

Actividad antiprotozoaria y antioxidante *in vitro* de extractos y metabolitos mayoritarios aislados de *Pilocarpus alvaradoi* (Rutaceae)

Fernis J. Marin^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-6720-9843>
Roger D. Espinosa¹ <https://orcid.org/0000-0002-3749-0934>
Camilo A. Guzman¹ <https://orcid.org/0000-0001-5616-1071>
Sara M. Robledo² <https://orcid.org/0000-0003-2752-4931>

¹ Facultad de Ciencias de la Salud, Dpto. de Regencia y Farmacia, Universidad de Córdoba, Montería-Colombia. (Correo-e: fjosemarin@correo.unicordoba.edu.co; rdespinosaez@correo.unicordoba.edu.co; cantonioguzman@correo.unicordoba.edu.co)

² Facultad de Medicina, PECET-Instituto de Investigaciones Médicas, Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia. (Correo-e: sara.robledo@udea.edu.co)

* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia.

Recibido May. 16, 2023; Aceptado Ago. 15, 2023; Versión final Oct. 25, 2023, Publicado Feb. 2024

Resumen

Esta investigación evalúa la actividad antiprotozoaria y antioxidante de extractos etanólicos de hojas y corteza de la especie *Pilocarpus alvaradoi*. La actividad antioxidante se mide usando los métodos DPPH•, ABTS•+ y FRAP. La actividad antiprotozoaria *in vitro* es medida frente a los parásitos de *Leishmania (V.) panamensis*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. La citotoxicidad se examina frente a células U937. Los compuestos se identifican mediante espectroscopia de RMN. Como resultado se identifican tres compuestos: sesamina, escopoletina y bergapteno. Los extractos etanólicos y subextracto en acetato de etilo de corteza muestran actividad antioxidante de 13.5 y 19.5 mg/L (ABTS•+), 17.4 y 21.1 mg/L (DPPH•) y 52.0 y 51.5 mg/L (FRAP) respectivamente. El extracto etanólico de corteza presenta moderada actividad leishmanicida, antiplásmoal y tripanocida con valores de CE₅₀ de 47.90, 28.05 y 49.06 µg/mL, respectivamente. En conclusión, las sustancias obtenidas de *P. alvaradoi* se reportan por primera vez para esta especie.

Palabras clave: *Pilocarpus alvaradoi*; actividad antiprotozoaria; antioxidante; leishmanicida; tripanocida

Antiprotozoal and antioxidant activity *in vitro* of *Pilocarpus alvaradoi* (Rutaceae) extracts and major metabolite isolates

Abstract

This research study assesses the antiprotozoal and antioxidant activities of ethanolic extracts from *Pilocarpus alvaradoi* leaves and bark. Antioxidant activity is measured by using DPPH•, ABTS•+, and FRAP. Antiprotozoal activity *in vitro* is tested against *Leishmania (V.) panamensis*, *Trypanosoma cruzi*, and *Plasmodium falciparum* parasites. Cytotoxicity is examined against U937 cells. Compound identification is obtained by NMR spectroscopy. As a result three compounds are identified: sesamin, scopoletin, and bergapten. Bark ethanolic extracts and its subextract in ethyl acetate show antioxidant activity of 13.5 and 19.5 mg/L (ABTS•+), 17.4 and 21.1 mg/L (DPPH•), and 52.0 and 51.5 mg/L (FRAP) respectively. Bark ethanolic extracts also display moderate leishmanicidal, antiplasmodial, and trypanocidal activity with EC₅₀ values of 47.90, 28.05, and 49.06 µg/mL, respectively. In conclusion, the compounds obtained from *P. alvaradoi* are reported for the first time for this species.

Keywords: *Pilocarpus alvaradoi*; antiprotozoal activity; antioxidant; Rutaceae; leishmanicidal; trypanocidal

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades protozoarias como Leishmaniasis, Chagas y Malária, hacen parte de las enfermedades tropicales desatendidas, actualmente se reporta un incremento en el número de casos, afectando a más de mil millones de personas en todo el mundo. Estas enfermedades (Leishmaniasis, Chagas y Malaria) son transmitidas por vectores que infectan a humanos y animales con parásitos protozoarios *Trypanosoma* spp, *Leishmania* spp y *Plasmodium* spp, respectivamente, aunque prevalecen en áreas endémicas, estas enfermedades ahora se han redistribuido en todo el mundo afectando millones de personas en más 149 países por acción de la migración humana, el cambio climático y las perturbaciones antropogénicas, generando problemas económicos y de salud significativa en áreas en que antes no existía (Silva et al., 2021).

La leishmaniasis es transmitida por la picadura de insectos del género *Lutzomyia*, de las cuales existen tres formas clínicas principales de la enfermedad, que incluyen la leishmaniasis visceral (LV), cutánea (LC) y mucocutánea (LM), las formas clínicas y el tratamiento dependen de la especie de *Leishmania* (Pimentel et al, 2024). La leishmaniasis cutánea es la forma más común y contagiosa no infecciosa, esta se compone de un amplio espectro de enfermedades que inician con lesiones externas localizadas, mientras que la leishmaniasis mucocutánea y visceral muestra lesiones que son deformantes y que pueden ser fatales (Marín et al., 2018). Es endémica en 111 países, se estima que la incidencia mundial de LV y LC es de 50000 a 90000 y de 600000 a 1 millón al año, respectivamente. El tratamiento de esta enfermedad se basa en los antimonios pentavalentes (antimoniato de meglumina y estibogluconato de sodio), isetionato de pentamidina, la miltefosina y la anfotericina B, sin embargo, estos medicamentos presentan problemas como: tratamientos dolorosos y largos, ya sean orales o inyectables, poca eficacia, efectos adversos, toxicidad sistémica y resistencia por parte del parásito (Razzaghi & Hashemi, 2022).

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y transmitida a los humanos por la picadura de un insecto vector (*Reduviidae: Triatominae*), además, por el consumo de alimentos infectados por el patógeno, o por vías secundarias como la transfusión de sangre, la transmisión vertical y por trasplante de órganos (Pinto et al., 2022). Es endémica en cerca 20 países, incluido los EE. UU y América Latina. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 10 y 13 millones de personas están crónicamente infectadas con la enfermedad. Además, aproximadamente 90 millones de personas están en riesgo de infección cada año y se reportan aproximadamente 21 000 muertes anualmente. Para combatir la infección se utilizan el Nifurtimox y el Benznidazol, estos fármacos son efectivos tanto en la fase aguda como en la crónica temprana de la enfermedad. Sin embargo, existen efectos secundarios graves asociados con el uso de estos y su eficacia en la fase crónica de la enfermedad de Chagas es limitada (Espinosa et al., 2021).

La malaria sigue siendo una de las enfermedades tropicales más prominentes y peligrosas, causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*, como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y el *Plasmodium knowlesi*, pero la mayoría de las muertes son provocadas por *P. falciparum* y *P. vivax*, que se transmiten a los humanos por la picadura de un mosquito hembra *Anopheles* infectado. Según el último Informe mundial sobre paludismo 2021, se estimaron 241 millones de casos de paludismo en 2020 en 85 países donde la malaria es endémica, produciendo 1,1 millones de muertes cada año. Actualmente, esta enfermedad está experimentando un resurgimiento y su control se ha convertido en un gran desafío para la salud mundial, además, debido a la alta tasa de mutación del parásito y su rápida adaptación a los cambios ambientales, se están presentando un aumento en la resistencia a los medicamentos y en la distribución geográfica de la enfermedad, lo cual, obliga a realizar esfuerzos continuos hacia la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos antipalúdicos. (Wang et al., 2022).

En atención a los problemas anteriormente mencionados, diversos estudios reportan el aislamiento de extractos y compuestos naturales de diversos géneros de la familia Rutaceae con actividad biológica, entre estos el género *Pilocarpus*, del cual se ha reportado actividad antitypanosomal, antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, antiviral y antioxidante (Sierra et al., 2021;), Ávila et al (2007) reporta que del extracto etanólico de las hojas de *P. alvaradoi*, aislaron metabolitos fenólicos: 7-hidroxi-6- rutenflavanona y 3-metoxi-4-hidroxi-3',4'-metilenedioxi-[3,3,0]-bicyclooctano epilignano, los cuales junto con el extracto etanólico de las hojas presentaron buena capacidad como atrapadores de radicales libres por el método TEAC con valores de 1.51; 1.16 y 0.63 mM respectivamente (Rai et al., 2021); por otro lado Marín et al (2018), evaluaron la actividad antioxidante de los extractos de la especie *P. alvaradoi*, reportando que en el extracto Cloroformico de las hojas, de donde se obtuvo una cumarina (escopoletina), mostró una moderada capacidad captadora del radical cationico ABTS^{•+} con una IC₅₀ de 33.46, mientras que el extracto en acetato de etilo de hojas y el extracto etanólico de corteza evidenciaron un buen potencial leishmancida reflejado en sus valores de CE₅₀ de 45.1 y 30.7 µg/ml y un IS de 1.1 y 2.3 respectivamente, frente al medicamento control Anfotericina B, cuya CL₅₀ es de 54.1 µg/ml, lo cual muestra la importancia de los compuestos presentes en los extractos de las especies del género *Pilocarpus* contra parásitos protozoarios de *Trypanosoma cruzi*.

Estos estudios muestran que extractos y moléculas naturales fenólicas obtenidas de la familia Rutaceae, podrían considerarse como una alternativa terapéutica para el tratamiento de algunas enfermedades comunes como el estrés oxidativo (alta producción de radicales libres) causantes de diversas patologías como envejecimiento, Arteriosclerosis, Cáncer, Alzheimer, Diabetes mellitus y el síndrome de estrés respiratorio (Apolinario et al., 2020), así mismo, de la cascara de la especie *Citrus sinensis* (Rutaceae), se reportó el aislamiento de cinco compuestos fenólicos con una alta capacidad para inhibir la oxidación de un sustrato, mediante el método de decoloración del β -caroteno (Vega et al., 2021), de la misma forma el extracto metanólico de hojas de *Citrus clementina* (Rutaceae) presentó una significativa actividad antioxidante frente al radical DPPH[•] con un valor $IC_{50} = 28.2 \pm 0.39 \mu M$, mientras que los compuestos Nobilietina (4) y Xantiletina (10) aislados de los extractos metanólicos de hojas y raíz, mostraron una moderada actividad antioxidante frente al radical DPPH[•] con valores de IC_{50} de $59.2 \pm 0.24 \mu M$ y $48.1 \pm 0.12 \mu M$ respectivamente, comparados con el BHA con un $IC_{50} = 44.2 \pm 0.06 \mu M$, usado como control positivo (Bissin et al., 2021). Lo anterior muestra que algunos géneros de la familia (Rutaceae), entre ellas el género *Pilocarpus* presenta una variabilidad de compuestos con importantes actividades biológicas, que permiten proponer la especie *P. alvaradoi* como un buen ejemplar para la búsqueda de nuevos principios activos con actividad antioxidante y antiprotozoaria (Santos et al., 2023).

Extractos y moléculas naturales fenólicas como alcaloides, flavonoides, cumarinas, lignanos, etc, obtenidas de las especies *Zanthoxylum thomense* y *Esenbeckia leiocarpa* de la familia Rutaceae (Vasquez et al., 2021), han presentado actividad significativa contra el estrés oxidativo, proceso relacionado con los efectos de la enfermedad de Chagas. En reportes actuales se ha podido demostrar que la persistencia del parásito es un factor determinante en el desarrollo de la fase crónica de la enfermedad, ya que la respuesta del huésped a la infección por *T. cruzi*, involucra la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) mediante células inflamatorias y la disfunción mitocondrial en el corazón, la cual conduce a la presentación de estrés oxidativo a largo plazo, tanto del tejido cardíaco como de los parásitos que se encuentran al interior de las células cardíacas. En la actualidad, hay evidencia creciente que sugiere un estrés oxidativo constante en el corazón de ratones y pacientes humanos que contribuirían a la cardiomiopatía Chagásica crónica. En este sentido, estudios en modelos murinos de la enfermedad de Chagas crónica indican que reacciones inflamatorias en el corazón se relacionan con una mayor producción de citoquinas de tipo inflamatorio que pueden, a su vez, inducir una producción de ROS y RNS (Florentino et al., 2021).

METODOLOGÍA

La metodología se presenta en dos secciones: Sección 1, en la que se describe el procedimiento químico para la obtención de los extractos y compuestos aislados, y una Sección 2, en la que se describe los ensayos de citotoxicidad sobre macrófagos de la línea celular U937 y la evaluación de la actividad antioxidante (DPPH[•], ABTS^{•+} y FRAP) y antiprotozoaria *in vitro* (Leishmania, Malaria y Chagas) de extractos y compuestos.

Sección 1. Obtención de extractos y compuestos aislados

Los pasos aplicados para obtener los diferentes extractos y los procesos de purificación de compuestos se muestran en el texto siguiente, en seis subsecciones.

Material vegetal

La especie *Pilocarpus alvaradoi*, fue recolectada por el Botánico Álvaro Cogollo y los docentes Omar Torres y Fernis Marín en la hacienda Gallo crudo ubicada en la zona rural del municipio Montería en el departamento de Córdoba, Colombia, en las coordenadas Longitud: 8°33'57.7"N y Latitud: 75°57'38.3"W. Un ejemplar de esta especie se encuentra en el Herbario de la Universidad de Córdoba con el número de colección HUC-004975 y HUC-004976.

Obtención de los extractos

El material vegetal (8570 g de hojas y 4236 g de corteza) de la especie *Pilocarpus alvaradoi*, fue sometido a secado a temperatura ambiente y posterior disminución del tamaño de partícula. Para la obtención de los extractos en etanol (96%, Merck, Alemania) se empleó el método de maceración en frío, obteniéndose 45.3 g de extracto etanólico de hojas y 15.2 g del extracto etanólico de corteza, representados en un 0.53% y 0.35% de rendimiento.

Fraccionamiento de los extractos y purificación de los compuestos

El extracto etanólico obtenido de las hojas (10.0 g) y corteza (5.0 g) fueron fraccionados por reparto con un sistema de solventes de polaridad creciente, Bencina de petróleo (40-60, Merck, Alemania), Diclorometano ($\geq 99.8\%$, Merck, Alemania), Acetato de etilo ($\geq 99.5\%$, Merck, Alemania), y Agua (100%, AQIPSAS, Colombia), obteniéndose los subextractos correspondientes, los cuales posteriormente fueron sometidos a separaciones

sucesivas por Cromatografía en Columna (CC) soportado en Sílica gel 60 (0.063–0.200 mm, Merck, Alemania). Las fracciones obtenidas fueron monitoreadas mediante cromatografía en capa delgada (CCD) empleando cromatoplasmas de Silica-gel 60HF₂₅₄ soportadas sobre placas de aluminio marca Merck, usando como reveladores luz UV de 254 nm, 365 nm (Cole Palmer, Vernon Hills, Estados Unidos), y vapores de yodo (I₂), para así clasificar los más representativos.

*Fraccionamiento del extracto Bencina de hojas de *Pilocarpus alvaradoi* (EBP)*

Se tomaron 4,0 g del extracto de bencina de petróleo de las hojas, se sometieron a fraccionamiento mediante cromatografía en columna (CC) soportado en sílica gel, iniciando con un sistema de elución BdP:DCM – 3:7 aumentando la polaridad hasta DCM:AcOEt – 9:2 colectándose 15 fracciones marcadas como EBP-1 a EBP-15 debido a que presentaron una sola mancha en su perfil cromatográfico en CCD, con excepción de la fracción EBP-3 que fue seleccionada por tener un peso de 480 mg y la presentar cristales inmersos en una mezcla de aceites color marrón, los cuales fueron purificados mediante lavado con pequeñas alícuotas de MeOH ($\geq 99.9\%$, Merck, Alemania), esto permitió la obtención del compuesto (1) con un peso de 10 mg.

*Fraccionamiento del extracto etanólico de corteza de *Pilocarpus alvaradoi* (ECP)*

10,0 g del extracto etanólico de corteza se sometieron a fraccionamiento mediante CC soportado en Sílica gel, iniciando el proceso de elución con Diclorometano y aumentando la polaridad hasta DCM:MeOH – 9:1, obteniéndose 28 fracciones (ECPa-1 a ECPa-28). Teniendo en cuenta el análisis presentado del perfil por CCD y el peso de las fracciones, se seleccionaron las fracciones ECPa-6, ECPa-12, ECPa-13 y ECPa-14. En la fracción ECPa-6 se observó la presencia de pequeños cristales en formación a los cuales se hizo lavado con alícuotas de BdP; esto permitió la obtención de un sólido correspondiente al compuesto (2) (26 mg). Las fracciones ECPa-12, ECPa-13 y ECPa-14, fueron reunidas por presentar un compuesto mayoritario en común según el análisis por CCD, obteniéndose la fracción ECPa-12a (836 mg), la cual fue sometida a CC, eluyendo inicialmente con Diclorometano y aumento la polaridad hasta un sistema DCM:MeOH – 95:5, colectándose 14 fracciones (ECPa-12a₁ a ECPa-12a₁₄). La fracción ECPa-12a₁₄ (204,8 mg) fue sometida a separación por CC, de la cual se obtuvo un sólido de color amarillo con un peso de 7 mg denominado compuesto (3).

Identificación de los compuestos aislados

Los compuestos aislados fueron identificados mediante técnicas espectroscópicas como RMN-¹H, RMN-¹³C (Bruker 400 MHz, IET, USA), experimentos bidimensionales (DEPT-135, APT, COSY, HSQC Y HMBC) y por comparación con datos experimentales reportados en la literatura.

Sección 2. Ensayo de citotoxicidad y evaluación de la actividad

El desarrollo de los ensayos de citotoxicidad, así como la evaluación de las actividades antiprotozoaria y antioxidante de extractos y compuestos, se describen a continuación, en trece subsecciones.

Preparación de las soluciones de extractos y compuestos

Para la evaluación de la actividad citotóxica se realizaron 6 diluciones dobles seriadas preparadas a partir de una solución madre de 200 µg/mL en dimetilsulfóxido (DMSO) ($\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich, USA), equivalentes a 100, 50, 10, 2.5, 0.625 y 0.156 µg/mL para el extracto etanólico de hojas, corteza y el compuesto 1. Para la evaluación de la actividad leishmanicida inicialmente se preparó una solución a 20 µg/mL, luego, para los extractos y el compuesto se prepararon diluciones cuádruples seriadas desde 100.0 hasta 1.562 µg/mL. Para la anfotericina B ($\geq 85\%$, Thermo Scientific Chemicals, USA) se prepararon cuatro soluciones a partir de 1.0 µg/mL. Todas las soluciones se hicieron en DMSO al 0.5% y medio RPMI 1640 (Gibco, Thermo Scientific Inc., USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Scientific Inc., USA) y 1% de antibióticos (penicilina-estreptomina) (Sigma-Aldrich, USA).

Línea celular

Monocitos humanos U937 (CRL-1593-2TM), adquirida del ATCC (American Type Cell Collection) se mantuvieron en medio RPMI-1640 completo a 37° C, con 5% de CO₂.

Actividad citotóxica sobre células U-937

La citotoxicidad se evaluó sobre las células U-937 empleando el micrométodo enzimático con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) ($\geq 98.0\%$, Sigma-Aldrich, USA). Las células en fase exponencial de crecimiento se ajustaron a una concentración de 100.000 células/mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB y antibióticos. En cada pozo de una placa para cultivo celular de 96 pozos (Falcon, Fisher Scientific, Thermo Scientific Inc, Waltham, MA, USA) se depositaron 100 µl de células. Luego se adiciono en cada pozo 100 µl de cada una de las concentraciones del respectivo compuesto. Como control

negativo (viabilidad o no citotoxicidad) se usaron células en medio RPMI completo y mantenidas bajo las mismas condiciones de incubación, pero en ausencia de cualquier compuesto; como control de citotoxicidad se utilizaron células expuestas a anfotericina B. Las células en presencia de las diferentes soluciones de los compuestos, así como los controles se incubaron (Memmer, Quimicompany - Colombia) a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ durante 72 horas.

Transcurrido el período de incubación, el efecto de los compuestos sobre las células se determinó midiendo la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Para ello, se adicionó, 10 µl/pozo de una solución de MTT con concentración 5 µg/mL (Sigma) y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Pasado este período de incubación se adicionaron 100 µl/pozo de una solución de 50% de isopropanol (≥ 99.8%, Merck Millipore, Alemania) y 10% de dodecil sulfato de sodio (SDS) (≥ 85.0%, Merck Millipore, Alemania) para solubilizar los cristales de formazán. Los platos se incubaron durante otros 30 minutos y la producción de formazán (que es proporcional al porcentaje de células viables) se midió en un lector de microplacas (Benchmark Bio-Rad Hercules CA, USA) a una densidad óptica de 570 nm (Ozlem-Caliskan et al., 2022).

La citotoxicidad se determinó de acuerdo al porcentaje de disminución de la viabilidad y, por ende, de la disminución en la cantidad de células obtenidas para cada extracto o compuesto y la anfotericina B según las densidades ópticas (D.O) obtenidas en cada condición experimental. La disminución de la viabilidad celular denominada inhibición del crecimiento celular, se calculó utilizando los valores de D.O para cada condición: compuesto o control a la concentración evaluada, usando la siguiente ecuación: $\% \text{ Viabilidad} = [D.O \text{ células expuestas al compuesto o control} \div D.O \text{ células no expuestas}] \times 100$. Los valores de D.O obtenidas para las células en ausencia de compuestos corresponde al 100% de viabilidad o células vivas. Luego, con los porcentajes de viabilidad se calculó el porcentaje de mortalidad, que corresponde a 100 - % viabilidad. Por último, con los porcentajes de mortalidad se calculó la concentración letal 50 (CL₅₀) por el método de análisis dosis-respuesta, Probit usando el programa estadístico SAS Data Analysis (SAS Institute Cary NC, USA). Los ensayos se realizaron dos veces con tres réplicas para cada concentración evaluada. La citotoxicidad de cada compuesto se clasificó según los valores de CL₅₀ usando una escala propia: citotoxicidad alta CL₅₀ < 50 µg/mL; citotoxicidad moderada: CL₅₀ > 50 < 200 µg/mL y citotoxicidad baja: CL₅₀ >200 µg/mL.

Evaluación de la actividad leishmanicida in vitro

La evaluación de la actividad leishmanicida se realizó según el procedimiento descrito por Torres et al. (2020), en su trabajo “*Síntesis de estirilquinolinas con potencial Leishmanicida in vitro sobre Leishmania (Viannia) panamensis*”.

El parásito

En los ensayos de actividad leishmanicida *in vitro* se utilizó la cepa de *L. (V.) panamensis* (UA140-pIR(-)-eGFP) cultivados como promastigotes en medio bifásico NNN modificado (Novy-MacNeil-Nicolle), empleando como fase sólida agar sangre (Merck Millipore Corporation, Medellín, Colombia) y como fase líquida solución salina de buffer fosfato (PBS) más glucosa, pH 6.9 e incubados a 26° C. Los promastigotes se usaron posteriormente para infectar los macrófagos U937 y obtener el estadio de amastigotes intracelulares. Con el fin de asegurar una mayor infección de los macrófagos *in vitro*, la cepa de *L. (V.) panamensis* se mantuvo en hámster (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente. Previamente a la infección *in vitro*, se hizo un aspirado de la lesión del hámster con solución de fosfatos (PBS) y aguja #26; luego, la muestra aspirada se cultivó en medio NNN e incubados a una temperatura de 27°C hasta obtener promastigotes (Espinosa et al., 2023).

Actividad sobre L. (V.) panamensis

La actividad de los extractos y el compuesto se evaluó sobre amastigotes intracelulares obtenidos luego de la infección *in vitro* de macrófagos U937 diferenciados con miristato acetato de forbol (PMA del inglés phorbol myristate acetate) (≥ 99.0%, Sigma-Aldrich, USA). Para ello, las células U937 mantenidas en cultivo en suspensión se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos y luego de descartar el sobrenadante, el botón de células se resuspendió a una concentración de 1X10⁵ células/mL de medio RPMI 1640 al 10% SFB con 0.1 µg/mL de PMA. En cada pozo de una placa para cultivo celular de 24 pozos se dispersó 1 mL de la suspensión de células y se incubaron a una temperatura de 37° C con una atmosfera al 5% CO₂. Transcurridas 48 horas de incubación las células se infectaron con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento en una proporción 15:1 parásito:célula.

Los platos se incubaron a 34° C en una atmosfera al 5% de CO₂ durante 2 horas. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS para eliminar los parásitos libres, se adicionó 1 mL de medio RPMI 1640 completo y las células se incubaron nuevamente durante 24 horas. Pasado este tiempo, las células infectadas se expusieron a cada una de las concentraciones de los compuestos durante 72 horas. Como control de infección se usaron células infectadas y cultivadas en ausencia de los compuestos y como control de efectividad se empleó la

anfotericina B. Luego de 72 horas de incubación a 34° C en una atmósfera al 5% de CO₂ las células se removieron cuidadosamente del fondo del plato utilizando el émbolo de una jeringa y se analizaron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, USA) leyendo a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión con un láser de Argón. Cada concentración de los extractos, el compuesto y de los controles se evaluó por triplicado en dos experimentos diferentes. La actividad anti-*Leishmania* se determinó de acuerdo a la carga parasitaria, que es la cantidad de parásitos en las células infectadas obtenidas para cada concentración de cada extracto, compuesto y anfotericina B según el número de eventos positivos para la fluorescencia verde usando diagrama de puntos e histogramas según la intensidad media de fluorescencia (IFM).

La disminución de la carga parasitaria, denominada inhibición de la infección se calculó utilizando los valores de IFM para cada condición, es decir, compuesto o control a la concentración evaluada, usando la siguiente ecuación: % Infección = $[IFMI \text{ células infectadas y expuestas al compuesto o control} \div IFM \text{ células infectadas y no expuestas}] \times 100$. Los valores de IFM obtenidas para las células infectadas en ausencia de compuestos corresponde al 100% de parásitos. A su vez, el porcentaje de inhibición de la infección corresponde a 100 - % infección. Para los compuestos que mostraron alguna inhibición a 20 µg/mL, se determinó también la Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) calculada por el método Probit. Al igual que la citotoxicidad, la actividad anti-*Leishmania* se clasificó según los valores de CE₅₀ así: actividad alta: CE₅₀ < 25 µg/mL; actividad moderada: CE₅₀ > 25 a < 50 µg/mL y actividad baja: CE₅₀ > 50 µg/mL. Finalmente, la actividad citotóxica se correlacionó con la actividad anti-*Leishmania* calculando el Índice de Selectividad (IS) con la siguiente ecuación: IS = $CE_{50} \div CE_{50}$.

Evaluación de la actividad anti-Tripanosoma cruzi in vitro

Se evaluó la actividad anti-*T. cruzi in vitro* de los extractos etanólicos y del compuesto 1 de la especie *P. alvaradoi* sobre amastigotes intracelulares, siguiendo el método reportado por Espinosa et al., 2021. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el software Prism v8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos se evaluaron inicialmente mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Cuando las interacciones fueron significativas, se utilizó la prueba de Tukey para determinar las diferencias específicas entre los valores medios. Los valores se expresaron como medias de las desviaciones estándar. Las diferencias entre los valores medios se consideraron significativas si p<0.05.

Evaluación de la actividad antimalárica (o anti-plasmodial) in vitro

Se evaluó la actividad antimalárica *in vitro* de los extractos etanólicos y del compuesto 1 de la especie *P. alvaradoi* sobre cultivos asincrónicos de *Plasmodium falciparum* (cepa 3D7), en condiciones de cultivo estándar, mediante la cuantificación de la actividad lactato deshidrogenasa (pLDH) del parásito liberada del citosol de las células dañadas al sobrenadante. Los cultivos de *P. falciparum* fueron ajustados a 0,5% de parasitemia y 1% de hematocrito en medio RPMI-1640 enriquecido con 1% de Albumax II. En cada pozo de una cromatopla de 96 pozos se agregaron 100 µL de suspensión de parásitos, y a estos se les adicionó 100 µL de cuatro diluciones en serie (100, 25, 3,125 y 0,78 µg/mL) del compuesto correspondiente. Como control positivo del fármaco antiplasmodial se empleó la cloroquina. Como control negativo se usaron parásitos no expuestos tanto para el crecimiento como para la viabilidad. Las placas se incubaron durante 72 h a 37°C con atmósfera de N₂ (90%), CO₂ (5%) y O₂ (5%).

Pasado el tiempo de incubación, se recolectó el contenido de cada pozo y los parásitos fueron sometidos a por 20 minutos a tres ciclos de congelación y descongelación. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de reactivo Malstat (400 µL de Triton X-100 en 80 mL de agua desionizada, 4 g de L-lactato, 1,32 g de tampón Tris y 0,022 g de acetilpiridina adenina dinucleótido en 200 mL de agua desionizada; pH 9,0) y 25 µL de solución de NBT/PES (0,16 g de sal nitro azul de tetrazolio y 0,08 g de etosulfato de fenazina en 100 ml de agua desionizada) a cada pozo de una segunda placa oscura de 96 pocillos de fondo plano. Pasados de cinco ciclos de congelación-descongelación, se resuspendieron los cultivos en cada pozo de la primera placa mezclándolos con pipeta y se tomaron 15 µl de cada pozo que fueron agregados al pozo correspondiente de la placa que contenía reactivos Malstat y NBT/PES. Pasada una hora de incubación en la oscuridad, se controló colorimétricamente el desarrollo del color de la reacción de pLDH usando un espectrofluorómetro (Varioskan, Thermo) a 650 nm. La intensidad del color en cada condición experimental se registró como D.O. La absorbancia no específica se corrigió restando la D.O. del blanco. La concentración efectiva del medio se definió como la concentración del compuesto que disminuye en un 50% los parásitos intracelulares. Los compuestos con EC₅₀ 25 µM se consideraron altamente activos Cuellar, et al., 2022.

Ensayos de actividad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de hoja, corteza y subextractos obtenidos del fraccionamiento por reparto; utilizando los métodos del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•) (≥90%, Merck, Alemania), el método del radical catiónico 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio (ABTS•+) (≥98%, Merck, Alemania), y Potencial de Reducción Férrica - FRAP. Para los ensayos ABTS•+ y

DPPH• se utilizó la metodología de Marin et al., 2018 y para la determinación del potencial de reducción férrica FRAP por el método TPTZ ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, USA). Las absorbancias de los extractos y subextractos fueron medidas en un espectrofotómetro UV/VIS (GENESYS™ 20, Thermo Scientific). Para el análisis estadístico de los resultados de la actividad antioxidante se utilizó como herramienta el programa Minitab 16 versión 5.1 y para la determinación del CE_{50} por regresión lineal, se utilizó el programa Statgraphics Plus versión 5.0, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$).

Ensayo antioxidante por el método ABTS•+

Consiste en observar la decoloración del radical ABTS•+, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno (Tine, et al; 2020). Las muestras fueron preparadas a partir de una solución concentrada de 20000 mg/L de los diferentes extractos y subextractos. De esta se prepararon soluciones más diluidas con concentraciones de 100, 80, 60, 40 y 20 mg/L, de las cuales se tomaron 40 μ L de cada muestra, se llevaron a tubos de ensayo y posteriormente se completó con 1960 μ L de solución de radical (ABTS•+) para obtener así la concentración final deseada. Estas soluciones fueron preparadas por triplicado para cada concentración. El blanco de la muestra se preparó tomando 40 μ L de las diferentes concentraciones de los extractos (100, 80, 60, 40 y 20 ppm) en tubos de ensayos y adicionando 1960 μ L de solución de buffer fosfato de pH 7,4. La referencia se preparó usando 40 μ L de solvente DMSO y diluyendo con 1960 μ L de la solución de ABTS•+ hasta un volumen de 2mL. Estas fueron preparadas por triplicado para cada ensayo. Posteriormente, las muestras, los blancos y las referencias, fueron guardados en oscuridad durante 30 minutos y transcurrido este tiempo fue medida una absorbancia ajustada de $0,700 \pm 0,05$ a una $\lambda = 734$ nm en un espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20, y posterior determinación del porcentaje de inhibición (%Inh).

Ensayo antioxidante por el método DPPH•

Este método se fundamenta en la reducción del radical estable 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•). La absorbancia característica de este radical que posee un color violeta intenso disminuye en presencia de un antioxidante u otro radical, por tanto, es posible cuantificar la capacidad captadora de radicales libres que poseen determinados extractos o compuestos mediante la determinación del grado de decoloración que provocan a una disolución metanólica de DPPH. (Phuyal et al., 2020).

Las muestras se prepararon a partir de una solución concentrada de 20000 mg/L de los respectivos extractos y subextractos. De esta se prepararon soluciones más diluidas con concentraciones de 100, 80, 60, 40 y 20 mg/L, de las cuales se tomaron 40 μ L de cada muestra, se llevaron a tubos de ensayo y posteriormente se completó con 1960 μ L de solución de radical (DPPH•), cada una de ellas fue preparada por triplicado para cada concentración. El blanco de muestra se preparó utilizando 40 μ L de muestra de las distintas concentraciones del extracto y 1960 μ L de metanol. La referencia se preparó utilizando 40 μ L de metanol y 1960 μ L de solución madre de DPPH•. Los tubos preparados con las muestras, los blancos y las referencias, fueron guardados en oscuridad durante 30 minutos y transcurrido este tiempo fue medida la absorbancia ajustada de 0.300 ± 0.05 a una $\lambda = 517$ nm en un espectrofotómetro, y posteriormente determinar el porcentaje de inhibición (%Inh). Para calcular la Concentración Inhibitoria medio (CI_{50}) se graficó el porcentaje de inhibición (%Inh) frente a la Concentración (Conc) y con ayuda de la regresión lineal se calculó la CI_{50} para cada extracto analizado.

Ensayo antioxidante por el método FRAP

En este método se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta, basado en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el átomo de hierro de su estado de oxidación +3 (Fe^{3+}) a +2 (Fe^{2+}) según (Rahmi et al 2023). La evaluación del potencial de reducción férrica se realizó mezclando 900 μ L de solución madre de TPTZ previamente preparada, con 50 μ L de muestra (a concentraciones finales de 10, 20, 50 y 100 μ g/mL) y 50 μ L de agua destilada, luego la mezcla es incubada a temperatura ambiente durante 60 min y posteriormente se miden las absorbancias a una longitud de onda de 593 nm en un espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 20, usando agua estéril para ajustar el blanco del equipo. Todas las lecturas se realizaron por triplicado y se graficó la absorbancia en función de las concentraciones de las muestras, para observar la cantidad de Fe^{2+} formado a en la reacción.

Identificación de sustancias

Las estructuras de los compuestos purificados fueron confirmadas utilizando las técnicas espectroscópicas IR (Perkin-Elmer RX/FT-IR System), RMN- 1H , RMN- ^{13}C (Brucker 400 MHz; $CDCl_3$), experimentos bidimensionales (DEPT, COSY, HMQC, HMBC) y por comparación con datos de estructuras similares reportados por otros autores.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la especie *Pilocarpus alvaradoi* se purificaron tres compuestos (Fig. 1), dos cumarinas, y un lignano furofuránico. De las hojas de la especie fue aislada una furanocumarina conocida como Bergapteno (1), de la corteza se aisló un lignano de tipo furofuránico conocida como Sesamina (2), y una cumarina simple denominada Escopoletina (3).

Bergapteno (1): Sólido blanco; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃); δ_H: 6.27 (d, 1H, J=9.8Hz, H-3); δ_H: 8.15 (d, 1H, J=9.8 Hz, H-4), protones en anillo lactónico en posición *orto*; δ_H: 7.18 (s, 1H, H-8), un protón aromático; δ_H: 7.02 (d, 1H, 2.3Hz, H-3'); y δ_H: 7.60 (d, 1H, 2.3Hz, H-2'), protones de anillo furánico, δ_H: 4.27 (s, 3H, OCH₃, H-5); RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) y DEPT – 135; seis carbonos cuaternarios en δ_C: 161.2 (C=O), 158.4 (C-7), 106.4 (C-8a), 149.6 (C-5), 112.7 (C-6) y 152.7 (C-4a); cinco carbonos metínicos en δ_C: 144.8 (2'), 139.3 (C-4), 112.6 (C-3), 105.0 (3') y 93.9 (C-8); un carbono metílico en δ_C: 60.1 (-OCH₃), característico un de grupo metoxilo.

Sesamina (2): Sólido amorfo blanco; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃); δ_H: 6.78 – 6.87 (m, 6H, Ar-H, H-2,5,6,2',5',6') protones sobre anillos aromáticos; δ_H: 5.98 (s, 4H, -OCH₂O-) protones del grupo metilendioxi; δ_H: 2.90 (m, 1H, -CH-CH₂-O-, H-8'); δ_H: 4.12 (m, 1H, -CH-CH₂-O-, H-8); δ_H: 3.34 (m, 2H, -CH-CH₂-O-, H-9); δ_H: 3.86 (2H, m, -CH₂-O-CH-, H-9'); 4.42 (d, 1H, J=7.1 Hz, CH-O-CH-, H-7'); δ_H: 4.86 (d, 1H, J=5.4 Hz, -CH-CH-O-, H-7), protones sobre el anillo furofuránico; RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) y APT: seis carbonos cuaternarios en δ_C: 147.9 (C-4), 147.2 (C-4'), 147.6 (C-3), 146.6 (C-5'), 135.1 (C-1'), 132.1 (C-1); diez carbonos metínicos en δ_C: 119.6 (C-6), 118.6 (C-2'), 108.5 (C-5), 108.1 (C-3'), 106.5 (C-2), 106.4 (C-6'), 87.6 (C-7'), 82.1 (C-7), 70.9 (C-8), 54.6 (C-8'); cuatro carbonos metilénicos en δ_C: 101.0 (-OCH₂O-), 100.9 (-OCH₂O-), 69.7 (C-9), 50.1 (C-9').

Escopoletina (3): Sólido amarillo; RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃); δ_H: 7.60 (d, 1H, J=9.5 Hz, H-4); 6.27 (d, 1H, J=9.5 Hz, H-3) protones en anillo lactónico en posición *orto*; δ_H: 6.91 (s, 1H, 5-H); 6.85 (s, 1H, H-8) protones sobre anillo aromático; δ_H: 3.97 (s, 3H, -OCH₃). RMN-¹³C (101 MHz, CDCl₃) y DEPT – 135; cinco carbonos cuaternarios en δ_C: 161.0 (C=O), 150.2 (C-8a), 149.7 (C-7), 144.0 (C-6), 111.4 (C-4a); cuatro carbonos metínicos en δ_C: 143.3 (C-4), 113.3 (C-3), 107.4 (C-5), 103.4 (C-8); un carbono metílico en δ_C: 56.3 (-OCH₃), característico de un grupo metoxilo (Bhatt et al., 2011).

El estudio fitoquímico de la especie *Pilocarpus alvaradoi* permitió el aislamiento de 3 compuestos, un lignano furofuránico conocido como Sesamina (2), el cual se reporta por primera vez para esta especie, del que se ha reportado actividad biológica como insecticida, bactericida, antiséptico y fungicida para el hongo *Atta sexdens* L. y dos cumarinas: Bergapteno (1), Escopoletina (3). Los compuestos fueron identificados por el análisis de los datos espectroscópicos y también por comparación con los valores de los mismos compuestos descritos en la literatura.

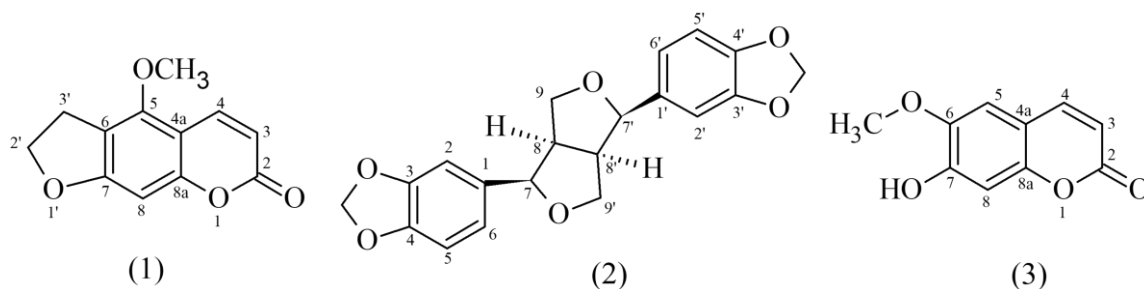


Fig. 1. Compuestos aislados de *Pilocarpus alvaradoi* (Rutaceae).

Potencial antiprotozoario de extractos y compuesto.

Los resultados de la evaluación del potencial leishmanicida, chagásico y malárico *in vitro* y de la citotoxicidad en la línea celular U937 de *P. alvaradoi*, de los extractos de hojas, corteza y del compuesto 2 (Sesamina) se resumen en la Tabla 1. De los compuestos aislados solo se evaluó el compuesto 2 (Sesamina), los compuestos 1 y 3 no se pudieron evaluar porque presentaron cantidades muy pequeñas, que fueron usadas para su identificación por técnicas espectroscópicas. La actividad leishmanicida se expresa como Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) e índice de selectividad (IS) y la citotoxicidad en valores de Concentración Letal 50 (CL₅₀). Según la escala aquí establecida, el extracto etanólico de hojas presentó alta toxicidad, con valores de CL₅₀ < 50 µg/mL, el extracto etanólico de corteza no fue citotóxico, ya que sus valores de CL₅₀ fueron >200 µg/mL, mientras que la Sesamina presentó una moderada citotoxicidad, con valores de CL₅₀ > 50 y < 200 µg/mL.

Tabla 1. Resultados de la actividad antiprotozoaria de los extractos etanólicos y del compuesto 1 de *P. alvaradoi*. Interpretación; NA: No aplica; NC: No Citotóxico; 3: actividad alta; 2: actividad moderada; 1 actividad baja; IS: Índice de selectividad.

Muestras y medicamento control	Actividad antiprotozoaria										
	Citotoxicidad		Anti-leishmania			Anti- <i>T. cruzi</i>			Anti-malarica		
	CL ₅₀ (µg/mL) X±SD	Int	CE ₅₀ (µg/mL) X±SD	IS	Int	CE ₅₀ (µg/mL) X±SD	IS	Int	CE ₅₀ (µg/mL) X±SD	IS	Int
Ext-EtOH-Hojas	36.67±4.3	3	171.97±63.5	0.21	1	101.9±17.0	0.00	1	20.75±3.5	1.76	3
Ext-EtOH-Corteza	513.67±61.	NC	47.98±15.8	10.7	2	49.06±0.6	10.5	2	28.05±6.4	18.3	2
Sesamina	146.90±23.	2	166.95±16.2	0.88	1	71.34±28.0	2.06	1	81.01±8.4	1.81	1
Benznidazol	>128±NA					14.7±0.1	8.70	2			
Anfotericina B	39.0±9.7	3	0.3±0.01	130	3						
Cloroquina	50.0±0.0	3							3.35±0.4	14.9	3

Para el caso de la actividad leishmanicida, solo el extracto etanólico de corteza con una Concentración Efectiva media (CE₅₀) de 47.98 µg/mL y un índice de selectividad de 10.7, mostró una moderada actividad contra amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*, comparado con el medicamento control anfotericina B, cuya CE₅₀ e IS son 0.30 µg/mL y 130 respectivamente, evidenciando de esta manera la poca capacidad del extracto para inhibir la carga parasitaria. La actividad leishmanicida presentada por este extracto es atribuible a la presencia de compuestos fenólicos tipo alcaloides, lignanos, flavonoides y cumarinas, que han sido aislados en especies de este género (Heredia, et al., 2021). Es importante destacar que el índice de selectividad (IS)>1 presentado por los extractos en acetato de etilo de hojas y etanólico de corteza de la especie *P. alvaradoi* lo convierten en una fuente interesante de metabolitos activos para realizar un posterior aislamiento y evaluación de las moléculas responsables de esta actividad.

La actividad tripanocida de los extractos etanólicos de hojas, corteza y de la Sesamina, se valuó en amastigotes intracelulares de *Tripanosoma cruzi* por colorimetría, los resultados se expresan en Concentración Efectiva 50 (CE₅₀), teniendo en cuenta los porcentajes de inhibición (%Inh) de la carga parasitaria. Los extractos etanólicos de hojas y corteza, así como la Sesamina evaluados a 4 concentraciones diferentes, mostraron valores de Concentración Efectiva 50 (CE₅₀) de 101.9, 49.06 y 71.34 µg/mL respectivamente, de los cuales el extracto etanólico de corteza presentó un potencial tripanocida moderado frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi*, mientras que el extracto etanólico de hojas y la Sesamina presentaron una baja actividad tripanocida con valores de CE₅₀ de 101.90 y 71.34 µg/mL, comparado con el Benznidazol empleado como medicamento de control, cuya CE₅₀ fue de 14.7 µg/mL, además el valor de índice de selectividad para el extracto etanólico de corteza de 10.5 (IS > 1), lo que convierte en un extracto con características promisorias debido al alto potencial por su acción efectiva contra el parásito de *T. cruzi*, de tal forma que se abre un nuevo horizonte para continuar con estudios de análisis de los componentes químicos en mayor proporción que integran este extracto.

Haciendo una comparación con los estudios reportados por Mafezoli et al (2000) se puede resaltar la importancia que revisten los diversos metabolitos presentes en las especies del género *Pilocarpus* contra parásitos protozoarios, como lo son los metabolitos contenidos en el extracto en la especie *P. spicatus*, en el que el extracto etanólico obtenido del tallo mostró un alto potencial para inhibir la carga parasitaria sobre epimastigotes de *T. cruzi* en un 97.3%, de la misma forma el extracto etanólico crudo de *Ruta graveolens* (Rutaceae), presentó actividad significativa, reduciendo la multiplicación de amastigotes intracelulares y la tasa de invasión celular a 0,25 mg/mL, mientras que en otros estudios se demostró que el extracto de hojas de *Spiranthera odoratissima* (Rutaceae), fue activa contra epimastigotes de *T. cruzi* con una CI₅₀ de 56,3 µg/mL (García y Cardona, 2021).

Estudios realizados mediante la aplicación del método DFT y funcional híbrido B3LYP, permitieron evaluar las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas de compuestos tipo alcaloidal presentes en las hojas de la especie *Pilocarpus microphyllus* (jaborandi), evidenciando un buen potencial para inhibir la proteasa esterol 14α-desmetilasa del parásito *T. cruzi*, con el apoyo de las técnicas de acoplamiento molecular, dinámica molecular, MM-PBSA y predicciones ADMET, lo que permite establecer que el género *Pilocarpus* contiene una diversidad molecular de metabolitos con acción sinérgica responsables de la actividad tripanocida con una marcada acción inhibitoria sobre *Tripanosoma cruzi* (De Sá et al., 2022).

El extracto etanólico de hojas de *P. alvaradoi* presentó con un valor de CE₅₀ de 20.75 µg/mL, indicando un alto potencial anti-malárico frente a *Plasmodium falciparum*, el extracto etanólico de corteza con una CE₅₀ 28.05 µg/mL, mostró una moderada actividad y el compuesto Sesamina fue poco activo con una CE₅₀ de

81.01 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, ambos extractos etanólicos (hojas y corteza) así como el compuesto Sesamina presentaron IS significativos con valores de 1.76, 18.3, y 1.81, evidenciando de esta manera la gran capacidad selectiva de para inhibir la acción contra el parásito *P.falciparum*, especialmente la selectividad del extracto etanólico de corteza, cuyo valor de $\text{IS} > 10$ está representado por el efecto sinérgico causado por los compuestos que constituyen estos extractos.

La resistencia a múltiples fármacos sigue siendo un obstáculo importante que impide los buenos resultados de la quimioterapia antipalúdica, estudios desarrollados por Kerubo y Kenanda (2017) reportan que del extracto de una mezcla de metanol-diclorometano en proporción 1:1 se aislaron seis compuestos de la corteza del tallo de *Zanthoxylum gillettii* (Rutaceae), resaltando que el extracto y la Sesamina mostraron actividades antiplasmodiales prometedoras con valores de IC_{50} de 2.52, 1.48 y 1.43 $\mu\text{g/mL}$ y 5.4, 9.1 y 8.3 μM , respectivamente, contra las cepas de *P. falciparum* resistentes a la cloroquina (W2), sensibles a la cloroquina (D6) y 3D7.

Actividad antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante del extracto etanólico y los subextractos en Acetato de etilo y Diclorometano de corteza de la especie *P. alvaradoi*, evaluada frente a los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$, DPPH^{\bullet} , y su equivalencia a TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox) como referente antioxidante natural, así como el potencial de reducción férrica FRAP y su comparación con relación a la Capacidad Antioxidante Equivalente al Ácido Ascórbico (AAEAC), se resumen en la Tabla 2. El subextracto de BdP de corteza no fue evaluado, al igual que los extractos y subextractos de hojas de la especie; debido a que en los ensayos preliminares se obtuvieron resultados poco satisfactorios. Los datos reportados muestran el IC_{50} en mg/L para cada una de las muestras evaluadas en cada ensayo.

Tabla 2. Actividad antioxidante de extractos de *P. alvaradoi*.

Muestra	Extracto	$\text{ABTS}^{\bullet+}$		DPPH^{\bullet}		FRAP	
		IC_{50} (mg/L)	TEAC	IC_{50} (mg/L)	TEAC	IC_{50} (mg/L)	AAEAC
Corteza	Etanol	13.5	685.9	17.4	532.2	28.2	50.0
	Acetato de etilo	19.5	474.9	21.1	438.9	33.8	41.7
	Diclorometano	49.7	186.3	58.6	158.0	46.5	30.3

El extracto etanólico de corteza mostró una gran capacidad captadora de radicales libres frente a las especies radicalarias $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y DPPH^{\bullet} , con IC_{50} de 13.5 y 17.4 $\mu\text{g/mL}$ y valores de 685.9 y 532.2 μg trolox/g extracto, respectivamente, de la misma manera el extracto en acetato de etilo de corteza presentó una buena capacidad antioxidante para inhibir el efecto oxidante de los radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y DPPH^{\bullet} , soportado en una equivalencia de 474.9 y 438.9 μg trolox/g extracto, respectivamente. Por otro lado estos extractos mostraron un buen potencial de reducción férrica al reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) que se encuentra como un complejo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en hierro ferroso (Fe^{+2}), evidenciado en sus valores con $\text{IC}_{50} < 28.2$ y 33.8 mg/L , lo que se refleja en los valores AAEAC de 50.0 y 41.7 mg AA/g extracto, por lo tanto estos extractos son una fuente importante en los procesos de disminución del estrés oxidativo, responsables de diversas patologías del organismo presentes en suero o plasma, resultados acordes con la investigación reportadas sobre *Citrus clementina* (Leaf) quien presentó un valor de 143.7 mg AA/gE (mg de ácido ascórbico/g de extracto) evidenciando una capacidad antioxidante total significativa, sin embargo, se reporta que un cambio en los solvente usados como etanol o agua generan una variabilidad en los resultados de actividad antioxidante por el método FRAP, así como el método usado (percolación, soxhlet, etc) para obtener los extractos (Saidi, et al., 2022).

Estos valores muestran que los metabolitos que constituyen los extractos etanólico y en acetato de etilo de corteza de *P. alvaradoi* poseen una mayor afinidad para disminuir los efectos oxidantes causados por el radical catiónico $\text{ABTS}^{\bullet+}$, lo cual se soporta al comparar estos con los resultados de actividad antioxidante del extracto etanólico de corteza de *P. alvaradoi* (Marin et al 2018) y del extracto etanólico de hojas de *Citrus clementina* reportado por Bissim et al (2021), mostró una buena actividad antioxidante frente al radical libre DPPH^{\bullet} , con valor CI_{50} de 28.2 μM .

Debido a los diferentes ensayos de actividad biológica que se han realizado en los compuestos aislados y extractos; y a los resultados significativos obtenidos, se recomienda seguir desarrollando estudios sobre estos; de tal manera que se contribuya en el avance de la obtención de compuestos no solo de interés farmacológico, sino también de tipo agroindustrial.

CONCLUSIONES

Del estudio de los extractos etanólico de hojas y corteza de la especie *Pilocarpus alvaradoi*, se aislaron tres compuestos; una cumarina simple llamada Escopoletina, una furanocumarina conocida como Bergapteno, y un lignano de tipo furofuranico denominado Sesamina, aislado por primera vez en esta especie.

El extracto etanólico de corteza que no mostró citotoxicidad alguna (CL₅₀ de 513.67 µg/mL) frente a la línea celular U937, presentó una moderada actividad frente a *L.(V) panamensis*, *T. cruzi* y *P. falciparum*, y gran selectividad sobre los tres parásito con índices de selectividad (IS) mayores a 10, mientras que el extracto etanólico de hojas evidenció una significativa actividad anti-malárica frente a *P. falciparum* con una CE₅₀ de 20.75 µg/mL e IS de 1.76, comparado con el medicamento control Cloroquina.

La buena actividad antioxidante de los extractos etanólicos y de acetato de etilo de corteza, permiten suponer que en la matriz de estos existen una diversidad de metabolitos secundarios de tipo fenólico, responsables de estos resultados en su mayor proporción.

El desarrollo de esta investigación establece una mayor contribución al conocimiento de la quimiotaxonomía y la bioactividad de los metabolitos secundarios presentes en el género *Pilocarpus* y la especie *Pilocarpus alvaradoi*, representando esta una fuente importante de compuestos promisorios para posibles medicamentos terapéuticos, debido a las características de actividad que estos han demostrado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Córdoba - Colombia, por el apoyo financiero para el desarrollo de la presente investigación; al profesor Alex Sáez de la Universidad EAFIT por la toma de los espectros, y a la Universidad de Antioquía (convocatoria CIDEPRO - CIIEs).

REFERENCIAS

- Apolinário, R., Nogueira, J., y otros ocho autores, Insecticidal activity of *Pilocarpus spicatus* Saint-Hilaire (Rutaceae) essential oil against the crop pest *Dysdercus peruvianus* (Guérin - Méneville, 1831) and *Oncopeltus fasciatus* (Dallas, 1852), <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10489>, Research, Society and Development, 9(11), e90091110489 (2020)
- Avila, M.C., y Cuca, L.E., Metabolitos fenólicos aislados de *Pilocarpus alvaradoi* pittier (Rutaceae), *Scientia et Technica*, año XIII, ISSN 0122-1701, 33, 67–69 (2007)
- Bhatt Mehul, K., Dholwani Kishor, K., y Saluja Ajay, K., Isolation and structure elucidation of Scopoletin from *Ipomoea reniformis* (Convolvulaceae), *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, ISSN: 2231-3354, 1(5), 138-144 (2011)
- Bissim, S., Kenmogne, S., y otros diez autores, The chemistry and biological activities of *Citrus clementina* Hort. Ex Tanaka (Rutaceae), a vegetatively propagated species, <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1731740>, *Natural Product Research*, 35(22), 4839–4842 (2021)
- Cuellar, J., Quiñones, W., y otros tres autores, Coumaro-chalcones synthesized under solvent-free conditions as potential agents against malaria, leishmania, and tripanosomiasis, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08939>, *Heliyon*, 8(2), 1-8 (2022)
- De Sá, E., Souza, J., y otros tres autores, Computational investigation of the alkaloids of *Pilocarpus microphyllus* species as phytopharmaceuticals for the inhibition of sterol 14 α -demethylase protease of *Trypanosoma cruzi*, <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2035819>, *J Biomol Struct Dyn*, 41(6), 1-19 (2022)
- Espinosa, R., Robledo, S., y otros siete autores, Screening of the antileishmanial and antiplasmodial potential of synthetic 2-arylquinoline analogs, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2787312/v1>, *Scientific Reports*, 1(13), 1–29 (2023)
- Espinosa, R., Robledo, S., y otros cinco autores, Synthesis and evaluation of the *in vitro* and *in vivo* antitrypanosomal activity of 2-styrylquinolines, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07024>, *Heliyon*, 7(5), 1-8 (2021)
- Florentino, P., Mendes, D., y otros cinco autores, DNA damage and oxidative stress in human cells infected by *Trypanosoma cruzi*, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009502>, *PLoS Pathog*, 17(4), 1–20 (2021)
- García, P., y Cardona, N., Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 1-10 (2021)
- Heredia, Y., Tuentler, E., y otros cinco autores, Novel flavonol-3-O-methylethers from *Zanthoxylum pistaciifolium* Griseb. (Rutaceae), <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1906240>, *Natural Product Research*, 36(19), 1–10 (2021)
- Kerubo, L., y Kenanda, E., Antiplasmodial Activities of the Stem bark Extract and Compounds of *Zanthoxylum gillettii* (De wild) P.G. Waterman, <https://doi.org/10.5530/pc.2017.1.6>, *Pharmacogn. Commn.*, 7(1), 41-46 (2017)
- Mafezoli, J., Vieira, P.C., y otros tres autores, *In vitro* activity of Rutaceae species against the trypanostigote form of *Trypanosoma cruzi*, *Journal of Ethnopharmacology*, ISSN: 0378-8741, 73(1–2), 335-340 (2000)

- Marin, F.J., Torres, O.L., Robledo, S.M., y Doria, M.E., Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante y leishmanicida de la especie *Pilocarpus alvaradoi* (Rutaceae), <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642020000100003>, Inf. Tecnol., 29(3), 177-186 (2018).
- Nossa, D., Gómez, J., Rozo, W., y Duchowicz, P., Antiprotozoal QSAR modelling for trypanosomiasis (Chagas disease) based on thiosemicarbazone and thiazole derivatives, <https://doi.org/10.1016/j.jLm.2020.107821>, J Mol Graph Model, 103(1), 1–13 (2021)
- Ozlem-Caliskan, S., Ilikci-Sagkan, R., y otros cinco autores, Efficacy of malachite green mediated photodynamic therapy on treatment of cutaneous leishmaniasis: *in vitro* study, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103111>, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 40(24), 1–7 (2022)
- Phuyal, N., Kumar, P., Prasad, P., y Rajbhandary, S., Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC, <https://doi.org/10.1155/2020/8780704>, The Scientific World Journal, 42(5), 1–7 (2020)
- Pimentel, K., Oliveira, R., y otros siete autores, Prediction of visceral leishmaniasis incidence using the Seasonal Autoregressive Integrated Moving Average model (SARIMA) in the state of Maranhão, Brazil, <https://doi.org/10.1590/1519-6984.257402>, Braziliam Journal of Biology, 84(1), 1-8 (2024)
- Pinto, L., Schijman, A., y otros diez autores, Molecular detection and parasite load of *Trypanosoma cruzi* in digestive tract tissue of Chagas disease patients affected by megacolon, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106632>, Acta Tropica, 235(9), 1-27 (2022)
- Rahmi, E.P., Makkiyah, F.A., y otros tres autores, Phytochemical Analysis and Antioxidant Activity of *Zanthoxylum acanthopodium* DC. Essential Oils, DOI: 10.4103/mtsp.mtsp_9_23, Matrix Science Pharma, 7(1), 22-26 (2023)
- Razzaghi-Asl, N., y Hashemi, N., Identification of potential antileishmanial agents via structure-based molecular simulations, <https://doi.org/10.1016/j.jmngm.2021.108039>, Journal of Molecular Graphics and Modelling, 110(17), 1–10 (2022)
- Saidi, S., Handaq, N., y otros cuatro autores, *Citrus clementina* (Leaf): Phytochemical and antioxidant activity, Arabian Journal of Medicinal & Aromatic Plants, ISSN 2458-5920, 8(1), 87–107 (2022)
- Santos, C., Cardoso, S., y otros siete autores, Coumarins from Rutaceae: Chemical diversity and biological activities, <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105489>, Fitoterapia, 168(1), 1-22 (2023)
- Sierra, E.J., Cordeiro, C.F., y otros cuatro autores, Cumarinas como posibles agentes antiprotozoarios: actividades biológicas y mecanismo de acción, <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00169>, Rev. Bras. Farmacogn., 31, 592–611 (2021)
- Silva, Y., Hardoim, D., y otros ocho autores, Amentoflavone isolated from *Selaginella sellowii* Hieron induces mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes, <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102458>, Parasitology International, 86(10), 1–24 (2021)
- Tine, Y., Diallo, A., y otros doce autores, The Flavonoid Compounds from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr (Rutaceae) Extracts and their Antioxidant Activity against ABTS•+, <https://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/4010>, Journal of Drug Delivery and Therapeutics, 10(2), 120–124 (2020)
- Torres, O., Marin, F., Santafé, G., y Robledo, S., Síntesis de estilquinolinas con potencial Leishmanicida *in vitro* sobre *Leishmania (Viannia) panamensis*, <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642020000100003>, Inf. Tecnol., 31(1), 3–12 (2020)
- Vásquez, P., Gadea, A., y otros nueve autores, Metabolomic approach of the antiprotozoal activity of medicinal *Piper* species used in Peruvian Amazon, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113262>, Journal of Ethnopharmacology, 264(1), 1-16 (2021)
- Vega, N., y Torres, M., Evaluación de compuestos fenólicos de (*Citrus sinensis*) y su capacidad antioxidante, <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n2.2021.11635>, Revista Ciencia en Desarrollo, 12(2), 109-117 (2021)
- Wang, C., Krüger, A., y otros tres autores, Novel Highlight in Malarial Drug Discovery: Aspartate Transcarbamoylase, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.841833>, Front. Cell. Infect. Microbiol, 12(1), 1–9 (2022).