embargo, a diferencia del lanosterol cuya posición 14 está orientada hacia el átomo de  $\text{Fe}^{2+}$  en el grupo hemo, en el caso del ácido oleanólico, es el grupo carboxilo C-28 quien está posicionado cerca del grupo hemo (Souza et al., 2016).

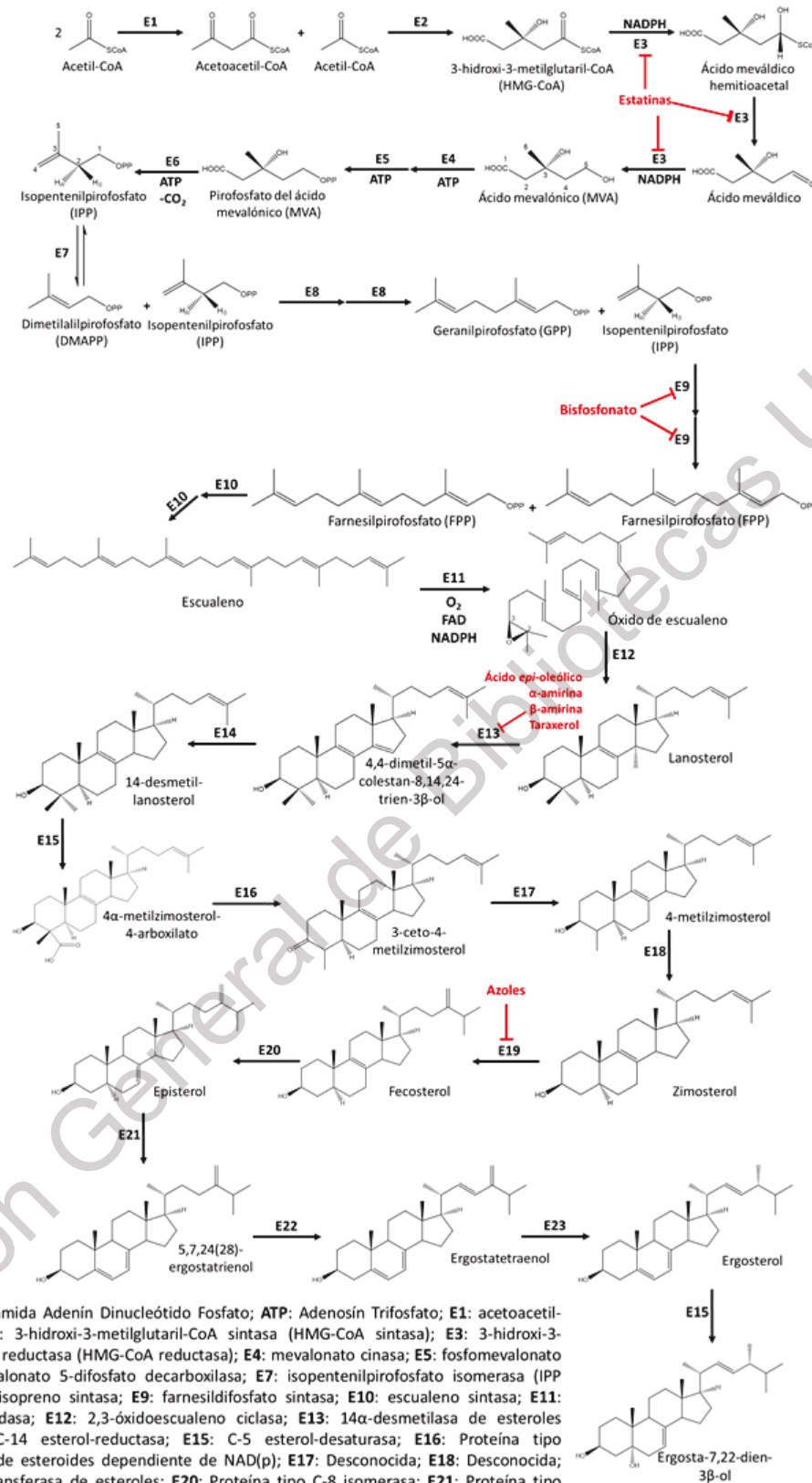


Figura 14. Ruta metabólica para la biosíntesis de los esteroides membranales identificados en *Leishmania* spp (Dewick, 2009; Yao and Wilson, 2016).

El lantadeno B, el ácido lantanílico y el ácido camárico aislados del cultivar amarilloroso de *L. camara*, poseen el mismo núcleo que el ácido oleanólico, pero ellos poseen ramificaciones de tipo acilo en lugar del grupo carboxilo de la posición C-28. Considerando las similitudes estructurales de estos tres triterpenos con el ácido oleanólico, se puede inferir que estos compuestos son capaces de unirse a la CYP51. Además, tomando en cuenta que estos triterpenos poseen una mejor actividad que el ácido oleanólico ( $CI_{50} < 25 \mu M$ ), es posible asumir que esta diferencia en potencia se debe a la presencia de estas ramificaciones de tipo acilo. De hecho, un análisis de acoplamiento molecular de compuestos de tipo esterol, que incluía al ácido *epi*-oleanólico y otros oleananos (Figura 15), mostró que las modificaciones en los grupos funcionales el núcleo oleanano influyen de gran manera en la posición de las moléculas dentro del bolsillo hidrofóbico de la CYP51, lo cual modifica su interacción con el grupo hemo (Warfield et al., 2014). Realizar un estudio *in silico* similar a este anterior, podría contribuir de forma certera a un mejor entendimiento del mecanismo de acción de estos triterpenos obtenidos a partir de este espécimen de *L. camara* mexicana.

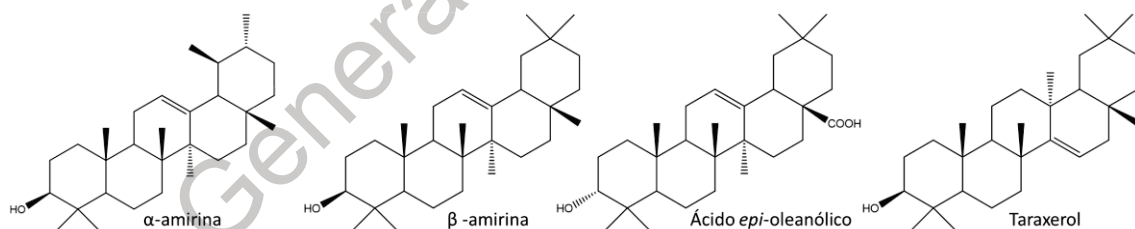


Figura 15. Triterpenos de tipo oleanano con actividad inhibitoria *in silico* de CYP51.

Otro potencial mecanismo de acción que puede estar involucrado en el efecto leishmanicida de los triterpenos de tipo oleanano, podría estar relacionado a su similitud estructural con el ergosterol, el cual es un importante constituyente de las balsas lipídicas de la membrana de *Leishmania* (Goad et al., 1984; Yao and Wilson, 2016). Goad y cols. fueron los primeros en identificar los principales esteroides en la membrana celular de 9 cepas de *Leishmania*, y encontraron que el ergosta-5,7,24(28)-trien-3 $\beta$ -ol era el más abundante, mientras que el colesterol sólo fue

encontrado en concentraciones de trazas, ya que *Leishmania* no posee maquinaria enzimática para sintetizar este esteroide (Goad et al., 1984). Cuando estos investigadores cultivaron una cepa de *L. tropica* en medio de cultivo enriquecido con colesterol, el perfil lipídico membranar se modificó y mostró un incremento significativo de los niveles de colesterol (33.5%), mientras que otros esteroides disminuyeron considerablemente, evidenciando que *Leishmania* es capaz de incorporar colesterol celular a su membrana (Goad et al., 1984). De esta forma, es posible hipotetizar que, siendo el ácido lantanílico, el ácido camárico, el lantadeno A y el lantadeno B, moléculas muy similares al colesterol, estos triterpenos pudieran infiltrarse en la membrana de *Leishmania*. Por otro lado, considerando que los ergosteroides están principalmente localizados en las balsas lipídicas, es posible que los triterpenos de tipo oleanano se incorporen en estos microdominios de la membrana, orientando los grupos polares (localizados en o alrededor de C-3 o el anillo A), en la misma dirección que las cabezas polares de los esfingolípidos, ocasionando la formación de poros membranales, provocando así un desbalance osmótico que llevaría a *Leishmania* a la muerte. Sin embargo, esta hipótesis necesita ser confirmada.

Además de su efecto leishmanicida, otras actividades biológicas han sido demostradas para los triterpenos de tipo oleanano obtenidos del cultivar amarillo-rosado de *L. camara*. Se han descrito para el lantadeno B, actividad antiviral, antitumoral, alelopática y antibacteriana (Sharma et al., 2007); mientras que el ácido lantanílico y el ácido camárico muestran actividad nematocida (Qamar et al., 2005; Begum et al., 2008), antibacteriana y antituberculosa (Saleh et al., 1999). Además, el ácido camárico inhibe la actividad enzimática de la cinasa de caseína II (Ishibashi et al., 1999), mostró actividad contra larvas de mosquito (Innocent et al., 2008) y presentó efectos antiprotozoarios (Mohamed et al., 2016).

Por otra parte, algunos estudios han mostrado que el lantadeno B induce hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y fotosensibilización en cobayos, vacas y ovejas (National Center for Biotechnology Information, 2019); sin embargo, este triterpeno

no fue tóxico en ratas ni en conejos. Este fenómeno puede ser atribuido a la microbiota de estos roedores (S. Sharma et al., 2000; Sharma et al., 2007). En el caso del ácido lantanílico y el ácido camárico, no hay reportes sobre su toxicidad. Evidentemente es necesario llevar a cabo estudios toxicológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, con el fin de determinar la seguridad de estos compuestos. Los triterpenos de tipo oleanano poseen una adecuada lipofilidad, lo que les permitiría permear la piel. De esta forma, estos compuestos podrían ser empleados para preparar una formulación tópica para el tratamiento de leishmaniasis cutánea, en el caso de que la toxicidad sistémica represente un riesgo. Es posible, además, desarrollar un fitomedicamento a partir de un extracto estandarizado, enriquecido con los triterpenos activos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio contribuyen a demostrar el potencial del cultivar amarillo rosado de *L. camara* para el desarrollo de un fitofármaco anti-leishmanial. Nuestros hallazgos también nos permiten proponer al lantadeno B, al ácido lantanílico y al ácido camárico como valiosos compuestos prototipo para el desarrollo de nuevas moléculas-fármaco para el tratamiento de leishmaniasis.

8.5 Análisis metabolómico y quimiométrico de los extractos obtenidos a partir de especímenes de *L. camara* recolectados en diferentes épocas del año

8.5.1 Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos a partir de *L. camara* recolectada en diferentes épocas del año

Se obtuvieron los extractos de diclorometano de las distintas colectas de *L. camara*: marzo, 2014; enero, junio, agosto, agosto b, septiembre, octubre, noviembre, diciembre de 2015 y septiembre 2016. El análisis cualitativo de los extractos por cromatografía en capa fina, permitió observar que, de manera general, los extractos presentan una composición química bastante similar. No obstante, existe una diferencia evidente con respecto al extracto de agosto b de 2015 (Figura 16), ya que



éste no presenta la mancha azul-morada en el  $R_f = 0.16$  y  $0.36$ , en las placas eluidas con hexano:acetato de etilo (3:2) y tolueno:éter (1:1) saturado con ácido acético al 10%, respectivamente y reveladas con reactivo de Liebermann-Burchard para triterpenos.

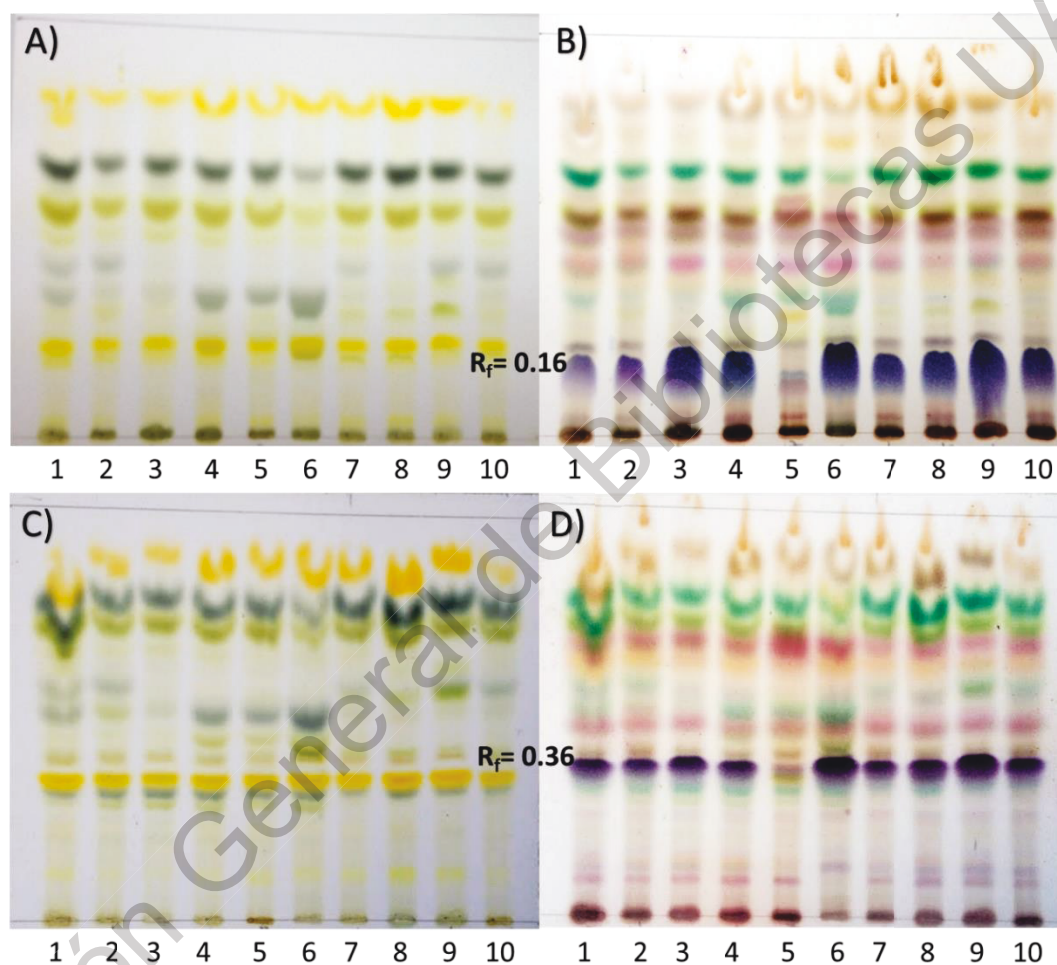


Figura 16. Placa de cromatografía en capa fina de los extractos de *L. camara*. 1: Marzo 2014, 2: Enero 2015, 3: Junio 2015, 4: Agosto 2015, 5: Agosto b 2015, 6: Septiembre 2015, 7: Octubre 2015, 8: Noviembre 2015, 9: Diciembre de 2015 y 10: Septiembre 2016. A) Placa eluida con hexano:acetato de etilo (3:2), sin revelar; B) Placa eluida con hexano:acetato de etilo (3:2), revelada con reactivo de Liebermann-Burchard; C) Placa eluida con tolueno:éter (1:1) saturado con ácido acético al 10%, sin revelar; C) Placa eluida con tolueno:éter (1:1) saturado con ácido acético al 10%, revelada con reactivo de Liebermann-Burchard.



Esta mancha corresponde a la mezcla de ácido lantanílico y ácido camárico (79:21). Dado que previamente se identificó que estos triterpenos son los compuestos de *L. camara* con la actividad leishmanicida más potente ( $CI_{50} < 25 \mu M$ ), es de esperarse que la actividad contra *Leishmania* del extracto de agosto b 2015 sea menor que la del resto de los extractos. Por otra parte, en el extracto de septiembre de 2015, se observa esta misma mancha más oscura, lo que indica niveles más altos de estos compuestos. Por ende, la actividad leishmanicida de este extracto debe ser mejor que la del resto.

#### 8.5.2 Evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos obtenidos a partir de *L. camara* recolectada en diferentes épocas del año

Al igual que las fracciones y los compuestos aislados de *L. camara*, se evaluó la actividad leishmanicida sobre promastigotes de *L. mexicana*, de los extractos obtenidos a partir de las 10 distintas colectas de esta planta, con el fin de observar si existía alguna diferencia en el perfil de bioactividad relacionado al perfil metabolómico de cada mes de colecta. En el Cuadro 17 se resumen las  $CI_{50}$  obtenidas para cada extracto.

Cuadro 17. Actividad leishmanicida de 10 extractos de diclorometano de *L. camara* colectada en diferentes meses durante la época de floración.

Extracto/Fármaco	$CI_{50} \pm DE$ ( $\mu g/mL$ ) en <i>L. mexicana</i> promastigotes
Glucantime®	$4,025.80 \pm 0.79^a$
Marzo 2014	$42.64 \pm 1.87^b$
Enero 2015	$68.40 \pm 5.82^c$
Junio 2015	$37.46 \pm 1.85^b$
Agosto 2015	$49.80 \pm 3.22^b$
Agosto b 2015	$67.47 \pm 1.12^c$
Septiembre 2015	$18.86 \pm 5.58^d$
Octubre 2015	$44.09 \pm 3.94^b$
Noviembre 2015	$47.72 \pm 6.36^b$
Diciembre 2015	$45.05 \pm 2.02^b$
Septiembre 2016	$26.09 \pm 1.10^d$

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria media, DE: desviación estándar. Las letras superindexadas indican las diferencias estadísticamente significativas entre las CI<sub>50</sub> de los diferentes extractos, después de un análisis ANOVA de una vía con un test post-hoc de Tukey de comparaciones múltiples,  $p > 0.0001$ ,  $n = 3$ .

Los resultados del análisis ANOVA de una vía, permitieron separar a todos los extractos, incluido el fármaco de referencia, en 4 grupos (a, b, c y d) (Figura 16). El Glucantime es el único miembro del grupo a, que es el de menor actividad frente a los promastigotes de *L. mexicana*. El grupo b contiene a los extractos de marzo 2014, junio 2015, agosto 2015, octubre 2015, noviembre 2015 y diciembre 2015; este grupo muestra una actividad intermedia. Por otro lado, el grupo c está conformado por los extractos de enero y agosto b de 2015, los dos extractos con menos actividad leishmanicida. Finalmente, el grupo d contiene a los dos extractos de septiembre (2015 y 2016), los cuales mostraron los valores de CI<sub>50</sub> más bajos siendo, por lo tanto, los extractos más activos.

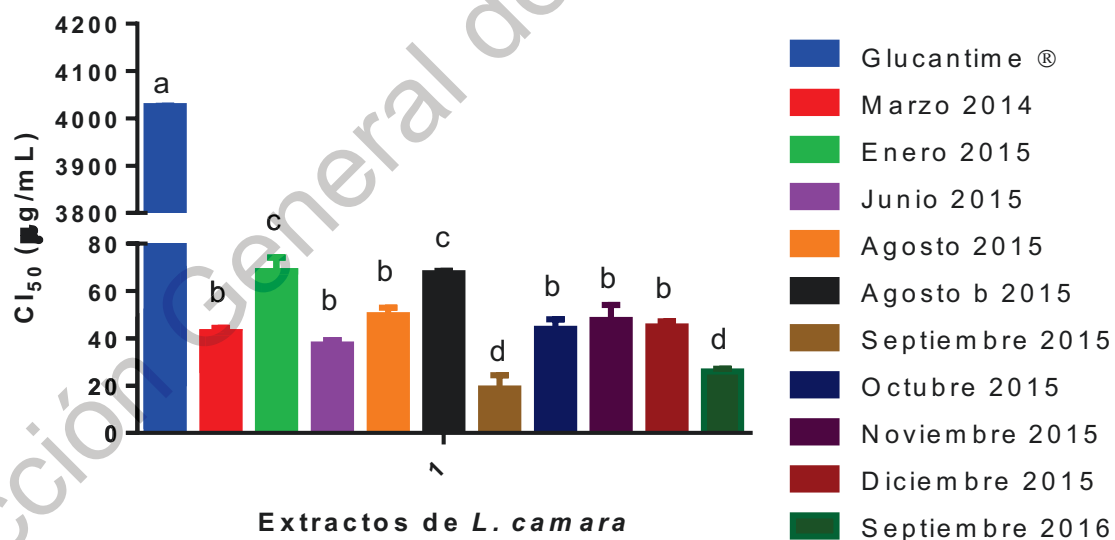


Figura 17. Comparación de los valores de CI<sub>50</sub> de los extractos de *L. camara* sobre promastigotes de *L. mexicana*. ANOVA de una vía con comparaciones múltiples, con análisis post-hoc de Tukey,  $p < 0.0001$ ,  $n = 3$ .

Estos resultados coinciden con lo esperado en el análisis cualitativo de las placas de cromatografía en capa fina, no obstante, el análisis por RMN de los extractos

permitió determinar que además del ácido lantanílico y del ácido camárico, otros compuestos están directamente relacionados con la actividad lesihmanicida de los extractos.

### 8.5.3 Análisis de <sup>1</sup>H-RMN de los estándares

Debido a que a este punto ya se conocía la identidad de los compuestos presentes en las fracciones más activas del extracto de *L. camara*, se decidió utilizar los compuestos puros como estándares para su identificación en los extractos, a través de su estudio por RMN. De esta forma, cada compuesto fue sometido a un análisis de <sup>1</sup>H-RMN para conocer su patrón de señales: eicosano, escualeno, β-ionona, óxido de cariofileno, ácido tíglico, β-cariofileno y ácido hexanoico (Cuadros 18-24). Para el ácido lantanílico, el ácido camárico y el lantadeno B, los desplazamientos químicos de sus protones, se encuentran previamente enlistados en los Cuadros 12, 13 y 14, respectivamente. Los espectros <sup>1</sup>H-RMN correspondientes, se muestran en los Anexos II, III y IV.

Cuadro 18. Desplazamientos químicos en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del eicosano.

Posición	δ <sub>H</sub> en ppm, multiplicidad, (J en Hz)
1, 20	1.26, s
2 – 19	0.88, t (7.1)

Cuadro 19. Desplazamientos químicos en el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del escualeno.

Posición	δ <sub>H</sub> en ppm, multiplicidad, (J en Hz)
1, 24, 25, 30	1.60, m
2, 6, 10, 15, 19, 23	-
3, 22	5.10, tquint (7.0, 1.3)
4, 8, 17, 21	2.07, m
5, 9, 16, 20	1.98, m
7, 18	5.13, tq (7.0, 1.3)
11, 14	5.15, h (1.3)
12, 13	2.02, m
26 – 29	1.68, qd (1.3, 0.4)

Cuadro 20. Desplazamientos químicos en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la  $\beta$ -ionona.

Posición	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)
1	-
2	1.47, m
3a	1.62, dt (12.7, 6.3)
3b	1.62, q (6.3)
4	2.06, broad t (6.3)
5	-
6	-
7	7.26, ddq (16.4, 1.6, 0.8)
8	6.11, d (16.4)
9	-
10	2.29, s
11, 12	1.06, s
13	1.75 q (0.9)

Cuadro 21. Desplazamientos químicos en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del óxido de cariofileno.

Posición	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)
1	1.76, t (9.9)
2	1.65, m
3a	0.96, td (13.1, 5.0)
3b	2.08, t (3.6)
4	-
5	2.87, dd (10.6, 4.3)
6a	2.24, ddt (12.3, 8.1, 4.3)
6b	1.32, dddd (12.8, 10.6, 8.1, 4.5)
7a	2.34, ddd (12.8, 8.1, 4.5)
7b	2.11, m
8	-
9	2.61, q (9.7)
10	1.42, m
11	-
12	1.20, d (0.9)
13a	4.97, s
13b	4.85, s
14	0.98, s
15	1.00, s

Cuadro 22. Desplazamientos químicos en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del ácido tíglico.

Posición	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)
1	-
2	-
3	7.01, dddd (8.3, 7.0, 5.7, 1.3)
4	1.82, d (7.4)
5	1.83, broad s

Cuadro 23. Desplazamientos químicos en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del  $\beta$ -cariofileno.

Posición	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)
1	1.69, broad t (2.0)
2	1.50, m
3a	1.46, dt (3.6, 1.7)
3b	2.09, dt (12.1, 3.9)
4	1.92, td (12.3, 4.9)
5	-
6a	5.31, dd (10.3, 4.8)
6b	2.24, ddt (12.3, 8.1, 4.3)
7a	2.00, dd (7.4, 3.1)
7b	2.02, m
8	2.20, m
9	-
10	2.33, q (9.7)
11	1.65, m
12	-
13a	1.61, d (1.1)
13b	4.94, d (1.9)
14	4.82, d (1.9)
15	0.98, s
	1.00, s

Cuadro 24. Desplazamientos químicos en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del ácido hexanoico.

Posición	$\delta_{\text{H}}$ en ppm, multiplicidad, (J en Hz)
1	-
2	2.34, t (7.6)
3	1.64, m
4	1.32, m
5	1.32, m
6	0.90, t (7.0)

#### 8.5.4 Perfil químico por RMN de los extractos obtenidos a partir de distintas colectas de *L. camara*

En la Figura 18, se muestran los espectros, por triplicado, de los extractos obtenidos a partir del material vegetal de las distintas colectas de *L. camara*. Se presentan de abajo hacia arriba: Marzo, 2014; enero, junio, agosto, agosto b, septiembre, octubre, noviembre, diciembre de 2015 y septiembre 2016.

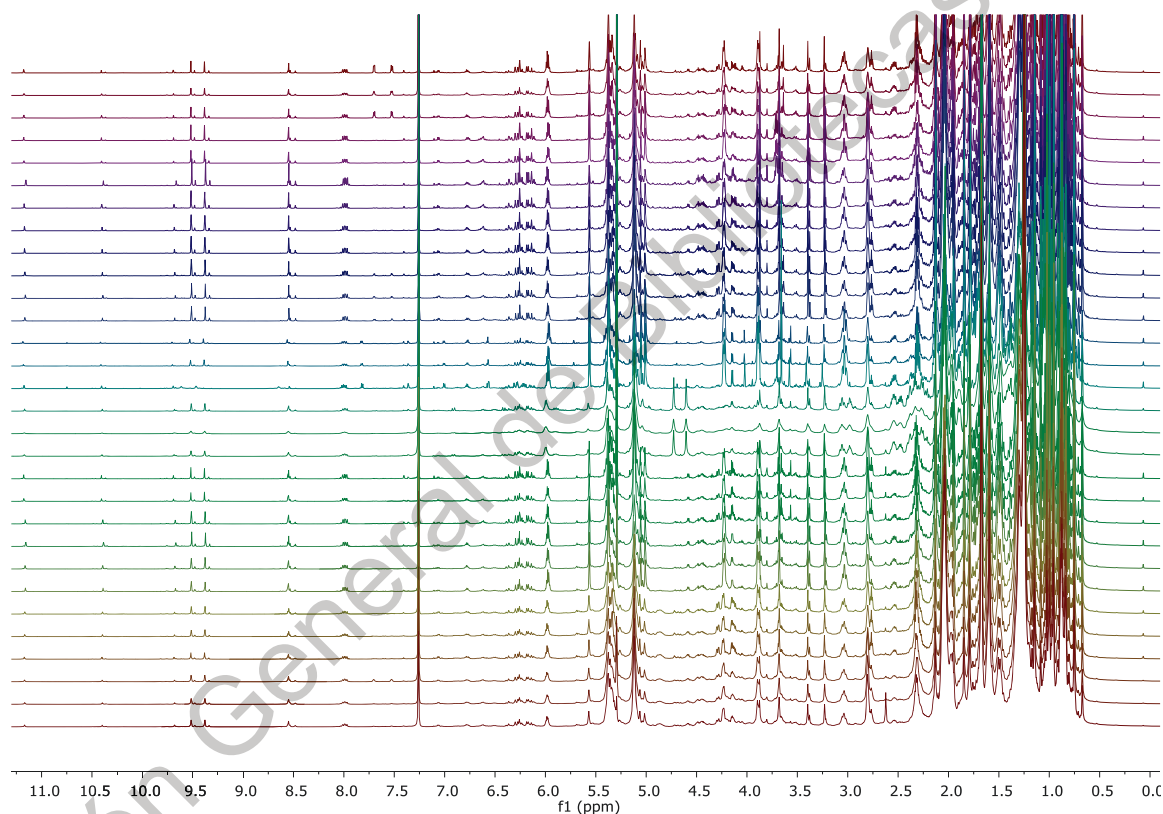


Figura 18. Espectros  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C) de los extractos de las distintas colectas de *L. camara*.

De manera general, la mayoría de los extractos presentan un perfil metabólico similar; sin embargo, es posible observar algunas diferencias entre los extractos. En la Figura 19 se muestran 3 espectros representativos correspondientes a un extracto muy activo (Septiembre 2015), un extracto medianamente activo (Junio 2015) y un extracto poco activo (Agosto b 2015).

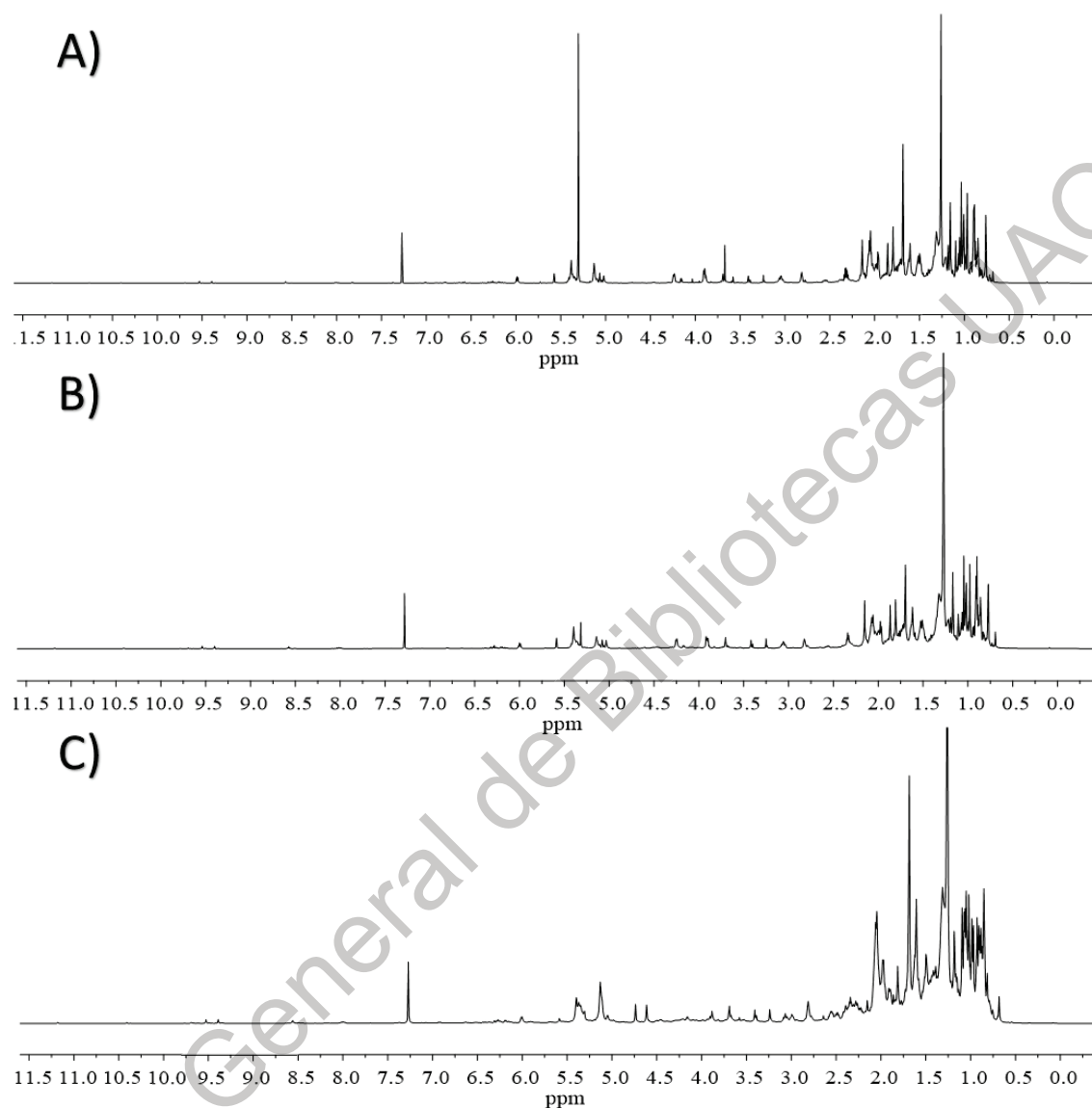
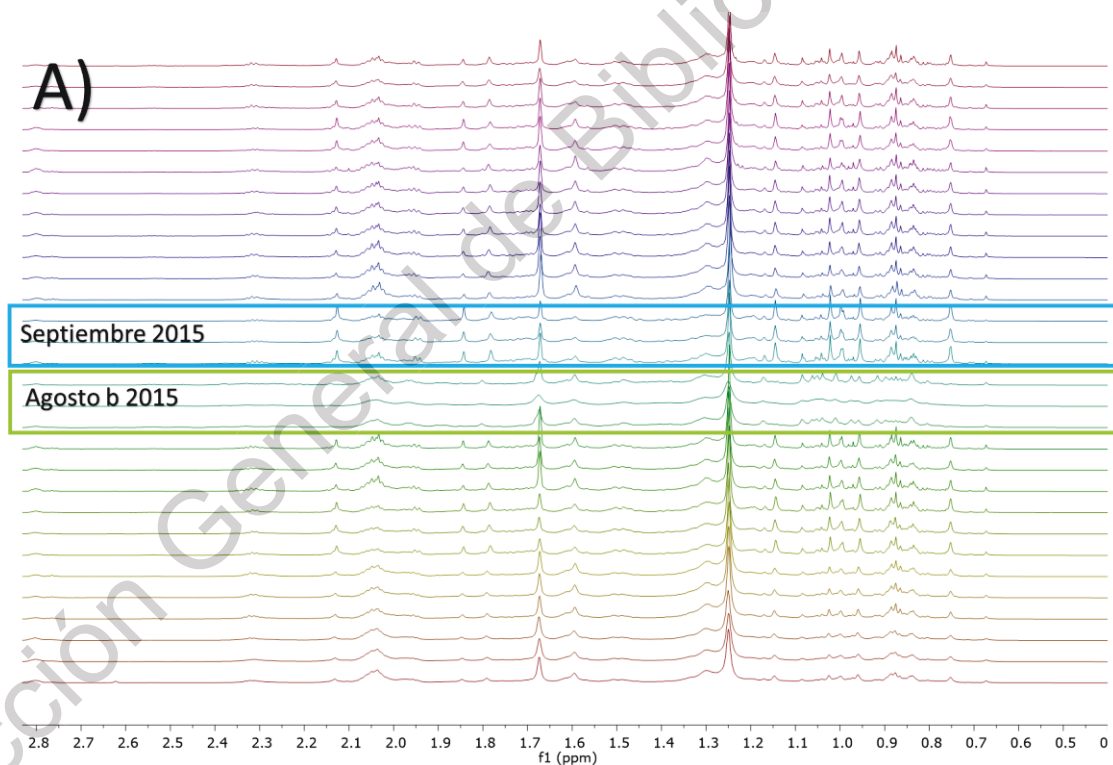


Figura 19. Espectros <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) de 30 mg de extracto en CDCl<sub>3</sub>. A) Extracto muy activo (Septiembre 2015). B) Extracto medianamente activo (Junio 2015). C) Extracto poco activo (Agosto b 2015).

En el espectro A de la Figura 19, las señales que se encuentran en la región alifática (0.0-2.5 ppm) son menos prominentes que en el espectro B. Por otro lado, las señales correspondientes a las regiones de los CH<sub>x</sub> desprotegidos (~3.0 ppm), grupos éter (~4.0 ppm) y los compuestos vinílicos (5.0-6.0 ppm) son más intensas en el espectro A que en el B. De esta manera, la actividad leishmanicida exhibida por el extracto más activo (septiembre 2015), puede ser asociada a las señales de la región

comprendida entre 2.5 y 6.5 ppm. Analizando minuciosamente las señales de los espectros, es posible observar más detalles sobre la diferencia entre algunas muestras, siendo los más evidentes, algunas señales en las muestras de agosto b y de septiembre de 2015 (Figura 20). Se observa que las señales de agosto b tienden a ser menos intensas y más anchas, mientras que las de septiembre de 2015 son más intensas y delgadas. Por los desplazamientos químicos de estas señales, es posible afirmar que éstas corresponden a las señales de los protones del ácido lantanílico y del ácido camárico. No obstante, es necesario revisar el análisis quimiométrico para establecer qué señales, específicamente, son las que están directamente relacionadas a la actividad leishmanicida de cada extracto.





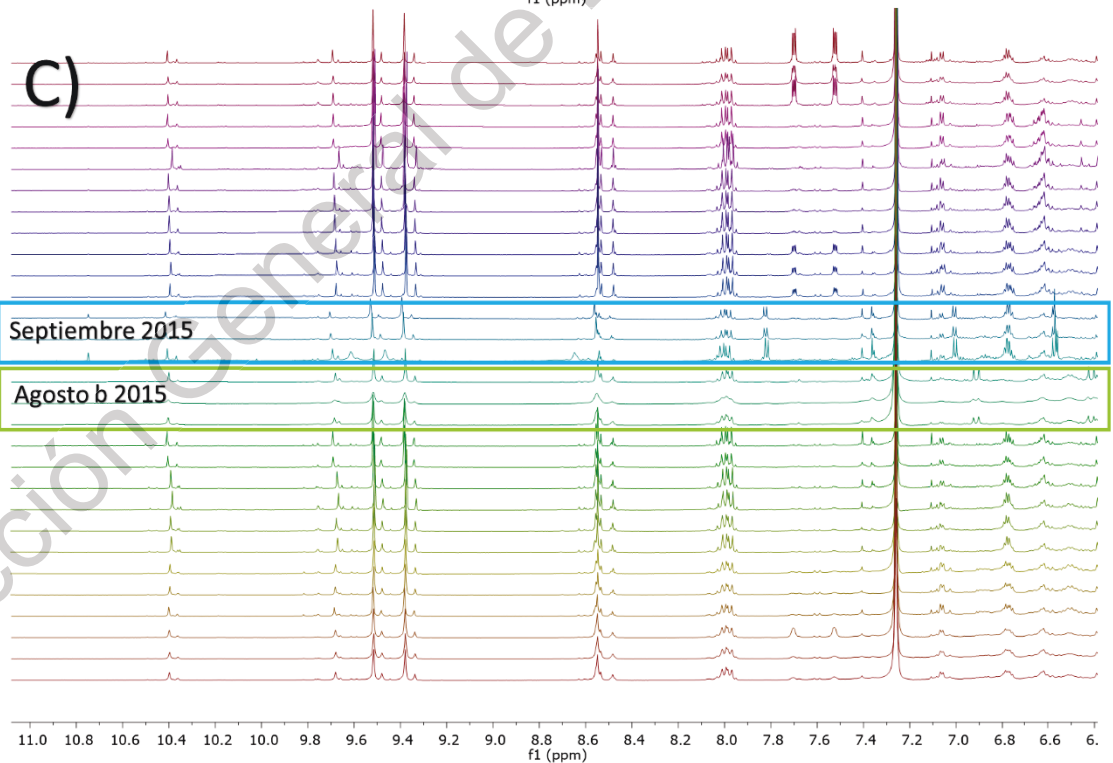
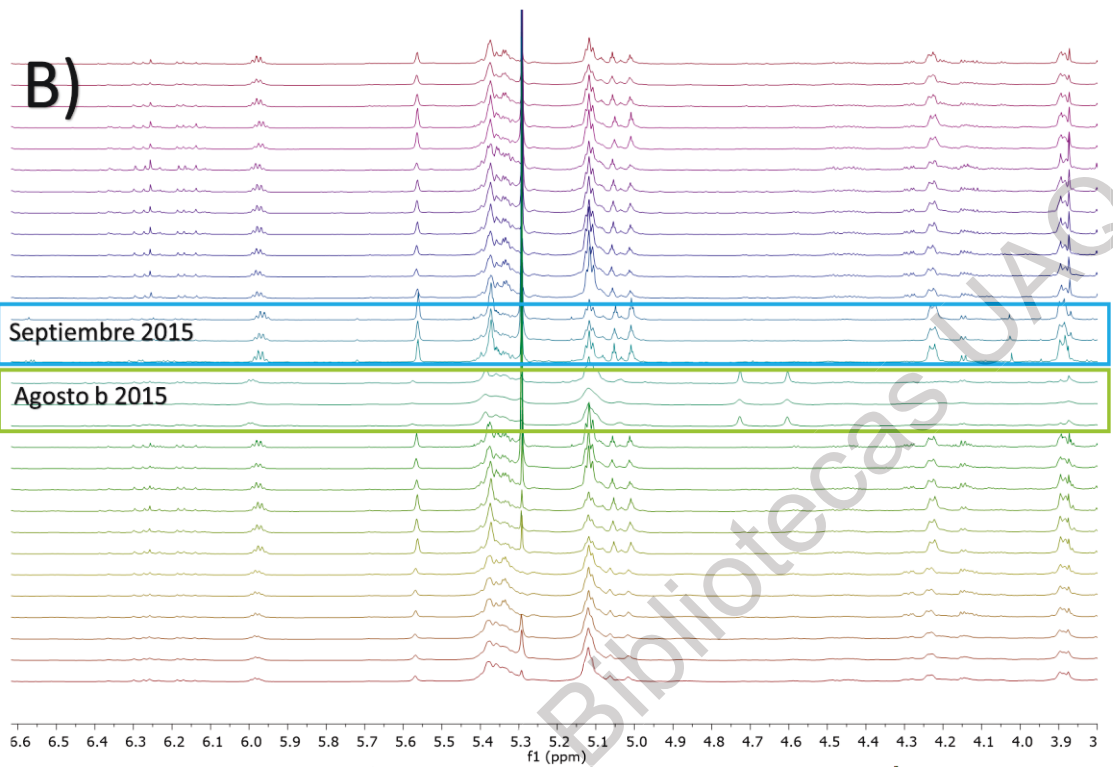


Figura 20. Espectros apilados de  $^1\text{H}$ -RMN de los extractos de las distintas colectas de *L. camara*.

### 8.5.5 Procesamiento de los datos para el análisis multivariado

Una vez obtenidos los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de los extractos de las distintas colectas de *L. camara* se procedió a procesarlos para su posterior análisis estadístico. En la Figura 21 se muestra el apilado de los espectros referenciados a la señal de 1.26 ppm del eicosano, con binning de 0.4 ppm y con las zonas del solvente (7.18-7.34 ppm) y del bis(2-etilhexil) ftalato (7.52 – 7.56 y 7.68 – 7.72 ppm), excluidas.



Figura 21. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN superpuestos procesados de los extractos de las distintas colectas de *L. camara* para el análisis multivariado.

### 8.5.6 Análisis estadístico multivariado

Para comenzar a conocer la naturaleza de los datos, se realizó un análisis de 3 componentes principales (PCA), con el fin de observar el agrupamiento natural de los extractos por el mes de colecta y el área bajo la curva de cada uno de los bins obtenidos en el punto pasado (Figura 22).

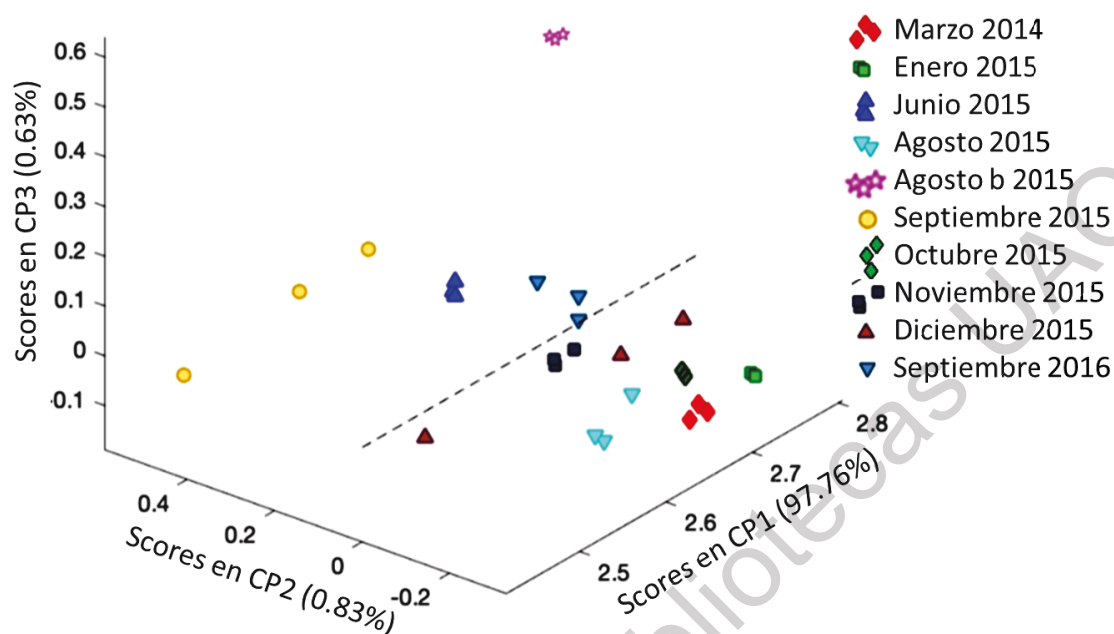


Figura 22. Gráfica de scores de los 3 componentes principales en el análisis de componentes principales (PCA), mostrando los agrupamientos naturales de los extractos, correlacionando su actividad leishmanicida con su perfil espectral.

El PCA de la Figura 22 explica el 99.23% de la variación espectral donde, específicamente el CP1 captura el 97.76% de dicha variación, mientras que el CP2 y el CP3 capturan el 0.83% y 0.63%, respectivamente. El CP1 y el CP2 logran la separación de los extractos en 2 grupos: 1) extractos de septiembre 2015 y 2016 y junio 2015 y, 2) extractos marzo 2014, enero, agosto, agosto b, octubre, noviembre y diciembre 2015. Se observa, además, una tendencia de las réplicas a recaer muy próximas indicando que, a pesar de que son muestras extraídas independientemente, existe una consistencia en el método de extracción, lo que las hace muy similares entre sí. No obstante, las muestras son lo suficientemente diferentes entre ellas, con respecto a los meses de colecta (dispersión de las muestras por meses). Esto confirma que sí hay una diferencia de la composición química de los extractos, derivado del mes de colecta. Como resultado del análisis de la gráfica de los residuales reducidos Q vs Hotelling reducido  $T^2$  (gráfica no mostrada), es posible afirmar que no existen fuertes variaciones espectrales en la

muestra. No obstante, de la Figura 22 es posible observar que el CP3 permite la diferenciación de las muestras correspondientes a Agosto b 2015, ya que éstas muestran una evidente separación del resto de los extractos, apuntando a que sus espectros poseen un perfil químico notablemente diferente al de los demás extractos. Esto concuerda totalmente con lo encontrado de manera cualitativa en la cromatografía en capa fina, donde es evidente que hay una concentración totalmente disminuida de ácido lantanílico y ácido camárico.

Por otro lado, el CP3 l extracto de agosto b del resto de extractos del segundo grupo, indicando que posee características únicas en comparación con el resto.

Considerando que se observó una diferencia cuantitativa en cuanto a la actividad leishmanicida de los extractos (Cuadro 17 y Figura 17), los datos también se sometieron a un análisis de regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS), para evaluar la posibilidad de correlacionar la variación en la actividad leishmanicida con la variación espectral observada en el PCA. Un modelo de 6 variables latentes validado por validación cruzada a través de un proceso de *leave-one-out*, permitió explicar el 99.89% de la variación espectral y el 95.58% de la actividad biológica, con parámetros satisfactorios de calibración: RMSEC = 3.18, RMSECV = 5.07, sesgo de calibración = -0.0076, sesgo de validación cruzada = -0.073,  $R^2$  (calibración) = 0.956 y  $R^2$  (validación) = 0.888.

A través del análisis del porcentaje de varianza para cada uno de los componentes, los siguientes desplazamientos químicos fueron identificados como los responsables del modelo de calibración: 0.76, 0.88, 0.96, 1.00, 1.16, 1.24, 1.28, 1.32, 1.52, 1.6, 1.68, 1.72, 1.80, 1.84, 2.0, 2.04, 2.12, 2.16, 3.64, 4.24, 5.32 y 6.0 ppm. Esto significa que la presencia o ausencia de los compuestos relacionados a tales señales, determinan la magnitud de la actividad de los extractos. En el Cuadro 24 se enlistan los compuestos asociados a estas señales, de acuerdo a los desplazamientos químicos encontrados para los estándares analizados por  $^1\text{H}$ -RMN (Anexo VI).

Cuadro 24. Asignación de las señales que están correlacionadas con la actividad leishmanicida de los extractos de diclorometano de *L. camara*.

Compuesto	Desplazamiento químico ( $\delta$ en ppm), multiplicidad y constante de acoplamiento $J$ (Hz)
Ácido lantanílico	$\delta$ 0.76 (H-26, s); $\delta$ 0.88 (H-28, s); $\delta$ 0.96 (H-24, s); $\delta$ 1.01 (H-30, s); $\delta$ 1.16 (H-27, s); $\delta$ 1.29 (H-19", m); $\delta$ 1.51 (H-6, s, H-15", m); $\delta$ 1.69 (H-9, m); $\delta$ 1.73 (H-19, m); $\delta$ 1.85 (H-4', s); $\delta$ 2.01 (H-11', s); $\delta$ 2.14 (H-1', s, H-5', s); $\delta$ 2.16 (H-2, m); $\delta$ 4.22 (H-25', m)
Ácido camárico	$\delta$ 0.77 (H-26, s); $\delta$ 0.90 (H-29, s); $\delta$ 0.97 (H-24, s); $\delta$ 1.01 (H-30, s); $\delta$ 1.16 (H-27, s); $\delta$ 1.24 (H-15", s); $\delta$ 1.30 (H-19", m); $\delta$ 1.52 (H-6, s, H-15', m); $\delta$ 1.71 (H-2", m); $\delta$ 1.81 (H-5', s, H-11", m); $\delta$ 2.01 (H-11', s); $\delta$ 2.14 (H-1', H-2', m); $\delta$ 4.25 (H-25', dd, $J=8.6, 2.7$ ); $\delta$ 6.01 (H-3', d, $J=7.3, 1.5$ )
Lantadeno B	$\delta$ 0.88 (H-29, s); $\delta$ 1.00 (H-30, s); $\delta$ 1.17 (H-27, s); $\delta$ 1.71 (H-19', m); 1.84 (H-5', d, $J=1.1$ ); $\delta$ 2.13 (H-4', d, $J=1.1$ )
$\beta$ -cariofileno	$\delta$ 5.32 (H-dd, $J=11.0, 4.8$ )
Óxido de Cariofileno	$\delta$ 1.60 (tentativo H-2', m)
$\beta$ -ionona	$\delta$ 2.04 (tentativo H-4, br t, $J=6.5$ )
No identificado	$\delta$ 3.64, s

El análisis de los espectros correspondientes a los extractos más activos y a los pobremente activos, permitió establecer que un incremento de la intensidad de estas señales (Cuadro 24), correlaciona positivamente con una mejora en la actividad leishmanicida, esto es, a mayor concentración de estos compuestos, menor valor de  $CI_{50}$  sobre promastigotes de *Leishmania* (mayor potencia del extracto). Resulta interesante mencionar que la gran mayoría de las señales corresponden al ácido lantanílico, ácido camárico y lantadeno B; los compuestos previamente identificados como los más activos en las fracciones de *L. camara*.

Tomando en consideración que las señales presentadas en la Cuadro 24 son las que están directamente asociadas a la actividad leishmanicida, es posible desarrollar un modelo matemático que permita predecir la actividad leishmanicida de un extracto de *L. camara* a partir de su espectro de RMN. Este modelado matemático, permitiría ahorrar recursos económicos, pues no sería necesario comprar insumos ni productos biológicos para medios de cultivo. Asimismo, evitaría el uso de ratones para mantener la virulencia de las cepas de *Leishmania*. Por otro

lado, el análisis de extractos por RMN requiere muy poco procesamiento de la muestra. En adición a ello, la actividad leishmanicida de un extracto de *L. camara* podría ser determinada enseguida de obtener el espectro, lo que disminuiría el tiempo de análisis de 1 semana a tan sólo 1 h.

Este modelo matemático fue probado a través de un análisis de PLS de valores predichos vs los valores reales de la actividad leishmanicida para cada uno de los extractos. En la Figura 23 se observa la gráfica que explica este modelo. Se puede observar una clara separación de 3 grupos principalmente: los puntos azules, en la parte inferior izquierda del plano; los puntos azul-verdosos, en el centro y los puntos amarillos, en la parte superior derecha. Cada uno de estos grupos muestra a los extractos activos (Septiembre 2015 y Septiembre 2016), los extractos medianamente activos (Marzo 2014; Junio, Agosto, Octubre, Noviembre y Diciembre 2015) y a los extractos pobremente activos (Enero y Agosto b, 2015); respectivamente. La línea verde indica la regresión lineal de los valores reales de la actividad leishmanicida ( $R^2 = 0.956$ ), mientras que la línea roja muestra la regresión lineal de los valores predichos ( $R^2 = 0.888$ ). Se ha establecido que un valor de  $Q^2$  de 0.4 y una  $R^2$  de 0.5 son valores aceptables para modelos biológicos, lo que indica que los espectros de RMN de los extractos de *L. camara*, pueden ser utilizados para predecir su actividad leishmanicida, dado que  $R^2$  es mayor a 0.5 y muy cercana a 1, el valor máximo para la validación de los modelos quimiométricos relacionados a metabolómica (Worley and Powers, 2013; SIMCA-P, 2019).

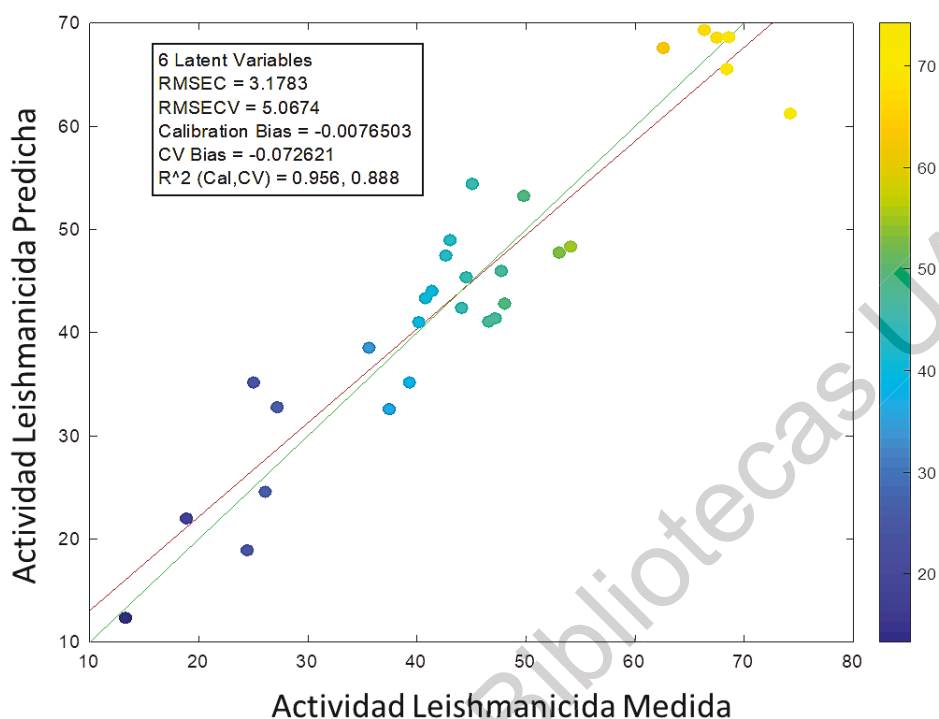


Figura 23. Gráfica de la actividad leishmanicida predicha vs la actividad leishmanicida medida, de los extractos de diclorometano de *L. camara* colectada en diferentes épocas del año, considerando la región del espectro de RMN de 0.6–6.1 ppm.

Tanto los valores de regresión lineal como la predicción de la actividad comparado con los valores reales, indican que este modelo matemático predice adecuadamente la actividad leishmanicida de los extractos de *L. camara*, por lo que podría utilizarse para predecir la actividad de otros extractos de esta misma planta en el futuro.

## 8.6 Desarrollo y validación del método analítico para el marcador químico

### 8.6.1 Selección del marcador químico

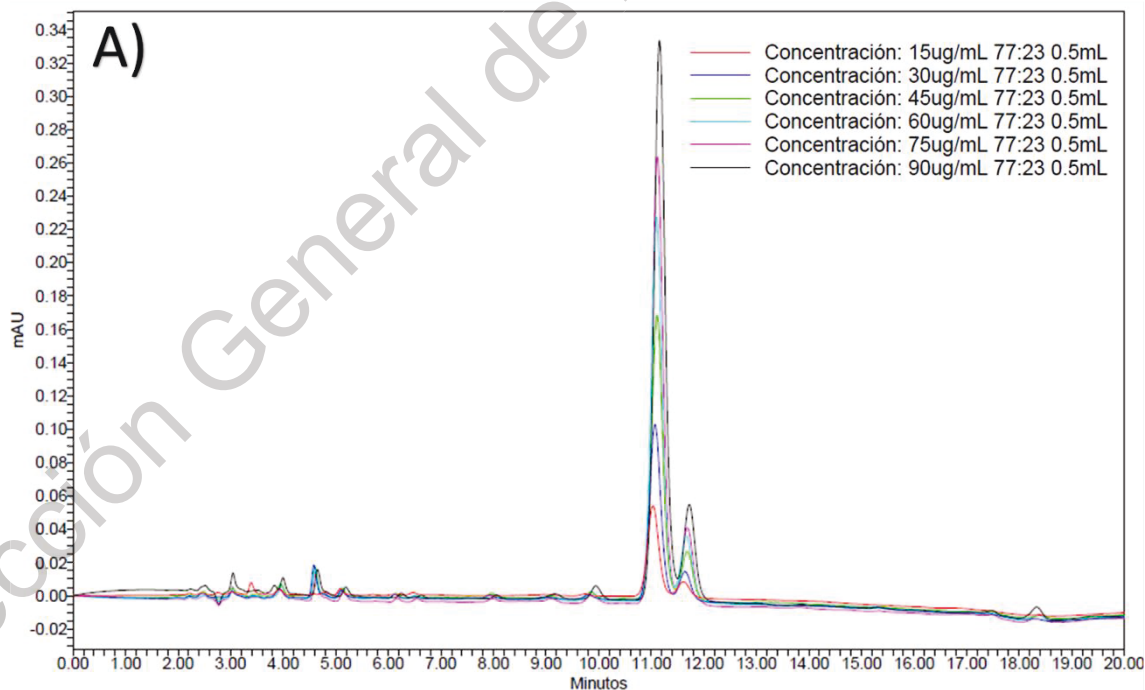
Hasta este punto, ha resultado evidente que los compuestos de *L. camara* que están directamente relacionados con la actividad leishmanicida, son los triterpenos de núcleo oleanano: lantadeno B, ácido lantanílico y ácido camárico. No obstante, los compuestos que mostraron una mejor actividad fueron los últimos dos. Por esta



razón, además de la relativa abundancia de estos compuestos en los extractos y su presencia constante en la mayoría de las distintas colectas, se decidió elegirlos como marcadores químicos bioactivos para el desarrollo y validación de un método analítico por HPLC-DAD, que permita cuantificarlos en los extractos de *L. camara*.

#### 8.6.2 Validación del método analítico para la detección y cuantificación de los marcadores químicos

El primer paso para la validación del método analítico fue la determinación de la linealidad del sistema. Para ello, se construyó una curva de calibración con las concentraciones 15, 30, 45, 60, 75 y 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de la mezcla de ácido lantanílico y ácido camárico (79:21). En la Figura 24 A), se muestra un cromatograma representativo de la curva de calibración, mientras que en la Figura 24 B) se muestra la regresión lineal para cada uno de los compuestos.





B)

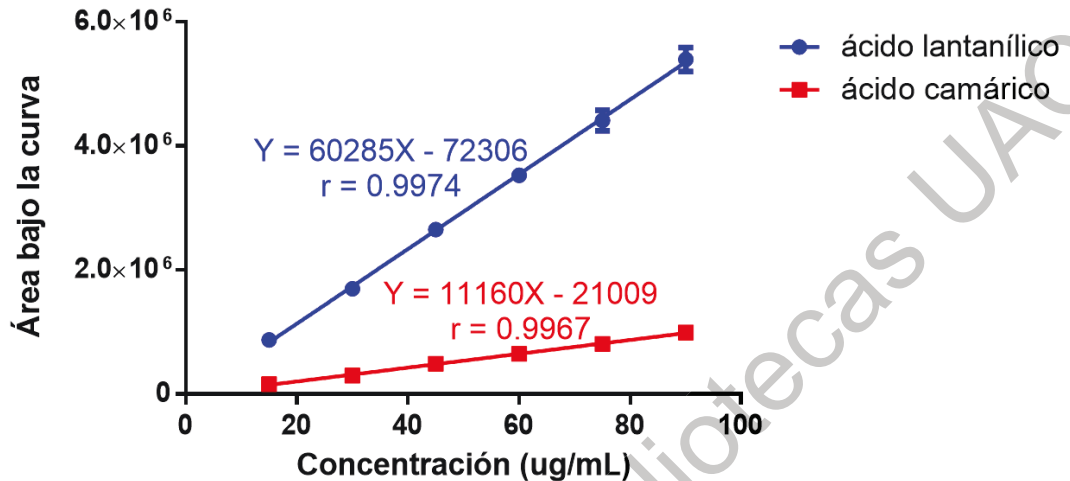


Figura 24. Curva de calibración para establecer la linealidad del sistema. A) Cromatogramas para cada una de las concentraciones. B) Curva de calibración.

Una vez establecida la linealidad del método, se procedió a realizar cada una de las pruebas necesarias para cada uno de los puntos en la validación del método, las cuales se resumen en el Cuadro 25.

Cuadro 25. Resumen de los parámetros para la validación del método de HPLC para la detección y cuantificación de los marcadores químicos

Parámetro de Validación	Criterio de aceptación teórico	Valor experimental Ácido lantanílico	Valor experimental Ácido camárico
Linealidad del sistema	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9950$	$r^2 = 0.9934$
	IC( $\beta_1$ ) no incluye a cero	$54324.305 < IC(\beta_1) < 173140.858$	$10077.811 < IC(\beta_1) < 89012.939$
	CV $\leq 2\%$ para la respuesta analítica	CV = 0.832%	CV = 1.456%
Adecuabilidad del sistema	$K' > 2$	$K' = 2.790$	$K' = 2.987$
	$R > 2$	$R = 2.708$	$R = 2.708$
	$T < 2$	$T < 2$	$T < 2$
Precisión del sistema	CV $\leq 1.5\%$	CV = 1.140%	CV = 1.382%
Límite de Detección	N/A	1.410 $\mu\text{g/mL}$	0.852 $\mu\text{g/mL}$
Límite de Cuantificación	N/A	2.968 $\mu\text{g/mL}$	2.908 $\mu\text{g/mL}$
	$r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.9917$	$r^2 = 0.9883$

Linealidad del método	$IC(\beta_1)$ no incluye a cero $98\% \leq IC(\mu)$ del porcentaje de recobro $\leq 102\%$ $CV_{IC(\mu)} \leq 2\%$	$61159.589 < IC(\beta_1) < 1061989.61$ $98.02\% \leq IC(\mu) \leq 101.82\%$ $CV_{IC(\mu)} = 1.26\%$ CV Analista 1, día 1 = 1.568% CV Analista 1, día 2 = 1.490%	$12262.904 < IC(\beta_1) < 721998.773$ $98.23\% \leq IC(\mu) \leq 101.61\%$ $CV_{IC(\mu)} = 1.48\%$ CV Analista 1, día 1 = 1.015% CV Analista 1, día 2 = 0.472%
Precisión del método	$CV \leq 2\%$	CV Analista 2, día 1 = 0.448% CV Analista 2, día 2 = 0.464%	CV Analista 2, día 1 = 1.322% CV Analista 2, día 2 = 1.062%
Exactitud y Repetibilidad del método	$98\% \leq IC(\mu)$ del porcentaje de recobro $\leq 102\%$ $CV_{IC(\mu)} \leq 2\%$	$99.59\% \leq IC(\mu) \leq 100.20\%$ $CV_{IC(\mu)} = 0.35\%$	$99.40\% \leq IC(\mu) \leq 100.80\%$ $CV_{IC(\mu)} = 0.72\%$
N/A: No Aplica.			

Al comparar los valores requisito teóricos, con los experimentales, es posible observar que el método cromatográfico desarrollado, cumple con todos los parámetros. Esto permitió cuantificar la cantidad de ácido lantanílico y ácido camárico presentes en los extractos de las diferentes colectas de *L. camara*.

### 8.6.3 Cuantificación del marcador químico

Tanto el ácido lantanílico como el ácido camárico fueron cuantificados de manera simultánea en cada uno de los extractos de diclorometano de *L. camara*, con el método analítico previamente validado (Figura 25).

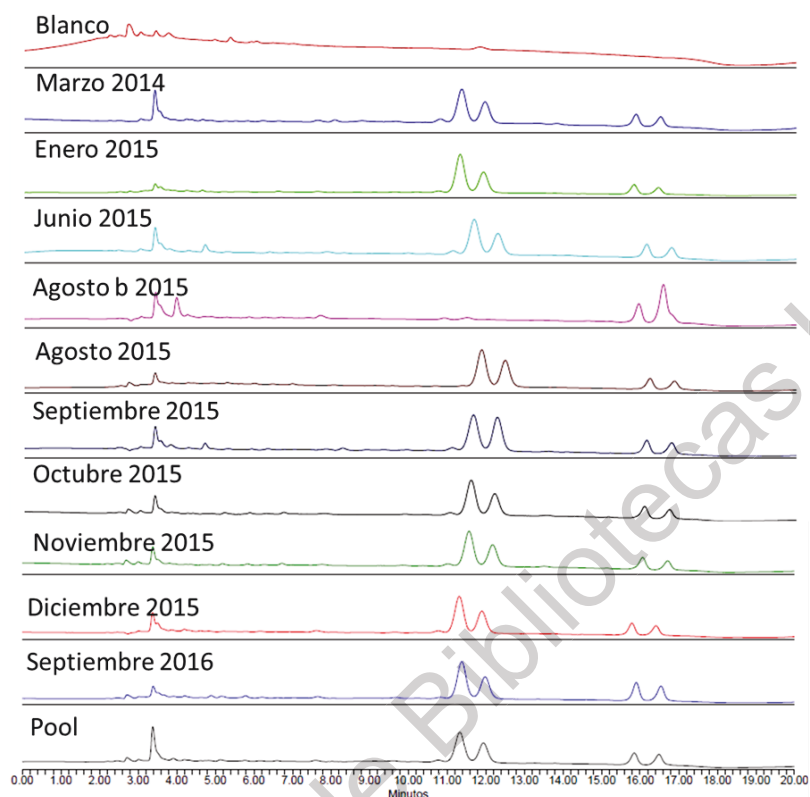


Figura 25. Cromatogramas representativos de la cuantificación de ácido lantanílico y ácido camárico en los extractos de diclorometano de *L. camara* colectada en distintas épocas del año.

Las concentraciones para cada uno de los extractos se muestran, a continuación, en el cuadro 26.

Cuadro 26. Cuantificación de ácido lantanílico y ácido camárico en los extractos de diclorometano de las distintas colectas de *L. camara*

Extracto	Concentración de ácido lantanílico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ extracto)	Concentración de ácido camárico ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ extracto)
Marzo 2014	$53.84 \pm 4.05$	$46.83 \pm 2.32$
Enero 2015	$24.70 \pm 4.17$	$11.85 \pm 1.69$
Junio 2015	$95.77 \pm 5.03$	$94.86 \pm 2.94$
Agosto 2015	$67.13 \pm 4.71$	$55.30 \pm 1.88$
Agosto b 2015	< LD	< LD
Septiembre 2015	$142.30 \pm 4.54$	$112.15 \pm 2.89$
Octubre 2015	$83.75 \pm 4.38$	$105.08 \pm 2.20$
Noviembre 2015	$65.13 \pm 4.88$	$56.69 \pm 1.98$
Diciembre 2015	$97.18 \pm 4.54$	$84.17 \pm 2.53$
Septiembre 2016	$118.45 \pm 4.10$	$101.88 \pm 2.76$
Pool	$62.73 \pm 1.16$	$57.49 \pm 0.68$

Como se enlista en el Cuadro 26, los extractos que poseen una mayor cantidad de los marcadores químicos, son los extractos más activos, los correspondientes a septiembre 2015 y septiembre 2016, con concentraciones de más de 100 µg/mg de extracto, para ambos triterpenos (130.38 ± 16.86 µg ácido lantanílico/mg extracto y 107.01 ± 7.26 µg ácido camárico/mg extracto). Para los extractos considerados medianamente activos (marzo 2014; junio, agosto, octubre, noviembre y diciembre 2015), la concentración de ambos compuestos osciló entre 53.84 y 105.08 µg/mg de extracto (81.79 ± 15.23 µg ácido lantanílico/mg extracto y 79.22 ± 22.46 µg ácido camárico/mg extracto). Finalmente, la concentración para los triterpenos en los extractos pobremente activos (enero y agosto b, 2015) se encontró por debajo de 24.70 ± 4.17 µg ácido lantanílico/mg extracto y de 11.85 ± 1.69 µg ácido camárico/mg extracto. Los valores resumidos en el Cuadro 26 comprueban lo previamente observado a través del análisis metabolómico y el estudio quimiométrico, los cuales correlacionaron directamente la actividad leishmanicida de los extractos con señales a determinados desplazamientos químicos, correspondientes al ácido lantanílico y al ácido camárico.

#### 8.7 Evaluación *in vivo* de dos extractos cuantificados de *L. camara* y algunos de los compuestos identificados

Para la evaluación del efecto *in vivo* de los extractos cuantificados de *L. camara*, se formuló una crema o/w en la cual se disolvieron 3 mg de los extractos de Marzo de 2014 o de Septiembre 2015; o de los compuestos: β-cariofileno, β-ionona, escualeno o la mezcla de ácido lantanílico+ácido camárico (79:21), por cada 20 µL de vehículo. De manera adicional, se preparó una segunda formulación, sustituyendo en la parte A, los 10 g de miristato de isopropilo por 6 g de aceites vegetales grado USP (almendras, aguacate y girasol) y 4 g de alcohol cetílico. En la parte B, se adicionó urea para lograr una concentración al 7.5%. A esta formulación la estaremos llamando form2 o Vehículo 2. Esta modificación permitiría una mejor permeabilidad de la piel, para potenciar la penetración de los extractos o compuestos y con ello, mejorar su capacidad de resolver la infección.

En la Figura 26, se muestra la evolución en el tamaño de la lesión para los distintos tratamientos. Para ninguno de los grupos se observó que existiera una disminución del tamaño de la lesión, lo que es un indicativo indirecto de la mejora de la infección. No obstante, como se resume en la Cuadro 26, existen diferencias estadísticamente significativas comparando el grupo control sin tratamiento con el vehículo 2 (grupo 3) y los tratamientos de marzo 2014 form2 7 mg (grupo 6), septiembre 2015 (grupo 7), óxido de cariofileno (grupo 8),  $\beta$ -ionona (grupo 10) y ácido lantanílico + ácido camárico (grupo 11). Analizando la Figura 25, es posible observar que esta diferencia estadísticamente significativa, se debe a un incremento del tamaño de la lesión, con respecto al grupo control; lo que podría indicar un aumento de la respuesta pro-inflamatoria de tipo Th<sub>1</sub> en los ratones.

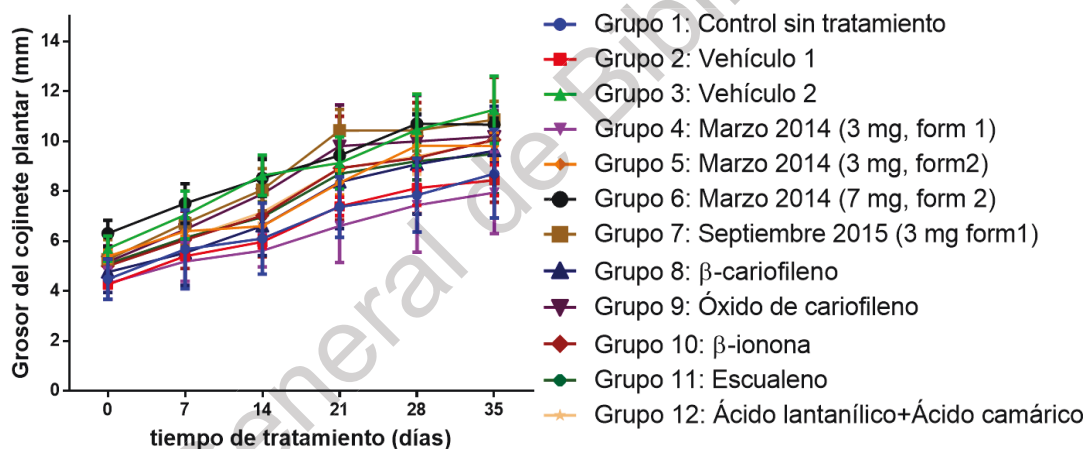


Figura 26. Efecto del tratamiento sobre el tamaño del cojinete plantar en los distintos grupos de ratones infectados con *Leishmania mexicana*.

En los modelos murinos para leishmaniasis, se ha observado que la diferencia entre cepas susceptibles (BALB/c, CcS16, DBS/2 y hámster dorado) y cepas resistentes (C3H/He, CBA, 129Sv/Ev, C57BL/6 y B10D2) a la infección por *Leishmania*, se debe a su fondo inmunológico. Para las cepas resistentes, se ha encontrado una respuesta inmune tipo Th<sub>1</sub>, que se caracteriza por una alta producción de interleucina 12 (IL-12), la cual favorece la síntesis del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2), así como una disminución en la expresión de la IL-13. El efecto

neto de la regulación de estas citocinas involucra un aumento de la síntesis de enzimas lisosomales y de óxido nítrico (NO) en el macrófago, lo que favorece la eliminación de *Leishmania* intracelular y, con ello, la resolución de la enfermedad. No obstante, una respuesta Th<sub>1</sub> exacerbada ocasiona daño tisular. Por otro lado, en las cepas susceptibles, se observa una respuesta inmunitaria de tipo Th<sub>2</sub>, en la cual se favorece de la producción de IL-4, a través de la activación del factor nuclear de células T activadas (NFAT). A su vez, se aumenta la expresión de IL-5, IL-6 e IL-10, y la sobreexpresión del gen que codifica a la proteína supresora de señalización de citocinas T (SOCS-1). El efecto final de estas citocinas sobre la respuesta inmune es la disminución de la respuesta inmune tipo Th<sub>1</sub>, un aumento en la producción de anticuerpos y un aumento en el metabolismo de la arginina para la producción de ornitina y urea, a través de la vía de las poliaminas, lo que desencadena un aumento de la división celular de macrófagos con baja actividad microbicida, lo que ocasiona una exacerbación de la enfermedad (Sacks and Noben-trauth, 2002; Watanabe et al., 2004; Alexander and Bryson, 2005; Ganguli et al., 2015; Mears et al., 2015; Mills et al., 2019). Actualmente se sabe que, la polarización hacia una respuesta inmune u otra, se debe a la proporción de 2 factores de transcripción: Tbx21 (Th<sub>1</sub>) y GATA3 (Th<sub>2</sub>) (Kyriazis et al., 2016).

A la fecha, se ha demostrado actividad leishmanicida e inmunomoduladora, sólo de 3 compuestos aislados a partir de plantas: 1) una flavona, la tricina (aislada de *Casearia arborica*), mostró un aumento *in vitro* en la producción de NO en macrófagos infectados con *L. infantum* (MHOM/BR/1972/LD), lo que sugirió que este compuesto modula el estallido respiratorio del macrófago, facilitando la eliminación del parásito. 2) Un glicósido secoiridoide, la oleuropeína (aislada de *Olea europea*), de la cual se demostró que elevaba los niveles de NO y especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos J774A.1 infectados con *L. donovani* (zimodema MON-2, cepa MHOM/IN/1996/THAK35) y en hepatocitos y esplenocitos explantados de ratones BALB/c infectados con esta misma cepa de *Leishmania*. Además, la polarización de la respuesta inmune hacia tipo Th<sub>1</sub> se hizo evidente por

el aumento de la expresión de los genes que codifican para la IL-1 $\beta$ , IL-12 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , de la proporción de los factores de transcripción Tbx21/GATA3, de la producción de anticuerpos específicos IgG2a/IgG1 y una mejora en la respuesta de hipersensibilidad retardada. Por otra parte, se encontró una disminución de los genes para la IL-10 y el TGF- $\beta$ 1. Uno de los riesgos de aumentar la respuesta tipo Th1 es que puede ocasionar daño en el tejido del hospedero, no obstante, la oleuropeína tuvo además la capacidad de aumentar la expresión de los genes que codifican para la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa (mGCLC, enzima encargada de la síntesis de glutatión) y del gen del factor nuclear Kappa-B (NF-KB2) en el ratón, ambos genes encargados de la producción de moléculas con potencial antioxidante. En contraste, hubo una disminución de la expresión del gen de la LdGCLG de *L. donovani*, la enzima encargada de la síntesis del tripanotión, agente reductor 600 veces más afín que el glutatión (Bocedi et al., 2010). Esto evidencia la selectividad de la oleuropeína para atacar específicamente a *Leishmania* y proteger al huésped de la actividad proinflamatoria de la respuesta tipo Th<sub>1</sub> (Kyriazis et al., 2016). Por último, 3) un triterpeno, el lupeol (aislado de *Sterculia villosa*) dañó la membrana de promastigotes de *L. donovani* (MHOM/IN/1983/AG83), incrementó la producción de NO, IL-12 e IFN- $\gamma$  y disminuyó los niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ , en ratones BALB/c infectados con la misma cepa de *Leishmania*. Adicionalmente, mediante un análisis *in silico* de acoplamiento molecular, se encontró que el lupeol presenta interacciones razonables con 2 enzimas de *Leishmania*: la adenina fosforribosiltransferasa (vía de rescate de purinas) y la pteridínreductasa (vía de los folatos) (Das et al., 2017). Considerando que el lantadeno B, el ácido lantanílico y el ácido camárico son compuestos relacionados al lupeol (son triterpenos), y dadas las evidencias encontradas en el presente trabajo con respecto a la actividad leishmanicida de estos compuestos, es posible plantear la posibilidad de que estos tres triterpenos actúen por mecanismos similares al lupeol. Las estructuras de estos tres compuestos se muestran en la Figura 27.



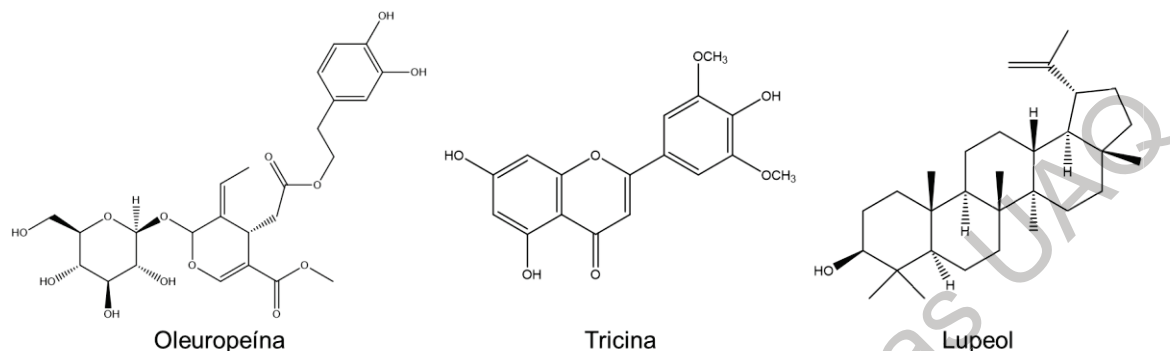


Figura 27. Compuestos de origen vegetal con actividad inmunomoduladora en leishmaniasis.

Si bien, la medición del tamaño de la lesión es un buen indicativo de la reversión de la infección, se observó que no necesariamente existe una correlación directa con la disminución de la carga parasitaria. En la Figura 28, se encuentra la gráfica del porcentaje de la carga parasitaria al final del tratamiento de 5 semanas con los extractos o compuestos, con respecto al grupo control sin tratamiento. En el Cuadro 27 también se encuentran resumidas las diferencias estadísticamente significativas de ambos resultados. Es posible observar que sólo dos grupos mostraron una disminución de la carga parasitaria estadísticamente diferente al control, aproximadamente del 50%. Estos dos grupos corresponden al grupo 7: septiembre 2015 (% carga parasitaria:  $47.81 \pm 14.00$ ) y grupo 11: ácido lantanílico + ácido camárico (% carga parasitaria:  $53.22 \pm 8.94$ ). No obstante, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Lo que indica que estos dos tratamientos pueden utilizarse indistintamente y obtener el mismo efecto terapéutico. Esto indica que es posible trabajar con el extracto completo sin necesidad de la purificación de los compuestos bioactivos para desarrollar un fitomedicamento. Si bien no se logró una resolución total de la enfermedad, este porcentaje de disminución, representa un importante logro en el desarrollo de fitomedicamentos de aplicación tópica para el tratamiento de leishmaniasis ya que, a la fecha, no existe ningún tratamiento disponible con esta vía de administración. Una de las principales desventajas de los tratamientos actuales es que, a excepción



de la miltefosina, todos se administran por vía parenteral (intralesional o intravenosa), requiriendo de un médico que lo aplique. En muchas ocasiones, esto dificulta la adhesión al tratamiento por parte del paciente. De esta manera, desarrollar un medicamento tópico, eliminaría esta situación.

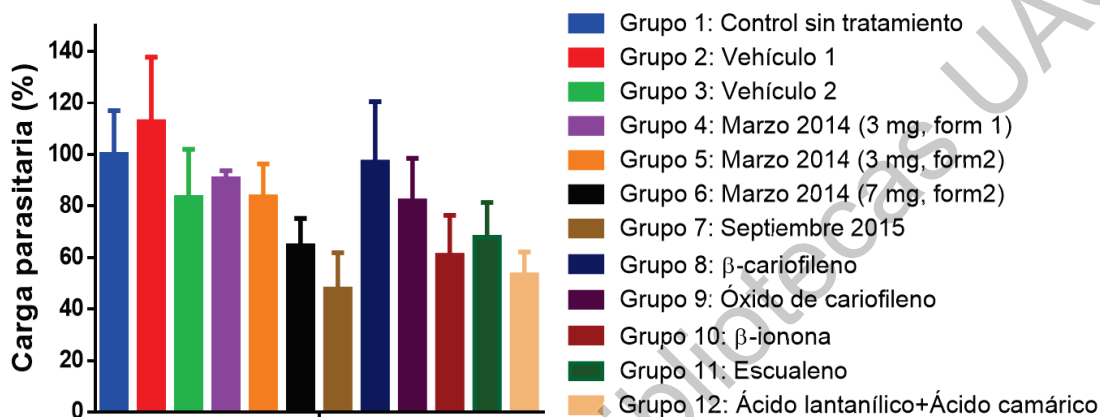


Figura 28. Efecto del tratamiento sobre la carga parasitaria en los distintos grupos de ratones infectados con *Leishmania mexicana*.

Cuadro 27. Diferencias estadísticamente significativas al final del tratamiento con los extractos o compuestos vs el control sin tratamiento (ANOVA de una vía de comparaciones múltiples con análisis post-hoc de Tukey)

Extracto/ Compuesto	Tamaño de la lesión (mm)	Diferencia estadística	Carga parasitaria (%)	Diferencia estadística
Control sin tratamiento	8.70 ± 1.54	N/A	100 ± 17.01	N/A
Vehículo 2	11.27 ± 1.17	****	83.36 ± 18.62	ns
Marzo 2014 formulación 2	10.67 ± 0.22	****	64.53 ± 10.61	ns
7 mg/20 $\mu$ L				
Septiembre 2015	10.86 ± 0.64	****	47.81 ± 14.00	**
Óxido de cariofileno	10.20 ± 0.90	**	81.99 ± 16.47	ns
$\beta$ -ionona	10.06 ± 2.16	**	60.76 ± 15.64	ns
Ácido lantanílico + ácido camárico (79:21)	10.02 ± 0.13	*	53.22 ± 8.94	**

N/A: no aplica; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0.1$ ; ns: no hay diferencia estadísticamente significativa.

El análisis de las fotografías de los cortes histopatológicos de los cojinetes plantares, permitió observar la disminución de la carga parasitaria derivada de cada uno de los tratamientos y, a su vez, que ninguno de ellos ocasionó daño en el tejido del ratón (ANEXO VII). No obstante, en los cortes que corresponden a los ratones tratados con el extracto de septiembre de 2015 y con la mezcla de ácido lantanílico y ácido camárico, es posible observar una alteración de la morfología de los parásitos, ya que se observan disminuidos en tamaño, “difuminados” y no es apreciable el núcleo, como sucede en el grupo control. Esta evidencia de daño morfológico sobre el parásito exclusivamente, podría confirmar el mecanismo que se propuso anteriormente, sobre la interacción de estos triterpenos con la 14 $\alpha$ -desmetilasa de esteroides (CYP51) de *Leishmania*. No obstante, es necesario conducir experimentos adicionales que corroboren tanto el efecto inmunomodulador como el mecanismo leishmanicida de estos triterpenos.

## 9. CONCLUSIONES

- *L. camara* posee compuestos con actividad leishmanicida, siendo los más potentes 3 triterpenos de núcleo oleanano: el lantadeno B ( $CI_{50} = 23.45 \pm 2.15 \mu M$ ), y la mezcla de ácido lantanílico y ácido camárico ( $CI_{50} = 12.02 \pm 0.36 \mu M$ , proporción 79:21).
- El ácido lantanílico y el ácido camárico constituyen los 2 principales marcadores químicos bioactivos de los extractos de *L. camara*, ya que su baja concentración o ausencia impacta negativamente en el potencial leishmanicida de los extractos totales (CCF, RMN).
- Con base en su actividad leishmanicida, los extractos de *L. camara* colectada en distintas épocas del año, pueden ser clasificados en pobremente activos ( $CI_{50} > 67.47 \mu g/mL$ ), medianamente activos ( $42.64 < CI_{50} < 49.80 \mu g/mL$ ) y altamente activos ( $CI_{50} > 26.09 \mu g/mL$ ).
- Los extractos más activos frente a *Leishmania mexicana* presentaron mayores niveles de ácido lantanílico y ácido camárico ( $130.37 \pm 16.86 \mu g$  ácido lantanílico/mg de extracto y  $107.01 \pm 7.26 \mu g$  ácido camárico/mg de extracto, respectivamente). Para los extractos considerados medianamente activos, la concentración de ambos compuestos fue de  $81.79 \pm 15.23 \mu g$  ácido lantanílico/mg extracto y  $79.22 \pm 22.46 \mu g$  ácido camárico/mg extracto. Finalmente, la concentración para el ácido lantanílico y el ácido camárico para los extractos poco activos se encontró por debajo de los  $24.70 \pm 4.17 \mu g$  ácido lantanílico/mg extracto y de  $11.85 \pm 1.69 \mu g$  ácido camárico/mg extracto.
- Los extractos de *L. camara* colectada en distintas épocas del año, presentaron algunas diferencias en su perfil químico (cromatografía en capa fina y  $^1H$ -RMN). El análisis de componentes principales (PCA) de los datos obtenidos por  $^1H$ -RMN permitió identificar un agrupamiento natural de los datos, siendo los extractos de agosto b 2015 y de septiembre de 2015, los extractos con los perfiles químicos más disímiles.

- La correlación de la actividad leishmanicida con el perfil químico obtenido mediante  $^1\text{H}$ -RMN, utilizando un análisis de mínimos cuadrados parciales latentes (PLS), permitió identificar a los desplazamientos químicos que contribuyen de manera significativa a la actividad leishmanicida: 0.76, 0.88, 0.96, 1.00, 1.16, 1.24, 1.28, 1.32, 1.52, 1.6, 1.68, 1.72, 1.80, 1.84, 2.0, 2.04, 2.12, 2.16, 3.64, 4.24, 5.32 y 6.0 ppm. Todas estas señales corresponden al ácido lantanílico, al ácido camárico y al lantadeno B, a excepción de la ubicada en 5.32 ppm, que corresponde al  $\beta$ -cariofileno.
- Fue posible desarrollar un modelo matemático que permitirá predecir la actividad leishmanicida de un extracto de *L. camara* a partir de su espectro protónico de RMN, lo que permitirá disminuir los tiempos y costos de evaluación de la actividad leishmanicida de extractos preparados a partir de esta especie.
- Se desarrolló y validó un método analítico por RP-HPLC-DAD para la detección y cuantificación del ácido lantanílico y el ácido camárico en extractos de *L. camara*.
- Las cremas obtenidas a partir del extracto de septiembre de 2015 y de los marcadores químicos, aumentaron la inflamación del tejido afectado por *Leishmania*. A su vez, disminuyeron la carga parasitaria en, aproximadamente, un 50%. El mecanismo por el cual, probablemente, actúan estos dos tratamientos es a través de una polarización de la respuesta inmune tipo  $\text{Th}_2$  hacia  $\text{Th}_1$  y por un efecto directo sobre el parásito, ya que se observa una pérdida de la integridad de la morfología de los mismos, después de 5 semanas de tratamiento. Este efecto directo sobre los parásitos podría involucrar la inhibición de la enzima CYP51 ( $14\alpha$ -desmetilasa de esteroides), una enzima clave en la síntesis de ergosterol.
- Se desarrolló una crema con potencial actividad leishmanicida que, si bien no logró la resolución total de la enfermedad, establece las bases para la mejora de la formulación farmacéutica del vehículo para favorecer las propiedades farmacocinéticas de los triterpenos.

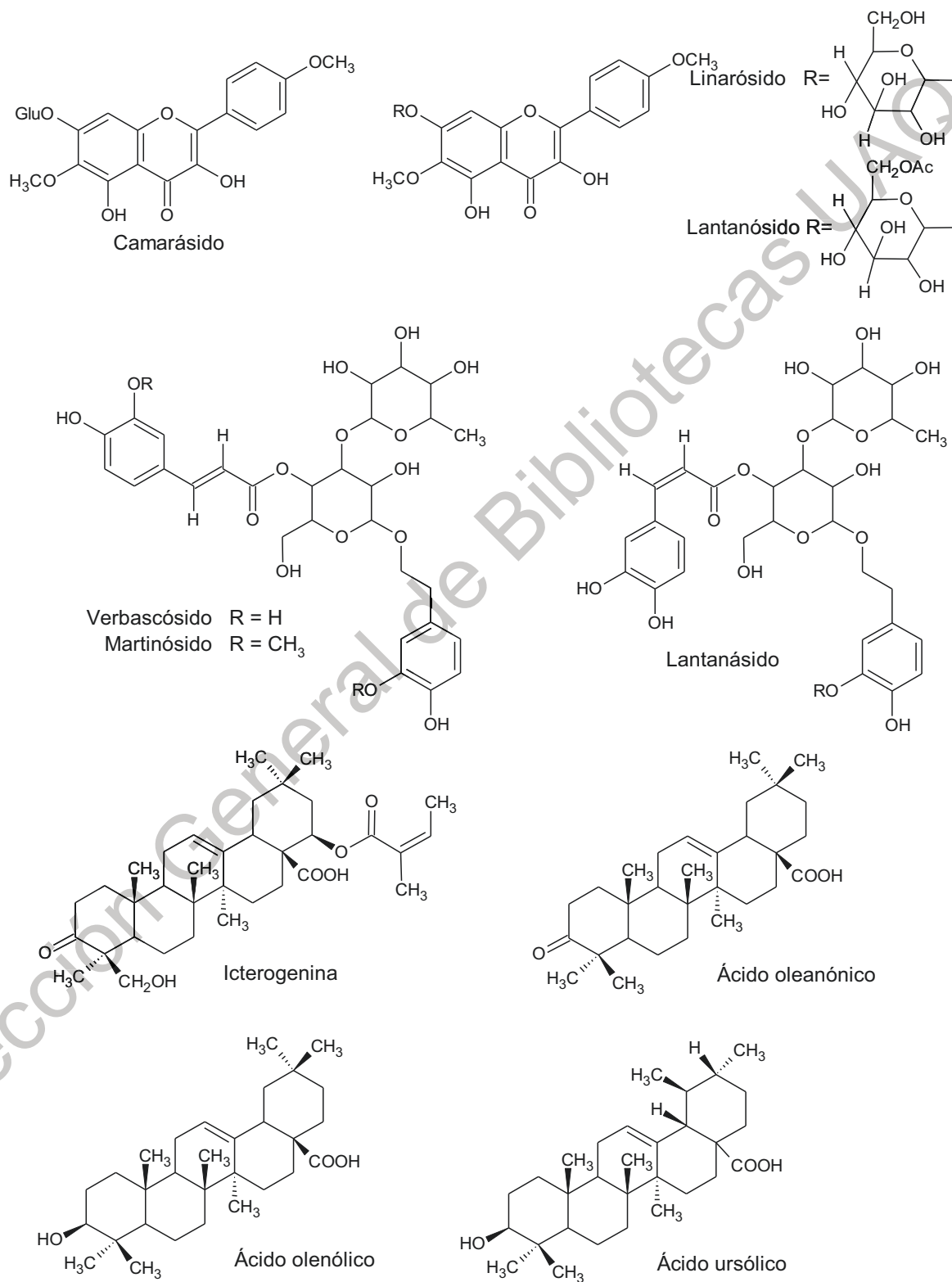
- Los resultados derivados de este trabajo constituyen las bases para el desarrollo de fitomedicamentos con actividad leishmanicida elaborados a partir de extractos poco polares y/o triterpenos puros obtenidos a partir de *L. camara*.

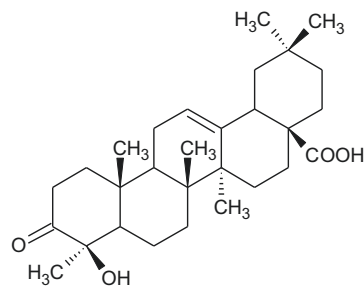
#### **10. PERSPECTIVAS**

- Establecer el mecanismo de acción, por el cual el ácido lantanílico y el ácido camárico actúan sobre *Leishmania*.
- Determinar la toxicidad aguda y crónica de estos triterpenos por vía oral.
- Desarrollar una formulación farmacéutica que mejore la permeabilidad de estos compuestos, para hacer posible, en un futuro, su uso como medicamento en humanos afectados por leishmaniasis.

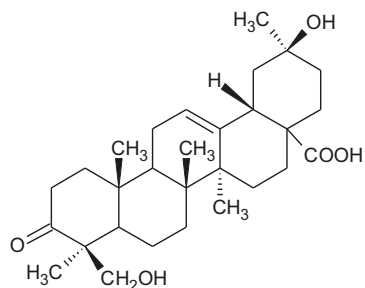
Dirección General de Bibliotecas UAQ

**ANEXO I. Compuestos aislados de *Lantana camara* con actividad biológica**

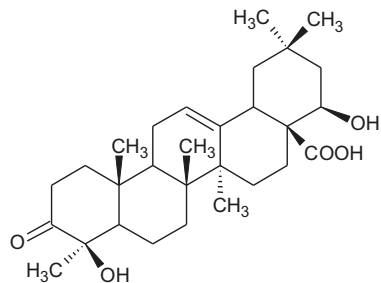




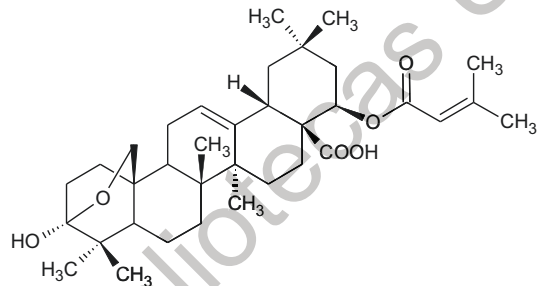
Ácido 4-epihederagónico



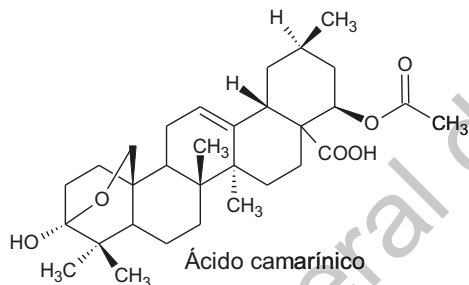
Ácido 24-hidroxi-3-oxours-12-en-28-oico



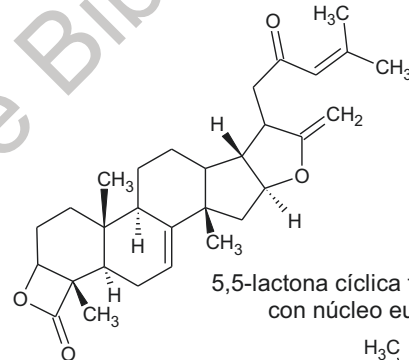
Ácido 24-hidroxi-3-oxolean-12-en-28-oico



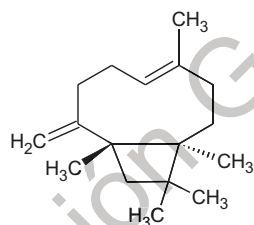
Ácido 22β-dimetilacrililoiloxilantánico



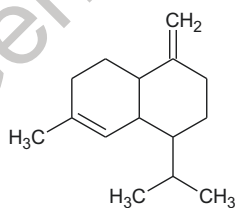
Ácido camarínico



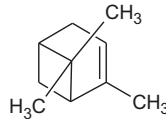
5,5-lactona cíclica fusionada con núcleo eufano



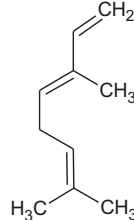
E-cariofileno



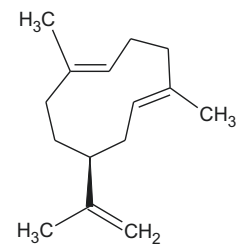
γ-cadineno



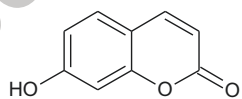
α-pineno



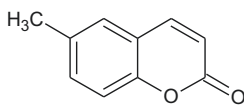
Ocimeno



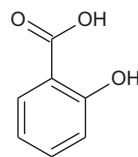
Germacreno D



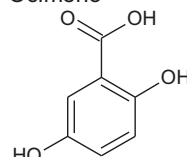
Umbeliferona



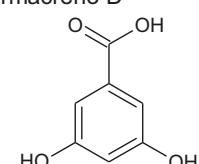
6-metilcumarina



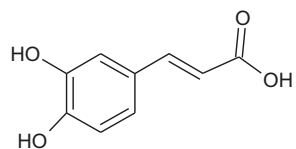
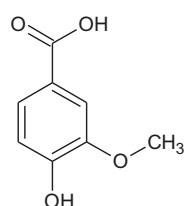
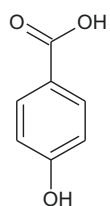
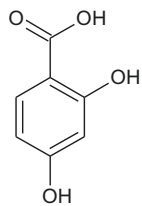
Ácido salicílico



Ácido gentísico



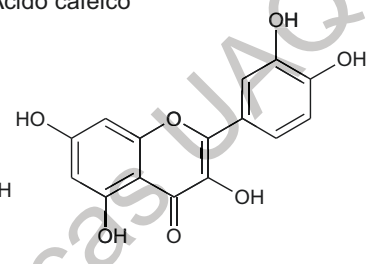
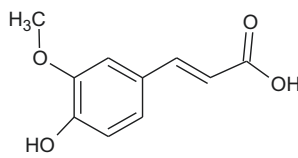
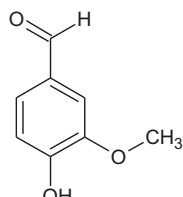
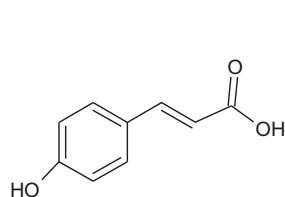
Ácido α-resorcílico



Ácido  
p-hidroxibenzoico

Ácido vanílico

Ácido cafeico



Ácido p-cumárico

Vainillina

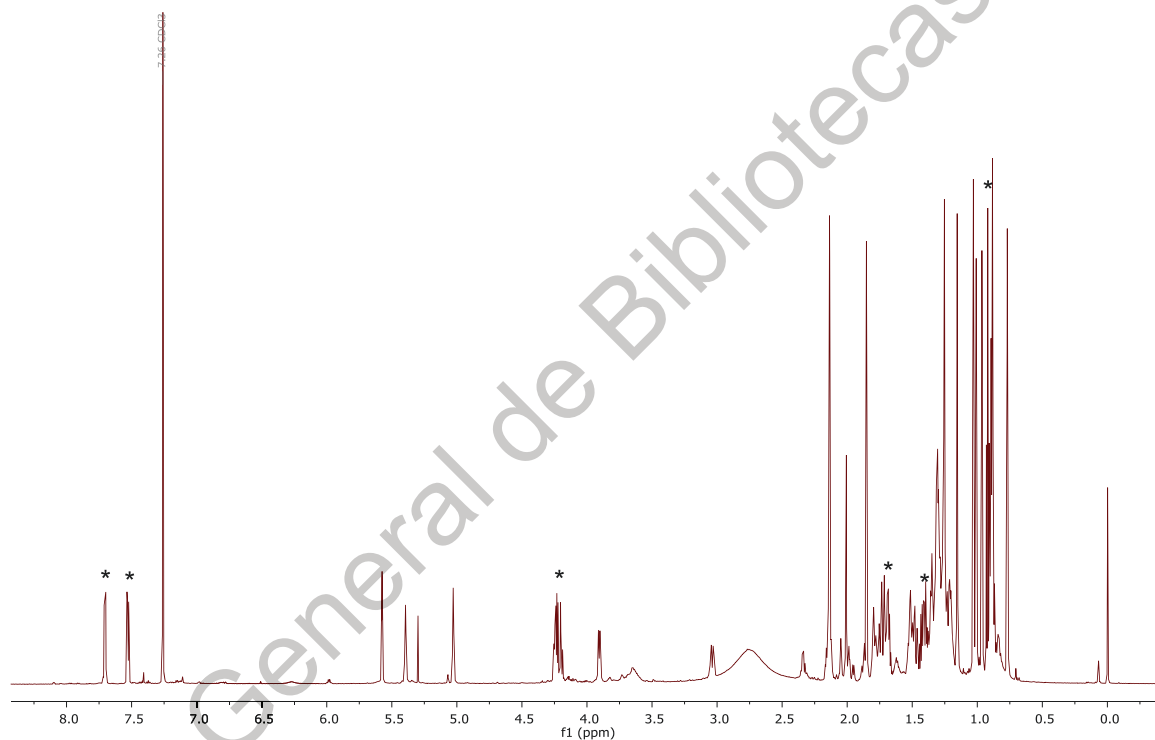
Ácido ferúlico

Quercetina

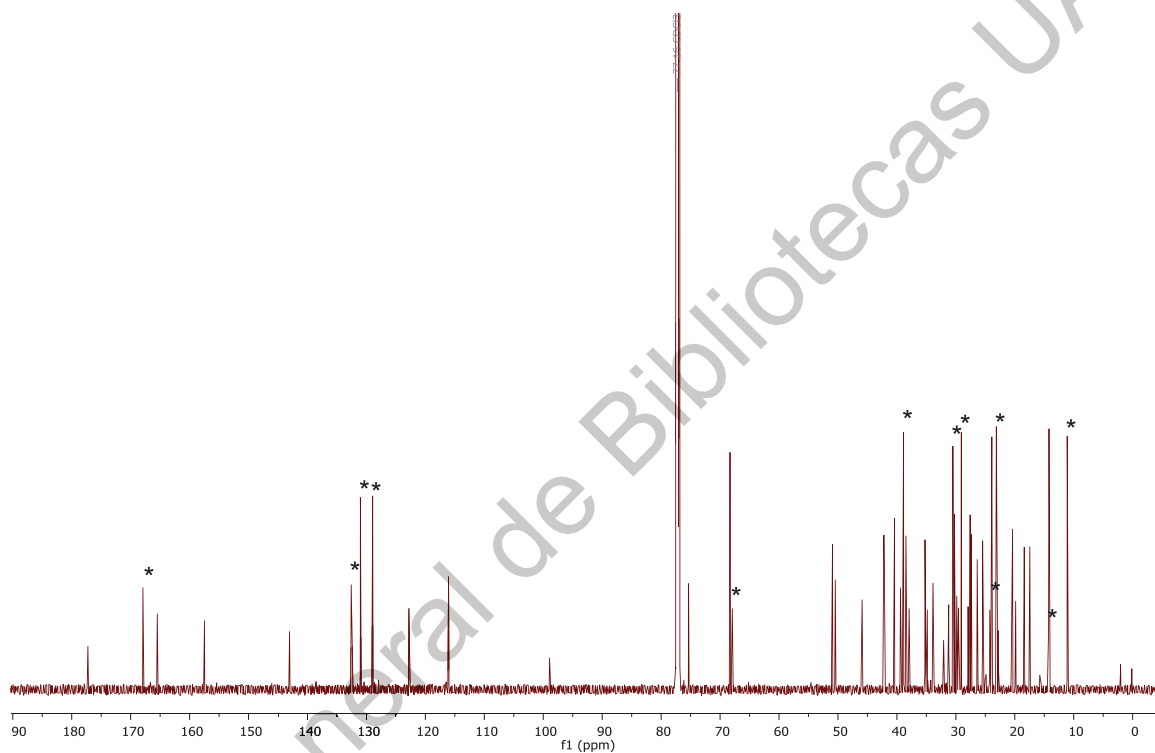
Dirección General de Bibliotecas



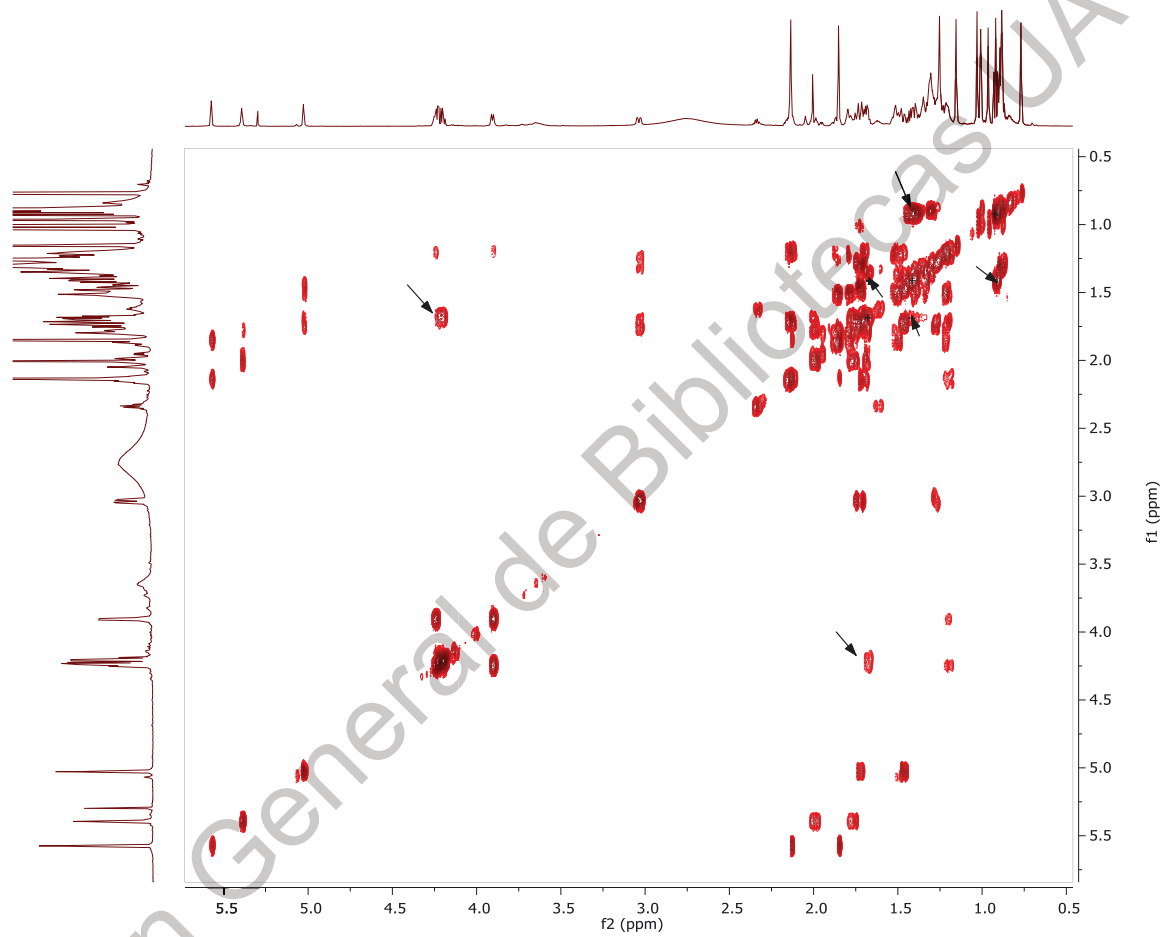
## ANEXO II. Espectros de RMN del ácido lantánico (8)



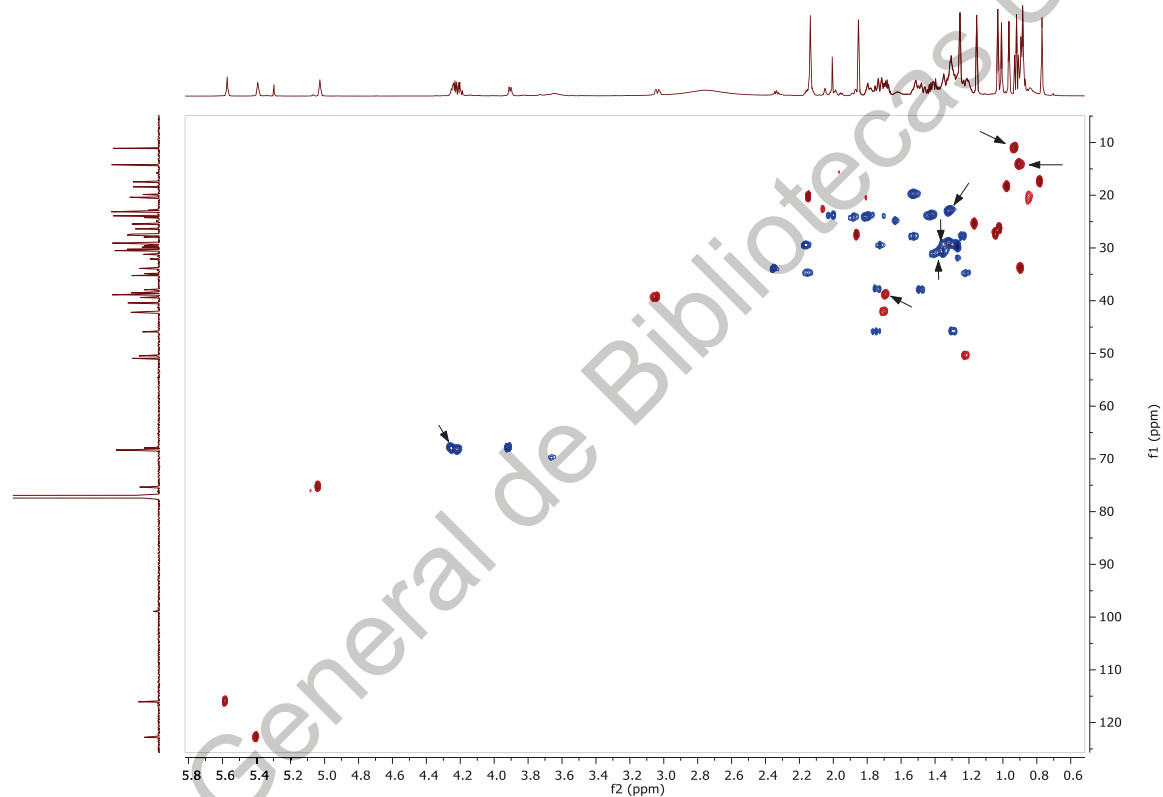
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, cloroformo-*d*, 298 K) del ácido lantánico (**8**). Los asteriscos (\*) indican las señales de impurezas de bis-(2etilhexil)ftalato (~10%). Por otro lado, también fue detectado ácido camárico (**9**) como impureza minoritaria (señales no indicadas, <5%).



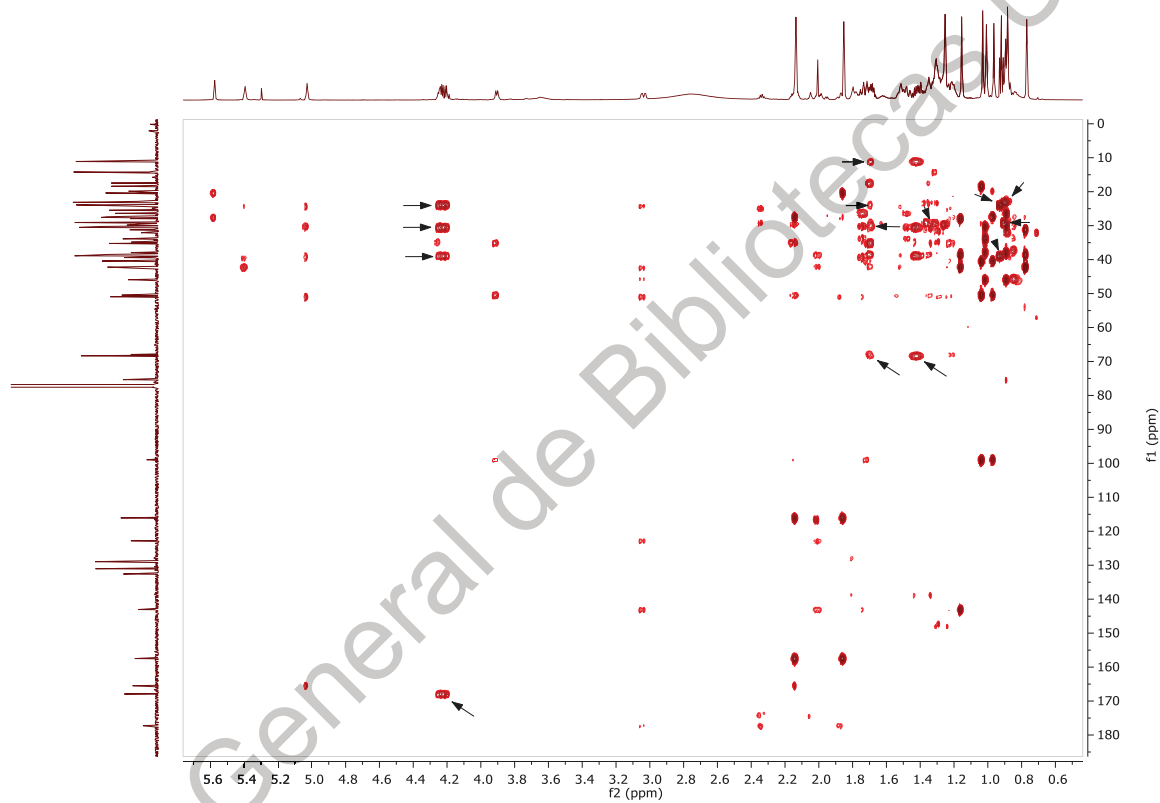
Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (175 MHz, cloroformo-*d*, 298 K) del ácido lantanílico (**8**). Los asteriscos (\*) indican las señales de impurezas de bis-(2etilhexil)ftalato (~10%). Por otro lado, también fue detectado ácido camárico (**9**) como impureza minoritaria (señales no indicadas, <5%).



Espectro COSY del ácido lantanílico (**8**). Las flechas ( $\rightarrow$ ) indican las correlaciones de las impurezas de bis-(2etilhexil)ftalato (~10%).

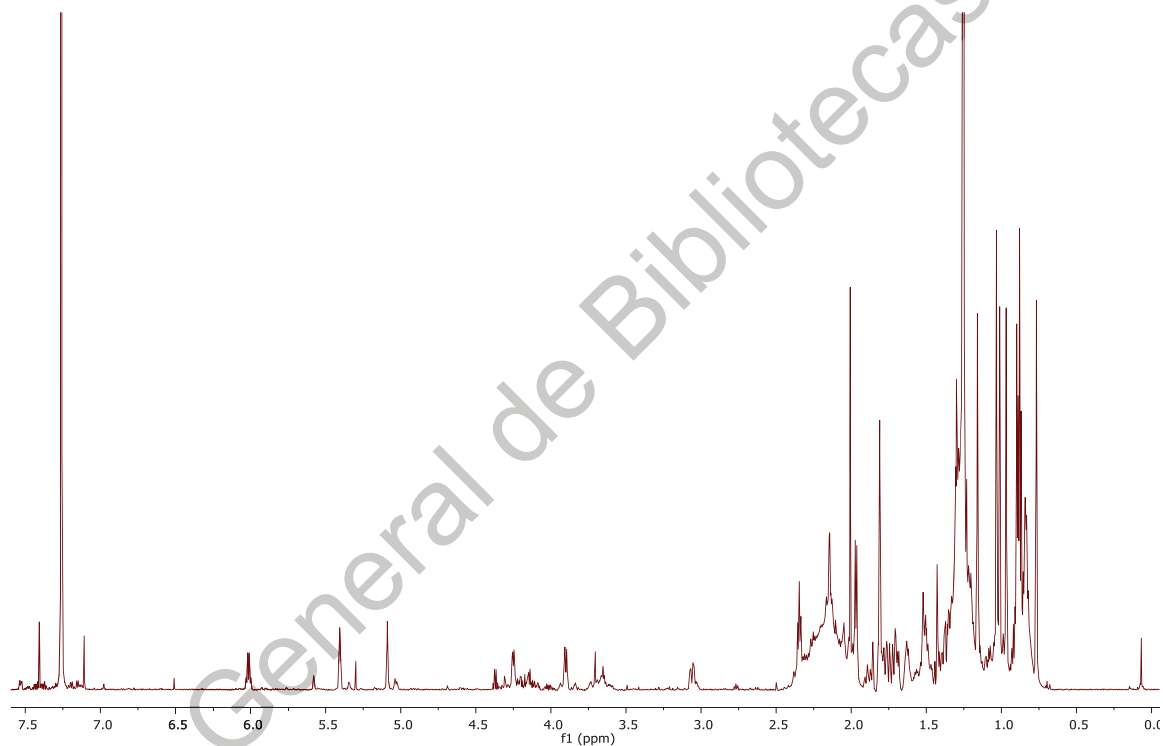


Espectro HSQC del ácido lantánico (**8**). Las flechas (→) indican las correlaciones de las impurezas de bis-(2etilhexil)ftalato (~10%).

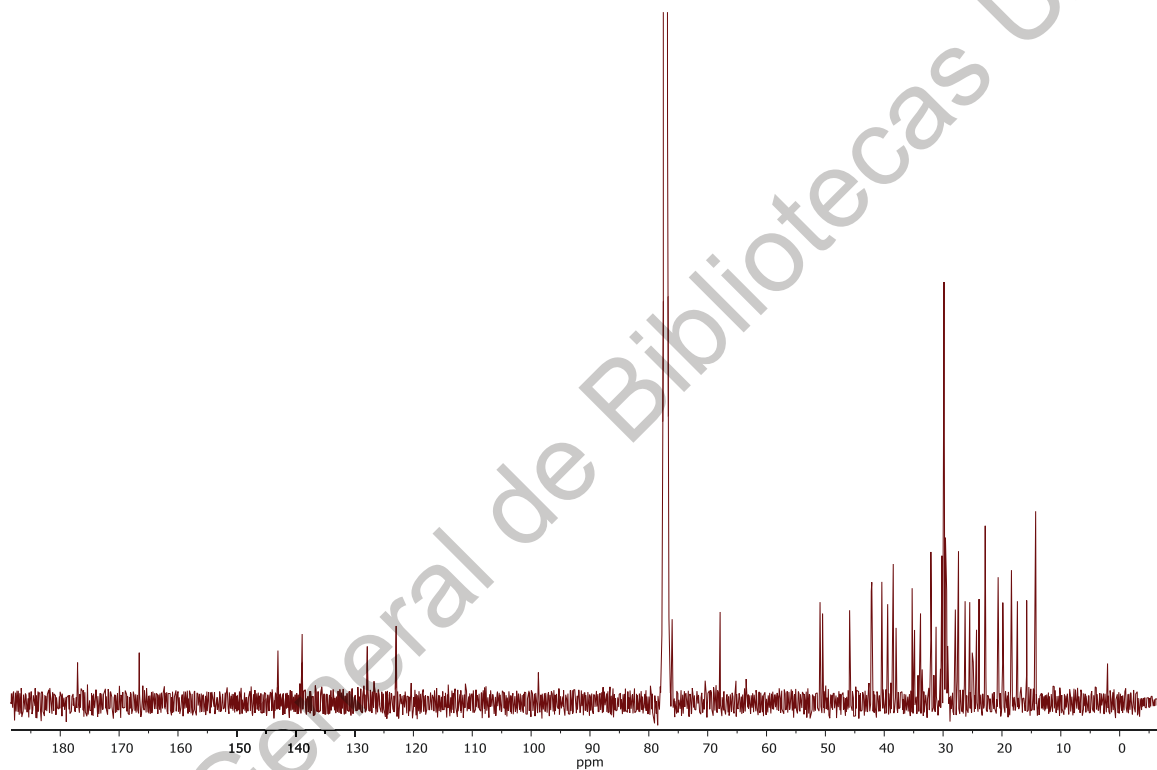


Espectro HMBC del ácido lantánico (**8**). Las flechas ( $\rightarrow$ ) indican las correlaciones de las impurezas de bis-(2etilhexil)ftalato (~10%).

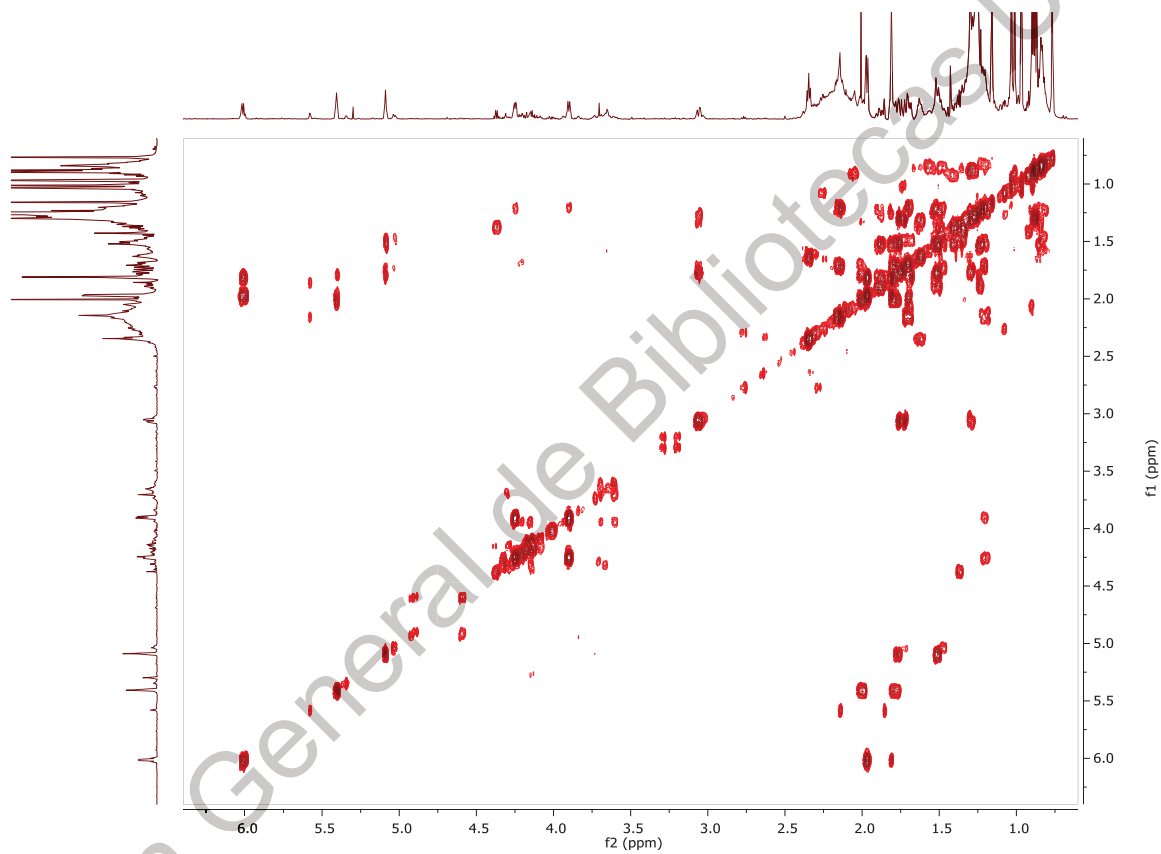
ANEXO III. Espectros de RMN del ácido camárico (9)



Espectro  $^1\text{H}$ -RMN (700 MHz, cloroformo- $d$ , 298 K) del ácido camárico (9). Fue detectado ácido lantanílico (8) como impureza minoritaria (señales no indicadas, <10%).

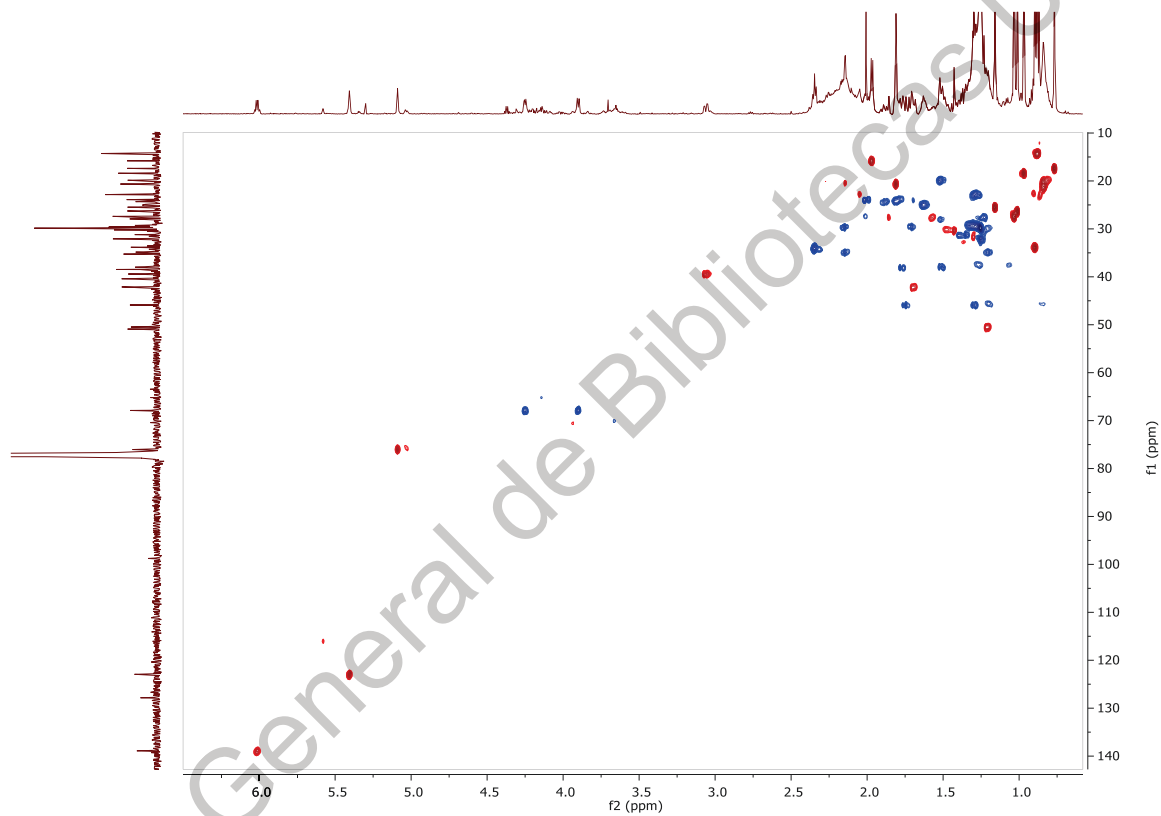


Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (175 MHz, cloroformo-*d*, 298 K) del ácido camárico (**9**). Fue detectado ácido lantánico (**8**) como impureza minoritaria (señales no indicadas, <10%).

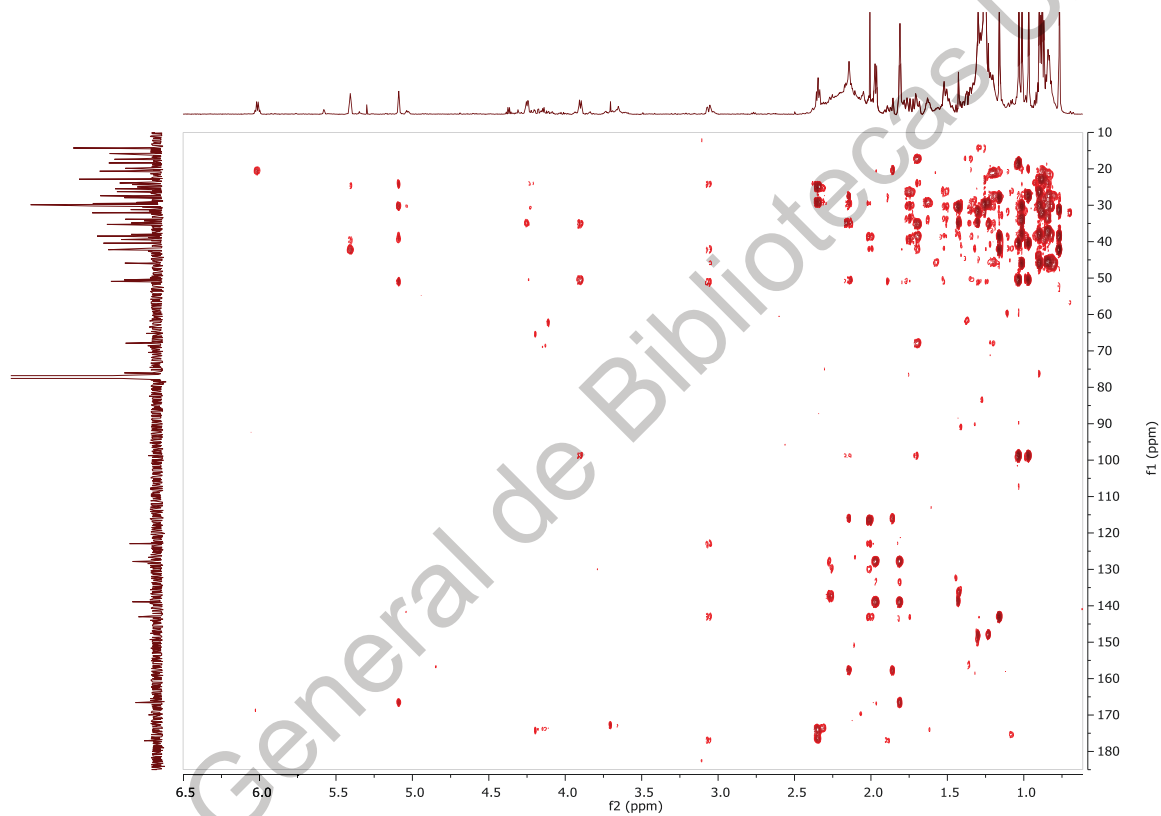


Espectro COSY del ácido del ácido camárico (**9**).



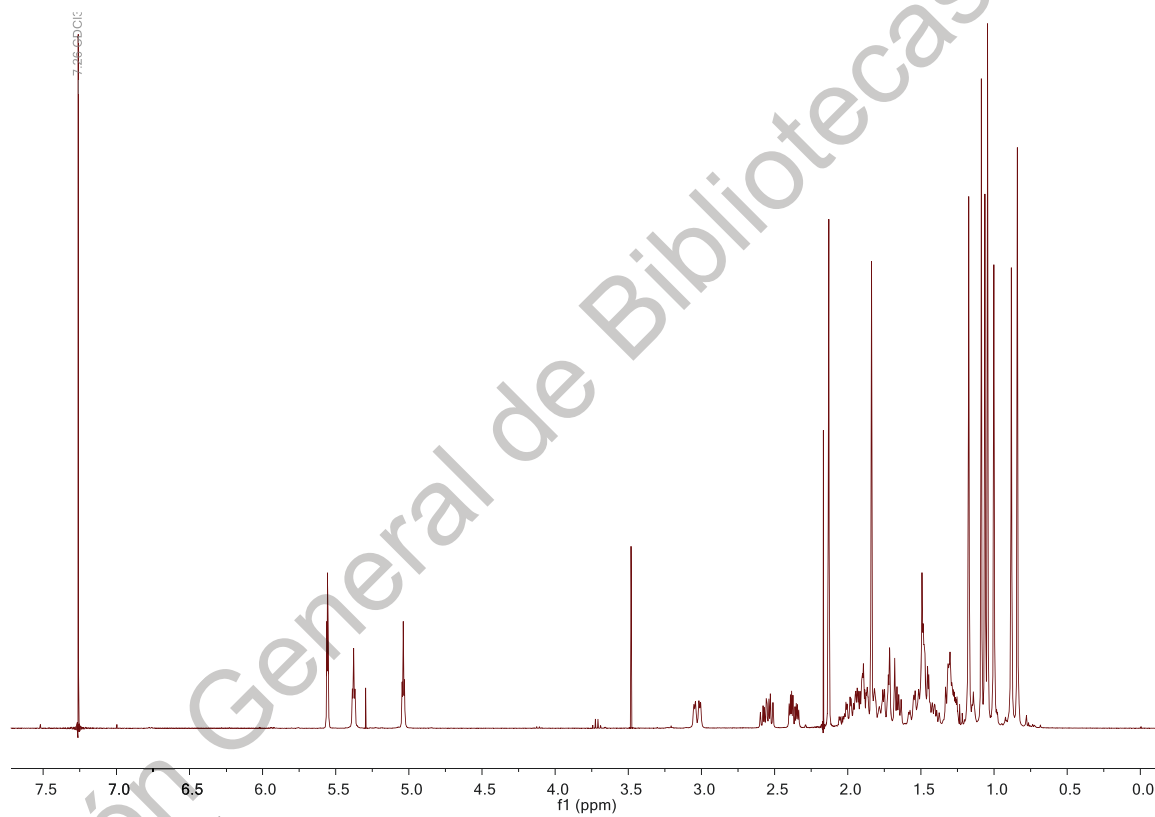


Espectro HSQC del ácido camárico (9).

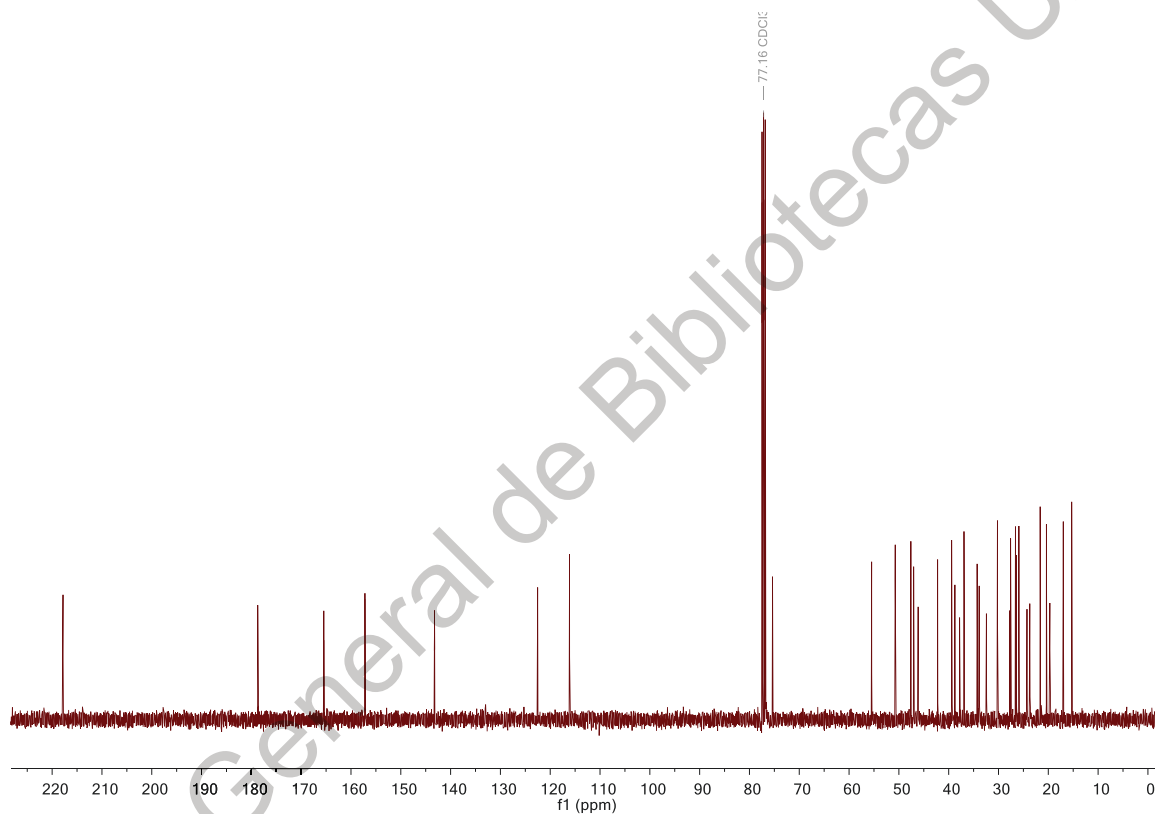


Espectro HMBC del ácido camárico (9).

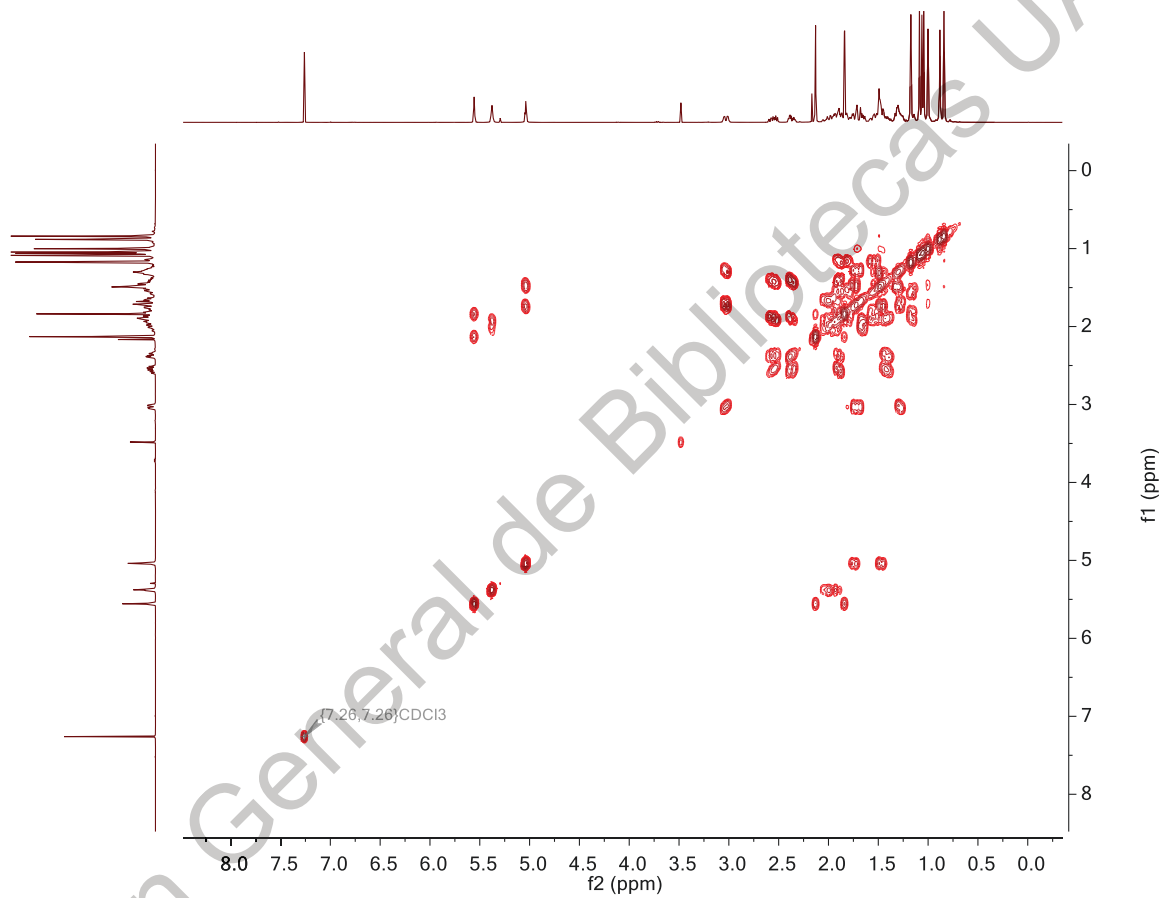
ANEXO IV. Espectros de RMN del lantadeno B (10)

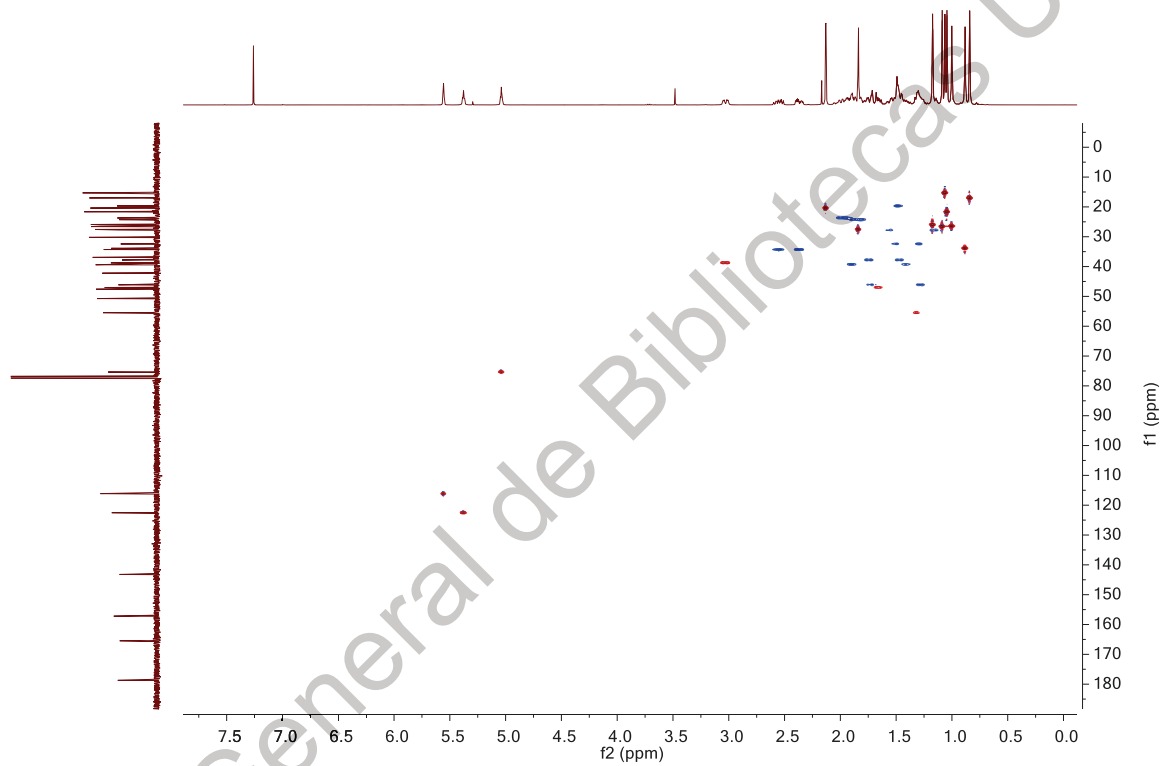


Espectro <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, cloroformo-*d*, 298 K) del lantadeno B (10).

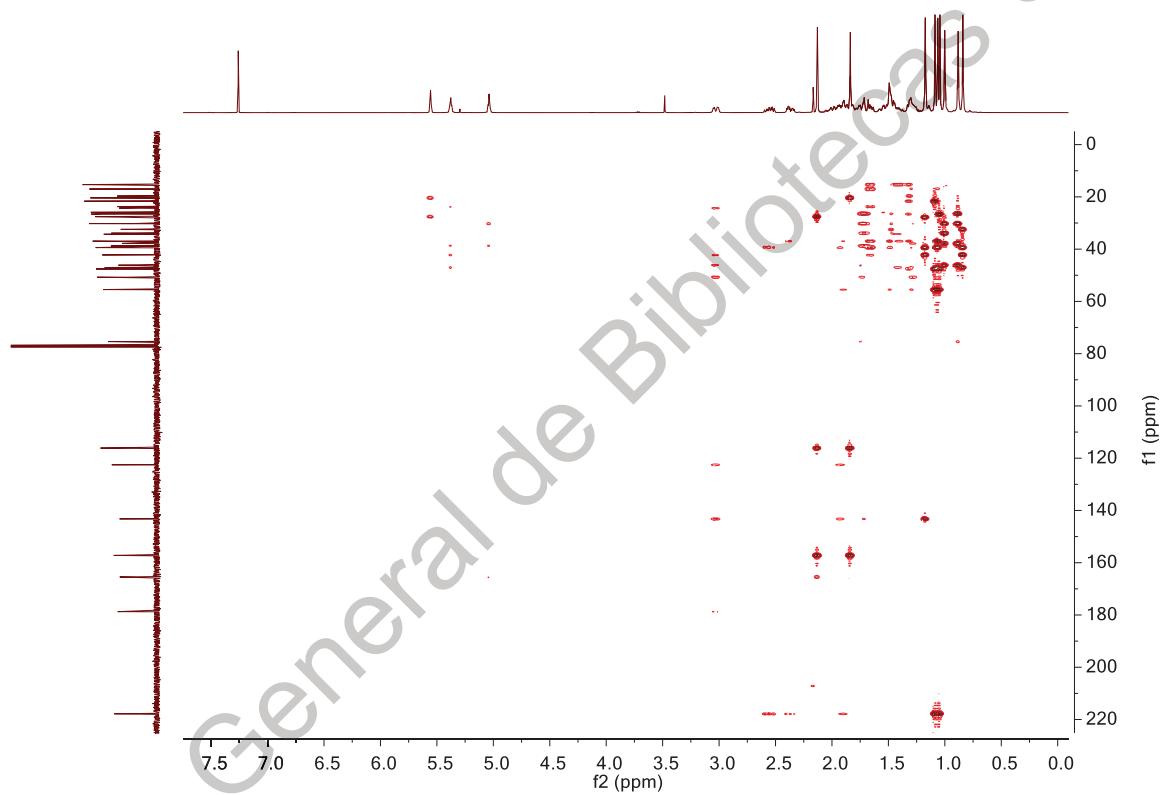


Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (175 MHz, cloroformo-*d*, 298 K) del lantadeno B (**10**).



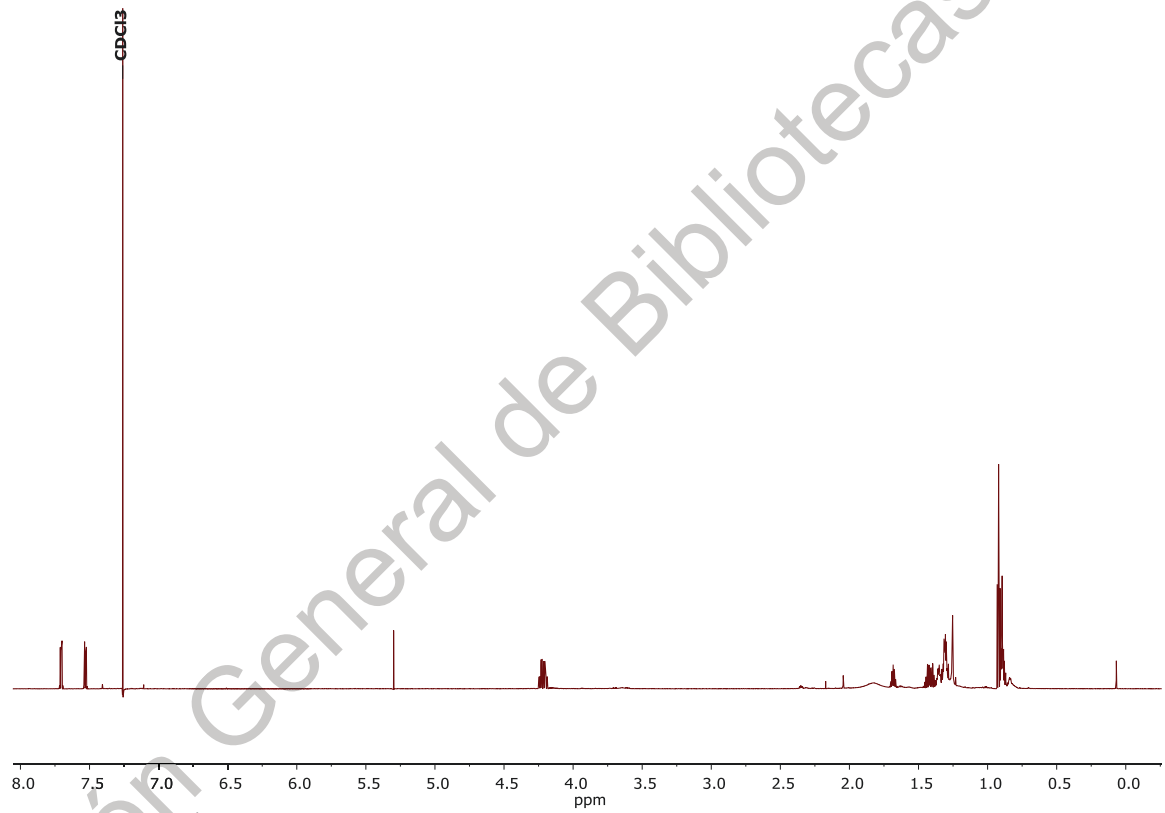


Espectro HSQC del lantadeno B (10).



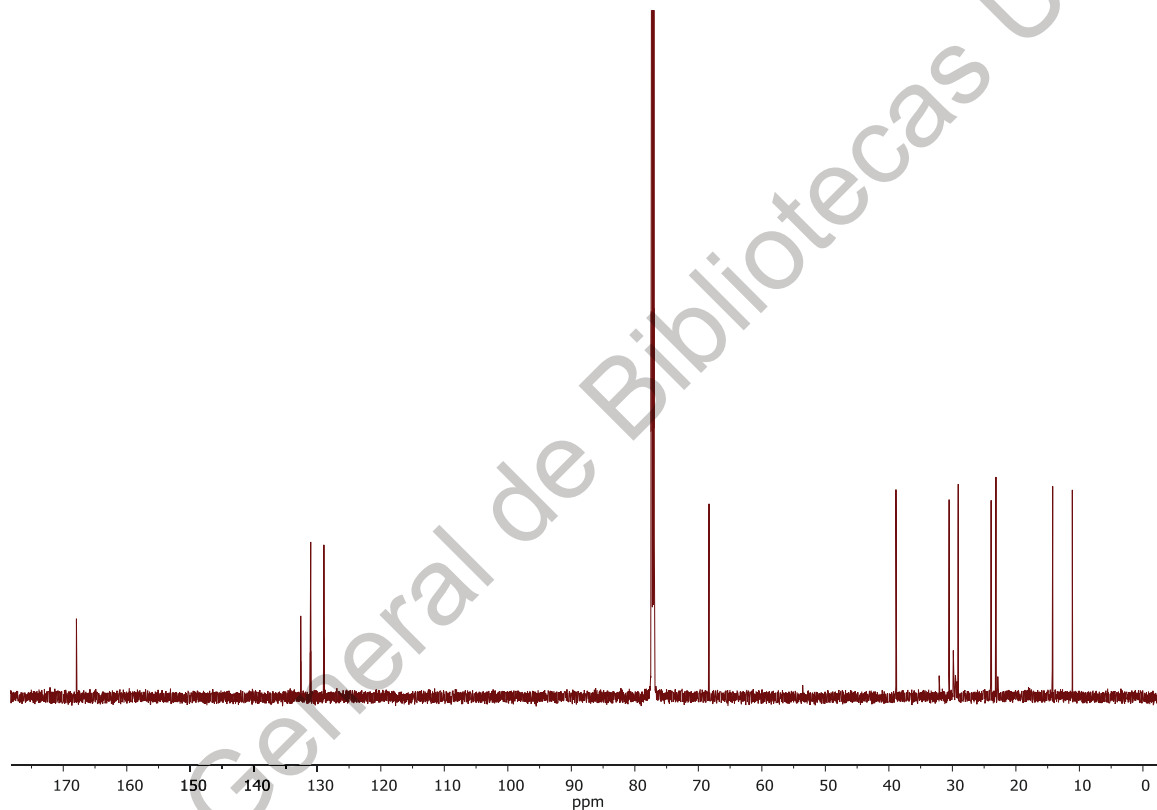
Espectro HMBC del lantadeno B (10).

ANEXO V. Espectros de RMN del bis(2-etilhexil)ftalato

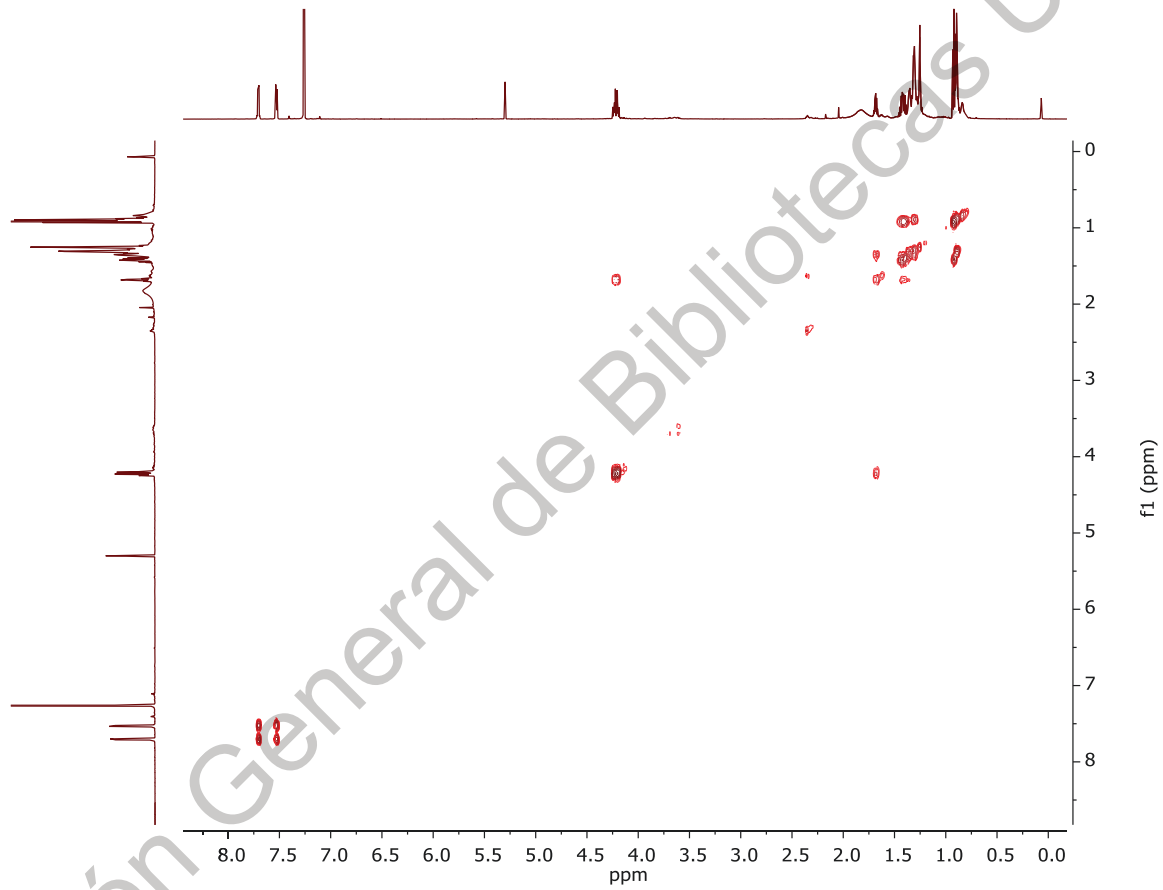


Espectro <sup>1</sup>H-RMN (700 MHz, cloroformo-*d*, 298 K) del bis(2-etilhexil)ftalato.

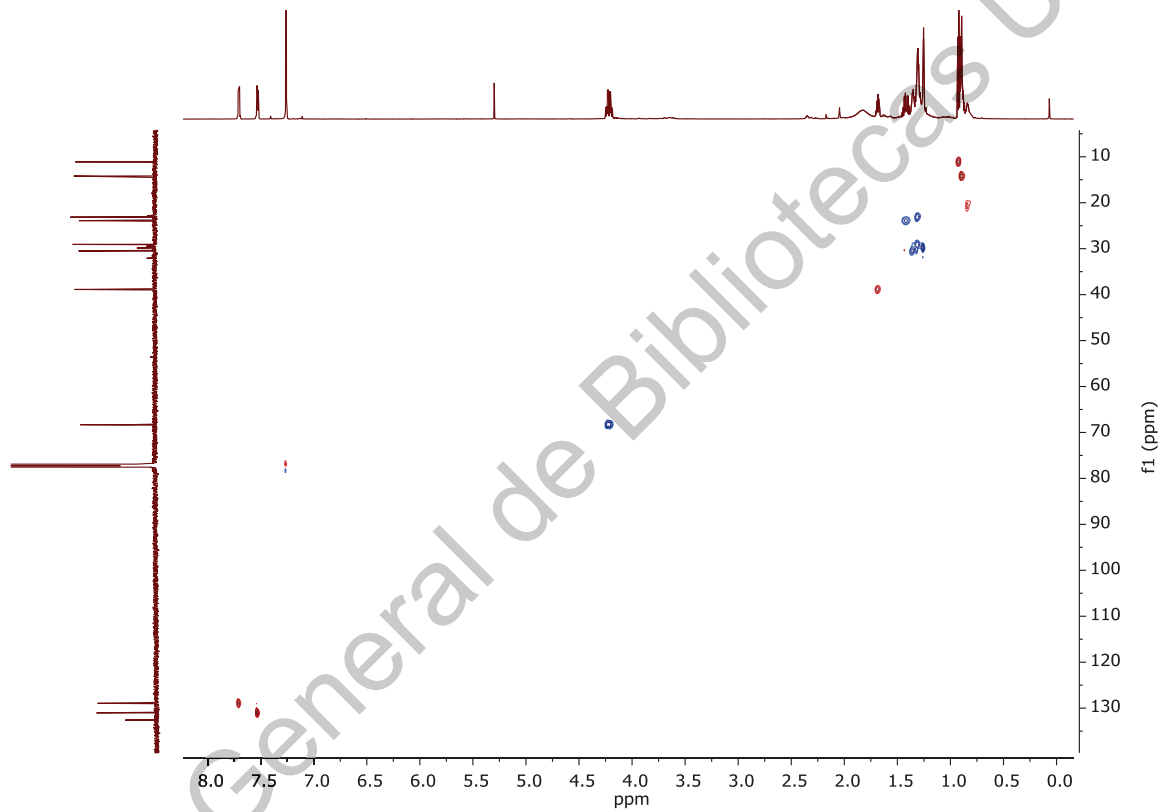




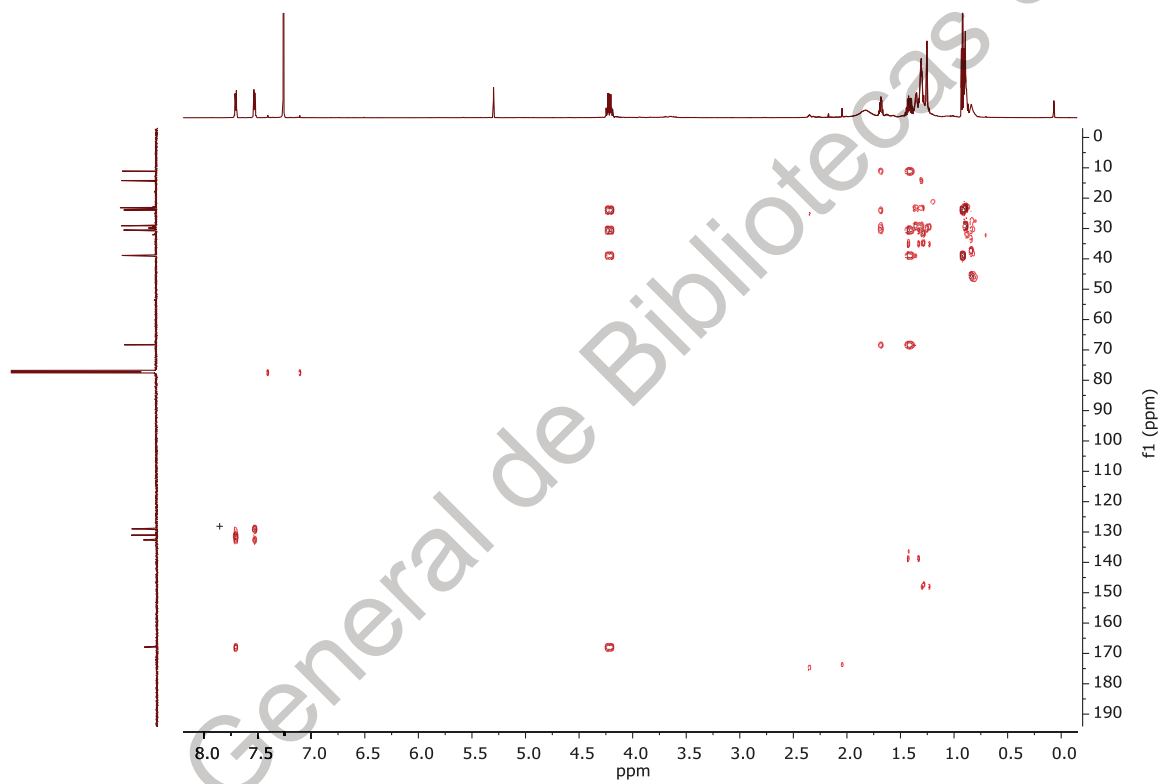
Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN (175 MHz, cloroformo-*d*, 298 K) del bis(2-etilhexil)ftalato.



Espectro COSY del bis(2-etilhexil)ftalato.

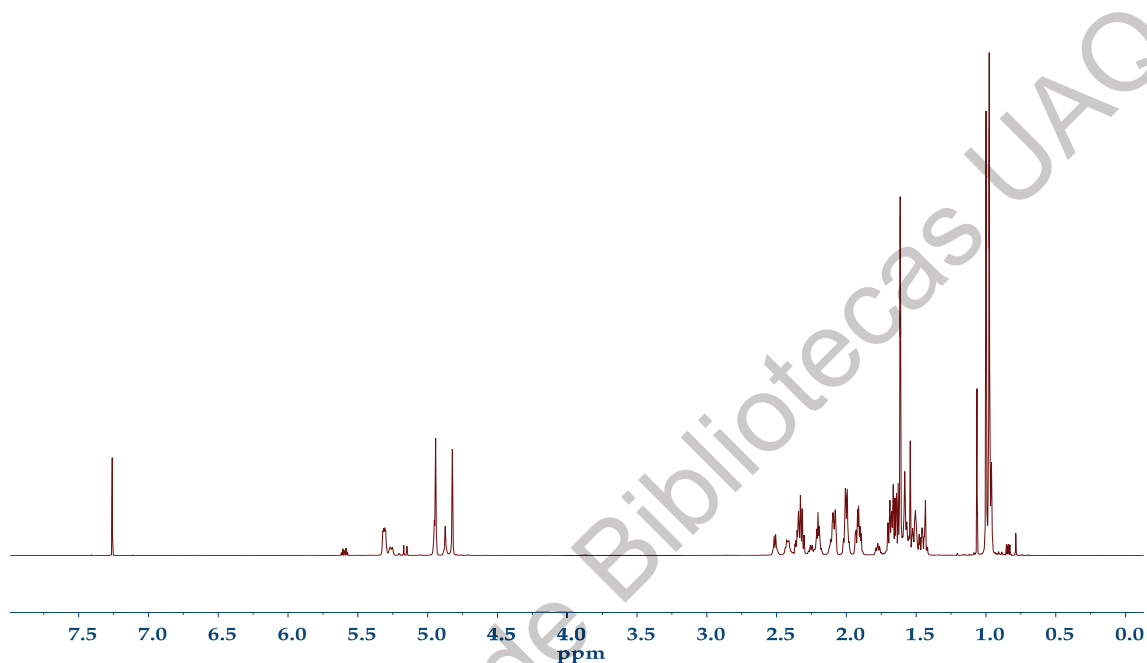


Espectro HSQC del bis(2-etilhexil)ftalato.

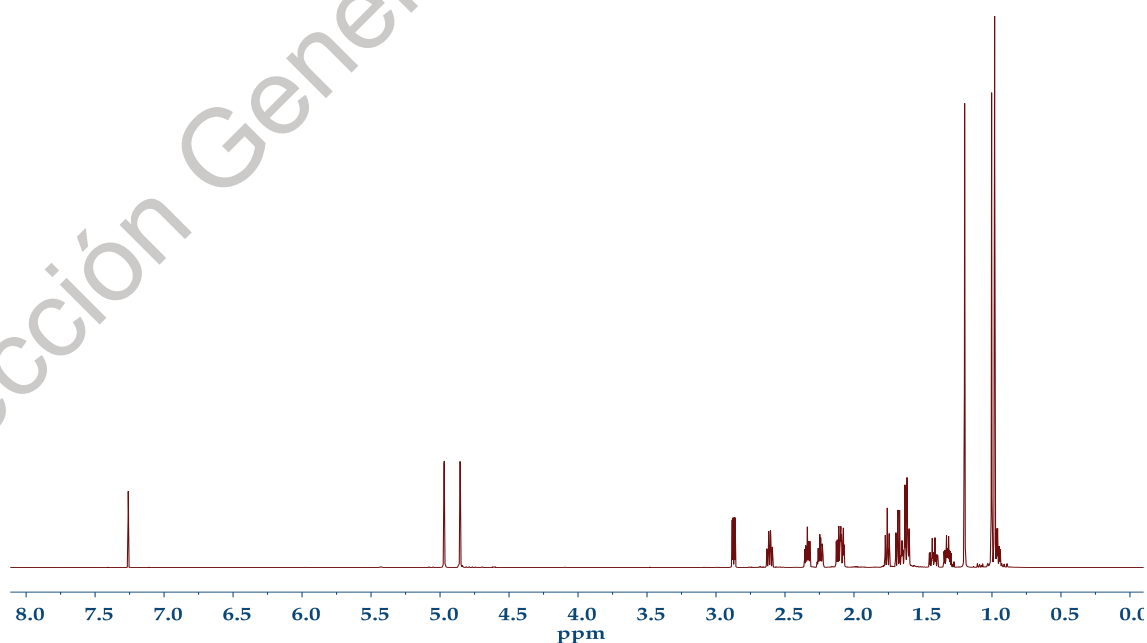


Espectro HMBC del bis(2-etilhexil)ftalato.

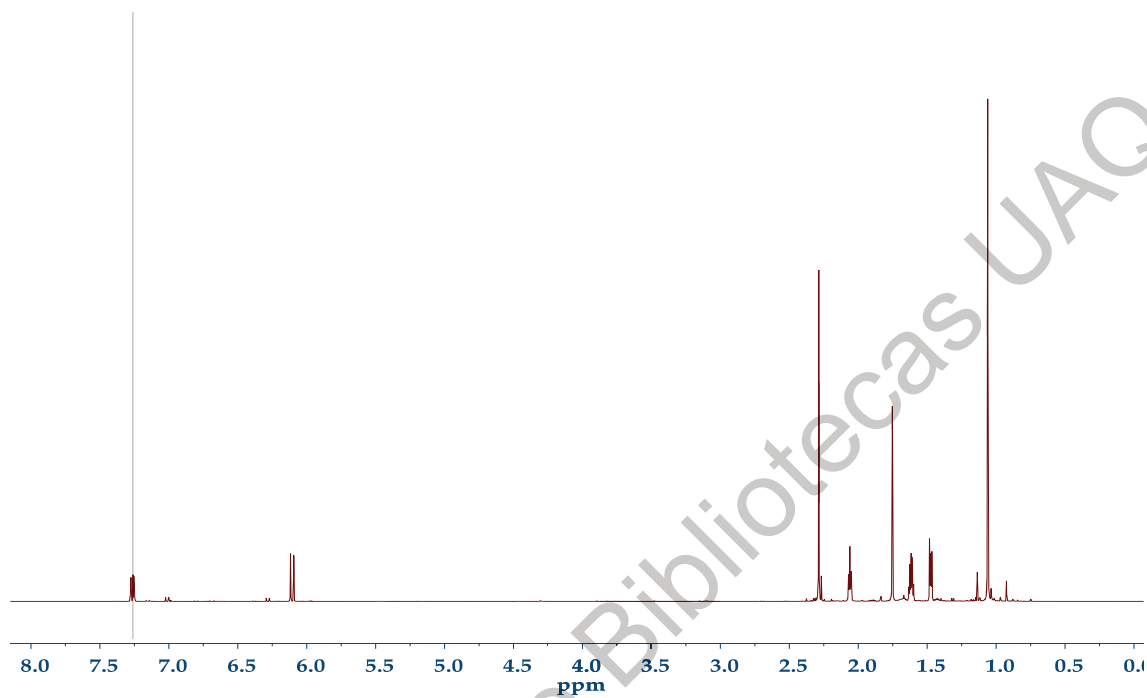
**ANEXO VI. Espectros protónicos de los estándares identificados en las fracciones activas de *L. camara***



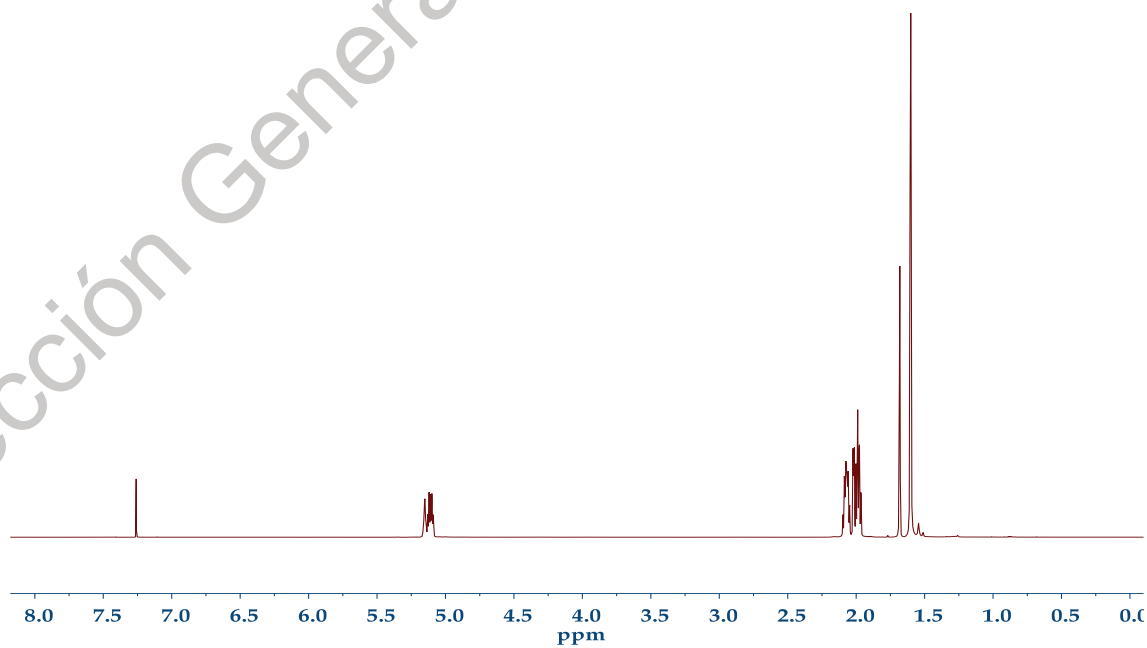
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del  $\beta$ -cariofileno.



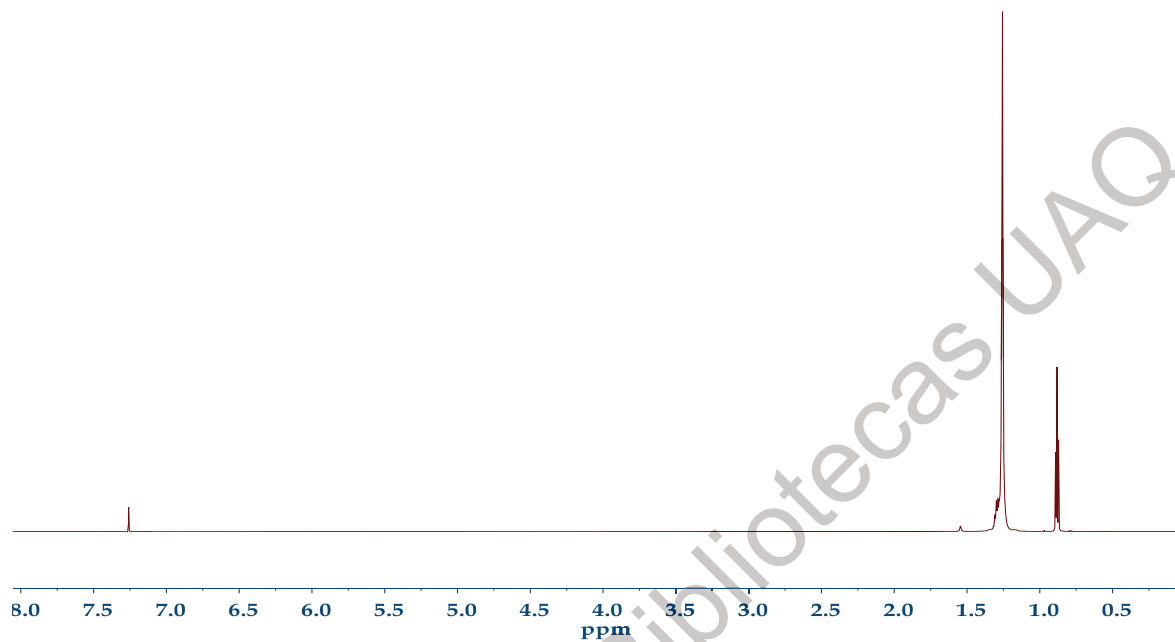
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del óxido de cariofileno.



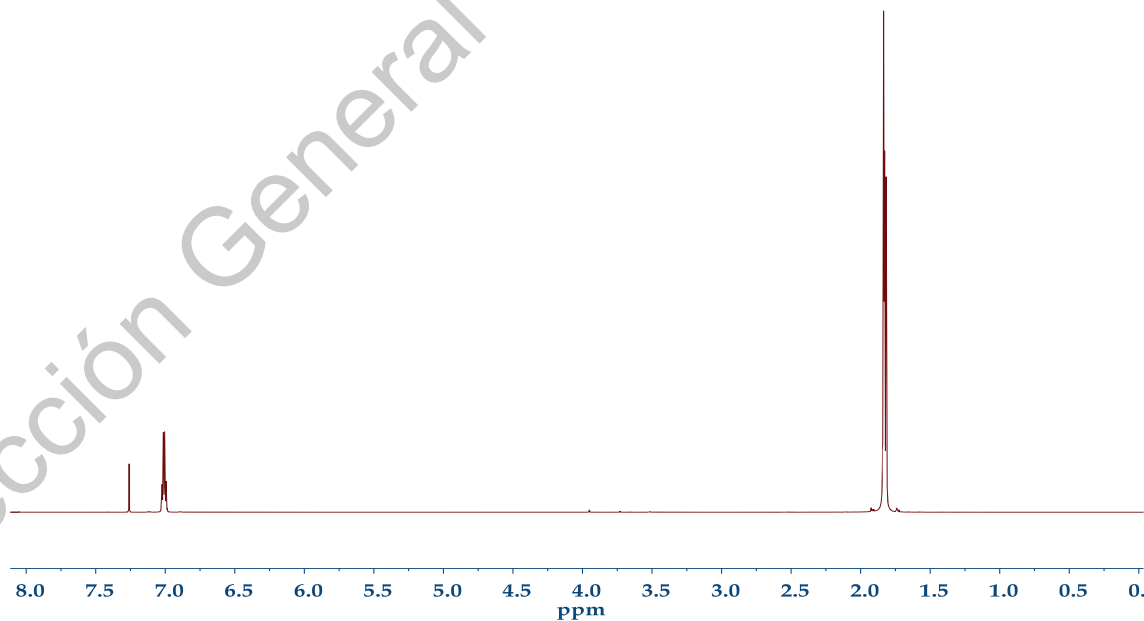
Espectro <sup>1</sup>H-RMN de la β-ionona .



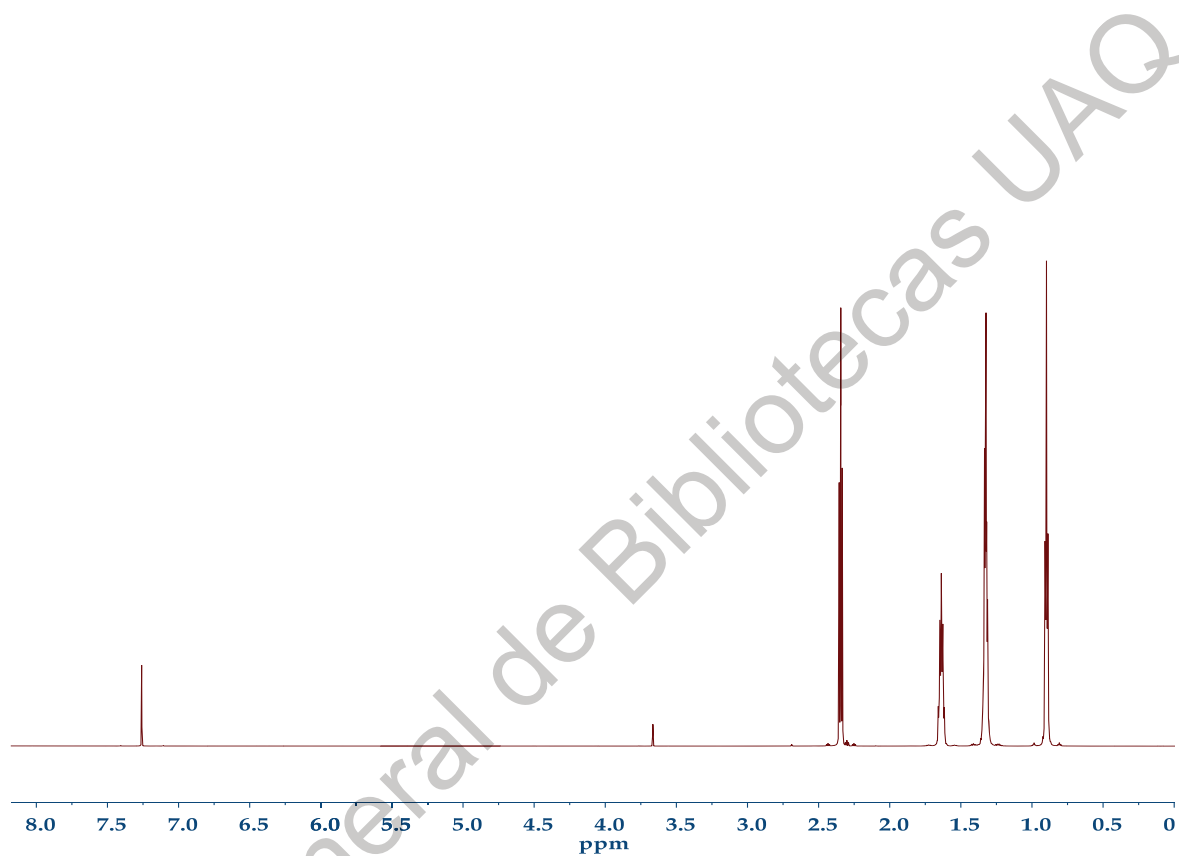
Espectro <sup>1</sup>H-RMN del escualeno.



Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del eicosano.



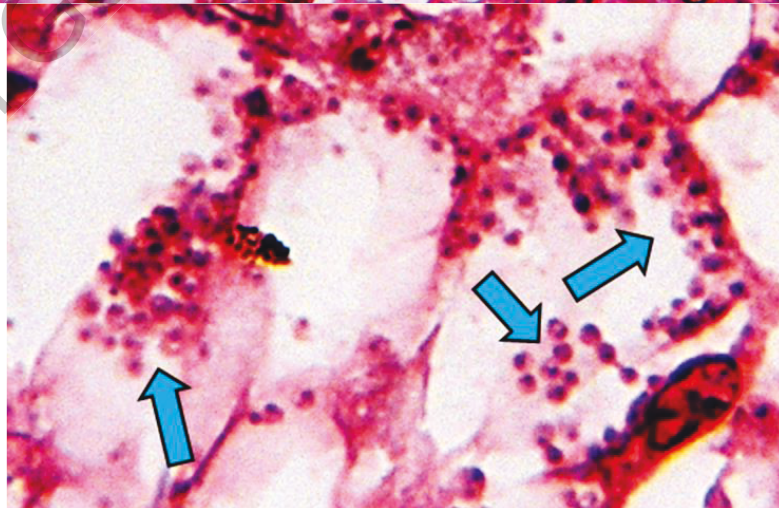
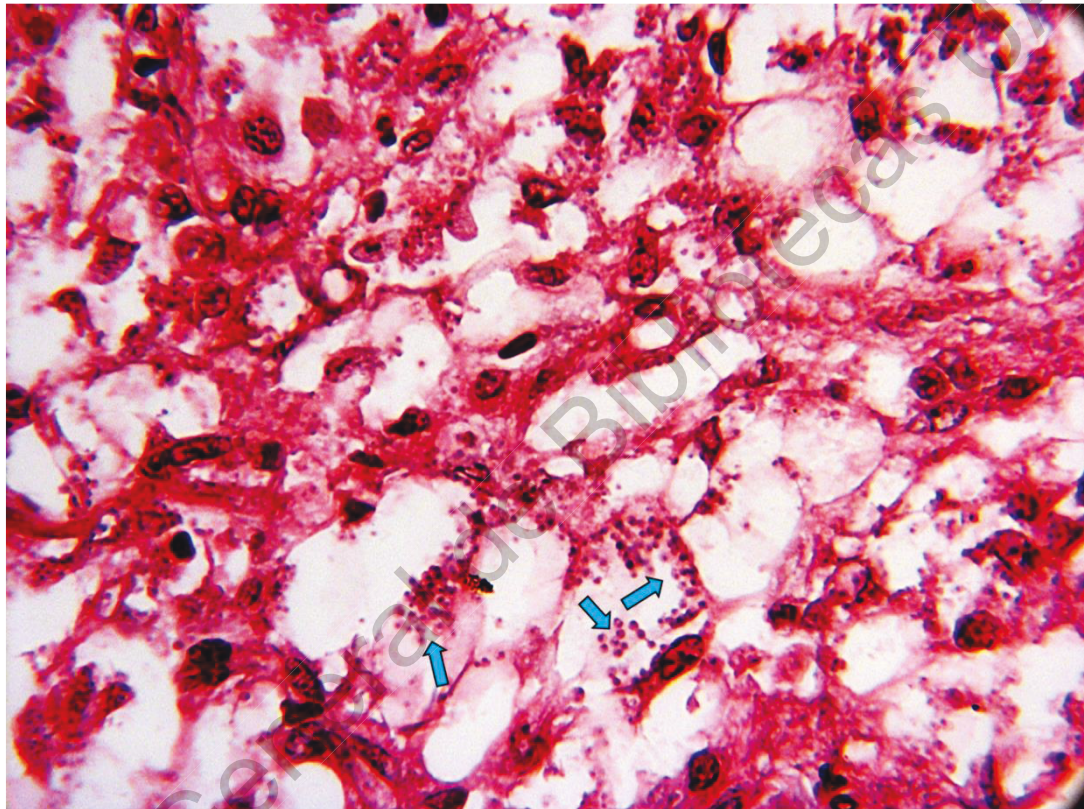
Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del ácido tíglico



Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del ácido hexanoico.

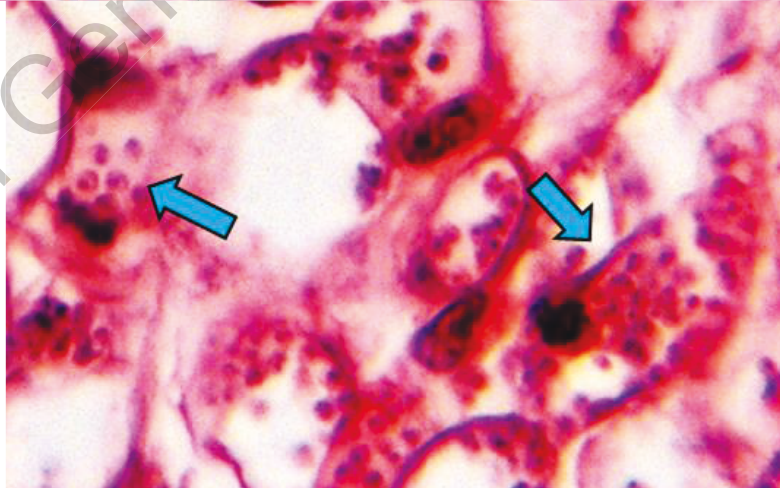
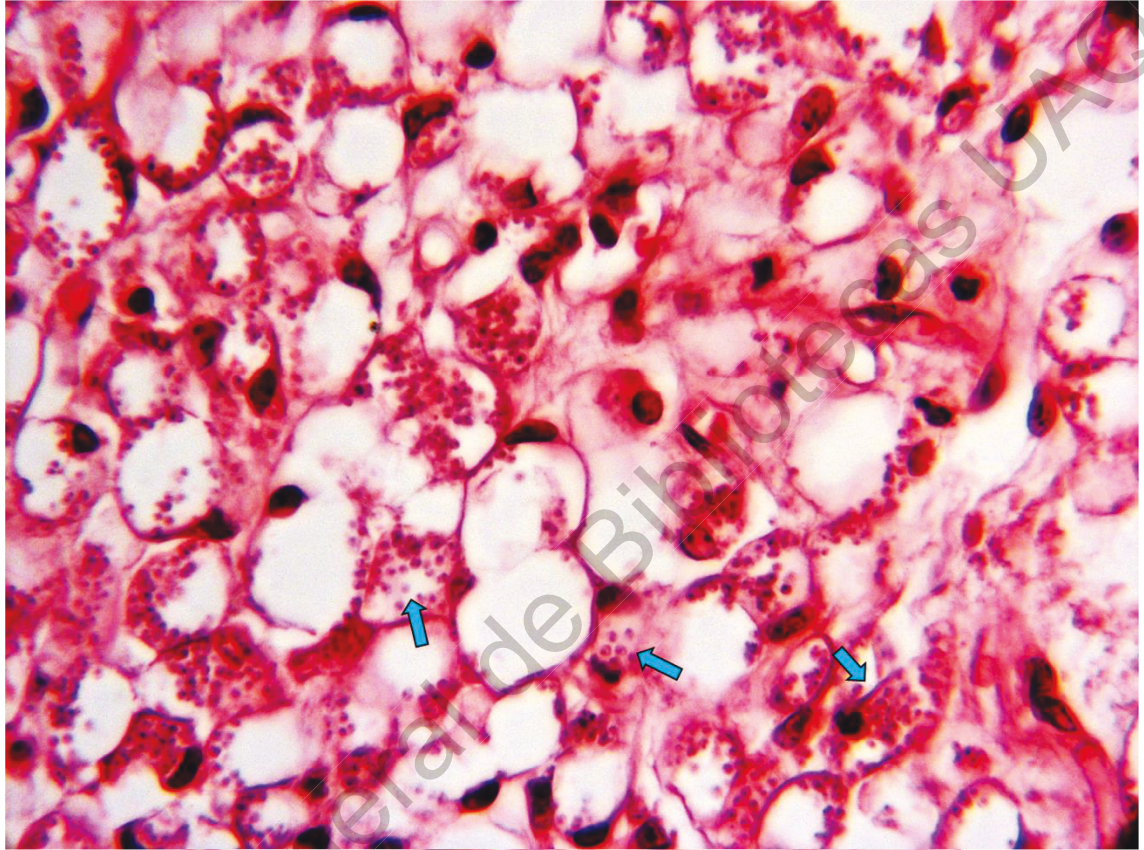


ANEXO VII. Fotografías representativas de los cortes histopatológicos de los cojinetes plantares de ratones BALB/ infectados con *Leishmania mexicana* ( $1 \times 10^6$  parásitos) tras 5 semanas de tratamiento. Cada fotografía es representativa en morfología y número de parásitos, de acuerdo al promedio para cada grupo. Las flechas azules señalan a los amastigotes intracelulares de *Leishmania mexicana*



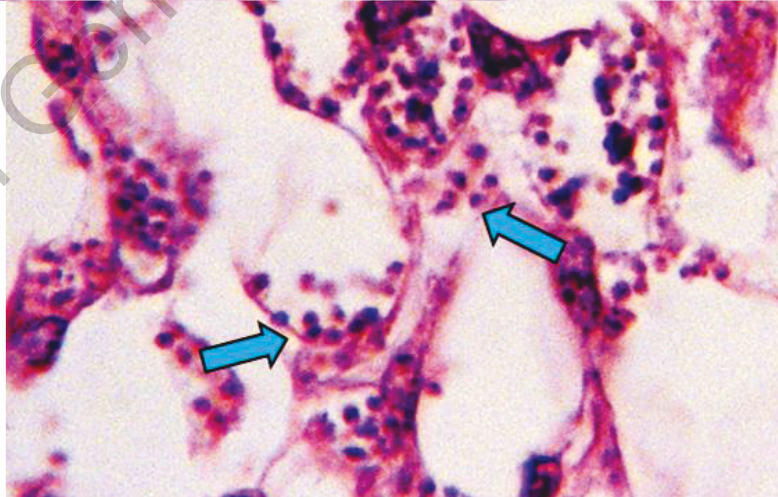
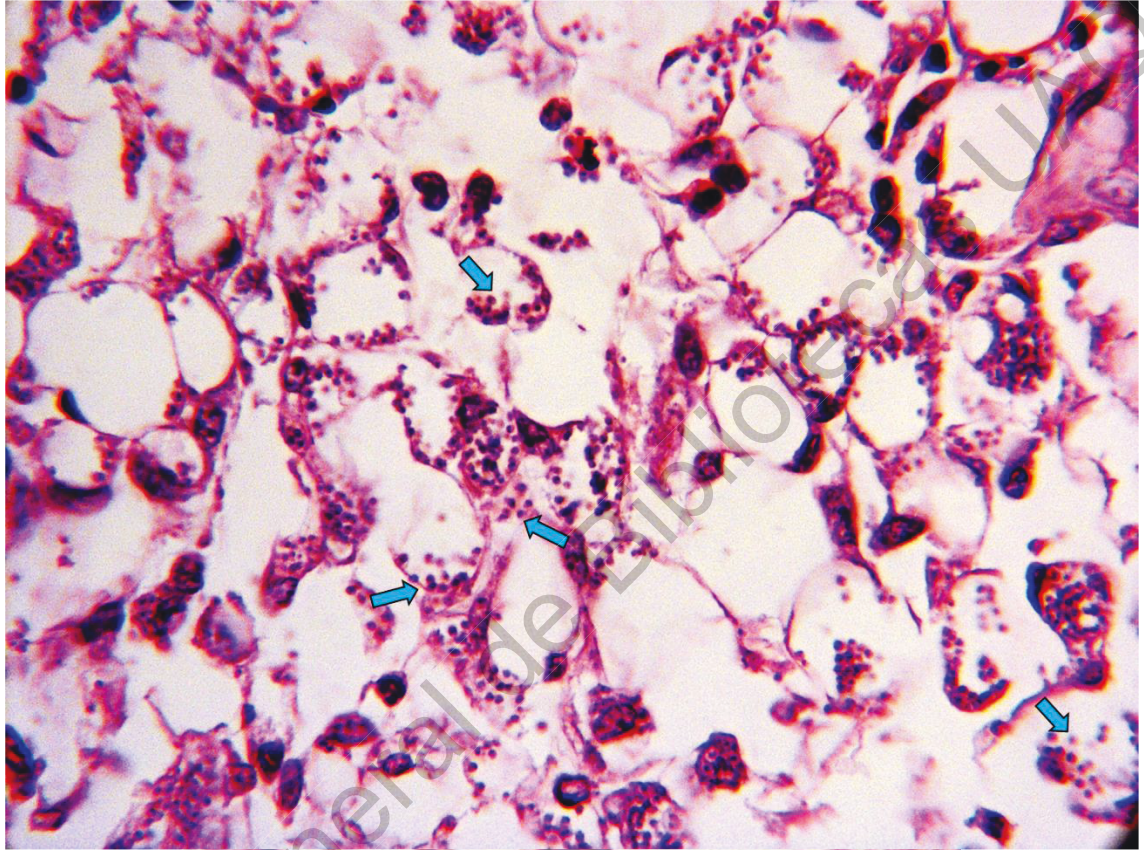
Grupo 1: Control sin tratamiento





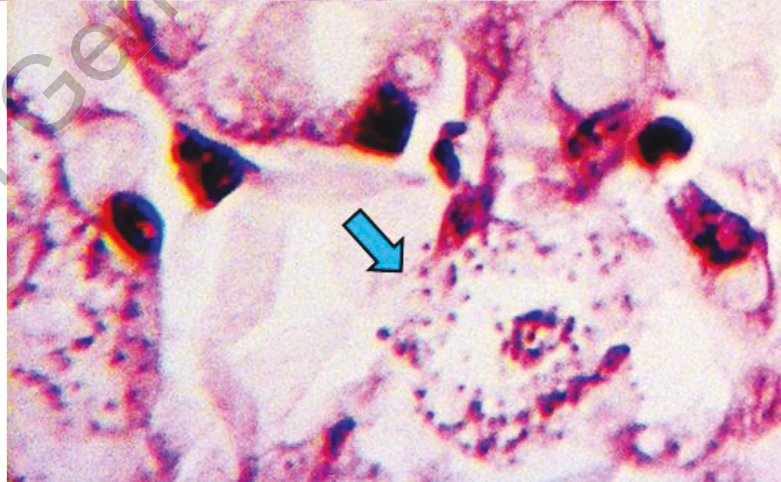
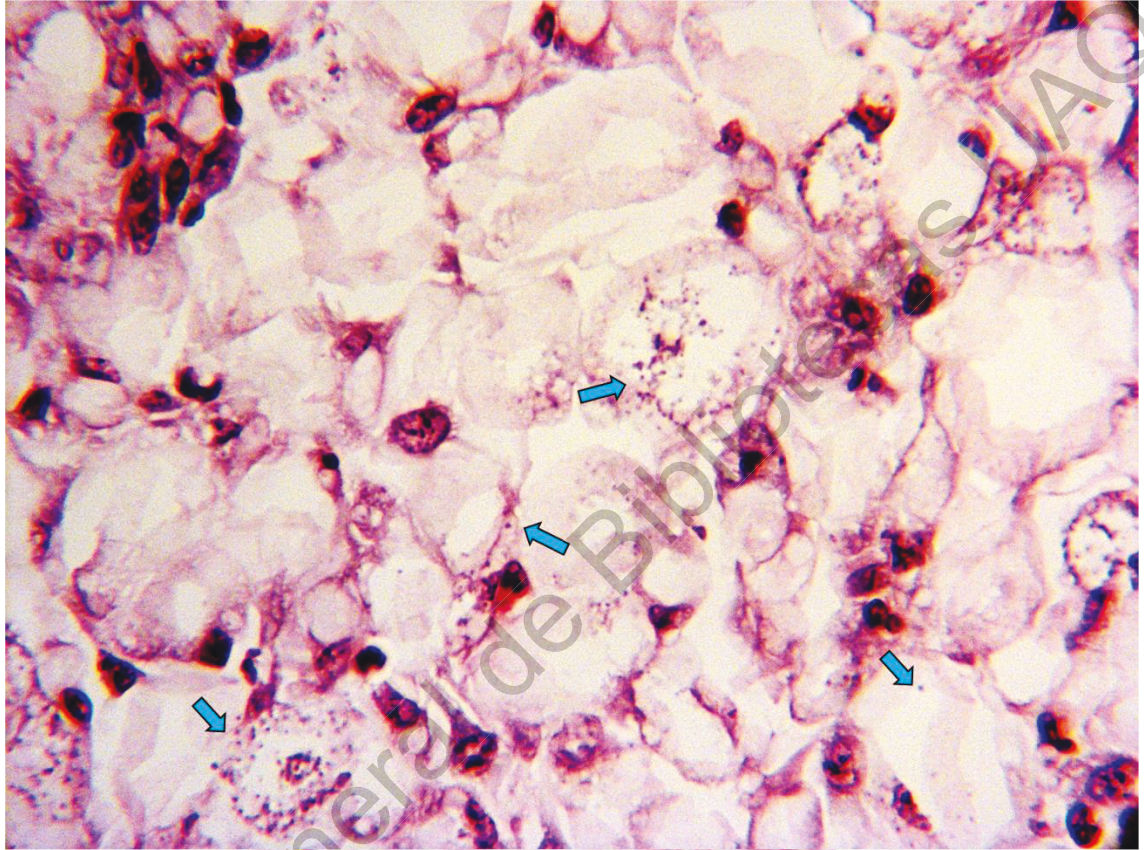
Grupo 2: Vehículo 1





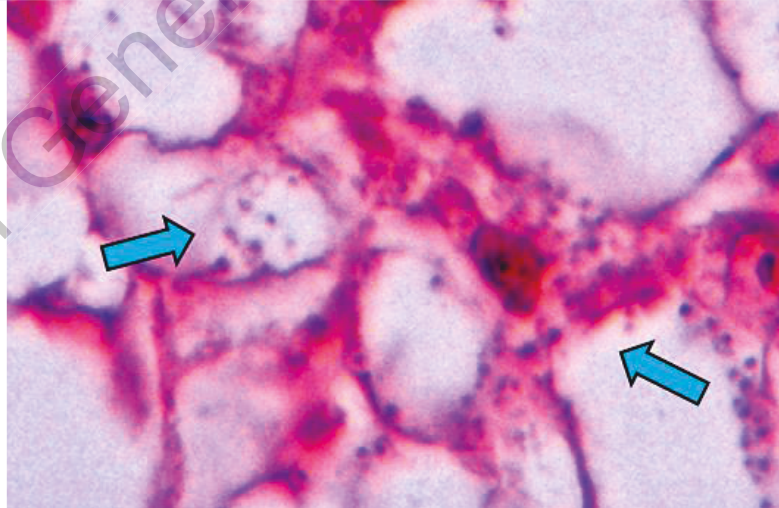
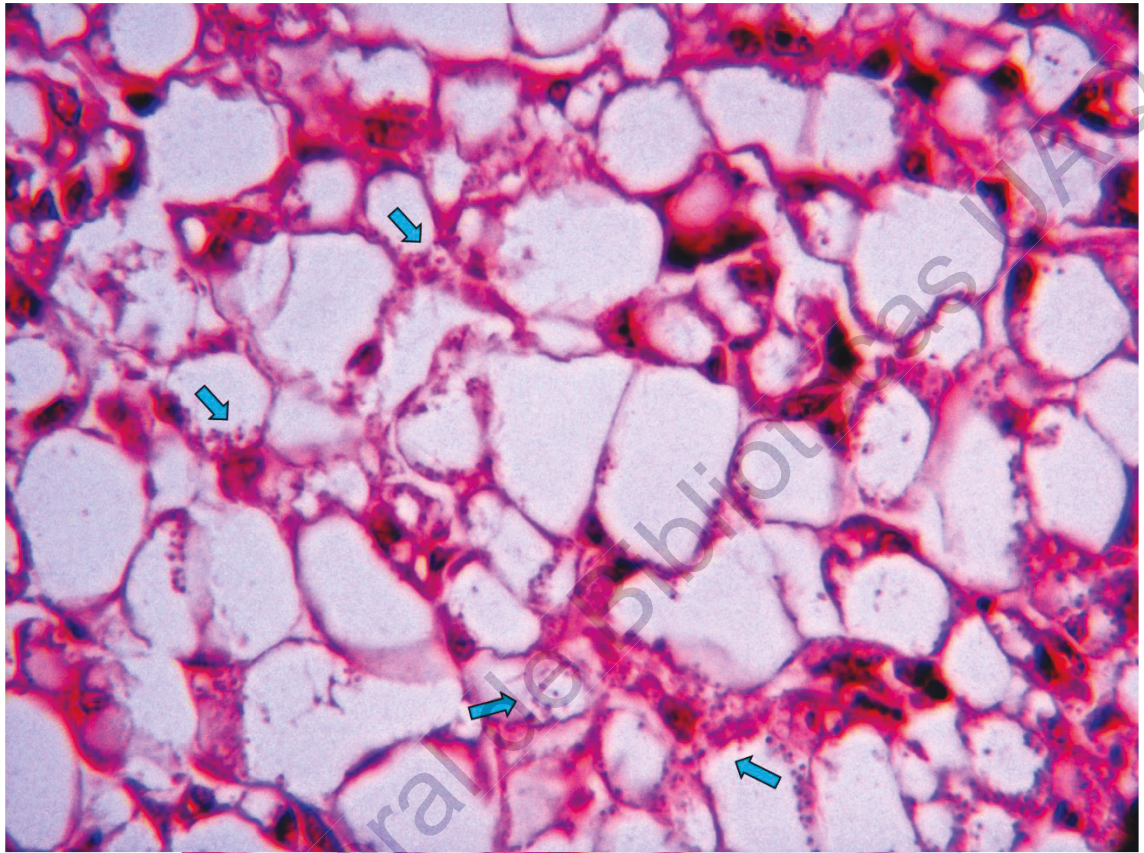
Grupo 4: Marzo 2014, 3 mg/20  $\mu$ L vehiculo 1



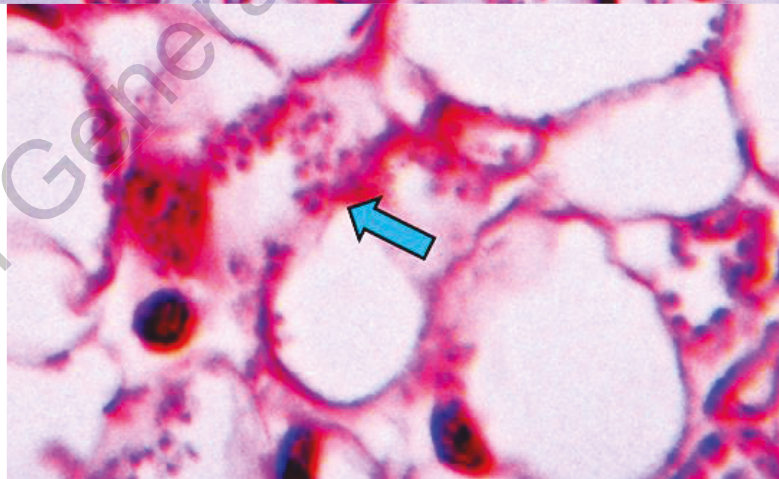
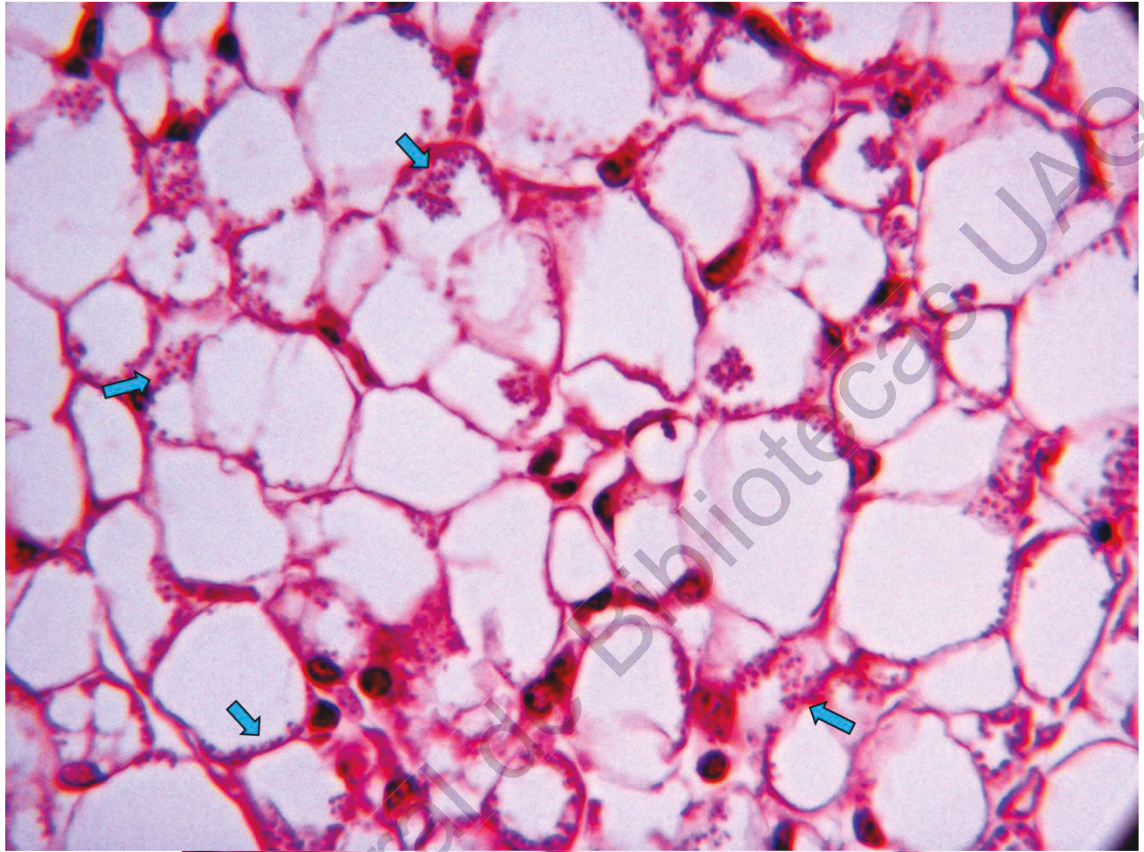


Grupo 7: Septiembre 2015



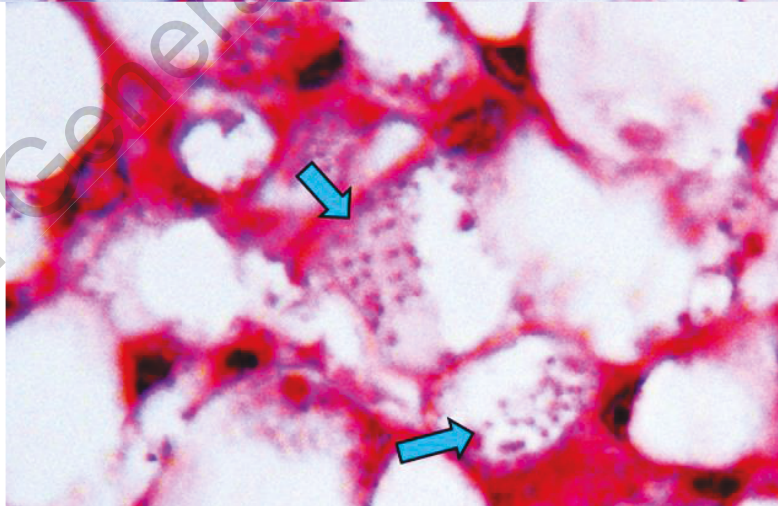
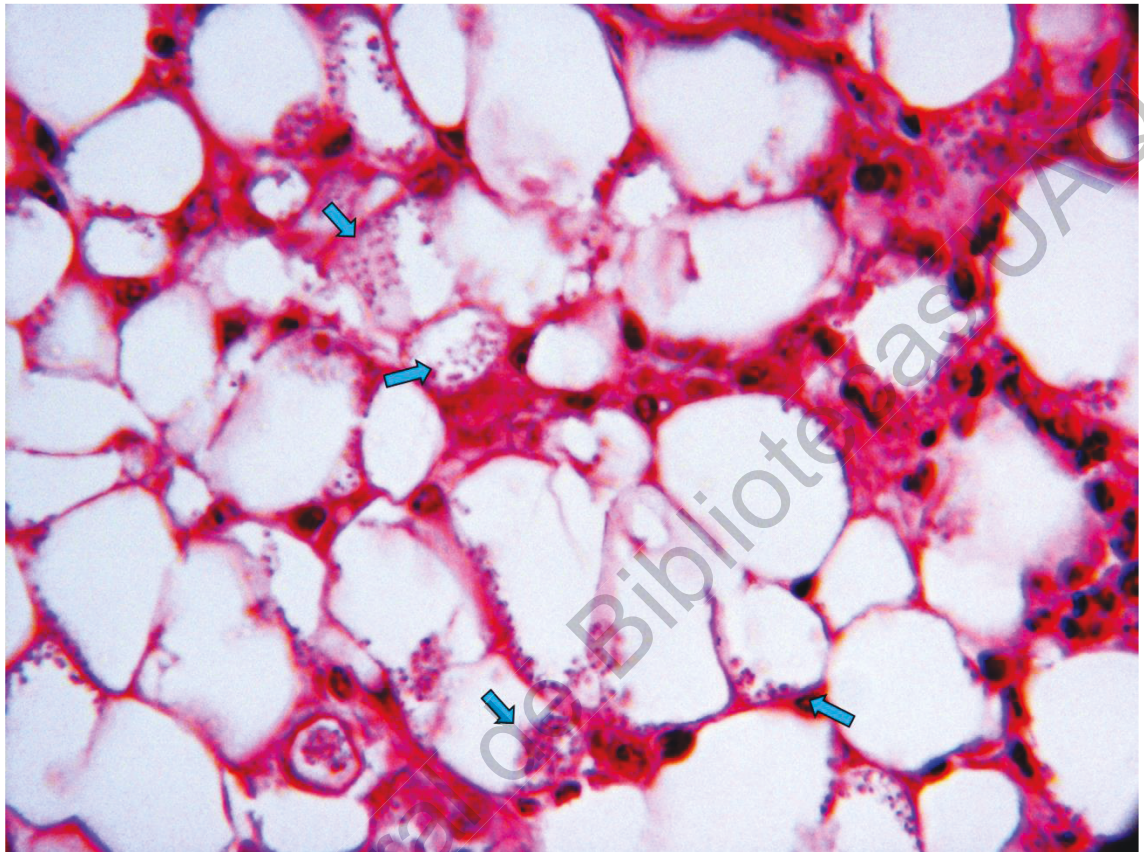


Grupo 8:  $\beta$ -cariofileno

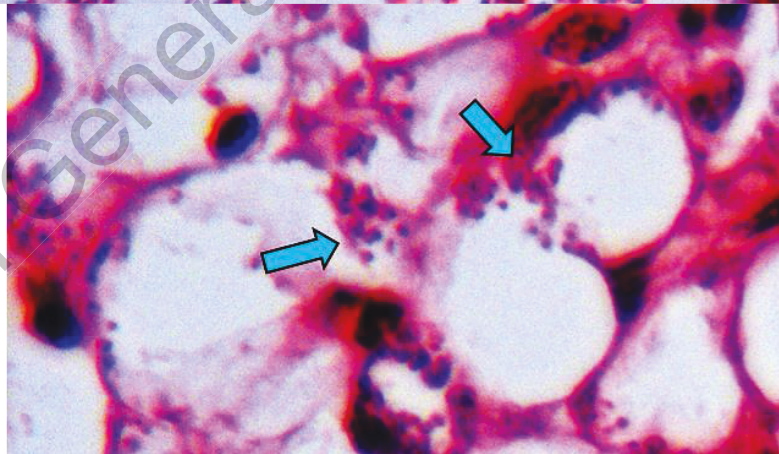
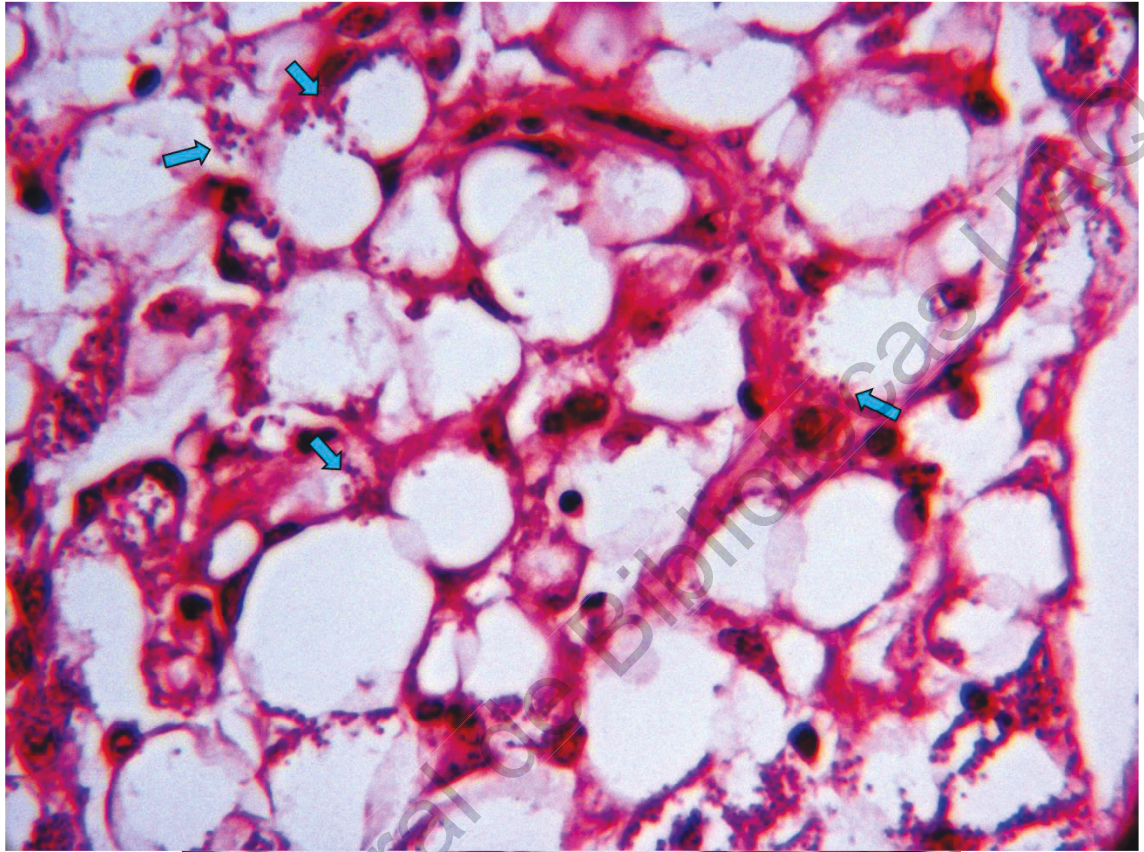


Grupo 9: Óxido de cariofileno



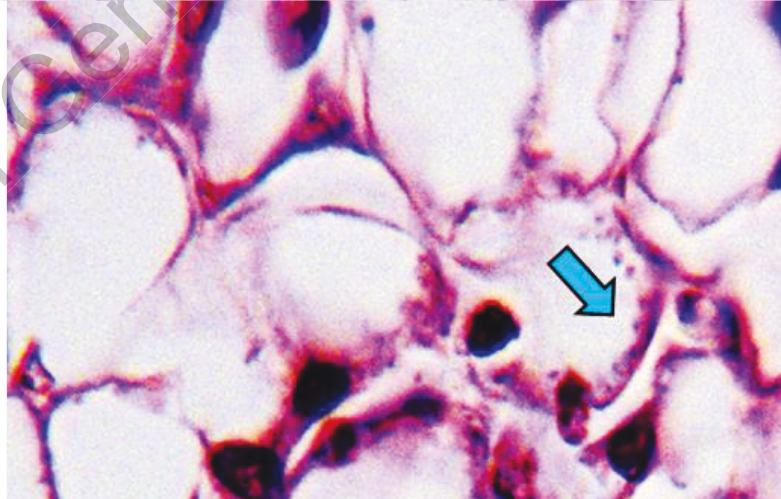
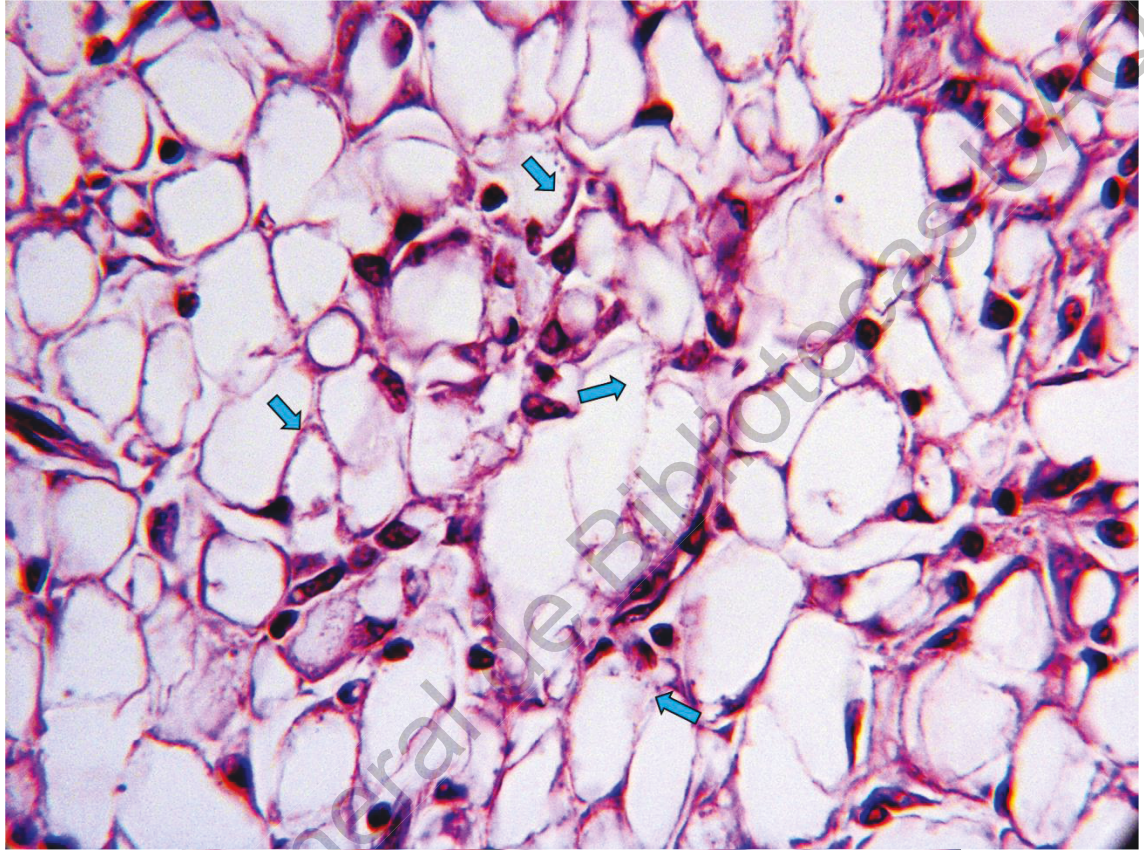


Grupo 10:  $\beta$ -ionona



Grupo 11: Escualeno





Grupo 12: Ácido lantanílico + ácido camárico (79:21)

## BIBLIOGRAFÍA

- Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votýpka, P. Marty, P. Delaunay, and D. Sereno. 2016. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS Negl. Trop. Dis. 10:1–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Alexander, J., and K. Bryson. 2005. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol. Lett. 99:17–23.
- Alitonou, G., F. Avlessi, I. Bokossa, E. Ahoussi, J. Dangou, and D. C. K. Sohounhloué. 2004. Composition chimique et activités biologiques de l'huile essentielle de *Lantana camara* Linn. Comptes Rendus Chim. 7:1101–1105. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631074804002036>
- Baroty, G. S. El, H. M. Goda, E. A. Khalifa, and H. H. Abd El Baky. 2014. Antimicrobial and antioxidant activities of leaves and flowers essential oils of Egyptian *Lantana camara* L. Der Pharma Chem. 6:246–255.
- Begum, S., A. Ayub, S. Q. Zehra, B. S. Siddiqui, M. I. Choudhary, and B. Sciences. 2014. Leishmanicidal triterpenes from *Lantana camara*. Chem. Biodivers. 11:709–718.
- Begum, S., S. Q. Zehra, B. S. Siddiqui, S. Fayyaz, and M. Ramzan. 2008. Pentacyclic triterpenoids from the aerial parts of *Lantana camara* and their nematocidal activity. Chem. Biodivers. 5:1856–1866.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2019. *Lantana camara* (L.): Ethnomedical uses in Mexico. :1. Available from: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=753>
- 1
- Bocedi, A., K. F. Dawood, R. Fabrini, G. Federici, L. Gradoni, J. Z. Pedersen, and G. Ricci. 2010. Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites.

den Boer, M., D. Argaw, J. Jannin, and J. Alvar. 2011. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:1471–1477.

Camacho, M. D. R., R. Mata, P. Castaneda, G. C. Kirby, D. C. Warhurst, S. L. Croft, and J. D. Phillipson. 2000. Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Med.* 66:463–468.

Chan, S. S. K., S. L. Li, and G. Lin. 2007. Pitfalls of the selection of chemical markers for the quality control of medicinal herbs. *J. Food Drug Anal.* 15:365–371.

Cos, P., A. J. Vlietinck, D. Vanden, and L. Maes. 2006. Anti-infective potential of natural products : How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept.' 106:290–302.

Das, A., J. J. Jawed, M. C. Das, P. Sandhu, U. C. De, B. Dinda, Y. Akhter, and S. Bhattacharjee. 2017. Antileishmanial and immunomodulatory activity of lupeol a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50:512–522. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.022>

Delgado-Altamirano, R. 2015. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana como fuentes de compuestos prototipo para el desarrollo de fármacos con actividad leishmanicida. Tesis de Maestría. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.

Delgado-Altamirano, R., R. I. López-Palma, L. Monzote, J. Delgado-Domínguez, I. Becker, J. F. Rivero-Cruz, N. Esturau-Escofet, P. A. Vázquez-Landaverde, and A. Rojas-Molina. 2019a. Chemical constituents with leishmanicidal activity from a pink-yellow cultivar of *Lantana camara* var. *aculeata* (L.) collected in central Mexico. *Int. J. Mol. Sci.* 20:1–17.

Delgado-Altamirano, R., L. Monzote, A. Piñón-Tápanes, H. Vibrans, J. F. Rivero-Cruz, C. Ibarra-Alvarado, and A. Rojas-Molina. 2017. *In vitro* antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. *Heliyon* 3:e00394. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844017314457>

Delgado-Altamirano, R., A. Rojas, and N. Esturau-Escofet. 2019b. 1H and 13C NMR reassignment of some chemical shifts of lantanilic acid and camaric acid. *Magn. Reson. Chem.* 57:320–325.

Dewick, P. M. 2009. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 3rd ed. John Wiley and Sons, Ltd, Great Britain.

DNDi. 2018. Drugs for Neglected Diseases initiative: Leishmaniasis. Available from: <https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>

Ganguli, P., Saikat Chowdhury, Shomeek Chowdhury, and R. R. Sarkar. 2015. Identification of Th1/Th2 regulatory switch to promote healing response during leishmaniasis: a computational approach. *Eurasip J. Bioinforma. Syst. Biol.* 2015:1–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13637-015-0032-7>

Ghisalberti, E. L. 2000. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia* 71:467–486. Available from: <http://ntbg.org/>

Ghobakhloo, N., M. H. Motazedian, B. Pourmohammadi, and Z. Yousefi. 2017. Evaluation of correlation between the *in vitro* susceptibility of field isolates of *Leishmania major* and clinical outcomes of meglumine antimoniate therapy in fars Province, Iran. *J. Arthropod. Borne. Dis.* 11:132–138.

Gillespie, P. M., C. M. Beaumier, U. Strych, T. Hayward, P. J. Hotez, and M. E. Bottazzi. 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine* 34:2992–2995. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16002966>

Ginouvés, M., S. Simon, M. Nacher, M. Demar, B. Carme, P. Couppié, and G. Prévot. 2017. *In vitro* sensitivity of cutaneous leishmania promastigote isolates circulating in French Guiana to a set of drugs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96:1143–1150.

Gnoatto, S. C. B., L. Vechia Dalla, C. L. Lencina, A. Dasonville-Klimpt, S. Da Nascimento, D. Mossalayi, J. Guillon, G. Gosmann, and P. Sonnet. 2008.



Synthesis and preliminary evaluation of new ursolic and oleanolic acids derivatives as antileishmanial agents. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 23:604–610.

Goad, L. J., G. G. Holz, and D. H. Beach. 1984. Sterols of *Leishmania* species, implications for biosynthesis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 10:161–170.

van Griensven, J., and E. Diro. 2012. Visceral Leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26:309–322. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>

Handler, M. Z., P. A. Patel, R. Kapila, Y. Al-Qubati, and R. A. Schwartz. 2015. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *J. Am. Acad. Dermatol.* 73:897–908. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.08.051>

Innocent, E., C. C. Joseph, N. K. Gikonyo, M. J. Moshi, M. H. H. Nkunya, and A. Hassanali. 2008. Mosquito larvicidal constituents from *Lantana viburnoides* sp *viburnoides* var *kisi* (A . rich) Verdc (Verbenaceae). *J. Vector Borne Dis.:*240–244.

Ishibashi, M., H. Oda, M. Mitamura, E. Okuyama, K. Komiyama, K. Kawaguchi, T. Watanabe, S. de Mello Alves, T. Maekawa, and K. Ohtsuki. 1999. Casein kinase II inhibitors isolated from two Brazilian plants *Hymenaea parvifolia* and *Wulffia baccata*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 9:2157–2160.

Kim, H. K., Y. H. Choi, and R. Verpoorte. 2011. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol.* 29:267–275. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016777991100031X>

Kyriazis, I. D., O. S. Koutsoni, N. Aligiannis, K. Karampetsou, A.-L. Skaltsounis, and E. Dotsika. 2016. The leishmanicidal activity of oleuropein is selectively regulated through inflammation- and oxidative stress-related genes. *Parasit. Vectors* 9:2–16. Available from:

<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1701-4>

Li, S., Q. Han, C. Qiao, J. Song, C. Lung Cheng, and H. Xu. 2008. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. *Chin. Med.* 3:7.

Machado, R. R. P., W. V. Júnior, E. S. Coimbra, N. B. De Souza, G. L. G. Soares,

and M. A. C. 2010. Essential oil from leaves of *Lantana camara*: a potential source of medicine against leishmaniasis. *Brazilian J. Pharmacogn.* 22:1011–1017.

Mahmoudvand, H., F. Kheirandish, S. R. Mirbadie, M. H. Kayedi, T. Rezaei Riabi, A. A. Ghasemi, M. Bamorovat, and I. Sharifi. 2017. The potential use of methotrexate in the treatment of cutaneous leishmaniasis: *In Vitro* assays against sensitive and meglumine antimoniate-resistant strains of *Leishmania tropica*. *Iran J. Parasitol.* 12:339–347.

Markley, J. L., R. Brüschweiler, A. S. Edison, H. R. Eghbalnia, R. Powers, D. Raftery, and D. S. Wishart. 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 43:34–40.

Martín-Montes, Á., D. Plano, R. Martín-Escolano, V. Alcolea, M. Díaz, S. Pérez-Silanes, S. Espuelas, E. Moreno, C. Marín, R. Gutiérrez-Sánchez, C. Sanmartín, and M. Sánchez-Moreno. 2017. Library of seleno-compounds as novel agents against *Leishmania* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61:1–13.

McCall, L.-I., A. El-Aroussi, J. Yong Choi, D. F. Vieira, G. De Muylder, J. B. Johnston, S. Chen, D. Kellar, J. L. Siqueira-Neto, W. R. Roush, L. M. Podust, and J. H. McKerrow. 2015. Targeting ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: Essentiality of sterol 14 $\alpha$ -demethylase. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:1–17.

Mears, E. R., F. Modabber, R. Don, and G. E. Johnson. 2015. A Review: The Current *In Vivo* Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:1–23.

Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, J. Michelle, A. M. Hill, M.-M.- Macrophages, T. Paradigm, C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, and A. M. Hill. 2019. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm.

Misra, L., and H. Laatsch. 2000. Triterpenoids, essential oil and photo-oxidative 28 ??? 13-lactonization of oleanolic acid from *Lantana camara*. *Phytochemistry* 54:969–974.

Mohamed, N. M., M. A. Makboul, S. F. Farag, S. Jain, M. R. Jacob, B. L. Tekwani, and S. A. Ross. 2016. Triterpenes from the roots of *Lantana montevidensis* with antiprotozoal activity. *Phytochem. Lett.* 15:30–36. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2015.11.008>

Monzote, L. 2009. Current treatment of leishmaniasis: a review. *Open Antimicrob Agents J* 1:9–19. Available from:

<http://ftp.benthamscience.com/open/toantimj/articles/V001/9TOANTIMJ.pdf>

Monzote, L., M. García, J. Pastor, L. Gil, R. Scull, L. Maes, P. Cos, and L. Gille. 2014a. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. *Exp. Parasitol.* 136:20–26. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.10.007>

Monzote, L., G. Geroldinger, M. Tonner, R. Scull, S. De Sarkar, S. Bergmann, M. Bacher, K. Staniek, M. Chatterjee, T. Rosenau, and L. Gille. 2018. Interaction of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. with mitochondria in *Leishmania* and other eukaryotes. *Phyther. Res.*:1–12.

Monzote, L., J. Pastor, R. Scull, and L. Gille. 2014b. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *Phytomedicine* 21:1048–1052. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2014.03.002>

National Center for Biotechnology Information. 2019. Lantadene B toxicity.

Available from:

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/15560077#section=Non-Human-Toxicity-Excerpts>

Perez-Franco, J. E., M. L. Cruz-Barrera, M. L. Robayo, M. C. Lopez, C. D. Daza, A. Bedoya, M. L. Mariño, C. H. Saavedra, and M. C. Echeverry. 2016. Clinical and parasitological features of patients with american cutaneous leishmaniasis that did



not respond to treatment with meglumine antimoniate. PLoS Negl. Trop. Dis. 10:1–13.

Perrone, J., B. De Menezes, C. Eduardo, S. Guedes, A. Luis, D. O. Almeida, D. Bittencourt, M. Fraga, P. Sampaio, and T. Veras. 2015. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. 2015:15–18.

Qamar, F., S. Begum, S. M. Raza, A. Wahab, B. S. Siddiqui, S. Begum, and S. M. Raza. 2005. Nematicidal natural products from the aerial parts of *Lantana camara* Linn . Nat. Prod. Res. 19:609–613.

Queensland, D. of N. R. and M. of the S. of. 2003. Identification Guide : *Lantana* flowers. :QNRM03382.

Rajasekaran, R., and Y.-P. P. Chen. 2015. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. Drug Discov. Today 20:958–968. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644615001555>

Randrianalijaona, J.-A., P. A. R. Ramanoelina, J. R. E. Rasoarahona, and E. M. Gaydou. 2005. Seasonal and chemotype influences on the chemical composition of *Lantana camara* L. Anal. Chim. Acta 545:46–52. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267005006537>

Sacks, D., and N. Noben-trauth. 2002. THE IMMUNOLOGY OF SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE. 2.

Saleh, M., A. Kamel, X. Li, and J. Swaray. 1999. Antibacterial triterpenoids isolated from *Lantana camara*. Pharm. Biol. 37:63–66.

Santos, I. E. M. 2002. A taxonomic revision of *Lantana* sect. *Lantana* (Verbenaceae) in the Greater Antilles. Willdenowia 32:285–301. Available from: <http://www.jstor.org/stable/3997636>

Satyral, P., R. A. Crouch, L. Monzote, P. Cos, N. A. Awadh Ali, M. A. Alhaj, and W. N. Setzer. 2016. The chemical diversity of *Lantana camara*: Analyses of essential

oil samples from Cuba, Nepal, and Yemen. *Chem. Biodivers.* 13:336–342.

Sefidkon, F. 2002a. Essential oil of *Lantana camara* L. occurring in Iran. *Flavour Fragr. J.* 17:78–80.

Sefidkon, F. 2002b. Chemical composition of leaf and flower essential oil of *Lantana camara* from India. *Flavour Fragr. J.* 17:75–77.

Sharma, O. P., S. Sharma, V. Pattabhi, S. B. Mahato, and P. D. Sharma. 2007. A review of the hepatotoxic plant *Lantana camara*. *Crit. Rev. Toxicol.* 37:313–352. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408440601177863>

Sharma, O. P., A. Singh, and S. Sharma. 2000. Levels of lantadenes, bioactive pentacyclic triterpenoids, in young and mature leaves of *Lantana camara* var. *aculeata*. *Fitoterapia* 71:487–491.

Sharma, O. P., J. Vaid, and P. D. Sharma. 1991. Comparison of lantadenes content and toxicity of different taxa of the *Lantana* plant. *J. Chem. Ecol.* 17:2283–2291.

Sharma, S., O. P. Sharma, B. Singh, and T. K. Bhat. 2000. Biotransformation of lantadenes, the pentacyclic triterpenoid hepatotoxins of lantana plant, in guinea pig. *Toxicon* 38:1191–1202.

Siddiqui, B. S., S. M. Raza, S. Begum, S. Siddiqui, and S. Firdous. 1995. Pentacyclic triterpenoids from *Lantana camara*. *Phytochemistry* 38:681–685.

Sifaoui, I., A. López-Arencibia, C. M. Martín-Navarro, M. Reyes-Batlle, M. Mejri, J. Lorenzo-Morales, M. Abderabba, and J. E. Piñero. 2017. Selective activity of oleanolic and maslinic acids on the amastigote form of *Leishmania* Spp. *Iran. J. Pharm. Res.* 16:1190–1193.

SIMCA-P, U. 2019. Frequently asked questions. :1–9.

Singh, N., B. B. Mishra, S. Bajpai, R. K. Singh, and V. K. Tiwari. 2014. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorganic Med. Chem.* 22:18–

45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.11.048>

Soares, D. C., N. A. Portella, M. F. D. S. Ramos, A. C. Siani, and E. M. Saraiva. 2013. Trans- $\beta$ -Caryophyllene: An effective antileishmanial compound found in commercial copaiba Oil (*Copaifera* spp.). Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2013:1–13.

Song, X.-Y., Y.-D. Li, Y.-P. Shi, L. Jin, and J. Chen. 2013. Quality control of traditional Chinese medicines: a review. Chin. J. Nat. Med. 11:596–607. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345500>

Sousa, E. O., and J. G. M. Costa. 2012. Genus Lantana: Chemical aspects and biological activities. Brazilian J. Pharmacogn. 22:1155–1180.

Souza, M. T., G. C. Rocha, S. D. Costa, C. M. Rodrigues, C. Ferreira, M. T. Tavares, E. Saraiva, R. Parise-filho, H. Braden, and J. C. Delorenzi. 2016. Oleanolic acid (OA) as an antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights. Parasitol. Int. 65:227–237. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.01.001>

De Souza, W., and F. C. J. Rodrigues. 2009. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.:1–19.

Srinivasan, V. S. 2006. Challenges and scientific issues in the standardization of botanicals and their preparations. United States Pharmacopeia's dietary supplement verification program - A public health program. Life Sci. 78:2039–2043. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.014>

Sundar, S., and J. Chakravarty. 2010. Antimony toxicity. Int. J. Environ. Res. Public Health 7:4267–4277.

Tan, N., M. Kaloga, O. A. Radtke, A. F. Kiderlen, S. Öksüz, A. Ulubelen, and H. Kolodziej. 2002. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. Phytochemistry 61:881–884.

Tiuman, T. S., A. O. Santos, T. Ueda-Nakamura, B. P. D. Filho, and C. V.

Nakamura. 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int. J. Infect. Dis.* 15.

Tiwari, N., M. R. Gedda, V. K. Tiwari, S. P. Singh, and R. K. Singh. 2017. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. *Mini-Reviews Med. Chem.* 18:1–16. Available from: <http://www.eurekaselect.com/151864/article>

Torres-Santos, E. C., D. Lopes, R. Rodrigues Oliveira, J. P. P. Carauta, C. A. Bandeira Falcao, M. A. C. Kaplan, and B. Rossi-Bergmann. 2004. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine* 11:114–120.

Warfield, J., W. N. Setzer, and I. V. Ogungbe. 2014. Interactions of antiparasitic sterols with sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of human pathogens. *Springer Plus* 3:1–11.

Watanabe, H., K. Numata, T. Ito, K. Takagi, and A. Matsukawa. 2004. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. 22:460–466.

Waterman, C. L., R. A. Currie, L. A. Cottrell, J. Dow, J. Wright, C. J. Waterfield, and J. L. Griffin. 2010. An integrated functional genomic study of acute phenobarbital exposure in the rat. *BMC Genomics* 11:1–17.

Weyerstahl, P., H. Marschall, A. Eckhardt, and C. Christiansen. 1999. Constituents of commercial Brazilian lantana oil. *Flavour Fragr. J.* 14:15–28.

Worley, B., and R. Powers. 2013. Multivariate analysis in metabolomics. *Curr. Metabolomics* 1:92–107.

Yao, C., and M. E. Wilson. 2016. Dynamics of sterol synthesis during development of *Leishmania* spp. parasites to their virulent form. *Parasites and Vectors* 9:1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1470-0>