



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE CHIAPAS

BIBLIOTECAS UNACH
FAC. MEDICINA HUMANA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
CAMPUS II



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA C-II
POSTGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

TESIS

“ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE AGUACATE
(*Persea americana*) SOBRE CULTIVOS *in vitro* DE *Leishmania mexicana*”

P R E S E N T A:

ELVIRA CRISTINA MUÑOZ OLVERA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. TERESA AYORA TALAVERA

1er. Asesor: DRA. PATRICIA TALAMÁS ROHANA

2º. Asesor: DRA. PEGGY ELIZABETH ALVAREZ GUTIÉRREZ

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

Junio del 2010

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de maestría en ciencias en salud ambiental y enfermedades transmisibles es producto del PROYECTO FOMIX CHIAPAS-CONACYT gobierno del estado (clave CH15030755), del cual el sustentante es egresado.

A las dos mujeres que me dieron una pauta a seguir y quienes son un ejemplo para mí, a la Dra. Teresa Ayora Talavera y a la Dra. Patricia Talamás Rohana, quienes gentilmente me abrieron las puertas de instituciones de amplio reconocimiento en materia de investigación, el Instituto Tecnológico de Tuatla Gutiérrez y el Centro Nacional de Investigaciones Avanzadas (CINVESTAV), respectivamente, les agradezco inmensamente.

Dra. Peggy Elizabeth Álvarez Gutiérrez sus críticas y observaciones agudas son la semilla incipiente de esta inquietud por seguir en el camino de la investigación, lo cual aprecio de todo corazón.

Al Dr. Miguel Ángel Mazariegos Arana por sus aportaciones y su confianza.

Y a las personas que me guiaron de la mano ante los pertrechos de este oficio, la Q.F.B. Amelia Angel Martínez, en CINVESTAV, y la entonces pasante ingeniero bioquímico Rosario Indili Cruz en el ITEC, muchas gracias.

Tuxtla Gutiérrez, Chuapas.
Agosto 02 del 2010.

Dra. Laura Trujillo Olivera
Coordinadora de Investigación y Postgrado de
La Facultad de Medicina Humana de la UNACH.

Por medio de la presente me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que he autorizado la impresión del trabajo de tesis "ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE AGUACATE (*Persea americana*) SOBRE CULTIVOS in vitro DE *Leishmania mexicana*", de la cual soy directora, trabajo desarrollado por la tesista Elvira Cristina Muñoz Olvera, quien aspira al título de maestría en Ciencias de la Salud.

Sin más por el momento aprovecho para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E


Dra. Teresa Ayora Talavera.

I.2.3.6 Propiedades biológicas	52
I.2.4 Saponinas	52
I.2.4.1 Estructura	52
I.2.4.2 Clasificación	53
I.2.4.3 Biosíntesis y localización en la planta	55
I.2.4.4 Funciones en la planta	56
I.2.4.5 Propiedades biológicas	56
I.2.5 <i>Persea americana</i>	59
I.2.5.1 Taxonomía	59
I.2.5.2 Ecología	63
I.2.5.3 Utilidades	65
I.2.5.4 Propiedades	66
I.3 Justificación	69
I.4 Objetivos	70
I.4.1 General	70
I.4.2 Específicos	70
CAPITULO II	71
II.1 Materiales	71
II.1.1 Material biológico	71
II.2 Métodos	71
II.2.1 Preparación de extractos crudos	71
II.2.2 Análisis cuantitativo de los extractos crudos de aguacate (<i>P. americana</i>)	73
II.2.2.1 Cuantificación de flavonoles	73
II.2.2.2 Cuantificación de flavanonas	73
II.2.2.3 Cuantificación de fenoles totales	74
II.2.3 Análisis cualitativo de los extractos crudos de aguacate (<i>P. americana</i>)	74
II.2.3.1 Detección de flavonoides, saponinas y terpenoides por cromatografía en capa fina (TLC)	74
II.2.4 Análisis parasitológico	75
II.2.4.1 Cultivo de <i>Leishmania mexicana</i>	75
II.2.4.2 Determinación de la sensibilidad de <i>Leishmania</i> en fase de promastigote a los extractos de aguacate	76
II.2.4.3 Preparación de las muestras para cuantificación por citometría de flujo	76

II.2.4.4 Microscopía óptica con tinción Giemsa.....	77
CAPITULO III	78
III.1 Resultados.....	78
III.1.1 Efecto de la presencia de extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate (<i>Persea americana</i>) sobre el crecimiento de <i>Leishmania mexicana</i>	78
III.1.1.2 Microscopía óptica de los cultivos de <i>Leishmania mexicana</i> en presencia de extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate (<i>P. americana</i>).....	79
III.1.2 Evaluación de los metabolitos presentes en los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate (<i>P. americana</i>).....	81
III.1.2.1 Identificación cromatográfica de flavonoides.	81
III.1.2.2 Identificación cromatográfica de saponinas.	85
III.1.2.3 Identificación cromatográfica de terpenoides.....	86
III.1.3 Cuantificación de flavonoides	87
III.2 Discusión	89
Capítulo IV	94
IV.1 Conclusiones	94
IV.2 Recomendaciones	94
CAPITULO V	95
V.1 Bibliografía	95
V.2 Anexos	102

Lista de figuras

Figura 1. Mapa de la distribución mundial de leishmaniosis cutánea. OMS 2005.....	5
Figura 2. Distribución de leishmaniasis en el estado de Chiapas. Archivos del Programa leishmaniasis. ISECH 1990-2008.....	7
Figura 3. Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania</i> (Vannier- Santos <i>et al.</i> , 2002).....	8
Figura 4. Estructura general del promastigote de <i>Leishmania</i> mediante microscopía electrónica. Los organelos pueden observarse, tales como el flagelo (F) emergiendo del bolsillo flagelar (P), núcleo (N), la única mitocondria y el kinetoplasto (K). Micrografía de P.F.P. Pimenta y W. de Souza.....	9
Figura 5. Microscopía de transmisión electrónica de un amastigote de <i>Leishmania</i> dentro de un macrófago. El pequeño, circular, no móvil forma intracelular presenta un flagelo (F) guardado dentro del bolsillo flagelar. La mitocondria-kinetoplasto (K), npucleo (N) y un largo lisosoma conocido como megasoma (M) pueden ser observados. Microscopía por P.F.P. Pimenta and W. de Souza.....	10
Figura 6. Ciclo de vida de las <i>Leishmanias</i> . Estadio humano 1. El mosquito toma la sangre (inyecta el promastigote en la piel), 2. El promastigote es fagocitado por el macrófago, 3. El promastigote se transforma a amastigote en el interior del macrófago, 4. El amastigote se multiplica en las células de diversos tejidos (incluyendo los macrófagos), Estadio mosquito 5. El mosquito toma la sangre (ingiere macrófagos infectados con amastigotes), 6. Ingestión de la célula infectada, 7. El amastigote se transforma a estadio promastigote en el intestino del mosquito, 8. Se divide en el intestino y migra hacia la proboscis, i:Estadio infeccioso, d: Estadio contagioso. Fuente: Centers for Disease Control & Prevention National Center for Infectious Diseases. Division of Parasitic Diseases.....	13
Figura 7. Frutos representativos de las razas de aguacate. De izquierda a derecha la raza Antillana, raza Guatemalteca y raza Mexicana. A parte raza Costaricensis (Barrientos-Priego, 2000).	59
Figura 8. Árbol de aguacate <i>Persea americana</i> (www.amigoarbol.org, 2008).....	63
Figura 9. Flor del aguacate (Carr G. D. , 2006).....	64
Figura 10. Diagrama de flujo de la técnica de extracción de flavonoides.	72
Figura 11. Regresión lineal del crecimiento de <i>Leishmania mexicana</i> . La ecuación de la curva $y=208.789x - 7519.96$, $r^2=0.999435$	77
Figura 12. Actividad leishmanicida de los extractos etanólicos crudos de aguacate (<i>Persea americana</i>) sobre promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> . H: extracto etanólico de hoja, C: extracto etanólico de cáscara, S: extracto etanólico de semilla. RPMI, medio de cultivo testigo.....	79
Figura 13. Microscopía del frotis de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> en un cultivo de 72 Hr de incubación y 24 Hr de evolución bajo los efectos del extracto crudo de la cáscara de aguacate (<i>Persea americana</i>). A) $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se aprecia lisis celular y aglutinación de restos celulares. B) $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se aprecia aglutinación de parásitos y detritus celulares. C) $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Aunque la integridad del cuerpo celular del parásito se conserva, se aprecia edema celular. D) $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se aprecia un aparente detritus, sin embargo se trata de extracto, ya que los parásitos tienen íntegra su estructura celular.	80
Figura 14. Cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos de: H, hoja; C, cáscara; S, semilla; N, naringenina y Q, quercetina. Sistema de solventes S1, Hexano: Acetato de etilo: Ácido Acético (31:14:5); Revelador: Luz UV.	82
Figura 15. Cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos de: H, hoja; C, cáscara; S, semilla; N, naringenina y Q, quercetina. Sistema de solventes S2, Acetato de etilo: Ácido acético: Ácido fórmico: Agua (100:11:11:26); Revelador: Luz UV.....	83

Figura 16. Cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos de: H, hoja; C, cáscara; S, semilla; N, naringenina y Q, quercetina. Sistema de solventes S3, Butanol: Acido Acético: Agua (40:10:50); Revelador: Luz UV.....	84
Figura 17. Cromatografía en capa fina de saponinas en los extractos de <i>Persea americana</i> ; Sistema de solventes S4; Revelador: solución de vainillina 1% en ácido sulfúrico. H, hoja; C, cáscara; S, semilla; W, <i>Linum</i> spp.	85
Figura 18. Cromatografía en capa fina de terpenoides en los extractos de <i>Persea americana</i> ; Sistema de solventes S 5; Revelador: reactivo de Liebermann-Burchard. H, hoja; C, cáscara; S, semilla; W, <i>Linum</i> spp.	86
Figura 19. Concentración de flavonoides en hoja, cáscara y semilla de aguacate (<i>P. americana</i>). Todos los experimentos son el promedio de 3 repeticiones. La comparación de medias se realizó por Tukey ($\alpha= 0.05$).....	87
Figura 20. Concentración de flavonoides totales y fenoles totales en hoja, cáscara y semilla de aguacate (<i>P. americana</i>). Todos los experimentos son el promedio de 3 repeticiones. La comparación de medias se realizó por Tukey ($\alpha= 0.05$).	88

Lista de tablas

Tabla 1. Taxonomía del género <i>Leishmania</i>	7
Tabla 2. Características geográficas y clínicas de la leishmaniasis.....	19
Tabla 3. Clasificación de los terpenoides	46
Tabla 4. Diferencias entre las razas de aguacate (<i>Persea americana</i> Mill.) ⁴⁵	61
Tabla 5. Sistemas de solventes utilizados en la cromatografía en capa fina.....	75
Tabla 6. Rf de los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate en el sistema de solventes S1.....	82
Tabla 7. Rf de los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate en el sistema de solventes S2.....	83
Tabla 8. Rf de los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate en el sistema de solventes S3.....	84

Resumen

Es mediante cromatografía en capa fina (TLC) como se hace la identificación de flavonoides, saponinas y terpenoides en los extractos etanólicos de la hoja, cáscara y semilla del fruto del aguacate (*Persea americana*), las concentraciones de los flavonoides variaron de acuerdo a la parte del árbol analizada, la mayor concentración se encontró en las partes aéreas de la planta tales como hoja y cáscara. La inhibición del crecimiento de *Leishmania mexicana*, se presentó en los tres extractos a concentraciones diferentes, la mínima concentración que produjo inhibición en el crecimiento parasitario de los extractos de hoja y cáscara fue de $250\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, y el extracto de semilla a $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

CAPITULO I

I.1 Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad causada por especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania*. Los reservorios de la enfermedad son el ser humano así como otros mamíferos tales como perros, roedores, marsupiales, etc. Los vectores son mosquitos que pertenecen al género *Lutzomyia* y *Phlebotomus*¹.

Desde el punto de vista clínico la leishmaniasis comprende tres manifestaciones claramente distintas: infección visceral generalizada (leishmaniasis visceral o “Kala-azar”), leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea (ulceración de la piel e hiper-desarrollo de las membranas mucosas¹). La alternativa más efectiva para su control es el manejo de los casos infectados, así como los reservorios a pesar de su costo y efectividad³.

El pilar del tratamiento para la leishmaniasis se basa en antimoniales pentavalentes, los cuales han sido utilizados por más de 50 años. Estos medicamentos presentan alto rango de fallo y recaídas, particularmente en el tratamiento de pacientes coinfectados con VIH. Reportes clínicos indican que una alta proporción de casos se están volviendo resistentes a la quimioterapia³. Aunque los antimoniales pentavalentes continúan siendo la primera línea de acción entre los medicamentos empleados para el tratamiento de la leishmaniosis, los efectos secundarios también se hacen presentes tales como artralgia, fatiga, malestar gastrointestinal, elevación de la amilasa, lipasa, y enzimas hepáticas, leucopenia, anemia y anormalidades electrocardiográficas⁵.

De acuerdo a los datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) la leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales más desatendidas, si se tiene en cuenta que existen pocos medios de lucha contra ella y no hay criterios claros para definir métodos de control. La leishmaniasis es endémica en 88 países del mundo y se considera que 350 millones de personas corren riesgo de contraer esta enfermedad. Según las estimaciones, hay 14 millones de personas infectadas y cada año se registran aproximadamente dos millones de nuevos casos. Esta enfermedad contribuye considerablemente a incrementar la pobreza porque su tratamiento es caro y, por lo tanto, resulta inasequible o impone una carga económica sustancial, incluida la pérdida de salarios².

En Latinoamérica las enfermedades tropicales ocupan el cuarto lugar entre las enfermedades transmisibles, estando por debajo de las enfermedades respiratorias agudas, enfermedades diarreicas y del SIDA. Representando una pérdida económica para los países endémicos equivalente a 6.5 billones de dólares al año⁴.

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en el estado de Chiapas, pero carece de un reconocimiento pleno como problema de salud por parte de las autoridades sanitarias, ya que no existe seguimiento de un programa epidemiológico por lo que no es posible definir sus alcances en términos económicos y humanos.

En la medicina tradicional de la región del Soconusco la infusión de las hojas del árbol y de la semilla del fruto del aguacate (*Persea americana*), es empleada como tratamiento antimicrobiano, antiparasitario, antiinflamatorio, antiasmático, antitusígeno, antipirético, también es empleado en el tratamiento de enfermedades renales, hepáticas, diabetes y en el tratamiento de cólicos menstruales⁶.

Según los datos del Natural Products Alert (NAPRALERT, 2007), la planta del aguacate contiene diversos compuestos de interés tales como alcaloides, saponinas, flavonoides, esteroides, carbohidratos, ácidos grasos y aceites esenciales⁷. En estudios preliminares Staat y col⁸. reportaron el aislamiento de una sustancia activa, la toxina persina, con propiedades antifúngicas y anticancerígenas. En éste árbol también se encontró a la aglutinina (PAA), proteína con propiedades antimicrobianas contra *Streptococcus mutans*⁹, *Staphylococcus aureus*¹⁰, *Pseudomona aureginosa*¹¹, *E. coli*¹² y *Legionella pneumophilla*¹³. Además, se han reportado propiedades antioxidativas en tejido hepático dañado¹⁴ y como terapia alternativa en el control de la diabetes mellitus¹⁵.

En el presente trabajo se evaluaron las propiedades antiprotozoarias de extractos etanólicos de las hojas del árbol, de la cáscara y semilla del fruto del aguacate proveniente de la región centro del estado de Chiapas, sobre cultivos *in vitro* de *Leishmania mexicana*.

I.2 Antecedentes

I.2.1 Leishmaniasis

I.2.1.1 Historia, Epidemiología y Salud Pública

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa que puede llegar a ser letal y es producida por un protozoo perteneciente al género *Leishmania*; su forma de presentación comprende un complejo de síndromes clínicos que se manifiestan por la presencia de lesiones cutáneas, mucocutáneas o viscerales, dependiendo de las características propias del parásito y de la respuesta inmunitaria del hospedero¹⁷. Padecimiento que data de los años 1500 y 1600 de la era cristiana, los incas en su legado cultural lo representan mediante la creación de figuras humanas con rostros deformes, entonces conocida como la enfermedad de los Andes; en 1885 y 1898, D. Cunningham y Peter Borovsky, respectivamente observan los parásitos, pero es hasta 1901 cuando William Leishman identifica los microorganismos en una biopsia esplénica de un paciente muerto a causa de “fiebre dum-dum”; en 1903 Charles Donovan identifica al microorganismo como una entidad diferente del *tripanosoma* y es Ross quien vincula el padecimiento kal-azar o fiebre negra, actualmente conocida como leishmaniasis, con el parásito a quien adjudicó el nombre de *Leishmania donovani*. En México, la leishmaniosis cutánea (LC) fue descrita por vez primera en 1912 en la península de Yucatán por Seidelin, quien la denominó “úlceras de los chicleros” debido a que afectaba a hombres que laboraban en regiones selváticas, en la cosecha de la goma del árbol del chicozapote, del cual se producía el chicle^{4,24}.

La incidencia mundial de leishmaniasis es de 2 millones de casos anuales, de los cuales 1.5 millones se presentan en la forma clínica de LC y 500 mil en la forma visceral (LV) y se estima que más de 12 millones de personas padecen la enfermedad; 88 países la reportan como enfermedad endémica, de los cuales 72 están en vías de desarrollo; aún así se considera que hay una subestimación de los datos debido a factores como diagnóstico pasivo, pacientes asintomáticos y porque únicamente 32 de los 88 países elaboran un reporte epidémico de la enfermedad⁴. Este padecimiento que presenta principalmente en regiones tropicales y subtropicales, tales como Brasil, Bangladesh, India y Sudan¹⁶ (Figura 1). Dentro del panorama epidemiológico, reflejo de las características sociales de la enfermedad, se encuentran las migraciones humanas masivas en países con problemas políticos y sociales, asentamientos poblacionales en regiones cercanas al nicho ecológico

Un ejemplo de lo anterior es lo que sucede en Tabasco, México, área endémica en la que la enfermedad se encuentra asociada a la actividad económica de la población, ya que el desecho de las cáscaras de cacao, ricas en nutrientes orgánicos, favorece el desarrollo de larvas de *Lutzomyia*, vector de la enfermedad¹⁷.

Actualmente, este padecimiento ya no es exclusivo de zonas rurales sino también propio de zonas urbanas, debido a la transición epidemiológica de la enfermedad en el suroeste de Europa por el empleo de drogas intravenosas entre pacientes coinfectados de leishmaniasis visceral con VIH, haciéndola altamente transmisible entre la población susceptible y produciendo brotes epidémicos en zonas donde se presentaban casos aislados (Figura 1) ⁴.

En el Continente Americano se ha reportado la presencia de leishmaniasis desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de la Argentina²⁰. En México la Secretaría de Salud realiza la identificación de la enfermedad de manera vertical mediante la búsqueda intencionada de personas infectadas en áreas endémicas, más no es de notificación obligatoria, por lo que existe un subregistro nacional. Según los datos reportados se estima que anualmente se presentan 400 nuevos casos de leishmaniasis, también se ha informado casos de LV, primordialmente en niños entre uno y cuatro años de edad, predominantemente de sexo masculino, infectados por *Leishmania (L.) chagasi*¹⁷. La enfermedad afecta fundamentalmente a la región suroeste del país siendo los estados de Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Campeche y Yucatán los más afectados, aunque estados como Coahuila, Jalisco, Nayarit, Nuevo León, Tamaulipas y Quintana Roo también la han referido²⁰.

En Chiapas el 92.8% de los casos reportados se presentan en la forma clínica de leishmaniasis cutánea localizada y afecta a la región norte y selva del estado, siendo los municipios de Ixcomitán, Pichucalco, Juárez, Maravilla, Tenejapa e Independencia los más afectados, el grupo etáreo susceptible se encuentra entre los 15 y 44 años de edad, y es el género masculino en una razón de 4:1 el más afectado y según la fuente no ha habido defunciones. En un registro histórico Chiapas cuenta con el 89% de casos de LV a nivel nacional durante el periodo de 1990-2008, siendo el único estado con persistencia del problema. El grupo etáreo más susceptible son menores de 5 años de edad, la población más afectada se encuentra en el centro del estado en los municipios de Tuxtla Gutiérrez, Chiapa de Corzo, Venustiano Carranza, Acala y Suchiapa (Figura 2) ¹⁹.

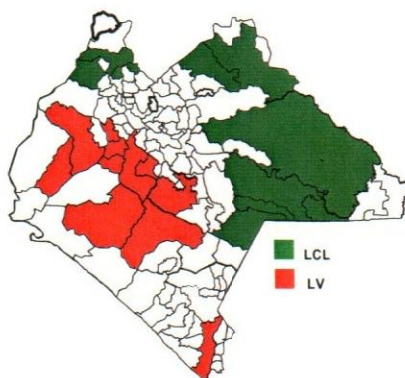


Figura 2. Distribución de leishmaniasis en el estado de Chiapas. Archivos del Programa leishmaniasis. ISECH 1990-2008.

I.1.2.2 Taxonomía de *Leishmania*

La leishmaniosis es producida por parásitos protozoarios flagelados, pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, género *Leishmania* que son parásitos intracelulares obligados de las células del sistema fagocítico monocitario, con una forma flagelada o promastigote, que se multiplica en el tubo digestivo del insecto vector y en medios de cultivo, y una forma no flagelada o amastigote que se multiplica en los tejidos de los hospederos vertebrados⁵⁵ (Tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía del género *Leishmania*

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Subfilo	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinitoplastida
Suborden	Tripanosomatina
Familia	Tripanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>

I.1.2.3 Los Flebotomos del Nuevo Mundo

Los vectores de la leishmaniosis son Dípteros de la familia *Psychodidae*, corresponden al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y al género *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo.

Los flebótomos realizan su ciclo vital completo durante todo el año en áreas tropicales. Su hábitat varía desde la selva húmeda hasta regiones muy áridas, y entre el nivel del mar y los 3.200 mts. La mayor parte de las especies del Nuevo Mundo viven más en selvas que zonas arenosas. Tiene actividad crepuscular y hasta pasada la media noche, siempre y cuando la temperatura sea mayor a los 18°C y no haya viento⁵⁵.

I.1.2.4 Estructura de *Leishmania*

Leishmania spp. presenta dos formas estructurales dependiendo del estadio en el ciclo vital, ya que la forma flagelada o promastigote, se multiplica en el tubo digestivo del vector, y la forma aflagelada o amastigote se multiplica en los tejidos de los hospederos vertebrados, infectando células del sistema reticuloendotelial; este bimorfismo le hace acreedor de la presencia o ausencia de órganos específicos .

Los promastigotes son células extracelulares, fusiformes, elongadas mide 12 a 20 μm , tiene un núcleo central y un flagelo anteronuclear mayor de 20 μm de longitud¹⁷ (Figura 3 y Figura 4)¹⁶, que nace del cuerpo basal situado por delante del quinetoplasto, un organelo citoplasmático que contiene su propio ADN.

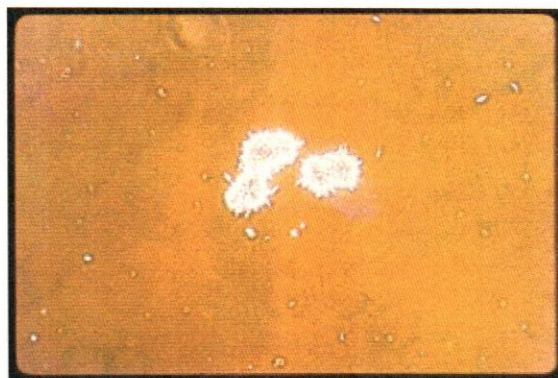


Figura 3. Promastigotes de *L. infantum* rosetas en medio de Schneider (Gállego- Riera, 2002)

Los amastigotes (Figura 5) son células oblongadas con un flagelo muy corto (por lo que se dice que es aflagelado) que miden aproximadamente de 2 a 4µm, tienen un núcleo grande y excéntrico además de un quinetooplasto que consta de blefaroplasto, con cuerpo basal a partir del cual nace rizoplasto que se convierte en flagelo en el promastigote¹⁷.



Figura 4. Estructura general del promastigote de *Leishmania* mediante microscopía electrónica. Los organelos pueden observarse, tales como el flagelo (F) emergiendo del bolsillo flagelar (P), núcleo (N), la única mitocondria y el kinetoplasto (K). Micrografía de P.F.P. Pimenta y W. de Souza.

Tanto en los amastigotes como en los promastigotes el flagelo emerge de un bolsillo flagelar y en la forma de amastigote el flagelo se encuentra totalmente restringido a este, por lo que únicamente es observado mediante microscopía electrónica¹⁶. Dicho bolsillo flagelar presenta numerosas proteínas integrales (Figura 4) de membrana localizadas en porción posterior¹⁸. Este dominio del bolsillo flagelar puede formar parte del cercenamiento de la cola de los promastigotes durante el proceso de exocitosis. Las formas amastigotes de *Leishmania* del Nuevo Mundo corresponden al complejo de *L. mexicana* el cual presenta organelos únicos parecidos a los lisosomas unidos a la membrana, presentando una matriz parecida a una esponja, la cual puede ocupar a lo mucho el 15% del volumen celular conocidos como megasomas. Estos son organelos ricos en cistein proteinasas asociadas a la acumulación y posible degradación de moléculas endocitadas. La actividad de las cistein proteinasas en *Leishmania* como en otros parásitos, juega un rol en el proceso de producción de infección ya que la inhibición de esta enzima con leupeptina daña la sobrevivencia del parásito dentro de los macrófagos y la delección resulta en una disminución de la sobrevivencia intracelular en macrófagos por lo que la cistein proteinasa

puede ser un blanco terapéutico. En adición la cistein proteinasa puede tomar parte en la degradación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad-II (MHC-II) por los amastigotes intracelulares¹⁶.

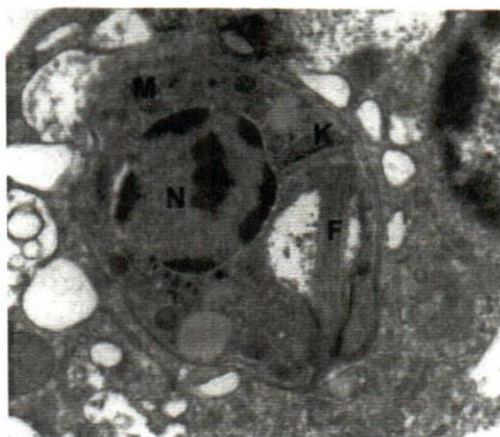


Figura 5. Microscopía de transmisión electrónica de un amastigote de *Leishmania* dentro de un macrófago. El pequeño, circular, no móvil forma intracelular presenta un flagelo (F) guardado dentro del bolsillo flagelar. La mitocondria-cinetoplasto (K), núcleo (N) y un largo lisosoma conocido como megasoma (M) pueden ser observados. Microscopía por P.F.P. Pimenta and W. de Souza

La presencia de vacuolas vacías en los parásitos tripanosomátidos se conocen como “volutin, gránulos metacromáticos o de inclusión”, “acidocalcisosmas” o bien “vacuolas electrodensas”. Se determinó que este organelo ácido, es un compartimento almacenador de Ca^{2+} , rico en pirofosfato, Mg^{2+} , Na^+ y en algunos casos Zn^{2+} . La presencia de $\text{Ca}^{2+}\text{-H}^+$ ATPasa, $\text{Ca}^{2+}\text{-H}^+$ pirofosfatasa translocadora en la membrana de los acidocalcisosmas fue confirmada en promastigotes de *L. donovani*. Estas proteínas membranales están involucradas en el almacenamiento y liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} para señalización; además están involucrados en la homeostasis del pH y la osmoregulación de los parásitos¹⁶.

Otro organelo único presente en *Leishmania* y otros tripanosomátidos es el glucosoma, un organelo altamente especializado envuelto en la generación de ATP glucolítico. La ingesta de glucosa puede ser más relevante en la fase de crecimiento logarítmica tardía. A pesar de esto, los promastigotes utilizan preferencialmente aminoácidos como prolina como fuentes de carbono. El uso de prolina en lugar de glucosa

para propósitos energéticos puede ser una adaptación importante para la sobrevivencia en la sangre del insecto rica en proteína.

Leishmania como otros parásitos tripanosomátidos, presentan una sola mitocondria ramificada la cual se puede extender a lo largo de toda la célula con un largo contenido de ADN en una región localizada en la vecindad del cuerpo basal del flagelo, conocido como cinetoplasto. Éste es un organelo que contiene su propio ADN (kADN), con aproximadamente 10^7 pares de bases el cual representa hasta 20% del ADN total del parásito y forma una compleja red de maxicírculos y minicírculos¹⁷. En células en replicación, la división del cinetoplasto precede a la división nuclear y al crecimiento del flagelo nuevo, el disco de red existente es flanqueado por dos complejos de proteínas envueltos en la replicación del ADN, tales como la topoisomerasa II y la ADN polimerasa. La topoisomerasa II libera un poco de cientos de minicírculos desde la red catenonizada al mismo tiempo permitiendo la replicación en un mecanismo similar como el que se lleva a cabo en los plásmidos y otros ADNs circulares¹⁶.

El núcleo en ambos estados está envuelto por el retículo endoplasmático puntuado por poros similares a otras células eucarióticas. Un núcleo prominente y centralmente posicionado de 0.6-1.0µm en diámetro puede ser observado y la cromatina nuclear está dispuesta periféricamente. Está organizada en 16-23 cromosomas o moléculas parecidas a los cromosomas.

Interesantemente tanto promastigotes como amastigotes son capaces de intercambiar componentes de membrana con las células huésped en un dinámico y regulado proceso desarrollado. *Leishmania* en la vacuola parasitófora adquiere moléculas citoplasmáticas macrofágicas vía transportadores de membrana o fusión de vacuolas autofágicas¹⁶.

I.1.2.5 Ciclo de vida

La mayoría de las leishmaniosis son zoonosis en las que distintas especies animales actúan como reservorio del parásito. En su inicio se trataría de parasitosis de animales salvajes, con la introducción accidental del hombre en el ciclo bio-epidemiológico del parásito (ciclo enzoótico o primario). Al desaparecer el reservorio salvaje del entorno humano, la adopción de animales domésticos susceptibles es el origen de las leishmaniosis

de carácter zoonotico o secundario. Finalmente, el reservorio animal puede desaparecer y el hombre actuar como único hospedador vertebrado en un ciclo antroponotico o terciario. Así, en el mantenimiento de las leishmaniasis juega un papel fundamental la existencia de mamíferos hospedadores habituales de estos parásitos que constituyen la fuente de partida para su posterior propagación al hombre a través de los flebotomos vectores. Los carnívoros, fundamentalmente los cánidos y diferentes grupos de roedores ejercen usualmente este papel. Otras especies animales como los osos hormigueros, los perezosos, las zarigüeyas pueden actuar también como reservorios en Sudamérica²³.

El inicio del ciclo en el hospedador vertebrado tiene lugar cuando el flebotomo ingiere los amastigotes mientras el flebotomino se alimenta de la sangre (Figura 6: Etapa 5 y 6), los cuales se transforman en promastigotes dentro del intestino del insecto. En el intestino de la mosca el parásito inicia un proceso de maduración y diferenciación que dura de cuatro a veinticinco días, en el cual los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (forma flagelada inmadura) y se adhieren al epitelio del intestino medio de la mosca mediante la molécula lipofosfoglicano (Figura 6: etapa 7).

En el intestino medio de la mosca los promastigotes mantienen un pH alcalino entre 7.0 y 9.0, mediante mecanismos de transporte intracelular como bombas de intercambio de protones, así como bombas de intercambio de aniones, co-transportadores anión-cación, y canales de cloro¹⁸. Bajo estas condiciones el promastigote procíclico madura y se transforma en promastigote metacíclico infectivo¹⁷. La adherencia del promastigote a la pared intestinal del insecto está confinada al intestino medio, excepto en especies de los complejos *L. braziliensis* (subgénero *Viannia*), a la cual también se le adhieren en el intestino alto, en la región del píloro¹⁶.

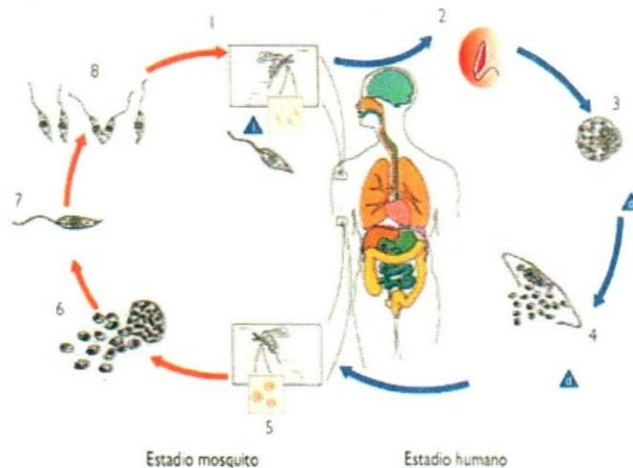


Figura 6. Ciclo de vida de *Leishmania*. Estadio humano 1. El mosquito toma la sangre (inyecta el promastigote en la piel), 2. El promastigote es fagocitado por el macrófago, 3. El promastigote se transforma a amastigote en el interior del macrófago, 4. El amastigote se multiplica en las células de diversos tejidos (incluyendo los macrófagos), Estadio mosquito 5. El mosquito toma la sangre (ingere macrófagos infectados con amastigotes), 6. Ingestión de la célula infectada, 7. El amastigote se transforma a estadio promastigote en el intestino del mosquito, 8. Se divide en el intestino y migra hacia la proboscis, i: Estadio infeccioso, d: Estadio contagioso. Fuente: Centers for Disease Control & Prevention National Center for Infectious Diseases. Division of Parasitic Diseases.

Durante este periodo los parásitos sufren profundas modificaciones morfológicas y bioquímicas, ya que se transforman en formas procíclicas no infectivas a formas metacíclicas infectivas. Los proliferativos promastigotes procíclicos, pueden encontrarse de diferentes morfologías. Los nectomados son promastigotes largos que proliferan dentro del saco de quitina de la matriz peritrófica. Con la ruptura de la parte anterior de esta matriz por enzimas quitinolíticas del promastigote el parásito migra y se une a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio. Una vez ahí los nectómad as proliferativos pueden dar lugar a los mecíclicos infectivos o a unos haptomonadas cortos y anchos. Algunos de estos pueden alcanzar el esófago y la farínge donde se transforman en paramastigotes los promastigotes más cortos en los cuales el quinetooplasto puede verse a un lado del núcleo. Los metacíclicos usualmente son más cortos y delgados que los procíclicos con aumento de la motilidad y con el flagelo relativamente más largo. Los promastigotes localizados en el intestino de la mosca, tres días después de su ingesta son virulentos, pero los ingeridos 7-8 días después son altamente virulentos para los ratones¹⁶.

La infección por *Leishmania* toma lugar cuando la boca del insecto lacera los tejidos dérmicos y venas superficiales del huésped vertebrado produciendo un pequeño hematoma o una alberca de sangre y el insecto regurgita al parásito y transmite los promastigotes metacíclicos infectivo al hospedero vertebrado siendo introducidos (Figura 6: etapa 1). Además del contagio por contacto directo, también ha sido reportado el contagio por transfusiones sanguíneas, hemodiálisis, transplante de órganos, vía congénita y en ocasiones por transmisión sexual.

Una vez llegados al hospedador del vertebrado, son captados por los macrófagos de la dermis y pasan a su citoplasma donde, englobados en una vacuola parasitófora (Figura 6: etapa 2), el parásito se transforma en la amastigote y se divide activamente por sucesivas divisiones binarias (Figura 6: etapa 3). Aproximadamente 30 minutos después de su formación se vuelve ácido a un pH de 4.5-5.5. Este microambiente agresivo se desarrollada por la acción de la membrana del parásito que es una ATPasa translocadora de protones, mantiene el citoplasma leishmánico en un pH neutro. El gradiente electroquímico de protones creado através de la membrana del parásito dirige el transporte activo de glucosa y prolina, escensial para la sobrevivencia del parásito. Los promastigotes de la mayoría de las especies de *Leishmania* se adhieren a los macrófagos preferencialmente a través del flagelo, excepto en *L. donovani* la cual muestra una unión no específica y la unión inicial puede ser mediada por cualquiera de los polos. La unión de *Leishmania* a los macrófagos puede verse influenciada por la carga del parásito. La diferenciación completa de promastigotes a amastigotes toma aproximadamente de 2-5 días dependiendo de las especies de *Leishmania*.

La multiplicación y desarrollo en los macrófagos finaliza cuando la célula, que contiene unas decenas de parásitos, estalla. Los parásitos libres invaden otros macrófagos de la zona, en los que se repite el proceso multiplicativo, o bien se diseminan directamente a través de la piel o de la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas, o son arrastrados por el torrente sanguíneo y linfático, junto a los macrófagos circulantes, para localizarse en territorios orgánicos ricos en células macrofágicas fijas como médula ósea, hígado y bazo (Figura 6: etapa 4). El paso del parásito al vector tiene lugar cuando las hembras de los flebotomos se dirigen al hospedador vertebrado con objeto de ingerir sangre para alimentarse y poder desarrollar sus huevos. Las leishmanias se multiplican bajo la forma

amastigote a su llegada al tubo digestivo del vector para pasar luego rápidamente a la forma promastigota que se multiplica activamente en su estómago e intestino. Finalmente, y después de pasar por el estadio de paramastigote que también sufre procesos de división binaria, los promastigotes metacíclicos se sitúan en la región bucal o trompa del vector, desde donde pasarán al hospedador vertebrado. Este ciclo general presenta distintas modalidades en las diferentes especies de leishmanias, dependiendo de la zona del intestino en que tiene lugar la presencia y multiplicación de las formas parásitas²³.

I.1.2.6 Patología y patogenia

El termino leishmaniosis se refiere a un espectro de enfermedades causadas por *Leishmania spp*, y son las distintas especies de esta las que dan lugar a diversos síndromes clínicos que resultan de interacciones complejas entre la capacidad invasora del parásito, su tropismo y su patogenicidad y, por otra parte, la respuesta inmunitaria del hospedero¹⁷.

La infección se establece cuando los promastigotes metacíclicos del género *Leishmania* son fagocitados por los macrófagos de la piel, células de Langerhans epidérmicas o células mononucleares circulantes. La entrada de los promastigotes activa la cascada del complemento, lo que permite que la proteína sérica C3 (C3b y C3b1) del complemento se deposite en la superficie del parásito y se una a los receptores del complemento presentes en el macrófago. La unión de los promastigotes al macrófago puede realizarse también directamente, gracias a la existencia en la superficie del parásito de moléculas tales como la lipofosfoglucono (LPG) y una metaloproteína, la glucoproteína 63 (gp63) de 63 kDa. La producción de derivados oxidativos, destinados a la destrucción de las leishmanias, queda inhibida cuando los parásitos penetran en el interior de las células hospedadoras vía C3b/C3b1. El LPG forma una barrera alrededor del parásito y es capaz de captar radicales libres de oxígeno, previniendo también la unión del fagosoma con los lisosomas. Además, la gp63, dada su actividad proteolítica, degrada los enzimas lisosomales destinados a destruir a los amastigotes²³.

La LPG es la mayor glucoproteína de membrana del promastigote, es un glucolípido extenso compuesto de unidades poliméricas repetidas de sacáridos fosforilados (di-tri- o tetrasacáridos), específicos para cada especie y que están unidas entre sí por puentes de monofosfato, conectados a un centro de carbohidratos, que en *L. donovani* es un

fosfohexasacárido, anclado mediante un liso-alkil-fosfatidilinositol¹⁶. Durante la metaciclogénesis, las moléculas de LPG se duplican y experimentan cambios en las cadenas laterales de los disacáridos¹⁷, debido a la adición de de sacáridos fosforilados de tal forma que puede duplicar su longitud en algunas especies de *Leishmania*. Las modificaciones de LPG resulta en la pérdida de unión a la proteína que se une al LPG de 65 kDa en las microvellosidades del intestino medio alcanzando la forma metacíclica infectiva para posteriormente trasladarse a la cavidad bucal. Más aún, la habilidad de unas especies de *Leishmania* para infectar al flebotomino depende de la variabilidad del LPG, las cuales se elongan lo cual permite que el parásito se desprenda del epitelio intestinal y migre a la faringe y la cavidad bucal de la mosca. Otro de los factores que cobran relevancia dentro de la patogenia en los promastigotes metacíclicos es el factor gp63, del cual se expresa un aumento, es la proteína más abundante en la superficie de los promastigotes los cuales constituyen más del 2% de las proteínas. La glucoproteína 63, también conocida como proteasa de superficie del promastigote (PSP) o leishmanolisina, es una metaloproteínasa con un centro de GPI y es estimulada por Zn. Su actividad proteolítica es resistente a la mayoría de los inhibidores conocidos excepto para 1,10-fenantrolina y degrada un sin número de moléculas del huésped tales como inmunoglobulinas y complemento. En el intestino de la mosca esta puede ayudar a degradar la hemoglobina extracelular. Los promastigotes metacíclicos también expresan un aumento en uniones de membrana y secretan fosfatasa acida (SAP) y cisteín proteinasa. Ambas moléculas pueden involucrarse en el proceso de infección¹⁶.

Una vez se encuentran los parásitos en el interior de los macrófagos, los amastigotes pueden ser destruidos por los metabolitos oxigenados y por las hidrolasas lisosomales. Las proteínas liberadas de las leishmanias se asocian a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que actúan como transportadores de antígenos a la superficie del macrófago. Cuando se asocian las CMH de la clase I, los antígenos son reconocidos por las células T del tipo CD8+ (Tc o citotóxicas), mientras que cuando se asocian a las de la clase II son reconocidos por las células T del tipo CD4+ (Th o cooperadoras). La activación de las células Tc permite la producción de una citotoxina que provoca la lisis del parásito, así como de citocinas que activan a los macrófagos. La activación de las células Th desempeña un papel importantísimo en la respuesta inmunitaria frente a *Leishmania*, tal y

como se ha observado en el modelo murino de infección con *Leishmania major*, estableciéndose dos tipos de respuesta según se expresen las subpoblaciones Th1 o Th2. Cuando se estimula la producción de las Th1 se producen linfocinas, sobre todo interferon-gamma (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), así como factor de necrosis tumoral (TNF- α), que activan los macrófagos parasitados y, como consecuencia de ello, se activan también los mecanismos que conducen a la destrucción de las leishmanias y a la curación de la lesión. Por el contrario, cuando se estimula la producción de las Th2 se producen linfocinas que inhiben la respuesta de tipo celular (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), que favorecen el desarrollo de la respuesta humoral, a la vez que falla la respuesta celular, con la consiguiente diseminación de los parásitos hacia otras zonas. Existen varios factores que determinan el tipo de respuesta inmune y, por lo tanto, de las diferentes formas clínicas de la leishmaniosis, tales como el genotipo del parásito, tamaño del inóculo, zona de inoculación, número de picaduras recibidas, saliva del flebotomino, respuesta inmune y ciertos factores genéticos ligados al hospedador, la existencia de infecciones concomitantes²³.

Otros factores como componentes de la saliva del flebotomino y/o los extractos de las glándulas salivales promueven que se lleve a cabo la infección. La saliva exacerba la leishmaniasis experimentalmente mediante inhibición de la respuesta microbicida, la presentación del antígeno y regulando la actividad positivamente de Th2, deletérea, mientras modula disminuyendo la respuesta Th1 protectora. La mayoría de los componentes de la saliva aún no han sido identificados pero todas las salivas de las moscas contienen apirasa ATP/ADPasa la cual parece estar involucrada durante el proceso infectivo. La saliva de *Lutzomyia longipalpis* contiene dentro de otras moléculas el péptido maxadilan, un potente vasodilatador el cual inhibe los eventos proinflamatorios en el huésped, incluyendo la proliferación en el bazo, la hipersensibilidad del tipo tardía y la producción de TNF α e induce la producción de IL-6 e IL-10. Estas propiedades sugieren un rol para maxadilan en la patogénesis de la leishmaniosis, inhibiendo la respuesta inmune en el sitio de la inoculación del parásito.

Una transmisión eficiente de metacíclicos depende no solamente de la capacidad del parásito para colonizar farínge del flebotomino sino también del estado de enfermedad inducida por el parásito en la mosca. Estas modificaciones incluyen la inhabilidad de las moscas infectadas para ingerir sangre. La red tridimensional de gel rica en carbohidratos se

piensa que causa la oclusión del lumen del intestino en la transición del intestino medio, esófago y farínge, las cuales contienen elevadas cantidades de parásitos. Esta red esta compuesta generalmente de mucina de elevado peso molecular filamentos de proteofosfoglicano (fPPG) secretados en las formas de promastigotes. Estas moléculas de fPPG en ocasiones excede los 6 μm de longitud. Concurrentemente, una actividad quitinolítica de los metacíclicos daña la válvula estomacal del sistema de alimentación de la mosca principalmente el reflujo de la sangre ingerida, la cual promueve la transmisión mediante la liberación de los metacíclicos¹⁶.

I.2.1.7 Cuadro clínico

Dependiendo de la especie infectiva de *Leishmania*, la infección puede llegar a órganos internos, diseminarse localmente hacia membranas mucosas o persistir en la piel. Hay más de 20 especies diferentes del género *Leishmania* que infectan al hombre y, dependiendo de la especie, pueden generar tres cuadros clínicos: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral. Lainson y Shaw dividieron al género *Leishmania* en dos subgéneros *Leishmania* (L.) y *Viania* (V.), según el sitio en que se desarrollen en el intestino de la mosca transmisora. La localización de *Leishmania* es suprapilórica, próxima a la probóscide, mientras que *Viania* se aloja en las porciones media y posterior del intestino. Las especies que con mayor frecuencia causan leishmaniasis cutánea en el Viejo Mundo suelen ser *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* y *L. (L.) aethiopica*; las áreas más afectadas son regiones tropicales y subtropicales del Medio Oriente, litorales del Mediterráneo, África, India y Asia¹⁷ (Tabla 2).

La leishmaniasis cutánea es generalmente causada por *L. (l.) tropica*, *L. (L.) major* y *L. (L.) aethiopica* en el Viejo Mundo y en el Nuevo Mundo por especies de *L. mexicana*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) pifanoi*, y el complejo *L. braziliensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (l.) aethiopica* pueden también producir la forma difusa de la enfermedad con numerosas lesiones diseminadas en ocasiones refractarias a la quimioterapia. La infección por el complejo de especies de *L. braziliensis* puede dar lugar a la metástasis mucomembranosa de la orofarínge con frecuente destrucción del septum nasal¹⁶. Las especies que causan leishmaniasis visceral pertenecen al complejo *L. donovani*, siendo *L. (L.) donovani* y *L. (L.) infantum* del Viejo

Mundo, y *L. (L.) chagasi* del continente americano. Ocasionalmente, también *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) chagasi* pueden producir lesiones cutáneas¹⁷.

Tabla 2. Características geográficas y clínicas de la leishmaniosis

Complejo	Especie	Distribución geográfica	Enfermedad
<i>Leishmania donovani</i>	<i>L.(L.) donovani</i>	India, África	LV, LCL
	<i>L.(L.) infantum</i>	Mediterráneo	LV, LCL
	<i>L.(L.) chagasi</i> <i>infantum</i>	México, América del Sur	LV, LCL
No pertenece a complejos	<i>L.(L.) major</i>	África, Asia, Medio Oriente	LCL
	<i>L.(L.) tropica</i>	Medio Oriente, Asia	LCL
	<i>L.(L.) aethiopica</i>	Etiopía, Kenia	LCL, LCD, LMC
<i>Leishmania mexicana</i>	<i>L.(L.) mexicana</i>	México, Centroamérica	LCL, LCD
	<i>L.(L.) amazonensis</i>	América del Sur	LCL, LCD
	<i>L.(L.) venezuelensis</i>	Venezuela	LCL
	<i>L.(L.) gamhami</i>		
	<i>L.(L.) pifanol</i>		
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	<i>L.(V.) braziliensis</i>	Brasil, Centroamérica	LMC, LCL
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	Guyana, Surinam, Brasil	LMC, LCL
	<i>L.(V.) panamensis</i>	Panamá, Costa Rica, Colombia	LMC, LCL
	<i>L.(V.) peruviana</i>	Perú, Argentina	LMC, LCL

LCL, leishmaniosis cutánea localizada; LCD, leishmaniosis cutánea difusa; LMC, leishmaniosis mucocutánea; LV, leishmaniosis visceral.

Una vez los promastigotes de una especie son inoculados pueden ocurrir tres situaciones: a) la muerte de los parásitos, b) el establecimiento de una infección local, o c) la diseminación a través de la piel, de la mucosa oronasal o por vía sanguínea. La metástasis vía linfática es poco frecuente, ya que los parásitos son destruidos en los nódulos linfáticos.

En México, la forma más común es la leishmaniosis cutánea, esta forma clínica se conoce como “úlceras del chiclero” y es causada por *Leishmania (L.) mexicana*, mientras que en el Viejo Mundo se conoce como “botón de oriente” y se debe a otras especies de

*Leishmanias*²³. La leishmaniasis cutánea, el igual que la lepra, se presenta en forma bipolar, en la que la Leishmaniosis Cutánea Localizada (LCL) representa el polo “benigno” y los pacientes cursan con una intensa respuesta inmunitaria celular que lleva a la curación y, en el otro extremo del espectro se encuentra la Leishmaniosis Cutánea Difusa (LCD), que se caracteriza por anergia de la respuesta inmunitaria celular específica hacia antígenos de *Leishmania* y los pacientes cursan con una enfermedad progresiva que generalmente tiene un desenlace mortal¹⁷.

La leishmaniosis cutánea ocurre entre dos y cuatro semanas después de la picadura. Inicialmente los enfermos con LCL desarrollan una pápula asintomática, que se agranda y se transforma en una úlcera de bordes indurados y de coloración violácea en el sitio de la picadura. Las úlceras pueden ser únicas o múltiples (dependiendo del número de veces que fue picado el sujeto), redondeadas, fondo limpio e indoloras (si no están infectadas secundariamente con bacterias). Los individuos con LCL ocasionalmente se curan espontáneamente en un lapso de seis meses a dos años, excepto cuando la lesión es en la oreja, en donde se vuelve crónica y múltiple¹⁷.

La lesión en personas con LCL se caracteriza por un infiltrado inflamatorio consistente de macrófagos, linfocitos y células plasmáticas con áreas de necrosis focal. En fases tempranas de la infección se pueden detectar macrófagos infectados. Sin embargo, en fases tardías disminuyen éstos, prevalecen los linfocitos y se genera un granuloma con presencia de células gigantes (macrófagos fusionados debido a la persistencia de componentes antigénicos del parásito) rodeadas de un manguillo de linfocitos. Estos pacientes cursan con una buena respuesta inmunitaria celular con características tipo Th1 y producción de las citocinas IFN-gama, TNF-alfa e IL-2 que generan una intradermorreacción de Montenegro positiva. Cuando la invasión de las leishmanias queda limitada a los macrófagos de la zona de la picadura, como consecuencia de la respuesta de tipo celular, se presenta el cuadro clínico de la leishmaniasis cutánea, conocida en determinados casos como Botón de Oriente. Las células infectadas permanecen en la piel y quedan aisladas por un cúmulo de linfocitos, células plasmáticas y células gigantes que originan un granuloma que causa cambios en la estructura de la piel. Estos cambios pueden ser una hiperplasia y adelgazamiento de la piel, ulceración y desorganización del tejido conectivo²³.

En ocasiones no tiene lugar el aislamiento de la lesión primaria por una barrera linfocítica y el parásito se extiende, por diseminación cutánea directa, sobre toda la superficie cutánea, originando la leishmaniasis cutáneo difusa en la que es característica la débil respuesta inmunitaria, tanto celular como humoral²³ y es situada en el polo opuesto, que se caracteriza por la falta de respuesta inmunitaria celular hacia antígenos del parásito, permitiendo la diseminación incontrolada del parásito, con desarrollo de lesiones nodulares en toda la piel, con excepción de cuero cabelludo. En esta forma clínica, el parásito se disemina lentamente por el líquido tisular, por la linfa o por vía sanguínea. Los pacientes presentan invasión de mucosas orofaríngea y nasofaríngea con nódulos dolorosos que pueden llegar a obstruir las vías aéreas e impedir la deglución en los estadios finales del padecimiento; además, tienen lesiones en los genitales externos y en las plantas de los pies¹⁷. Generalmente los enfermos de LCD cursan con un desenlace mortal, en parte por problemas obstructivos en mucosas, que llevan a la inanición, la piel se adelgaza y se vuelve muy friable, por lo que frecuentemente se ulcera y se infecta secundariamente con bacterias como *Staphylococcus* o *Streptococcus*.

Las lesiones de pacientes con LCD presentan escasos datos de una respuesta inmunitaria celular efectiva; en toda la dermis se encuentran macrófagos altamente parasitados y pocos linfocitos. Se caracterizan por tener una respuesta Th2, debido a que los linfocitos CD4+ secretan citocinas supresoras de macrófagos como son IL-10, TGF- β e IL-4, que inhiben a los mecanismos leishmanicidas del macrófago (generación de radicales oxidantes y del óxido nítrico), lo cual permite la multiplicación incontrolada del parásito dentro de las vacuolas parasitóforas y, además bloquean la producción de las citocinas IFN- γ y TNF- α . En estos enfermos no hay datos de hipersensibilidad retardada cuando inyectan antígenos de *Leishmania* en la piel y son negativos para la intradermorreacción de Montenegro. También tienen títulos altos de anticuerpos antileishmania e hipergamaglobulinemia que refleja una activación policlonal de linfocitos B. Los pacientes con LCD habitualmente responden mal a los tratamientos, en parte debido al desarrollo de resistencia del parásito. Uno de los grandes enigmas en la leishmaniosis es la causa de la inhibición de la respuesta inmunitaria celular en personas con LCD. Se ha descartado al parásito, ya que las mismas especies que producen LCD (*L. mexicana*, *L. amazoniensis* y *L. aethiopica*) también pueden producir leishmaniosis cutánea localizada¹⁷.

La metástasis de los parásitos, muchas veces a partir de lesiones cutáneas primitivas, hacia las mucosas es el origen de la leishmaniasis mucocutánea (LMC) o espundia²³, cursa con invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea, resulta muy desfigurante. Las especies causantes de esta forma clínica pertenecen al complejo *L.(V.) panamensis* y *L.(V.) peruviana*. En Perú se conoce como “uta” y siempre se desarrolla después de que desaparecen las lesiones cutáneas; ocasionalmente puede presentarse hasta 20 años después. Generalmente las lesiones inician en la mucosa nasal y se propagan a la mucosa orofaríngea, a la laringe, y a la piel de nariz y labios. La muerte del paciente ocurre por neumonía, obstrucción laríngea, sepsis secundaria o inanición. Las lesiones se caracterizan por tener escasos parásitos y los daños son secundarios a la reacción inflamatoria que ocurre en la mucosa nasal, oral y faríngea, con destrucción del tabique nasal. Los tratamientos son muy prolongados y los enfermos generalmente son rechazados por su comunidad debido a las destrucciones faciales rutilantes que les confiere aspecto de leprosos. Las lesiones de pacientes con LMC tienen linfocitos CD4+ con características tanto de tipo Th1 como de tipo Th2, celular y humoral respectivamente; sin embargo, la respuesta sistémica es predominantemente tipo Th1. Las células mononucleares de sangre periférica proliferan y producen IFN-gama e IL-2, cuando se estimulan in Vitro con antígenos de *Leishmania*; la intradermorreacción de Montenegro es positiva¹⁷.

La visceralización del parásito, como consecuencia del fallo de la respuesta inmune de tipo celular, se conoce con el nombre de leishmaniosis visceral (LV)²³ o Kala-azar (fiebre negra) es causada por las especies de *Leishmania* (*L.*) *donovani* y *L. (L.) infantum* en el Viejo Mundo. La población en riesgo incluye niños menores de cinco años, los pacientes inmunodeprimidos y personas desnutridas¹⁷. En el sudeste europeo se calcula que entre el 25-70% de los casos de LV pertenecen a enfermos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)²³. Los primeros síntomas y signos clínicos aparecen después de un periodo de incubación de tres a ocho meses, aunque existen informes de periodos de incubación mucho más prolongados: hasta de 34 meses variable. El parásito alcanza vía linfática y vasos sanguíneos muchos órganos, especialmente el bazo, el hígado y la médula ósea¹⁷, pero puede haber afectación de otras áreas como pueden ser los pulmones y la mucosa intestinal. En los órganos afectados se forman pequeños granulomas

que dañan las vísceras al causar hiperplasia e hipertrofia de los mismos, congestión de los vasos sanguíneos, necrosis de los tejidos y alteraciones de su funcionamiento normal.

Los síntomas pueden iniciar gradualmente o de manera súbita. Una lesión granulomatosa papular temprana y en ocasiones transitoria se conoce como leishmanioma puede observarse en el sitio de la mordida del insecto¹⁷. Los principales síntomas de la LV son una fiebre alta, irregular y prolongada (más de dos semanas), acompañada de pérdida de peso y astenia, diarrea, tos, esplenomegalia que puede ir acompañada de hepatomegalia, que suele ser moderada, linfadenopatías y pancitopenia. La trombocitopenia puede dar lugar a desórdenes hemorrágicos tales como epistaxis y hemorragias intestinales las cuales junto con infecciones recurrentes tales como neumonía y sepsis son la mayor causa de muerte. Esta forma de la enfermedad tiene un 100% de mortalidad si no se da tratamiento y más del 15% para los pacientes eficientemente tratados. Después de la resolución de la infección visceral una leishmaniasis dérmica post-kala-azar se observa principalmente en pacientes de la India¹⁶. En la LV hay una importante respuesta humoral con elevadas tasas de anticuerpos específicos junto con una hipergammaglobulinemia policlonal, con producción de IgM e IgG, por activación de los linfocitos B. El incremento de anticuerpos da como resultado la aparición de inmunocomplejos circulantes que a veces se depositan en los riñones causando una glomerulonefritis. En contraposición, y tal como se ha comentado, se presenta una importante inhibición de la respuesta celular que conduce a una multiplicación incontrolada del parásito.

En los casos subagudos o crónicos, la sintomatología generalmente inicia con hepatoesplenomegalia, fiebre (intermitente y generalmente con dos picos al día), pérdida de peso, anemia, leucopenia (puede haber hasta $1,000/\text{mm}^3$) hipergammaglobulinemia y caquexia. La anemia puede ser grave y generalmente es normocítica y normocrónica; puede deberse a una combinación de factores que incluye hemólisis, sobrepoblación de macrófagos infectados en médula ósea, que desplaza la producción de eritrocitos, hemorragias, secuestro de eritrocitos en el bazo agrandado, hemodilución y efectos de $\text{TNF-}\alpha$. La presencia de bazo endurecido y hepatomegalia, de consistencia blanda, superficie lisa y borde filoso son signos característicos. La piel es seca y delgada y puede haber caída de pelo. En etapas avanzadas aparecen edema periférico y sangrados. Las personas con LV progresiva tienen una respuesta inmunitaria con características tipo Th2

con secreción de IL-10, por lo cual con negativas en la prueba de intradermorreacción de Montenegro. Presentan hipergamaglobulinemia asociada a la activación policlonal de linfocitos B y la mayoría también presentan complejos inmunitarios circulantes y factores reumatoides (que generalmente son anticuerpos Ig M anti la región constante de Ig G). El nivel de globulinas séricas puede incrementar mucho (hasta 9 g/dl) y la relación globulina/albúmina es muy alta. Los riñones muestran signos de depósito de complejos inmunes y los enfermos pueden cursar con una glomerulonefritis leve que por lo general se asocia con insuficiencia renal. Estos pacientes pueden curar con tratamientos muy prolongados. Los pacientes presentan un viraje de su respuesta inmunitaria hacia una tipo Th1 después del tratamiento exitoso, sus células responden al estímulo con antígenos del parásito mediante producción de IFN-gama e IL-2 y se vuelven positivos a la intradermorreacción de Montenegro. Sin embargo, en la LV, al igual que en las otras formas clínicas, el tratamiento exitoso nunca elimina totalmente al parásito, ya que este permanece latente en algunas células, una de las cuales podría ser la célula de Langerhans, que carece de los mecanismos leishmanicidas potentes del macrófago. Las personas infectadas pueden permanecer asintomáticas, mientras no cursen con una inmunodepresión, lo que permitiría que el parásito se multiplique nuevamente¹⁷.

En enfermos con la coinfección VIH-*Leishmania* el cuadro clínico puede ser parecido, aunque suelen presentarse localizaciones atípicas debido a la anergia de los pacientes. En estos pacientes, la enfermedad puede cursar sin esplenomegalia y con lesiones nodulares o ulcerativas a nivel del tracto gastrointestinal y pulmonar; además, el número de parásitos en la médula ósea suele ser elevado²³. La LV ha surgido como un problema de salud pública en pacientes inmunodeprimidos con VIH, principalmente en la región del Mediterráneo. En esta zona el reservorio natural es principalmente el perro. En la LV los parásitos se encuentran en forma masiva dentro de macrófagos hepáticos (células de Kupffer), esplénicos y de médula ósea, provocando una hipertrofia progresiva. El bazo se agranda mucho debido a que los folículos linfoides se reemplazan por células mononucleares infectadas. La fiebre se debe a la liberación de pirógenos endógenos (como TNF- α , IL-1 e IL-6) por los macrófagos infectados, mismos que inducen la liberación de prostaglandina E2 (PGE₂) por células del hipotálamo y ésta, a su vez, actúan sobre el centro termorregulador del hipotálamo. Además el TNF- α causa caquexia y desgaste de tejido

graso y muscular que sufren estos enfermos debido al efecto catabólico y anoréxico que ejerce la citocina. Las manifestaciones clínicas resultan de una combinación de factores del parásito y genéticos del hospedero¹⁷. La muerte generalmente ocurre debido a infecciones bacterianas o virales en pacientes debilitados con anemia grave.

Los medicamentos de elección son costosos, se tienen que administrar vía intravenosa y generalmente están asociados con severos efectos colaterales y progresivamente se confrontan con la resistencia parasitaria, de ahí la urgencia de la búsqueda de nuevos medicamentos con actividad leishmanicida¹⁶.

I.2.1.8 Tratamiento

El tratamiento de leishmaniasis es problemático debido a que los medicamentos disponibles requieren de administración parenteral repetida, no son efectivos en todos los casos y la mayor parte se asocian con efectos tóxicos colaterales. Los antimoniales pentavalentes como el glucantime (antimoniato de meglumina) y el pentostam (stibogluconato de antimonio y sodio) fueron desarrollados a mediados del siglo pasado y siguen siendo los fármacos de elección para todas las formas clínicas¹⁷. El estiboglucano de sodio usualmente es administrado a una dosis de 20 mg/kg de peso por 20 a 40 días, es de igual forma empleado en los casos de resistencia a antimoniales y se recomienda un tratamiento por 4 meses, el cual es caro y potencialmente tóxico, el tratamiento puede repetirse en intervalos de 15 días hasta tres veces²². La aplicación de glucantime en forma intralesional, aunada a la aplicación parenteral, ha dado buenos resultados en México. Aunque los antimoniales pentavalentes generalmente son bien tolerados, ocasionalmente puede haber efectos colaterales como dolor abdominal, náusea, vómito, malestar general, incremento de niveles de transaminasas, nefrotoxicidad, debilidad, mialgias, artralgias, fiebre, tos, neumonitis y eritema. Ocasionalmente se observan cambios en el electrocardiograma y los efectos más graves incluyen arritmias y a veces se ha informado la muerte súbita asociada a dosis muy elevadas de la droga. El costo elevado, los efectos tóxicos secundarios y el surgimiento de formas resistentes han llevado a la búsqueda de nuevos fármacos¹⁷.

Si el tratamiento con antimoniales pentavalentes no tiene éxito una preparación de diamidina aromática, isotionato de pentamidina o sulfonato diamitina de pentamidina

(lomidina) es empleado. Ambos compuestos son muy efectivos en el tratamiento del Kala-Azar pero debido a su toxicidad y efectos secundarios potenciales son empleados como drogas de segunda elección. La pentamidina interactúa selectivamente con el DNA del quinetoplasto, causando la pérdida de su estructura, además, inhibe la polimerasa de RNA, otras funciones ribosomales y la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y fosfolípidos, causando disminución de fosfolípidos de membrana¹⁷. Los efectos tóxicos secundarios de la pentamidina incluyen sensación de ardor, cefalea, dolor precordial, náuseas, vómitos e hipotensión. El efecto secundario mas serio es la hipoglucemia la cual se presenta cuando hay daño hepático irreversible, la hiperglicemia y pancreatitis aguda también pueden presentarse produciendo una diabetes. La pentamidina es generalmente efectiva en contra de todas las formas de leishmaniasis. Aún así una alta proporción de pacientes con leishmaniasis visceral no responde al tratamiento en Kenia, India y China debido al incremento en la resistencia²².

Los medicamentos utilizados en los casos de resistencia a glucantime son deoxicolato de anfotericina B e isotiocianato de pentamidina, ambos son alternativas tóxicas, un sustitutivo menos tóxico es anfotericina B encapsulada en liposomas (AmBisome), que ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de LV en Estados Unidos¹⁷. La anfotericina B es otro medicamento de segunda elección en el tratamiento de la leishmaniasis es un antibiótico macrólido y actúa en los esteroides y fosfolípidos de la membrana celular de *Leishmania spp.* Es muy activo, *in vitro*, matando las formas extra e intracelulares de *Leishmania* a concentraciones de 1 mg por mL de medio. En hamsters y monos infectados con *L. donovani*, la anfotericina B fue 400 veces mas potente que el estibogluconato de sodio. La anfotericina B es inestable en un pH neutro y cuando es expuesta a la luz y al aire, es formulada como una suspensión coloidal la cual es administrada como una infusión intravenosa. Los efectos secundarios comunes incluyen anafilaxia, trombocitopenia, estornudos, dolor generalizado, escalofríos, fiebre, flebitis, anemia, convulsiones, anorexia, decremento de la función glomerular y renal tubular, hipocalemia en cerca de la tercera parte de los pacientes tratados. La anfotericina B se une preferentemente a los esteroides tales como el ergosterol, la cual es el principal esteroide de las membranas celulares de *Leishmania* más no de las membranas celulares de los mamíferos, se une preferentemente a los 24 esteroides sustituidos y en menor grado al colesterol de las

membranas del humano, lo que subraya su toxicidad. En la India Mishra y col, emplearon dosis bajas de 0.5mg/Kg de peso en días alternados por poco tiempo (14 días) y obtuvieron el 100% de la cura con muy baja toxicidad en pacientes con LV²².

La aplicación tópica diaria durante un mes de 15% de paromomicina con 12% de metilbencetonio disueltos en parafina blanda ha tenido éxito para el tratamiento de leishmaniasis cutánea causada por *L. major*. Sin embargo, es tóxica en el 50% de los pacientes que la reciben por vía intravenosa o intramuscular. Sus efectos adversos incluyen taquicardia, náusea, vómito, mareo, hipotensión e hipoglicemia por toxicidad sobre las células beta del páncreas; la hipoglicemia puede convertirse en diabetes insulín dependiente. El alopurinol administrado en forma oral y otros análogos de purinas se han utilizado con éxitos variables. Un imidazol antifúngico, el ketoconazol no tiene actividad sobre *Leishmania (L.) mexicana*, sin embargo es activo contra *Leishmania (V.) braziliensis*. Se han utilizado distintas formas de crioterapia y, debido a la susceptibilidad del parásito al calor, se ha realizado hipertermoterapia de aplicación local con éxitos variables. Dos estudios piloto recientes realizados en la India y Brasil han revelado que miltefosine por vía oral está surgiendo como excelente alternativa, es un derivado de fosfolípidos que originalmente fue desarrollado para el tratamiento del cáncer mamario. Su aplicación oral está teniendo éxitos muy promisorios para el tratamiento de leishmaniasis, sin embargo, debido a que es teratogénico, no es aplicable en mujeres en edad reproductiva a menos que estén tomando anticonceptivos^{17 y 22}.

Existen nuevas formulaciones para medicamentos empleados tres preparaciones comerciales de lípidos asociados a la anfotericina B (LAAMB) actualmente bajo prueba para el tratamiento de la leishmaniasis, AmBisome (Vestar, USA) Amfocil (Liposome technology inc, USA) y complejo lipídico de anfotericina B (Bristol Meyers Squibb, USA). El mecanismo de acción de LAAMB es que el componente lipídico reconocerá los receptores celulares específicos y así el medicamento puede dar en el blanco en sitios particulares de la infección, por lo tanto más drogas estarán disponibles para interactuar con la membrana de ergosterol del parásito, y reaccionaran menos con el colesterol humano reduciendo así los efectos tóxicos. Estas moléculas lipídicas también son fagocitadas por los macrófagos por lo tanto la droga es liberada exactamente en el lugar específico que los parásitos infectan²².

Ambisoma, es anfotericina B incorporada dentro de los liposomas hechos a base de fosfatidilcolina, colesterol y disterol fosfatidilglicerol. Este medicamento ha sido empleado con éxito en el tratamiento de paciente con LV que no responden a los medicamentos estándar. La amfocilina es una suspensión coloidal de sulfato de holesterol de anfotericina B. En hamsters infectados con *L.donovani*, la amfocilina fue de 4-15 veces más efectiva que la anfotericina B convencional. Investigaciones en pacientes con LV han mostrado resultados prometedores. El complejo lipídico de anfotericina B, consiste de lípidos como el dimiristoil fosfatidilglicerol y dimiristoil fosfatidilcolina. La amfocilina causó efectos secundarios incluyendo escalofríos, fiebre, aumento en la frecuencia respiratoria y reacción febril aguda presentaron 80% de los pacientes durante la infusión, síntomas que cesaron con la administración de un agente antiinflamatorio, tal como el potasio de diclofenaco administrado todos los días antes de cada infusión de amfocilina. Debido a estas reacciones adversas peligrosas, amfocil esta únicamente indicado para adultos mientras que la ambisoma puede emplearse en todas las edades ^{Loc. cit.}.

La emergencia de resistencia a los medicamentos por parte de los parásitos de *leishmania* es el mayor obstáculo para su control. La carencia de respuesta a los antimoniales pentavalentes en cerca del 5-70% de los pacientes en algunas áreas endémicas de leishmaniosis visceral ha sido un problema por muchos años y se esta incrementando en el mundo entero. Sin el prospecto de una promesa real de una vacuna en un futuro cercano, hay una urgente necesidad de desarrollar nuevos y mejores medicamentos. Entre los nuevos medicamentos actualmente bajo evaluación clínica son aminosidina (Paromomycin), imidazoles y triazoles y análogos de la purina (alopurinol). Los trabajos tardíos sobre el principio de que *leishmania* es inhábil de sintetizar purinas, el alopurinol es hidrolisado a alopurinol riboside, un análogo de la inosina. Este nucleósido es incorporado en lugar del ATP dentro del RNA leishmánico, interfiriendo con la síntesis normal de proteínas. El Alopurinol solo no ha tenido mucho éxito en el tratamiento de la leishmaniosis, sin embargo el efecto sinérgico del alopurinol con el estiboglucano de sodio ha sido útil en el tratamiento de cinco casos de LV resistentes a antimoniales en Kenia. Otro medicamento que esta mostrando resultados óptimos es la aminosidina. Este es un antibiotico de la familia de los aminoglucósidos. Investigaciones clínicas en la India y Kenia han

demostrado que cuando la aminosidina es usada en combinación con el estiboglucano de sodio es efectiva en el tratamiento a leishmaniosis visceral arreactiva ^{Loc. cit.}.

Otra alternativa terapéutica es la inmunoterapia empleada para mejorar la acción de medicamentos antileishmánicos. Una de los métodos empleados es el uso de interferón gamma (INF-gamma) para el tratamiento de la leishmaniosis visceral. Las células mediadoras del sistema inmune fallan en el reconocimiento de antígenos leishmánicos, INF-gamma aumenta la respuesta a la muerte intracelular de los parásitos de *leishmania spp.* y disminuye la dosis de antimoniales requeridos para la inhibición o muerte de *leishmania spp.* En Brasil, una combinación de estiboglucano de sodio y INF-gamma recombinante han sido utilizados para mejorar el tratamiento de 6 de 8 pacientes con LV refractaria. Un estudio temprano en Brasil, reportó un intervalo del 46% de éxito y otro estudio en India en pacientes con Kala Azar produjo un rango de cura del 69%. El tratamiento con INF-gamma es conocido por producir solo efectos colaterales menores los cuales son usuales de las terapias cintoquinas. Fiebre y síntomas parecidos a un resfriado son efectos colaterales comunes y fueron fácilmente aliviados con medicamentos antipiréticos. El tratamiento con INF-gamma unicamente ha demostrado producir disminución en el número de parásitos de *L. donovani* en aspirados esplénicos, como sea INF-gamma es mejor empleado en combinación con drogas antimoniales ^{Loc. cit.}.

A pesar de estas estrategias para el tratamiento de la leishmaniasis, la aparición de resistencia a éstos fármacos es un problema, por lo que se necesita de otras alternativas para combatir estas resistencias. Una de estas propuestas es la utilización de productos naturales provenientes de los metabolitos secundarios de las plantas.

I.2.2. Flavonoides

I.2.2.1. Estructura

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etc. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente

distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana²⁵.

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C₂ (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950²⁵.

Los flavonoides son un extenso grupo de compuestos polifenólicos²⁵ que poseen un bajo peso molecular y comparten el esqueleto común de difenilpiranos²⁶, o sea, un núcleo básico de flavanos con dos anillos aromáticos o bencénicos (anillos A y B), interconectados mediante un anillo heterocíclico de tres átomos de carbono, pirona (anillo C). La mayoría de los flavonoides distribuidos contienen un doble enlace entre C-2 y C-3 y una cetofunción en C-4 del anillo C, el cual se une al anillo B en C-2 (flavona) o en C-3 (isoflavona). Como resultado de modificaciones posteriores en los tres anillos, particularmente en el anillo C, los flavonoides representan una de las más extensas y diversas clases de metabolitos secundarios en las plantas³⁸. Su estructura puede ser abierta o cerrada. En los anillos aromáticos se presenta sustitución por uno o más grupos hidroxilo, por lo que son polifenólicos y, por esto, fuertemente ácidos²⁹. Los flavonoides contienen en su estructura química grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante por ello desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer²⁵.

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azucarado más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glucósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales

libres que su aglicona o flavonoide respectivo²⁵. El azúcar puede unirse al grupo fenólico por un enlace de éter (O glicósidos), o directamente al núcleo de flavonoides por un enlace carbón carbón (C glucósidos)²⁹.

En la naturaleza se encuentran también ampliamente distribuidos los flavonoides metilados, principalmente en las posiciones -3, -7 y -3', la metilación en la -4' es menos común, y en la -5' es rara. La metilación en los flavonoides enmascara a los grupos fenólicos reactivos y al mismo tiempo, cambia sus propiedades físicas significativamente, los hace solubles en éter cuando eran hidrofílicos. También se pueden entrelazar con puentes de hidrógeno para formar complejos moleculares menores, o bien, pueden ligarse otra clase de constituyentes vegetales tales como proteínas²⁹.

I.2.2.2 Clasificación

La variación en el estado de oxidación del anillo central de pirano de los flavonoides, da lugar a una diferenciación entre estos compuestos. Basándose en lo anterior, se han identificado, hasta ahora, 14 tipos de flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, chalconas, dihidrochalconas, auronas, isoflavonoides, antocianidinas, leucoantocianidinas, neoflavonoides, biflavonoides, rotenoides y pterocarpanos²⁹.

Flavonas

“Flavona” es la raíz de la cual se deriva de la palabra flavonoide. En las flavonas están presentes los dos anillos de benceno A y B, y en el anillo C existe un doble enlace en la posición 2-3. Aunque actualmente se conocen alrededor de 128 flavonas, las más extensamente distribuidas son la apigenina y la luteolina, tanto libres o como glicósidos, encontrándoseles en las hojas de angiospermas.

Flavanonas

Las flavanonas difieren de las flavonas en la falta del doble enlace en la posición 2-3. Aun no se han encontrado en la naturaleza, flavanona sin sustituyentes, sin embargo las hidroxiladas son muy comunes, ya sea libres o como glucósidos, siendo la más simple 7-

hidroxiflavanona. Como ejemplos de flavanonas, están la naringina, la prunina y la hesperidina.

Flavonoles

Difieren de las flavonas en que tienen un sustituyente hidroxilo en la posición -3. Los más comunes son el kaempferol, la quercetina y la miricetina. Los flavonoles son prácticamente ubicuos en angiospermas leñosas, aparecen menos frecuentemente en angiospermas herbáceas y, excepcionalmente, en plantas inferiores.

Dihidroflavonoles

Están constituidos por el mismo sistema de anillos fundamental de las flavanonas, pero un sustituyente hidroxilo en la posición -3. También se les llama 3-hidroxiflavanonas o flavanonoles. El 7-hidroxidihidroflavonol es el más simple conocido en la naturaleza. Estos compuestos son intermediarios obligados en la biosíntesis de otros flavonoides. Los dihidroflavonoles se han encontrado solamente en algunas familias del reino vegetal: Leguminosas, Rutáceas, Anacardiaceas, Moráceas, Ericáceas y otras, pero la información disponible es limitada.

Chalconas

Las chalconas son flavonoides de cadena abierta, en los cuales los dos anillos aromáticos se unen por un sistema carbonilo a-b instaurado de tres carbonos. Chalcona, sin sustituyentes, no ha sido encontrada como producto natural, pero si hidroxilada en mayor o menor grado. El patrón de sustitución en el anillo A generalmente está basado en un sistema floroglucinol (2', 4', 6'-trihidroxil-), puesto que esta parte de la molécula deriva de unidades de acetato. Como el anillo B se origina de un precursor fenilpropanoide, comúnmente exhibe un patrón de 4-mono-, ó 3,4-di-, ó 3,4, 5-trihidroxilación.

Dihidrochalconas

La reducción del doble enlace (a-b al carbonilo) en una chalcona produce una dihidrochalcona, la cual se ha encontrado poco en la naturaleza pero, sin embargo, se conoce su presencia desde 1835. Se ha aislado dihidrochalcona sin sustituyentes de *Phallus*

impudicus, y algunas dihidrochalconas hidroxiladas como la floridzina encontrada en el manzano y en algunas especies de rosáceas, ericáceas, fagaceas, leguminosas y salicáceas.

Auronas

Las auronas están basadas en un sistema de 2-bencilidenocoumarona y su estereoquímica es Z. Esta clase de flavonoides puede ejemplificarse con la sulfuretina (6,3', 4'-trihidroxiaurona) que se ha reportado en flores de *Bidens sp* y *Dahlia sp* y en la madera *Schinopsis sp*.

Antocianidinas

Las antocianidinas carecen del grupo carbonilo en la posición -4 y pueden tener residuos de azúcares (glucosa, galactosa, arabinosa, fructosa) unidos a los sustituyentes hidroxilo. Las antocianidinas naturales son importantes pigmentos vegetales y su coloración se puede relacionar con el número de grupos hidroxilo del anillo B. Así, con un hidroxilo, como la pelargonidina, son de color escarlata; con dos hidroxilos, como cianidina, son de color carmesí; y con tres, como la delfinidina, son púrpura. Son particularmente abundantes en flores coloreadas.

Leucoantocianidinas

Las leucoantocianidinas son flavan -3,4-dioles incoloros que hacen soluciones rojas con ácido, debido a que se convierten en antocianidinas. Han sido aisladas principalmente de madera y corteza de árboles, particularmente de especies de Acacia. Este grupo se puede ejemplificar con la leucofisetinidina, aislada de *Schinopsis lonentzii*.

Isoflavonoides

Los isoflavonoides difieren de los otros flavonoides en que tienen el anillo B en la posición -3, en lugar de la -2. En este grupo están incluidos muchos productos naturales como isoflavonas, isoflavanonas, rotenoides, pterocarpanos y coumestanos. Las isoflavonas son las más comunes de los isoflavonoides y son características de la familia a las leguminosas, especialmente la subfamilia Lotoideae, aunque hay registros ocasionales de su presencia en: amarantáceas, iridáceas, miristicáceas y rosáceas. Las isoflavanonas carecen

del doble enlace 2-3, así que se relacionan con las isoflavonas de la misma manera que las flavanonas con las flavonas. El primero de estos compuestos aislados fue la padmakasteína, de la corteza de *Prunus pudum*.

Rotenoides

Estos compuestos tienen como base estructural un sistema de cuatro anillos, cromancromanona. Son isoflavanonas modificadas por un átomo de carbono adicional. Actualmente se conocen 15 rotenoides, de los cuales el más abundante y a la vez el primero en aislarse es la rotenona.

Pterocarpanos

Se da este nombre a los compuestos derivados del sistema coumaranocromano. Por muchos años se conocieron la pterocarpina, y la homopterocarpina. Comúnmente se les encuentra en el corazón de la madera de géneros tropicales de leguminosas, principalmente de la subfamilia *Lotoidae*. En otras leguminosas, los pterocarpinos se han encontrado en las raíces de las plantas. La mayoría de estos compuestos tienen actividad fungicida.

Neoflavonoides

El término neoflavonoide se usa para describir un grupo de compuestos naturales con un esqueleto 4-arilcromano. El primero de estos compuestos aislado fue calofilolide y después de unos años se aisló la dalbergina.

Bioflavonoides

Actualmente pueden definirse como el producto del acoplamiento oxidativo de dos unidades de chalcona y una modificación subsecuente de la unidad central. Algunos se pueden clasificar en 6 grupos, dependiendo de los carbonos con los que se enlazan las dos unidades. Así, por ejemplo, el enlace carbón-carbón puede estar entre las posiciones -3' y -8', como en el grupo de la amentoflavona, o entre las -6 y -8'', como en el grupo de la agatisflavona, entre las 8' y -8', como en el de la cupressuflavona, entre las -6 y -3''', como en el de la robustaflavona, o entre las -3 y -8'' como en el de la garcinia; o, si están unidas

por un enlace carbón-oxígeno entre las posiciones -6 y -4'', como en el grupo de la hinokiflavona²⁹.

1.2.2.3 Biosíntesis y localización en la planta

Los flavonoides se sintetizan en las plantas y participan en la fase dependiente de luz de la fotosíntesis, durante la cual catalizan el transporte de electrones. Su formación tiene lugar a partir de los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina y también de unidades de acetato. La fenilalanina y la tirosina dan lugar al ácido cinámico y al ácido parahidroxicinámico, que al condensarse con unidades acetato, originan la estructura cinamol de los flavonoides. Posteriormente se forman los derivados glucosilados o sulfatados²⁵.

Los flavonoides son biosintetizados por una combinación de ambas vías biosintéticas, la del ácido shikímico y la del malonil-CoA. El compuesto obtenido por la vía biosintética del ácido shikímico, p. ej. Ácido cinámico, es luego utilizado como compuesto de partida para la vía del malonil-CoA, en la cual se le adicionan tres acetatos. Con la posterior ciclación se obtiene la estructura clásica de los flavonoides, en la cual el anillo A se formó por la vía del malonil-CoA, mientras que el anillo B se formó por la vía del ácido shikímico, y el puente de tres carbonos proviene de la adición de fosfoenolpiruvato. Con sucesivas hidroxilaciones y reducciones se forman los diferentes flavonoides, con la opción de una glucosidación final²⁷.

La biosíntesis de flavonoides es afectada por una larga serie de factores naturales, tales como: la luz, la atmósfera, presencia de auxinas o inhibidores, nutrición de la planta, presencia de carbohidratos y minerales, la temperatura, el agua y la presencia de patógenos.

Aunque se saben que se almacenan en las vacuolas, existe controversia acerca de la parte de la célula en donde son sintetizados, al respecto existen dos opiniones: en una se cree que son sintetizados en las vacuolas y ahí permanecen sin entrar en contacto con enzimas citoplásmicas ni organelos, mientras que en la otra se cree que se sintetizan en el citoplasma, en los plastidos y una parte es transportada después a las vacuolas²⁹.

Los flavonoides se localizan prácticamente en todas las partes de las plantas, inclusive en los frutos, el pólen, la raíz y el corazón de la madera. Se le encuentra en forma libre (agliconas), o bien como glucósidos o derivados metilados. En el caso de los

pigmentos, la glucosilación es de gran importancia ya que los hace solubles en la savia, los protege de la oxidación enzimática y los hace fotoestables. También es importante porque de esta forma, se pueden conservar en las hojas materiales tóxicos como formas inactivas. Al respecto, se ha encontrado que los flavonoides libres son mucho más bioactivos que los correspondientes derivados glicosídicos²⁹.

Los flavonoides metilados son muy liposolubles y se piensa que se almacenan en el citoplasma de las células y en la cara superficial de las hojas²⁹. Por lo que los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las parte de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercitina 4'-D-glucósidos. En la uva estas moléculas se localizan en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las pepitas²⁵.

Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre.

I.2.2.4 Función que desempeñan los flavonoides en la planta

La naturaleza etanólica de estos compuestos les confiere una gran solubilidad en los fluidos biológicos, por lo que pueden moverse fácilmente a través de las membranas biológicas. De ahí se predice que los flavonoides tienen influencia sobre una amplia variedad de fenómenos biológicos, puesto que las membranas son un importante medio con el cual los organismos controlan su bioquímica²⁹.

También hay flavonoides que actúan como inhibidores de enzimas o como precursores de sustancias tóxicas²⁹.

Los efectos de los flavonoides como inhibidores o promotores de crecimiento de plantas también han sido estudiados, concluyéndose que están estrechamente relacionados con las hormonas de crecimiento. Se ha encontrado que la inhibición o promoción del crecimiento que un flavonoide produce, está en función principalmente de su patrón de

hidroxilación, los 4-hidroxi flavonoides aumentan la actividad enzimática, mientras que los 3' ó 4'-hidroxi flavonoides son inhibidores²⁹.

Así también, se ha establecido que la naringenina es un inhibidor de crecimiento. Los flavonoides también tienen injerencia en la respiración y la fotosíntesis de las plantas³⁵.

Puesto que los flavonoides inician, promueven o inhiben el crecimiento de plantas provocando cambios morfológicos, los cuales pueden a su vez alterar el tiempo o secuencia del desarrollo reproductivo, se dice que están relacionados también con la morfogénesis y determinación de sexo de las plantas. Sin embargo existe controversia en considerar o no a los flavonoides como fitohormonas sexuales²⁹.

Las antocianinas son protectores de los rayos UV, ya que actúan absorbiendo los rayos UV con un radio entre 270 y 290 nm, por lo que son consideradas como fuertes absorbentes de UV-B, moderando el daño de ADN, proteínas, y membranas en las plantas que crecen en ambientes con altas concentraciones de UV-B³¹.

Debido a su actividad antioxidante los flavonoides protegen a la planta de los incrementos o decrementos de la temperatura ambiental, ya que está demostrado que cuando la planta es sometida a este tipo de estrés, ésta incrementa la producción de flavonoides³¹.

Los flavonoides participan en la resistencia a los niveles elevados de metales en la tierra, ya que los flavonoides se unen a los metales, evitando el proceso oxidativo. También están involucrados en la reproducción de la planta, tanto en tejidos como en semillas. Esto debido a su protección de los rayos UV y a su actividad antioxidante³¹.

Los flavonoides desempeñan un papel de gran importancia en las relaciones ecológicas de las plantas con otros organismos tales como otras plantas, insectos benéficos o predadores y animales²⁹. Por ejemplo los isoflavonoides actúan como fitoalexinas, las cuales pueden definirse como compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular. Tanto los isoflavonoides, isoflavonas, isoflavanos e isoflavanonas, son extremadamente tóxicas para los patógenos fúngicos. Ya que inhiben la germinación de las esporas fúngicas. Ciertos flavonoides son usados por la planta para protegerla de la invasión de parásitos³¹.

Las innumerables coloraciones azules, moradas, violeta y colores cercanos al rojo, presentes en las células de flores, frutos, hojas y tallos de plantas, se deben a pigmentos de

antocianidinas. Estos mismos compuestos son los que colorean los jugos de frutas y vinos²⁹.

Así también, los pigmentos amarillo brillante que contribuyen a dar esa coloración a muchas flores, se deben a otros flavonoides de los tipos chalconas y auronas. Aunque la mayoría de las flores amarillas deben su color a la presencia de carotenoides. Colorean también el material de otros tejidos como la madera, hojas y semillas de algunas plantas²⁹.

Así, estos flavonoides tienen un papel ecológico establecido en proveer de colores atractivos a las flores para promover la polinización y la dispersión de frutos y semillas, ya que la mayor parte de las correlaciones entre el color de las flores y los tipos de insectos que las visitan, son atribuidas en gran parte, a los flavonoides²⁹.

Es bien conocido que los insectos tienen sistemas visuales que les permiten ser particularmente sensitivos a los colores de las flores. Estos compuestos producen patrones coloridos que, para el insecto, pueden prometer alimento, producir repulsión, enojo, ataque y, como consecuencia, polinización; o bien desanimar al polinizador de visitar otra vez la misma flor y así aumentar la probabilidad de que visite un miembro no polinizado de la misma especie²⁹.

Los flavonoides, como muchos metabolitos secundarios, pertenecen a un complejo sistema químico de defensa de la planta contra sus competidores y sus enemigos, entre los que se incluyen herbívoros y microorganismos patógenos, ya que muchos de ellos son tóxicos para animales y otras plantas, o al menos repelentes. A esta relación bioquímica se le llama alelopatía²⁹.

Las fitoalexinas son metabolitos secundarios que la planta sintetiza cuando se ve atacada por hongos y bacterias patógenos. De las fitoalexinas conocidas hasta la fecha, la mayoría son flavonoides, y específicamente pterocarpanos. También algunas flavanonas, dihidroflavonoles e isoflavonas poseen actividad fungicida notable, tales como la formononetina, la dizdeína, la genisteína y la prunetina²⁹.

En el caso de los insectos, la toxicidad de flavonoides comunes se ha demostrado en *Hehothis viresens*, *H. zea* y *Pectinophora gossypiella* (gusano rosado). Cuando su alimentación contiene bajas concentraciones de quercetina, y tres de sus glucósidos, lo repelen, y cuando se les aplica en la dieta concentraciones arriba de 0.2%, estos flavonoides matan la larva. Sólo un grupo de flavonoides se conoce como especialmente tóxico para

insectos, este es el de los rotenoides, presentes en *Lonchocarpus nicou* y en *Derris elliptica*, los cuales son usados comercialmente como insecticidas²⁹.

El principal papel de los flavonoides incoloros, presentes en el tejido de las hojas, es el de proveer a la planta de sustancias químicas contra herbívoros, ya que su sabor, de amargo hasta dulce, las hace en general, desagradables para estos o actúan como inapetentes en algunos casos. Se ha descubierto también que algunos isoflavonoides tienen actividad estrogénica en mamíferos y se han aislado compuestos activos, principalmente de *trifolium subterraneum*, *T. repens* y *Medicago sativa* (alfalfa). Se ha demostrado que los compuestos más activos tienen dos sustituyentes hidroxilo en posición "para" en cualquier anillo²⁹.

1.2.2.5 Distribución

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, ginko biloba, cardo, mariano o crataegus. El vino tiene un alto contenido en compuestos polifenólicos, aproximadamente se conocen unos 500, la mayoría de los cuales provienen de la uva y del proceso fermentativo. Su cantidad y tipo depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo. La cerveza también contiene importantes cantidades de flavonoides entre los que destacan los polihidroxiflavanos (catequina y epicatequina), los antocianógenos (leucocianidina o leucopelargonidina) y los flavonoles (grupo de quercitinas: kaempferol o mirecitina)²⁵.

Catequinas, flavonoles, y proantocianidinas son abundantes en frutas. En contraste flavanonas y flavonas están restringidas a variedades de cítricos tales como la naranja y el limón. Las flavonas también se encuentran en algunos vegetales tales como apio, chiles dulces, y lechuga. Catequinas y procianidinas, no se encuentran en hojas verdes o raíces de vegetales pero han sido encontradas en legumbres tales como frijoles verdes. El tomate es el único vegetal que posiblemente contiene las flavononas naringenina y hesperidina. Especies de ajo y cebollas rojas representan una fuente rica de quercetina. Vegetales tales como brócoli, col rizada, col y coles de brucas tienden a contener mezclas complejas de

flavonoles, con significativas cantidades de kaempferol y glucósidos de mirecitina presentes en adición a conjugados de quercetina.

Se han identificado más de 5,000 flavonoides, entre los que se pueden destacar:

1. Citroflavonoides: quercitina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócolis, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los ollejos de las naranjas y limones. La naringenina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.
2. Flavonoides de la soya o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soya tales como porotos, tofu, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeína.
3. Proantocianidinas se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.
4. Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.
5. Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.
6. Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.
7. Kaempferol: aparece en puerros, brócoles, rábano, endibias y remolacha roja²⁵.

Algunos tipos de flavonoides están más extensamente distribuidos que otros, así, las flavonas, flavonoles y antocianidinas son universales, mientras que las isoflavonas y los bioflavonoides se encuentran solo en pocas familias de vegetales²⁹.

I.2.2.6 Biodisponibilidad, absorción y metabolismo de los flavonoides

El metabolismo de los flavonoides es intenso y una parte se excretan por la orina. La transformación de los flavonoides tiene lugar en dos localizaciones: en primer lugar en el hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I en las que se introducen o exponen grupos polares; en segundo lugar en el colon mediante reacciones de biotransformación de fase II, en las que los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos. La conjugación con el ácido glucurónico, sulfatos, o glicina, parecen tener

lugar tanto para los flavonoides como para sus metabolitos procedentes del colon. Los conjugados, solubles en agua, pueden excretarse por la orina²⁵.

Para evaluar los efectos biológicos de los flavonoides, así como de cualquier fármaco o componente alimenticio, uno de los más importantes aspectos es la biodisponibilidad, en la que influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución y eliminación²⁵.

I.2.2.7 Propiedades biológicas y usos

A los flavonoides se les atribuyen numerosas actividades fisiológicas, lo que ha dado lugar a varias revisiones de sus efectos farmacodinámicos³⁸. Numerosos compuestos, en su mayoría del tipo de las flavonas, han sido reportados hasta ahora como bioactivos; así, algunos actúan como estimulantes cardíacos, otros, como la hesperidina fortalecen los vasos sanguíneos débiles. También, algunas flavonas altamente hidroxiladas actúan como diuréticos y como anticoagulantes de grasas²⁹.

Los derivados de las flavonas, tales como el producto de condensación de la 7-hidroxi flavona y el bromoacetato de etilo, poseen actividad vasodilatadora de la coronaria. En pruebas clínicas realizadas en Italia, se ha encontrado que este producto es más efectivo y menos tóxico que la nitroglicerina²⁹.

También ha sido reportada la acción anticancerígena, antiaterogénica, debido a su protección antioxidativa del ADN y de las lipoproteínas de baja densidad, modulación de la inflamación, inhibición de la agregación plaquetaria, efectos estrogénicos y modulación de la expresión del receptor de adhesión³¹. Algunas flavonas han presentado actividad antihistamínica, espasmolítica, anticonvulsivante, analgésica y broncodilatadora. Propiedades citotóxicas y antivirales han sido reportadas también para ciertas flavonas, así como propiedades antiinflamatorias, principalmente de los biflavonoides²⁹.

Es conocido que los flavonoides inhiben la función de muchas proteínas de unión al ATP, tales como la ATPasa mitocondrial, miosina, ATPasa de membrana de Na/K y Ca, proteinkinasa, topoisomerasa II y proteínas resistentes a múltiples drogas³¹.

Muchos flavonoides han mostrado aumentar su actividad al interactuar con las ADN topoisomerasas, enzimas clave que gobiernan procesos importantes como la replicación, transcripción, recombinación, integración y segregación cromosomal²⁸. Los flavonoides

genisteína y orobol, que no se intercalan en la doble cadena de ADN, y quercetina, mirecitina, y biacelina, que si se intercalan, median la promoción de la topoisomerasa, y el rompimiento en sitios específicos del ADN en células de mamíferos *in vitro*^{33,34}.

Recientemente, se reportó que la quercetina y flavonoides relacionados, acetina, apigenina, kaempferol, y morina, inhiben a la topoisomerasa I eucariótica- catalizadora de la religación del ADN. Estos compuestos no actúan directamente sobre el intermediario catalítico y tampoco interfieren con la ruptura del ADN³¹. Como estabilización de la ADN topoisomerasa II "Complejo de ruptura" es una lesión citotóxica conocida *in vivo*, estos flavonoides son candidatos potenciales en el diseño de drogas antineoplásicas, antibacteriales o antiparasitaria³², ya que muchas drogas importantes anti-tripanosomales y anti-leishmánicas como pentamidina, berenil o samorin, así como antineoplásicos, etoposido y 4-[9-Acridinylamino]-N-[methanesulfonyl]-m-anisidina (mAMSA) promueven la formación del "complejo de ruptura" entre el ADN minicírculo en el cinetoplasto y la topoisomerasa tipo II mitocondrial³⁷.

Tanto la luteolina como la quercetina inhiben el crecimiento de promastigotes de *Leishmania donovani*, así como los macrófagos infectados con amastigotes *in vitro*, e inducen la detención del ciclo celular en la fase G1, iniciando la apoptosis. Estos dos compuestos también promueven la ruptura de kADN mediada por la topoisomerasa II. La formación del complejo de ruptura inducida por estos compuestos puede estar relacionado con la citotoxicidad hacia los parásitos *in vitro*. También, la administración oral de luteolin y quercetina, dos veces a la semana por un mes, a hamsters dorados 4 días post-infección, causó disminución significativa de la carga de parásitos esplénicos, comparados con los hamsters no tratados o testigos³⁶.

En otro estudio proponen a todas las flavonas y a las flavon-3-ol agliconas con mayor actividad leishmanicida, siendo las más potentes la fisetina, 3-hidroxi-flavona y la luteolina³⁸.

La propiedad insecticida de la rotenona, y compuestos relacionados, es muy conocida desde hace mucho tiempo. El principal efecto de los rotenoides sobre insectos es una disminución en la capacidad para tomar oxígeno, lo que finalmente les produce la muerte. Sin embargo son poco tóxicos para los humanos. Estudios bioquímicos han

revelado que estos actúan como inhibidores específicos de la NADH2 deshidrogenasa en la cadena respiratoria mitocondrial²⁹.

Los rotenoides utilizados comercialmente como insecticidas, principalmente la rotenona, que es potente contra un extenso rango de plagas. Se usa ampliamente en la agricultura, para controlar masticadores de hoja como escarabajos, orugas y afidos. Su limitación es que son poco solubles en agua, pero son muy activos a bajas concentraciones²⁹.

La principal fuente de estos compuestos son las raíces de dos plantas selváticas *Lonchocarpus nicouvar utilis* y *Derris elliptica*²⁹. Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen fundamentalmente hacia los radicales hidroxilo y superóxido, especies altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación lipídica y se ha descrito su capacidad de modificar la síntesis de eicosanoides (con respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria), de prevenir la agregación plaquetaria (efectos antitrombóticos) y de proteger a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación (prevención de la placa de ateroma)²⁵.

Además de sus conocidos efectos antioxidantes, los flavonoides presentan otras propiedades que incluyen la estimulación de las comunicaciones a través de las uniones hendidura, el impacto sobre la regulación del crecimiento celular y la inducción de enzimas de destoxificación tales como monooxigenasas dependientes de citocromo P-450, entre otras²⁵.

Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio ácido (por debajo de pH 3) y con una carga negativa a pH 7. Las repercusiones de la carga negativa son sumamente importantes en la evaluación del potencial antioxidante de los flavonoides. Primero, el radical cargado negativamente no es probable que pase a través de la membrana celular con carga negativa. Segundo, la reacción de los radicales flavonoides con la vitamina E, que es termodinámicamente factible para algunos radicales flavonoides, tiene un obstáculo adicional a causa de la repulsión electrostática entre el anión del radical flavonoide y la membrana fosfolipídica cargada negativamente, donde la vitamina E se incrusta. Tercero, la oxidación de un solo electrón de los flavonoides por cualquier oxidante tendrá una barrera entrópica, porque por lo menos dos protones se intercambian en la reacción. Los protones pueden intercambiarse entre los reactantes o con

el solvente en el estado de transición, en este caso, la interfase del enlace con hidrógeno debe tenerse en cuenta²⁵.

Los flavonoides son captadores de donadores de radicales hidrógeno (antioxidantes) mediante el complejo de iones de hierro, los flavonoides suprimen la reacción de Fenton dirigida por superóxido. El complejo de cobre es también una importante actividad de ciertos flavonoides, especialmente aquellos con estructura catecol en el anillo B³⁰.

Los flavonoides han demostrado actividad contra alergias, inflamación, virus, hipertensión, artritis, mutaciones y carcinogénesis, cáncer, y SIDA. Los polifenoles inhiben la fosfodiesterasa cGMP y cAMP, xantina oxidasa y elastasa³⁰.

Las isoflavonas y sus metabolitos tienen estructura similar al estradiol de los mamíferos. Como fitoestrógenos se piensa que bloquean los receptores de estrógenos mediante inhibición competitiva, y así inhiben la síntesis de estrógenos. Por lo que actúan disminuyendo el riesgo de cánceres dependientes de hormonas como el cáncer de mama y el de próstata^{30, 31}.

El consumo de vino rojo en humanos reduce la adhesión de TNF-alfa de los monocitos a las células endoteliales *in vivo* y está asociada con la regulación de moléculas de adhesión monocíticas, en la activación tardía particular del antígeno-4 (VLA-4).

Las semillas de uva reducen la expresión de moléculas de adhesión en la esclerosis sistémica, al menos el efecto *in vitro* fue únicamente evidente en la expresión de VCAM-1. La quercetina disminuye la expresión de ICAM-1 evitando la activación de TNF-alfa de la proteína-1 activadora (AP-1) vía JNK³¹.

I.2.3 Terpenoides

I.2.3.1 Estructura

Grupo variado de compuestos con (o formados a partir de) una unidad estructural de cinco carbonos en común, el isopreno. Se les conoce como isoprenoides, terpenoides o terpenos.

En el reino vegetal se han encontrado miles de terpenoides, y todavía no se ha podido estimar el número real. Muchos son de interés gracias a su uso comercial y porque ilustran la capacidad de las plantas de sintetizar un vasto complejo de compuestos que los animales no forman³⁹.

Excepto por el isopreno (C_5H_8) en si mismo, los isoprenoides son dímeros, trímeros o polímeros de unidades de isopreno, donde estas unidades suelen estar unidas con una disposición “cabeza-cola”³⁹.

I.2.3.2 Clasificación

Los terpenoides se pueden dividir según el número de unidades de isopreno que contienen. Estos grupos son los siguientes⁴⁰:

Hemiterpenos

Los hemiterpenos como el alcohol 3,3-dimetilalílico y el isopentenol, son constituyentes de algunos aceites esenciales. El acetato de isoamilo, forma parte de la feromona de alarma de abejas. El isopreno es secretado por las hojas de diversas plantas; los tulipósidos, presentes en los bulbos de los tulipanes, son precursores de las tulipalinas fungitóxicas.

Monoterpenos

Los monoterpenos son metabolitos secundarios de las plantas superiores, pero también son sintetizados por animales; están presentes en algunas secreciones defensivas de los insectos, glándulas de cocodrilos y en unos cuantos microorganismos. Además de los ejemplos de la tabla 3, podemos mencionar otros monoterpenos comunes como el cíñelo, α - y β - pineno, mirceno, citral, citronelal, alcanfor y limoneno³⁹.

También se les puede encontrar en hojas, flores, frutos, etc. Son elaborados por las plantas, a las que les sirven, entre otras cosas, para inhibir la germinación de otras especies y así evitar la competencia, especialmente por el agua, si esta es escasa.

Lo anterior se confirmó al estudiar algunas especies nativas de las zonas áridas del sur de California, entre estas *Salvia leucophylla* y *Artemisia californica*. En ellas se demuestra que los terpenos que producen estas especies vegetales les sirven para inhibir la geminación y, en caso de que esto suceda, retardar el crecimiento de las plantas vecinas; de esta manera elimina a la competencia por el agua que es tan escasa en el desierto⁴¹.

Los autores observaron que en años lluviosos, el mecanismo no funcionaba y que junto a los arbustos de salvia y artemisa crecían numerosas plantas, ya que el agua alcanzaba para todas⁴¹.

Tabla 3. Clasificación de los terpenoides

No. De moléculas de isopreno	Grupo de compuestos	Ejemplos
1	Hemiterpenos	Isopreno, alcohol dimetilalílico, isopentenol, alcohol isoamílico
2	Monoterpenos	Constituyentes de los aceites esenciales (geraniol, mentol, timol), irinoides (loganina, secologanina)
3	Sesquiterpenos	Constituyentes de aceites esenciales (Farnesol, bisabolol) y lactonas sesquiterpénicas (matricida, ácido absísico, hormonas juveniles, sirenina)
4	Diterpenos	Constituyentes de las resinas (ácido abiótico, fitol, vitamina A, crocetina)
5	Sesterterpenos	Constituyentes de extractos de lípidos insaponificables
6	Triterpenos	Escualeno, esteroides, triterpenos pentacíclicos
8	Tetraterpenos	Carotenos, xantofilas
>8	Politerpenos	Solanesol, espadicol, hule

Un estudio cuidadoso reveló que la toxina que estas plantas desprenden, es una mezcla de terpenos simples entre los que se encuentran los α y β pinenos, el alcanfor y el cineol⁴¹. Se demostró que estas sustancias son las responsables de la inhibición en la germinación y crecimiento de las plantas vecinas y que los diversos terpenos que elaboran las salvia y las artemisas, el cineol y el alcanfor son los más activos⁴¹. Se demostró que estas sustancias son las responsables de la inhibición de la germinación y crecimiento de las plantas vecinas.

Los irinoides son monoterpenos que toman su nombre del iridodial, un constituyente de las secreciones defensivas de la hormiga *Iridomyrmex*. Existen también alcaloides iridoideos, por ejemplo la gentianina y los alcaloides iridoideos de *Valeriana officinalis*, que además, contiene epóxidos iridopideos (valepotriatos, valtrato) que son sedantes. De gran importancia son los alcaloides iridoideos de *Catharanshus raseus*. La nébeda (*Nepeta*, Labiatae) goza de propiedades excitantes, especialmente en los gatos

(posiblemente porque su olor recuerda a algunas esencias utilizadas por estos animales en el marcaje territorial), debido a su contenido en nepetalactona, que también funciona como repelente de insectos³⁹.

El irinoide loganina, tiene un interés especial pues resulta un intermediario clave en la síntesis de los complejos alcaloides del indol³⁹.

Los irinoides son sustancias amargas que pueden repeler a los depredadores, pero que también atraen a algunos organismos especialistas. Algunos se usan para la fabricación de licores y con fines medicinales³⁹.

Sesquiterpenos

Son productos naturales de quince átomos de carbono, formados por la unión de tres unidades isopreno⁴¹, pueden ser alifáticos o cíclicos, pueden contener dobles ligaduras o estar saturados; frecuentemente contienen grupos hidroxilo, oxo, aldehído, ácido carboxílico y lactonas, lo que explica su enorme variedad. Están ampliamente distribuidos entre las plantas superiores, son componentes de muchos aceites esenciales y tienen volatilidad alta; algunos se usan en medicina o son de interés comercial³⁹.

El sesquiterpeno más sencillo y que se considera precursor de los demás es el farnesol, sustancias que aunque se encuentra en numerosas plantas, siempre están en pequeñas cantidades. Se les conoce como reguladores del crecimiento de las plantas. También se ha mencionado la actividad citotóxica y promotora de la formación de las raíces. Tanto el farnesol y su acetato, así como varios de sus derivados, tienen actividad de hormona juvenil en insectos⁴¹.

La sirenina, es un sesquiterpeno que constituye la feromona sexual de *Allomyces* y determina la atracción de los gametos masculinos hacia los femeninos. En las plantas superiores y en los insectos, el ácido abscísico, el ácido fásico, la xantoxina y la hormona juvenil III (su principal efecto es controlar la maduración de las larvas), actúan como hormonas, incluso existen algunos que aunque son producidos por las plantas, ejercen en los insectos una actividad hormonal, como la juvabiona y la dehidrojuvabiona; por esta razón, estos sesquiterpenos tienen importancia como insecticidas³⁹.

Entre los sesquiterpenos destacan las lactonas sesquiterpénicas por sus interesantes propiedades químicas y biológicas. Sus propiedades biológicas varían desde antihelmínticas

de la santonina pasando por la actividad reguladora del crecimiento vegetal de la heliangina y la inhibidora de tumores cancerosas que posee la vernolepina.

Los sesquiterpenos son constituyentes de las escencias florales que atraen polinizadores (B-ionona, bisabolol y S-cadineno). También contribuyen a los sabores y olores de especias, productos alimenticios y bebidas. Algunos (risitina e ipomeamarona) son fitoalexinas formadas en las plantas en respuesta a infecciones microbianas. Otras, son toxinas producidas por los microbios, como el helmintosporal. *Clitocybe illudens* (hongo bioluminiscente) produce dos principales sesquiterpenos tóxicos: iludina M e iludina S. Ciertos escarabajos, producen la cantaridita como un antialimentario. Los ésteres del tranasfarnesilo son feromonas sexuales de algunas abejas; y el transfarnesol regula la concentración de los estomas de las plantas, y de esta forma, la respiración.

Por último debe mencionarse al gran grupo de lactonas sesquiterpenicas, que tienen un interés especial, ya que muchas de ellas poseen potentes propiedades antitumorales. Muchos de estos metabolitos se encuentran en una sola familia de plantas, la Compositae o Asteraceae. Por ejemplo, la alfa-santonina, vernolepina, plenolina y elefantanina⁴¹.

El número de tipos diversos de esqueletos sesquiterpenicos parece no tener fin, cada año se descubren nuevos y más exóticos compuestos, en particular en los organismos marinos, que han mostrado ser una rica fuente de sesquiterpenos halogenados⁴¹.

Diterpenos

Los diterpenos son sustancias alifáticas tri o tetracíclicas que pueden contener diversos grupos funcionales. Algunos como la aconitina (alcaloide diterpénico), contienen nitrógeno³⁹.

Los diterpenos constituyen un grupo de sustancias formadas por ciclización del geraniol, lo que origina numerosos tipos de estructuras⁴¹.

Los diterpenos se encuentran distribuidos en plantas, animales y microorganismos, pero los alcaloides diterpénicos son exclusivos de las plantas superiores. Los diterpenos pueden derivarse de los tetraterpenos en plantas y animales³⁹.

Muchos diterpenos con estructuras muy diversas son de gran interés por su comportamiento químico como por sus interesantes propiedades biológicas entre las que destacan la actividad reguladora del crecimiento vegetal que tienen las giberelinas, la

actividad antialimenticia para insectos que tienen algunos diterpenos entkaurénicos, las propiedades tóxicas de los diterpenos con esqueleto taxano⁴¹.

La transformación del geranil-geraniol a fitol es de gran importancia, ya que este es constituyente de las clorofilas. El fitol también es constituyente del gitano y pristano; ambos compuestos se encuentran comúnmente en los sedimentos de los lagos y ríos, incluso, han sido detectados en los fósiles del precámbrico³⁹.

Los diterpenos son constituyentes de las resinas, por ejemplo, el ácido abiótico, el cual es ingerido de las Pinaceae y acumulado por las larvas de ciertos insectos para repeler a sus depredadores. El ácido carnosólico, es un constituyente amargo de las Labiatae. El geranilgeraniol, su acetato y el cembreno A, son constituyentes de las feromonas de abejas, hormigas y termitas, respectivamente. Las andromedotoxinas (acetilandromedol) son compuestos tóxicos comunes en la Ericaceae, que incrementan la constancia de la polinización³⁹.

El copalil-pirofosfato es el producto clave en la síntesis de las giberelinas, hormonas de las plantas, que también son producidas como fitotoxinas por el hongo *Gibberella fujikuroi*. Los anteridiógenos que poseen actividad homonal en los helechos, están estructuralmente relacionados con las giberelinas³⁹.

Sesterterpenos. Este es un pequeño grupo de terpenos, de los que se conocen sólo unos cuantos compuestos, por ejemplo, los más numerosos, las ofiobolinas, se han descubierto en los hongos. Las ceras de algunos de los insectos contienen algunos sesterterpenos. Así mismo, en las esponjas del género *Ircinia*, se han aislado una serie de furanoides (variabilina)³⁹.

Triterpenos

La dimerización del sesquiterpeno farnesol origina al escualeno, triterpenoide fundamental, fuente de otros triterpenoides y de los esteroides. Existen pocas diferencias entre triterpenos y esteroides, por lo que generalmente se consideran como un solo grupo de metabolitos secundarios³⁹.

Algunos triterpenos, como los hopanoides, son estabilizadores de las membranas en algunos procariotas. El lanosterol, se usa como emulsificante en la industria farmacéutica. Las cucurbitacinas debido a su amargo sabor, funcionan como antialimentarios para

muchos hervíboros, en acambio atraen a los escarabajos especialistas que utilizan a las Cucurbitaceae como alimento³⁹.

Tetraterpenos

Se originan por la dimerización de unidades C₂₉. Muchos de los carotenoides son tetraterpenos. Sin embargo, algunas bacterias contienen carotenoides C₃₀ C₄₅ y C₅₀. Los carotenoides C₄₀ se originan del diterpeno fitoeno³⁹.

Los carotenoides se caracterizan por una serie de dobles ligaduras conjugadas; pueden ser alifáticos o cíclicos; carecen de oxígeno (carotenos) o tienen una gran variedad de radicales que lo contienen; las xantofilas, son sintetizadas a partir de los carotenos y contienen grupos epóxidos. El color de los carotenoides varía de amarillo hasta rojo; son sintetizados tanto por plantas como por microorganismos. En las plantas superiores, los cloroplastos constituyen el principal sitio de síntesis. Los animales pueden procesar los carotenoides que toman de los alimentos³⁹.

Los carotenoides son copigmentos en la fotosíntesis y protegen a los tejidos de las plantas de la luz ultravioleta y las radiaciones visibles de onda corta. Los carotenoides zeaxantina y violaxantina están involucrados en la regulación de la fotosíntesis a nivel de la membrana de los tilacoides³⁹.

Los carotenoides median las respuestas fototrópicas en las plantas superiores y hongos; son pigmentos florales que atraen a los polinizadores y fortalecen la rigidez de la membrana, tanto en microorganismos como en plantas³⁹.

En los animales, los carotenos son convertidos en retinal, el que subsecuentemente se convierte en retinol (vitamina A). El retinal es importante en la percepción de la luz, en animales y microorganismos. El pigmento visual rodopsina (cromoproteína) de la retina del ojo humano, contiene 11-cis-retinal. La rodopsina se decolora con la luz y se regenera en la oscuridad⁴³.

Las esporopoleninas, son polímeros oxidativos de los carotenoides y ésteres de carotenoides, presentes, por ejemplo, en la pared de los granos de polen y esporas de plantas y microorganismos. Las esporopoleninas son extremadamente resistentes a la descomposición, de tal manera que los granos de polen y las esporas pueden sobrevivir millones de años; su estructura química no ha sido totalmente identificada³⁹.

Politerpenos

Sin duda, el más importante de los poliisoprenoides es el hule (las moléculas de hule varían en tamaño, entre 500 y 5000 unidades de isopreno), que se obtiene, por ejemplo del látex de *Hevea brasiliensis* donde se encuentra en un sistema de células especializadas conectadas entre sí que constituyen los vasos laticíferos. El látex contiene partículas de hule con un diámetro mayor de 3 micrómetros. Las partículas del hule están suspendidas en el plasma celular líquido junto con el núcleo, mitocondrias, ribosomas, enzimas solubles, etc. Aproximadamente el 1% de todas las plantas tienen la capacidad de sintetizar poliisoprenoides³⁹.

I.2.3.3 Biosíntesis y localización en la planta

La unidad de isopreno se sintetiza por completo a partir del acetato de acetyl CoA mediante lo que se suele llamar camino del ácido mevalónico, porque el mevalonato es un intermediario importante. Tres moléculas de acetyl CoA proporcionan los cinco carbonos necesarios para una unidad de isopreno, mientras que el sexto carbono se pierde del pirofosfato de mevalonato en forma de CO_2 ⁴⁰.

Es poco común que una especie en particular pueda tener todos los tipos de terpenoides, por eso es notable el caso de guayule (*Parthenium argentatum*) ya que contiene casi todas las clases de terpenoides; tiene monoterpenos en su aceite esencial, contiene también sesquiterpenos (parteniol y guayulinas A y B), triterpenos (argentatinas A, B y C) además de politerpenos en formas de hule en un alto porcentaje⁴¹. La industria perfumera los aísla de flores, hojas y raíces, para fabricar perfumes de alto valor comercial⁴².

I.2.3.4 Función que desempeñan en la planta

La función de los isoprenoides en la fisiología vegetal varía ya que intervienen en los mecanismos de autodefensa, funcionan como hormonas (giberelinas, ácido absídico), pigmentos fotosintéticos (fitol, carotenoides), transportadores de electrones (ubiquinona, plastofatos), mediadores de la unión de polisacáridos (fosfatos de poliprenilo) y componentes estructurales de las membranas (fitosteroles). Algunos terpenoides (las

humanos. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una glucona, llamada genéricamente sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroidal (tipo colano) como en la esmilagenina, o de triterpeno tipo β -amirina como en la chichipegénina; tipo α -amirina, como el ácido asiático; tipo lupeol, como en la estallogenina; o de tipo tetracíclico como en el panaxadiol⁴¹.

Las saponinas están conformadas por unidades de azúcar y usualmente contienen glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, ramanosa o metilpentosa, unida por enlaces glucosídicos a una aglicona hidrofóbica (sapogenina) la cual puede ser un triterpenoide o un esteroide en la naturaleza. La aglicona puede contener uno o más enlaces C-C insaturados. La cadena de oligosacáridos está normalmente unida al C₃, pero muchas saponinas tienen un azúcar adicional en la posición C₂₆ o C₂₈. La gran complejidad de la estructura de las saponinas deriva de la variabilidad en la estructura de las agliconas, la naturaleza de las cadenas de alado y la posición de unión de estos motivos sobre la aglicona. Son producidas generalmente por las plantas, pero también por animales marinos y algunas bacterias⁴³.

Con excepción de la criptogenina, el sistema espiroacetal es una característica general de las sapogeninas esteroidales, y es variable el número de insaturaciones, hidroxilos, grupos cetónicos y otros grupos oxigenados. Las agliconas triterpenoides están bien representadas por el ácido queretaroico y la dumortierigenina. El enlace glicósido siempre se forma con el oxígeno del carbono 3. Se conocen más de 200 saponinas esteroidales, localizadas en las monocotiledóneas (liláceas, amarilidáceas y dioscoráceas, principalmente, como excepción en escrofulariáceas) y otras tantas saponinas triterpenoides, aisladas principalmente en dicotiledóneas⁴³.

I.2.4.2 Clasificación

Según la estructura de la genina, sapogenina o grupo aglicón, se conocen dos tipos de saponinas³⁹:

- Esteroidales (neutras)
- Triterpenoides (ácidas)

Que probablemente tienen un origen biogénico común. Generalmente, las geninas están unidas a una posición glucídica, de 1 a 5 moléculas de azúcar (las más comunes: glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y xilosa)³⁹.

Las saponinas esteroidales no están ampliamente distribuidas en la naturaleza, como las triterpenoides; las saponinas esteroides abundan especialmente en las monocotiledonas: Dioscoraceae, Amarylidaceae, Agavaceae y Liliaceae. Algunas especies como *Strophantus spp.* y *Digitalis spp.*, contienen tanto saponinas esteroidales como glucósidos cardíacos. También existen saponinas esteroidales en algunos equinodermos. Algunos ejemplos de saponinas esteroidales son: sarsaponina, digitoxina, gitonina y dioscina³⁹.

Sin duda la más útil de todas las sapogeninas esteroidales es la diosgenina, que se encuentra en diversas especies de *Dioscorea*; este metabolito está disponible en grandes cantidades (5 a 10%) en los rizomas de estas plantas, y es utilizado como materia prima en el proceso industrial de fabricación de cortisona y hormonas sexuales como la progesterona. La cortisona tiene una gran variedad de usos clínicos, particularmente como agente antiinflamatorio, y se presenta de manera natural en todos los mamíferos³⁹.

Otras sapogeninas esteroidales son: la hecogenina del *Agave sisalana* (*A. fourcroides*) “sisal o henequén”; la sarsapogenina, de *Yucca* y *Smilax*; y la samentogenina de *Strophantus*³⁹.

Las saponinas triterpenoides, al contrario de las esteroidales, son raras en las monocotiledonas. Son abundantes en algunas dicotiledonas, como las cariofiláceas, sapindáceas, poligaláceas y sapotáceas; también en las fitolacáceas, quenopodiáceas, ranunculáceas, berberidáceas, papaveráceas, lináceas, zidofiláceas, retáceas, mirráceas, cucurbitáceas, araliáceas, umbelíferas, oleáceas, lobeliáceas, campanuláceas, rubiáceas y compuestas. Algunas saponinas triterpenoides son: la aescina (*Aesculus*), la aralina (*Analia*), la caléndula-saponina, la guayaco-saponina y el ácido glicirrícico³⁹.

La naturaleza química única de las saponinas demanda técnicas tediosas y sofisticadas para su aislamiento, elucidación de su estructura y análisis. El aislamiento de saponinas provenientes de material vegetal es complicado debido a la presencia de muchas sustancias estrechamente relacionadas en los tejidos de las plantas y debido a que la mayoría de las saponinas carecen de un cromóforo⁴³.

Hay varias estrategias viables para el aislamiento de saponinas. Como regla general, este inicia con su extracción de las plantas, con metanol o etanol. Más adelante el procesado del extracto es llevado fuera después de la evaporación bajo presión reducida, disolución en muy poco contenido de agua y en una fase de separación con n-butanol. Esta reconocido que este último paso es en ocasiones indeseable, ya que solo aquellas saponinas con cadenas de oligosacaridos cortas serán extraídas eventualmente en la fase butanólica. Una purificación posterior se lleva a cabo, esta involucra cromatografías liquidas sobre una columna de gel de sílice, o por gradiente de elución proveniente de un soporte polimérico o líquido-cromatografía líquida partition, o como es mayormente conocida, separación HPLC. En la mayoría de los casos, algunos de los pasos anteriormente señalados son repetidos con cambios de soporte para alcanzar una purificación mayor^{Loc.cit.}.

Una vez que la saponina ha sido purificada, esta puede ser sujeto de métodos analíticos incluyendo MS, NMR de protones y carbono, y espectroscopia infraroja. Otros métodos clásicos son empleados para determinar la presencia de saponinas en extractos crudos de plantas, y elucidar su composición a través de los pasos de purificación. La cromatografía en placa (TLC) y el tñido con reactivos deshidratantes que contienen aldehídos aromaticos (tales como anisil aldehído en ácido sulfúrico) son comúnmente empleados. Las saponinas puras también pueden ser hidrolizadas para determinar la naturaleza de sus componentes glucosídicos^{Loc.cit.}.

1.2.4.3 Biosíntesis y localización en la planta

Las saponinas se encuentran como parte constitutiva de muchas plantas, tanto en silvestres como en las cultivadas. En cultivos las saponinas triterpenoides son las predominantes, mientras en las saponinas esteroidales son comunes en plantas utilizadas como hierbas por sus propiedades curativas. Las saponinas triterpenoides han sido detectadas en muchas leguminosas tales como el frijol de soya, frijol, chícharos, etc. También en ajos, té, espinacas, betabel, quinoa, girasoles y ginseng. Las saponinas esteroidales se encuentran en el salvado, semilla de tomate, ajos, espárragos, yuca y ginseng⁴³.

En general, muy poco es conocido acerca de las enzimas y de las vías bioquímicas envueltas en la biosíntesis de saponinas. Las saponinas triterpenoides son sintetizadas por la vía de los isoprenoides mediante ciclización de 2,3-oxidosqualene para reproducir

inicialmente esqueletos triterpenoides de aleanane (b-amyrin) o dammarane. La maquinaria genética requerida para la elaboración de esta importante familia de metabolitos secundarios de plantas es aún desconocida, a pesar del gran interés comercial en este importante grupo de productos naturales. Esto se debe en parte a la complejidad de las moléculas y la carencia de intermediarios obtenidos comercialmente para estudios bioquímicos. Un número de factores, tales como edad fisiológica, ambiente y factores agronómicos, han demostrado afectar el contenido de saponinas en las plantas. Generalmente las plantas inmaduras de diferentes especies se han encontrado con altos contenidos de saponinas más que las plantas maduras de la misma especie^{Loc.cit.}.

Ambos grupos de saponinas se han aislado de diversos órganos vegetales; así, la sarsaponina se ha encontrado en las raíces de la *Sarsaparrilla mexicana*; en los tubérculos de la *Dioscorea tokaro*; en las hojas de los agaves y hasta en las flores y semillas de la *Yucca schottii* o en los frutos de la *Sapindus saponaria*⁴¹.

1.2.4.4 Funciones en la planta

El rol fisiológico de las saponinas en las plantas aún no es entendido completamente. Muchas saponinas son conocidas por ser antimicrobianos, de inhibir hongos, y de proteger a las plantas de los ataques de insectos. Las saponinas pueden ser consideradas una parte del sistema de defensa de las plantas, y como tales han sido incluidas en un largo grupo de moléculas protectoras en plantas conocido como “fitoanticipinas” o “fitoprotectores”. El primer termino describe aquellas saponinas, tales como A y B avenacosides en el salvado, que son activadas enzimáticamente por las plantas en respuesta a un daño tisular o al ataque de un patógeno. El segundo termino describe aquellas saponinas que tienen muchas actividades antimicrobianas o anti-insectos. Una saponina triterpenoide glucosilada de chícharos fué purificada y caracterizada como un inhibidor específico de la diguanilato ciclase, una enzima clave en la regulación de la síntesis de celulosa. Esto también sugiere que las saponinas pueden ser un recurso de monosacáridos.

1.2.4.5 Propiedades biológicas

Las saponinas reducen la tensión superficial de las soluciones acuosas y, como los jabones, causan la formación de espumas estables, por esto se han utilizado ampliamente

por sus propiedades detergentes; en Europa, la raíz se *Saponaria officinalis* (Caryophyllaceae) y en América del Sur la corteza *Quillaia saponaria* (Rosaceae). Esta misma propiedad, incrementa la permeabilidad de las membranas celulares; tienen propiedades hemolíticas, son venenosas si se inyectan, sin embargo por vía oral son prácticamente inactivas; la zarzaparrilla es rica en saponinas y sin embargo, se utilizan en la preparación de una bebida no alcohólica; debido a su sabor amargo pueden funcionar como antialimentarios. Las saponinas tienen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades. Son sustancias muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular⁴¹.

Las saponinas tienen una elevada actividad tóxica en los hongos. La actividad antifúngica en contra de *Trichoderma viride* fue empleado anteriormente como método de identificación para saponinas. La saponina kanalopanax A e I aisladas de *Kalopanax pinctus* muestran una fuerte y específica actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*. La saponina Asparagus-1, de las hojas bajas de *Asparagus officinalis*, tienen propiedades antifúngicas en concentraciones de 0.5-0.8 µg·mL⁻¹ dependiendo del tipo de hongo. Las saponinas monodesmosídicas espirostoles derivadas de *Y. schidigera* destruyen ciertas levaduras deterioradoras de alimentos, levaduras formadoras de película, y levaduras dermatofíticas y hongos. El principal mecanismo sugerido para la actividad antifúngica de las saponinas es su interacción con los esteroides de la membrana. Las saponinas esteroideas sintéticas preparadas por Takchi y col. fueron tanto antifúngicas y hemolíticas pero en muchos casos las saponinas triterpenoideas mostraron muy baja actividad antifúngica. Se ha observado que tienen unidas cadenas de trisacáridos sin la presencia de grupos oxígeno en el C2 exhibe actividad anti-levadura, mientras que las saponinas con grupos 2β-hidroxil o 12 ceto mostraron ser muy débiles o no tener actividad. Una saponina con una unidad de disacárido exhibió una actividad baja relativamente y las agliconas o saponinas furostanol bidesmódicas no mostraron actividad⁴³.

Algunas saponinas y sapogeninas han demostrado ser capaces de desactivar virus, por ejemplo, la mezcla de saponina purificada de *Maesa lanceolata*. Maesasaponina con ciclización tuvo actividad antiviral. Las saponinas triterpenoides oleanolécicas inhiben la replicación del HIV-1, probablemente mediante la inhibición de la actividad de la proteasa del HIV-1⁴³.

Diferentes clases de saponinas producen una disminución en los protozoarios y han sido identificadas como posibles agentes contenidos en el rumen. Esta propiedad puede ser explotada para el tratamiento de infecciones protozoarias en otros animales. Las saponinas triterpenoides y esteroideas han sido encontradas para el combate de muchas infecciones protozoarias tales como el *Plasmodium falciparum*, trofozoitos de *giardia* y especies de *leishmania*. La toxicidad de las saponinas en los protozoarios parece no estar aún dilucidada y es inespecífica obviamente es el resultado de su efecto detergente en la membrana celular. La propiedad antiprotozoaria de las saponinas puede perderse con la desglucolización^{Loc.cit.}.

La importancia de los antioxidantes contenidos en los alimentos es bien apreciada tanto por la preservación de los mismos y como suplemento. Los antioxidantes son inhibidores rompedores de cadenas de la peroxidación lipídica como radicales libres generados por el daño *in vivo* de lípidos, proteínas, ADN y pequeñas moléculas^{Loc.cit.}.

Un grupo de saponinas producidas en leguminosas, conocidas como soyasaponinas del grupo B, contienen grupos de antioxidantes unidos al C23. El residuo único de azúcar, 2,3-dihidro-2, 5-dihidroxi-6metil-4H-piranona (DDMP), permite a las saponinas atrapar mediante la formación de intermediarios hidroperóxidos, previniendo el daño biomolecular por los radicales libres. Previamente se sugirió que el residuo de DDMP se pierde durante el procesamiento del frijol de soya. De cualquier forma, se ha demostrado que los ingrediente de soya (frijol de soya, proteína aislada de soya, proteína texturizada vegetal, concentrado de proteína de soya y Novasoya) y comidas de soya (leche de soya, tofu y tempeh) contienen soyasaponinas del grupo B en concentraciones de 0.20-114.02 $\mu\text{mol/g}$. El residuo de DDMP se encuentra ampliamente distribuido entre leguminosas tales como los frijoles, cacahuates, chícharos y tréboles. Las saponinas también muestran un amplio rango de efectos citostáticos en contra de células cancerígenas. La habilidad de las saponinas para disminuir los niveles de colesterol sanguíneo en animales también ha sido reportado^{Loc.cit.}.

1.2.5 *Persea americana*

1.2.5.1 Taxonomía

Persea americana es el nombre científico del aguacate, este género tiene los subgéneros *Eriodaphne* y *Persea*; siendo este último el que contiene a los aguacates comestibles, también se clasifican en razas hortícolas *mexicana*, *antillana* y *guatemalteca*, o en variedades botánicas las que difieren en algunas características morfológicas, fisiológicas y condiciones de adaptación climática. Este género pertenece a la familia de las Lauráceas (*Lauraceae*). El nombre científico es *Persea americana*, variedad *drymifolia* de raza mexicana; variedad *americana* de raza antillana, y variedad *guatemalensis* de raza guatemalteca⁴⁶ (Figura 6).



Figura 7. Frutos representativos de las razas de aguacate. De izquierda a derecha la raza Antillana, raza Guatemalteca y raza Mexicana. A parte raza Costaricensis (Barrientos-Priego, 2000).

El aguacate originado en las zonas altas del centro y este de México generan la raza mexicana, los originados en las zonas altas de Guatemala generan la raza guatemalteca, y la raza antillana proviene de las primeras plantas encontradas en las Antillas. Con respecto al origen de la raza antillana, existen discrepancias puesto que cabe la posibilidad de que los primeros aguacates existentes en las Antillas hayan sido introducidas desde México por los españoles o los ingleses durante la colonización⁴⁶.

Por otra parte Bergh (1995) indicó que las tres razas de aguacate son genéticamente equidistantes. Dicha afirmación fue corroborada con análisis de marcadores genéticos de ADN mediante la técnica de RAPD (Amplificación al Azar de ADN Genómico) por Bufler

y Fiedler (1996). La raza Mexicana tiene como principal ventaja la resistencia a frío, así como su alto contenido de aceite. Otra característica distintiva (Tabla 4), es el olor a anís de sus hojas en casi todos los individuos. La raza Guatemalteca presenta una cáscara bastante gruesa si se compara con las otras tres razas, lo que le permite resistencia del fruto al transporte, sin embargo, como está formada por tejidos esclerificados son bastante duros y no permite saber con el tacto si los frutos ya están en madurez de consumo. Otra característica favorable es el tamaño pequeño y forma redonda de la semilla en varios individuos de esta raza (Tabla 4). La raza Antillana se adapta a clima tropical y como portainjerto es más tolerante a la salinidad, también tiene un lapso de flor a fruto bastante corto. La raza Costaricensis se adapta a condiciones subtropicales de Costa Rica, la semilla es redonda como la raza Guatemalteca, la cáscara como la raza Antillana y las hojas son medianas a pequeñas similares a las de la raza Mexicana pero sin olor a anís (Tabla 4)⁴⁶.

Estas tres razas de aguacate, desde la antigüedad se fueron mezclando naturalmente entre ellas por medio de su propio sistema de reproducción. El resultado de estas fusiones producidas por medio de "polinización cruzada" dieron origen a incontables variedades híbridas naturales indefinidas⁴⁶.

Tabla 4. Diferencias entre las razas de aguacate (*Persea americana* Mill.)⁴⁴

Carácter	Raza Mexicana	Raza Guatemalteca	Raza Costaricensis	Raza Antillana
Clima	“Semitropical” a templado	subtropical	subtropical	Tropical
Altitud sobre el nivel del mar	Sobre 2000 m	Entre 1000 y 2000 m	Entre 800 y 1500 m	Menos de 1000
Resistencia a salinidad	menor	menor	¿?	mayor
Resistencia al frío	mayor	intermedia	menor	Menor
Hojas:				
tamaño	menor	intermedio	menor	Mayor
color	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde pálido
olor	Olor a anís	Sin olor a anís	Sin olor a anís	Sin olor a anís
Flor:				
pubescencia	Más	menos	¿?	Menos
Tallo:				
Brotes jóvenes	Verde pálido	rojizos	Verde pálido	Verde pálido
Corteza del tronco	No acanalada	No acanalada	No acanalada	Acanalada
Fruto:				
Tamaño	Variable, tendiente a pequeños	intermedios	pequeños	Variable, tendientes a grandes
pedicelo	Cilíndricos y grosor mediano	Cónico y grosor voluminoso	Cilíndrico y grosor regular	Forma de cabeza de clavo y poco grosor, y también existen tipos con mayor grosor
Persistencia del perianto en el fruto	mayor	menor	menor	menor
cáscara	Delgada, lisa y suave	Gruesa, quebradiza y rugosa	Grosor mediano, flexible y suave	Grosor mediano, flexible y suave
semilla	Adherida o suelta, cotiledones lisos o ligeramente rugosos	Adherida y cotiledones lisos	Adherida y cotiledones lisos	Suelta y cotiledones rugosos
Cubiertas de la semilla	Delgada	delgada	delgada	Mediana o gruesa y membranosa
aceite	Alto contenido	Mediano contenido	¿?	Bajo contenido
sabor	A especia y por lo general a anís	Ligero, en ocasiones nogado	Ligero, sin sabor específico	Ligero y frecuentemente dulce, con un ligero amargor al final
Fibra en la pulpa	común	No común	No común	No común
Tiempo de flor a fruto	6-9 meses	10-16 meses	¿?	5-9 meses
Tamaño relativo del árbol y hábito de crecimiento general:	Medianos abiertos	Altos y erectos	Medianos y abiertos	Altos y medianos, abiertos y erectos

A principios del siglo pasado (1900) se comenzaron a seleccionar aguacates de excelentes atributos para ganar mercados consumidores, dando origen a los distintos cultivares que durante décadas lideraron los mercados mundiales. Todas estas nuevas variedades funcionaron bien hasta que en el año 1935 se patentó en Estados Unidos una nueva variedad llamada “Hass”, de progenitores desconocidos (pero con más porcentaje de guatemalteca), originado en La Habra, un lugar de California, donde el Sr. Rudolph Gay Hass la detectó entre los árboles de su huerto⁴⁶.

El origen del aguacate tuvo lugar en las partes altas del centro y este de México, y partes altas de Guatemala. Esta misma región está incluida en lo que se conoce como Mesoamérica, y también es considerada como el área donde se llevó a cabo la domesticación del mismo. Existe evidencia directa de la domesticación en el período Clásico Maya del maíz, calabaza, yuca, algodón, aguacate, camote y el agave, lo cual está sustentado por restos de planta en el contexto arqueológico y lingüístico que le dan validez a esta lista de cultivos. Originario del sur de Chiapas y cultivado desde el Río Bravo hasta Chile Central antes de la llegada de los europeos. *P. americana* puede alcanzar 20 m de altura. Su fruto, comestible, es llamado aguacate, palta, cura, petro o abacate. La palabra aguacate viene del náhuatl ahuacatl, lo que también significa testículos. Los españoles hicieron de ahuacatl las palabras aguacata y avocado esta última, una palabra ya conocida, que designaba antiguamente a los abogados⁴⁶.

El aguacate era bien conocido por el hombre desde tiempo atrás, ya que la evidencia más antigua del consumo de aguacate fueron encontrados en una cueva en Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, México, datados entre los años 8,000-7,000 A. C. Las culturas antiguas también contaban con un buen conocimiento acerca del aguacate y de sus variantes, como se muestra en el Códice Florentino, donde se mencionan tres tipos de aguacate, que de acuerdo a su descripción; “aoacatl” podría tratarse de *Persea americana* var. *drymifolia* (raza Mexicana), “tlacacolaocatl” a *Persea americana* var. *americana* (Raza Antillana) y “quilaoacatl” a *Persea americana* var. *guatemalensis* (raza Guatemalteca)⁴⁶.

Después de la conquista los españoles llevaron el aguacate a España en 1600 y posteriormente comenzó la distribución del aguacate a nivel mundial. México es uno de los países con amplia diversidad de tipos de aguacate y existen en el país al menos 20 diferentes especies relacionadas con el aguacate. Esta gran variabilidad puede ser debida a

diferentes condiciones ambientales presentes a lo largo y ancho del territorio nacional y a la naturaleza que le ha conferido al aguacate, mecanismos que hacen maximizar el cruzamiento con otros tipos, y por lo tanto incrementa la variabilidad genética y por ende ampliar la adaptación a un mayor número de ambientes⁴⁶.

1.2.5.2 Ecología

En estado silvestre, el árbol puede alcanzar alturas de alrededor de 20 metros, con tronco erecto o torcido. Los árboles en plantación, generalmente derivados de injertos y sujetos a podas de formación, muestran una apariencia muy distinta. Copa: extendida, globulosa o acampanulada, con ramas bajas, ramitas al principio verde amarillentas que se tornan opacas y con cicatrices prominentes dejadas por las hojas. Corteza: áspera, a veces surcada longitudinalmente. Hojas: coriáceas, enteras, alternas, elípticas, de 8-40 cm de largo. De color rojizo brillante cuando jóvenes, se vuelven verde oscuras y opacas en la madurez. En algunas variedades caen antes de la floración (figura 7)⁴⁷.



Figura 8. Árbol de aguacate *Persea americana* (www.amigoarbol.org, 2008)

Flores: bisexuales, pequeñas (1 cm), de color verde amarillento, agrupadas en panículas axilares de alrededor de 200 flores (figura 8). Frutos: drupas redondeadas, ovales o piriformes según la variedad, de tamaño muy variado (7-33 cm de largo y hasta 15 cm de

ancho), cáscara de color verde hasta púrpura oscuro, y desde delgada hasta gruesa y rugosa, a veces como cuero. Pulpa firme, aceitosa, de color amarillo a verdoso. Contiene una semilla grande (5-6.4 cm), dura y pesada, redonda o con punta, de color marfil pero con dos envolturas paperosas muy delgadas de color café, que a menudo quedan adheridas a la pulpa⁴⁷.



Figura 9. Flor del aguacate (Carr G. D. 2006)

Ampliamente distribuido en gran cantidad de países en todo el mundo, pero principalmente en los trópicos americanos. Los requerimientos de clima y suelo varían con las diferentes razas. La raza antillana prefiere clima tropical húmedo, y se cultiva desde el nivel del mar hasta los 800 metros, con temperaturas medias de 24 a 26°C. No tolera heladas⁴⁷.

La raza guatemalteca crece entre 500 y 2400 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas medias de 22-25°C y puede temperaturas no inferiores a 4.5°C. La raza mexicana puede crecer hasta los 2800 metros sobre el nivel del mar, con temperaturas medias de 20°C, y puede tolerar heladas hasta de 4°C⁴⁷.

P. americana crece en climas secos a húmedos, con precipitaciones de 800 a 2000 milímetros, con estaciones secas bien definidas de hasta 6 meses, aunque crece mejor con estaciones secas más cortas. Por otro lado, requiere más de tres meses secos para buena producción de frutas. Los periodos de gran calor y sequía pueden provocar la caída de los frutos, especialmente en las variedades de montaña. Los sitios demasiado húmedos no son apropiados, por la mayor posibilidad de ocurrencia de ciertas enfermedades del suelo, a las cuales la especie es altamente susceptible. Se adapta a gran variedad de suelos, desde

arenosos hasta arcillosos, limos volcánicos, lateríticos y calizos, pero crece mejor en suelos francos, bien drenados, ligeramente ácidos y ricos en materia orgánica. La raza antillana tolera suelos calizos y ligeramente salinos. Ninguna variedad tolera suelos pesados, con drenaje impedido y no debe plantarse cuando la capa freática esté a menos de un metro de la superficie. El rango óptimo de pH se considera entre 6 y 7, aunque algunos cultivares en Florida crecen bien en suelos con pH de 7.2 a 8.3. Se ha encontrado una asociación simbiótica entre esta especie y hongos endomicorrízicos, que facilitan la absorción de elementos minerales, sobre todo fósforo, cobre y zinc⁴⁷.

I.2.5.3 Utilidades

La especie se cultiva principalmente por sus frutos sabrosos y energéticos, y en muchos países constituye un alimento básico que en ciertas épocas sustituye a la carne o los huevos. El exceso de producción o los frutos dañados son utilizados en la alimentación de cerdos y otros animales de granja. Los frutos son un alimento energético, con 2200 hasta 2800 cal por kg, altos en grasa (5-25%) y proteína (0.8-4.4 g/100g). También contiene 5-6% de azúcar y almidón, vitamina B2 (0.13-0.2 mg/100g) y niacina (0.8-1.2 mg), además de vitamina A y E, potasio, calcio, hierro y fósforo. El aceite de la pulpa es rico en vitaminas A, B, D y E, y puede mantenerse en buenas condiciones por muchos años. Se dice que filtra los rayos ultravioleta, no es alergénico, y es similar a la lanolina en cuanto a sus acciones como penetrante y suavizante. En Brasil, 30% de la producción de frutos es procesado para aceite. El fruto usualmente se consume crudo en ensaladas, en sopas, o majado y mezclado con diversos ingredientes (limón, ajo, cebolla, sal, pimienta y en ocasiones chile) para preparar el tradicional "guacamole". Las hojas de algunas variedades han resultado tóxicas cuando se dan en dosis altas a algunos animales. El aceite obtenido de la pulpa se utiliza en la preparación de productos para el cabello, cremas faciales, lociones para las manos y jabones finos. En Brasil, los residuos de la elaboración del aceite son utilizados en la alimentación animal. En tiempos de la colonia un fluido lechoso de las semillas que se vuelve rojo con el aire se utilizó como tinta indeleble. También se ha utilizado para teñir telas de algodón y lino. Aunque la madera no es un producto principal de esta especie, cuando los huertos son raleados o los árboles deben ser talados por alguna razón, se puede utilizar la madera para construcción ligera, paneles, tornería, grabados y

artesanías. En México también se utiliza para fabricación de canoas y muebles. En Haití se ha convertido en una importante fuente de madera al escasear las maderas tradicionales. Las flores atraen abejas y el néctar produce una miel oscura y espesa, de buena calidad. En sistemas de finca *P. americana* es adecuada para plantaciones puras, sistemas agroforestales, árboles en huertos y jardines, para sombra y como ornamental, así como para mejoramiento de suelos y control de la erosión. Es común encontrarlo en patios de hogares rurales o en fincas junto con otros frutales como mango, coco y cítricos, o dentro de plantaciones de café, ya sea plantado (por lo general usando plantas injertadas) o porque se han protegido arbolitos voluntarios originados por semilla⁴⁷.

I.2.5.4 Propiedades

El aguacate es considerado dentro de la medicina tradicional una herramienta útil en el combate y alivio de enfermedades. Por ejemplo las semillas tostadas y la ceniza disuelta en agua se ha utilizado para curar la diarrea. Se cree que el polvo de las semillas elimina la caspa. Un trocito de la semilla colocado en la cavidad de las muelas puede aliviar el dolor. El aceite de la semilla se aplica para las erupciones de la piel. Los Shuar de Ecuador trituran las semillas y después la maceran en aguardiente, dando una mezcla que se considera eficaz contra las mordeduras de serpiente. Según los Quichuas de Ecuador, las mujeres que comen la semilla molida dejan de menstruar por varios meses. La cáscara del fruto es antibiótico y se emplea como vermífugo y contra la disentería. Los Tikunas colombianos toman la cocción de las hojas para “limpiar los riñones” y eliminar los cálculos renales. Las hojas masticadas sirven contra la piorrea. Emplastos de las hojas se aplican sobre la heridas y calentadas se colocan en la frente para aliviar la neuralgia. El jugo de las hojas se emplea como antibiótico, y la cocción se toma contra la diarrea, dolor de garganta y hemorragias; también se dice que estimula y regula la menstruación. En los países amazónicos se usa contra la leishmaniasis cutánea. En Cuba, la decocción de los brotes tiernos se usa contra la tos. Algunas veces, un trozo de la semilla se hierve junto con las hojas para hacer la decocción. En México, las hojas son usadas como condimento. Las semillas y raíces contienen un antibiótico que previene el deterioro de alimentos, y se está tramitando su patente en EEUU⁴⁷.

La medicina tradicional chiapaneca también lo incluye dentro del arsenal terapéutico con similares propósitos, ya que la infusión de las hojas del árbol o de la semilla del fruto del aguacate, es empleada en la región del Soconusco como tratamiento antimicrobiano, anti-parasitario, anti-inflamatorio, antipirético, antitusígeno, así como para el tratamiento de enfermedades tales como el asma, enfermedades renales, hepáticas, para el control de la diabetes, en el tratamiento de cólicos menstruales y el tratamiento de las várices inflamadas, también es empleado como abortivo⁶.

La planta del aguacate contiene alcaloides, saponinas, flavonoides, esteroides, carbohidratos, ácidos grasos, flavonoles, aceites esenciales y flavononas^{7, 62, 63}. En estudios preliminares se ha reportado el aislamiento de diversas sustancias dentro de las que cabe mencionar la toxina persina, la cual ha demostrado tener actividades antifúngicas y anticancerígenas⁸. La aglutinina de *P. americana* (PAA) es una glucoproteína que ha demostrado tener propiedades antimicrobianas contra *Streptococcus mutans*⁹, *Staphylococcus aureus*¹⁰, *Pseudomona aureginosa*¹¹, *E. coli*¹², *Legionella pneumophilla*¹³. Al aguacate también se le han estudiado sus propiedades anti-oxidativas en tejido hepático dañado¹⁴. Otros estudios lo reportan como terapia alternativa en el control de la diabetes mellitus¹⁵.

En lo que respecta a la visión y el análisis científico sobre las propiedades antimicrobianas estudiadas en 1980 Staat y col. observaron que la lectina de *Persea americana* modificaba la adherencia de *S. mutans* a la superficie de un vaso, suponiendo que dicha lectina tiene la capacidad de unirse al polisacárido componente de glucosiltransferasas (GTF)⁹, por lo cual inhibe su virulencia. Otro estudio llevado a cabo con el extracto de *P. americana* corroboró que cuenta con actividad antiviral, incluso mayor que de fármacos antivirales, dicho estudio se realizó sobre el herpes simple tipo 1 y adenovirus tipo 3, en este estudio se identificaron las sustancias con actividad antiviral, la cual residía en dos flavonoles monoglucosidados como kaempferol y quercetin 3-O-alfa-D- arabinopiranosidos⁵⁴.

Sus propiedades antimicrobianas también han sido puestas a prueba y se demostró que es un inhibidor del crecimiento de *Pseudomona aureginosa* mejor que la amoxicilina¹¹, sugiriendo también que la propiedad antimicrobiana está directamente relacionada con la

cantidad de alcaloides que contiene. En otros estudios la actividad antimicrobiana de *P.americana* contra *E.coli* ha sido buena en comparación con la estreptomycin¹².

Investigaciones preliminares han dado a conocer la actividad tóxica de *Persea americana*, ya que su fracción aislada “persina” presento actividad antifúngica⁴⁸ y citotóxica sobre el tejido mamario⁴⁹. Esta propiedad ha sido aplicada en la industria insecticida ya que el extracto de *Persea americana* se emplea como insecticida sobre la larva de *Anopheles gambiae*, causándole hipertrofia intestinal^{50, 51}.

En el estudio llevado a cabo por J. L. McLaughlin en 1997, se demostró que los extractos de *P. americana* tenían actividades anticancerígenas, teniendo predilección sobre el cáncer prostático⁵².

Respecto a la propiedad antiinflamatoria sugerida por la medicina tradicional, se llevó a cabo un estudio en el cual extracto acuoso de las hojas de *P. americana* se administró a ratas albinas tratadas simultáneamente con indometacina, un inhibidor de las prostaglandinas, y con etanol, ambas sustancias productoras de úlceras gástricas. El estudio reveló que el extracto produjo significativamente una actividad antiulcerativa dependiente de la dosis en contra de las úlceras producidas por la indometacina y el etanol. Justificando el empleo de extracto de *Persea americana* en la medicina tradicional⁵³.

Otra de las propiedades del aguacate que también ha sido analizada es la propiedad anticonvulsivante referida por los médicos tradicionales africanos, y la cual se puso a prueba empleando el extracto de las hojas como terapia anticonvulsivante en ratas, las cuales respondieron apropiadamente, a pesar que se desconoce el mecanismo, se corrobora su empleo en la medicina tradicional nuevamente⁵⁴.

I.3 Justificación

La ausencia de recursos terapéuticos con menos efectos secundarios, en el tratamiento de padecimientos como la leishmaniasis, se traduce en un reto terapéutico para el clínico, y un déficit en la calidad de vida del paciente. Consecuentemente se hace necesario abordar su pronta atención desde una perspectiva integral que contemple el establecimiento de estrategias alternativas a los tratamientos actuales.

Debido a las características antropológicas, sociales y económicas de las poblaciones rurales, hacen de la medicina tradicional un recurso para el tratamiento de enfermedades que van de una índole infecciosa a una crónico-degenerativa, obteniéndose en ocasiones resultados benéficos, lo que resulta interesante y de ahí la inquietud del estudio de los metabolitos secundarios contenidos en una de las especies herbóreas más comunes en nuestro estado, el aguacate (*Persea americana*).

La importancia de este trabajo radica en la aportación científica respecto a una de las tantas propiedades que *Persea americana* presenta, ya que en la medicina tradicional amazónica es empleada como antiprotozoaria, suponiendo que dicha propiedad se deba a la presencia de metabolitos secundarios presentes en su metabolismo, impacta sobre el abanico de terapias alternativas para el tratamiento de enfermedades como la leishmaniosis.

I.4 Objetivos

I.4.1 General

Determinar las propiedades antileishmanicas de los extractos etanólicos de la hoja, cáscara y semilla del aguacate (*Persea americana*), proveniente de la región centro del estado de Chiapas.

I.4.2 Específicos

1. Determinar la presencia de flavonoides, terpenoides y saponinas en los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla del aguacate.
2. Determinar el grado de inhibición del crecimiento producido por extractos de hoja, semilla y cáscara del aguacate en cultivos de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

CAPITULO II

II.1 Materiales

II.1.1 Material biológico

Los extractos de hoja, cascara y semilla que se utilizaron en el presente estudio fueron obtenidos de *Persea americana* (Museo de Historia Natural del Estado de Chiapas, 2009), ubicado en el municipio de Suchiapa, Chiapas, especie de 10 años de edad. La recolección de la muestra, tanto de hojas y frutos se realizo mediante la recolección manual de las mismas, las cuales se lavaron con jabón y agua, y se pusieron a secar a temperatura ambiente por 6 semanas, protegidas de la luz solar y cubiertas con papel estrasa.

Se trabajó con la cepa de *Leishmania mexicana* MHOM/MX/92/UAY68 aislada de una paciente con leishmaniasis cutánea localizada. Gentilmente donada por la Dra. Ingeborg Becker, Investigadora de la Facultad de Medicina de la UNAM.

II.2 Métodos

II.2.1 Preparación de extractos crudos

Los extractos crudos de de hoja, cáscara y semilla de *P. americana* se realizaron macerando 2 g por separado de cada uno de los órganos vegetales secos con 20 mL de solución de extracción, (etanol: ácido acético: agua destilada, 90:0.5:9.5) a 4°C en obscuridad. Posteriormente se filtraron con gasa, la cual se lavó con 20 mL de la solución de extracción (SE). El extracto crudo se centrifugó por 10 min a 1000 g y la pastilla se lavó con 20 mL de SE. El sobrenadante se evaporó a presión reducida a 50 °C. El residuo se resuspendió con 1.5 mL de etanol al 80%. El material resuspendido se almacenó a -20°C hasta su utilización (Figura 9).

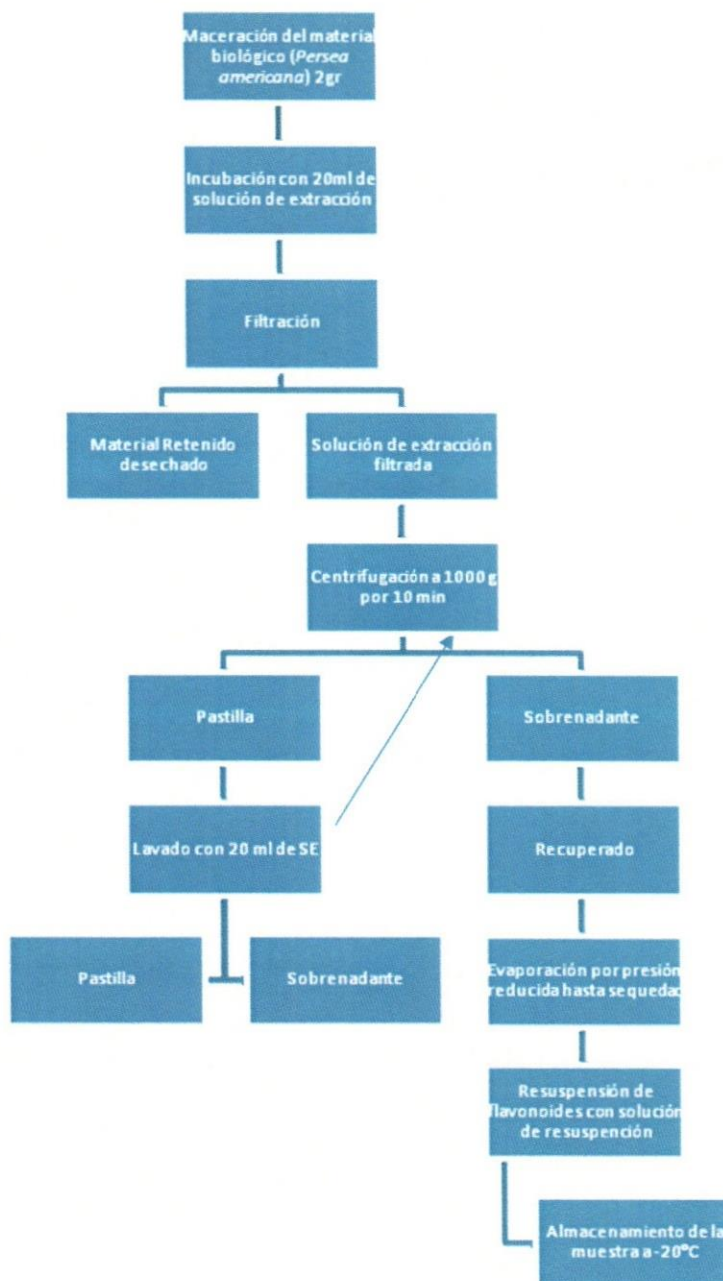


Figura 10. Diagrama de flujo de la técnica de extracción de flavonoides.

Para la evaluación de la actividad antileishmanica, el extracto etanólico se evaporó por medio de centrifugación al vacío en un Savant Speed-Vac hasta la petrificación. Se prepararon soluciones a concentraciones de 100, 250, 500 y 1000 μg de extracto seco y pulverizado en Tris-HCl 1M pH 11, posteriormente fueron diluidos en 5 mL de medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich ®) sin suero bovino fetal (SBF).

II.2.2 Análisis cuantitativo de los extractos crudos de aguacate (*P. americana*)

II.2.2.1 Cuantificación de flavonoles

La determinación de flavonoles presentes en los extractos crudos de hoja, cáscara y semilla de aguacate, se realizó por el método del cloruro de alumnio (Salamanca *et al*, 2007).

La curva estándar se preparó con muestras de diferentes concentraciones: 0, 20, 40, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de quercetina (Sigma ®) se mezclaron con 0.5 mL de la solución estándar (1.5 mL de etanol al 95%, 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10%, 0.1 mL de acetato de potasio 1 M y 2.8 mL de agua destilada. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente por 30 min se midió la absorbancia a 415 nm. Para la solución blanco el cloruro de aluminio al 10% se sustituyó por la misma cantidad de agua destilada.

La determinación de flavonoles en los extractos crudos se llevó a cabo mediante diluciones de los extractos: 1:10, 1:100 y 1:1000 en etanol al 80% como diluyente.

II.2.2.2 Cuantificación de flavanonas

La determinación de flavanonas de los extractos crudos de hoja, cáscara y semilla de aguacate, se realizó por el método de 2,4-dinitrofenilhidralazina, reactivo que forma complejos con las flavanonas, y son medibles mediante espectrofotometría (Salamanca *et al*). La curva de calibración se realizó utilizando naringenina (Anexo: tabla 13 y figura 32), 0.05 g de en 25 mL de metanol y se realizaron diluciones de soluciones de 0, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 y 2000 μg de naringenina (Sigma ®) se mezclaron con 2 mL de 1% de 2,4-Dinitrofenilhidrazina al 2 mL de metanol. Cada una de las mezclas se colocaron en baño maría a 50 °C por 50 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, y posteriormente se le añadieron 5 mL de 1%hidróxido de potasio en 70%metanol y se incubaron 2 min a temperatura ambiente. A 1 mL de la mezcla anterior se le adicionaron 5 mL de metanol y se centrifugó por 10 min para remover el precipitado. Del sobrenadante se recuperó 1 mL y se aforó a 5 mL con metanol. La mezcla se sometió a análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 495 nm. Para la cuantificación de flavanonas en los extractos crudos únicamente se sustituyó la naringenina por un mililitro de extracto crudo.

II.2.2.3 Cuantificación de fenoles totales

La determinación se llevó a cabo en 0.1 mL de muestra y se le adicionaron 4.2 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo Folin- Ciocalteau. Esta mezcla se incubó por 1 min, y se añadió 1 mL de solución de 2% carbonato de sodio y 4.2 mL de agua destilada. La mezcla se dejó en reposo por 2 horas a temperatura ambiente protegido de la luz. La lectura de la absorbancia se realizó a 760 nm. La curva de calibración se realizó con la solución patrón de ácido gálico con concentraciones 0, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1050 y 1200 ppm (ver Anexos).

II.2.3 Análisis cualitativo de los extractos crudos de aguacate (*P. americana*)

El análisis cualitativo de los extractos crudos de aguacate consistió en identificar la presencia de flavonoides, saponinas y terpenoides por medios cromatográficos.

II.2.3.1 Detección de flavonoides, saponinas y terpenoides por cromatografía en capa fina (TLC)

Los cromatogramas fueron realizados en placas Merck ® de gel de sílice 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm (0.25 mm de espesor) como fase estacionaria, la fase móvil empleada fue de acuerdo a los compuestos a detectar (Tabla 5) y fueron seleccionadas de acuerdo a su polaridad para establecer los valores de R_f evaluado para cada estándar. En cada cromatografía se aplicaron 10 µL de cada extracto.

Los cromatogramas fueron desarrollados a temperatura ambiente en una cámara vertical, la cual fue saturada con la fase móvil apropiada (Tabla 5). La cromatografía se detuvo hasta que el sistema de solventes había recorrido aproximadamente 18 cm a partir del origen. Los cromatogramas fueron secados con aire caliente.

La detección de flavonoides se realizó empleando el método reportado por Wagner (1984), se revelaron con una solución de cloruro férrico al 5% y aluminio al 5% en etanol y se observaron a luz UV (254 nm). Los estándares empleados fueron quercetina (Sigma ®) y naringenina (Sigma ®) a una concentración de 0.1 mg·mL⁻¹.

Tabla 5. Sistemas de solventes utilizados en la cromatografía en capa fina.

Sistema de solventes	Solvente
S1	Hexano: Acetato de etilo: Acido Acético (31:14:5)*
S2	Acetato de etilo: Ácido acético: Ácido fórmico: Agua (100:11:11:26)*
S3	Butanol: Acido Acético: Agua (40:10:50)*
S4	N -butanol: Ácido acético glacial: Agua. (50:10:40)°
S5	Benceno: Acetato de etilo (86:14)^

*Sistema para identificación de flavonoides

°Sistema para identificación de saponinas

^Sistema para identificación terpenoides

La detección de saponinas se realizó empleando la fase móvil S4. Los cromatofolios fueron secados con aire caliente, y revelados con una solución de vainillina 1% en ácido sulfúrico. La aparición de manchas con coloración azul o azul violeta, algunas pueden dar coloración amarilla indica la presencia de saponinas.

La detección de terpenoides se realizó empleando la fase móvil S5 (Tabla 5). Los cromatogramas fueron secados con aire caliente y se revelaron con reactivo de Liebermann-Burchard (anhídrido acético: ácido sulfúrico: etanol absoluto en proporciones de 5:5:50, la adición de anhídrido acético y ácido sulfúrico al etanol absoluto, se lleva a cabo lentamente en un baño de hielo). La aparición de manchas de coloración verde-azul es considerada como positiva la presencia de terpenoides.

II.2.4 Análisis parasitológico

II.2.4.1 Cultivo de *Leishmania mexicana*

El medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich ®) se preparó con 293 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de L-glutamina, 30 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineetanesulfónico (HEPES), 10,000 UI $\cdot\text{L}^{-1}$ de penicilina y 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de estreptomycin. Se suplementó con 10% de suero bovino fetal (SBF) descomplementado. El pH se ajustó a 7.4, y el medio se esterilizó con filtro de 0.22 micras estéril, en campana de flujo laminar. Se tomaron 2 alícuotas de 20 mL cada una y se pusieron a prueba de esterilidad a 37°C, el resto se almacenó a 4°C.

El cultivo de promastigotes de *Leishmania mexicana* se llevó a cabo en forma axénica en 10 mL de cada caja se inoculó con 1×10^6 parásitos y se incubaron a 26 °C, por 48 horas.

II.2.4.2 Determinación de la sensibilidad de *Leishmania* en fase de promastigote a los extractos de aguacate.

La sensibilidad de *Leishmania mexicana* en fase de promastigote a extractos crudos de aguacate se llevó a cabo determinando la concentración mínima inhibitoria de los extractos crudos por medio de citometría de flujo.

Los extractos crudos de hoja, cáscara y semilla se agregaron, a los cultivos de *Leishmania mexicana* de 48 h de crecimiento (fase inicial logarítmica de los cultivos), en concentraciones $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.500 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.250 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $0.100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, todos en un volumen total de 1 mL. En 500 μL de la solución Tris-HCl 1 M, pH 11 se diluyeron 50 mg, 25 mg, 12.5 mg y 5 mg de extracto seco, posteriormente esto se diluyó en 5 mL de medio RPMI 1640 sin inóculo, del cual se tomó 1 mL y se agregó al cultivo control.

En cada determinación se incluyeron tres controles: un control positivo el cual contenía $0.940 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de anfotericina B en lugar del extracto, un control negativo sin extracto en el que se sustituyó por medio de cultivo y un control vehículo sin extracto.

II.2.4.3 Preparación de las muestras para cuantificación por citometría de flujo

Las muestras de cultivo expuestas a los extractos, se procesaron tomando 100 μL de muestra, la cual se centrifugó por 10 min a 3,000 g, la pastilla se lavó en dos ocasiones con solución de lavado (PBS pH 7.4) y se centrifugó nuevamente por 10 min a 3,000 g, y se resuspendieron en un volumen total de 500 μL con solución de lavado.

Para la estandarización de la curva de regresión lineal, se realizó partiendo de una muestra de 1×10^6 parásitos sin extracto, de la cual se realizaron 10 diluciones seriadas a partir de la misma, y fueron cuantificadas por citometría de flujo, obteniendo el número de eventos por 30 segundos. El valor de Y se determinó mediante la estimación de X (Figura 6).

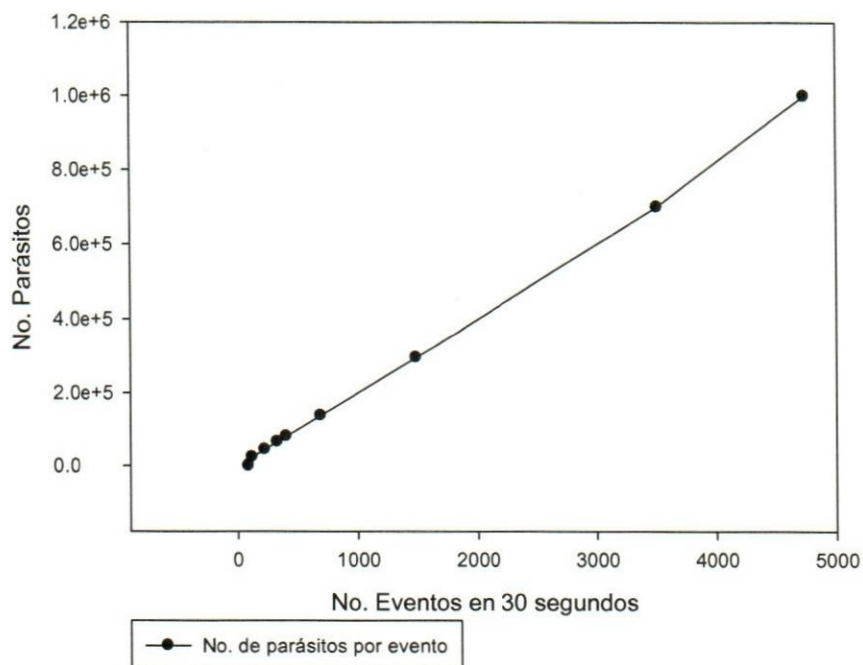


Figura 11. Regresión lineal del crecimiento de *Leishmania mexicana*. La ecuación de la curva $y=208.789x -7519.96$, $r^2=0.999435$

II.2.4.4 Microscopía óptica con tinción Giemsa

Se colocaron 100 μL de muestra de los cultivos sometidos al proceso de inhibición, sobre portaobjetos, la cual se dejó secar, se añadió 100 μL de tinción de Giemsa y se dejó secar. Las muestras preparadas se visualizaron en el microscopio.

CAPITULO III

III.1 Resultados

III.1.1 Efecto de la presencia de extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate (*Persea americana*) sobre el crecimiento de *Leishmania mexicana*.

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo⁵⁶. Mediante el empleo de esta técnica se determinó la actividad leishmanicida de los extractos Tris-HCl 1M pH 8.0 (ET) de hoja, cáscara y semilla de aguacate, a través de la cuantificación de número de parásitos.

Los ET de hoja, cáscara y semilla inhibieron el crecimiento de las formas promastigotes de *Leishmania mexicana*, a las diferentes concentraciones ensayadas. La concentración mínima inhibitoria (CMI), después de 72 h de incubación en presencia de los ET de hoja y cáscara fue de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y de la semilla $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cuando los cultivos se sometieron a la presencia de ET de hoja y cáscara en concentraciones de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, la lisis celular fue mayor. Cabe destacar que todos los extractos en concentraciones mayores a $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ presentaron igual o mayor actividad leishmanicida que la anfotericina B (Figura 11).

La presencia de Tris-HCl 1 M pH 11 en el cultivo de *Leishmania mexicana*, como vehículo, resultó inócuo para las células, ya que no hubo alteraciones morfológicas de los parásitos, ni disminución en el crecimiento.

El efecto del tiempo de incubación de *Leishmania mexicana* en presencia de los ET de hoja, cáscara y semilla fue hasta las 48 hr a concentraciones de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, a partir de las cuales todos los ET a esta concentración disminuyeron su efecto inhibitorio y permitieron el crecimiento de las células hasta cierto límite. Todas aquellas concentraciones por arriba de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ no permitieron el crecimiento celular, manteniendo su efecto leishmanicida hasta 120 Hr después.

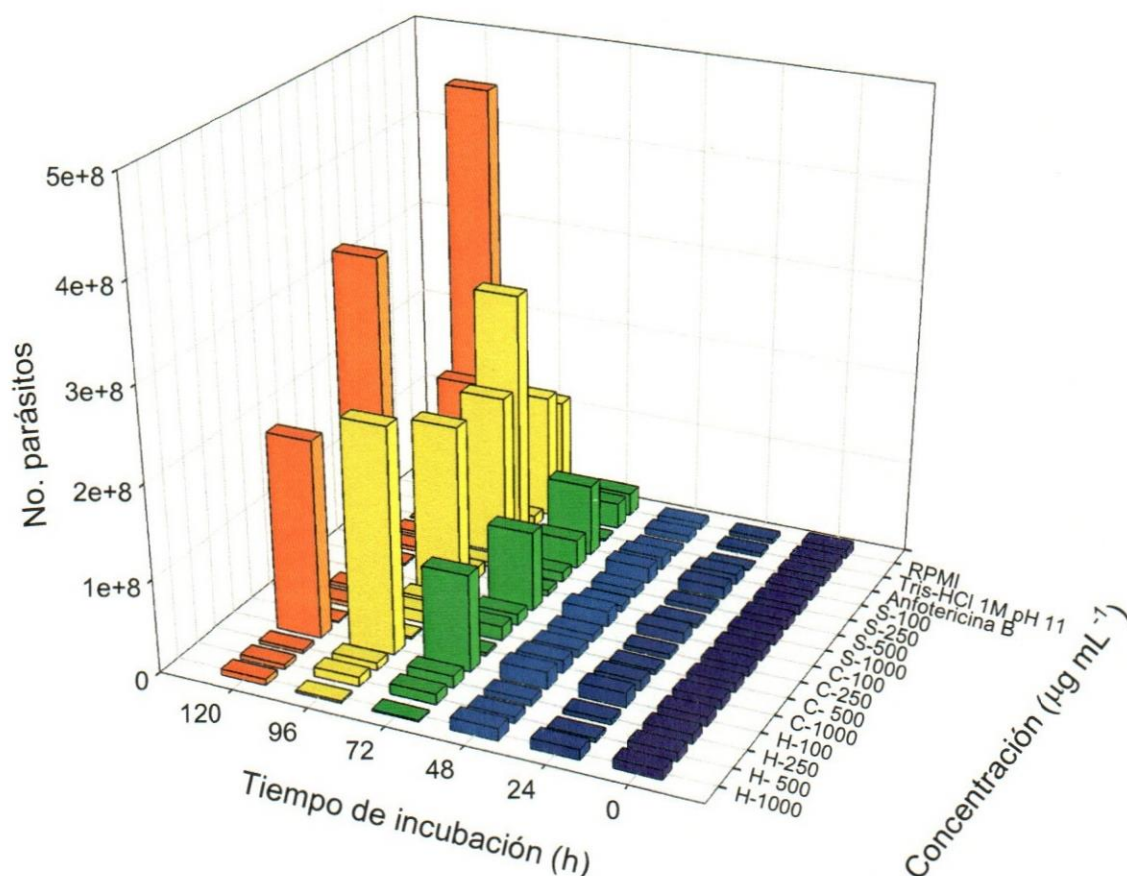


Figura 12. Actividad leishmanicida de los extractos etanólicos crudos de aguacate (*Persea americana*) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. H: extracto etanólico de hoja, C: extracto etanólico de cáscara, S: extracto etanólico de semilla. RPMI, medio de cultivo testigo.

III.1.1.2 Microscopía óptica de los cultivos de *Leishmania mexicana* en presencia de extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate (*P. americana*)

Para determinar los cambios estructurales más evidentes causados por los extractos ET de hoja, cáscara y semilla, a diferentes concentraciones, se llevó a cabo el análisis microscópico de las formas promastigotes de *Leishmania mexicana* cultivadas en ausencia o presencia de éstos. Las fotomicrografías mostradas en la Figura 12, ilustran parásitos con diferentes grados de daño después de 24 Hr de incubación en presencia de ET.

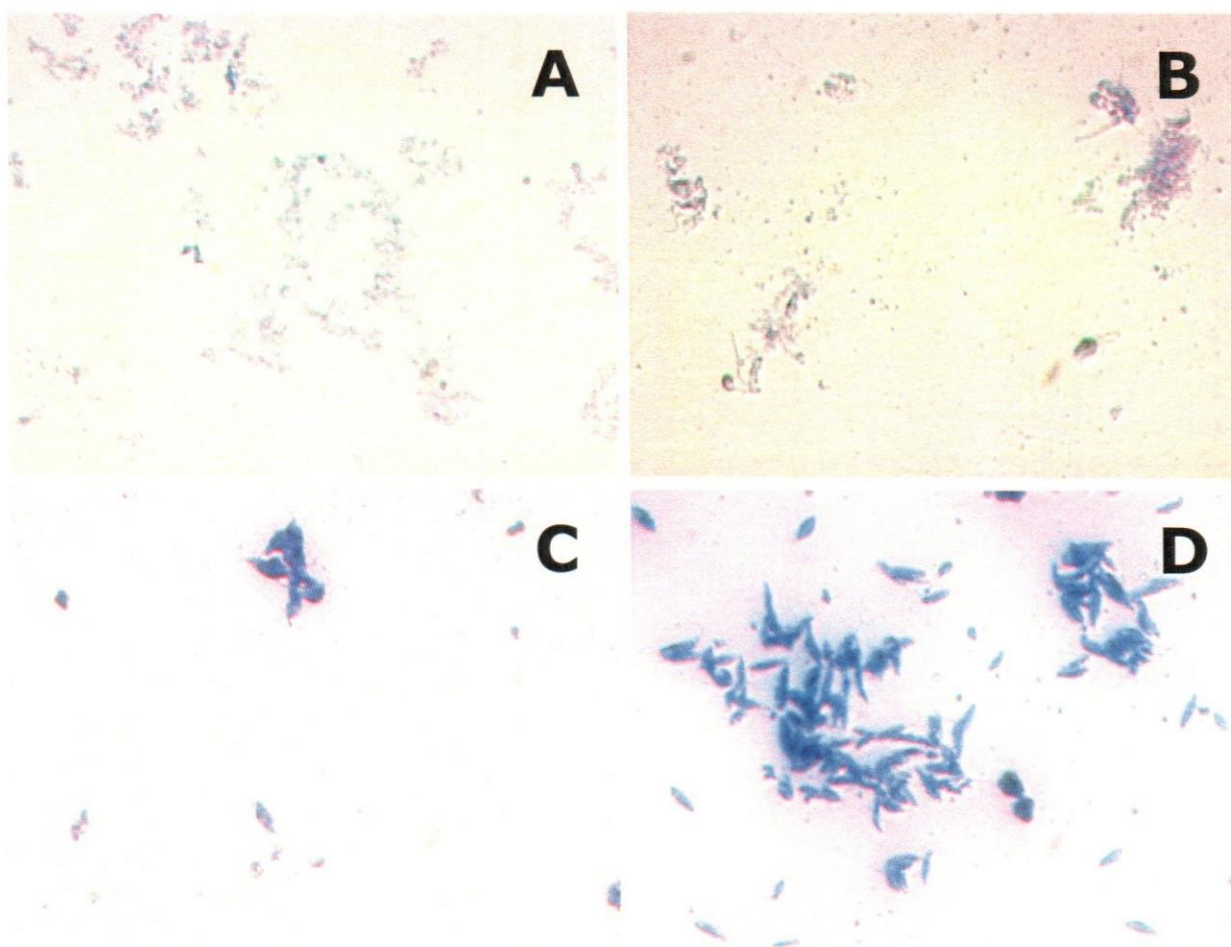


Figura 13. Microscopía del frotis de promastigotes de *Leishmania mexicana* en un cultivo de 72 hr de incubación y 24 Hr de evolución bajo los efectos del extracto crudo de la cáscara de aguacate (*Persea americana*). A) $1000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se aprecia lisis celular y aglutinación de restos celulares. B) $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se aprecia aglutinación de parásitos y detritus celulares. C) $250\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Aunque la integridad del cuerpo celular del parásito se conserva, se aprecia edema celular. D) $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, se aprecia un aparente detritus, sin embargo se trata de extracto, ya que los parásitos tienen íntegra su estructura celular.

Los promastigotes tratados con $1000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto de hoja y cáscara (Figura 12A) muestran alteraciones morfológicas significativas: aglutinación de los parásitos, lisis de la pared celular, deformación morfológica y ausencia de flagelo. Los cultivos tratados con $500\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mostraron estructura celular redondeada y edematizada (Figura 12B). En presencia de $250\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ los parásitos conservaron la integridad del cuerpo pero mostraron edema (Figura 12C). Finalmente, los tratados con $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto de hoja, cáscara y semilla conservaron su estructura celular y morfología normales (Figura 12D). No se

observaron cambios estructurales en los promastigotes cultivados en Tris-HCl 1 M pH 11, mostrando morfología celular normal, integridad en la pared celular y flagelo sin alteraciones.

III.1.2 Evaluación de los metabolitos presentes en los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate (*P. americana*)

Los extractos crudos etanólicos obtenidos de las diferentes partes del árbol de aguacate, contienen metabolitos con una polaridad semejante a este disolvente, por lo tanto, para discernir cual de éstos son los probables causantes de la actividad antileishmanisida, se hizo un análisis fitoquímico de algunos componentes y determinar los mayoritarios.

La cromatografía en capa fina permitió la identificación de flavonoides, saponinas y terpenoides dentro de los extractos etanólicos de la hoja, cáscara y semilla del aguacate. En los ensayos se emplearon placas de silica gel 60 F₂₅₄; para determinar la presencia de flavonoides se prepararon tres sistemas móviles diferentes, cada uno con un determinado grado de polaridad conferido por los eluyentes empleados, con la finalidad de conocer la naturaleza de las sustancias presentes en los extractos y hacer una adecuada separación de los compuestos. Los marcadores positivos empleados fueron la naringenina y quercetina para la detección de flavonoides, en el caso de las saponinas y terpenoides no fue necesario el uso de marcadores, ya que únicamente se esperaba una respuesta colorimétrica.

III.1.2.1 Identificación cromatográfica de flavonoides.

La cromatografía en capa fina es una técnica que permite la identificación preliminar de una sustancia, basada en el fundamento de las diferencias de polaridad de cada uno de los elementos empleados para su realización, en este trabajo se identificaron algunos flavonoides que se encontraron presentes en los extractos. Se emplearon tres sistemas de solventes con diferentes polaridades; la fase móvil el sistema S1 (Hexano: Acetato de etilo: Acido Acético, 31:14:5) de características poco polares (Figura 13) resolvió algunas manchas y arrastró a los estándares a distancias intermedias.

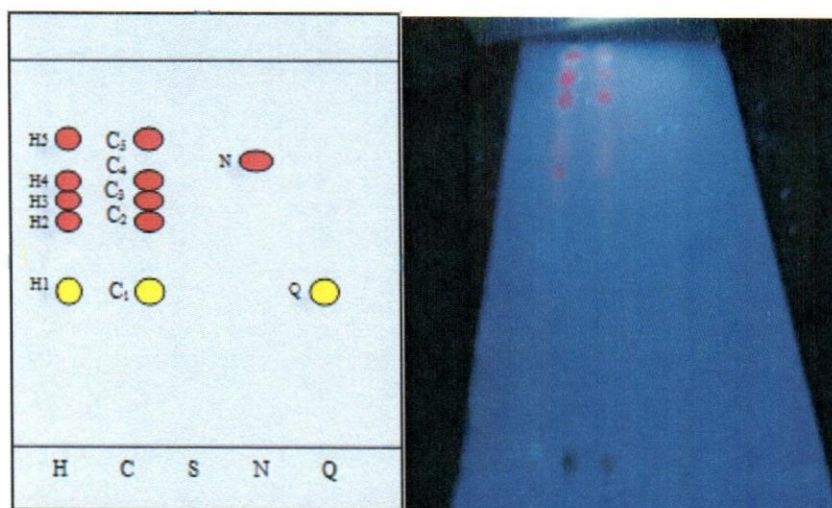


Figura 14. Cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos de: H, hoja; C, cáscara; S, semilla; N, naringenina y Q, quercetina. Sistema de solventes S1, Hexano: Acetato de etilo: Acido Acético (31:14:5); Revelador: Luz UV.

El R_f de la quercetina (Q) fue de 0.42 y para la naringenina (N) de 0.66. De la separación de los compuestos de los extractos se observa que la mancha H_1 del extracto de hoja y C_1 de la cáscara coinciden con la quercetina, teniendo un R_f de 0.42 y 0.65, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. R_f de los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate en el sistema de solventes S1.

R_f Hoja	R_f Cáscara	R_f Semilla	R_f N	R_f Q
H_1 0.42	C_1 0.42	s/r*	0.66	0.39
H_2 0.65	C_2 0.66	s/r*		
H_3 0.74	C_3 0.75	s/r*		
H_4 0.83	C_4 0.85	s/r*		
H_5 0.91	C_5 0.92	s/r*		

s/r* = sin resolución

En los extractos de hoja (H_{2-5}) y cáscara (C_{2-5}) se identificaron sustancias con valores de R_f similares entre ellas, pero que no coinciden con el de los estándares empleados. De hecho este resultado sugiere que son compuestos con polaridades muy semejantes al sistema S1, ya que la distancia recorrida por ellas está muy cercana al frente del cromatofolio. En el extracto de semilla no hubo separación de compuestos con este

sistema de solventes (Tabla 6), lo que significa que los compuestos fenólicos presentes en este extracto son totalmente opuestos a la polaridad del sistema S1.

La cromatografía empleando como fase móvil S2 (Acetato de etilo: Ácido acético: Ácido fórmico: Agua, 100:11:11:26), dio como resultado una menor separación de compuestos de los extractos y un R_f para la quercetina (Q) y la naringenina (N), de 0.78 y 0.92, respectivamente (Figura 14).

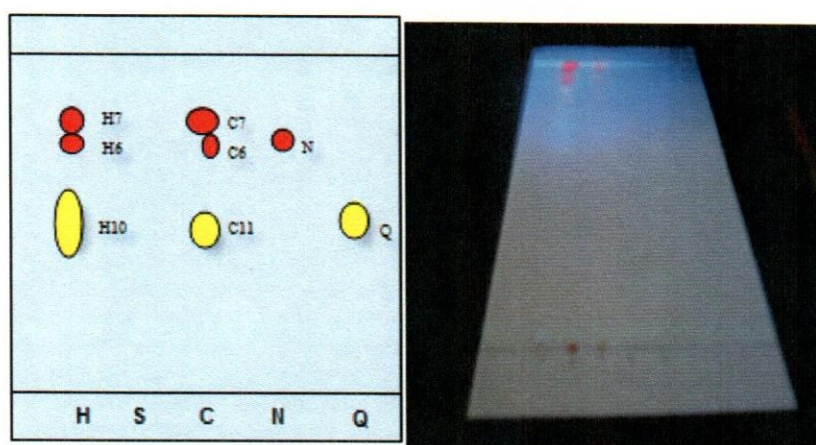


Figura 15. Cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos de: H, hoja; C, cáscara; S, semilla; N, naringenina y Q, quercetina. Sistema de solventes S2, Acetato de etilo: Ácido acético: Ácido fórmico: Agua (100:11:11:26); Revelador: Luz UV.

En los extractos de hoja, se detectaron dos sustancias H_6 , H_7 y H_{10} y de cáscara, C_6 , C_7 y C_{11} con R_f 's semejantes, 0.94, 0.97 y 0.78 (Tabla 7). En el extracto de semilla no hubo separación de compuestos. Estos valores de R_f , tanto para estándares como para extractos, sugieren una polaridad muy cercana al sistema S2, lo que impide su separación y una buena resolución.

Tabla 7. R_f de los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate en el sistema de solventes S2.

R_f Hoja	R_f Cáscara	R_f Semilla	R_f N	R_f Q
H_6 0.94	C_6 0.94	s/r*	0.92	0.78
H_7 0.97	C_7 0.97	s/r*		
H_{10} 0.78	C_{11} 0.78	s/r*		

s/r*= sin resolución

Los resultados obtenidos con el sistema S3 (Butanol: Ácido Acético: Agua, 40:10:50), se presentan en la Figura 15. El R_f de quercetina (Q) y naringenina (N) es 0.69 y 0.71, respectivamente.

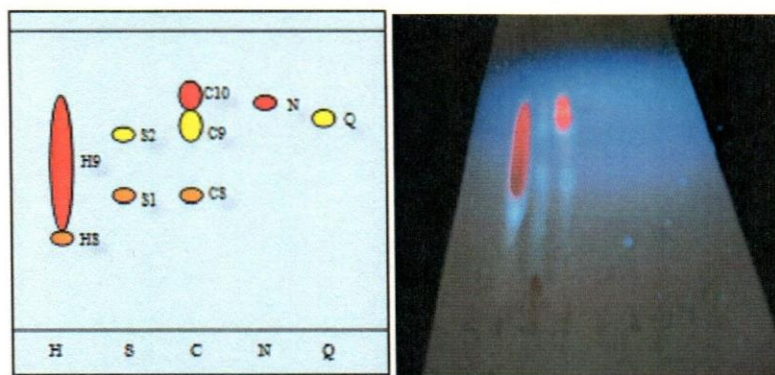


Figura 16. Cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos de: H, hoja; C, cáscara; S, semilla; N, naringenina y Q, quercetina. Sistema de solventes S3, Butanol: Ácido Acético: Agua (40:10:50); Revelador: Luz UV.

El extracto de hoja presentó dos manchas, H_8 y H_9 , la primera de ellas barrida y dando lugar a un R_f difícil de calcular ya que no hubo separación de compuestos; en el extracto de cáscara (C_{8-10}) se identificaron tres manchas con R_f de 0.38, 0.65 y 0.73. En el extracto de semilla (S_1 y S_2) se revelaron dos manchas con R_f de 0.38 y 0.70.

Tabla 8. R_f de los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate en el sistema de solventes S3.

R_f Hoja	R_f Cáscara	R_f Semilla	R_f N	R_f Q
H_8 0.22	C_8 0.38	S_1 0.38	0.71	0.69
H_9 s/c	C_9 0.65	S_2 0.70		
	C_{10} 0.73			

La polaridad del sistema S3 permitió la separación de manchas del extracto etanólico de la semilla de aguacate.

III.1.2.2 Identificación cromatográfica de saponinas.

Para la identificación de saponinas los extractos crudos de aguacate se sometieron a la cromatografía en capa fina empleando al sistema S4 (N -butanol: Ácido acético glacial: Agua, 50:10:40). Esta prueba solo es cualitativa por lo que no se utilizaron estándares.

El revelado de la placa con una solución de vainillina al 1% en ácido sulfúrico, permite determinar la presencia de saponinas si hay aparición de manchas violetas y amarillas. Los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla presentaron manchas de éstos colores; la de mayor intensidad se localizó en el carril del extracto de hoja, de mediana intensidad en el extracto de cáscara y de baja intensidad en el extracto de semilla (Figura 16).

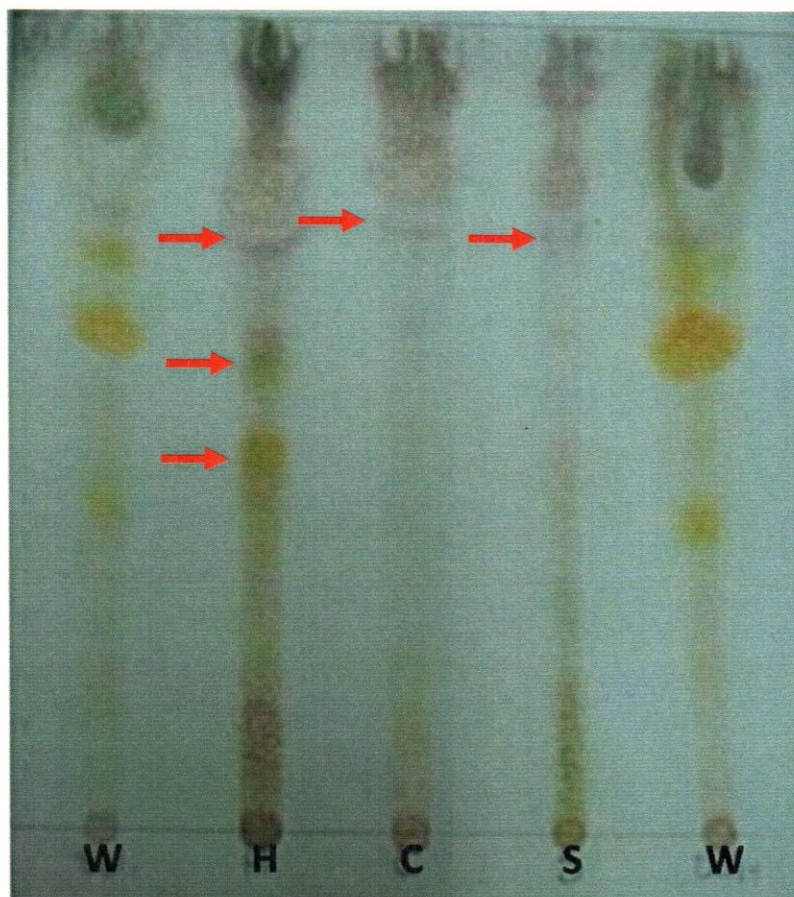


Figura 17. Cromatografía en capa fina de saponinas en los extractos de *Persea americana*; Sistema de solventes S4; Revelador: solución de vainillina 1% en ácido sulfúrico. H, hoja; C, cáscara; S, semilla; W, *Linum* spp.

III.1.2.3 Identificación cromatográfica de terpenoides.

Al igual que para determinar la presencia de saponinas, para el caso de los terpenoides también se empleó la cromatografía en capa fina pero utilizando como sistema de solventes el S5 (Benceno: Acetato de etilo, 86:14) y como revelador el reactivo de Liebermann-Burchard. La presencia de manchas azul-verdosas, se observaron en el extracto de hoja (Figura 17); el extracto de cáscara únicamente presento una mancha azul-verdosa de muy poca intensidad. El extracto etanólico de semilla no presento manchas, lo que sugiere la ausencia de estos metabolitos en ella.

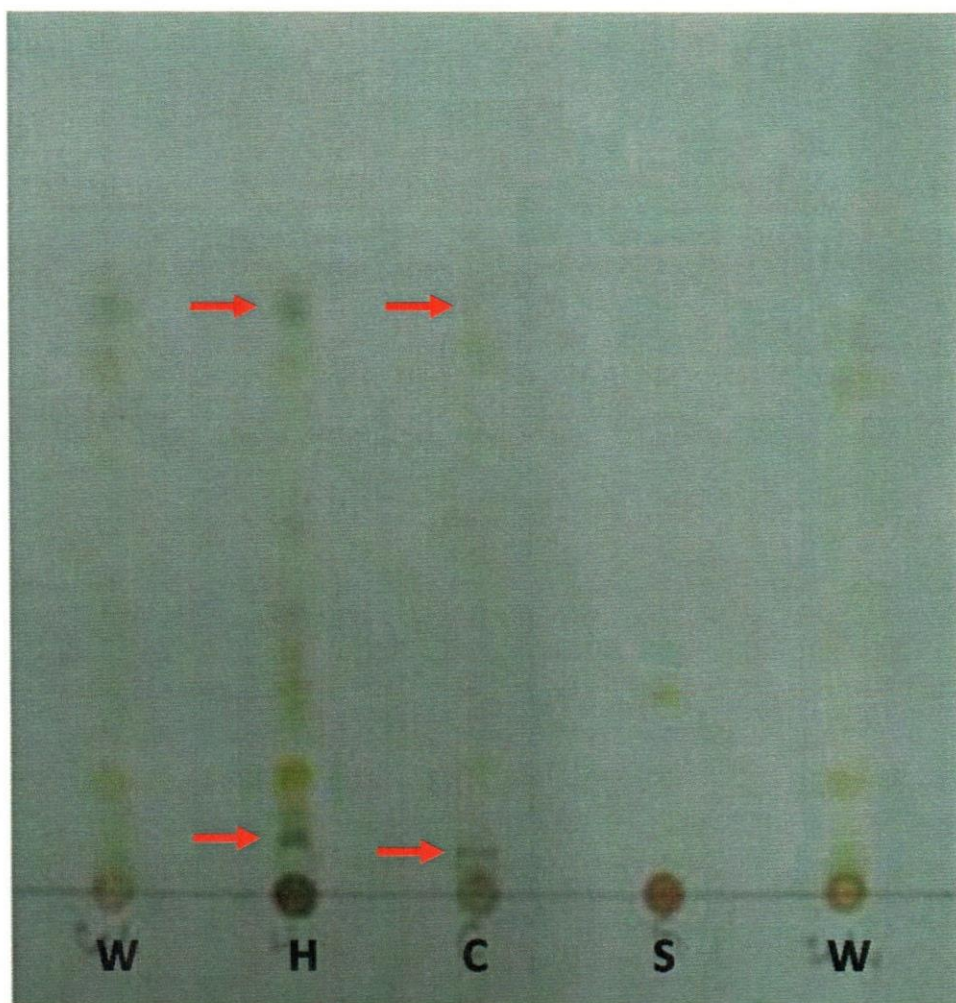


Figura 18. Cromatografía en capa fina de terpenoides en los extractos de *Persea mericana*; Sistema de solventes S 5; Revelador: reactivo de Liebermann-Burchard. H, hoja; C, cáscara; S, semilla; W, *Linum* spp.

III.1.3 Cuantificación de flavonoides

El análisis preliminar cuantitativo de metabolitos presentes en los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla de aguacate, nos indican que los compuestos mayoritarios son los flavonoides y por lo tanto, los fenoles totales; por lo que el siguiente paso fue cuantificarlos empleando métodos colorimétricos.

Dentro de los flavonoides existen dos grandes grupo de polifenoles, los flavonoles representados principalmente por la quercetina y las flavononas por la naringenina, por lo que se procedió a su cuantificación. La concentración más elevada de flavonoles lo presentaron las partes aéreas del árbol del aguacate, hoja y cáscara del fruto, el análisis estadístico indica que hay diferencia significativa ($\alpha=0.05$) entre estos dos extractos, siendo el de hoja el de mayor concentración. En el caso de las flavononas la mayor concentración se encontró en hoja y semilla del fruto (Figura 18). El análisis estadístico ($\alpha=0.05$) señala que no existe diferencia significativa entre estos dos extractos.

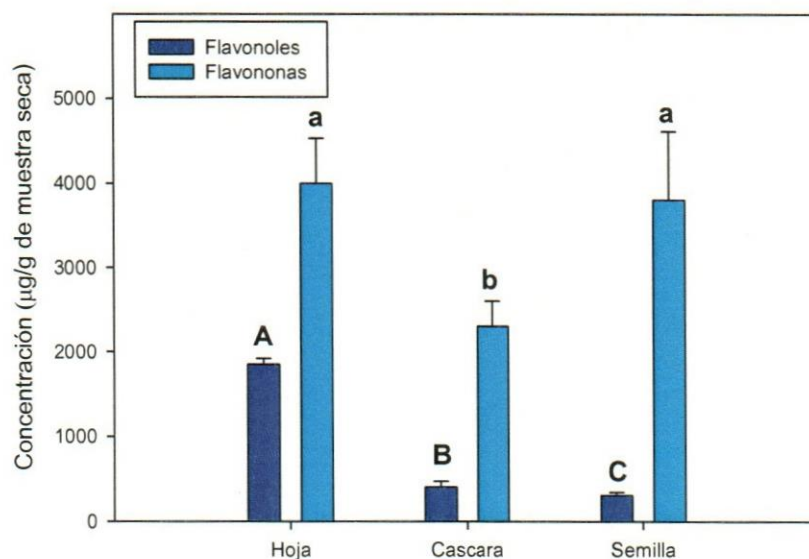


Figura 19. Concentración de flavonoides en hoja, cáscara y semilla de aguacate (*P. americana*). Todos los experimentos son el promedio de 3 repeticiones. La comparación de medias se realizó por Tukey ($\alpha=0.05$).

En la Figura 19 se presenta el contenido de flavonoides totales (suma de la concentración de flavononas y flavonoles) y de fenoles totales en los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla; el análisis estadístico indica que existe diferencia significativa ($\alpha=0.05$) en la concentración de ambos compuestos polifenólicos en las diferentes muestras. Así, la mayor concentración de flavonoides totales se encuentra en la hoja, seguida por la semilla y la cáscara, entre estas dos últimas no existe diferencia significativa. La mayor concentración de fenoles totales se encontró en la cáscara y la hoja y por último la semilla. El análisis estadístico ($\alpha=0.05$) de la concentración de fenoles totales de hoja y cáscara indica que no hay diferencia significativa entre ellas.

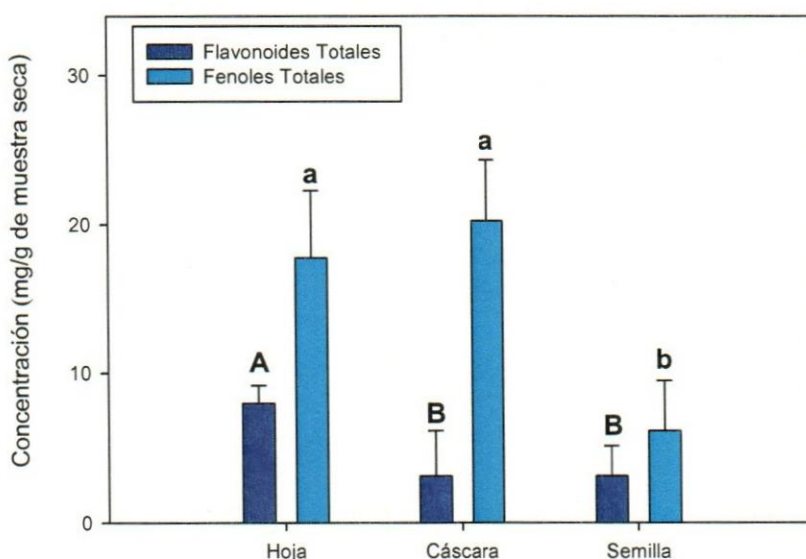


Figura 20. Concentración de flavonoides totales y fenoles totales en hoja, cáscara y semilla de aguacate (*P. americana*). Todos los experimentos son el promedio de 3 repeticiones. La comparación de medias se realizó por Tukey ($\alpha=0.05$).

III.2 Discusión

Con la finalidad de documentar con bases científicas las observaciones hechas por la medicina tradicional, y como un recurso alternativo y accesible, para hacer frente a una de las enfermedades del rezago, tal como la leishmaniasis, la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida se llevó a cabo en las hojas, cáscara y semillas de aguacate (*Persea americana*).

La presencia de metabolitos secundarios en las plantas y las múltiples funciones que estos realizan data de los primeros estudios en los que Müller y Börger, en 1941 introdujeron el concepto de fitoalexinas (fitos=planta; alexos=detener) en el marco de resistencia a enfermedades en vegetales, y la caracterización de dichas sustancias hechas por Cruickshank y Perrin, hasta 1960, quienes la describieron como un derivado pterocarpano, molécula química perteneciente al grupo de los metabolitos secundarios. En 1959, Fraenkel, hizo evidente la importancia del papel mediador de los metabolitos secundarios en las relaciones planta-insecto. En 1970, Cornelius H. Müller identificó la presencia de metabolitos secundarios con actividades mediadoras de interacciones ecológicas planta-planta y planta-microorganismo⁶¹. Otras propiedades de los metabolitos secundarios están relacionadas con sistemas defensivos o de excreción, y son responsables del olor, sabor y color de la planta, así como de sus propiedades medicinales⁵⁷. Por ejemplo, los flavonoides son protectores capilares y venosos, favoreciendo la correcta síntesis de colágeno, inhiben la agregación plaquetaria y muchos de ellos son protectores hepáticos; algunos presentan actividades diuréticas, espasmolíticas, antiinflamatorias y antimicrobianas. En el caso de los terpenoides se les conoce actividades antitumorales, antiinflamatorias, hipocolesterolemiantes, y espasmolíticas. Y las saponinas se caracterizan por tener actividades tensioactivas, afrógenas y hemolíticas⁵⁸. Partiendo de las observaciones realizadas por la medicina tradicional amazónica, la cual sugiere el empleo del aguacate como terapia medicinal en la leishmaniasis cutánea⁴⁵, indujo a la búsqueda intencionada de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenoides y saponinas en los extractos etanólicos exclusivamente de las partes aéreas de la planta, hojas y fruto, a pesar de que la literatura reporta la presencia de estos metabolitos secundarios tanto en hojas, como en frutos, raíces y flores de las plantas superiores⁶¹, el criterio se basó en los usos de

la medicina tradicional chiapaneca, la cual emplea estas partes del árbol con fines curativos de otra índole⁶.

El solvente de extracción empleado, etanol, aumenta la diversidad de sustancias que pudieran encontrarse en los extractos con actividad leishmanicida, ya que el etanol ofrece la capacidad de formar enlaces de hidrógeno y ceder pares de electrones, como el agua, pero además también posee un extremo lipófilo que puede ayudar a la solvatación de sustratos orgánicos⁶⁶, con base en esto, es de esperarse la presencia de sustancias que van de un alto grado de polaridad a una polaridad intermedia o anfipática, tales como los flavonoides⁶⁸, y poco polares como terpenos y alcaloides; debido a que las saponinas son sustancias muy polares, es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular⁴¹. La presencia de proteínas es dudosa ya que solventes como el etanol producen precipitación y desnaturalización de las mismas, aunado a que el proceso de extracción se realiza mediante presión reducida a 50°C, temperatura que produce daños estructurales en las proteínas⁵⁹.

En los extractos etanólicos de *Persea americana* las partes aéreas o expuestas de la planta fueron las que presentaron mayor concentración de flavonoles y flavonas así como flavononas; la parte no aérea, la semilla del fruto, la cual a pesar de presentar concentraciones elevadas de flavononas la concentración de flavonoles y flavonas es menor a la cuantificada en la hoja y cáscara del fruto. A este respecto los flavonoides sin ser metabolitos primarios, se encuentran casi en cualquier vegetal superior, hay más de 8000 compuestos conocidos de plantas vasculares mientras que en los vegetales inferiores: algas, hongos y bacterias, los compuestos fenólicos principales son quinonas y xantonas y a éstos deben su color. Las plantas concentran los flavonoides en compartimentos microcitoplasmáticos, en la gran vacuola central y fuera de la pared celular. A finales de 1800, se postuló una posible función protectora de los flavonoides ante la luz excesiva, y son las flavonas y flavonoles los mejores protectores contra las ondas largas (UV-A de 320 a 400 nm), y las flavononas contra las ondas medianas (UV-B de 290-320 nm)⁶⁹.

Los flavonoides en las diferentes especies vegetales toman diferentes roles dentro de la fisiología ya que pueden actuar como mensajeros químicos ante la defensa de microorganismos, funcionan como antioxidantes ante los cambios de temperatura, participan en la resistencia a los niveles elevados de metales en la tierra, ya que se unen a

los metales, evitando el proceso oxidativo³¹, desempeñan un papel de gran importancia en las relaciones ecológicas de las plantas con otros organismos actuando como fitoalexinas, metabolitos secundarios que la planta sintetiza cuando se ve atacada por hongos y bacterias patógenos. De las fitoalexinas conocidas hasta la fecha, la mayoría son flavonoides, y específicamente pterocarpanos. También algunas flavanonas, dihidroflavonoles e isoflavonas poseen actividad fungicida notable, tales como la formononetina, la dizdeína, la genisteína y la prunetina. Otro tipo de flavonoides tienen un papel ecológico establecido en proveer de colores atractivos a las flores para promover la polinización y la dispersión de frutos y semillas²⁹.

En el aguacate se ha reportado la presencia de flavonoides, quercetol, catequina, epicatequina, cianidina, procianidina A-1, A-2, B-1 a B-5, C-1, D-1, D-2, E, G, quercetina, perseita, persiteol⁶³.

Otros metabolitos secundarios identificados en la hoja y cáscara del fruto del aguacate fueron terpenoides, los cuales desempeñan una función en el crecimiento vegetal actuando como hormonas vegetales⁶⁴.

Arango (1994) reporta la presencia de saponinas en el fruto del aguacate, este trabajo los refiere en las tres muestras de la planta, hoja, cáscara y semilla⁶⁵. La importancia de estos metabolitos radica en que son considerados una parte del sistema de defensa de las plantas, fitoalexinas, por ser antimicrobianos, de inhibir el moho, y por la protección ante los ataques de insectos; tienen propiedades de detergente lo que incrementa la permeabilidad de las membranas celulares⁴².

La actividad leishmanicida de los extractos se observó uniformemente en los extractos ET de hoja y cáscara a una concentración de 1000, 500 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se mantiene hasta por 120 h, tiempo de duración del ensayo; a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ la actividad disminuye y después de 48 h hay crecimiento celular. El ET de semilla, también tuvo actividad leishmanicida a concentraciones de 1000 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sin embargo, a diferencia de los ET de hoja y cáscara esta actividad disminuyó a 250 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a partir de las 48 h de incubación. El análisis fitoquímico de los diferentes extractos indica que los tres ET tienen flavonoides y saponinas en su composición, siendo los mayoritarios los de hoja y cáscara; la presencia de terpenoides solo se detectó en los extractos de hoja y cáscara, por lo que se sugiere que los flavonoides y probablemente las saponinas, son los

responsables de la actividad leishmanicida, sin descartar la posibilidad de que haya un efecto sinérgico de los diferentes compuestos (Cushnie et al. 2005, Mandalri et al. 2007).

La actividad leishmanicida de los polifenoles se ha reportado por varios autores, utilizando diversas plantas como fuente de estos compuestos. Ejemplo de esto es la flavona y la chalcona isocordoina encontradas en *Lonchocarpus* spp. con actividad antiparásitica sobre promastigotes de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* (Bórguez-Argáez et al. 2007). La 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona proveniente de la planta *Piper aduncum* inhibe el crecimiento *in vitro* de promastigotes de *L. amazonensis* (Torres-Santos et al. 2009), así como la licochalcona A obtenida de raíces de la planta *Glycyrrhiza* spp. sobre promastigotes de *L. major* y *L. donovani* (Chen et al. 1993, 1994). Estos resultados han dirigido algunos estudios hacia pruebas de flavonoides y chalconas puras sobre cultivos *in vitro* de prosmatigotes con la finalidad de determinar la relación cuantitativa estructura-actividad (Tasdemir et al. 2006); estos han encontrado que la quercetina y la 7,8-dihidroxi-4'-metoxichalcona son los que tienen mayor efectividad.

El esqueleto carbonado básico de flavonoides puede tener numerosos sustituyentes, los grupos hidroxilos y los azúcares aumentan la solubilidad en agua, otros sustituyentes como grupos metilésteres o unidades modificadas de isopentilo hacen que los flavonoides tengan un carácter lipofílico (hidrofóbico). Dado que estos compuestos pueden poseer características lipofílicas y un nivel detectable de solubilidad en agua, la cual depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes, podemos especular que su actividad antiparasitaria está correlacionada con la capacidad a migrar a través del medio acuoso extracelular e interactuar con los lípidos de las membranas o las proteínas que se encuentran en ellas, tal como sucede con los medicamentos que tienen la capacidad de afectar la permeabilidad de las membranas y que no solo se ven influenciados por la carga de superficie neta de la membrana, sino también por la composición de lípidos (Trombetta et al. 2005). Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (DMC) altera la composición de esteroides inhibiendo la biosíntesis de ergosterol, afectando así la fluidez de la membrana de *L. amazonensis* y por lo tanto ocasionando la muerte de estos parásitos (Torres-Santos et al. 2009).

Por otro lado, también se ha reportado que la presencia de flavonoides disminuye la resistencia a las drogas o MDR (de sus siglas en inglés Multidrug resistance) que algunos

parásitos de *Leishmania* adquieren con el tiempo en presencia de éstos fármacos. Esta resistencia está ligada a la presencia en las membranas de *Leishmania* de un gran número de proteínas pertenecientes al grupo de transportadores de metabolitos llamados ABC que dependen de ATP para su función (Pérez-Victoria et al. 2001); entre las que destacan la glucoproteína P (Pgp) y la proteína MRP (de sus siglas en inglés Multidrug Resistance Associated Protein). Estos transportadores expelen las drogas fuera de la célula del parásito evitando así su efecto. Parece ser, que los flavonoides interaccionan con una de las subunidades hidrofóbicas de ésta proteínas alojándose en el sitio en donde se une el ATP inhibiendo el transporte y favoreciendo la acumulación del fármaco dentro de las células de *Leishmania* ocasionando finalmente su muerte (Conseil et al. 1998, Wong et al. 2007, Polonio & Effert 2008).

Por último, se ha encontrado que la quercetina quela al Fe^{3+} , que es el cofactor indispensable de la ribonucleótido reductasa, la carencia de este metal inhibe la biosíntesis de ADN al no haber desoxiribonucleótidos disponibles, impidiendo así la proliferación de *Leishmania* (Sen et al 2008).

Wagner, H. S. Bladt & E.M. Zgainski. 1984. *Plant drug analysis*. Germany: Springer-Verlag, 1984.

Wagner H, Bladt S. Plant Drug Análisis. A thin Layer Chromatography Atlas; Flabonoids Drugs including Gingko biloba and Echinaceae Species. 2 ed. Alemania: Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 1996. 284p. (p.195-197).

Capítulo IV

IV.1 Conclusiones

Los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla del aguacate (*Persea americana*) contienen concentraciones variables de metabolitos secundarios tales como saponinas, terpenoides y flavonoides, estos últimos se encontraron en mayor concentración en las partes aéreas de la planta tal como es la hoja y la cáscara del fruto.

Los extractos etanólicos de hoja, cáscara y semilla del aguacate (*Persea americana*) tienen actividad leishmanicida.

La actividad leishmanicida de los extractos etanólicos de hoja y cáscara del fruto del aguacate son las más elevadas.

IV.2 Recomendaciones

Aunque los resultados obtenidos arrojan información interesante acerca de las propiedades de *Persea americana*, el seguimiento de los mismos es preponderante para determinar el alcance de este estudio en el planteamiento de una terapia alternativa, en base a las observaciones realizadas por la medicina tradicional; aunque los estudios de citotoxicidad, las pruebas de inhibición en amastigotes y la experimentación con especies más agresivas de *Leishmania spp.*, serían determinantes al respecto; igualmente es relevante determinar la naturaleza de el o los metabolitos relacionados con estos resultados, caracterizar la fuente de los mismos, permitiría un aprovechamiento completo de uno de los recursos naturales más populares por su fruto exótico, en nuestro país, y en la medicina tradicional en poblaciones rurales por sus propiedades antiinflamatorias. No está demás promover el uso racionado y la conservación de las especies vegetales con las que se cuentan, no únicamente en el estado de Chiapas, sino en el resto de la geografía ya que pudiera ser que en ellos se encuentren los tratamientos para enfermedades agobiantes, tal como es el caso de la leishmaniosis; es necesario puntualizar que este trabajo al igual que otros similares refleja la ignorancia que hay acerca de las propiedades de las especies vegetales más comunes que nos rodean dejando entrever que las especies no tan comunes y aún desconocidas probablemente poseen propiedades medicinales iguales o de mayor alcance.

CAPITULO V

V.1 Bibliografia

1. Walker AS, Microbiología, McGraw-Hill Interamericana, 2000, pp: 473-476.
2. Anónimo. OMS 6ª asamblea mundial de salud A60/10; Marzo 2007.
3. Sharif M, Ziaei H, Azadbakht M, Daryani A, Ebadattalab A, & Rostami M. (2006). Effect of methanolic extracts of *Artemisia aucheri* and *Camellia sinensis* on *Leishmania major* (In Vitro). Turk J Med Sci., 36: 365-369.
4. www.who.int/topics/tropical_diseases/en/ [consultada en Enero 2007].
5. Markle W, and Makhoul K. (2004). Cutaneous leishmaniasis: Recognition and treatment. American Family Physician, 69:1455-1459.
6. C. Teresa Ortiz. Faja de Oro, Cacahoatán; Chiapas.
7. <http://www.napralert.org/>
8. Staat R, and Peyton J. (1984). Adherence of oral Streptococci: evidence for nonspecific adsorption to saliva-coated hydroxylapatite surfaces. Infec. Immun., 44: 653-659.
9. Staat R, Langley S, & Doyle J. (1980). *Streptococcus mutans* adherence: Presumptive evidence for protein-mediated attachment followed by glucan-dependent cellular accumulation. Infec. Immun., 27:677.
10. Leung AY, & Foster S. (1980). Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. New York, NY: John Wiley and Sons.
11. Osadebe O, & Ukwueze E. (2004). A comparative study of the phytochemical and antimicrobial properties of the eastern nigerian specie of african mistletoe (*Loranthus micranthus*) sourced from different host trees. Bio-Research; 2:18-23.
12. Almeida A, Miranda M, Simoni C, Wigg D, Lagrota M, and Costa S. (1998). Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea Americana* (Lauraceae) leaf infusion. Phytotherapy Research; 12:562-567.
13. Doyle R, Nedjat-Haiem F, Miller R, and Sëller K. (1982). Interaction between plant agglutinins and *Legionella* species. Clin. Microb., 15:973-975.

14. Ekor M, Adepoju G, and Epoyun A. (2006). Protective effect of the methanolic leaf extract of *Persea americana* (Avocado) against Paracetamol-Induced acute hepatotoxicity in rats. J. Pharm. 2 : 416-420.
15. Lans, C. (2006). Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. Ethnob. Ethnomed., 2:45.
16. Vannier-Santos M A, Martiny A, and de Souza W. (2002). Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and evading. Current Pharmaceutical Desing, 8: 297-318.
17. Flisser Steinbruch Ana y Pérez Tamayo Ruy. (2006). Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. Editores de textos mexicanos, 1ª. Edición, pp:
18. Vieira L, Lavan A, Dagger F, and Cabantchik Z. (1994). The role of Anions in pH Regulation of *Leishmania* major Promastigotes. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 269, No. 23, Issue of June 10, pp. 16254-16259.
19. Archivos del programa de leishmaniasis del estado de Chiapas 1990-2008 de la Secretaría de Salud del Estado de Chiapas.
20. Cuaderno Técnico No. 44, Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud 525 Twenty-third Street, N.W. Washington, D.C. 20037, E.U.A.
21. Roberts L J, Handman E, & Foote S J (2000). Science, medicine, and the future Leishmaniasis. BMJ, 321.
22. Coll J. (1997). New horizons in *Leishmania* cultivation. Physicians Surg Park. 7(2): 53-7.
23. Gallego M, y Riera C. (2000) Las leishmaniosis humana: leishmaniosis autóctona por *Leishmania infantum*. Control Calidad SEIMC. Universidad de Barcelona.
24. Cordova- Uscanga C, AlbertosAlpuche N E, Andrade-Narvaez F J, Canto-Lara S B. (1993). Leishmaniasis: Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del estado de Tabasco. Salud Pública de México, 35 (4).
25. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J M y Tuñón M J. (2002). Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. 17 (6): 271-278.
26. Moreno Álvarez M J. (2004). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soja desodorizado. INCI. 29 (9).

27. Harborne J B, Mabry T J, & Mabry H. (1975). "The Flavonoids", Chapman and Hall, London.
28. Brenzan M A, Vataru Nakamura C, Dias Filho B P, Ueda-Nakamura T, Young M C, García Cortez D A. (2007). Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. Parasitol Res. 101: 715-722.
29. Hurtado Díaz L M. Flavonoides, p: 77-103.
30. Merken M H. and Beecher G R. (2000). Measurement of food flavonoids by High-Performance liquid chromatography: A review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 48, No. 3. Pag. 577-599.
31. Andersen O, and Markham K. (2006). Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. CRC Press, pp: 409-416.
32. Wang J C. (1996). DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. 65: 635-692.
33. Yamashita Y, Kowada S Z, Nakano H. (1990) Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by non-intercalative flavonoids, genistein and orobol. Biochem. Pharmacol. 39:737-744.
34. Austin C A, Patel S, Ono K, Nakane H, Fisher L M. (1992) Site-specific DNA cleavage by mammalian DNA topoisomerase II induced by novel flavone and catechin derivatives. Biochem. Pharmacol. 39: 737-744.
35. Boege F, Straub T, & Kehr A. (1996) Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA relegation step of eukaryotic topoisomerase I. J. Biol. Chem. 271: 2262-2270.
36. Badyottam M, Saha A, & Chowdhury A. (2000) Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. Mol. Med. 6 (6): 527-541.
37. Shapiro T A, Klein V A, Englund P T. (1989) Drug-promoted cleavage of kinetoplast DNA minicircles, the evidence for type II topoisomerase activity in trypanosome mitochondria. J. Biol. Chem. 264: 4173-4178.
38. Harborne J. B. (1972) Recent Advances in Pytochemistry, Vol. 4, pag. 107, Century Crofts, New York.
39. Anaya Lang A L (2003). Metabolismo secundario. Ecología química. Plaza y Valdes, 1ª. Edición: 48-59. México D. F.

40. Salisbury F B (2000). Fisiología de plantas 2. Paraninfo Thompson learning. pp: 473-497.
41. Romo de Vivar A (1985). Productos naturales de la flora mexicana, Limusa s.a. de c.v. pp: 59.
42. Domínguez X A (1973). Métodos de investigación fitoquímica. Panamericana Parroquia, p: 45.
43. Francis G, Kerem Z, Harinder P. S. Makkar and Klaus Becher (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. (BJN) British Journal of Nutrition. 88: 587-605.
44. Connolly J. D. and Hill R. A. (2001) Triterpenoids. Nat. Prod. Rep. 18, 131-147.
45. Geilfus F (1994). El árbol al servicio del agricultor. Manual de Agroforestería para el Desarrollo Rural. Enda-caribe/CATIE, Turrialba, Costa Rica. Vol. 2, pp: 125-133.
46. Barrientos-Priego A F, y López-López L. Historia y genética del aguacate. Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 carretera México- Texcoco. Chapingo, Edo. de México. 56230. México.
47. Olaleye M T (2005). Antibacterial and cytotoxicity properties of leaf extract of *Persea americana*. Global J. Pure App Sci, 11:407-410.
48. Domergue F, Gregory H L, Prusky D and Browse J (2000). Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado. Phytochemistry Vol. 54, p. 183-189.
49. Oelrichs P B (1995). Isolation and identification of compound from avocado (*Persea Americana*) leaves which causes necrosis of the acinar epithelium of lactating mammary gland and to myocardium. Nat Toxins, 3: 344-349.
50. Koua H K, Han S H, & d'Almeida M. (1995) Histopatología de *Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902 (Diptera Culicidae) Subjected to the larvicidal activity of the equos extract of *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae). Nat Toxins. 3(5): 344-9.
51. Oliveros B M & de las Llagas L (1997). A study on the larvicidal activity of *Persea americana* Miller (Lauraceae).
52. Oberlies H N (1997). The effectiveness of annonaceous acetogenins against multidrug-resistant tumor cells, and, the bioactivity-directed fractionation of the unripe fruit of *Persea Americana*. Purdue University, pp: 127.

53. Ukwe V C, and Nwafor V S. (2004) Anti-ulcer activity of aqueous leaf extract of *Persea Americana* (family-Lauraceae). Nig. J. Pharm. Res. 3 (1): 91-95.
54. Ojewole J A, & Amabeoku G J. (2006) Anticonvulsant effect of *Persea Americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf aqueous extract in mice. Phytother Res. August; 20(8): 696-700.
55. González F, y Zerpa O (2007). Leishmaniasis Cutánea en la Infancia. Revista Dermatología Pediátrica Latinoamericana.
56. Barrera Ramírez L M. (2004) Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. Vol. 17 (1); pag. 42-55.
57. Castillo García E, y Martínez Solís I. Manual de Fitoterapia, Principios activos de las drogas vegetales, Elsevier Masson, AÑOXX, pp: 25.
58. Vanaclocha B y Cañigual S (2003). Fitoterapia vademecum de prescripción., Elsevier Masson, p: 29-38.
59. Badui Dergal S (1993). Química de los alimentos, Alhambra mexicana s.a. de c.v., p: 158.
60. Stafford H A. (1990) Flavonoid Metabolism. CRC Pres. Pag. 240-2
61. Anaya Lang A (2001). Relaciones químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación, Plaza y Valdes, p: 238-239. México Distrito Federal.
62. Baraona, Cockrell M. y Sancho Barrantes E (2002). Aguacate y mango: Fruticultura especial 2. EUNED, p: 33-41.
63. Cortés Enríquez G (1994). Atlas Agropecuario de Costa Rica, EUNED, p: 187-191.
64. Zeiger L Y (2006). Fisiología vegetal, Universitat Jaume I, 2006, pp: 538-540.
65. Arango Mejía M C (1994). Plantas medicinales: Botánica de interés médico. Edit. Kier, 7a. edición. p: 35. Argentina.
66. Durst H D y Gokel G W (1985). Química orgánica experimental, Reverté, 1ª. Edición, p: 122.
67. Kil-Ung K y Dong-Hyun S (2004). La importancia de la alelopatía en la obtención de nuevos cultivares, Manejo de malezas para países en desarrollo Addendum I, Título de la serie: Estudios FAO: Producción y protección vegetal - 120 Add.1; R. Labrada (ed.), p: 318.

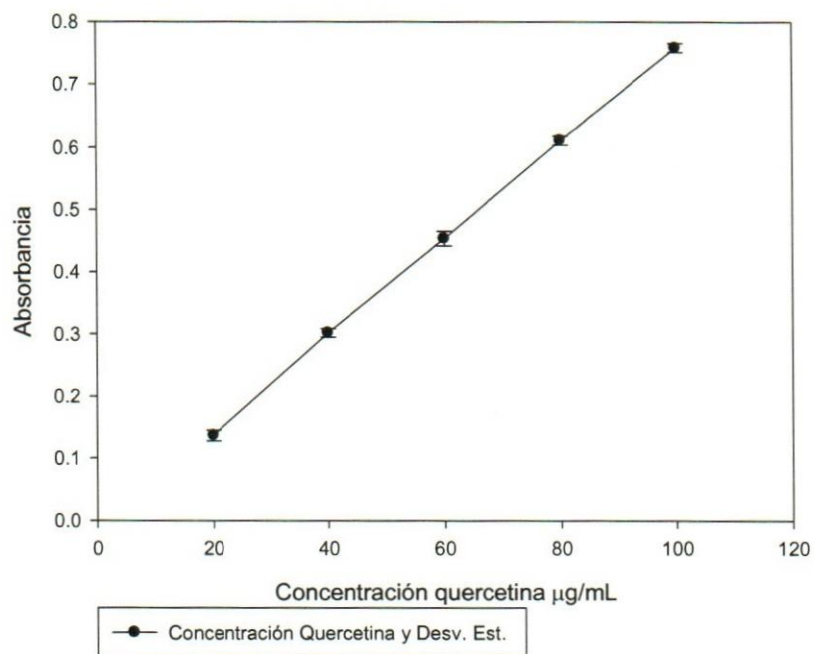
68. Andersen O M y Markham K R (2006). Flavonoids chemistry, biochemistry and applications, CRC Press Taylor & Francis group, p: 2. Boca ratón.
69. Stafford H A. (1990) Flavonoid metabolism, CRC Press, p: 241. USA.
68. Crushnie TPT, Lamb AJ (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. J Antimicrob Agents, 26: 343-356.
69. Mandalari G, Bennett RN, Bisignano G, Trombetta D, Saija A, Faulds CB, Gasson MJ, Narbad A (2007). Antimicrobial activity of flavonoides extractes from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. J Appl Microbiol, 103: 2056-2064.
70. Bórges-Argáez R, Balnburry L, Flowers A, Giménez-Turba A, Ruiz G, Waterman PG, Peña-Rodríguez LM (2007). Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus* spp. Phytomed 14: 530-533.
71. Torres-Santos EC, Sampaio-Santos MI, Buckner FS, Yokoyama K, Gelb M, Urbina JA, Rossi-Bergmann B (2009). Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. J Antimicrob Chemother, 63:469-472.
72. Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander TG, Kharazmi A (1993). Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. Antimicrob Agents Chemother, 37: 2550-2556.
73. Chen M, Christensen SB, Theander TG, Kharazmi A (1994). Antileishmanial activity of Licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. Antimicrob Agents Chemother, 38:1339-1344.
74. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G (2005). Mechanism of antimicrobial action of three monoterpenes. Antimicrob Agents Chemther, 49: 2474-2478.
75. Pérez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S (2001). ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. Int Microbiol, 4: 159-166.
76. Conseil G, Baubichon-Cortay H, Dayan G, Jault JM, Barron D, Di Pietro A (1998). Flavonoids: A class of modulators with bifunctional interactions at vivinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 9831-9836.

77. Wong ILK, Chan KF, Burkett BA, Zhao Y, Cahi Y, Sun H, Chan TH, Chow LMC (2007). Flavonoid dimers as bivalent modulators for pentamidine and sodium stiboglucnate resistance in *Leishmania*. *Anticomb Agents Chemother*, 51: 930-940.
78. Polonio T, Efferth T (2008). Leshmaniasis: drug resistance and natural products (Review). *Int J Mol Med*, 22: 277-286.
79. Sen G, Mukhopadhyay S, Ray M, Biswas T (2008). Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *J Antimicrob Chemother*, 61: 1066-1075.

V.2 Anexos

IV.2.1 Curvas estándar y cuantificación de flavonoides por métodos colorimétricos.

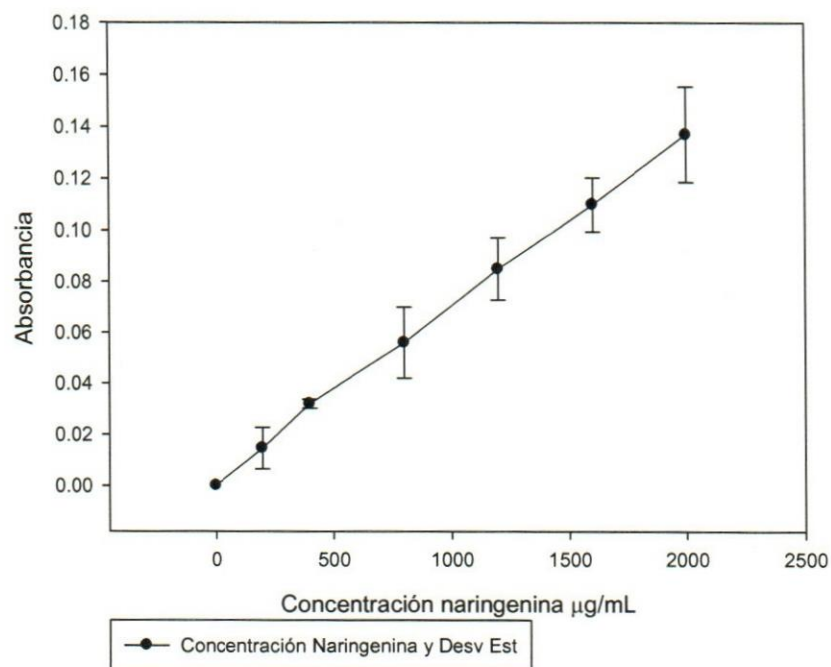
IV.2.1.1 Método cloruro de aluminio/quercetina



La ecuación de la curva estándar $y=0.00767143x +(-0.00657143)$, $r^2=0.999764$

IV. 2.1.2 Método 2,4-dinitrofenilhidralazina/naringenina.

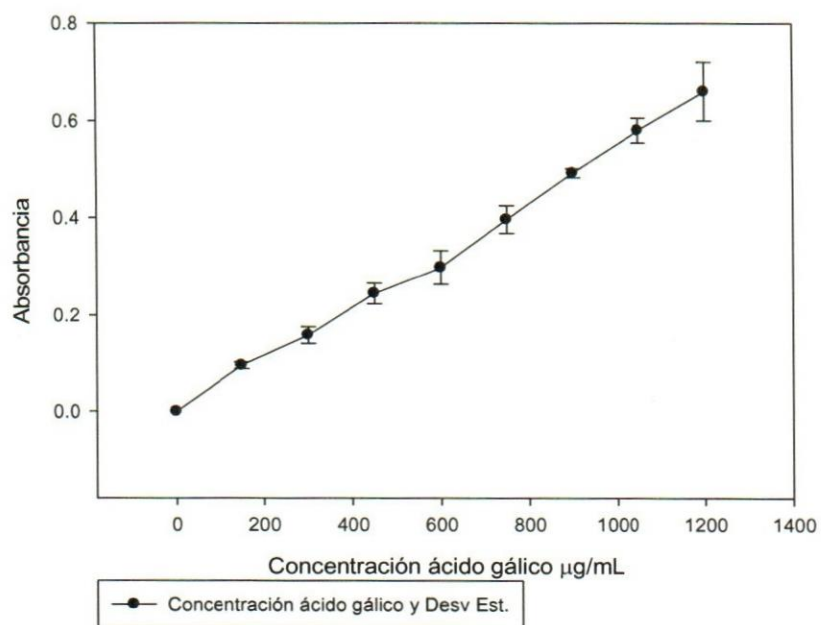
IV.2.1.2.1 Estandarización de la curva para flavononas



La ecuación de la curva estándar $y=0.000067884x + 0.00201706$, $r^2=0.999486$

IV.2.1.3 Método Folin/ácido gálico

IV.2.1.3.1 Estandarización de la curva para fenoles totales



La ecuación de la curva estándar $y=0.000546444x +(-0.00208889)$, $r^2=0.998439$