UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

"Evaluación de la actividad antiparasitaria de productos naturales como base para el desarrollo de nuevas drogas contra la enfermedad de Chagas"

Tesis presentada para optar al título de doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

Lic. Diana María Bernal Giménez

Director de Tesis: Dr. Martín Edreira
Directora Adjunta: Dra. Lucía Fernández
Consejero de estudios: Dr. Luis Scolaro

Lugar de Trabajo: Departamento de Química Biológica - Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBICEN, UBA-CONICET)

Buenos Aires, 2023

Dedicatoria

A mi madre, Graciela.
A mis hermanas, Lisa, Mirtha, Ana.
A mi hermano, Blás.
A mi amigo, Matías.

Agradecimientos

- Al Programa Nacional de Becas del gobierno paraguayo, BECAL, por financiar los últimos años de mi carrera de doctorado y darme la oportunidad de finalizar el mismo.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas del gobierno argentino, CONICET, por haberme otorgado la beca inicial para desarrollar los primeros años del programa de doctorado.
- A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por haberme otorgado el espacio y los recursos materiales y académicos, para llevar adelante mi formación académica.
- Al Dr. Martín Edreira, por aceptar ser mi director de tesis, por darme un espacio en su laboratorio, y darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente en un ambiente cálido y humano.
- A la Dra. Lucía Fernandez, por confiar en mí, siempre, por brindarme un espacio seguro y de contención las veces que necesité, por aprender conmigo, por enseñarme, por guiar mi trabajo hasta el final, por ser mi amiga.
- Al Dr. Luis Scolaro, por sus intervenciones y sugerencias sobre el desarrollo de la tesis.
- Al Dr. Jorge Palermo y a la Lic. Belén Valdéz, del Dpto. de Química Orgánica, por su valiosa colaboración para este trabajo.
- A la Dra. Mariana Miranda y a los Dres. Juan Burgos y Fernando Durán, por aceptar evaluar mi trabajo de tesis doctoral.
- A mis compañeros del laboratorio, Dani, Gaby, José, Guille, por el aporte valioso que cada uno de ellos me proporcionó durante estos años y no solo en lo académico y profesional, sino también en lo humano.
- A mi amigo Leandro Cossio, porque su persona es una influencia positiva y determinante en mi presente.
- A mi mamá y a mis hermanos Lisa, Mirtha, Ana y Blás, por acompañarme y apoyarme, siempre, por permitirme migrar y desarrollar todos mis proyectos con la tranquilidad de que la casa siempre se mantuvo en orden. Soy realmente muy afortunada de tenerlos en mi vida.
- A Daniela Sanabria y sus hermosas hijas, por hacerme un lugar en su hogar y siempre tratarme como una más de su familia.
- A la familia Zeballos (Migue, Rumy, Nilda), por abrirme las puertas de su casa, por brindarme cariño y los mejores almuerzos y cenas de todos estos años.
- A Matías Factorovich, por haber sido mi compañero de vida durante muchos años, por seguir siendo mi mejor amigo y por sostenerme de la mano, siempre.

Gracias a cada uno de ellos, hoy puedo dar cierre a este capítulo de mi vida que definitivamente fue el más significativo.

Índice

1. Introducción General..... 11
1.1. Enfermedad de Chagas..... 12
1.1.1. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*..... 12
1.1.1.1. Taxonomía y características estructurales..... 12
1.1.1.2. Morfología, ciclo biológico, DTUs..... 13
1.1.2. Agente Vector: Triatoma Infestans..... 16
1.1.3. Análisis histórico de la Enfermedad de Chagas..... 18
1.1.4. Epidemiología de la enfermedad de Chagas..... 20
1.1.5. Mecanismo de transmisión de la infección..... 21
1.1.6. Prevención de la transmisión..... 22
1.1.7. Desarrollo de la enfermedad: Manifestaciones clínicas..... 22
1.1.8. Diagnóstico..... 23
1.1.9. Tratamiento..... 24
1.2. Productos naturales..... 26
1.2.1 Productos naturales en la medicina tradicional..... 26
1.2.2. Productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas..... 27
1.2.3. Antecedentes bibliográficos de las familias y especies vegetales analizadas en esta tesis..... 28
1.3. Técnicas moleculares y colorimétricas para la determinación de viabilidad celular, y rastreo de compuestos con potencial actividad tripanocida..... 41
2. Objetivos General y Específicos..... 46
3. Materiales y Métodos..... 48
3.1. Materiales..... 49
3.1.1. Materiales biológicos..... 49
3.1.1.1. Parásitos..... 49
3.1.1.2. Líneas celulares..... 49
3.1.2. Fármacos antiparasitarios de referencia..... 50
3.1.3. Medios de cultivo, Soluciones, Reactivos, Solventes..... 50
3.1.3.1. Medios de cultivo..... 50
3.1.3.2. Soluciones..... 51
3.1.3.3. Reactivos..... 53
3.1.3.4. Solventes..... 53
3.1.3.5. Fases estacionarias..... 53
3.2. Métodos..... 54
3.2.1. Obtención del Material vegetal..... 54
3.2.2. Extracción y Purificación de compuestos..... 54
3.2.2.1. Procedimiento general de obtención de los extractos etanólicos y subextractos polares y lipofílico..... 54
3.2.2.2. Identificación de los compuestos purificados de cada especie vegetal..... 55
3.2.3. Obtención de compuestos semisintéticos..... 59
3.2.4. Mantenimiento de cultivos celulares..... 60
3.2.5. Búsqueda de los parámetros óptimos para la utilización de la técnica colorimétrica reducción de la resazurina sódica..... 61

3.2.6. Curvas de calibración..... 62
3.2.7. Curvas de crecimiento..... 63
3.2.8. Determinación de la inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de productos naturales, compuestos puros y semisintéticos..... 64
3.2.9. Determinación de la inhibición del crecimiento de tripomastigotes de *T. cruzi* en presencia de compuestos puros y semisintéticos..... 65
3.2.10. Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares..... 66
3.2.11. Estimación de la IC50 y la CC50 de los compuestos utilizados..... 67
3.2.12. Estimación del índice de selectividad (IS) de los compuestos de interés..... 67
3.2.13. Determinación de la inhibición del crecimiento de amastigotes de *T. cruzi* en ensayos de invasión celular por tripomastigotes..... 68
3.2.14. Determinación del porcentaje de liberación de tripomastigotes de *T. cruzi* en ensayos de 7 días post-infección..... 68
4. Capítulo I..... 70
Estandarización de ensayos biológicos moleculares y colorimétricos, para el desarrollo de un método eficiente de rastreo de drogas..... 70
4.1. Objetivo Específico e Hipótesis..... 71
4.2. Resultados..... 72
4.2.1. Cuantificación de epimastigotes transgénicos mediante la valoración de la señal de fluorescencia de GFP..... 72
4.2.2. Cuantificación de epimastigotes transgénicos por medición de la actividad de la β-galactosidasa..... 75
4.2.3. Búsqueda de los parámetros óptimos para la utilización de la técnica colorimétrica reducción de la resazurina sódica..... 76
4.2.4. Cuantificación de epimastigotes silvestres por reducción de la resazurina sódica..... 78
5. Capítulo II..... 85
Extracción, aislamiento e identificación de extractos puros y metabolitos secundarios provenientes de especies vegetales para la evaluación de su actividad biológica sobre cultivos axénicos de *T. cruzi*..... 85
5.1. Objetivo Específico e Hipótesis..... 86
5.2. Resultados..... 87
5.2.1. Actividad biológica de extractos y subextractos..... 87
5.2.2. Procesamiento de especies seleccionadas y actividad biológica de los compuestos aislados..... 88
5.3. Discusión..... 100
6. Capítulo III..... 105
Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiparasitaria de compuestos puros y semisintéticos aislados del Guatambú blanco..... 105
6.1. Objetivo Específico e Hipótesis..... 106
6.2. Resultados..... 107
6.3. Discusión..... 112
7. Referencias..... 115

“Evaluación de la actividad antiparasitaria de productos naturales como base para el desarrollo de nuevas drogas contra la enfermedad de Chagas”

Resumen

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas, una infección parasitaria y zoonótica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi,* ha sido declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como parte del grupo de enfermedades tropicales olvidadas. Los tratamientos disponibles contra la Enfermedad de Chagas son poco efectivos en la fase crónica de la afección para las infecciones en adultos y pueden presentar efectos secundarios severos. Existe una urgente necesidad de encontrar nuevas terapias antiparasitarias eficientes que puedan reemplazar a las ya existentes. El primer objetivo de este trabajo consistió en establecer una técnica colorimétrica como un método eficaz para el rastreo de drogas. Para ello se compararon diferentes técnicas en ensayos *in-vitro* y se estandarizó la técnica colorimétrica conocida como reducción de la resazurina sódica, para ser aplicada en cultivos celulares y cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*. Seguidamente, se describe la extracción, aislamiento e identificación de extractos puros y metabolitos secundarios, provenientes de especies vegetales, para la evaluación de su actividad biológica sobre cultivos axénicos de epimastigotes de *T. cruzi*, con el objetivo de encontrar potenciales candidatos con actividad antiparasitaria. Para ello se procesaron las hojas, flores, semilla y corteza de 6 especies vegetales *Baccharis trimera* (Carqueja blanca), *Helietta apiculata* (Canela de Venado), *Jacaranda Caroba* (Karoba), *Brosimum gaudichaudii* (Mamica de Cadela), *Aristolochia triangularis* (Ysypo Mil Hombre), *Achillea millefolium* (Milenrama) pudiéndose aislar y elucidar la estructura de 13 compuestos puros (*etiljacaranona, acetato de articulina, gaudichaudiósido A, 4-O-prenilcinamato de metilo, rutacultina, chalepina, gravelliferona, uliscomoncadin A, δ-amirina, lupeol, isomultiflorenol e isobauerenol* y p-cumarato de metilo). Los compuestos obtenidos junto con dos derivados semisintéticos de la cumarina *uliscomoncadin A*, fueron probados en ensayos de inhibición de crecimiento de epimastigotes. Por otro lado, con la finalidad de mejorar los resultados de inhibición parasitaria, se analizaron 16 derivados semisintéticos de kokusaginina y flindersiamina, los principales alcaloides aislados de la corteza de *Balfourodendron riedelianum* (Guatambú blanco), sobre cultivos de epimastigtotes y tripomastigotes. Así también, se evaluó la citotoxicidad sobre líneas celulares NRK y HeLa. Aquellos compuestos que presentaron un índice de selectividad igual o mayor a 25, fueron seleccionados para bioensayos sobre amastigotes intracelulares. Dos de los compuestos analizados, dos derivados de kokusaginina mostraron diferencias significativas, respecto al control negativo (DMSO 0,1%), sobre los estadios epimastigotes y tripomastigotes, y uno de ellos, pudo reducir significativamente, el número de amastigotes intracelulares respecto al control. Ninguno de los compuestos mostró efecto citotóxico en las líneas celulares analizadas (NRK y HeLa), destacándose como potenciales candidatos para drogas antiparasitarias contra la enfermedad de Chagas.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, técnicas moleculares y colorimétricas, actividad antiparasitaria, drogas tripanocidas, metabolitos secundarios, ensayos de invasión de tripomastigotes.

“Assessment of the antiparasitic activity of natural products as a basis for the development of new drugs against Chagas disease”

Abstract

American trypanosomiasis or Chagas disease is a parasitic and zoonotic infection caused by flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* and the World Health Organization (WHO) has declared it as part of the group of Neglected Tropical Diseases. Available treatments against Chagas Disease are not very effective during the chronic phase of the disease in adults and can have severe adverse effects. There is an urgent need to find efficient new antiparasitic therapies that can replace existing ones. The first goal of this research was to establish a colorimetric technique as an effective method for drug screening. For this purpose, different techniques were compared using *in vitro* assays and the colorimetric technique known as sodic resazurin reduction was standardized to be applied in human cell lines and *T. cruzi* epimastigote cultures. Next, the extraction, isolation, and identification of secondary metabolites from several plant species is described. Their activity on axenic *T. cruzi* epimastigote cultures was assessed to find potential candidates with antiparasitic activity. In order to do this, leaves, flowers, seeds, and bark of the following 6 plant species were processed: *Baccharis trimera* (Carqueja blanca), *Helietta apiculata* (Canela de Venado), *Jacaranda caroba*. (Karoba), *Brosimum gaudichaudii* (Mamica de Cadela), *Aristolochia triangularis* (Ysypo Mil Hombre), *Achillea millefolium* (Milenrama), Twelve pure compounds were successfully isolated and their structures elucidated, including (*ethyljacaranone, articulin acetate, gaudichaudioside A, 4-O-prenilcinamato de metilo, rutacultin, chalepin, gravelliferone, uliscomoncadin A, δ-amyrin, lupeol, isomultiflorenol, isobauerenol, and methyl p-cumaratethe*) compounds obtained, along with two semi-synthetic derivatives of *uliscomoncadin A* coumarin, were tested in growth inhibition assays against epimastigotes. On the other hand, 16 semi-synthetic derivatives of kokusaginine and flindersiamine, the main alkaloids isolated from the bark of *Balfourodendron riedelianum* (Guatambú blanco), were analyzed on epimastigote and trypomastigote cultures to improve the results of parasitic inhibition. Additionally, cytotoxicity on cell lines NRK and HeLa was also evaluated. Those compounds that presented a selectivity index equal to or greater than 25 were selected for bioassays on intracellular amastigotes. Two of the analyzed compounds, derivatives of kokusaginina, showed significant differences compared to the negative control (0.1% DMSO) on epimastigote and trypomastigote stages, and one of them was able to significantly reduce the number of intracellular amastigotes compared to the control. None of the compounds had a cytotoxic effect on the analyzed cell lines (NRK and HeLa) showing promising potential as candidates for anti-parasitic drugs against Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, colorimetric techniques, antiparasitic activity, anti-parasitic drugs, secondary metabolites, trypomastigote invasion assays.

Abreviaturas

ADN:	ácido desoxirribonucleico
Ap:	ampicilina
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
BHT:	medio de cultivo Brain Heart Trypsosa
BNZ:	benznidazol
CB H:	extracto hojas Carqueja Blanca
CB H:	extracto hojas Carqueja Blanca
CC:	columna seca de sílica
CC50:	concentración media citotóxica
CCD:	cromatografía de capa delgada preparativa
CFCS-RP:	cromatografía flash en columna seca de fase reversa
CFCS:	cromatografía flash en columna seca en fase normal
CPRG:	sustrato enzimático clorofenol rojo β-D-galactopiranosida
CV C:	extracto corteza de Canela de Venado
CV CA:	subextracto acuoso corteza de Canela de Venado
CV CL:	subextracto lipofílico corteza Canela de Venado
CV CO:	subextracto orgánico corteza Canela de Venado
CV CP:	subextracto polar corteza Canela de Venado
CV HP:	subextracto polar hojas Cadela de Venado
DAPI:	marcador de ADN, 4´,6'diamidino-2-phenylindole
DMEM:	medio de cultivo, Dulbecco's Modified Eagle's Medium completo
DMSO:	dimetilsulfóxido
DTUs:	unidades Discretas de Tipificación
EC:	enfermedad de Chagas
ELISA:	enzimoinmunoanálisis de adsorción
EM:	espectrometría de masa
Fr.:	fracciones obtenidas de extractos puros o subextractos
GFP:	proteína verde fluorescente
gGAPDH:	enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa glucosómica
HeLa:	línea celular, Henrietta Lacks
IC50:	concentración media inhibitoria
IFI:	inmunofluorescencia indirecta
IMBIO:	Instituto Misionero de Biodiversidad
IS:	índice de selectividad
K H:	extracto hojas de Karoba
K HP:	subextracto polar de Karoba

CV HL:	subextracto lipofílico hojas Cadela de Venado
KF:	extracto flores de Karoba
KS:	extracto semillas de Karoba
lacZ:	gen que codifica la enzima β-galactosidasa
LC:	límite de cuantificación
LD:	límite de detección
LIT:	medio de cultivo, Liver Infusion Tryptose
M H:	extracto hojas de Milenrama
Md C:	extracto corteza Mámica de Cadela
Mr:	masa molecular
MTT:	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NFX:	nifurtimox
NRK:	línea celular, Normal Rat Kidney
OMS:	Organización Mundial de la Salud
ONPG:	sustrato enzimático, orto-nitrofenil-β-D-galactopiranósido
K HL:	subextracto lipofílico hojas de Karoba
PBS:	solución salina fosfatada
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
RMN:	resonancia magnética nuclear
SBFi:	suero fetal bovino inactivado
SD:	desviación estándar
SFB:	suero fetal bovino
Sm:	estreptomicina
TcCS:	enzima cisteína sintasa de Trypanosoma cruzi
UA	Unidades de absorbancia
UF	Unidades de fluorescencia
VERO:	línea celular proveniente de fibroblastos de mono
X-GAL:	sustrato enzimático, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
Y-GFP:	epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* que expresan la proteína GFP
Y-WT:	epimastigotes silvestres de *T. cruzi*
Y-β-GAL:	epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* que expresan la proteína β-galactosidasa
YMH H:	extracto hojas Ysipo Mil Hombres

1. Introducción General

1.1. Enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas, es una infección parasitaria y zoonótica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, la misma es transmitida por el insecto vector *Triatoma infestans*, triatomino conocido comúnmente como vinchuca. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la incluyó como parte del grupo de enfermedades tropicales desatendidas[1]. Asociada a la pobreza y malas condiciones de viviendas especialmente en las zonas rurales, la enfermedad de Chagas coexiste con otras enfermedades menos silenciosas por lo que pasa desapercibida y aún persiste[2].

Las estrategias para controlar la enfermedad y su transmisión, se basan en un tratamiento farmacológico para las personas infectadas y en el control vectorial del agente transmisor.

La enfermedad tiene una etapa crónica y otra aguda. El tratamiento farmacológico de la misma depende de la etapa en la que se encuentre el paciente. En la etapa aguda, el tratamiento se enfoca en eliminar al parásito y reducir la carga parasitaria en el cuerpo. En la etapa crónica, el tratamiento se enfoca en aliviar los síntomas y prevenir complicaciones[3].

Por su parte, el control vectorial se enfoca en intervenir sobre los triatominos para prevenir su reproducción y disminuir su presencia en las viviendas y sus alrededores, mediante el control químico, mejoramiento de las viviendas, educación y promoción de la enfermedad y sus agentes interventores.

1.1.1. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

1.1.1.1. Taxonomía y características estructurales

El *Trypanosoma* (schizotrypanum) *cruzi*, nombre acuñado por Carlos Chagas en 1909, es el agente causal de la Enfermedad de Chagas. Es un organismo eucariota unicelular, microscópico (mide aproximadamente 20 μm) perteneciente al reino protista, incluido en el orden kinetoplastida porque poseen una masa de ADN circular extranuclear llamada kinetoplasto que se encuentra presente dentro de la doble membrana de una gran y única mitocondria que contiene numerosas copias del genoma mitocondrial[4]. La posición que guarda el kinetoplasto con respecto al núcleo, ayuda a definir el estadio de desarrollo en el que se encuentra el parásito. El *T. cruzi* tiene un genoma nuclear diploide, distribuido en pares de cromosomas homólogos. Este protozoo, posee un cuerpo alargado, está provisto de un único flagelo y una membrana ondulante, estructuras que, agitándose y vibrando, permiten su movilización dentro de la masa de sangre. Todas estas características estructurales lo incluyen dentro de la familia de los trypanosomatides.

En la **Tabla 1** se puede observar la taxonomía de este parásito[5].

Tabla 1: Taxonomía del *Trypanosoma (S) cruzi*.
Reino: Protista. **Sub-reino:** Protozoo. **Phyllum:** Sarcomastigophora. **Clase:** Zoomastigophora. **Orden:** Kinetoplastida. **Familia:** Trypanosomatidae. **Género:** *Trypanosoma.* **Sub-género:** *Schizotrypanum.* **Especie:** *Trypanosoma (S) cruzi.*

1.1.1.2. Morfología, ciclo biológico, DTUs

- Morfología

El parásito sufre una serie de cambios morfológicos y funcionales alternando entre estadios que sufren división binaria así como formas no replicativas e infectivas. Las descripciones morfológicas realizadas por Carlos Chagas, fueron hechas mediante técnicas de fijación y tinción celular, que son utilizadas hasta el día de hoy. Con ayuda de la microscopía óptica se pudo observar la forma general del parásito, así como también, la posición relativa del núcleo (n) y el kinetoplasto (c), y con estos datos se pudieron identificar tres formas evolutivas del parásito; tripomastigostes, amastigotes y epimastigotes[6] (**Figura 1**).

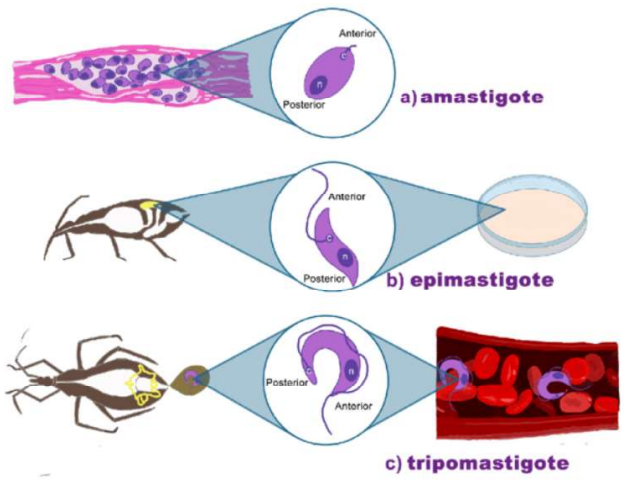


Figura 1*: Localización y morfología de T. cruzi en sus distintos estadios. a) amastigotes en los tejidos del huésped vertebrado. b) epimastigotes en el intestino medio del vector y en cultivo axénico. c) tripomastigotes metacíclicos en los tubos de Malpighi (recto) y las heces del vector. Tripomastigotes sanguíneos en el torrente del hospedero vertebrado[6].*

a) *Amastigotes:* forma esférica, de 2-5µm de diámetro, núcleo circular, kinetoplasto pequeño en forma de barra en la región anterior al núcleo. Pequeño flagelo (no visible al microscopio óptico). Forma no infectiva y replicativa, se encuentran dentro de las células del mamífero infectado.

b) *Epimastigotes:* forma ahusada, de 10-15µm de largo y 1-3µm de ancho. Núcleo ovalado, kinetoplasto en forma de barra en la región anterior al núcleo. Membrana que recorre todo el cuerpo y termina en un flagelo en forma de látigo en el extremo anterior. Esta forma se encuentra presente en el tubo digestivo del insecto vector, es una forma no infectiva y replicativa[7,8].

c) *Tripomastigotes:* forma fusiforme, de 16-20µm de largo y 2-4µm de ancho. Kinetoplasto circular localizado en la región posterior al núcleo. Membrana ondulante que emerge de la zona del kinetoplasto y cubre todo el resto del cuerpo hasta terminar en una prolongación en forma de látigo en la parte posterior, conocido como flagelo. Forma muy infectiva, se encuentra en el intestino posterior del insecto vector y en forma circulante en la sangre de los vertebrados infectados.

- Ciclo biológico

El ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* incluye etapas de desarrollo en un insecto vector, comúnmente conocido como vinchuca, que actúa como intermediario y un vertebrado tales como: seres humanos, animales silvestres y animales domésticos, que actúan como reservorio. En la **Figura 2**, se puede observar cómo transcurre el ciclo biológico del *T. cruzi.* El ciclo inicia cuando el insecto vector hematófago (vinchuca) pica y se alimenta de la sangre infectada del hospedador vertebrado (1 y 2), los parásitos que ingiere sufren una transformación madurativa en el intestino (3-5) y libera con sus heces tripomastigotes metacíclicos que son las formas infectivas del parásito. Estas se desarrollan en la ampolla rectal del insecto vector triatomino y pueden infectar a distintas especies de animales vertebrados incluyendo al hombre[9]. Al picar a un nuevo mamífero, la vinchuca defeca cerca de la picadura (6). Esto causa escozor, por lo que el hospedero frota la zona afectada y los tripomastigotes metacíclicos ingresan dentro del huésped a través de esas lesiones. Una vez que los tripomastigotes metacíclicos atraviesan la piel, invaden células nucleadas cercanas al sitio de inoculación (7 y 8) y en su interior se diferencian al estadio intracelular amastigote (9-11)[10]. Luego de múltiples divisiones, estos rompen las células que los contienen y en su forma diferenciada de tripomastigotes sanguíneos quedan libres en la circulación sanguínea y pueden invadir nuevas células (12-15). Estos tripomastigotes que se encuentran en el torrente sanguíneo del huésped vertebrado, pueden volver al insecto vector cuando el mismo se alimenta de este vertebrado infectado[11]. Una vez dentro del tracto digestivo del vector, el parásito se diferencia al estadío replicativo no infectivo, epimastigote. En el recto o intestino posterior se diferencian a tripomastigotes metacíclicos y el ciclo inicia nuevamente.

El proceso de diferenciación que ocurre a lo largo del intestino del vector se llama metaciclogénesis[12].

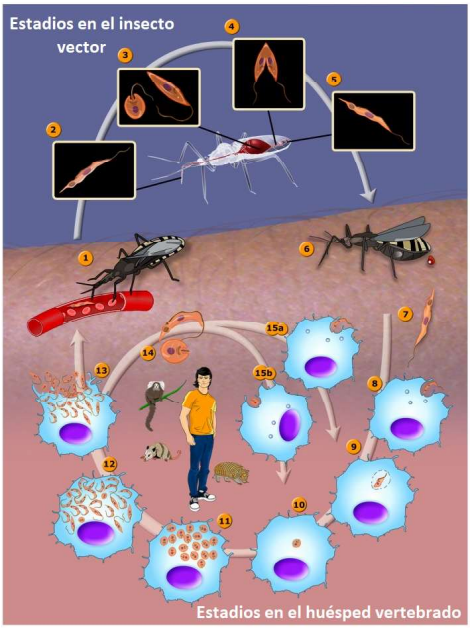


Figura 2. *Ciclo biológico del T. cruzi. El ciclo comprende dos reservorios, uno ocurre dentro del insecto vector (T. infestans), y el otro en el huésped vertebrado. En la parte central de la figura, se agregaron los reservorios animales más importantes involucrados en el mantenimiento del parásito en el ambiente doméstico y peridoméstico[13].*

- DTUs o Unidades Discretas de Tipificación

Además de un ciclo de vida complejo, *T. cruzi* es una especie extraordinariamente heterogénea que presenta múltiples cepas con un alto grado de variabilidad genética y biológica, y que han sido relacionadas con la distribución geográfica, las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento. En efecto, el tamaño del genoma puede variar hasta 48% entre especies. Esta inmensa diversidad genética ha sido clasificada en seis Unidades Discretas de Tipificación (DTUs): TcI a TcVI[14]. Una DTU se refiere a un conjunto de cepas que pueden ser caracterizadas por marcadores moleculares específicos, y que son genéticamente más similares entre sí que con otro conjunto de cepas[15]. A pesar de que nuevos estudios propusieron otra clasificación, o la inclusión de TcBat como la séptima DTU[16], la clasificación de las "seis DTUs" se mantiene actualmente como la más aceptada. Dentro de este marco, estudios ecoepidemiológicos mostraron a cada DTU asociada a una distribución geográfica particular[17].

1.1.2. Agente Vector: Triatoma Infestans

- Hábitat y distribución geográfica

La transmisión vectorial de la Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas se da por la intervención de insectos hemípteros de la familia Reduviidae, específicamente por el *Triatoma infestans*[18] comúnmente conocido como vinchuca, palabra que se cree tiene un origen quechua y significa "echarse al suelo o dejarse caer"[19], esta es una particularidad del insecto que se refugia en las grietas de paredes y techos de las viviendas construidas con ladrillos de adobe, ramas o paja, y que cuando necesita "baja a alimentarse". Este insecto es endémico en el cono sur americano, existe evidencia genética y registros escritos que indican que el *Triatoma infestans* se originó en la región de Cochabamba-Sucre en Bolivia Central, donde se pueden encontrar focos selváticos de esta especie entre rocas amontonadas y en asociación con roedores[20,21]. La caza de estos roedores y la cría de los mismos dentro de las casas como fuente de alimentos, pudo haber suministrado la ruta inicial para la domesticación del *T. infestans*[22]. La distribución del insecto en el resto del continente se asocia a las migraciones humanas iniciadas con los indios Chinchorro que se desplazaron para establecerse al norte de Chile. Actualmente los encontramos en: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay[23]. A diferencia de otros triatominos, también presentes en estas zonas, *T. infestans* ha desarrollado la capacidad de alojarse en el hábitat humano y esa domiciliación le permitió utilizar al humano como un recurso de alimento. Sin embargo, el humano no es el único vertebrado que forma parte de su ciclo alimenticio ya que se lo puede encontrar en las zonas próximas al domicilio (peridomiciliar) como en los gallineros, conejeras, palomares, entre otras[24]. Es un animal de hábitos nocturnos, por lo que son de difícil visualización durante el día. La prevalencia de la vinchuca en las viviendas se ve favorecida por las malas condiciones de construcción e higiene de las mismas.

- Características morfológicas y ciclo de vida

Los especímenes de *T. infestans* presentan dimorfismo sexual visible en su estadío adulto (**Figura 3**). Como características generales, son de color oscuro (negro, pardo o marrón oscuro). Las hembras son de mayor tamaño que los machos, tienen una longitud de 26-29 mm, mientras que los machos alcanzan una longitud de 21-26 mm. Presentan un abdomen generalmente aplanado. Cabeza alargada, cilíndrica o cónica, y un aparato bucal chupador-picador. Ojos compuestos, grandes, redondeados y salientes, un par de antenas largas, finas, formadas por cuatro segmentos. El dorso es duro y bien queratinizado, con un reborde de bandas transversales que se alternan en colores pardos y amarillos (conexivo). De la zona dorsal también nacen dos pares de alas bien desarrolladas. El insecto presenta tres estadios de desarrollo (huevo - ninfa - adulto). Se reproduce por huevos, que miden de 2 a 3 mm. Luego pasa por dos estados de crecimiento, estado ninfal y estado adulto, que vienen acompañados de cambios (muda) en el tamaño del insecto y en la aparición de las alas. Las

ninfas, al igual que los adultos, son hematófagas. La transformación desde el estado de huevo a la etapa adulta puede variar de ocho meses a un año. A partir del estado adulto la vida de este insecto se prolonga entre uno y dos años[25,26] (**Figura 4**).

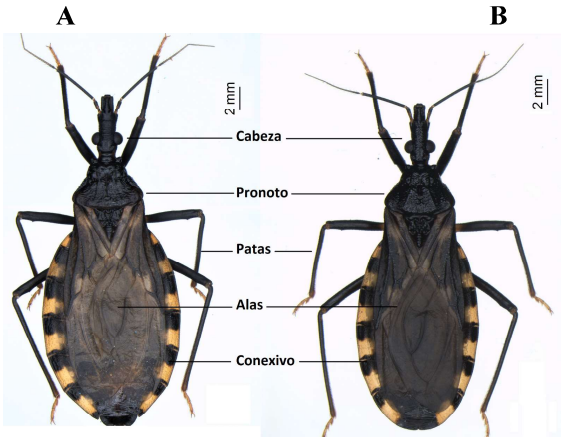


Figura 3: *Vista dorsal del estadío adulto de Triatoma infestans. Dimorfismo sexual.* ***A.*** *Ejemplar hembra.* ***B.*** *Ejemplar macho*[27].

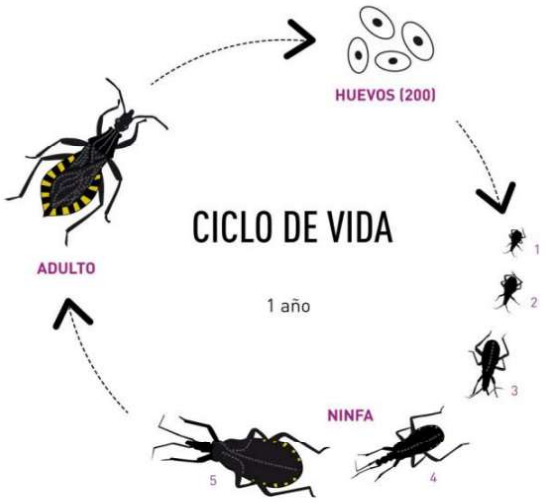


Figura 4: *Ciclo de vida de los triatominos T. infestans. Su desarrollo comprende varias transformaciones desde el huevo (elípticos y con un opérculo, por donde emerge la ninfa), cinco estadios ninfales (1-5), donde existe un crecimiento incompleto de las alas y la genitalia. Los primordios alares son visibles en el estadío 5, y el adulto, (hembra o macho) donde se encuentran desarrollados y diferenciados las alas y los genitales*[28].

1.1.3. Análisis histórico de la Enfermedad de Chagas

Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, médico e investigador brasilero, en sus inicios fue ampliamente reconocido por sus estudios sobre la malaria y su lucha exitosa contra esta. Esto lo llevó a ser contratado por el doctor Osvaldo Cruz, director y fundador del Instituto Manguinhos de Rio de Janeiro, hoy conocida como la Fundación Osvaldo Cruz, para participar en una campaña contra la malaria y combatir la epidemia en la provincia brasileña de Minas Gerais en 1906[29]. Durante esa campaña de trabajo supo de la presencia, en las viviendas rurales, de un insecto hematófago triatomino que tenía el hábito nocturno de "picar" a las personas. Sus conocimientos sobre enfermedades de transmisión vectorial y la presencia de sintomatologías clínicas en determinados pobladores, que no se correspondían con las enfermedades conocidas en ese momento, lo llevó a suponer que podría tratarse de una nueva enfermedad humana relacionada con este insecto hematófago. Esto lo motivó a analizar al insecto, a algunos vertebrados presentes en la zona y a los habitantes de esos hogares, y descubrió en los intestinos del primero y en la sangre de los demás, un protozoo flagelado que más adelante sería bautizado como *Trypanosoma cruzi*[30].

El 14 de febrero de 1909, Chagas examinó a una niña de 2 años, Berenice, que tenía fiebre alta, hepatomegalia, edema facial y presencia del parásito en la sangre. Ella sería el primer caso de la enfermedad de Chagas descrito en la literatura. Berenice permaneció asintomática durante toda su vida y murió a los 73 años por otras causas. Fue incluida en varios estudios clínicos de esta enfermedad desde los 55 hasta los 71 años de edad[31]. Más adelante, hacia 1913, empezaron a reportarse más casos similares en El Salvador, Perú, Venezuela, Costa Rica, Paraguay. Estos datos fortalecieron los informes de Chagas y fue entonces que pudo determinar la existencia de una nueva enfermedad, conocida hoy como Enfermedad de Chagas, al agente patógeno causante de esta enfermedad, al insecto vector encargado de transmitirla y a los distintos reservorios de este patógeno. Con el análisis de diversos cuadros clínicos describió las formas aguda y crónica de la enfermedad, y más adelante confirmó sus descubrimientos con lo cual el conocimiento de la enfermedad se extendió en el mundo[32]. Al tiempo aparecieron las críticas sobre su descubrimiento y se puso en duda la existencia de la enfermedad considerando que en los países limítrofes donde abundaban esas especies de vectores, no se detectaban personas enfermas. Hoy se pueden comprender esas dudas porque actualmente se conoce la dificultad en diagnosticar la fase aguda ya que no presenta sintomatología específica. Además, muchos casos ocurrían a edad muy temprana o se confundía con otras enfermedades que abundaban en ese entonces, mientras que en la fase crónica la ausencia del parásito en sangre impedía su diagnóstico a simple observación; esto sumado a otros aspectos socioambientales llevó a que se dejara de prestar atención a esta enfermedad[33]. Carlos Chagas, fue nominado al premio Nobel en dos oportunidades (1913 y 1921) pero el premio nunca le fue otorgado[34]. En 1934 muere a los 55 años de edad de una aparente insuficiencia cardíaca.

En ese mismo tiempo, la intervención de los médicos argentinos Salvador Mazza y Cecilio Romaña, marcaron una nueva etapa cuando informaron que habían encontrado muchos casos de la enfermedad de Chagas en el Chaco argentino. Mazza estudió las características de la enfermedad, trazó un mapa de su distribución y transmitió sus conocimientos a los médicos de las localidades donde llegaba. Certificó más de 1200 casos de Chagas en Argentina. A la par, los avances tecnológicos permitieron introducir nuevos métodos clínicos de diagnóstico (xenodiagnóstico) que finalmente confirmaron, al mundo entero, los hallazgos de Carlos Chagas y ya en ese momento la presencia de la enfermedad en varios países de América[35]. Si bien es cierto que el conocimiento de la enfermedad como tal se dió a partir de los descubrimientos de Chagas, existen reportes del ADN del parásito en restos de humanos momificados de hace más de nueve mil años de antigüedad encontrados en el desierto de Atacama, Chile y en los tejidos de una momia inca peruana[36,37]. Estas culturas recurrían a ambientes oscuros y muy secos para conservar los restos humanos y los insectos vectores del orden hemíptero, al cuál pertenecen los triatominos, y que tienen una distribución geográfica en esas zonas, pudieron estar presentes en esos ambientes. La presencia antigua de estos vectores queda también evidenciada en los registros en las crónicas de exploradores y naturalistas como Charles Darwin quien cuenta que en marzo de 1835, mientras pasaba la noche en la ciudad de Mendoza-Argentina, experimentó el "ataque de la vinchuca, el gran bicho negro de las Pampas". Se cree que los problemas cardíacos que lo acompañaron en las últimas etapas de su vida se debía a la enfermedad de Chagas que pudo contraerla en ese entonces, aunque esto no se ha podido demostrar[38]. En la **Figura 5**, se representa la línea de tiempo con los años y los eventos más preponderantes en la historia de la enfermedad de Chagas.

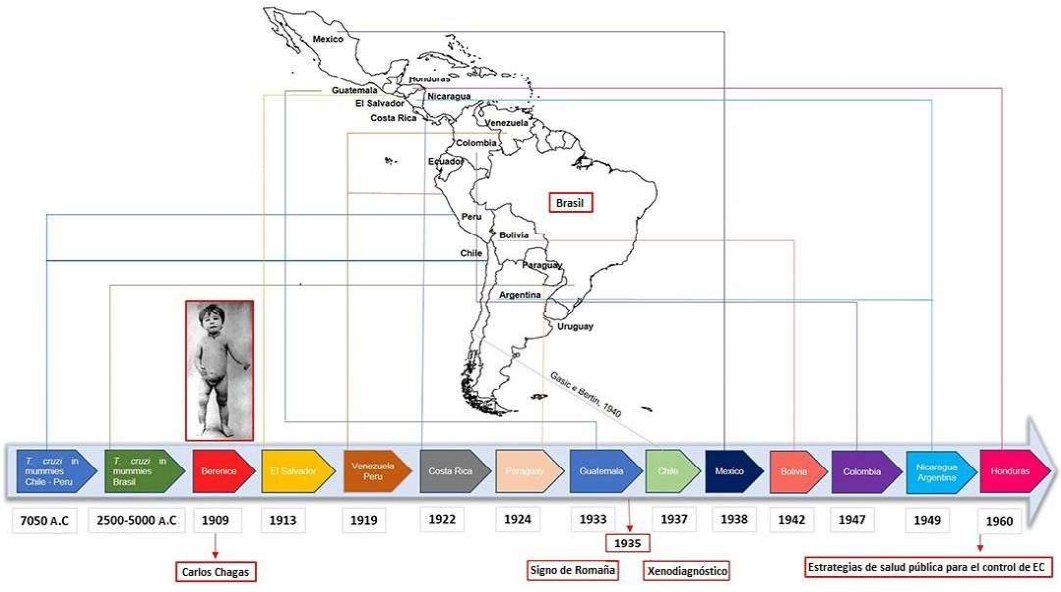


Figura 5: *Línea de tiempo con los primeros casos humanos de la enfermedad de Chagas reportados en América Latina. Tras el informe del primer paciente confirmado (Berenice) en Brasil por Carlos Chagas en 1909, se reportaron casos en El Salvador, Venezuela, Perú, Costa Rica, Paraguay, Guatemala, Chile, México, Bolivia, Colombia, Nicaragua, Argentina y Honduras. En 1935, se asoció la señal de Romaña con la forma aguda de la enfermedad, y se propuso el xenodiagnóstico como un método de diagnóstico. En 1960 se inició la implementación de programas gubernamentales para controlar la enfermedad de Chagas (EC), en América Latina*[32].

1.1.4. Epidemiología de la enfermedad de Chagas

Esta parasitosis, de difícil diagnóstico y detección, se ha extendido no solo por el continente Americano sino por el resto del mundo, por lo que hoy la enfermedad de Chagas se ha convertido en un problema de salud pública mundial. En la **Figura 6**, se puede observar el mapa de distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.

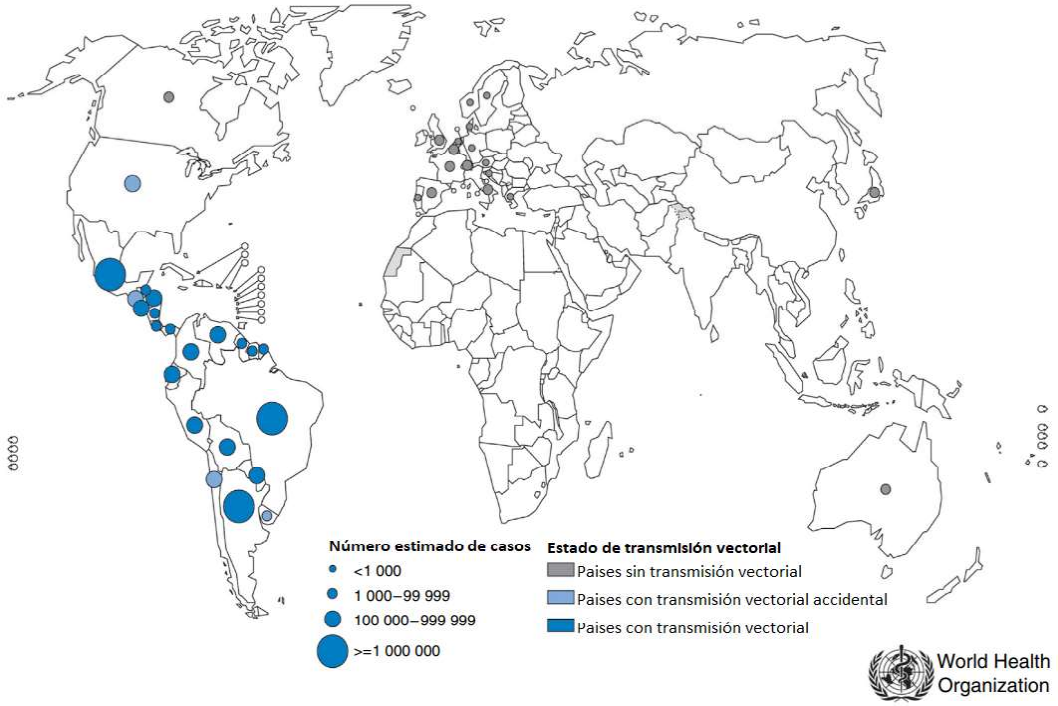


Figura 6: *Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas*[39]*. El tamaño de los círculos es proporcional a los casos estimados. Los colores de los círculos determinan el tipo de transmisión.*

La transmisión vectorial es la más prevalente en poblaciones rurales de Latinoamérica con insectos vectores domiciliados y peridomiciliados. Las zonas endémicas se extienden desde el sur de Estados Unidos hasta el cono sur donde Bolivia, Argentina, Paraguay y Brasil son los países con mayores casos de esta enfermedad. La transmisión oral por la contaminación de alimentos es una de las formas que se presenta actualmente en algunas zonas del Brasil[40]. En los últimos años se han registrado pacientes infectados por *T.cruzi* en países no endémicos. Las migraciones humanas han

sido señaladas como el factor crítico para la aparición de la enfermedad de Chagas en áreas donde previamente no se había descrito. Debido a esto, la enfermedad se ha extendido a otros continentes donde se transmite por otras vías como la congénita, transfusional y por trasplantes de órganos. Europa y Estados Unidos son las zonas con mayor número de casos estimados, aunque también se han documentado casos en Asia y en Oceanía[41]. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, la mayoría de ellas en América Latina. Su existencia y prevalencia, en estos países, se ampara en un contexto socioambiental dado que se encuentra asociada a la pobreza y a las malas condiciones de las viviendas principalmente de las zonas rurales y en los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades donde existe mucha migración de personas infectadas[42]. Indicadores como la presencia de vectores, seroprevalencia, enfermedad clínica y sangre infectada en los bancos de sangre son los considerados relevantes y confiables para estimar una cuantificación real de la enfermedad.

1.1.5. Mecanismo de transmisión de la infección

El *Trypanosoma cruzi* puede infectar al humano utilizando diferentes vías de transmisión que se podría clasificar en vectorial y no vectorial. La transmisión vectorial o dependiente de un agente vector, se da principalmente por la inoculación del parásito, presente en las heces de los triatominos, a través de la piel y de las mucosas, y de forma secundaria por vía oral, a través de la ingesta de alimentos contaminados con las heces de estos triatominos[39]. Aunque se han identificado más de 130 especies de vinchucas triatominas[43], solo unas pocas son vectores competentes para *T cruzi. Triatoma infestans, Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son las tres especies de vectores más importantes en la transmisión de *T cruzi* al ser humano. Históricamente, *T. infestans* ha sido el vector más importante y el principal en las regiones endémicas. La transmisión no vectorial puede darse por transfusiones de sangre infectada y hemoderivados, también se puede producir a través de trasplantes de órganos infectados como el riñón, médula ósea, corazón, etc. Otras formas de transmisión ocurren en accidentes de laboratorio por contacto directo con vinchucas o sangre infectada y/o manipulación del parásito, también se da la transmisión vertical o congénita (de madre a hijo). El parásito puede pasar al feto en cualquier fase de la infección, y en cualquier momento de la gestación, incluido el parto, debido al contacto del recién nacido con las mucosas y la sangre materna[44]. Sin embargo, hasta la fecha no hay indicios de que exista una transmisión por medio de la leche materna. Tampoco se describen casos de transmisión por contacto sexual ni por contacto con las mucosas de la boca.

1.1.6. Prevención de la transmisión

Debido a la complejidad antigénica del *T. cruzi,* las diferentes vías de transmisión, la falta de recursos del sistema sanitario de los países endémicos, entre otros aspectos, el control del avance y la prevalencia de la infección se basa principalmente en la prevención. La interrupción de la transmisión domiciliar y peridomiciliar se ha visto favorecida mediante el control vectorial del *T. infestans.* La principal medida tiene que ver con la forma en la que están construidas las casas, es importante evitar hacerlas de adobe con techos de paja, debido a que en estas estructuras se crean muchos huecos o fisuras donde los triatominos se pueden esconder durante el día, también es necesario mejorar la higiene del hogar, y por las noches utilizar mosquiteros ya que estos insectos se alimentan en esos momentos[45]. En cuanto al control por parte de la salud pública, la implementación de insecticidas piretroides ha presentado resultados variables de un país a otro[46,47]. Sumado a estos mecanismos de control es necesaria una constante vigilancia epidemiológica, ya que los triatominos son ejemplares autóctonos del área y no pueden ser eliminados en su totalidad. Por otro lado, para reducir los casos de infección por vía oral, resulta indispensable la correcta higiene en la preparación, transporte, almacenaje y consumo de alimentos. La transmisión por transfusión de sangre se elimina al seleccionar a los donadores con las pruebas serológicas correspondientes. La transmisión dentro de los laboratorios se mitigan fácilmente al aplicar las buenas prácticas y normas de bioseguridad. La prevención de la transmisión congénita está enfocada en el recién nacido. Por lo que se hace imprescindible realizar las pruebas correspondientes a los recién nacidos de madres infectadas y así detectar la presencia del parásito a tiempo. Una detección temprana permitirá que estos puedan ser tratados con los fármacos disponibles mostrando una alta eficacia para esos casos[48].

1.1.7. Desarrollo de la enfermedad: Manifestaciones clínicas

Se distinguen dos fases luego de la infección por *T. cruzi*, la fase aguda y la fase crónica. En la **Figura 7,** se muestra un esquema representativo del desarrollo de la enfermedad en una línea de tiempo. La fase aguda dura entre quince y sesenta días y es la que ocurre inmediatamente después de la infección con el parásito. Se caracteriza por la presencia de grandes cantidades de tripanosomas circulando en la sangre del hospedador (alta parasitemia)[49]. En la mayoría de los casos, no viene acompañado de síntomas o si los hay son leves y no específicos. Se describen fiebre prolongada, diarrea, dolor de cabeza, cansancio, irritabilidad, vómitos, falta de apetito, malestar general, pero pasan desapercibidos por ser síntomas comunes a otras afecciones. A veces, la infección aguda puede estar asociada a un chagoma de inoculación (inflamación e hinchazón cutánea del sitio de entrada del parásito más frecuente en el rostro y extremidades por ser las zonas más expuestas) o a una lesión ocular, denominada signo de Romaña que se presenta como edema de color rosado violáceo claro,

indoloro y duro. En algunos casos se pueden observar manifestaciones severas con cuadros de meningoencefalitis y miocarditis aguda[50]. Cuando este síntoma está presente, el diagnóstico es preciso. El período de incubación de la etapa aguda comprende 4 a 10 días y se observa una alta efectividad al tratamiento con los antiparasitarios existentes[51]. La fase crónica deviene después de la fase aguda. Puede presentarse en dos formas, la indeterminada o latente y la forma sintomática. La fase crónica puede durar toda la vida del individuo y muchas veces pasar desapercibida. Representa entre 50% y 70% de todos los pacientes infectados[52]. El porcentaje de personas que desarrollará algún cuadro clínico depende, entre otras cosas, de la edad, el estado nutricional y el estado del sistema de defensa (sistema inmune). En estos casos, los parásitos invaden los órganos y músculos y en un porcentaje alto de pacientes aparecen los síntomas frecuentes como la cardiopatía chagásica, que se caracteriza por su gravedad y representa la principal causa de muerte de los enfermos[53], y los síndromes digestivos progresivos como el megaesófago y el megacolon. En esta fase existe una parasitemia baja, por tanto, se requiere de técnicas inmunológicas específicas para su detección. Para los casos crónicos, el tratamiento antiparasitario no resulta efectivo[54]. De acuerdo con la caracterización de las fases del Chagas, es importante destacar la diferencia que existe entre estar infectado por el *Trypanosoma cruzi* y estar enfermo de Chagas. Se dice que está infectado quien se encuentra en alguna de las dos primeras etapas descritas. Tiene el parásito en su organismo pero no manifiesta signos o síntomas clínicos. Mientras que está enfermo de Chagas quien se encuentra en la etapa crónica sintomática, manifestando afecciones de diversa complejidad en su salud.

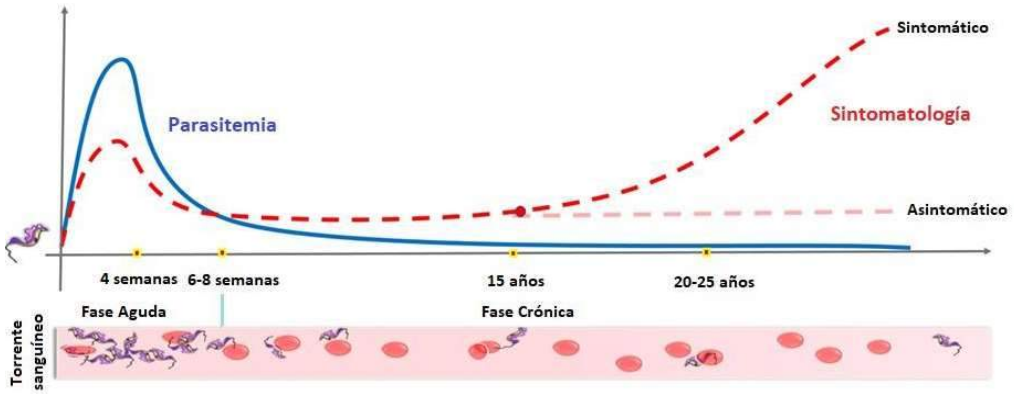


Figura 7: *Desarrollo de la enfermedad en el tiempo. La fase aguda de la infección por Trypanosoma cruzi viene acompañado de varios síntomas y una alta parasitemia que comienza a disminuir después de 4 semanas. Durante la fase crónica, la parasitemia baja y los síntomas permanecen ocultos durante años*[55].

1.1.8. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección puede darse en cualquiera de las fases pero requiere la utilización de datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio[56]. La fase aguda tiene una duración de

4-8 semanas y se caracteriza por una elevada parasitemia que puede ser detectada por métodos parasitológicos directos como el examen en fresco de sangre extraída de pacientes infectados, también el xenodiagnóstico y hemocultivos[57]. En la fase crónica, la parasitemia desciende y ya no es posible utilizar los métodos directos, por lo que las técnicas no parasitológicas como PCR[58] y las inmunoserológicas (ELISA, IFI, Hemoaglutinación indirecta) son las apropiadas. Para que el diagnóstico, en casos crónicos, tenga alto grado de certeza deben realizarse al menos dos pruebas serológicas, utilizando técnicas distintas. Ambos resultados deben ser concordantes. En los casos de discordancia, es decir con una prueba positiva y otra negativa, debe realizarse una tercera técnica[59]. Además de las pruebas parasitológicas y serológicas, para determinar la situación de cada persona, es necesario que todos los diagnósticos de laboratorio (en fase aguda y crónica) sean acompañados por una evaluación clínica, que puede incluir estudios como electrocardiograma, radiografía de tórax o ecocardiograma, hepatograma, entre otros[60,61].

1.1.9. Tratamiento

La infección por *Trypanosoma cruzi* no discrimina edad ni sexo. Este es un parásito con gran capacidad de sobrevivir y adaptarse a ambientes tan cambiantes como el intestino de una vinchuca, el torrente sanguíneo y el interior de una célula humana. Además, puede resistir, camuflarse y/o evadir a nuestro sistema inmune. En la actualidad no existe una vacuna contra el agente causal de la enfermedad pero se puede tratar y en algunos casos curar[62].

Podemos definir dos tipos de tratamientos, el etiológico que apunta al origen de la infección, es decir al parásito; y el tratamiento de las manifestaciones clínicas[63]. El tratamiento etiológico se basa en el uso de fármacos antiparasitario, y es altamente efectivo si se aplica al poco tiempo de producirse la infección (fase aguda), sin embargo, su eficacia disminuye a medida que transcurre el tiempo desde el inicio de la infección y poseen importantes efectos secundarios[64]. Con el tratamiento antiparasitario (o tripanocida) se apunta, a nivel individual, a curar la infección y a prevenir que el parásito pueda invadir y lesionar los órganos. A nivel poblacional, se busca disminuir las posibilidades de transmisión del *T. cruzi.*Se ha demostrado que el tratamiento etiológico es tanto más efectivo cuanto antes se realice, esto implica una eficiencia mayor en estadios tempranos de la fase aguda, así como en niños/as y adolescentes, alcanzándose en estas condiciones un éxito de curación del 70 - 95 %. La eficacia del tratamiento en niños es alta en cualquiera de las fases[65].

Los dos medicamentos disponibles que se encuentran en el mercado desde hace más de 40 años, para estos tratamientos son el nitroimidazol comercialmente conocido como Benznidazol (BNZ), y el nitrofurano Nifurtimox (NFX)[66,67] (**Figura 8**). El mecanismo de acción de estos

fármacos implica daño en el ADN mitocondrial del parásito y la producción de radicales libres e inhibición de la síntesis de proteínas y cadena respiratoria en los protozoarios, impidiendo su replicación[68]. El uso de estos antiparasitarios está descrito desde la década del 70` y sigue en vigencia. Son los únicos medicamentos con eficacia comprobada contra la enfermedad de Chagas, aunque resultan poco eficaces en la fase crónica de la enfermedad y muy tóxicos en el humano, produciendo efectos adversos (dermatológicos, digestivos, neurológicos, entre otros) en más del 40% de los pacientes tratados[69], cuya intensidad y frecuencia suelen aumentar en función del tiempo de tratamiento[70] y de la edad de quien lo recibe, esta es una de las principales razones por la cual los pacientes no terminan el tratamiento. Otro problema recurrente, al cual se enfrentan los pacientes, es que provienen de lugares muy distantes, y no tienen un fácil acceso a los centros de distribución farmacológica de estos medicamentos, lo que favorece al abandono del tratamiento[71]. Aunque la toxicidad de estos compuestos es alta, a falta de otras opciones, el benznidazol y el nifurtimox seguirán siendo parte del tratamiento en el futuro próximo, por lo que urge encontrar nuevos protocolos o combinaciones con otros fármacos para lograr una máxima eficacia con una mínima toxicidad[72]. Actualmente estos medicamentos no son comercializados, su distribución es controlada por los organismos de salud de cada país.

Nifurtimox (NFX) **Benznidazol (BNZ)**



Figura 8: *Estructuras químicas de los compuestos Nifurtimox y Benznidazol*

El desarrollo de una vacuna contra la enfermedad, un mayor apoyo en la búsqueda y el esclarecimiento de los mecanismos relacionados con invasión celular, la respuesta inmune, la patogénesis de la enfermedad y marcadores que permitan pronosticar el desarrollo de la misma, así como también, encontrar un tratamiento antiparasitario más eficiente siguen siendo objetivos pendientes a alcanzar junto con el control de la transmisión y la prevención de la enfermedad de Chagas mediante el acceso a la salud pública de las poblaciones de riesgo.

1.2. Productos naturales

1.2.1 Productos naturales en la medicina tradicional

El empleo de las plantas y otros recursos naturales para la alimentación del hombre y curar o aliviar dolencias, se remonta a siglos pasados. Esas experiencias transmitidas de generación en generación basadas en las creencias, conceptos y prácticas empíricas dieron origen a lo que hoy se conoce como medicina tradicional. Esta forma parte del acervo cultural y se ha desarrollado en muchos países con características propias[73]. Desempeña un papel especialmente importante en comunidades aisladas o de bajos recursos, ya que muchas veces es la única opción de cura o tratamiento paliativo a la que la población tiene acceso. La utilización de plantas en la medicina tradicional no es casualidad, hoy se sabe que las especies vegetales elaboran cientos de sustancias orgánicas, conocidas como metabolitos, que se clasifican en dos tipos: primarios y secundarios. Se define como metabolitos primarios a los compuestos químicos que son necesarios para la vida, crecimiento y reproducción de todos los organismos vivos incluyendo a las especies vegetales. Son producidos mediante reacciones bioquímicas que realizan las células a partir del carbono, nitrógeno y energía térmica. La glucosa y otros azúcares, los ácidos grasos, lípidos y ceras, los aminoácidos y con ellos las proteínas, además de vitaminas y reguladores de crecimiento, entre otras sustancias esenciales son ejemplos del metabolismo primario. Estas sustancias tienen función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos, síntesis de proteínas, carbohidratos y lípidos. Por su parte, los metabolitos secundarios o también llamados productos naturales, son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario[74]. Son, en principio, no esenciales para la vida pero contribuyen definitivamente a la adaptación de las especies y su supervivencia, ya que intervienen en funciones biológicas y ecológicas. Estas pequeñas moléculas ejercen una amplia gama de efectos sobre la propia planta y sobre otros organismos vivos[75]. Actúan como aleloquímicos interviniendo en las funciones de la planta o de los organismos con los que interacciona, y son el recurso del cual se valen para existir y sobrevivir considerando que son organismos sésiles y no pueden huir de los peligros. Inducen la floración, la fructificación y la abscisión, mantienen el crecimiento perenne o señalan el comportamiento caducifolio. Entre los productos naturales se encuentran sustancias odoríferas que desempeñan el papel de atrayentes o, por el contrario, como repelentes de animales[76]. Otras sustancias son pigmentos que proporcionan colores intensos a las flores y frutos que favorecen la polinización y fuente de alimentación de animales, también existen sustancias con funciones de defensa con sabores amargos o venenosas impidiendo la predación de las mismas o bien, sustancias tóxicas para determinados patógenos que enferman a las plantas. Las hierbas medicinales y muchos medicamentos modernos dependen de los metabolitos secundarios para sus acciones[77]. Estos

compuestos tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica[78]. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, etc. Los metabolitos secundarios incluyen diferentes tipos de compuestos donde encontramos a los carotenos, cumarinas, ésteres alifáticos, esteroides, ésteres aromáticos, fenoles, flavonoides (antocianinas, chalconas, isoflavonoides, flavonas, flavonoles, flavanonas, quercetina), gomas, glucósidos y glicósidos, iridoides, lignanos y neolignanos, mucílagos, pectinas, quinonas (antraciclinonas, antraquinonas, benzoquinonas, naftoquinonas), resinas, saponinas, taninos, terpenos, etc. Aunque podría hacerse una gran clasificación en 4 grupos: terpenos (mono, di, tri y sesquiterpenos)[76], compuestos fenólicos, glicósidos cianogénicos y alcaloides. Es importante destacar que no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas; estos tienen una distribución diferencial entre grupos taxonómicos, por lo que la diversidad biológica favorece la diversidad química de los metabolitos secundarios, así también varían su concentración y localización. Ellos pueden sintetizarse en determinados órganos (hoja, tallo) y almacenarse en otras estructuras distintas, por ejemplo: flores, semillas, raíces o rizomas o en todo el vegetal. Todas estas propiedades biológicas hacen a las plantas un recurso natural de alto valor económico y medicinal.

El uso responsable de estos recursos naturales es indispensable, pues si bien es cierto que existen partes de las plantas que son renovables (hojas, frutos, flores) necesitan un tiempo para volver a generarse, mientras que hay otras partes, como la corteza, que no se renuevan o que requieren de muchos años para regenerarse, por lo que una extracción inadecuada implicaría la muerte del ejemplar.

1.2.2. Productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas

El desarrollo de nuevos fármacos activos contra *T. cruzi* sigue siendo un desafío. El complejo ciclo de vida y la diversidad genética del parásito, la ausencia de vacunas, las diferentes sensibilidades a los medicamentos disponibles y la poca atención de las compañías farmacéuticas hacia las enfermedades desatendidas, son algunas de las razones del lento progreso en este campo. Considerando que gran parte de las drogas aprobadas y disponibles comercialmente para el tratamiento de diversas dolencias y enfermedades tienen como base compuestos y derivados de origen natural, y atendiendo a la diversidad estructural y química que estos presentan, los productos naturales siguen siendo excelentes puntos de partida para encontrar potenciales fármacos bioactivos o derivados asociados[79]. En la **Figura 9**, se muestra un gráfico de torta donde se representa el origen

del total de las drogas aprobadas y comercializadas, desde 1981 hasta el 2019, para el tratamiento de determinadas enfermedades humanas[80], observándose que del total de 1881 compuestos, aproximadamente 441 compuestos provienen de compuestos naturales y de sus derivados.

La penicilina, la morfina, la atropina, la colchicina, la efedrina, son ejemplos importantes de drogas de origen natural que marcaron la historia de la medicina y que se siguen comercializando hasta la fecha. El descubrimiento de la quinina a partir de *Cinchona succirubra* y su posterior desarrollo como fármaco antimalárico, el descubrimiento de la artemisinina y de la avermectina, representan un hito en la historia de los fármacos antiparasitarios porque cambiaron el tratamiento de las enfermedades parasitarias en todo el mundo[81].

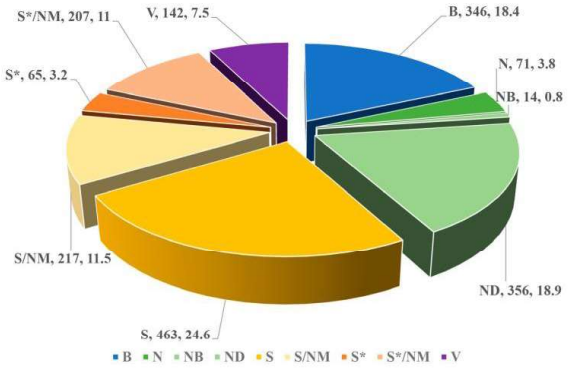


Figura 9: *Origen del total de drogas aprobadas y comercializadas desde 1981 hasta 2019 para el tratamiento de enfermedades humanas. "B": Biológico; "N": Producto natural. "NB": Producto natural botánico. "ND": Derivado de un producto natural y generalmente una modificación semisintética. "S": Medicamento totalmente sintético. "S*": Producido por síntesis total, pero el farmacóforo es/fue un producto natural. "V": Vacuna. "NM": Imitador de producto natural*[80].

La prevalencia de enfermedades que datan de la edad antigua como el Chagas, lepra, tuberculosis, y el surgimiento de nuevas enfermedades en la actualidad, ponen de manifiesto la necesidad de la búsqueda constante de compuestos químicos que puedan utilizarse para el desarrollo de nuevos fármacos que combatan y eliminen dichas enfermedades.

1.2.3. Antecedentes bibliográficos de las familias y especies vegetales analizadas en esta tesis.

El bosque atlántico sudamericano sigue siendo uno de los ecosistemas más diversos del planeta. Aunque se ha perdido más del 90 % de su extensión original, una gran parte del bosque lluvioso más meridional que queda, se encuentra en la provincia de Misiones, Argentina. En este bosque se encuentran familias de especies vegetales que tiene un alto valor medicinal para las comunidades que habitan esa región, ya que muchas de ellas son utilizadas de manera empírica contra diversas dolencias. Hoy sabemos que estos usos, no son casualidad, pues estas especies presentan en sus partes, estructuras compuestos químicos que se describen con propiedades medicinales. A continuación, se presentan las familias de plantas y determinadas especies utilizadas en este trabajo de investigación.

- **Familia Asteraceae**

Se la conoce también como la familia de las margaritas, de los girasoles o de los cardos. Son angiospermas, la mayoría de las especies son herbáceas mientras que las arbustivas son menos frecuentes. Se calcula que abarca unos 1600 géneros y más de 23.500 especies[82]. Se caracterizan por ser una fuente rica en fitoquímicos como alcaloides, cumarinas, flavonoides, benzofuranos, esteroles y terpenoides[83,84]. Presentan una amplia distribución geográfica y una gran plasticidad adaptativa, abarcando una amplia variedad de hábitats en regiones polares como tropicales pero son más abundantes en las regiones templadas y cálidas[85]. Poseen una gran importancia ecológica siendo las inflorescencias de esta familia atrayentes de una amplia variedad de polinizadores como por ejemplo, mariposas, abejas, moscas y escarabajos. Muchas especies tienen un valor económico como plantas alimenticias, aromáticas, ornamentales. Otras, poseen propiedades medicinales y son utilizadas para tratar una amplia variedad de dolencias como fiebre, diarrea, disentería, cólico intestinal, enfermedades respiratorias, trastornos gastrointestinales, problemas de la piel, así también, para tratar enfermedades crónicas como la diabetes y la hipertensión[86]. Existen reportes que indican que los extractos puros y metabolitos secundarios aislados, incluyendo aceites esenciales, pueden inhibir parásitos protozoarios tales como *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania amazoensis*[87], gusanos intestinales[88,89], *Trypanosoma cruzi*[90], *Trypanosoma brucei*[91].

Entre las asteraceas analizadas para este trabajo, se encuentran *Achillea millefolium* y *Baccharis trimera*.

☐ *Achillea millefolium*

Conocida comúnmente como Milenrama, es una de las 130 especies que tiene el género *Achillea* cuya clasificación taxonómica[92] puede verse en la **Tabla 2**. Son plantas aromáticas con flores perennes (**Figura 10**).

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *Achillea millefolium*

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Género: Achillea
Especie: *Achillea millefolium*

Investigaciones fitoquímicas de especies de *Achillea* han revelado que muchos componentes de este género son altamente bioactivos. Se encontraron flavonoides, terpenoides, lignanos, derivados de aminoácidos, ácidos grasos y alcamidas, estas últimas son responsables de las actividades insecticidas, antiinflamatorias y algunas inmunológicas de las *Achillea*. También producen aceites

esenciales que contienen monoterpenos y altos niveles de sesquiterpenos[93]. Se describe el uso de las hojas y flores tanto de forma interna como externa en la medicina tradicional para tratar una variedad de dolencias como fiebre, problemas de la piel, infecciones urinarias, transtornos menstruales, enfermedades gastrointestinales y respiratorias, cicatrizante, antiinflamatoria, antibacterial, antiviral, hipotensor, etc[94]. También se ha descrito actividad tripanocida de los aceites esenciales[95] y de los extractos puros de las partes aéreas de la planta[96]. Estos resultados motivaron nuestro análisis de la especie.



Figura 10: *Ejemplares de Achillea millefolium como modelo de observación. Se observan: en A y B, el porte de la planta (arbusto); y en C, la inflorescencia.*

☐ *Baccharis trimera*

Conocida comúnmente como Carqueja o Jaguarete ka´a (en Paraguay), es una de las 500 especies que pertenece al género *Baccharis*[97], cuya clasificación taxonómica se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Clasificación taxonómica *Baccharis trimera*.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Género: *Baccharis*
Especie: *Baccharis trimera*

Es una especie arbustiva perenne cuyas hojas están reducidas a brácteas. Las flores son blanquecinas en espigas[98] (**Figura 11**). En su composición fitoquímica se encuentran compuestos fenólicos, flavonoides y diterpenos como sus fitoconstituyentes principales[99]. Es conocida tradicionalmente por sus propiedades curativas frente a diferentes "males" o enfermedades, incluyendo enfermedades hepáticas, trastornos gastrointestinales, fiebre, dolor de cabeza, trastornos de la piel, infecciones y enfermedades respiratorias[100], pero también hay reportes de que posee propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, diuréticas y que tiene efecto

vermífugo[101]. También se ha utilizado para regular el azúcar en la sangre, y ha sido investigada por sus propiedades antitumorales y para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares[102]. Se han encontrado algunos antecedentes de esta especie vegetal donde se muestran sus propiedades antiparasitarias contra algunos protozoarios y gusanos intestinales lo que nos permitió prestar interés a esta especie para nuestros análisis en *T. cruzi.*



Figura 11: *Ejemplares de Baccharis trimera como modelo de observación. Se observan: en A, las hojas; en B, el porte de la planta (arbusto); y en C, las flores en espiga.*

- **Familia Moraceae**

La Moraceae, comúnmente conocida como la familia de las moras o la familia de los higos, es una familia de plantas con flores y frutos que comprende alrededor de 40 géneros y más de 1500 especies[103]. Pueden ser árboles o arbustos, con hojas perennes o caduciformes; raramente son hierbas. En su mayoría son plantas tropicales y subtropicales. Su distribución geográfica se extiende por varios continentes aunque la mayoría de los géneros están presentes al sur del continente Americano. Muchas especies leñosas son importantes componentes de los bosques lluviosos de Amazonas. En Centro América y el Caribe existe menor diversidad de esta familia[104]. Se ha detectado la presencia de taninos, flavonoides, glucósidos cardiotónicos, saponinas, sapogeninas, lactonas, cumarinas, esteroles e isoprenoides entre sus componentes químicos principales[105]. Los representantes de la familia Moraceae tienen gran importancia económica porque son utilizados comúnmente como frutos comestibles con altos valores nutricionales, siendo la mora y el higo los ejemplos más conocidos en esta región[106]. Los gusanos de seda son invertebrados que también se alimentan de algunas especies de esta familia, y la corteza de otras se utiliza para la fabricación de productos textiles y papel. Varios géneros también son muy apreciados por la calidad de su madera y por la producción de látex, mientras que otros son utilizados como ornamentales. En la medicina tradicional se utiliza en casos de mordeduras de serpientes, control de la diabetes, hipertensión, como antihelmíntica, antiparasitaria, antiinflamatorias[107], antifúngicos[108], también se citan propiedades de antioxidantes [109].

La Moraceae analizada en este trabajo es la conocida popularmente como Mamica de Cadela (*Brosimum gaudichaudii*) a quien se le ha atribuido propiedades antifúngicas y antiparasitarias en *T. cruzi*, para esta especie.

☐ *Brosimum gaudichaudii*

Mámica de Cadela, es una especie frutal, se presenta como un arbusto lechoso y pequeño (**Figura 12**), común en la zona del Cerrado del Brasil. Presenta pequeñas frutas comestibles ricas en nutrientes y propiedades fitoquímicas que la hacen interesante para las industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias. Pertenece al género *Brosimun* y su clasificación taxonómica[110] se muestra en la (**Tabla 4**).

Tabla 4: Clasificación taxonómica de *Brosimum gaudichaudii*

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Rosales
Familia: Moraceae
Género: *Brosimum*
Especie: *B. gaudichaudii*

Flavonoides, cumarinas, arilbenzofuranos, terpenoides, estilbenos, xantonas y ésteres son

algunos compuestos presente en las raíces, corteza y fruto verde[111]. Esta especie es conocida por su uso popular principalmente en el tratamiento de vitíligo y otras enfermedades que causan despigmentación. También se describe su uso contra la bronquitis, discromías, la gripe, la mala circulación, úlcera de estómago, resfriados y varias otras enfermedades[110]. Se han atribuido propiedades antifúngicas al extracto etanólico de la corteza del tallo de *B. gaudichaudii* en *Candida albicans* y *Candida sp*[112] , aunque se desconoce el compuesto que interviene en la actividad. Existen reportes sobre la actividad tripanocida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *B. gaudichaudii* mostrando resultados alentadores en análisis *in vivo* en ratones infectados con el estadio tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*[113].

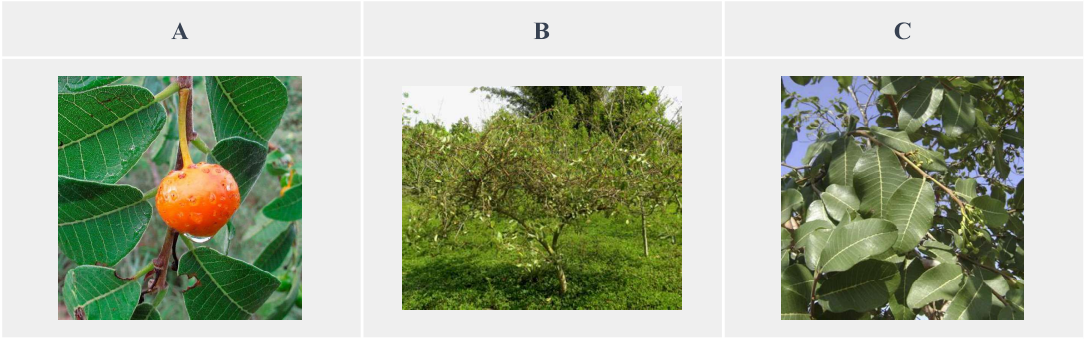


Figura 12: *Ejemplares de Brosimum gaudichaudii como modelo de observación. Se observan: en A, el fruto; en B, el porte de la planta (arbusto); y en C, la inflorescencia.*

- **Familia Aristolochiaceae**

La familia Aristolochiaceae está representada por el género *Aristolochia*, con aproximadamente 550 especies. Las especies de aristolochia son hierbas perennes, subarbustos o arbustos, a menudo escandentes, trepadoras, a veces lianas, generalmente con rizomas o raíces tuberosas o rastreras[114]. La distribución global de aristolochia incluye las franjas tropicales, subtropicales y templadas de todos los continentes, aunque se estima que el 75% de las especies se encuentra en las Américas[115]. Sus usos más comunes son en la ornamentación y en la medicina. En medicina tradicional, es utilizada como desinfectante y antiinflamatorio para curar granos y llagas de la piel, como analgésico para el dolor de muelas, así también para tratar dolores reumáticos, como purificador de la sangre, abortivo[116]. También se describen propiedades antiparasitarias, antibacterianas, neuroprotectoras, antiespasmódicas y algunas especies presentaron compuestos agonistas a opioides, por lo que podrían presentar funciones antiadictivas contra ciertas sustancias[117]. En cuanto a la composición química, la aristolochiaceae se caracteriza por presentar metabolitos secundarios del tipo ácidos y ésteres aristolóquicos, aristolactamas, aporfinas, protoberberinas, isoquinolinas, benzilisoquinolinas, amidas, flavonoides, lignanos, éteres de bifenilo, cumarinas, tetralonas, terpenoides (mono-, sesqui-, y diterpenoides), benzenoides, esteroides, y en sus hojas se encuentran aceites esenciales[118]. La presencia del ácido aristolóquico es muy frecuente en muchas especies de *Aristolochia* y se ha demostrado que son nefrotóxicos, carcinogénicos y mutagénicos[119]. También se ha descrito que en Nigeria, las raíces y las semillas de algunas especies de aristolochia son ricas en taninos y alcaloides y eran utilizadas para tratar la malaria, enfermedades de la piel, disentería, cólicos, mordeduras de serpientes y como adyuvante[120].

En este trabajo se analizará la especie *Aristolochia triangularis*, conocida comúnmente como Ysypo mil hombre[118].

- ☐ *Aristolochia triangularis*

Su clasificación taxonómica[121] se muestra en la **Tabla 5**. Es una especie de planta con flores, trepadora (enredadera), perenne (**Figura 13**).

Tabla 5: Clasificación taxonómica de *Aristolochia triangularis*

Reino: Plantae
División: Fanerógama Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Piperales
Familia: Aristolochiaceae
Género: Aristolochia
Especie: *A. triangularis*

Es muy utilizada en la ornamentación y en la medicina tradicional en Sudamérica, especialmente en Brasil y Argentina[117]. Los preparados que contienen hojas y/o tallos se utilizan

tradicionalmente como antiinflamatorios, diuréticos y como antídoto contra las mordeduras de serpientes[122]. En Brasil es muy utilizada para el control de la diabetes por poseer propiedades hipoglucemiantes debido a la presencia de lignoides, alcaloides y flavonoides glucosilados[123]. La infusión de flores es bebida por las parturientas antes de dar a luz, ya que contiene ácido aristolóquico, un vasodilatador que, probablemente favorece la dilatación uterina. Además, se usa como abortivo[124]. Contiene resinas, taninos, saponinas, fitoserina, aceites esenciales, peroxidasa y aristoloquina, cuyo extracto, en dosis elevadas, produce la llamada "embriaguez aristolóquica", cuyos síntomas son vómitos, náuseas, pulso acelerado, sueño agitado y perturbaciones cerebrales[125]. Se han descripto análisis de la actividad biológica de los extractos, fracciones y compuestos aislados de las hojas y tallos de *A. tringularis* encontrándose reportes de: sobre líneas celulares de cáncer de pulmón humano con resultados prometedores (CC50: 2.93 µg/mL). Además se detectó una actividad antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus* con la fracción de cloroformo obtenida de las hojas mientras que esta misma fracción mostró resultados prometedores contra *Leishmania amazonensis*, aunque no se pudo identificar, dentro de la fracción, al compuesto puro responsable de la actividad. Estos estudios motivaron nuestro análisis a esta especie vegetal[126].

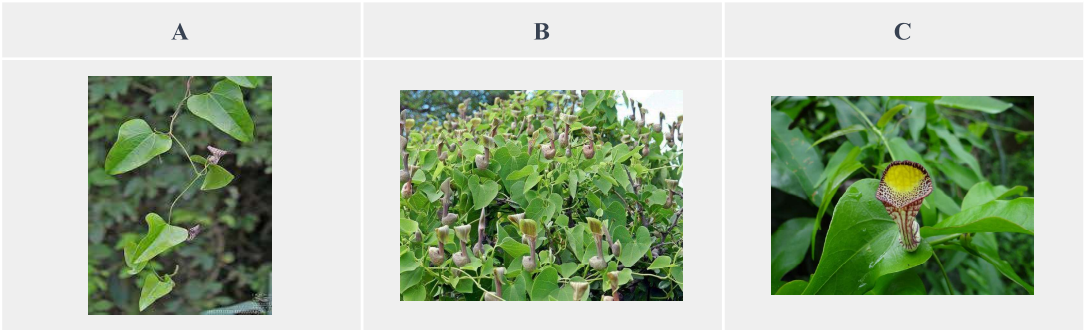


Figura 13: *Ejemplares de Aristolochia triangularis como modelo de observación. Se observan: en A y B, el porte de la planta (enredadera); y en C, las flores.*

- **Familia Bignoniaceae**

Esta familia comprende alrededor de 120 géneros y 800 especies distribuidas en regiones tropicales y subtropicales, centrada en el norte de América del Sur, aunque también existen muchas especies en África y Asia[127]. Sus representantes presentan porte de árboles, arbustos, trepadoras y lianas, con flores muy vistosas, generalmente en inflorescencias. El fruto se presenta en forma de cápsulas y algunas veces en forma de baya. Varios géneros incluyen especies de importancia hortícola en regiones tropicales y templadas, incluyendo Bignonia, Campsis, Catalpa, Jacaranda, Spathodea y Tabebuia. También son muy apreciadas por sus usos para la producción de madera, con fines ornamentales y fines medicinales. En medicina tradicional se utiliza como agente antimicrobiano, contra la diabetes, para aliviar el dolor estomacal, como antiinflamatorio y cicatrización de heridas[128]. Las especies pertenecientes a esta familia han sido ampliamente estudiadas en cuanto a sus propiedades farmacológicas (como extractos y compuestos aislados). En su interior se encuentran compuestos terpenoides, naftoquininas, alcaloides, flavonoides, esteroles, fenoles, hidrocarburos aromáticos, aminas, taninos, aceites de semillas etc. También se ha estudiado al compuesto Lapachol y a sus derivados y se encontró que tienen actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antifúngica, antivirale y anticancerígena. Recientemente se ha descrito que presentan actividad significativa como potencial agente antimalárico, tripanocida y anti-leishmania[129]. Los iridoides (monoterpeno), son compuestos presentes en estas especies vegetales que tienen propiedades de repelente contra insectos[130], por lo que son buenos candidatos para el desarrollo de pesticidas, y también son estimulantes de la oviposición y la alimentación para las especies de animales especializadas en la captación del alimento[131].

En este trabajo analizamos la especie *Jacarandá caroba*, conocida popularmente como Karoba.

☐ *Jacarandá caroba*

El género Jacarandá contiene 49 especies en todo el mundo. En la **Tabla 6**, se muestra la clasificación taxonómica de la especie.[132]

Tabla 6: Clasificación taxonómica de *Jacaranda caroba*
Reino: Plantae **División:** Magnoliophyta **Clase:** Magnoliopsida **Orden:** Lamiales **Familia:** Bignoniaceae **Género:** *Jacaranda* **Especie:** *Jacaranda caroba*

El género está representado por árboles de gran tamaño con flores vistosas de color violeta, la

madera, de color gris blanquecino a rosa claro, es ligera, lisa, algo porosa, bastante frágil y de escasa durabilidad por lo que su valor comercial es debido a la utilización como combustible y carbón (**Figura 14**). También es muy utilizado con fines ornamentales debido a las flores coloridas que presentan[133]. En Sudamérica, el representante más utilizado es el *Jacaranda caroba*. Esta especie es utilizada en la medicina popular como tratamiento para la sífilis y la fatiga mental. La corteza amarga es utilizada en infusiones y tiene propiedades astringente, catártica y diurética[134]. Las hojas son tónicas y también se utilizan en el tratamiento de diversos problemas de la piel. También hay reportes de su uso para el tratamiento de uretritis, reumatismo y enfermedades causadas por protozoos[135]. La composición química de está especie está representada por terpenos, flavonoides, cumarinas[136]. Jacaranona, es uno de los constituyentes químicos más importante de esta especie, ya que existen reportes de su actividad anticancerígena[137]. Existen reportes de actividad leishmanicida *in vitro* para extractos puros de partes aéreas y corteza de *J. caroba,* lo que motivó nuestro análisis de la especie[138,139].



Figura 14: *Ejemplares de Jacaranda caroba como modelo de observación. Se observan: en A la inflorescencia; en B, el fruto; y en C, el porte de la planta (árbol).*

- **Familia Rutaceae**

Esta familia es comúnmente conocida como la familia de los cítricos. La naranja, el limón, el pomelo son los típicos representantes. Presenta 161 géneros y 1815 especies, con una distribución cosmopolita en casi toda América, Europa y África. Son plantas con flores y las distintas especies tienen porte de árboles, arbustos o sub-arbustos, lianas o hierbas. Los frutos son bayas, drupas, hesperidios o sámaras[140]. Tienen un alto valor económico ya que son especies utilizadas como comestibles, madera, ornamentales, en cosmética, entre otros. En la medicina popular se utiliza para el tratamiento de fiebre, hipertensión, gastritis, gingivitis, esquistosomiasis, diarrea, cáncer, úlcera, dolor de riñón, esterilidad, gonorrea, laxante, enfermedades infecciosas, etc. Además se describen propiedades antimicrobianas y antifúngicas de los extractos de sus hojas y corteza[141]. En cuanto a su composición química, se han reportado la presencia de alcaloides del tipo acridinas y quinolinas; flavonoides, cumarinas, fitotoxinas y terpenos[142].

En este trabajo analizamos las especies *Helietta apiculata y Balfourodendron riedelianum.*

☐ *Helietta apiculata*

Es conocida comúnmente como Canela de Venado en Argentina y como Yvyra ovi en Paraguay. Es un árbol nativo de América del Sur que se distribuye naturalmente en Brasil, Paraguay, y Argentina. En la **Tabla 7**, se muestra la clasificación taxonómica de la especie[143].

Tabla 7: Clasificación taxonómica de *Helietta apiculata*
Reino: Plantae **División:** Tracheophyta **Clase:** Magnoliopsida **Orden:** Sapindales **Familia:** Rutaceae **Género:** *Helietta* **Especie:** *Helietta apiculata*

Es una especie arbórea, de gran valor económico por el uso de la madera en construcción, como leña y carbón. También es utilizado como árbol ornamental. En la medicina tradicional, la corteza es conocida como afrodisíaca, y es utilizada para tratar lesiones cutáneas y enfermedades inflamatorias[144] (**Figura 15**). Se describe la presencia de alcaloides furoquinolínicos y cumarinas en sus hojas y corteza, y que son moderadamente activos contra las formas promastigotes de algunas especies de *Leishmania* con valores de IC50 en el rango entre 17 y >50 µg/mL[145]. Existen estudios donde se probaron extractos puros de la corteza en ratones infectados con *T. cruzi*, y expresaron su posible efecto tripanocida[146]. Así también, otros estudios nombran a la maculina como un compuesto presente en esta especie y con potencial efecto antiparasitario[147].

A	B	C
		

Figura 15: *Ejemplares de Helietta apiculata como modelo de observación. Se observan: en A, las hojas; en B, el porte de la planta (árbol); y en C, la inflorescencia.*

☐ *Balfourodendron riedelianum*

Popularmente es llamado Guatambú blanco. Su clasificación taxonómica[148] se muestra en la **Tabla 8**.

Tabla 8: Clasificación taxonómica de *Balfourodendron riedelianum*
Reino: Plantae **División:** Fanerógama Magnoliophyta **Clase:** Magnoliopsida **Orden:** Sapindales **Familia:** Rutaceae **Género:** *Balfourodendron* **Especie:** *B. riedelianum*

El guatambú es una especie importante del bosque alto. Es un árbol de gran porte, pudiendo alcanzar los 25 metros de altura y diámetro superiores a los 90 centímetros en estado natural. Posee follaje siempre verde, sus frutos son secos, denominados sámaras tetraladas (**Figura 16**). Su regeneración natural en el bosque es abundante. No tolera sequía, necesita de ambientes húmedos y cálidos para existir[149]. Su madera es muy apreciada porque se utiliza en construcción para la elaboración de pisos, en la fabricación de muebles, puertas, leña. También es utilizada para la arborización de parques, jardines, recomposición de vegetación y la recuperación de áreas degradadas, y en medicina tradicional. En sus hojas y corteza se describe la presencia de alcaloides, terpenos, flavonoides y cumarinas con posibles actividades inhibitorias que evitan la adhesión de moluscos marinos a estructuras sólidas[150]. Dos de sus alcaloides furoquinolinicos, la kokusaginina y la flindersiamina, son reportados como inhibidores del proceso de fotosíntesis de la espinaca[151], así también se describieron actividad antimicrobiana y antimalárica[152] para dichos compuestos.



Figura 16: *Ejemplares de Balfourodendron riedelianum como modelo de observación. Se observan: en A, las hojas; en B, el porte de la planta (árbol), y en C, la inflorescencia.*

1.3. Técnicas moleculares y colorimétricas para la determinación de viabilidad celular, y rastreo de compuestos con potencial actividad tripanocida.

- **Proteína verde fluorescente**

La proteína verde fluorescente, GFP (Green Fluorescent Protein) por sus siglas en inglés, es producida por la medusa *Aequorea victoria*. En su estructura están presentes 238 aminoácidos, está formada por 11 cadenas beta que se disponen en un cilindro cuyo centro está ocupado por una cadena hélice alfa (**Figura 17**). Esta hélice alfa contiene un cromóforo que cuando la luz UV o luz azul impacta sobre él toma la energía de la luz y se excita, emitiendo luz fluorescente en otra longitud de onda sin necesidad de aditivos[153].

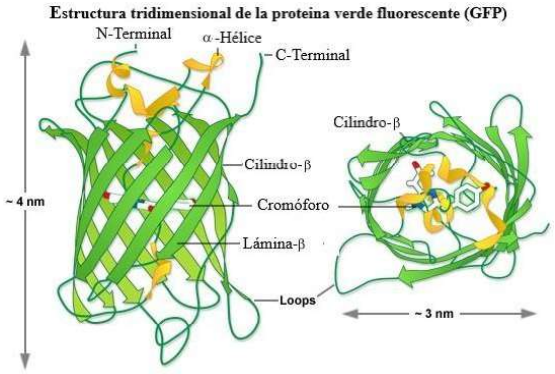


Figura 17: *Estructura tridimensional de la proteína verde fluorescente (GFP)*[154]

El gen que codifica esta proteína fue clonado en 1992 y expresado con éxito en *E. coli* y *C. elegans*, y a partir de ahí en distintos organismos celulares como protozoarios, bacterias, hongos, plantas, animales así como también en cultivos celulares[155,156]. Es una herramienta ampliamente utilizada en la investigación biológica. En biología celular y molecular es muy utilizada para el marcado y seguimiento de células *in vivo*, localización de proteínas en células vivas[154], como gen reportero para análisis de la expresión génica, para estudiar interacciones proteína-proteína y formación de complejos proteicos[155], en monitoreo ambiental como un biosensor de toxinas[156] y como indicador de viabilidad celular en ensayos de citotoxicidad[160]. En general, GFP ha revolucionado la manera en que los investigadores estudian los sistemas biológicos, proporcionando una herramienta de imagen en tiempo real y no invasiva para una amplia gama de aplicaciones. En *Trypanosoma cruzi,* se ha reportado su aplicación en análisis in *vitro* como un método de expresión diferencial de proteínas en los diferentes estadios del protozoario[161], cuantificación del parásito para establecer dosis inhibitorias de compuestos antiparasitarios[162], entre otros. Así también, en análisis *in vivo* se ha reportado su utilidad para estudios de invasión celular y monitoreo de la parasitemia.

- **Señal de la β-galactosidasa**

La β-galactosidasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de un enlace beta-glucosídico en disacáridos y oligosacáridos que contienen una unidad de galactosa en su estructura. Esta actividad se inicia con la unión de la enzima a su sustrato, lo que induce un cambio conformacional en la proteína que permite la hidrólisis del enlace beta-glucosídico. El agua actúa como nucleófilo y ataca al carbono anomérico de la galactosa, lo que da lugar a la liberación de glucosa y galactosa libres (**Figura 18**). Este proceso se ve facilitado por la presencia de residuos de aminoácidos específicos en el sitio activo de la enzima, que estabilizan los intermediarios de la reacción y aceleran la hidrólisis del enlace glicosídico[163].

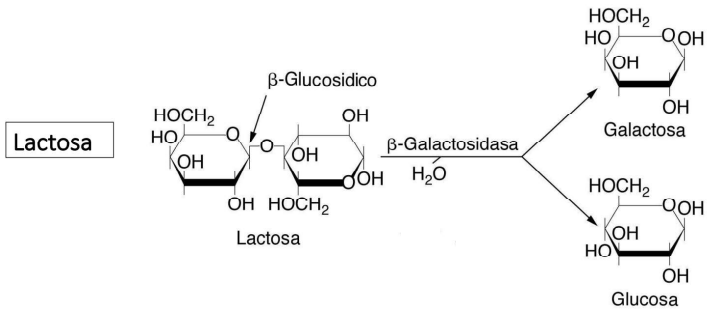


Figura 18: *Esquema de la reacción catalizada por la β-galactosidasa sobre el sustrato natural Lactosa.*

Su utilidad en biología molecular se descubrió en 1950, cuando el bioquímico francés Jacques Monod y sus colegas, comenzaron a investigar el metabolismo de la lactosa en *E. coli.* Descubrieron que las bacterias pueden producir diferentes enzimas para descomponer los azúcares, pero que la producción de estas enzimas está regulada por la presencia de determinados azúcares. En 1961 se propuso "el modelo del operón" para sostener la hipótesis de la existencia de represores capaces de unirse a operadores, en la secuencia del ADN, que controlan la síntesis del ARNm de las enzimas en cuestión. A partir de ese momento surge el concepto de lo que hoy se conoce como el operón lactosa (Operón Lac)[164,165]. La secuencia del Operón Lac puede ser insertada en la secuencia de ADN de distintos organismos modelo, y su presencia y actividad puede ser medida utilizando diferentes sustratos. En general, la señal de la actividad enzimática de la β-galactosidasa es una herramienta de detección y cuantificación, versátil y ampliamente utilizada que permite estudiar diferentes aspectos de la expresión génica y la función celular.[166,167] También se puede utilizar como una herramienta para analizar la viabilidad celular mediante la detección de su actividad en células vivas o la liberación de la enzima en el medio extracelular en células dañadas o muertas. Existen reportes bibliográficos sobre el comienzo del uso de esta técnica en parásitos de *T. cruzi* que expresaban el gen de la β-galactosidasa y que fueron utilizados para para determinar la actividad

antiparasitaria de diferentes fármacos de uso comercial (benznidazol, fluconazol y anfotericina B) mediante la reacción colorimétrica utilizando sustrato clorofenol rojo β-D-galactopiranosida (CPRG) con resultados exitosos[168,169].

Partiendo de este principio, decidimos utilizar epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* que expresaban el gen de la β-galactosidasa para medir su actividad con los sustratos cromogénicos, análogos de la lactosa, disponibles en el laboratorio (ONPG y X-GAL), de los cuales no se encontraron descripciones de su uso en *cruzi*, y se analizó su posible utilidad como un método rápido de screening de drogas. A continuación se describen a estos sustratos:

- ONPG (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranósido): Es un compuesto que se utiliza en medios de cultivos o soluciones líquidas. En contacto con la enzima β-galactosidasa se hidróliza en dos residuos, galactosa y o-nitrofenol (**Figura 19**), este último tiñe el medio de un intenso color amarillo lo que proporciona una evidencia visual de la ocurrencia de la reacción enzimática. Esta reacción puede ser medida por absorbancia a una longitud de onda de 420[170], y la señal puede traducirse como señal reportera y/o correlacionarse con concentraciones de interés. En biología molecular es comúnmente utilizada como un indicador de bacterias modificadas con el gen de la β-galactosidasa, y que expresan algún otro gen de interés[171]. También es muy requerido en las industrias de alimentos, ya que puede utilizarse para medir procesos de fermentación donde interviene la lactosa[172].

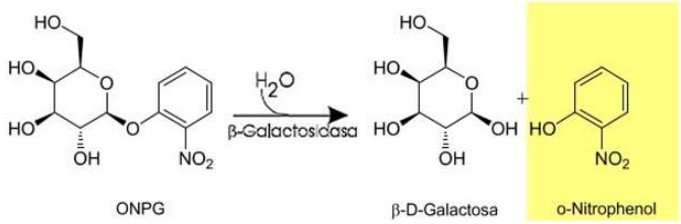


Figura 19: *Esquema de la reacción catalizada por la β-galactosidasa utilizando ONPG como sustrato.*

- X-GAL (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido): Al ser hidrolizado, produce un compuesto dimérico (indoxil) que en contacto con el aire se oxida y transforma en un precipitado insoluble de intenso color azul (**Figura 20**). Es utilizado como indicador de expresión de la β-galactosidasa en diferentes tipos de organismos cultivados en placas. Aquellas cultivos que estén expresando la enzima se tornarán de un color azul más o menos intenso en función de la cantidad de enzima que estén expresando[173]. Se puede obtener la concentración de β-galactosidasa en función de la intensidad del color azul, medida por absorbancia a 600 nm[174].

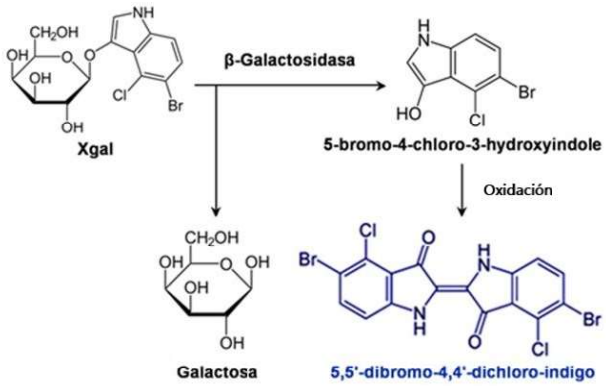


Figura 20: *Esquema de la reacción catalizada por la β-galactosidasa utilizando X-Gal como sustrato.*

El principal uso que se le da al análogo X-GAL es en la diferenciación de bacterias recombinantes que expresan el gen de la β-galactosidasa de las no recombinantes en experimentos de clonación, utilizando vectores que contienen el gen del péptido α-lacZ o lacZ. La inserción de ADN en la región lacZ resulta en la pérdida de actividad de la β-galactosidasa. Las células bacterianas que retienen la β-galactosidasa activa formarán colonias de color azul característico mientras que aquellas cuyo proceso fue interrumpido tendran como resultado colonias blancas[175]. También se citan usos de X-Gal como sustrato de la β-galactosidasa en ensayos inmunológicos e inmunohistoquímicos[176] y estudios de trasplantes neuronales[177], utilizando el mismo principio.

- **Reducción de la resazurina sódica**

Es una herramienta versátil y ampliamente utilizada en biología celular y molecular que permite evaluar la viabilidad celular, la actividad metabólica y la citotoxicidad de diferentes compuestos y sustancias[178]. La resazurina sódica o comercialmente llamado Alamar Blue®, es un compuesto químico de color azul no fluorescente que cuando se expone a las reductasas mitocondriales y citosolicas de células vivas y metabólicamente activas, se reduce al compuesto fluorescente de color rosa resorufina (**Figura 21**). Este compuesto puede utilizarse de forma cualitativa como un indicador de procesos celulares o bien de forma cuantitativa ya que la cantidad de resorufina puede monitorearse a través de su florescencia o absorbancia mediante un espectrofotómetro y estos valores se pueden utilizar como una medida indirecta de la actividad metabólica y la viabilidad celular[179].

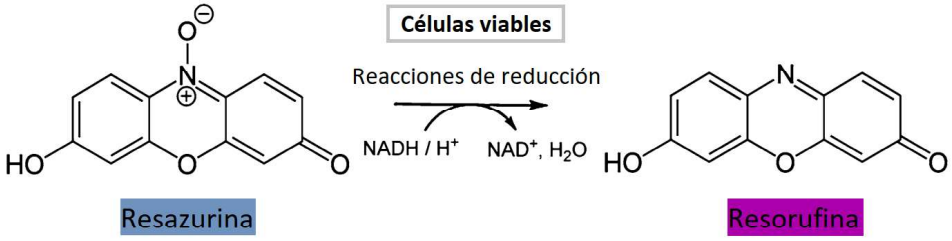


Figura 21: *Esquema del mecanismo de la reacción de la resazurina.*

Se describen usos para observar apoptosis, función y control del ciclo celular[180], proliferación celular de fibroblastos[181], líneas celulares inmortalizadas y cancerosas[182], ecotoxicología en cultivo primario de neuronas y varias líneas celulares de animales[183], pruebas de susceptibilidad fungicidas[184], antimicrobiana[185]. También se describe su uso en *T. cruzi* como un método cuantitativo para evaluar la citotoxicidad de compuestos contra el parásito protozoario[186,187].

2. Objetivos General y Específicos

El objetivo general de esta tesis fue la búsqueda de productos naturales o derivados, con actividad antiparasitaria como base para el desarrollo de nuevas drogas contra la enfermedad de Chagas.

Para ello se seleccionaron diferentes plantas utilizadas en la medicina tradicional para combatir determinadas dolencias y enfermedades, de las cuales se aislaron compuestos químicos que fueron evaluados en bioensayos. También se evaluaron derivados semi-sintéticos de algunos de ellos.

Para los bioensayos se utilizaron cultivos celulares y cultivos axénicos de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi.* Con algunos compuestos se analizó la actividad biológica sobre el estadio amastigote. La técnica colorimétrica de la Resazurina Sódica nos permitió medir la actividad biológica de los compuestos y derivados.

Para este trabajo se establecieron los siguientes objetivos específicos, que se presentan como capítulos, de la siguiente forma:

- ☐ **Capítulo I** Estandarización de ensayos biológicos, moleculares y colorimétricos para el desarrollo de un método eficiente de rastreo de drogas.

- ☐ **Capítulo II** Extracción, aislamiento e identificación de extractos puros y metabolitos secundarios provenientes de especies vegetales para la evaluación de su actividad biológica sobre cultivos axénicos de de epimastigotes de *T. cruzi*.

- ☐ **Capítulo III** Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiparasitaria de compuestos puros y semisintéticos aislados del Guatambú blanco.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Materiales biológicos

3.1.1.1. Parásitos

Trypanosoma cruzi

- **Cepa Y (TcII)**
  - Y-WT (Wild Type/Silvestre)

Se utilizaron epimastigotes silvestres para los ensayos de actividad de los productos naturales y compuestos. Se utilizaron tripomastigotes para los ensayos de invasión sobre cultivos celulares HeLa.

- Y-GFP (Green Fluorescent Protein)

Epimastigotes silvestres de la cepa Y fueron modificados genéticamente mediante la inserción del vector que expresa la proteína fluorescente GFP, fueron originados por el Dr. S. Schenkman y cedidas por la Dra. Patricia Romano. Se utilizaron epimastigotes para las pruebas de selección de técnicas moleculares y colorimétricas para el cribado farmacológico.

- Y-*β*-GAL (beta-galactosidasa)

Epimastigotes silvestres de la cepa Y fueron modificados genéticamente mediante la inserción del gen de la enzima β-galactosidasa (lacZ) de *Escherichia coli.* Se utilizaron epimastigotes para las pruebas de selección de técnicas moleculares y colorimétricas para el cribado farmacológico.

- **Cepa RA (TcVI)**

Se utilizaron tripomastigotes en cultivos axénicos para los ensayos de actividad biológica.

3.1.1.2. Líneas celulares

- **NRK** (Fibroblastos provenientes del riñón de rata)

Células utilizadas para ensayos de citotoxicidad.

- **HeLa** (Células humanas provenientes del cuello uterino - Henrietta Lacks)

Células utilizadas para ensayos de citotoxicidad e invasión de las formas tripomastigotes de *T. cruzi.*

- **VERO** (Células epiteliales provenientes del riñón de monos)

Utilizadas para la obtención y mantenimiento de las formas tripomastigotes de *T. cruzi*

3.1.1.3. Especies Vegetales

Las muestras vegetales fueron obtenidas de la selva misionera Argentina, en el partido de Oberá, provincia de Misiones. Se colectaron muestras en los predios de la "Fundación Bosques Nativos Argentinos para la Biodiversidad" con permiso del Instituto Misionero de Biodiversidad (IMBIO). A continuación se citan las especies analizadas:

- *Achillea millefolium* (Milenrama)
- *Baccharis trimera* (Carqueja blanca)
- *Brosimum gaudichaudii* (Mamica de Cadela)
- *Aristolochia triangularis* (Ysypo mil hombre)
- *Jacarandá caroba* (Karoba)
- *Helietta apiculata* (Canela de venado)
- *Balfourodendron riedelianum* (Guatambú blanco)

3.1.2. Fármacos antiparasitarios de referencia

- Benznidazol en tabletas de 50 mg (Laboratorio Elea, Argentina).
- Nifurtimox en tabletas de 120 mg (Laboratorio Bayer).

Las tabletas fueron pulverizadas y disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) puro. La concentración final de DMSO en los medios de cultivo nunca superó el 0,2% (v/v).

3.1.3. Medios de cultivo, Soluciones, Reactivos, Solventes

3.1.3.1. Medios de cultivo

- **Medio LIT** (Liver Infusion Tryptose)

Infusión de hígado…….	0.225 g
Triptosa…….	0.450 g
ClNa……..	0.360 g
Glucosa……..	0.180 g
KCl……	0.036 g
Na_2HPO_4……	0.284 g
SBFi……...	10 mL
Hemina (25 mg/mL).....	90 mL
Antibiótico…….	180 µL
(10.000 U penicilina/mL y 10.000 µg estreptomicina/mL)	
Agua destilada……...	90 mL

Se mezclaron todos los componentes, y se ajustó el pH a 7.4±2 con HCl 1N o NaOH 1N. Se esterilizó por filtración y se mantuvo en frío a 4°C.

- **Medio BHT** (Brain Heart trypsosa)

Heart infusion trypsosa……..	33.00 g
Triptosa……...	3.000 g
Na_2HPO_4……	4.000 g
KCl……	0.400 g
Glucosa……..	0.300 g
Hemina (25 mg/mL)……..	10 mL
SBFi……...	10 mL
Antibiótico…….	180 µL
(100 U penicilina/mL y 100 µg estreptomicina/mL)	
Agua destilada……...	990 mL

Se mezclaron todos los componentes, y se ajustó el pH a 7.4±2 con HCl 1N o NaOH 1N. Se esterilizó por filtración y se mantuvo en frío a 4°C.

- **Medio DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium completo**)**

Medio DMEM……...	1000 mL
Suero equino inactivado (30 min, 56 ºC).....	10%
SBFi……...	5%
$CaCl_2$ (25 mM).....	10%
L-Glutamina (200 mM).....	1%
Extracto embrionario de pollo……...	2%

Se ajustó el pH a 7,2. Se esterilizó por filtración y se conservó refrigerado a 4 ºC.

3.1.3.2. Soluciones

- **Solución de PBS** (solución salina fosfatada) **10X**

ClNa……..	8.000 g
PO_4HNa_2.....	1.210 g
PO_4H_2K…….	0.340 g
Agua destilada……...	1000 ml

Se mezclaron todos los componentes, y se ajustó el pH a 7.4±2 con HCl 1N o NaOH 1N. Se esterilizó por calor y se mantuvo en frío a 4°C.

- **Solución de Hemina**

Hemina (Sigma)……..	25 mg
NaOH (1N).....	1mL

Se mezclaron todos los componentes. Se esterilizó por filtración y se mantuvo en frío a 4°C en obscuridad.

- **Solución Azúl Tripan**

Azúl Tripan 0.4%…….. 10 mL

PBS 1X..... 90 mL

Se mezclaron todos los componentes. Se esterilizó por filtración y se mantuvo a temperatura ambiente.

- **Solución de resazurina 3mM**

Sal sódica Resazurina…… 0,00075 mg

PBS 1X pH 7,0..... 1 mL

Se mezclaron todos los componentes. Se esterilizó por filtración y se mantuvo en frío a 4°C en obscuridad.

- **Solución madre de X-gal (20 mg/mL)**

X-gal……. 1000 mg

DMSO..... 50 mL

Se mezclaron todos los componentes. Se esterilizó por filtración y se mantuvo en frío a 4°C.

- **Solución madre de ONPG (20 mg/mL)**

ONPG…… 1000 mg

Tampón de reacción..... 50 mL

Se mezclaron todos los componentes. Se esterilizó por filtración y se mantuvo en frío a 4°C.

- **Solución de Antibióticos**

Ampicilina (Ap). (Sal sódica; Roche). Se preparó una solución concentrada de 100 mg/mL en agua destilada, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 ºC. Se utilizaba a una concentración final de 50 o 100 µg/mL.

Estreptomicina (Sm). (Sulfato, Sigma). Se preparó una solución concentrada de 50 mg/mL en agua destilada, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 ºC. Se utilizaba a una concentración final de 50 µg/mL.

G418 (Sulfato; Gibco) Se preparó una solución concentrada de 50 mg/mL en agua destilada, se esterilizó por filtración y se guardó a – 20 ºC. Se utilizaba a una concentración final de 50 µg/mL.

- **Soluciones Comerciales**

- GlutaMAX™ 100X (Gibco)

Suplemento nutritivo de aminoácidos, utilizado en medios de cultivos celulares para mejorar el estado nutricional de células en suspensión o adherentes.

- Tripsina TripLE™ Express 1X (Gibco)

Solución de enzima recombinante que rompe enlaces peptídicos y disocian células adherentes entre sí y entre superficies.

3.1.3.3. Reactivos

- Dapi (Invitrogen) (4 ',6-diamidino-2-fenilindol). Marcador fluorescente que permite observar señal en microscopía de fluorescencia. Se adhiere a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de ADN. Utilizado en los ensayos de invasión para identificar a los parásitos que invadieron y replicaron en las células.
- FluorSaveTM (Calbiochem). Medio de montaje acuoso para su uso en conjunto con trazadores fluorescentes. Preserva secciones de tejido teñidas con fluorescencia. Utilizado para el montaje de los vidrios utilizados en los ensayos de invasión.

3.1.3.4. Solventes

Para las extracciones y purificaciones de los compuestos a partir de los extractos vegetales se utilizaron los solventes orgánicos más comunes en esta línea de trabajo como ser: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, metanol y etanol. Salvo éste último, todos fueron destilados previo a su uso. Para los espectros de resonancia magnética nuclear, se utilizó cloroformo deuterado (Sigma-Aldrich).

3.1.3.5. Fases estacionarias

Como fases estacionarias se utilizaron sílica gel de fase normal, sílica gel de fase reversa (C-18) y Sephadex LH-20.

3.2. Métodos

3.2.1. Obtención del Material vegetal

Las muestras de las especies analizadas fueron colectadas en la Provincia de Misiones, en una reserva de más de 650 hectáreas dentro de la selva misionera. Esta reserva pertenece a la organización "Fundación Bosques Nativos Argentinos para la Biodiversidad" (Argentina), quienes junto con el Dr. Jorge Palerno (Departamento de Química Orgánica-UYMFOR-FCEN-UBA-CONICET) tienen establecida una colaboración con el fin de obtener un estudio exhaustivo de la diversidad química de las especies vegetales que se encuentran en esa región como una estrategia alternativa para promover la conservación y recuperación del ecosistema. De las especies seleccionadas, se contaba con información etnobotánica ya que son utilizadas empíricamente por la población nativa y rural como plantas medicinales paliativas y/o curativas de infecciones, inflamaciones, dolores musculares, enfermedad de Chagas, entre otras afecciones. Las muestras fueron identificadas por el Sr. Javier Unisony, guardaparque de la reserva.

3.2.2. Extracción y Purificación de compuestos

3.2.2.1. Procedimiento general de obtención de los extractos etanólicos y subextractos polares y lipofílico

Las hojas, semillas, flores o corteza de las especies analizadas, fueron depositadas, por separado, en recipientes de vidrio con tapa a presión y embebidos totalmente con etanol. Cada preparado se dejó en reposo a temperatura ambiente para su maceración por un mínimo de 72 horas. Luego de un proceso de evaporación se obtuvo el extracto etanólico. Este extracto fue particionado entre ciclohexano y una mezcla de metanol:agua (9:1), y se obtuvieron así los subextractos polar y lipofílico. De acuerdo a la masa y al perfil de cada subextracto se utilizaron diversas técnicas cromatográficas para la obtención de las fracciones polares y lipofílicas. Estas fracciones fueron nuevamente sometidas a particiones y a cromatografía hasta obtener los productos aislados que finalmente fueron llevados a resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masa (EM) para identificarlos. En la **Figura 22**, se observa un esquema representativo del proceso de extracción de los productos obtenidos a partir del material vegetal disponible.

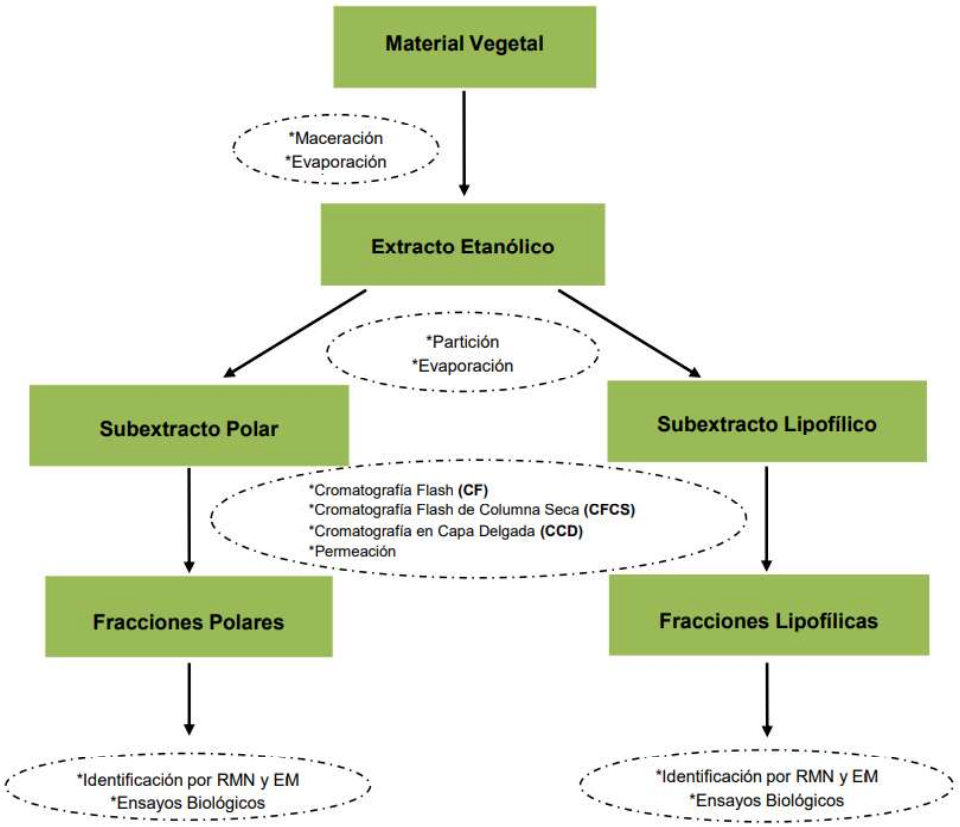


Figura 22: *Esquema representativo del proceso de extracción de metabolitos secundarios provenientes del material vegetal de interés.*

3.2.2.2. Identificación de los compuestos purificados de cada especie vegetal

Los compuestos puros previamente reportados se identificaron por resonancia magnética nuclear comparando con datos de bibliografía

- **Carqueja Blanca**

Acetato de articulina: ^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 1.82 (d, J = 14.1 Hz, 1H, H-1a), 1.40 (td, J = 14.1, 3.4 Hz, 1H, H-1b), 5.33 (m, 1H, H-2), 6.78 (d, J = 6.5 Hz, 1H, H-3), 1.99 (dt, J = 13.1, 3.1 Hz, 1H, H-6a), 1.32 (m, 1H, H-6b), 1.71 (m, 2H, H-7a, H-11a), 1.56 (m, 1H, H7b, H-11b), 1.70 (m, 1H, H-8), 2.18 (d, J = 12.1 Hz, 1H, H-10), 2.40 (tda, J =15.0, 13.3, 4.6 Hz, 1H, H-12a), 2.30 (tda, J = 16.3, 14.7, 4.0 Hz, 1H, H-12b), 5.85 (ta, J =1.55 Hz, 1H-H-14), 4.76 (dd, J = 17.3, 1.50 Hz, 1H, H-16a), 4.70 (dd, J = 17.3, 1.50 Hz, 1H, H-16b), 0.89 (d, J = 6.5 Hz, 3H, H-17), 4.32 (d, J = 8.2 Hz, 1H-H19a), 3.93 (dd, J = 8.2, 1.9 Hz, 1H-H-19b), 0.65 (s, 3H, H-20), 2.05 (s, 3H, $C\underline{H_3}CO$). ^{13}C RMN (125 MHz, Cl_3CD) δ = 24.9 (C-1), 66.5 (C-2), 128.3 (C-3), 144.1 (C-4), 45.5 (C-5), 34.0 (C-6), 27.6 (C-7), 36.5 (C-8), 38.0 (C-9), 40.4 (C-10), 34.8 (C-11), 21.5 (C-12), 169.6 (C-13), 115.6 (C-14), 173.5 (C-15), 72.8 (C-16), 15.5 (C-17), 168.2 (C-18), 70.6 (C-19), 17.6 (C-20), 169.9 ($CH_3\underline{C}O$), 20.9 ($\underline{C}H_3CO$).

^{1}H RMN (90 MHz, Cl_3CD) δ = 5.32 (J = 5.5 Hz, H-2), 6.76 (J = 6.5 Hz, H-3), 5.84 (J = 1.2 Hz, H-14), 4.74 (J = 1.6 Hz, H-16), 0.62 (H-17), 3.95-4.32 (J = 8.3 Hz, H-19), 0.89 (J = 5.5 Hz, H-20), 2.03 (CH_3CO)[188].

Gaudichaudiosido A: ^{1}H RMN (500 MHz, CD_3OD) δ= 1.40 (m, 1H, H-1a), 2.04 (d, J = 12.4 Hz, 1H, H-1b), 1.56 (m, 1H, H-2a), 1.71 (m, 1H, H-2b), 1.10 (m, 1H, H-3a), 1.59 (m, 1H, H-3b), 1.59 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H-5), 4.13 (td, J = 9.8, 5.6 Hz, 1H, H-6), 2.20 (dd, J = 17.7, 9.5 Hz, 1H, H-7a), 2.91 (dd, J = 17.8, 5.7 Hz, 1H, H-7b), 2.45 (td, J = 13.1, 4.4 Hz, 1H, H-11a), 2.87 (m, 1H, H-11b), 2.15 (m, 1H, H-12a), 2.32 (td, J = 13.4, 12.9, 4.1 Hz, 1H, H-12b), 5.41 (t, J = 6.8 Hz, 1H, H-14), 4.09 (d, J = 6.7 Hz, 2H, H-15), 1.72 (s, 3H, H-16), 10.0 (s, 1H, H-17), 1.28 (s, 3H, H-18), 3.54 (d, J = 11.9 Hz,1H-H-19a), 3.95 (d, J = 11.4 Hz, 1H, H-19b)1.23 (s, 3H, H-20), 4.30 (d, J = 7.3 Hz, 1H, H-1'), 3.62 (m, 1H, H-2'), 3.50 (dd, J = 9.1, 3.4 Hz, 1H- H-3'), 3.79 (sa, 1H, H-4'), 3.57 (m, 1H, H-5'a), 3.89 (dd, J = 12.6, 2.6 Hz, 1H, H-5'b). ^{13}C RMN (126 MHz, CD_3OD) δ = 37.6 (C-1), 19.4 (C-2), 39.8 (C-3), 40.2 (C-4), 57.4 (C-5), 80.5 (C-6), 35.5 (C-7), 131.7 (C-8), 168.5 (C-9), 45.0 (C-10), 26.3 (C-11), 44.2 (C-12), 138.6 (C-13), 125.8 (C-14), 59.3 (C-15), 16.3 (C-16), 194.1 (C-17), 32.2 (C-18), 67.9 (C-19), 21.5 (C-20), 106.5 (C-1'), 72.8 (C-2'), 75.0 (C-3´), 69.9 (C-4'), 67.1 (C-5').

^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD + 3 gotas de D_2O) δ 1.21 (s, 3H, H-20), 1.28 (s, 3H, H-18), 1.59 (d, 1H, J =10 Hz, H-5), 1.73 (s, 3H, H-16), 2.78 (dd, 1H, J = 16, 10 Hz, H-7α), 3.56 – 3. 63 (señales superpuestas, 2 H, H-5´a,19a), 3.90 (m, 1H, H-4'), 3.93-3.95 (señales superpuestas, 4H, H-2', 3', 5'b, 19b), 4.10 (d, 2H, J = 6 Hz, H-15), 4.19 (m, 1H, H-6), 4.35 (d, J = 6 Hz, 1H, H-1'), 5.41 (t, J = 6 Hz, 1H, H-14), 9.97 (s, 1H, H-17)[189].

- **Karoba**

Etiljacaranona: ^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 6.95 (d, 2H, J = 10.0 Hz, H-2,6), 6.20 (d, 2H, J = 10.0 Hz, H-3,5), 2.68 (s, 2H, H-7), 4.22 (c, J = 7.1 Hz, 2H, CH_2CH_3), 1.28 (t, J =7.1Hz, 3H, CH_2CH_3). ^{13}C RMN (126 MHz, Cl_3CD) δ= 67.6 (C-1), 149.0 (C-2,6), 128.5 (C-3,5), 185.1 (C-4), 43.5 (C-7), 171.3 (C-8), 61.8 (CH_2CH_3), 14.3 (CH_2CH_3).

^{1}H RMN (Cl_3CD) δ= 6.90 (d, J = 10 Hz, 2H, C-2, 6 H), 6.00 (d, J =10 Hz, 2H, C-3, 5 H), 2.67 (s, 2H, C-7H), 4.12 (q, J = 7 Hz, 2H C-9 H), 1.17 (t, J = 7 Hz, 3H, C-10 H), 4.65 (sa, 1H, OH). ^{13}C RMN (Cl_3CD) δ= 65.5 (s, C-1), 148.3 (d, C-2,6), 125.5 (d, C-3,5), 183.0 (s, C-4), 42.9 (t, C-7), 167.0 (s, C-8), 59.2 (t, C-9), 12.5 (q, C-10)[190].

- **Canela de venado**

Maculina: ^{1}H RMN (200 MHz, Cl_3CD) d= 7.57 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-2a), 7.03 (d, J = 2.8 Hz, 1H, H-3a), 7.52 (s, 1H, H-5), 7.30 (s, 1H, H-8), 6.09 (s, 2H, OCH_2O), 4.41 (s, 3H, OCH_3).

^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 7.56 (d, J = 2.4 Hz, H-C2a), 7.03 (d, J = 2.4 Hz, H-C3a), 7.46 (s, H-C5), 7.21 (s, H-C8), 6.07 (s, OCH_2O), 4.41 (s, OCH_3)[191].

p-cumarato de metilo: ^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 7.64 (d, J = 16.0 Hz, 1H, H-2), 6.30 (d, J = 16.0 Hz, 1H, H-3), 6.84 (d, J = 8.6 Hz, 2H, H-5,9), 7.43 (d, J = 8.5 Hz, 2H, H-6,8), 3.79 (s, 3H, OCH_3). ^{13}C RMN (126 MHz, Cl_3CD) δ= 168.1 (C-1), 144.7 (C-2), 115.5 (C-3), 127.5 (C-4), 116.0 (C-5,9), 130.2 (C-6,8), 157.7 (C-7), 51.9 (OCH_3)

^{1}H RMN (200 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.66 (d, J =16.0 Hz, 1H, H-2), 6.31 (d, J=16.0 Hz, 1H, H-3), 6.89 (d, J=8.6 Hz, 2H, H-5,9), 7.42 (d, J=8.6 Hz, 2H, H-6,8), 3.82 (s, 3H, $OC\underline{H}_3$). ^{13}C RMN (50 MHz, $CDCl_3$) δ = 168.7 (C-1), 145.3 (C-2), 115.9 (C-3), 126.6 (C-4), 115.9 (C-5,9), 130.1 (C-6,8), 158.3 (C-7), 51.9 ($O\underline{C}H_3$)[192].

Chalepina: ^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 7.48 (s, 1H, H-4), 7.19 (s, 1H, H-5), 6.71 (s, 1H, H-8), 6.16 (dd, J = 17.3, 10.7 Hz, 1H, H-10), 5.06-5.09 (señales superpuestas, 2H, H-11a,b), 1.47 (s, 6H, H-12,13), 3.12-3.27 (señales superpuestas, H-14a,b), 4.71 (dd, J = 9.3, 8.4 Hz, 1H, H-15), 1.36 (s, 3H, H-17), 1.23 (s, 3H, H-18). ^{13}C RMN (Cl_3CD, 126 MHz) δ= 160.5 (C-2), 131.1 (C-3), 138.2 (C-4), 113.3 (C-4a), 123.4 (C-5), 124.7 (C-6), 162.4 (C-7), 97.3 (C-8), 154.8 (C-8a), 40.50 (C-9), 145.8 (C-10), 112.3 (C-11), 26.3 (C-12,13,17), 29.8 (C-14), 91.1 (C-15), 71.9 (C-16), 24.4 (C-18).

^{1}H RMN data (600 MHz, Cl_3CD): δ 7.48 (s, 1H, H-4), δ 7.20 (s, 1H, H-5), δ 6.71 (s, 1H, H-8), δ 6.17 (dd, J = 18.00, 12.00 Hz, 1H, H-8), δ 5.09 (señales superpuestas, 2H, H-11a,b), δ 4.72 (dd, J = 12.00, 6.00 Hz, 1H, H-15), δ 3.21 (señales superpuestas, 2H, J = 18.00, 12.00, 6.00 Hz, H-14a,b), δ 1.47 (s, 6H, H-12,13), δ 1.37 (s, 3H, H-17), δ 1.23 (s, 3H, H-18). ^{13}C RMN (600 MHz, Cl_3CD) δ= 160.21 (C-2), 130.87 (C-3), 138.09 (C-4), 113.14 (C-4a), 123.26 (C-5), 124.58 (C-6), 162.25 (C-7), 97.14 (C-8), 154.64 (C-8a), 40.30 (C-9), 145.61 (C-10), δ 112.09 (C-11), 26.11 (C-12,13,17), 29.61 (C-14), 90.91 (C-15), 71.70 (C-16), 24.21 (C-18)[193].

Gravelliferona: ^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 7.55 (s, 1H, H-4), 7.17 (s, 1H, H-5), 7.02 (s, 1H, H-8), 6.16 (dd, J = 17.3, 10.8 Hz, 1H, H-10), 5.08 (señales superpuestas, 2H, H-11a,b), 1.45 (s, 6H, H-12,13), 3.37 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-14), 5.32 (dddd, J = 7.3, 6.0, 2.8, 1.5 Hz, 2H, H-15), 1.75 (s, 3H, H-17), 1.79 (s, 3H, H-18). ^{13}C RMN (126 MHz, Cl_3CD) δ= 161.3 (C-2), 131.2 (C-3), 138.8 (C-4), 112.8 (C-4a), 128.3 (C-5), 125.5 (C-6), 157.7 (C-7), 102.6 (C-8), 153.4 (C-8a), 40.5 (C-9), 145.8 (C-10), 112.8 (C-11), 26.5 (C- 12,13), 18.6 (C-14), 121.5 (C-15), 134.9 (C-16), 26.0 (C-17), 18.0 (C-18).

^{1}H (300 MHz, Cl_3CD) δ= 7.54 (s, 1H, H-4), 7.19 (s, 1H, H-5), 6.94 (s, 1H, H-8), 6.18 (dd, J = 10.8, 16.8 Hz, 1H, H-10), 5.08 (m, 2H, H-11a,b), 1.45 (s, 6H, H-12,13), 3.39 (d, J = 7.2 Hz, 2H, H-14), 5.32 (t, 2H, H-15), 1.78 (3H, s, H-17), 1.81 (s, 3H, H-18)[194].

Uliscomoncadin A: ^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 7.47 (s, 1H, H-4), 7.16 (s, 1H, H-5), 6.75 (s, 1H, H-8), 6.16 (dd, J = 17.4, 10.7 Hz, 1H, H-10), 5.09 (señales superpuestas, 2H, H-11a,b), 1.48 (s, 6H, H-12,13), 3.10 (ddd, J = 16.6, 5.3, 1.1 Hz, 1H, H-14a), 2.82 (dd, J = 16.7, 5.3 Hz, 1H, H-14b), 3.86 (q, J = 5.3 Hz, 1H, H-15), 1.35 (s, 3H, H-17), 1.37 (s, 3H, H-18). ^{13}C RMN (126 MHz, Cl_3CD) δ= 160.3 (C-2), 132.1 (C-3), 137.6 (C-4), 113.6 (C-4a), 128.9 (C-5), 116.2 (C-6), 155.6 (C-7), 104.1 (C-8), 153.5 (C-8a), 40.6 (C-9), 145.6 (C-10), 112.3 (C-11), 26.3 (C-12,13), 30.9 (C-14), 69.5 (C-15), 78.1 (C-16), 25.1 (C-17), 22.2 (C-18).

^{13}C RMN (100 MHz, Cl_3CD): 160.0 (C-2), 132.1 (C-3), 137.4 (C-4), 113.4 (C-4a), 128.7 (C-5), 116.0 (C-6), 155.5 (C-7), 103.9 (C-8), 153.3 (C-8a), 40.4 (C-9), 145.6 (C-10), 112.1 (C-11), 26.2 (C-12,13), 30.8 (C-14), 69.3 (C-15), 77.9 (C-16), 24.9 (C-17), 21.8 (C-18)[195].

Rutacultina ^{1}H RMN (200 MHz, Cl_3CD) δ= 7.51 (s, 1H, H-4), 6.85 (s, 1H, H-5), 6.81 (s, 1H, H-8), 6.20 (m, 1H, H-10), 5.09 (señales superpuestas, 2H, H-11a,b), 1.48 (s, 6H, H-12,13), 3.93 (s, $OC\underline{H}_3$), 3.91 (s, $OC\underline{H}_3$).

^{1}H RMN (Cl_3CD) δ= 7.49 (H-4), 6.85 (H-5), 6.81 (H-8), 6.20 (c, H-10), 5.06 y 5.04 (señales superpuestas, 2H, H-11a,b), 1.50 (s, 6H, H-12,13), 3.92 (s, OCH_3), 3.89 (s, OCH_3)[196].

4-O-prenil cinamato de metilo: ^{1}H RMN (200 MHz, Cl_3CD) δ= 6.91 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-4,6), 7.46 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, H-3,7), 4.54 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H, H-8), 5.48 (m, 1H, H-9), 1.75 (s, 3H, H-11), 1.80 (s, 3H, H-12), 3.79 (s, 3H, OCH_3).

^{1}H RMN (300 MHz, Cl_3CD) δ= 6.89–6.95 (m, 2H, H-4,6), 7.96–8.01 (m, 2H, H-3,7), 4.56 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-8), 5.48 (tt, *J* = 1.5, 6.9 Hz, 1H, H-9), 1.76 (s, 3H), 1.81 (s, 3H), 3.88 (s, 3H, OCH_3)[197].

Lupeol: ^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 3.19 (dd, *J* = 11.4, 4.9 Hz, 1H, H-3), 2.38 (td, *J* = 11.1, 5.8 Hz, 1H, H-19), 1.92 (dtd, *J* = 13.7, 10.4, 8.3 Hz, 1H, H-21b), 0.97 (2, 3H, H-23), 0.76 (s, 3H, H-24), 0.83 (s, 3H, H-25), 1.03 (s, 3H, H-26), 0.94 (s, 3H, H-27), 0.79 (s, 3H, H-28), 4.57 (dd, *J* = 2.5, 1.4 Hz, 1H, H-29a), 4.69 (dt, *J* = 2.5, 0.7 Hz, 1H, H-29b), 1.60 (señal superpuesta, H-30).

^{1}H RMN (200 MHz, Cl_3CD) δ= 4.57 (s, H-29a), 4.68(s, H-29b), 3.21 (dd, *J* = 2.0; 6.0 Hz, H-3), 1.68, 1.00, 0.97, 0.95, 0.83, 0.79, 0.76 (21 H, 7 s, 7 CH3)[198].

δ-amirina: ^{1}H RMN (500 MHz, Cl_3CD) δ= 3.23 (dd, *J* = 11.4, 4.9 Hz, 1H, H-3), 0.76 (s, 3H, H-23), 0.99 (s, 3H, H-24), 0.85 (s, 6H, H-25,26), 1.16 (s, 3H, H-27), 1.01 (s, 3H, H-28), 0.70 (s, 3H, H-29), 0.93 (s, 3H, H-30). ^{13}C RMN (126 MHz, Cl_3CD) 79.7 (C-3), 134.6 (C-13), 133.4 (C-18), 15.7 (C-23), 28.3 (C-24), 16.6 (C-25), 17.9 (C-26), 21.5 (C-27), 24.0 (C-28), 24.3 (C-29), 32.5 (C-30).

^{1}H NMR (400, Cl_3CD) δ= 0.68, 0.75, 0.91, 0.97, 1.00, 1.14 (cada uno 3H, s), 0.83 (6H, s), 3.21 (1H, m) ^{13}C RMN (100 MHz, Cl_3CD) δ= 79.0 (C-3), 134.3 (C-13), 133.1 (C-14), 17.7 (C-23), 28.1 (C-24), 15.5 (C-25), 16.4 (C-26), 21.4 (C-27), 24.1 (C-28), 23.8 (C-29), 32.4 (C-30)[199].

Isobauerenol+isomultiflorenol: ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ= 134.46, 134.17, 79.02, 76.59, 52.37, 50.70, 50.50, 44.11, 41.10, 38.83, 38.23, 37.80, 37.54, 37.28, 36.79, 36.71, 35.96, 35.05, 34.55, 34.38, 34.19, 33.14, 32.98, 31.92, 31.78, 31.50, 30.68, 29.65, 29.11, 28.06, 28.03, 27.93, 27.50, 27.44, 26.24, 25.24, 25.19, 24.68, 22.45, 22.19, 20.81, 20.56, 19.89, 19.83, 19.24, 19.17, 18.98, 15.74, 15.61, 15.56.

^{13}C (100 MHz, CDCl3) δ= 15.67, 18.94, 19.22, 19.83, 19.91, 20.56, 20.82, 22.15, 22.42, 24.77, 25.20, 25.31, 26.36, 27.46, 27.51, 28.04, 29.19, 29.68, 30.74, 31.50, 31.82, 31.98, 34.19, 34.39, 34.50, 35.12, 36.02, 36.71, 36.90, 37.36, 37.59, 37.66, 37.85, 38.22, 38.27, 38.84, 41.01, 41.14, 44.15, 50.58, 50.79, 52.50, 79.04, 133.59, 134.27, 134.51, 135.16[200].

3.2.3. Obtención de compuestos semisintéticos

De la especie *Helietta apiculata* (Canela de venado), se obtuvo el compuesto *uliscomoncadina A,* este fue sometido a un proceso de reacciones químicas a fin de obtener los derivados semisintéticos 1 y 2, (**Figura 23**), para ello se procedió de la siguiente manera:

Derivado 1: En un balón de reacción provisto con un septum, se preparó una solución de la cumarina *uliscomoncadin A* en diclorometano anhidro bajo atmósfera inerte. Seguidamente, se agregaron 1.2 equivalentes de ácido m-Cl perbenzoico a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar por 8 horas. Pasado este tiempo se diluyó el crudo de reacción con diclorometano y se extrajo con una solución de carbonato de sodio al 10%. La fase orgánica se lavó con agua y se secó con sulfato de sodio anhidro. Luego de filtrar se evaporó el solvente orgánico en el rotavapor y se purificó el crudo de reacción mediante cromatografía en capa delgada preparativa (R=30%).

Derivado 2: Se trató la cumarina *uliscomoncadin A* con una solución de hidruro de litio y aluminio en tetrahidrofurano anhidro. El agregado se realizó bajo atmósfera inerte y baño de hielo con sal. Se mantuvo en agitación por cuatro horas y pasado ese tiempo se agregó el crudo de reacción lentamente y de a gotas a un vaso con hielo y ácido clorhídrico diluído. Esta mezcla se extrajo con diclorometano. La fase orgánica se lavó con agua, se secó con sulfato de sodio anhidro y luego de filtrar se evaporó en el rotavapor. Se purificó mediante cromatografía en capa delgada preparativa (R=20%).

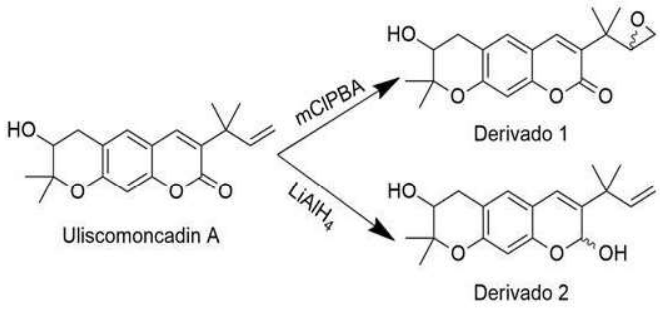


Figura 23: Esquema de obtención de los derivados 1 y 2 del compuesto *uliscomoncadin A*

Por otro lado, de los compuestos puros *kokusaginina y flindersiamina* (**Figura 48**), extraídos a partir de la corteza de *Balfourodendron riedelianum* (Guatambú blanco) también se obtuvieron derivados semisintéticos, y posteriormente se probó su actividad sobre distintos estadios de *T. cruzi* y sobre líneas celulares. Para ello, los compuestos puros fueron bromados en el anillo quinolínico siguiendo el procedimiento de Yajima y Mukanata[201]. Para la obtención de las anilinas secundarias y terciarias, los alcaloides bromados se homogeneizaron en un balón de reacción cónico junto a $Pd(AcO)_2$ (10 %mol), DPEphos (20%mol) y K_3PO_4 (2.5 eq.) en atmósfera inerte (argón) (**Figura 24**). Luego, se agregaron las diferentes anilinas recién destiladas como sustituyentes (**Figura 49**). La

mezcla se calentó a 100–120°C por 18 horas. La reacción se cortó por dilución de la mezcla de reacción con diclorometano y partición con agua. La fase orgánica se llevó a sequedad y los productos de reacción se purificaron mediante cromatografía en columna flash. Los derivados fueron provistos por la Lic. Belén Valdez del grupo del Dr. Palermo (DQO-UMYMFOR-FCEN-UBA).

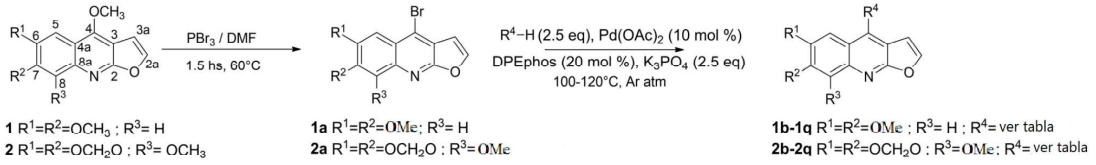


Figura 24: *Proceso de obtención de los derivados bromados y las anilinas.*

3.2.4. Mantenimiento de cultivos celulares

- Líneas celulares

Fibroblastos de riñón de rata (NRK, normal rat kidney; Sigma), células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa, Henrietta Lacks) y células VERO (línea celular proveniente de fibroblastos de mono) fueron inoculadas en el medio de cultivo DMEM con Glutamax™ (Gibco), suplementado con 10% SFB (Natocord), 100 µg/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina (Sigma), dentro de frascos T25 para cultivo celular (Falcon® 25cm²) con tapa de rosca. Posteriormente fueron incubadas a 37°C en atmósfera enriquecida con 5% CO_2. El mantenimiento del cultivo se realizó en serie, a través de repiques, cuando la monocapa de células alcanzaba una confluencia de aproximadamente 80%. Para levantar la monocapa celular de la superficie se lavó el frasco T25, con 5 ml de PBS 1X (pH 7,4) y se incubó con 500 µL de tripsina TripLE™ Express 1X (Gibco) durante 10 min. La actividad enzimática se interrumpió con 4,5 mL de medio de cultivo completo. Para el repique, se transfirió, a un frasco T25 nuevo, 500 µL del cultivo y se agregó medio de cultivo completo hasta alcanzar un volumen de 10 mL. Se repitió el repique cada 3 días. Los recuentos celulares se hicieron en cámara de Neubauer realizando una dilución de células 1:2 en Azul de Tripán (Sigma). Para la conservación de la línea celular, las células se mantuvieron congeladas en crioviales dentro de tanques de N_2 líquido. Previamente se centrifuga (1.000 rpm durante 5 minutos) y se resuspende el sedimento en 1 mL de SFB con DMSO al 10%.

- Epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Y y transgénicos

Formas epimastigotes de la cepa Y y transgénicos de *Trypanosoma cruzi* fueron incubados, en medio de cultivo LIT completo [suplementado con SFB 10% (Natocord), hemina bovina 0,002 %, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL] en frasco T25 para cultivo celular (Falcon® 25cm²) con tapa de rosca, en agitación a 28ºC, y mantenidos por pasajes en serie. Para los parásitos

transgénicos además, se adicionó la solución de antibiótico G418 a una concentración de 10 µg/mL. Cada cultivo partió de una concentración inicial de 10^6 epimastigotes/mL. El mantenimiento del cultivo se realizó a través de repiques cuando los parásitos alcanzaron la fase de crecimiento exponencial (aprox. 10^7células/mL).

- Tripomastigotes de *T. cruzi*, cepas RA/Y

Formas tripomastigotes de *T. cruzi* de las cepas RA e Y, fueron puestos en contacto con cultivos de la línea celular VERO para producir su infección, a los 6-7 días post infección se colectó el sobrenadante del cultivo, donde se encontraron nuevos parásitos en estadío tripomastigote, estos se purificaron por lavados y centrifugación. El ciclo se repetía cada vez que se necesitaban parásitos en ese estadio.

3.2.5. Búsqueda de los parámetros óptimos para la utilización de la técnica colorimétrica reducción de la resazurina sódica.

El uso de resazurina como método para cuantificar la viabilidad de parásitos de *T. cruzi*, fue descrito anteriormente en el trabajo de Rolón et al. 2006[186]. En este trabajo, se encontró una respuesta lineal entre reducción de la resazurina y la concentración de epimastigotes en el rango de $2x10^5$ a $5x10^6$ epimastigotes/mL para una concentración de resazurina de 3 mM y un tiempo de incubación de 5 horas, condiciones establecidas mediante la absorbancia del compuesto resazurina.

En nuestro laboratorio, se adaptó esta técnica, siendo la fluorescencia producida por la reducción del compuesto resazurina, el parámetro a medir. Para esto se utilizaron epimastigotes en fase exponencial de crecimiento (72 horas de incubación), ver **Figura 37.** De una muestra madre, se tomaron distintos volúmenes del inóculo, los cuales se diluyeron al mismo volumen final, obteniéndose concentraciones entre $2.5x10^5$ hasta $1x10^7$ epimastigotes/mL, a los mismos se les agregó distintas concentraciones de resazurina (0.5 a 3 mM) y posteriormente fueron incubados en tiempos comprendidos entre 1 a 5 horas.

Los valores de fluorescencia se leyeron con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 570 ± 10 nm/590 ± 10 nm y se analizaron los valores obtenidos. Cada punto de la curva, para todos los casos, se evaluó por triplicado y los resultados se expresaron como la media +/- SD de 3 experimentos independientes. Para el análisis de los datos se empleó “Prism 8 for windows” versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

3.2.6. Curvas de calibración

- Epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* (Y-GFP), que expresan la proteína GFP (Cepa Y)

Las condiciones analizadas fueron epimastigotes en PBS, y medios de cultivo LIT y BHT. La curva de calibración se construyó a partir de diluciones seriadas de cultivos axénicos de epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* (Y-GFP), en fase de crecimiento exponencial, y se realizaron diluciones al medio que abarcaron un rango de concentraciones de entre $1x10^6$ y $1,5x10^8$ epimastigotes/mL, cuantificadas mediante recuento directo en cámara de Neubauer. Para la condición de PBS se utilizó una solución madre de epimastigotes incubados en medio LIT que posteriormente fueron lavados, centrifugados y resuspendidos en PBS. En una microplaca negra de 96 pocillos se sembraron, por triplicado, 150 µl de cada dilución para todas las condiciones. Como blanco de cada condición, se utilizó el medio de cultivo y solución correspondiente (LIT, BHT y PBS) sin parásitos. La placa con las muestras sembradas se llevó al espectrofotómetro de fluorescencia con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 470 ± 15 nm/515 ± 20 nm y se analizaron los valores obtenidos. Cada punto de la curva se evaluó por triplicado y los resultados se expresaron como la media +/- SD de 3 experimentos independientes. Para el análisis de los datos se empleó "Prism 8 for windows" versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

- Epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* (Y-*β*-GAL), que expresan la proteína β-galactosidasa (Cepa Y)

La curva de calibración se construyó a partir de diluciones seriadas de cultivos axénicos de epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* (Y-*β*-GAL), en fase exponencial de crecimiento. La concentración de las soluciones de partida fue de $1,5x10^8$ epimastigotes/mL cuantificada mediante recuento directo en cámara de Neubauer. Se obtuvieron 8 diluciones (rango de $10x^6$ y $2x10^8$ epimastigotes/mL). Las condiciones analizadas fueron epimastigotes en PBS, y en medio de cultivo LIT. El perfil de actividad se determinó en presencia de los sustratos X-GAL y ONPG a las concentraciones de 100 µM, 200 µM y 300 µM, siguiendo el protocolo utilizado por Rolón et. al.[169] En una microplaca transparente de 96 pocillos se sembraron, por triplicado, 200 µL de cada dilución para todas las condiciones. A cada pocillo se le agregó 20 µL de cada sustrato (X-GAL y ONPG) y se incubó en agitación a 37 °C durante 4 horas. Para la condición de PBS, las muestras de parásitos se crecieron en medio de cultivo LIT. Para medir, se realizaron lavados, centrifugaciones y resuspensiones para extraer todo el medio de cultivo. Finalmente el sedimento se resuspendió en PBS y se realizaron las diluciones correspondientes. Como blanco de cada condición, se utilizó el medio de cultivo y solución correspondiente (LIT y PBS) sin parásitos. La placa con las muestras sembradas se llevó al espectrofotómetro con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech para medir la absorbancia a 420 ± 10 nm para la condición ONPG, y 600 nm para la

condición X-GAL, y se analizaron los valores obtenidos. Cada punto de la curva, para todos los casos, se evaluó por triplicado y los resultados se expresaron como la media +/- SD de 3 experimentos independientes. Para el análisis de los datos se empleó "Prism 8 for windows" versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

- Epimastigotes silvestres de *T. cruzi* (Y-WT), (Cepa Y).

La curva de calibración se construyó a partir de diluciones seriadas de epimastigotes de *T. cruzi*, en fase exponencial de crecimiento en medio de cultivo LIT. La concentración de la solución de partida fue de $2x10^8$ epimastigotes/mL cuantificada mediante recuento directo en cámara de Neubauer. Se obtuvieron 8 diluciones seriadas (rango de $10x^6$ y $2x10^8$ epimastigotes/mL) de epimastigotes Y-WT. En una microplaca negra de 96 pocillos se sembraron, por triplicado, 200 µL de cada dilución. A cada pocillo se le agregó 20 µL de una solución de resazurina sódica 3mM. La placa se llevó a incubación en agitación a 28°C durante 3 horas. Como blanco se utilizó el medio de cultivo LIT sin parásitos, con el compuesto resazurina. Pasadas las 3 hs se midió la fluorescencia con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 570 ± 10 nm/590 ± 10 nm y se analizaron los valores obtenidos. Cada punto de la curva se evaluó por triplicado y los resultados se expresaron como la media +/- SD de 3 experimentos independientes. Para el análisis de los datos se empleó "Prism 8 for windows" versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

3.2.7. Curvas de crecimiento

- Epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* que expresan la proteína GFP (Cepa Y)

Cultivos iniciales de 10^6 parásitos/mL creciendo en medios LIT y BHT fueron puestos en incubación durante seis (6) días corridos, en frasco T25 para cultivo celular (Falcon® 25cm²) con tapa de rosca. Los cultivos fueron incubados en agitación a 28ºC. Desde el tiempo 0 horas hasta el tiempo 144 horas, cada 24 horas se tomaron muestras de cada condición para su procesamiento y monitoreo por recuento directo en cámara de Neubauer y por medición de la fluorescencia. Para el recuento directo por cámara de Neubauer se realizaron diluciones de 1:20; 1:50; 1:100. Para la medición de la fluorescencia, se sembraron 150 µL, de las diluciones, por pocillo, por triplicado, en una microplaca negra de 96 pocillos. Para las condiciones de LIT y BHT las muestras se sembraron por toma directa del cultivo en incubación, para la condición de PBS se utilizaron epimastigotes incubados en medio LIT que posteriormente fueron procesados (lavados, centrifugados y resuspendidos en PBS). Para cada condición se utilizó como blanco la solución y el medio de cultivo correspondiente sin los parásitos. LIT, BHT y PBS, respectivamente. La fluorescencia se midió con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 470 ± 15 nm/515 ± 20 nm. Cada punto de la curva se evaluó por triplicado y los

resultados se expresaron como la media +/- SD de 3 experimentos independientes. Para el análisis de los datos se empleó "Prism 8 for windows" versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

- Epimastigotes silvestres de *T. cruzi* (Cepa Y).

Cultivos iniciales de 10^6 parásitos/mL creciendo en medios LIT fueron puestos en incubación durante 144 horas (6 días) corridas, en frasco T25 para cultivo celular (Falcon® 25cm²) con tapa de rosca en agitación a 28ºC. Desde el tiempo 0 horas hasta el tiempo 144 horas, cada 24 horas se tomaron muestras de cada condición para su procesamiento y monitoreo por recuento directo en cámara de Neubauer y por medición de la fluorescencia. Para el recuento directo por cámara de Neubauer se realizaron diluciones de 1:20; 1:50; 1:100. Para medir la fluorescencia, se utilizó la técnica colorimétrica de la resazurina sódica, para esto se sembró en una placa negra de 96 pocillos una muestra de 180 µL del cultivo y se agregó 20 µL de una solución de resazurina sódica 3 mM. Como blanco de las muestras se utilizó el medio de cultivo LIT con el compuesto resazurina, sin los parásitos. La placa se llevó a incubación en agitación a 28°C durante 3 horas. Pasado ese tiempo, se midió la fluorescencia con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 570 ± 10 nm/590 ± 10 nm y se analizaron los valores obtenidos. Cada punto de la curva, para todos los casos, se evaluó por triplicado y los resultados se expresaron como la media + SEM de 3 experimentos independientes. Para el análisis de los datos se empleó "Prism 8 for windows" versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

3.2.8. Determinación de la inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de productos naturales, compuestos puros y semisintéticos.

Para evaluar el efecto de los productos naturales estudiados, sobre la proliferación celular de parásitos de *T. cruzi*, 10^6 parásitos/mL de epimastigotes silvestres de *T. cruzi* (cepa Y), en fase de crecimiento exponencial, se sembraron en tubos de cultivo con fondo U (volumen final de cada muestra 2 mL) en medio de cultivo LIT en combinación con distintas concentraciones de los productos. Los extractos puros y subextractos fueron probados a concentraciones de 100 µg/mL, mientras que los compuestos puros y derivados, se probaron a concentraciones de entre 1-100 µg/mL dependiendo de cada caso. Los mismos fueron llevados a incubación durante 72 hs en agitación constante a 28 °C. La proliferación celular se midió por recuento directo en cámara de Neubauer y de forma paralela mediante la fluorescencia utilizando la técnica de la resazurina sódica. Para el recuento directo por cámara de Neubauer se realizaron diluciones de 1:100. Para medir la fluorescencia, se tomaron 180 µL de cada tratamiento y se sembraron, por triplicado, en una placa negra de 96 pocillos, luego se agregó 20 µL de una solución 3 mM de resazurina sódica a cada pocillo y se llevó a incubación durante 3 horas a 28ºC en agitación constante. Luego, se llevó la

placa al espectrofotómetro y se midió la fluorescencia con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 570 ± 10 nm/590 ± 10 nm y se analizaron los valores obtenidos. Se realizaron, al menos, tres experimentos independientes para cada condición. Como control negativo se utilizó el cultivo de parásitos en medio de cultivo LIT en combinación con DMSO al 0,1%. Como control positivo (C+) se utilizó el cultivo de parásitos en medio de cultivo LIT con nifurtimox a 2 µg/mL (6,95 µM). También se incluyeron los blancos del medio de cultivo y de los compuestos analizados. Los valores de fluorescencia se normalizaron al control negativo como porcentaje de inhibición. Los resultados se expresaron como como la media de la desviación estándar ± SD de 3 experimentos independientes, y se trazó en un histograma. Para identificar los productos que presentaban una actividad antiparasitaria significativamente diferente al control negativo, se utilizó el test de ANOVA del programa Graphpad Prism. Se definió la significancia estadística como $p<0.0001$.

3.2.9. Determinación de la inhibición del crecimiento de tripomastigotes de *T. cruzi* en presencia de compuestos puros y semisintéticos.

Formas tripomastigotes de *T. cruzi* de las cepas RA e Y, obtenidos a partir de cultivos celulares infectados (ver sección 3.2.4) fueron resuspendidos en DMEM suplementado al 5% con suero fetal bovino y colocados a razón de $2x10^6$ parásitos/pocillo en placas de 96 wells. Se agregaron soluciones de concentraciones crecientes (0; 1,5; 3; 6; 12; 25; 50; 100 µg/mL), de los compuestos puros y semisintéticos, en el mismo medio de cultivo hasta un volumen final de 100 µL. La placa se incubó durante 48 horas a 37 °C en medio enriquecido con 5% CO_2. Pasadas las 48 horas, se realizó el conteo de parásitos en cámara de Neubauer. Alternativamente, se agregó 50 µL de solución sódica de resarzurina 3mM y se incubó durante 3-4 horas hasta observar cambio de color. Se midió la fluorescencia con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 570 ± 10 nm/590 ± 10 nm y se analizaron los valores obtenidos. En la **Figura 25,** se observa la curva de calibración utilizada para corroborar el funcionamiento de la técnica de reducción de la resazurina a las concentraciones de interés en tripomastigotes.

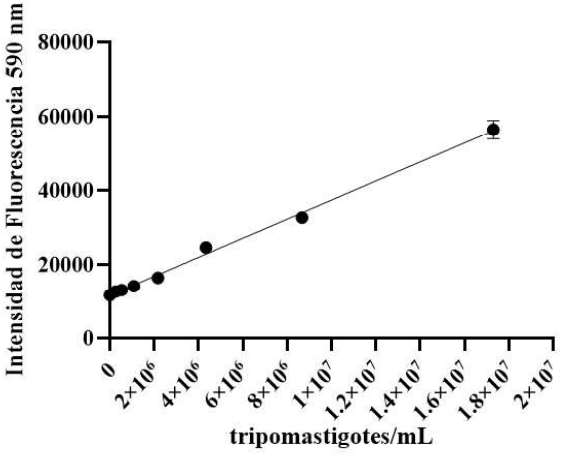


Figura 25: *Curva de calibración de la técnica de la resazurina para cultivo de tripomastigotes.*

3.2.10. Ensayos de citotoxicidad en líneas celulares

Estos ensayos se realizaron para descartar cualquier efecto tóxico de los compuestos de interés sobre cultivos celulares NRK y HeLa para determinar su selectividad hacia *T. cruzi.* El perfil de citotoxicidad se determinó en presencia del compuesto resazurina y posterior cuantificación de la fluorescencia. En placas negras de 96 pocillos, se sembraron, suspensiones de 8.000 células de NRK y HeLa en 180 µL de medio DMEM con Glutamax™ (Gibco), suplementado con 10% SFB (Natocor), 100 µg/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Sigma), y se llevaron a incubación a 37 °C y atmósfera enriquecida con CO_2 durante 24 horas para que las células se adhieran a la placa. Posteriormente, concentraciones crecientes (0; 1,5; 3; 6; 12; 25; 50; 100 µg/mL) de extractos puros, subextractos, compuestos puros y compuestos semisintéticos disueltos en DMSO, fueron colocados al medio fresco en las placas y se incubaron durante 72 horas. Pasado ese tiempo, en cada placa se agregó 20 µL del compuesto resazurina sódica a una concentración de 1,5 mM a cada pocillo, y se incubó durante 3 horas a 37ºC y 5% CO_2, luego las placas se llevaron al espectrofotómetro y se midió la fluorescencia con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 570 ± 10 nm/590 ± 10 nm y se analizan los valores obtenidos. Como control negativo se utilizó las células en crecimiento con el medio de cultivo DMEN en combinación con DMSO al 1%, y como control positivo (C+) se utilizó a las células con una solución del medio de cultivo con DMSO al 10%. También se incluyeron los blancos del medio de cultivo y de los compuestos analizados. Con los resultados obtenidos se estimó el porcentaje de citotoxicidad considerando la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular (CC50). Cada

concentración se evaluó por triplicado y los resultados se expresaron como la media +/- SD de 3 experimentos independientes. Para el análisis de los datos se empleó "Prism 8 for windows" versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

3.2.11. Estimación de la IC50 y la CC50 de los compuestos utilizados

Para analizar el efecto inhibitorio y la viabilidad celular de los fármacos de uso comercial (nifurtimox), de los compuestos puros aislados y sus correspondientes derivados en cultivos axénicos de epimastigotes y tripomastigotes; y en las líneas celulares de interés, se calculó la concentración media inhibitoria (IC50) y la concentración media citotóxica (CC50).

Para ello, los cultivos y las líneas celulares analizadas, fueron sometidos a concentraciones crecientes del fármaco y compuestos de interés y fueron incubados durante 48-72 horas. Los cultivos axénicos de epimastigotes y tripomastigotes fueron incubados a 37 °C con agitación, mientras que las líneas celulares fueron incubadas a 28 °C en atmósfera de CO_2. Para todos los casos, se utilizó la técnica de la resazurina sódica (3 mM y 3-4 horas de incubación), y se midió la fluorescencia. Para el caso de los parásitos en cultivo, en paralelo, se realizó el ensayo de inhibición del crecimiento por conteo directo de parásitos en cámara de Neubauer.

La IC50 y la CC50 para todos los casos, se calculó utilizando el modelo dosis-respuesta-inhibición que se muestra a continuación en la Ecuación 1:

$$Y = B + \frac{(T-B)}{1+(IC_{50}/X)^{HS}} \qquad \textbf{(Ec.1)}$$

Donde Y es la señal respuesta (señal de fluorescencia de las células vivas o recuento manual), X es la concentración del inhibidor (nifurtimox/compuestos/derivados µg/mL), T y B son los parámetros que ajustan los comportamientos asintóticos. T, por "Top" a baja concentración del inhibidor, B, por "Bottom" a alta concentración del inhibidor. HS, ajusta la pendiente con la que decae la función. Finalmente IC50/CC50 indica la concentración de X a la que la respuesta Y alcanza un 50 % del valor T. Para el ajuste del modelo se empleó "Prism 8 for windows" versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

3.2.12. Estimación del índice de selectividad (IS) de los compuestos de interés

Para estimar el potencial de un extracto o compuesto químico dado, para inhibir el crecimiento del parásito sin toxicidad para el huésped, se introdujo el concepto de índice de selectividad (IS). El mismo queda definido mediante la Ecuación 2:

$$IS = \frac{CC50}{IC50} \qquad \textbf{(Ec.2)}$$

Donde CC50 es la concentración media citotóxica, del compuesto químico de interés, sobre las líneas celulares utilizadas (HeLa/NRK), y la IC50 es la concentración media inhibitoria, del mismo compuesto químico, sobre el microorganismo modelo utilizado (tripomastigotes de *T. cruzi*).

3.2.13. Determinación de la inhibición del crecimiento de amastigotes de *T. cruzi* en ensayos de invasión celular por tripomastigotes.

Para evaluar el efecto de los productos naturales y compuestos semisintéticos de interés sobre la proliferación celular de amastigotes de *T. cruzi*, se utilizaron cultivos celulares HeLa. Una densidad de 7000 células/mL, se sembró sobre vidrio en una placa de 24 pocillos con medio de cultivo DMEM suplementado con SFB al 10%, y se llevó a incubación durante 24 horas a 37 °C y atmósfera enriquecida con 5% de CO_2. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se agregaron cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y (relación 20:1 parásitos:células), dejándolas en contacto durante 2 horas. Pasado ese tiempo, se removieron los parásitos extrayendo el sobrenadante de cada pocillo. Luego se agregó a las células medio de cultivo DMEM al 5% de SFB combinado con los tratamientos de interés (productos naturales aislados y compuestos semisintéticos), y sus respectivos controles (DMSO al porcentaje en el que se encuentran disueltos los productos naturales y semisintéticos utilizados) dejándolas en incubación durante 72 horas. Luego de las 72 horas, se lavaron las células con PBS, se fijaron con PBS-paraformaldehído 4% (Sigma), se tiñeron con 1 µg/mL de DAPI (4´,6'diamidino-2-phenylindole) (Invitrogen), se retiraron los vidrios de las placas se montaron en láminas de observación con el reactivo FluorSave™ (Calbiochem) para ser analizados en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 acoplado a una cámara SPOT RT™. Se tomaron fotografías de diferentes campos de la lámina y de las obtenidas se analizaron el porcentaje de infección (#células infectadas/células totales)*100, el número de amastigotes cada 100 células, y el número de amastigotes por célula infectada. Para los análisis se contaron 3000 células de cada tratamiento utilizando el programa Image J ("Cellcounter" plugin).

3.2.14. Determinación del porcentaje de liberación de tripomastigotes de *T. cruzi* en ensayos de 7 días post-infección.

Para evaluar el efecto de los productos naturales y compuestos semisintéticos de interés sobre la liberación de tripomastigotes de *T. cruzi,* se sembraron 7000 células Hela/mL por pocillo en placas de 24 wells, utilizando DMEM suplementado al 10% con suero fetal bovino y se incubó durante 24 horas. Luego de 24 horas, las células se infectaron con tripomastigotes purificados como

se describe en el apartado 3.2.4., en relación célula:tripomastigotes 1:100. Los parásitos se dejaron en contacto con las células en DMEM al 4% durante dos horas. Pasado ese tiempo, los wells se lavaron tres veces con PBS y se colocaron los correspondientes tratamientos preparados en DMEM 4%, y se llevó a incubación durante 72 horas. Luego de 72 horas, se renovaron los tratamientos hasta observar la liberación de tripomastigotes de las células al microscopio, a los 7 días post-infección. El sobrenadante con los tripomastigotes liberados se colectaron y transfirieron a placas negras de 96 wells, y con la técnica de la reducción de la resazurina (3mM y 3-4 horas de incubación), se midió la fluorescencia con el lector multimodo para microplacas PHERAstar FS, BMG Labtech con filtros de excitación/emisión a 570 ± 10 nm/590 ± 10 nm. Los valores corregidos por el blanco se normalizaron en forma de porcentaje respecto al control negativo.

3.2.15. Análisis estadístico

Todas las muestras analizadas y las medidas instrumentales utilizadas para esta tesis se realizaron por triplicado. Los resultados finales se informaron como valor medio ± desviación estándar. Para las comparaciones estadísticas de los resultados obtenidos, se aplicó la prueba de ANOVA unidireccional, utilizando el programa “Prism 8 for windows” versión 8.4.3, ©1992-2020 GraphPad Software, LLC.

4. Capítulo I

Estandarización de ensayos biológicos moleculares y colorimétricos, para el desarrollo de un método eficiente de rastreo de drogas.

4.1. Objetivo Específico e Hipótesis

La determinación de compuestos con potencial efecto tripanocida sigue implicando, principalmente, el conteo microscópico de parásitos. Esta técnica, si bien es robusta y de bajo costo, implica muchas horas de trabajo, lo que la hace una técnica poco eficiente considerando la cantidad de compuestos que se deben probar. Como alternativa, las técnicas moleculares y colorimétricas representan un método eficiente para cuantificar ensayos de viabilidad celular. Las mismas requieren el uso de organismos modificados y/o soluciones y reactivos accesibles, así como también instrumentos de medición simples.

Con el objetivo de encontrar un método de cribado farmacológico eficiente, que reemplace la técnica de recuento manual, la hipótesis de trabajo que se propone en este apartado, es que el uso de técnicas moleculares y colorimétricas es un método de screening cuantitativo simple, eficiente y reproducible para medir la actividad biológica de productos naturales y fármacos antiparasitarios de uso comercial sobre cultivos celulares.

Para ello, se ensayaron diferentes técnicas moleculares y colorimétricas en bioensayos sobre epimastigotes de la cepa Y, silvestres y transgénicas, de *T. cruzi*. Para los análisis se seleccionaron tres técnicas:

1. Valoración de fluorescencia de GFP (Green Fluorescent Protein) en epimastigotes transgénicos de *T. cruzi*, que expresan la proteína GFP.
2. Valoración de la actividad de la β-galactosidasa en epimastigotes transgénicos de *T. cruzi*, que expresan constitutivamente el gen de la β-galactosidasa.
3. Valoración de la fluorescencia producto de la reducción de la resazurina sódica en epimastigotes silvestres (cepa Y).

Para evaluar la eficacia de cada técnica se realizaron curvas de calibración y crecimiento midiendo la señal correspondiente en función de la concentración de parásitos. A modo de control, de forma paralela, se realizó la cuantificación de los parásitos, por recuento microscópico por cámara de Neubauer.

4.2. Resultados

4.2.1. Cuantificación de epimastigotes transgénicos mediante la valoración de la señal de fluorescencia de GFP.

Para estos ensayos se utilizaron cultivos axénicos de epimastigotes transgénicos de *T. cruzi* (Y-GFP), y como parámetro de medición la fluorescencia de GFP que expresaban estos parásitos.

Como punto de partida se determinó la curva de crecimiento de los parásitos, con el fin de conocer su dinámica de crecimiento (**Figura 26**).

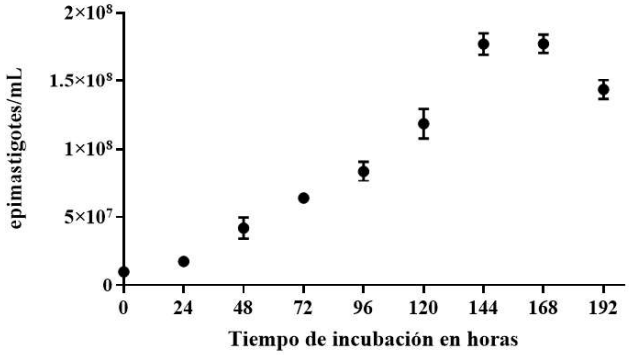


Figura 26: *Curva de crecimiento de epimastigotes transgénicos (Y-GFP) en función al tiempo de incubación. La concentración de cada punto se determinó por recuento manual por cámara de Neubauer. Cada punto de la curva indica la media ± desviación estándar (SD) de los recuentos realizados en tres subcultivos independientes (n = 3).*

Se observa una fase de latencia en los primeros días de incubación, seguido de una fase de crecimiento exponencial hasta las 144 horas, una fase estacionaria breve a las 168 horas de incubación, y la consecuente disminución de la concentración de epimastigotes.

Una vez establecida la dinámica de crecimiento de la cepa transgénica, se procedió a realizar una curva de calibración para evaluar la relación entre la concentración de parásitos y la señal de fluorescencia. Para ello, se analizaron las variaciones en la concentración de epimastigotes y la influencia del medio de cultivo en la medición. Se evaluaron tres (3) condiciones: epimastigotes en medio LIT, BHT y PBS.

En la **Figura 27**, se muestran los resultados obtenidos para las curvas de calibración en los distintos medios, se construyeron tomando como soluciones de partida muestras de cultivos de epimastigotes en etapa de crecimiento exponencial (72 horas de incubación), posteriormente se realizaron diluciones seriadas. Para todos los casos, se realizaron los controles de coloración basal correspondientes.

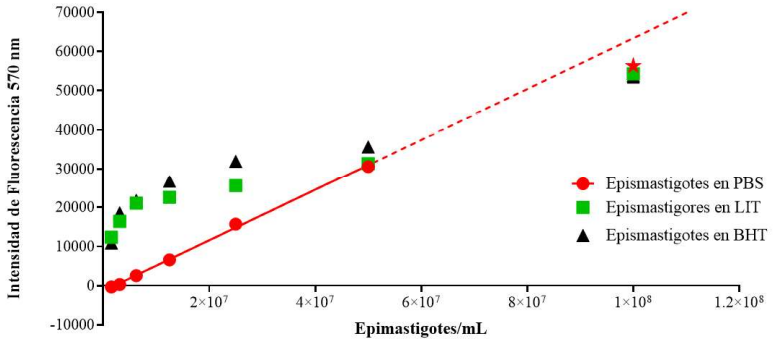


Figura 27: *Intensidad de fluorescencia en función a la concentración de epimastigotes. Condición LIT cuadrados verdes, Condición BHT triangulos negros, condición PBS circulos rojos. Se muestra el ajuste lineal para la condición PBS, línea roja continua. Línea roja discontinua, extensión de la regresión por fuera de los datos del ajuste. La estrella roja marca el punto de PBS que no se tomó en cuenta para el ajuste.*

Se puede observar que tanto para la condición LIT como BHT, la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de parásitos, no sigue una respuesta lineal en el rango de concentraciones estudiadas y presentan una alta intensidad de fluorescencia (10000 U.F) a las concentraciones mínimas. Sin embargo, para la condición PBS se observó una tendencia lineal, entre la mínima concentración estudiada y el valor aproximado de $5x10^7$ epimastigotes/mL. A concentraciones mayores se evidencia una pérdida de la linealidad como se resalta con la línea extrapolada del ajuste (línea roja discontinua) y el punto de la máxima concentración que se midió. El ajuste por cuadrados mínimos en el rango lineal dio como resultados una pendiente de **(6,48 ± 0,3)x10^{-4} UF.mL/epimastigotes** y una ordenada (**-1391 ± 524**) **UF**. El r^2=0,99, cercano a 1, muestra la bondad del modelo.

Para corroborar la correspondencia, se realizaron curvas de crecimiento durante 192 horas (8 días) para seguir el grado de proliferación de los parásitos mediante la variación de la intensidad de fluorescencia en la condición PBS. A modo de comparación, también se incluyeron las condiciones LIT y BHT.

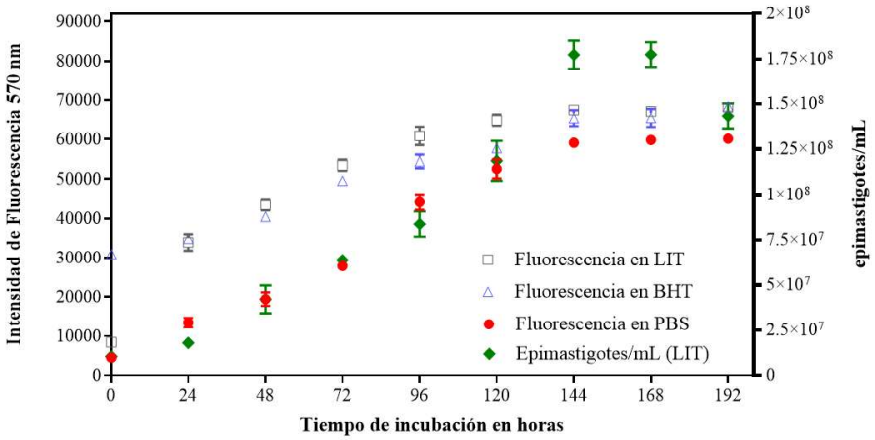


Figura 28: Curva de crecimiento de epimastigotes en función al tiempo de incubación. Eje izquierdo: *Intensidad de fluorescencia en función al tiempo de incubación de parásitos. Eje derecho: Concentración de epimastigotes por mililitro. Condición LIT, cuadrados transparentes; condición BHT, triángulos transparentes; condición PBS, círculos rojos; recuentos en cámara de Neubauer en medio LIT, rombos verdes.*

La **Figura 28**, presenta un doble eje en las ordenadas, donde el eje izquierdo indica la intensidad de fluorescencia para los tres medios estudiados. El eje derecho, con escala en unidades de concentración, muestra los resultados para el recuento microscópico de epimastigotes, por cámara Neubauer.

De los resultados de fluorescencia, sólo la condición PBS presenta una buena correspondencia con los resultados obtenidos por recuento microscópico. En esta condición, también se pudo obtener una correspondencia lineal entre fluorescencia y concentración por medio de la curva de calibración, como se observa en la **Figura 27**. Sin embargo, en la **Figura 28**, también se observa que cuando el crecimiento de los epimastigotes supera los $1x10^8$ epimastigotes/mL (aprox 120 horas) se pierde la sensibilidad en la señal de fluorescencia, mientras que los resultados por recuento microscópico indican que los parásitos siguen multipliándose hasta las 144 horas o $1.75x10^8$ epimastigotes/mL.

A partir de esto, se estableció una respuesta lineal de la intensidad de fluorescencia para la condición de PBS, de manera tal de poder correlacionar la variación de fluorescencia con el aumento de la concentración de parásitos, sin necesidad de obtener su concentración explícita, asumiendo que un aumento en la señal de fluorescencia corresponde a un aumento en la concentración de parásitos.

Aunque se puede considerar la factibilidad de esta técnica en la condición de PBS para seguir el crecimiento de epimastigotes, resulta muy laboriosa y poco eficiente en tiempo, ya que la manipulación de las muestras implica un proceso de lavados y centrifugaciones para extraer el medio de cultivo y finalmente un paso de resuspensión, de las muestras, en PBS para su posterior valoración.

4.2.2. Cuantificación de epimastigotes transgénicos por medición de la actividad de la β-galactosidasa.

Para estos ensayos se utilizaron cultivos axénicos de epimastigotes transgénicos que expresan el gen reportero de la β-galactosidasa (Y-β-GAL), y como parámetro de medición, la actividad de la β-galactosidasa por la hidrólisis de los sustratos ONPG y X-GAL.

Como en el caso anterior, inicialmente verificamos con una curva de crecimiento, el comportamiento de esta cepa de parásitos. En la **Figura 29** se observa que hasta las 120 horas de incubación, los epimastigotes presentan un aumento poblacional, para luego empezar a disminuir. Una vez realizada la curva crecimiento y analizado el comportamiento de los parásitos en cultivo, se realizaron curvas de calibración para evaluar la efectividad de la valoración de la actividad de la β-galactosidasa.

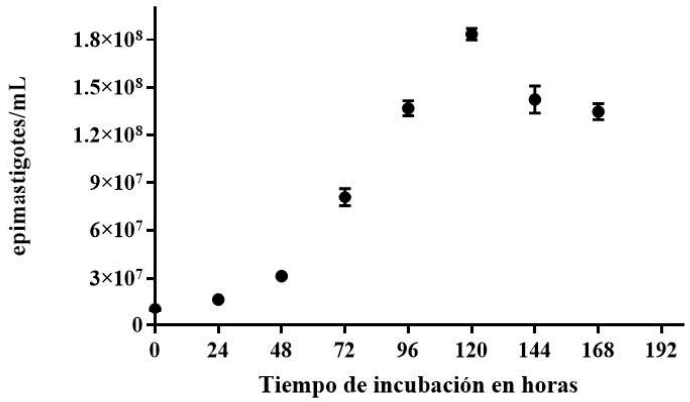


Figura 29: *Curva de crecimiento de epimastigotes transgénicos (Y-β-GAL) en función al tiempo de incubación. La concentración de cada punto se determinó por recuento manual por cámara de Neubauer. Cada punto de la curva indica la media ± desviación estándar (SD) de los recuentos realizados en tres subcultivos independientes (n = 3).*

En la **Figura 30** se muestran los resultados de la absorbancia en función de las diluciones de epimastigotes para la construcción de las curvas de calibración, para todas las combinaciones de sustratos (X-GAL, ONPG) y medios utilizados (LIT, PBS).

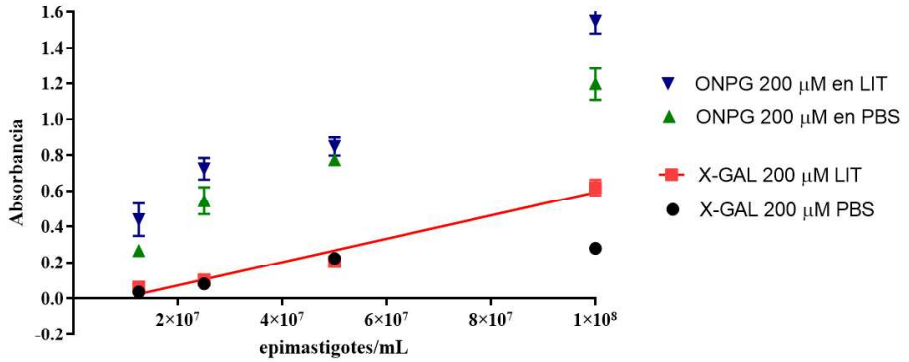


Figura 30: *Absorbancia en función a la concentración de epimastigotes. Condición ONPG en LIT triángulos azules, condición ONPG en PBS triángulos en verde.Condición X-GAL en PBS círculos negros, condición X-GAL en LIT cuadrados rojos.*

Se observa que las condiciones de X-GAL tanto en LIT como en PBS presentan un cambio de absorbancia poco sensible a la variación de concentración de parásitos. Para las condiciones de ONPG, en ambos medios, la situación es opuesta. La absorbancia sí presenta sensibilidad al cambio de concentraciones, sin embargo, para las concentraciones superiores a $5x10^7$ epimastigotes/mL, la absorbancia posee valores que superan la unidad (1), haciendo esta medida poco confiable dentro del rango de concentraciones de interés. Por debajo de $5x10^7$ epimastigotes/mL se tendría una respuesta lineal, pero la cantidad de puntos medida resulta insuficiente para llevar a cabo una regresión lineal. Realizar un paso extra de dilución sería la alternativa para ampliar ese rango. En esta figura, solo se muestra la regresión lineal de la condición X-GAL en LIT por presentar el mejor resultado de entre todas las condiciones analizadas. La misma presenta una pendiente de **$(6 \pm 4)x10^{-9}$ UA.mL/epimastigotes** y una ordenada **(-0,1 ± 0.2) UA**. La baja performance del ajuste se puede ver con el gran error de la pendiente, y también en sus figuras de mérito, con un Límite de Detección, LD = $2x10^7$ epimastigotes/mL y un Límite de Cuantificación, LC = $7x10^7$ epimastigotes/mL, este último en el medio de concentraciones de interés, indicando que la cuantificación podría realizarse en un rango muy acotado de concentraciones.

4.2.3. Búsqueda de los parámetros óptimos para la utilización de la técnica colorimétrica reducción de la resazurina sódica.

Los resultados obtenidos para el establecimiento de las condiciones experimentales óptimas de los siguientes parámetros: concentración de parásitos, concentración de resazurina y tiempo de incubación, para la aplicación de la técnica colorimétrica de la reducción de la resazurina se

muestran a continuación en la **Figura 31**.

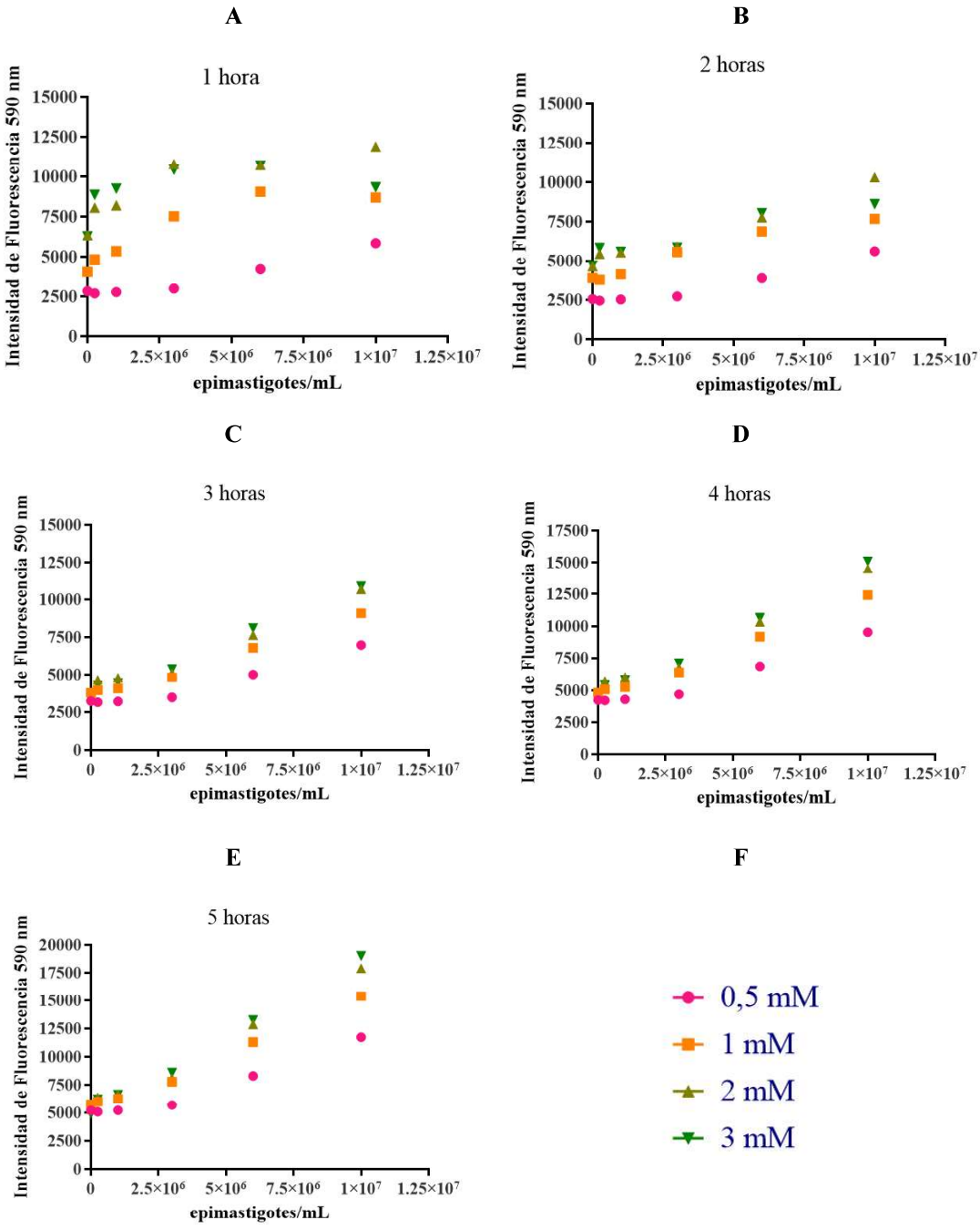


Figura 31: *Intensidad de Fluorescencia vs epimastigotes/mL para distintos tiempos de incubación y concentraciones de resazurina. A: 1 hs. de incubación. B: 2 hs. de incubación. C: 3 hs. de incubación. D: 4 hs. de incubación. E: 5 hs. de incubación. F: Leyendas correspondientes a las concentraciones utilizadas de resazurina.*

Se observa que a los tiempos de 1 y 2 horas de incubación, con diferentes concentraciones de resazurina, se obtienen valores de intensidad de fluorescencia que no se corresponden necesariamente con una respuesta creciente en la concentración de parásitos. Sin embargo, a partir de las 3 horas de incubación se observa una correspondencia constante entre el aumento de la intensidad de fluorencias y el aumento en la concentración de epimastigotes para todas las concentraciones de resazurina, siendo la concentración de 3 mM la que mejor se ajusta en todos los casos. A partir de estos resultados se tomaron como condiciones de experimentación de la técnica, una concentración de resazurina de 3 mM y un tiempo de incubación de 3 horas.

Finalmente, se realizó un barrido más amplio de concentraciones de epimastigotes, de tal manera a poder identificar el rango dinámico lineal de la respuesta de fluorencias vs concentración de epimastigotes. Estos resultados se presentan, más adelante, en una curva de calibración (**Figura 33**).

4.2.4. Cuantificación de epimastigotes silvestres por reducción de la resazurina sódica.

Para estos ensayos se utilizaron cultivos axénicos de epimastigotes de *T. cruzi* silvestres (Y-WT) en medio de cultivo LIT, y como parámetro de medición la fluorescencia producida por la reducción de la resazurina sódica.

En la curva de crecimiento, por recuento microscópico por cámara de Neubauer, presentada en la **Figura 32**, se observa que hasta las 168 horas de incubación, los epimastigotes presentaban un aumento poblacional y a partir de las 192 horas una disminución.

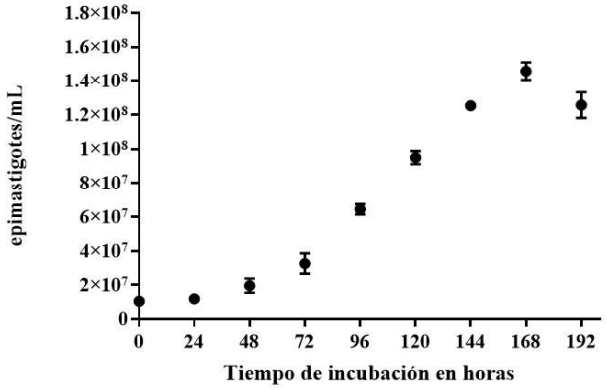


Figura 32: *Curva de crecimiento de epimastigotes silvestres (Y-WT) en función al tiempo de incubación. La concentración de cada punto se determinó por recuento manual por cámara de Neubauer. Cada punto de la curva indica la media ± desviación estándar (SD) de los recuentos realizados en tres subcultivos independientes (n = 3).*

Seguidamente, se realizaron curvas de calibración, con diluciones seriadas del cultivo de parásitos. En la **Figura 33** se presentan los resultados de las medidas de fluorescencia para las distintas diluciones de epimastigotes tratadas con resazurina. Se observa una respuesta lineal de la fluorescencia a la variación de las concentraciones de parásitos, con un $\mathbf{r^2 = 0{,}999}$. Los valores del ajuste para el modelo resultaron ser **(5,2 ± 0,3)x10^{-4} UF.mL/epimastigotes** para la pendiente, y **(45 ± 1259) UF** para la ordenada.

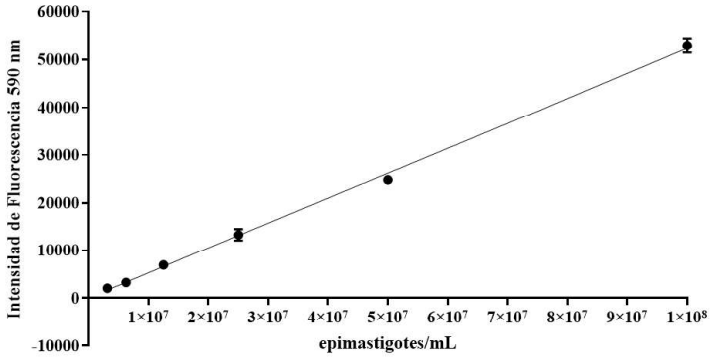


Figura 33: *Intensidad de fluorescencia, por reducción de la resazurina sódica, en función a la concentración de epimastigotes.*

La **Figura 34,** presenta los resultados comparativos de las curvas de crecimiento durante 168 horas (7 días), considerando las variables Intensidad de Fluorescencia (ordenada izquierda) y recuentos de parásitos por cámara de Neubauer (ordenada derecha). Se observa que hay un aumento en la intensidad de fluorescencia al aumentar el tiempo de incubación, ese aumento se corresponde linealmente con el aumento de la concentración de parásitos hasta que se alcanza un valor de 1x10^8 epimastigotes/mL (120 horas), a mayores concentraciones se ve observa que el crecimiento de los parásitos persiste, sin embargo, los valores de intensidad de fluorescencia saturan.

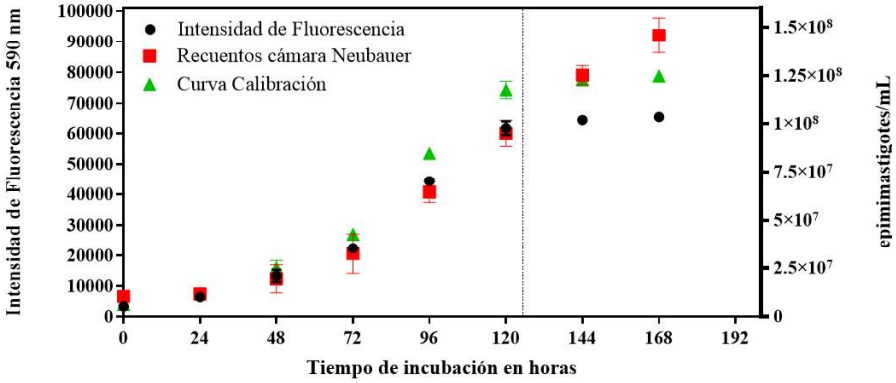


Figura 34: *Intensidad de fluorescencia, por reducción de la resazurina sódica, en función al tiempo de incubación de epimastigotes.*

Se pudo corroborar que la medida de la señal de fluorescencia en medio LIT, producto de la reducción de la resazurina sódica se corresponde con las variaciones observadas en las concentraciones de epimastigotes obtenidas por recuento microscópico. Estos resultados, nos permiten utilizarla para medir la actividad inhibitoria de potenciales candidatos antiparasitarios.

Para confirmar la eficacia de la técnica de la resazurina, en las condiciones establecidas, para cuantificar la inhibición de crecimiento por fármacos, se analizó el efecto inhibitorio del nifurtimox sobre epimastigotes en fase exponencial de crecimiento y se calculó la IC50 del compuesto como se indica en la sección 3.2.10. Se pudo observar que a medida que la concentración de nifurtimox aumenta, tanto la intensidad de fluorescencia (ordenada izquierda) como la concentración de epimastigotes (ordenada derecha), disminuyen hasta llegar a la muerte total de los parásitos a concentraciones iguales y/o superiores a 8 µg/mL (**Figura 35**).

Los resultados del ajuste para los valores medidos de fluorescencia y recuento microscópico de parásitos dan un valor de IC50 de 1.9 +/- 1 µg/mL y 2.4 +/- 2.1 µg/mL, respectivamente. Teniendo en cuenta estos valores se decidió utilizar una concentración de nifurtimox de 2 µg/ml para las pruebas de inhibición de crecimiento parasitario, y utilizar este compuesto como el de referencia para todos los controles positivos de nuestros experimentos.

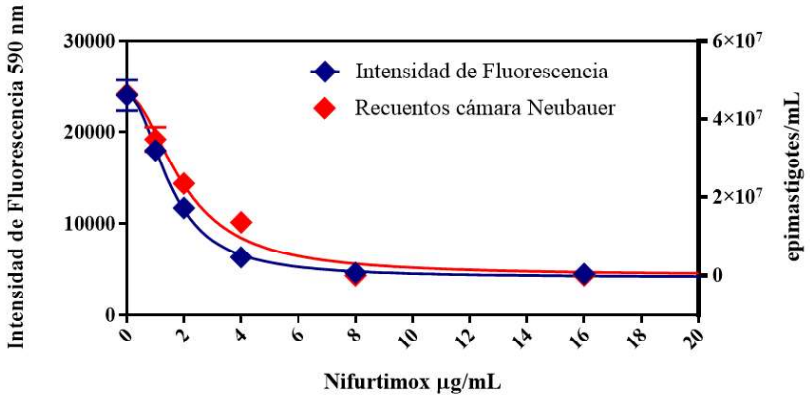


Figura 35: *Crecimiento de epimastigotes en función a la concentración de nifurtimox. Eje Y (izquierda), representa a la intensidad de fluorescencia proporcional a la concentración de epimastigotes. Y (derecha) representa a la concentración de epimastigotes por recuento microscópico. Las líneas (roja y azul), muestran el ajuste dado por la Ec. 1.*

4.3. Discusión

En la actualidad, la evaluación de la citotoxicidad en líneas celulares y la determinación de la actividad antiparasitaria de compuestos o fármacos con potencial efecto tripanocida, involucra la utilización de diversas técnicas moleculares y colorimétricas[202]. Estas incluyen el recuento microscópico de parásitos vivos, la reducción enzimática de la molécula MTT por células en estado viable en la que la actividad metabólica de células vivas se correlaciona con la formación de un producto colorimétrico que puede cuantificarse[203], la evaluación de la actividad enzimática en parásitos transfectados, la medición de la fluorescencia emitida por parásitos modificados genéticamente, así como la detección de la absorbancia de compuestos cromóforos, entre otras estrategias de análisis[204]. Sin embargo, muchas de estas técnicas demandan la ejecución de múltiples pasos en sus procedimientos, y en consecuencia, resultan en un consumo significativo de tiempo. Esta complejidad procedural limita la eficiencia y practicidad en la realización de cribados farmacológicos.

A través de la exploración de alternativas metodológicas nos propusimos superar las limitaciones actuales en términos de tiempo y complejidad. Para ello, establecimos como objetivo desarrollar y establecer un método óptimo y expedito para llevar a cabo el screening de compuestos y fármacos con potencial actividad tripanocida, considerando la urgente necesidad de optimizar los procesos de evaluación de potenciales agentes terapéuticos, permitiendo identificar de manera más rápida y precisa aquellos compuestos que demuestren capacidad para combatir la infección por *T. cruzi.*

Para alcanzar este objetivo, se analizaron tres herramientas moleculares y colorimétricas: Cuantificación de la fluorescencia en epimastigotes de *T. cruzi* que expresan el gen reportero GFP; cuantificación de la actividad de la β-galactosidasa en epimastigotes de *T. cruzi* que expresan constitutivamente el gen de la β-galactosidasa y el ensayo colorimétrico de reducción de la resazurina sódica con epimastigotes silvestres, todos ellos pertenecientes a la cepa Y. En los tres casos, se evaluó el comportamiento del crecimiento de los parásitos y se realizaron curvas de calibración (absorbancia o fluorescencia) vs concentración de parásitos, a partir de las cuales se calcularon las figuras de mérito que se presentan a continuación en la **Tabla 9.**

Tabla 9: Comparación de las figuras de mérito de las técnicas analizadas.				
Técnica	**Límite de detección LD (epimastigotes/mL)**	**Límite de cuantificación LC (epimastigotes/mL)**	***Sensibilidad (Z.mL/epimastigotes)**	**Coeficiente correlación de Pearson r**
Fluorescencia de GFP	$1{,}36x10^{6}$	$4{,}52x10^{6}$	$6{,}48x10^{-4}$	0,9980
Absorbancia β-galactosidasa (X-GAL en LIT)	$2{,}17x10^{7}$	$7{,}25x10^{7}$	$6{,}49x10^{-9}$	0,9846
Florescencia reducción resazurina	$2{,}6x10^{6}$	$8{,}68x10^{6}$	$5{,}23x10^{-4}$	0,9993
***Z:** *representa a las unidades de fluorescencia (UF) o absorbancia (UA), según corresponda.*				

A lo largo de los años, se han descrito numerosos estudios *in vitro* e *in vivo*, con parásitos transgénicos de *Trypanosoma cruzi* que expresan la proteína GFP utilizados como un método de monitoreo, de invasión celular, cuantificación del parásito, entre otros[205]. En este contexto, se han reportado transfecciones exitosas con vectores de expresión que permiten la integración de los genes de la proteína fluorescente verde (GFP) en los estadios epimastigotes de diferentes cepas, así también, a partir de cultivos envejecidos de epimastigotes transfectados, y mediante la infección de células VERO, se pudieron obtener estadios de tripomastigotes y amastigotes fluorescentes[161].

Para nuestros ensayos, se utilizaron epimastigotes-GFP. En los resultados obtenidos, la fluorescencia emitida por los epimastigotes-GFP se pudo correlacionar con el número de protozoarios vivos. A su vez, la capacidad de cuantificar a estos organismos con una proteína fluorescente sin la adición de sustratos y cofactores convertía a esta metodología en una técnica conveniente para ensayos de este tipo. Adicionalmente, las figuras de mérito para la calibración resultaron adecuadas, viéndose que tanto el LD como LC se encontraban muy cercanos a las mínimas concentraciones con las que comienzan las curvas de crecimiento. El rango dinámico lineal presenta resultados diferentes de acuerdo a si se considera la curva de calibración (aproximadamente hasta $5x10^{7}$ epimastigotes/mL) o los resultados de la superposición de las curvas de crecimiento cuantificadas por fluorescencia y por recuento ($1x10^{8}$ epimastigotes/mL). Sin embargo, se encontraron limitaciones en esta técnica. Principalmente, el sistema donde se observa una respuesta lineal de la fluorescencia con la concentración de epimastigotes (condición con PBS), requería un protocolo de preparación de muchos pasos de lavados, centrifugación y resuspensión donde se observaba pérdida de la muestra. Otra limitación importante es la obtención, manipulación y mantenimiento del protozoario transgénico. En nuestra experiencia, dentro del laboratorio, nos enfrentamos en varias oportunidades a cepas de parásitos transgénicos que expresaban niveles bajos de fluorescencia y otras perdían la capacidad de expresión con el tiempo. Teniendo en cuenta esto y

sumado al largo protocolo que requería la manipulación individual de cada tratamiento, se concluyó que esta técnica no era adecuada para aplicarla en nuestros ensayos de *screening* de compuestos.

Por otro lado, para la técnica de la actividad de la β-galactosidasa en *T. cruzi*, se describen numerosos estudios exitosos estandarizando las condiciones experimentales del sustrato clorofenol rojo β-D-galactopiranosida (CPRG)[169]. Se destacan como ventaja de estos ensayos que la actividad de la β-galactosidasa es directamente proporcional al número de parásitos transfectados viables, la medida de absorbancia resulta rápida y sencilla, pudiéndose realizar con un espectrofotómetro estándar, y el sustrato comercial es accesible.

Nuestros resultados experimentales de la medida de absorbancia con los sustratos X-GAL y ONPG, mostraron que el sistema no presentaba una respuesta lineal para los sustratos en condición PBS. En el caso de X-GAL en LIT, se pudo observar una respuesta lineal, pero su performance fue muy baja. Este hecho se puede apreciar con las figuras de mérito de la regresión, con una baja sensibilidad, y un LD y LC que son, aproximadamente, un orden de magnitud mayor en comparación a las técnicas de fluorescencia de Y-GFP y reducción de la resazurina. En particular el valor de LC se encuentra por encima de la mitad del rango de concentraciones evaluadas para la curva de calibración, lo que hace a esta metodología poco útil. Otro aspecto que condicionó nuestro análisis, al igual que el caso anterior con Y-GFP, fue el protocolo utilizado para detectar la señal, pues requería de un procesamiento con pasos de lavados, centrifugaciones y resuspensiones que conducían a una inversión de tiempo considerable.

Por otra parte, la técnica colorimétrica por reducción de la resazurina que es utilizada tradicionalmente para examinar la contaminación bacteriana y de levaduras en la leche, para evaluar la calidad del esperma en humanos[206], entre otros, fue estandarizada y con resultados exitosos para medir viabilidad celular en varios organismos incluyendo *T. cruzi*. Tanto Rolón et al. (2005)[186], como Torchelsen y col. (2021)[187], reportaron resultados exitosos con esta técnica al establecer parámetros óptimos en cuanto a tiempo de incubación y concentraciones de resazurina y parásitos, siendo la señal de absorbancia su parámetro de valoración. La resazurina es un compuesto cromóforo redox, no tóxico y que se mantiene estable en el medio de cultivo. La bioreducción de la resazurina por células viables reduce la cantidad de su forma oxidada (azul) y, al mismo tiempo, aumenta la cantidad de su forma reducida (violeta), lo que permite cuantificar el grado de citotoxicidad causado por el agente de prueba.

El protocolo para la preparación de la muestra y valoración de la forma reducida de la resazurina fue adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio con resultados prometedores. La modificación más importante fue la señal medida, que en nuestro caso fue la fluorescencia emitida

por el compuesto reducido resorufina. Otros ajustes fueron el rango de concentraciones de parásitos evaluados, el tiempo de incubación, y la concentración de resazurina. Resultado las condiciones óptimas una concentración de resazurina de 3 mM, un tiempo de incubación de 3 horas con agitación a 28°C, y un rango de concentración de parásitos de $8x10^6$ a $1x10^8$ epimastigotes/mL. En estas condiciones se observó una respuesta lineal entre la fluorescencia emitida y la concentración de parásitos, resultados que se pueden apreciar en las **Figuras 33 y 34**. También, las figuras de mérito de la regresión resultaron adecuadas con una buena sensibilidad y un LC y LD que se encontraban por debajo de las mínimas concentraciones de parásitos con las que comienza la curva de crecimiento. Como primer paso en el estudio de citotoxicidad, se determinó la IC50 para el fármaco de referencia Nifurtimox, estableciendo la concentración de 2 µg/mL para los posteriores estudios.

La aplicación de esta técnica reveló notables ventajas. Desde una perspectiva metodológica, el protocolo de manipulación se presentó como un proceso sencillo y rápido. Las muestras se sembraron directamente desde los tubos de cultivo sin requerir procedimientos adicionales, más allá de la adición del compuesto resazurina y la espera del tiempo de incubación correspondiente. Es importante resaltar que los parásitos empleados eran de origen silvestre, eliminando así, la dependencia de modificaciones genéticas. Además, se pudo constatar que la resazurina no producía toxicidad sobre los parásitos, manteniéndose estable en el medio de cultivo sin generar precipitados que pudiesen afectar las mediciones y sin necesitar pasos de disolución de cristales. Sumado a esto, el compuesto en cuestión es de un costo muy accesible.

Considerando estos beneficios, se optó por emplear esta técnica en todos nuestros ensayos de citotoxicidad, los cuales arrojaron resultados sumamente alentadores.

La estandarización de una técnica colorimétrica rápida, menos laboriosa y semicuantitativa, es una herramienta que favorece los avances en la investigación de búsqueda de candidatos químicos con potencial efecto antiparasitario de manera más eficiente. Adaptar la técnica de reducción de la resazurina a nuestras condiciones de trabajo dentro del laboratorio nos permite avanzar en nuestras búsquedas de compuestos con potencial efecto antiparasitario contra *T. cruzi*.

5. Capítulo II

Extracción, aislamiento e identificación de extractos puros y metabolitos secundarios provenientes de especies vegetales para la evaluación de su actividad biológica sobre cultivos axénicos de *T. cruzi.*

5.1. Objetivo Específico e Hipótesis

El desarrollo de nuevos fármacos activos contra *T. cruzi* sigue siendo un desafío importante en el campo de la investigación. El lento progreso en este campo, se debe principalmente al complejo ciclo de vida y la diversidad genética del parásito, las diferentes sensibilidades a los medicamentos disponibles y la poca atención de las compañías farmacéuticas hacia las enfermedades desatendidas. En este sentido, el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos o derivados, a partir de fuentes naturales, sigue siendo una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos.

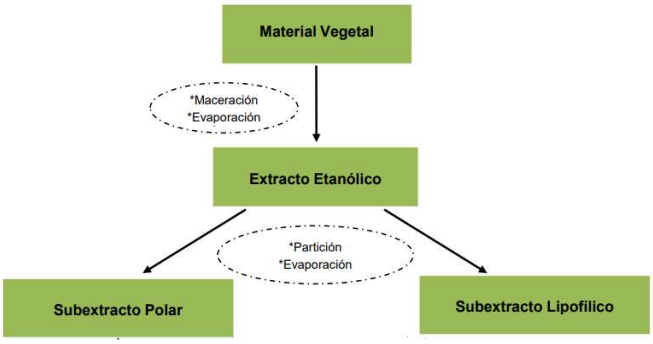
El objetivo específico de este capítulo consiste en la extracción, aislamiento e identificación de extractos puros y metabolitos secundarios provenientes de especies vegetales para la evaluación de su actividad biológica sobre cultivos axénicos de de epimastigotes de *T. cruzi*. La hipótesis que se propone es que a partir de metabolitos secundarios de especies vegetales, es posible hallar productos naturales con potencial actividad tripanocida.

Para ello se realizó un estudio químico de las hojas, flores, semilla y corteza de 6 especies vegetales: *Baccharis trimera* (Carqueja blanca), *Helietta apiculata* (Canela de Venado), *Jacaranda caroba* (Karoba), *Brosimum gaudichaudii* (Mamica de Cadela), *Aristolochia triangularis* (Ysypo Mil Hombre) y *Achillea millefolium* (Milenrama), mediante la obtención de extractos, subextractos y compuestos aislados de los mismos, que fueron ensayados en bioensayos sobre el estadío epimastigote de *T. cruzi.*

5.2. Resultados

5.2.1. Actividad biológica de extractos y subextractos

Los extractos etanólicos y subextractos polares y lipofílicos de las hojas, corteza, flores y semillas de las especies analizadas, fueron evaluados en ensayos de actividad biológica frente a epimastigotes de *T. cruzi*. En la **Figura 36**, se hace referencia al proceso de obtención de los extractos y subextractos, y a las nomenclaturas de los productos obtenidos y utilizados en este trabajo.



Nombre común de especies	Partes/Características
Carqueja Blanca (CB)	Hoja (H)
Mamica de Cadela (MdC)	Corteza (C)
Ysypo Mil Hombre (YMH)	Flores (F)
Milenrama (M)	Semillas (S)
Karoba (K)	Extracto Lipofílico (L)
Canela de Venado (CV)	Extracto Polar (P)

Figura 36: Esquema de obtención de los extractos - subextractos, y su nomenclatura

Los ensayos se realizaron a una concentración mínima de 1 µg/mL, y a una concentración máxima de 100 µg/mL para cada caso. Los resultados obtenidos a 100 µg/mL se muestran en la **Figura 37**, donde se destaca con un asterisco aquellos extractos que inhibieron significativamente el crecimiento de epimastigotes, según el análisis estadístico de ANOVA, comparado con el control negativo, como se indicó en la metodología.

Los extractos de las partes hojas de Carqueja Blanca (CB H), los extractos de las flores de Karoba (KF), los subextractos polares de la corteza de Canela de Venado (CV CP), los subextractos lipofílicos de la corteza de Canela de Venado (CV CL) y el subextracto polar de las hojas de Canela de Venado (CV HP), presentaron actividad biológica en epimastigotes silvestres de *T. cruzi* (cepa Y). Estos lograron inhibir significativamente (35-60% de inhibición), el crecimiento de epimastigotes a una concentración de 100 µg/mL para cada caso.

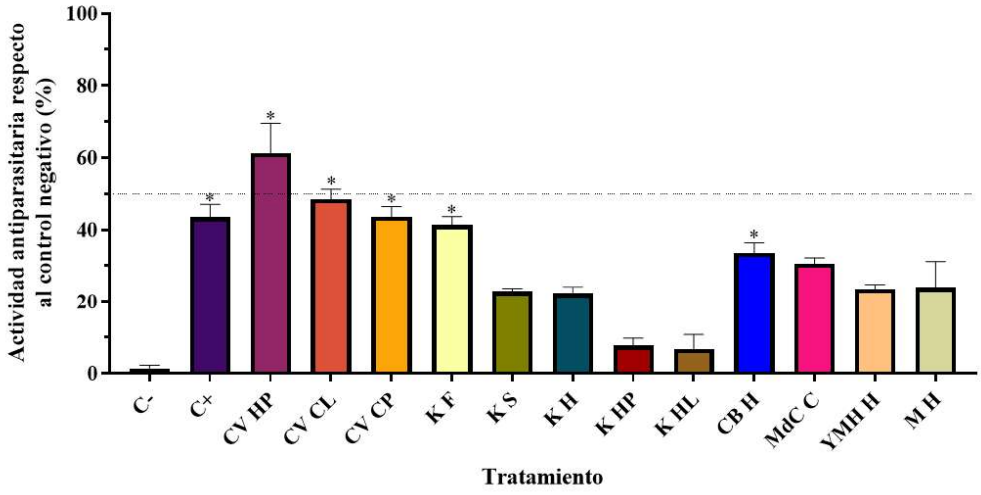


Figura 37: *Actividad antiparasitaria de extractos y subextractos, normalizada respecto al control negativo. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Control negativo, DMSO 0,1%. Control positivo (C+), Nifurtimox Lampit® 2µg/mL. (*) Porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA ($p<0.0001$).*

Los extractos puros de las hojas de Ysipo Mil Hombres (YMH H) y de la especie *Achillea millefolium* conocida como Milenrama (M H) muestran una actividad antiparasitaria de aproximadamente 25% de inhibición del crecimiento de epimastigotes. Para nuestros cálculos estadísticos, este valor no resulta significativo comparándolo con el control negativo de la muestra.

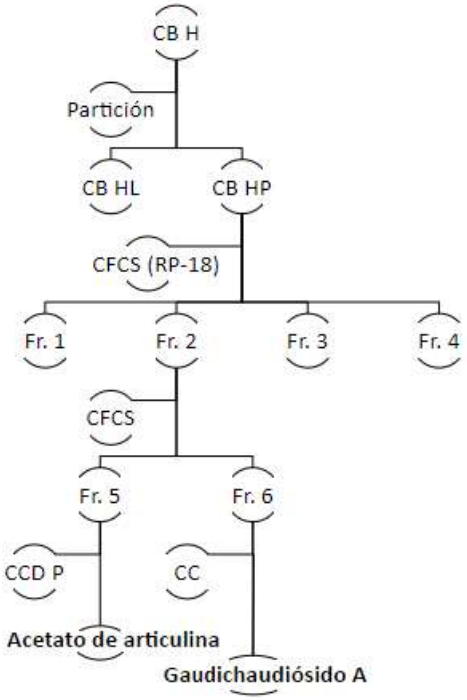
El extracto puro de las semillas de Karoba (KS), de las hojas (K H), y los subextractos polar y lipofílico (K HP) y (K HL), respectivamente, no mostraron actividad antiparasitaria significativa, siendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de entre 10-22% con respecto al control negativo. Sin embargo, el extracto puro de las flores (KF) presentó una capacidad de inhibición significativa de aproximadamente 42%, lo que motivó a seguir procesando la muestra e identificar a los componentes del extracto.

5.2.2. Procesamiento de especies seleccionadas y actividad biológica de los compuestos aislados

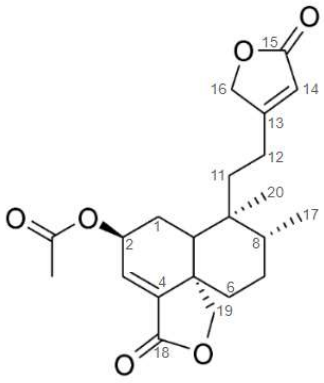
Los extractos y subextractos que mostraron actividad significativa (*), fueron sometidos a nuevos procesos de separación y aislamiento para identificar a sus componentes químicos de manera aislada.

A continuación se describe, a detalle, el procesamiento de las especies de las cuales se obtuvieron compuestos aislados. Posteriormente, los mismos fueron evaluados en los ensayos de actividad biológica sobre epimastigotes silvestres de *T. cruzi.*

- ***Baccharis trimera*** **(Carqueja blanca)**



Acetato de articulina



Gaudichaudiósido A

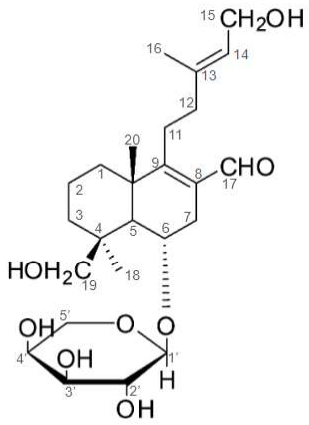


Figura 38: *Esquema del procesamiento del extracto etanólico de las hojas de Carqueja blanca (CB H) y las estructuras de los compuestos puros obtenidos.*

500 gramos de hojas de *B. trimera*, fueron trituradas y maceradas en etanol durante 72 horas a temperatura ambiente en envases de vidrio. El extracto etanólico de las hojas (CB H) se particionó y se obtuvieron los subextractos lipofílicos (CB HL) y polares (CB HP). El subextracto polar (CB HP) fue sometido a una cromatografía flash en columna seca de fase reversa [CFCS-(RP-18)] utilizando mezclas de metanol:agua de polaridad decreciente para obtener 4 fracciones (Fr.1-Fr.4). La Fr.2 fue sometida nuevamente a una cromatografía flash en columna seca en fase normal (CFCS) con mezclas de éter de petróleo y acetato de etilo de polaridad creciente como solvente de desarrollo. Se obtuvieron 13 fracciones de las cuales se continuaron trabajando las fracciones 5 (Fr.5) y 6 (Fr.6). La fracción Fr.5 fue purificada mediante una cromatografía de capa delgada preparativa (CCD), con una mezcla de diclorometano:metanol (97:3) como solvente de desarrollo, obteniéndose el compuesto *acetato de articulina*. La fracción Fr.6 fue purificada mediante cromatografía en columna seca de silica (CC) con mezclas de diclorometano:metanol de polaridad creciente como solvente de elución, obteniéndose el compuesto *gaudichaudiósido A* (**Figura 38**).

Ambos compuestos fueron evaluados sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones mínimas y máximas de 1*µg/mL* y 10*µg/mL,* respectivamente. Según el análisis de ANOVA, los mismos no presentaron una actividad antiparasitaria significativa respecto al control (**Figura 39**).

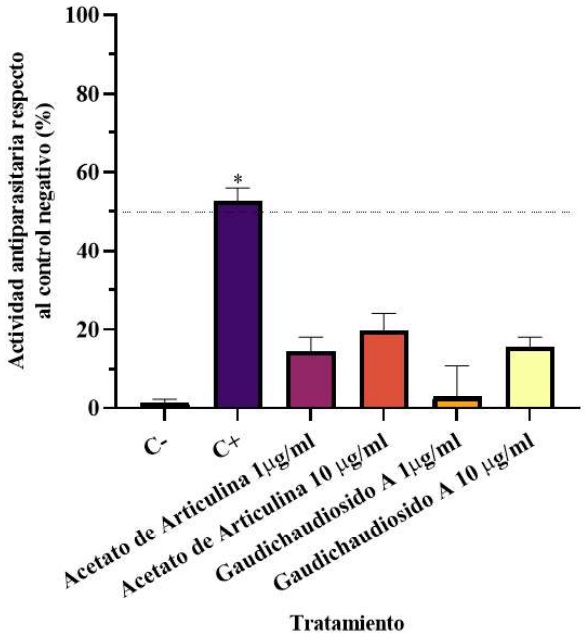


Figura 39: *Actividad antiparasitaria de compuestos aislados a partir del extracto puro de las hojas de Carqueja Blanca (CB H), normalizada respecto al control negativo. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Control negativo, DMSO 0,1%. Control positivo (C+), Nifurtimox Lampit® 2µg/mL. Las concentraciones de los compuestos: 1-10µg/mL ≃ 2,07-25,7µM. (*) Porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA (p<0.0001).*

- ***Jacarandá caroba (Karoba)***

De esta especie se analizaron las hojas, flores y semilllas, y se obtuvieron los extractos etanólicos KH, KF y KS respectivamente. El extracto resultante de las flores (KF) se sometió a cromatografía flash en columna seca (CFCS) en fase normal con mezclas de ciclohexano:acetato de etilo de polaridad creciente como solvente de elución. Se obtuvieron así 3 fracciones (Fr.1-Fr.3). La Fr.3 fue permeada a través de a una columna de Sephadex con metanol como solvente de elución obteniéndose una fracción semi-pura (Fr.4). Esta última fracción se purificó por cromatografía flash en columna seca de fase reversa [CFCS-(RP-18)] y se pudo aislar e identificar el compuesto *etiljacaranona* (**Figura 40**). Este compuesto es un artefacto formado a partir del producto natural jacaranona debido a su extracción con etanol. La actividad antiparasitaria del compuesto se probó sobre cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* a las concentraciones de 2*µg/mL (10,2µM)*, 20*µg/mL (102µM) y 100µg/mL (510µM)* dando un resultado de más del 70% de inhibición, con respecto al control negativo, a la concentración de 100 µg/mL. En las demás concentraciones analizadas el porcentaje de inhibición fue de entre 2-10 %.(**Figura 40**).

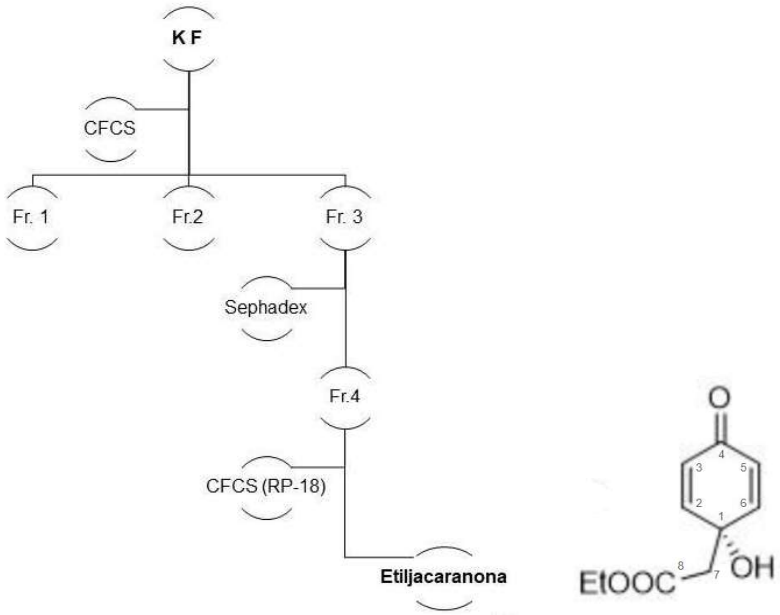


Figura 40: *Esquema del procesamiento del extracto etanólico de las flores de Karoba (**KF**) y la estructura del compuesto puro obtenido..*

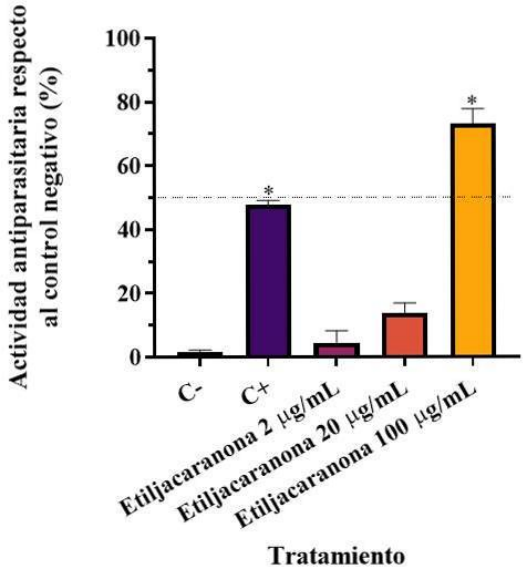


Figura 41:. *Actividad antiparasitaria de compuestos aislados a partir del extracto puro de las flores de Karoba (KF), normalizada respecto al control negativo. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Control negativo, DMSO 0,1%. Control positivo (C+) Nifurtimox Lampit® 2µg/mL. (*) Porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA ($p<0.0001$).*

- ***Helietta apiculata (Canela de venado)***

De esta especie se analizaron los subextractos polar (CV HP) y lipofílico (CV HL), obtenidos a partir de 700 gramos de hojas, y 1000 gramos de corteza (CV CP y CV CL). El procesamiento de la corteza se describe en la **Figura 42**.

Al extracto puro etanólico de la corteza (CV C), se le realizó una extracción ácido base y se obtuvieron las porciones orgánicas (CV CO) y acuosa (CV CA). La porción orgánica fue sometida a partición entre ciclohexano y metanol:agua (9:1) para separar del extracto total los alcaloides que comúnmente produce esta planta y se obtuvieron los subextractos polar (CV CP) y lipofílico (CV CL). El subextracto polar (CV CP) fue sometido a una cromatografía flash en columna seca de fase normal (CFCS), con mezclas de diclorometano y acetato de etilo de polaridad creciente como solvente de elución, obteniéndose 6 fracciones (Fr.1-Fr.6), La Fr.6 fue sometida a cromatografía en columna flash con mezclas de ciclohexano, diclorometano y acetato de etilo de polaridad creciente como solvente de elución. Se obtuvieron 3 fracciones (Fr6.1-Fr.6.3). La Fr.6.3 se permeó a través de Sephadex con metanol como solvente de elución lo que permitió obtener dos compuestos puros: *p-cumarato de metilo y maculina.* Además, mediante cromatografía flash en columna seca de fase reversa CFCS-PR, se obtuvo una mezcla de las cumarinas *chalepina*, *uliscomoncadin A y*

gravelliferona y una fracción impura de *rutacultina,* las estructuras de los compuestos se muestran en la **Figura 43**.

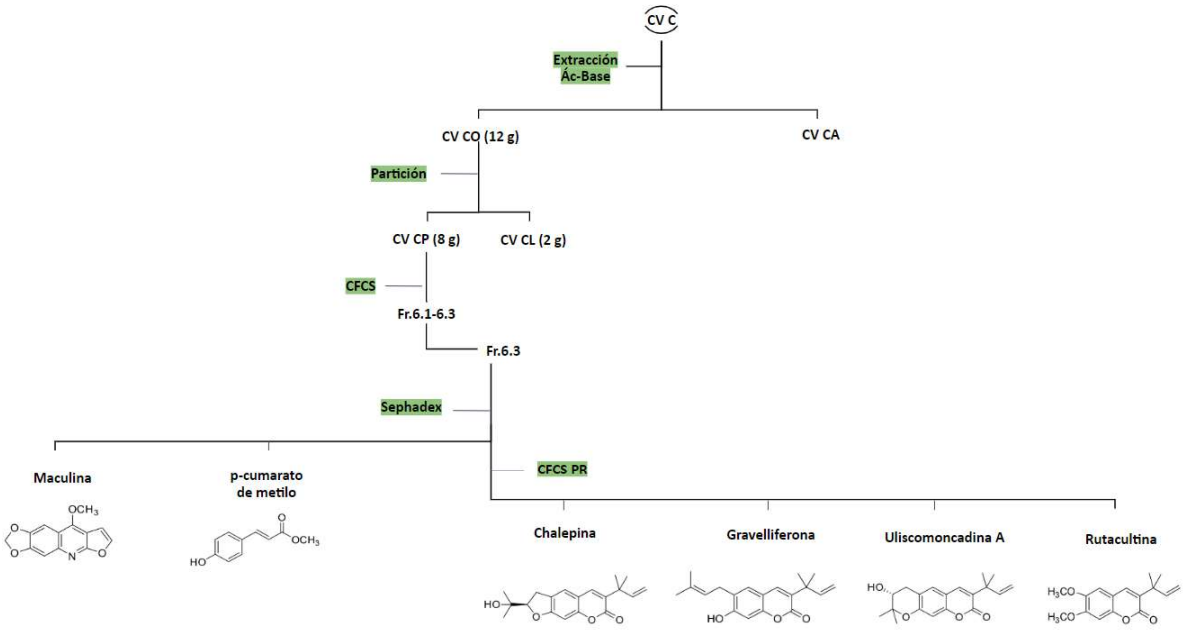
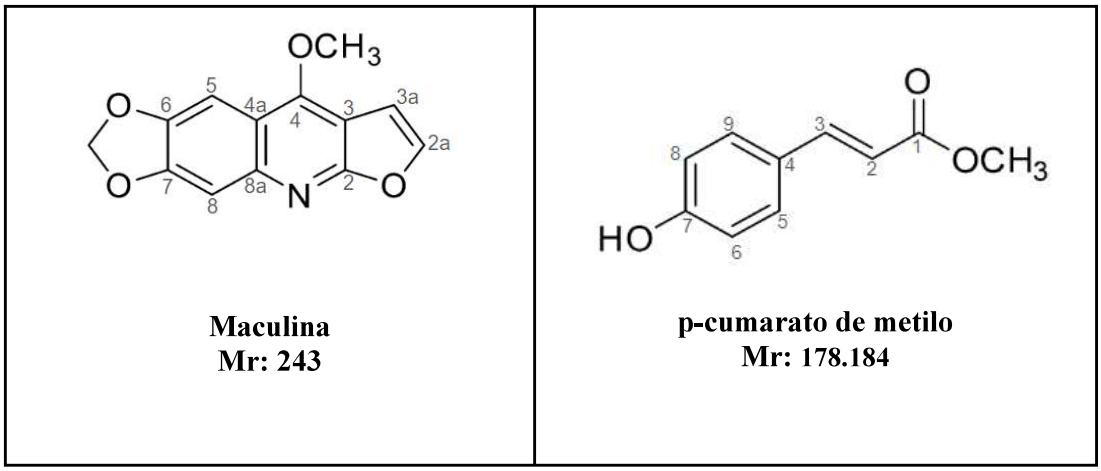


Figura 42: *Esquema de extracción de metabolitos secundarios de la corteza de Canela de Venado.*



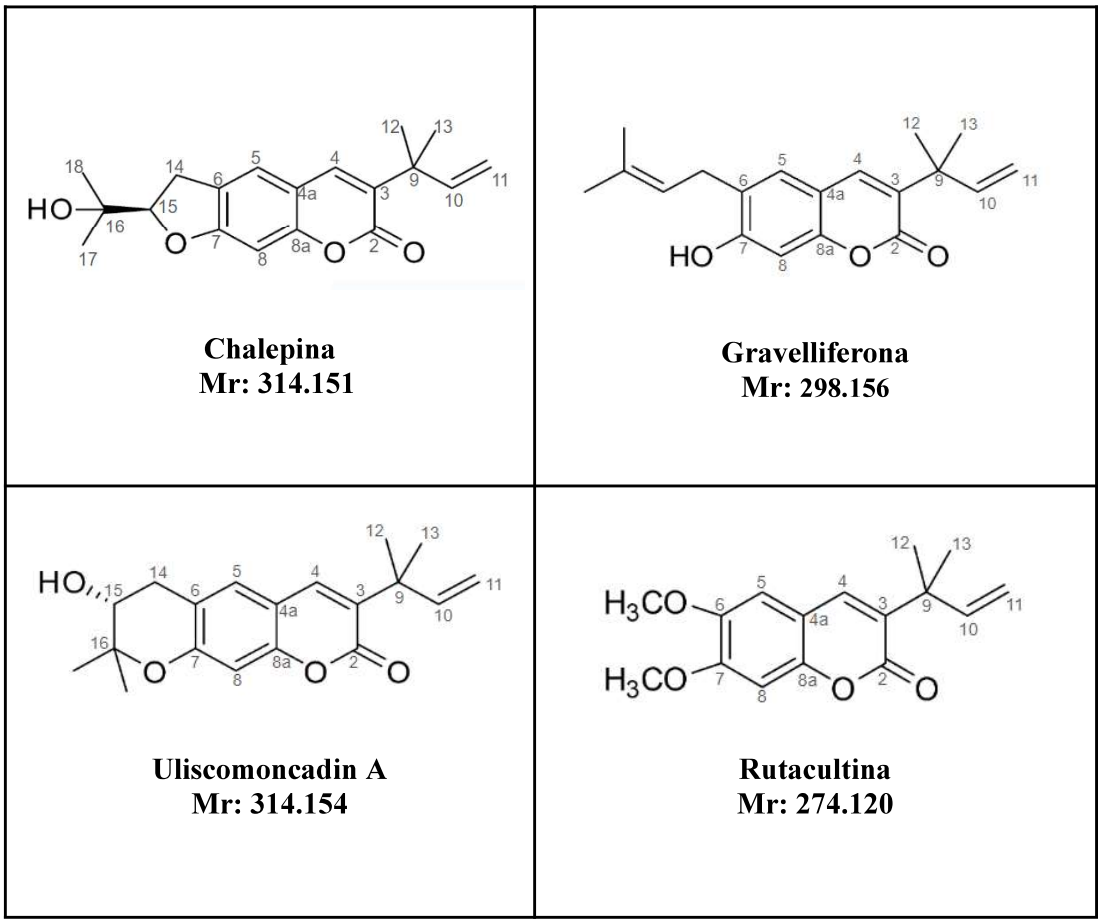


Figura 43: Estructuras químicas de los compuestos aislados a partir del subextracto polar de Canela de Venado (CV CP)

Los mismos fueron probados sobre cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 3-30 µM ≈ 0,7-10 µg/mL. Todos los compuestos, excepto *p-cumarato de metilo* 3μM y *chalepina* 3μM mostraron actividad antiparasitaria significativa con respecto al control negativo. En particular, se observó que la *rutacultina* 30μM y *graveliferona* 30μM presentan una inhibición del crecimiento mayor al 50% (**Figura 44**).

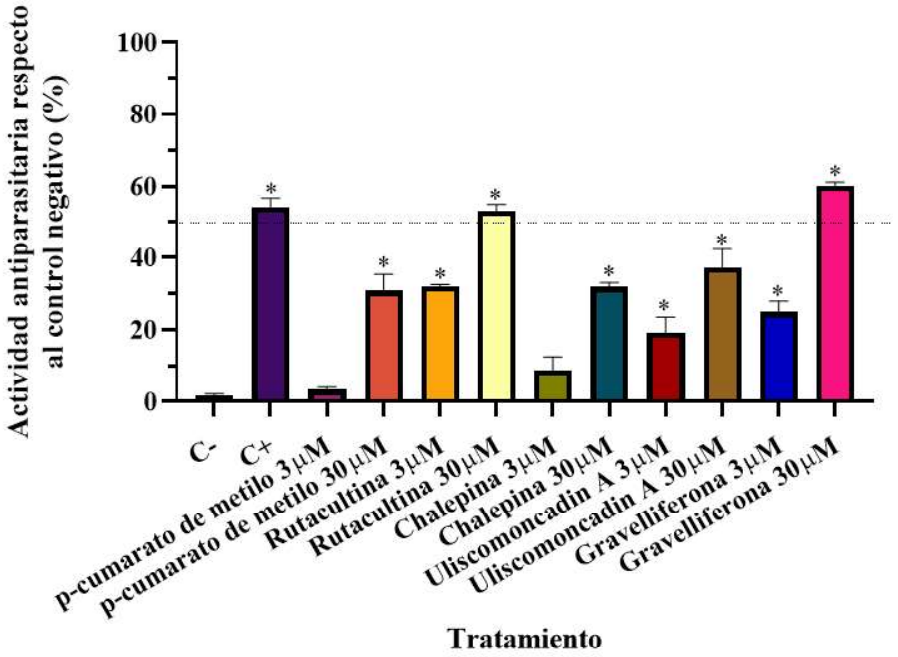


Figura 44: *Actividad antiparasitaria de compuestos aislados a partir del subextracto polar de la corteza de Canela de Venado (CV CP), normalizada respecto al control negativo. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Control negativo, DMSO 0,1%. Control positivo (C+) Nifurtimox Lampit® 2 µg/mL. Las concentraciones de los compuestos:* 3-30 µM ≃ 0,7-10 µg/mL. *(*) Porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA ($p<0.0001$).*

Entre los compuestos aislados que presentaron actividad antiparasitaria significativa, el compuesto *uliscomoncadina A* se sometió a reacciones de funcionalización para la obtención de los derivados semisintéticos 1 y 2 (**Figura 45**), como se describió en la sección 3.2.3.

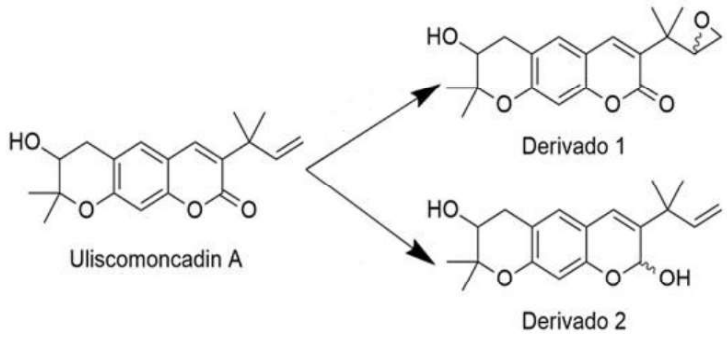


Figura 45: Estructuras del compuesto Uliscomoncadin A y sus derivados

El compuesto base y sus derivados 1 y 2, fueron ensayados sobre epimastigotes a concentraciones de entre 1,25-20 µg/mL ≃ 3,98-64 µM. Se obtuvieron los resultados que se observan en la **Figura 46**, donde se puede apreciar que a las concentraciones de 10 y 20 µg/mL, *uliscomoncadin A* presenta actividad biológica significativa. Por su parte, el *Derivado 1* muestra un efecto antiparasitario muy bajo a las concentraciones de 5, 10 y 20 µg/mL, mientras que el *Derivado 2* no mostró resultados positivos a ninguna de las concentraciones analizada, y por tanto, sus resultados no fueron representados en la figura.

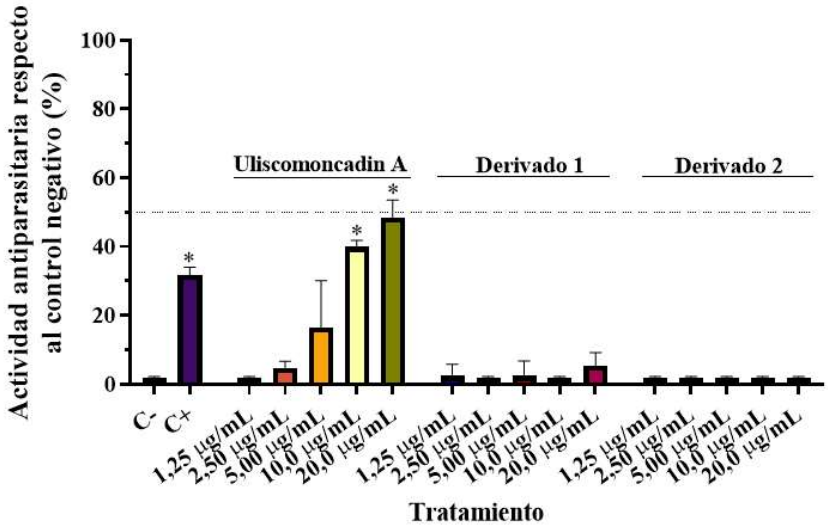


Figura 46: *Actividad antiparasitaria del compuesto uliscomoncadin A y sus derivados, normalizada respecto al control negativo. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Control negativo DMSO 0,1%. Control positivo (C+) Nifurtimox Lampit® 2µg/mL. Las concentraciones de los compuestos: 1,25-20 µg/mL ≃ 3-64 µM. (*) Porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA ($p<0.0001$).*

Por otro lado, el subextracto lipofílico de la corteza (CV CL) fue fraccionado mediante CFCS con mezclas de éter de petróleo y acetato de etilo de polaridad creciente como solvente de elución. Se obtuvieron 6 fracciones Fr.1-Fr.6. El compuesto puro *4-O-prenillcinamato de metilo* fue aislado a partir de la fracción Fr.4 por cromatografía en columna flash con un gradiente de diclorometano y acetato de polaridad creciente. La Fr.5 fue sometida a CFCS-FR lo que permitió obtener una fracción con mezcla de terpenos que fueron purificados por cromatografía de alta resolución (HPLC) de fase reserva como se muestra en la **Figura 47**. Se obtuvieron así los compuestos puros *lupeol*, *δ-amirina* y una mezcla de *isobauerenol e isomultiflorenol,* inseparables en las condiciones utilizadas. Las estructuras de los compuestos obtenidos se muestran en la **Figura 48**.

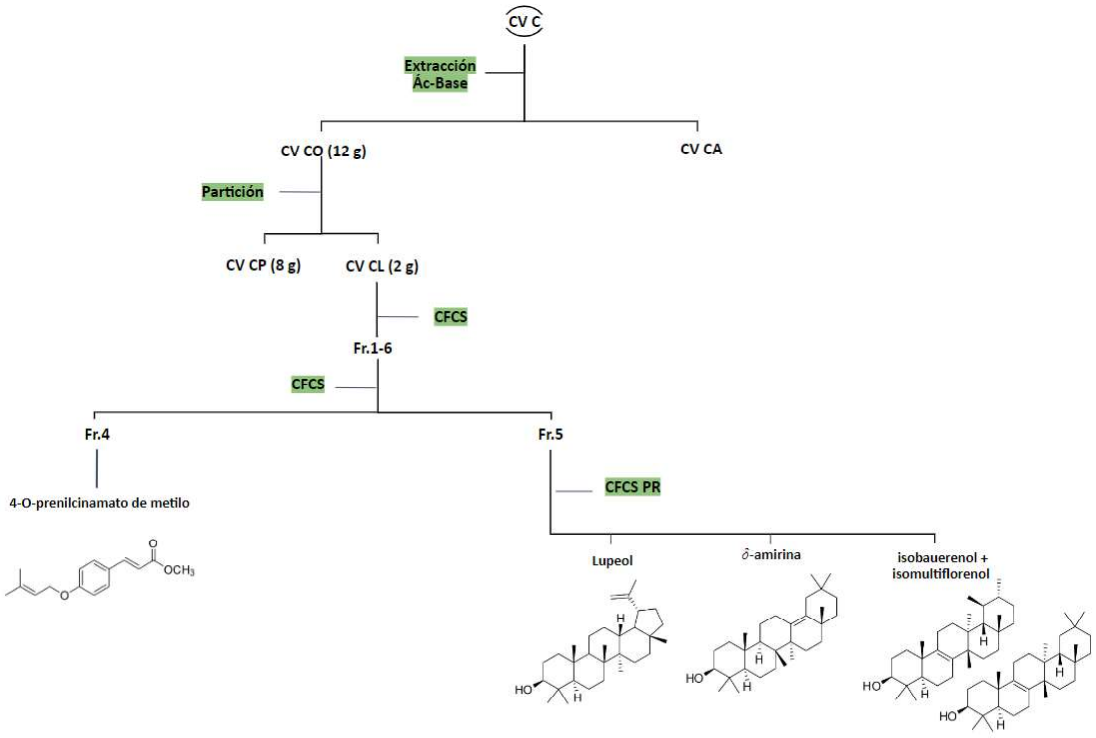
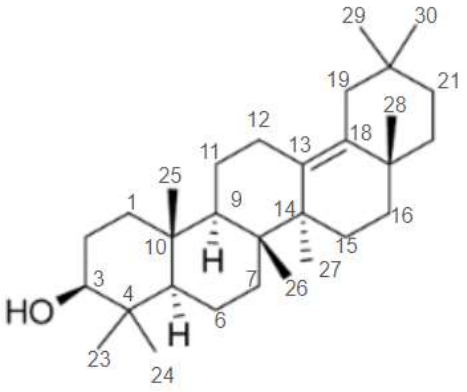
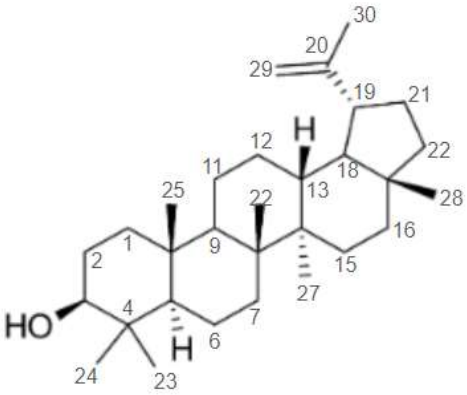


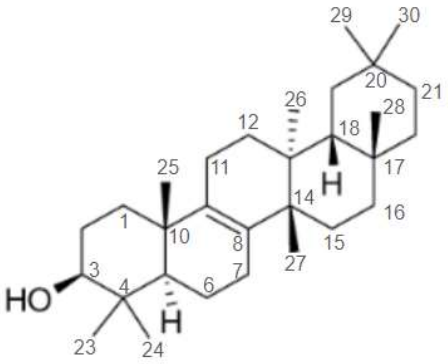
Figura 47: *Esquema de extracción de metabolitos secundarios a partir del subextracto lipofílico de la corteza de Canela de Venado.*



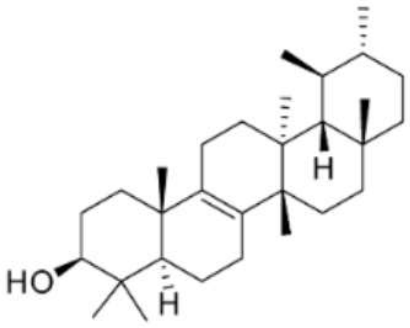
δ-amirina
Mr: 442



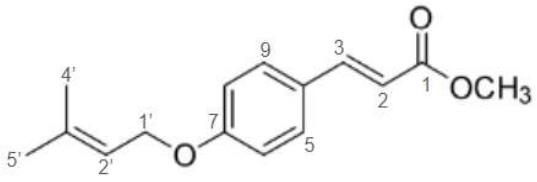
Lupeol
Mr: 442



Isomultiflorenol
Mr: 442



Isobaurenol
Mr: 442



4-O-prenilcinamato de metilo
Mr: 246

Figura 48: Estructuras químicas de los compuestos aislados del subextracto lipofílico de Canela de Venado (CV CL)

Los compuestos obtenidos fueron probados sobre cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 3 μM y 30 μM. Todos los compuestos, excepto la δ-amirina 3μM y lupeol 3μM presentaron una actividad antiparasitaria significativa con respecto al control negativo (**Figura 49**).

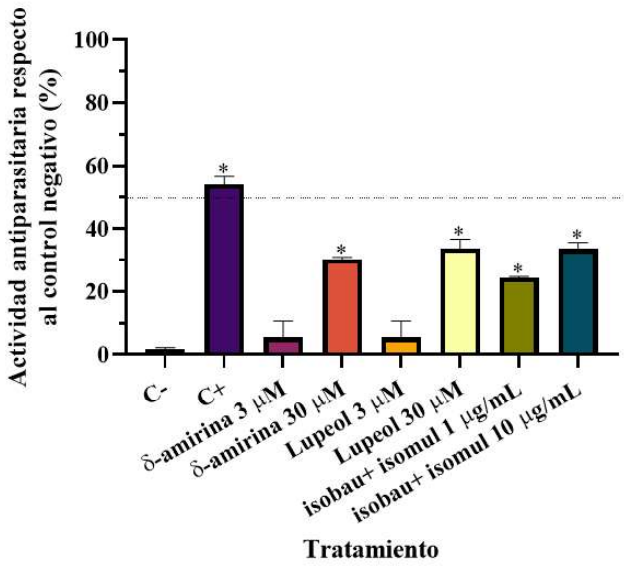


Figura 49: *Actividad antiparasitaria de compuestos aislados, normalizada respecto al control negativo. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Control negativo, DMSO 0,1%. Control positivo (C+) Nifurtimox Lampit® 2μg/mL. Concentraciones de los compuestos: 3-30 μM ≃ 1-13 μg/mL. (*) Porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA ($p<0.0001$).*

5.3. Discusión

Hemos observado que compuestos químicos comerciales y productos naturales que pertenecen a un amplio espectro de clases químicas presentan actividad antiparasitaria contra *T. cruzi.* Además de los fármacos de referencia, nifurtimox y benznidazol, se han ensayado varios productos comerciales utilizados en tratamientos de infecciones bacterianas, y que mostraron actividad tripanocida, pero con poco éxito en las fases clínicas. La furadantina, la nitrofurazona, la furaltona y la furazolidona, son algunos nitrofuranos que presentaron cierta actividad[207]. Por su parte, los nitroimidazoles como el metronidazol y derivados semisintéticos de este fueron descritos con actividad, pero también informaron que producen resistencias debido al metabolismo del fármaco[208]. Algunos pirazoles como el allopurinol parece ser activo frente a *T. cruzi* y resulta menos tóxico que los compuestos de primera línea, pero no se ha mostrado eficaz en pacientes en fase aguda[209].

Las investigaciones etnofarmacológicas, sobre las propiedades tripanoestaticas o tripanocidas de metabolitos secundarios sigue llamando la atención. Aunque en la mayoría de los casos, los mecanismos de acción y sus blancos terapéuticos se desconocen o no han sido demostrados claramente, las enzima trans-sialidasa[210] y la cruzipaína[211] son los objetivos que más se destacan en las bibliografías, aunque también se sostiene que algunos productos naturales interfieren con el equilibrio redox de los parásitos, actuando ya sea en la cadena respiratoria o en las defensas celulares contra el estrés oxidativo produciendo radicales superóxidos[212].

Las especies bajo análisis en esta tesis, son originarias de la selva misionera y su selección se basó principalmente en sus usos tradicionales en la medicina popular. A partir de estas se obtuvieron 7 extractos y 6 subextractos, cuya performance, en los ensayos de actividad biológica, se resumen a continuación.

Varios autores mencionan efectos antiparasitarias contra *Leishmania amazonensis*[213] y *Plasmodium falciparum*[214] a partir de extractos etanólicos de las partes aéreas, para la especie *A. triangularis*, conocida comúnmente como Ysipo Mil Hombre, y acreditan este efecto a la presencia de alcaloides, fenoles y terpenos en los extractos, sin embargo, nuestros análisis no arrojaron resultados significativos en *T. cruzi,* ver **Figura 37**.

Por su parte, la especie *Achillea millefolium* conocida como Milenrama, cuenta con bibliografía que describe la actividad tripanocida de los extractos metanólicos de las partes aéreas sobre cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma evansi*[96], donde se mostraron resultados variables en cuanto a su actividad antiparasitaria. Describen que a concentraciones de 250 µg/ml del extracto, se producía un efecto tripanoestático, mientras que a concentraciones de 1000 µg/ml se observaba un

efecto tripanocida. Nuestros análisis no mostraron actividad antiparasitaria significativa, en epimastigotes, a la máxima concentración utilizada (100 µg/ml). Mayores concentraciones no fueron evaluadas en nuestros ensayos considerando que lo deseado es encontrar compuestos que permitan tener mejores resultados, en cuanto a la actividad antiparasitaria, y la menor citotoxicidad posible a concentraciones menores de las utilizadas con los fármacos de primera línea en el tratamiento de la enfermedad.

Por su parte, los subextractos lipofílicos y polares, así como los extractos puros obtenidos de las hojas (KH) y las semillas (KS) de Karoba (Jacarandá caroba), no mostraron actividad antiparasitaria significativa. Sin embargo, para los extractos de las flores (KF), se identificó una actividad biológica significativa a la concentración máxima examinada. Al desglosar la composición química del extracto de (KF), se encontró como compuesto mayoritario la etiljacaranona, producto de la transesterificación que sufre la jacaranona al estar en contacto con el etanol utilizado durante la maceración del material vegetal. El compuesto estilado fue probado a diferentes concentraciones (2-100 µg/mL), observándose actividad biológica a 100 µg/mL. La jacaranona es un metabolito secundario abundante y de fácil obtención e identificación en diferentes especies vegetales, incluyendo a *Jacarandá caroba.* Existen bibliografías que citan a este compuesto con propiedades antiparasitarias contra *Leishmania sp, Tripanosoma sp y Plasmodium sp*[215]. Se ha descrito específicamente, que la jacaranona, aislada de las hojas de algunas especies de Bignoanaceae, muestra una fuerte actividad contra promastigotes de *L. amazonensis.* Además muestra una débil actividad *in vivo* cuando se administra por vía subcutánea a ratones infectados con *L. amazonensis*[139]. Estos resultados sugieren que el compuesto jacaranona merece evaluaciones más profundas y sistemáticas, dado que ha demostrado repetidamente su potencial como un candidato antiparasitario.

Considerando los resultados descritos para los extractos hidroetanólicos de las partes aéreas de Mámica de Cadela (*Brosimum gaudichaudii),* donde se probaron distintas concentraciones del extracto en ensayos *in vivo* sobre ratones infectados con el estadío tripomastigote mostrando resultados favorables a concentraciones de 100 mg/kg[113], para esta tesis, se decidió analizar el extracto de la corteza de Mámica de Cadela (MdC C), siendo este recurso disponible en cantidades adecuadas para su análisis. Aunque en la bibliografía citada, no se identifica al compuesto responsable de la actividad, se asoció a la presencia de furanocumarinas siendo estos los principales componentes del extracto tanto en las partes aéreas como en la corteza. Nuestros resultados no mostraron actividad antiparasitaria significativa con respecto al control negativo, obteniéndose un porcentaje de inhibición de aproximadamente el 30%.

Para la asteraceae Carqueja Blanca (*Baccharis trimera*), se describe en la literatura, que los extractos etanólicos y algunas de sus fracciones obtenidas de las partes aéreas presentaron actividad contra los amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis* a concentraciones de 133 µg/mL y 1,6 µM, respectivamente. En la fracción analizada, el compuesto mayoritario obtenido fue el flavonoide eupatorina (3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona), al cual se le acreditó el efecto antiparasitario[216]. En nuestros análisis, el extracto obtenido de las partes aéreas, presentó actividad biológica significativa, a la mayor concentración analizada (100 µg/mL), sin embargo, los dos productos mayoritarios purificados (*acetato de articulina y gaudichaudiósido A)*, no presentaron efecto sobre los epimastigotes a las concentraciones ensayadas. Esto parecería indicar que o bien se necesitan concentraciones mayores de los mismos o, que el compuesto responsable de la actividad es minoritario en el extracto y no se pudo identificar al contar con muy poca cantidad del mismo.

Los terpenos, alcaloides y las cumarinas son algunos de los productos naturales más abundantes y de fácil obtención a partir de las partes aéreas y corteza en la planta conocida popularmente como Canela de Venado (*Helietta apiculata*). Se describe que en muchas especies vegetales, estos grupos de compuestos presentan actividad biológica en promastigotes de algunas especies de *Leishmania*[129]. En nuestros análisis, los subextractos polares y lipofílicos de la corteza (CV CP y CV CL, respectivamente), así como también, el subextracto polar de las hojas (CV HP), presentaron actividad biológica a la máxima concentración analizada. Los subextractos polares y lipofílicos de la corteza fueron procesados hasta la obtención de compuestos aislados que posteriormente fueron identificados y agrupados en tres grupos: cumarinas (*rutacultina, chalepina, gravelliferona y uliscomoncadin A*); terpenoides (triterpenos pentacíclicos), (δ-amirina, lupeol, Isomultiflorenol y Isobauerenol); y el ácido-trans-cinámico, p-cumarato de metilo.

Las cumarinas *uliscomoncadin A* y *chalepina* fueron los compuestos mayoritarios obtenidos en nuestras muestras de Canela de Venado. Existe bibliografía que cita la interacción de la *chalepina* con la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa glucosómica (gGAPDH) con un posible efecto tripanocida[217]. Los autores de este análisis, caracterizaron el complejo *gGAPDH-chalepina*, y sugirieron que se podría mejorar el efecto de la interacción con algunas modificaciones estructurales en la chalepina, reemplazando el grupo 1,1-dimetilalilo por heteroátomos como nitrógeno, oxígeno o halógenos. Partiendo de este enunciado y teniendo en consideración que el compuesto uliscomoncanina A tiene una estructura química muy similar a la *chalepina*, que comparten el mismo grupo funcional y la disponibilidad del material químico, se decidió realizar modificaciones químicas estructurales sobre el 1,1-dimetilalilo y la lactona del *uliscomoncanin A*. De esa forma se obtuvieron los *derivados 1 y 2*, que fueron ensayados *in vitro* frente a los epimastigotes de *T. cruzi*

para medir su actividad, observándose una pérdida de actividad para todos los derivados semisintéticos.

Análisis *in vitro* e *in sílico* describen a los terpenoides *acetato de lupeol* y *α-amirina* con actividad antiparasitaria moderada en tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi.* Estos resultados indican que estos compuestos podrían actuar como potenciales inhibidores de la enzima cisteína sintasa del parásito (TcCS)[218], lo cual tiene implicancias significativas en la búsqueda de estrategias antiparasitarias efectivas. Entre los triterpenos obtenidos en nuestro estudio, se encuentran el *lupeol*, perteneciente a la serie lupeno como lo es el acetato de lupeol, y el triterpeno amirénico, *δ-amirina*. Estos compuestos mostraron actividad biológica en epimastigotes con un alcance del 20-30%, a concentraciones máximas de 30 µM. Por otro lado, es relevante señalar que no se encontró en la literatura previa, información sobre la actividad antiparasitaria de los triterpenos *Isomultiflorenol e Isobauerenol* en *T. cruzi.* Este hecho podría sugerir que nuestros resultados son los primeros al evidenciar una actividad biológica a 10 µM para una mezcla de estos compuestos, la cual lamentablemente no pudo ser separada para un análisis más detallado.

Es importante destacar que existe el consenso de utilizar concentraciones de 10 µg/mL para los extractos crudos y de 1 µg/mL para los compuestos puros aislados y que son utilizados en los ensayos *in vitro* frente a amastigotes intracelulares para la búsqueda de compuestos con potencial actividad tripanocida[219]. Sobre la base de esto último, y considerando la sensibilidad variable de los diferentes estadios del *T. cruzi*, en este trabajo de tesis, las pruebas de actividad se realizaron a las concentraciones mencionadas y a concentraciones de hasta 10 veces mayor en algunos casos. Así, los extractos crudos se evaluaron a concentraciones de entre 10-100 µg/mL, mientras que los compuestos puros aislados se analizaron a concentraciones de entre 1 y 20 µg/mL (o su equivalencia correspondiente en concentraciones micromolares).

Hasta este punto de nuestro análisis, es fundamental destacar que entre todos los extractos y subextractos analizados, se han identificado cinco (5) que presentaron una actividad biológica: el extracto de las hojas de Carqueja Blanca (CB H); el extracto de las flores de Caroba (KF); la fracción polar del subextracto de las hojas de Canela de Venado (CV HP); la fracción lipofílica del subextracto de la corteza de Canela de Venado (CV CL) y la fracción polar del subextracto de la corteza de Canela de Venado (CV CP). Además, resaltar el logro del aislamiento y la identificación de 13 compuestos puros (*etiljacaranona, acetato de articulina, gaudichaudiósido A, rutacultina, 4-O-prenilcinamato de metilo, chalepina, gravelliferona, uliscomoncadina A, δ-amirina, lupeol, Isomultiflorenol e Isobauerenol*, p-cumarato de metilo), y la obtención de los derivados

semisintéticos 1 y 2 a partir del compuesto *uliscomancadin A*, marcando un logro importante en nuestro proceso de investigación.

Si bien es cierto que en nuestros ensayos se utilizaron altas concentraciones de los extractos puros y los compuestos aislados para observar un efecto antiparasitario significativo, los resultados obtenidos sugieren que algunos productos poseen un gran potencial como candidatos en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de chagas. Así también, respaldan su relevancia como compuestos naturales que podrían dar origen a derivados semisintéticos, mediante modificaciones estructurales en los compuestos base, que tuvieran mejores efectos antiparasitarios a menores concentraciones. Muchos de estos compuestos, han demostrado presentar actividad sobre *Leishmania sp*, esto no es de extrañar considerando la relación filogenética y bioquímica de los géneros *Trypanosoma y Leishmania*[220,221].

Por otro lado, cabe mencionar que el uso de cultivos axénicos de epimastigotes de *T. cruzi*, en la mayoría de las pruebas de actividad biológica, se considera ventajosa en virtud de las demandas estructurales del laboratorio. Así también, este estadio resulta eficaz para la identificación de compuestos activos. Sin embargo, esta aproximación tiene sus limitaciones, principalmente porque no considera los estadios infectivos del parásito.

Los compuestos aislados que han presentado actividad biológica y demostraron potencial como agentes tripanocidas merecen una evaluación exhaustiva en todos los estadios del parásito. Además, es fundamental llevar a cabo un minucioso análisis molecular con el propósito de identificar los posibles mecanismos de acción y los blancos moleculares en el *T. cruzi.*

Adoptar un enfoque integrado en esta dirección podría revelar compuestos líderes de gran relevancia para el desarrollo de medicamentos mejorados, los cuales son imperativos en la lucha contra la enfermedad de Chagas. Esto, a su vez, abre nuevas perspectivas para investigaciones orientadas al aislamiento y elucidación de sustancias o compuestos, así como para la comprensión profunda de sus mecanismos de acción.

6. Capítulo III

Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiparasitaria de compuestos puros y semisintéticos aislados del Guatambú blanco.

6.1. Objetivo Específico e Hipótesis

Balfourodendron riedelianum, conocida comúnmente como "Guatambú blanco" es una de las principales especies arbóreas de la selva misionera de Argentina. La corteza de *B. riedelianum* produce grandes cantidades de los alcaloides de furoquinolina kokusaginina y flindersiamina[222]. Existen numerosas actividades biológicas reportadas, en la literatura, para ambos alcaloides, como actividad antimicrobiana, fungicida, antifouling e incluso se le atribuyen propiedades antiparasitarias contra la malaria[223]. Todos estos resultados son evidencia de posibles interacciones entre los alcaloides de furoquinolina y diferentes blancos biológicos. Así también, se sabe que los derivados de quinolina tienen efecto antiparasitario contra *Leishmania spp*. y tripanosomas, y algunos quinolones sintéticos sustituidos en la posición C4 han mostrado una mayor actividad contra *T. cruzi,* en comparación con sus precursores[224,225]. Estos resultados previos respaldaron la exploración de las posibilidades semisintéticas de estos compuestos base, con el fin de mejorar sus conocidas actividades biológicas.

El objetivo de este capítulo es el análisis de la actividad antiparasitaria de los compuestos puros kokusaginina y flindersimina y sus derivados semisintéticos obtenidos a partir del Guatambú blanco, contra cultivos axénicos de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, así como también, contra el estadio intracelular amastigote.

La hipótesis que se propone, es que modificaciones estructurales en los compuestos obtenidos en esta especie vegetal, mejoran la actividad biológica de estos compuestos sobre los diferentes estadios de *T. cruzi.*

6.2. Resultados

Del procesamiento de la corteza del Guatambú blanco (*Balfourodendron riedelianum*), se obtuvieron los compuestos *Kukusaginina* y *Flindersamina* (**Figura 49**).

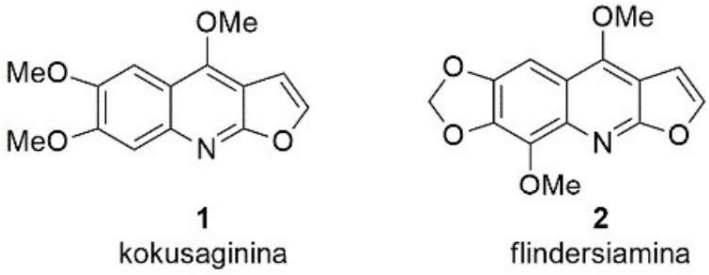


Figura 49: *Estructuras químicas de los compuestos kokusaginina y flindersiamina.*

Mediante reacciones de sustitución se obtuvieron derivados bromados que se utilizaron para generar aminas, reemplazando el grupo R^4 por diferentes sustituyentes (**Figuras 50 y 51**).

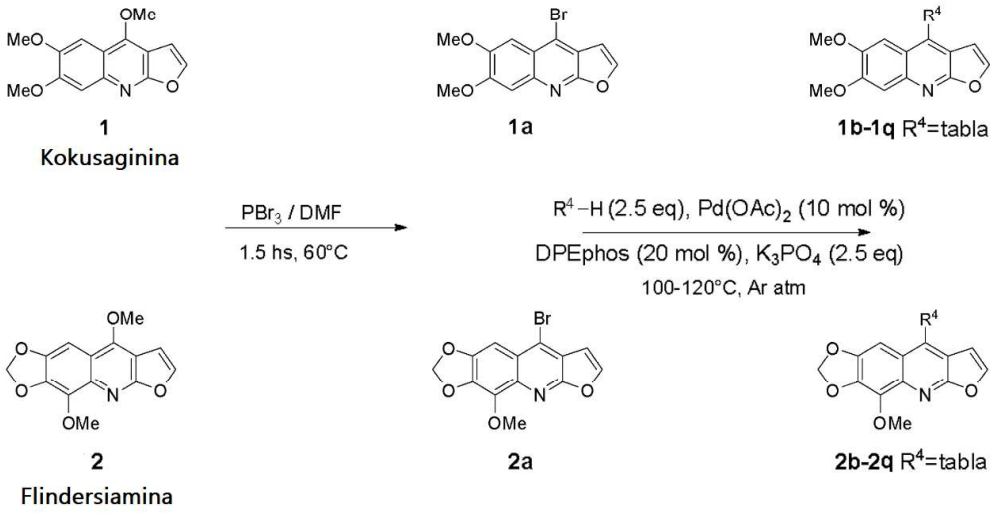
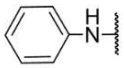
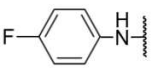
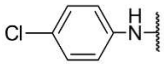
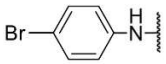
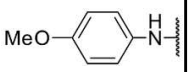
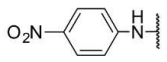
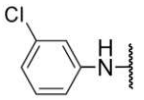
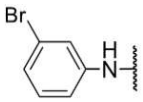
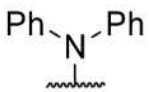
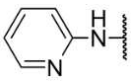


Figura 50: *Proceso de obtención de los derivados bromados y las anilinas. A, estructuras de los compuestos base kokusaginina (1) y flindersiamina (2). B, derivados bromados de kokusaginina (1a) y flindersiamina (2a). C, producto final de las sustituciones del Br por los distintos sustituyentes (R^4=aminas primarias y secundarias).*

	b	c	d	e	f
R^4					

	g	h	i	j	k
R^4					

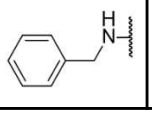
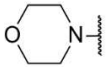
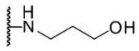
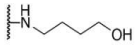
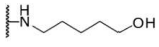
	l	m	n	o	p
R^4					

Figura 51: *Sustituyentes R^4, para los derivados bromados.*

Los compuestos puros y la mayoría de sus derivados fueron evaluados sobre epimastigotes a concentraciones de 1 μg/mL y 10 μg/mL ≃ 25,0–38,5 μM. A 1μg/mL ninguno de los compuestos presentó un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de parásitos.

Los resultados obtenidos para *Kokusaginina* (1) y sus derivados, a 10 μg/mL, se presentan en la **Figura 52**. Aquí se pudo observar que los compuestos derivados 1b-1i presentan una actividad antiparasitaria de entre 30-75% con respecto al control negativo, en comparación a sus respectivos compuestos base y derivado bromado (1 y 1a, respectivamente). En particular, los compuestos 1c, 1d, 1e y 1f, presentan una capacidad de inhibición de más del 60%, un porcentaje superior al control positivo (C+), destacándose el compuesto 1e con casi el 75% de inhibición.

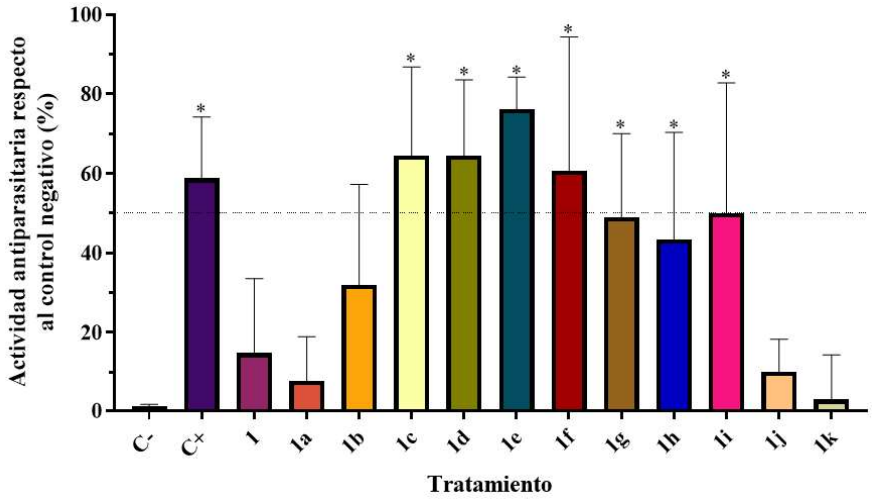


Figura 52: *Actividad antiparasitaria de kokusaginina y sus derivados, normalizada respecto al control negativo. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Control negativo, DMSO 0,1%. Control positivo (C+) Nifurtimox Lampit® 2µg/mL. Concentración de los compuestos 10 µg/mL ≈ 25,0–38,5 µM. (*) Porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA ($p<0.0001$).*

Para *Flindersiamina* (2) y sus derivados, se obtuvieron los resultados observados en la **Figura 53** a una concentración de 10 µg/mL. Aquí se observa que los compuestos derivados (2b-2h, 2k, 2l y 2n) tienen un mejor efecto antiparasitario, sobre los epimastigotes, que los compuestos base (2) y el derivado bromado (2a). Salvo el compuesto 2d que presentó una capacidad de inhibición de aproximadamente 47%, los compuestos 2b, 2c, 2e, 2f, 2g, 2h, 2k, 2l, 2n, presentaron actividad antiparasitaria de entre 60-95%, superior al control positivo (C+) que presenta una actividad de aproximadamente 52%. Los demás compuestos no mostraron actividad significativa en nuestros análisis.

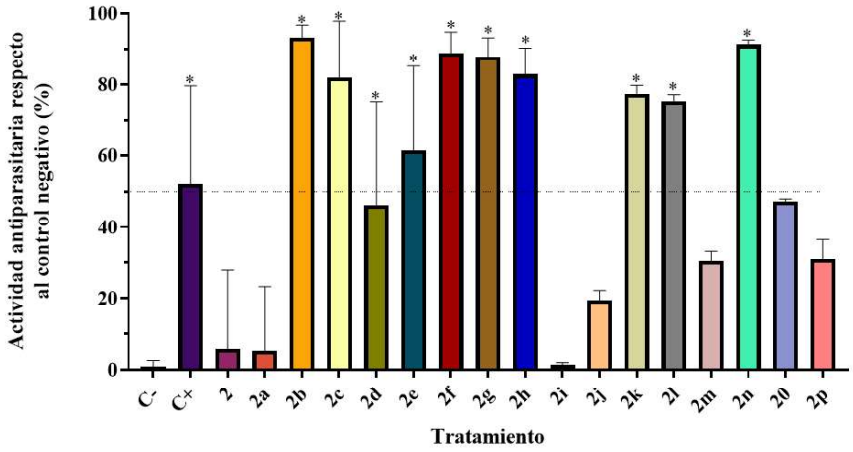


Figura 53: *Actividad antiparasitaria de flindersiamina y sus derivados, normalizada respecto al control negativo. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Control negativo, DMSO 0,1%. Control positivo (C+) Nifurtimox Lampit® 2µg/mL. Concentración de los compuestos 10 µg/mL ≃ 25,0–38,5 µM. (*) Porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA ($p<0.0001$).*

Ante la buena performance de los compuestos derivados, se procedió a una caracterización de mayor profundidad, que permita analizar la posible viabilidad de estos compuestos como potenciales candidatos para drogas antiparasitarias. En la **Tabla 10**, se muestran los resultados de la CC50 calculada en las líneas celulares NRK y HeLa, seguido por los valores calculados de la IC50 en cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi* RA/YWT. Finalmente, estos resultados fueron utilizados para obtener los índices de selectividad mediante la relación entre la CC50 de las líneas celulares y la IC50 de la actividad antiparasitaria calculada, considerando que cuanto mayor sea el IS, mayor será la actividad antiparasitaria selectiva del extracto o compuesto en cuestión. Aquellos compuestos cuyo índice de selectividad (IS) fueron iguales o mayores a 20, fueron analizados sobre los amastigotes (formas proliferativas intracelulares presentes en el huésped mamífero) de la cepa Y.

Tabla 10 *Caracterización de la citotoxicidad, actividad biológica en tripomastigotes e índice de selectividad de los compuestos de interés*								
Compuesto	**Citotoxicidad (CC50 µM)**		**Actividad anti-tripomastigote (IC50 µM)**		**Índice de selectividad (IS)**			
	Hela	**NRK**	**Cepa RA**	**Cepa Y**	**Hela/RA**	**Hela/Y**	**NRK/RA**	**NRK/Y**
2b	42.3±1.6	36.2±0.3	-	27.38	-	1.5	-	1.3
1c / 2c	78.6±0.3/31.6±0.6	16.4±0.3/30.0±1.5	1.9±0.3/>14.2	3.0±0.6/40.1±7.0	41/<2	26/0.8	9/<2.1	5/0.8
1d / 2d	7.1±0.8/46.0±5.1	10.1±0.5/114.9±12.8	-	>14.1/>20	-	<0.5/<2.3	-	<0.7/<5.5
1e / 2e	70.7±9.0/22.8±2.5	17.0±0.6/16.7±0.8	3.6±0.4/ >12.1	1.0±0.4/50.2	20/<2	71/0.5	5/<1.3	17/0.3
1f / 2f	93.2±29.0/28.3±2.3	26.7±0.2/12.0±0.4	-/>13.7	>20/>20	-/2	<4,6/<1.5	-/<0.8	<1,3/<1
1g / 2g	26.3±1.6/159.4±30.1	112.5±3.0/232.0±4.6	-/>26.3	>20/>20	-/<6	<1/<8	-/<0,5	<6/<12
1h / 2h	43.3±2.0/31.4±0.2	49.9±2.4/36.0±0.3	-	38.9±7.0/27.4±3.0	-	1.1/1.5	-	1.3/1.3
1i	45.4±1.5	33.5±3.3	-	31.6±10.0	-	1.4	-	1.1
2k	11.7±0.3	21.5±0.5	-	>20	-	<1	-	<2
2l	24.7± 0.7	17.4±0.3	-	>20	-	<2	-	<1
2n	16.5±2.7	44.9±0.4	-	>20	-	<1	-	<3
C+: Nifurtimox ELEA® 2 µg/mL (6,9 µM).								

Los compuestos 1c y 1e mostraron una mejor actividad *in vitro* contra los tripomastigotes que el nifurtimox (control positivo) con IC50 <4 µM. Además, ninguno de los compuestos resultó citotóxicos contra las líneas celulares analizadas. Así también, cuando se evaluaron contra los amastigotes intracelulares, y los tripomastigotes liberados, el compuesto 1c fue capaz de reducir significativamente el número de estos, en comparación con el control negativo (DMSO 0,1%) **Figura 54**.

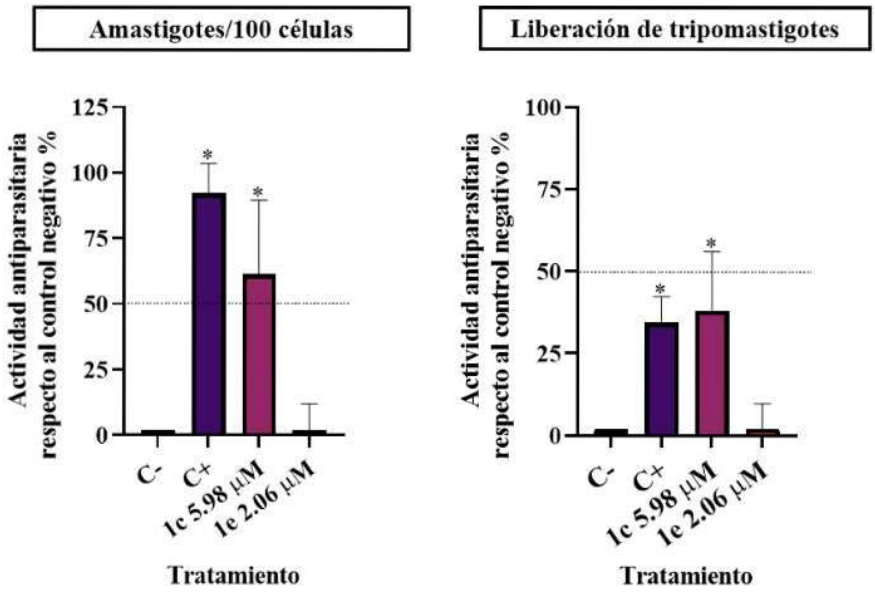


Figura 54. *Efecto del compuesto 1c y 1e sobre los amastigotes intracelulares de la cepa Y y tripomastigotes liberados a los 7 días post infección (d.p.i.). Control negativo, DMSO 0,1%. Control positivo (C+) Nifurtimox Lampit® 2µg/mL. Los datos se representan como el promedio de triplicados, la barra de error corresponde a la desviación estándar (SD) del promedio. Los (*), representan a los porcentajes considerados significativos en los análisis estadísticos por ANOVA: * $p<0.01$.*

6.3. Discusión

En este capítulo se presentan los ensayos del cribado *in vitro* contra *T. cruzi* para los compuestos kokusaginina (1) y flindersiamina (2), además de sus derivados, con el objetivo de encontrar compuestos que sean activos contra los tres estadios del parásito.

Como primer enfoque para evaluar la actividad antiparasitaria y citotóxica potencial del Guatambú blanco, se evaluó la toxicidad de los compuestos contra los epimastigotes de *T. cruzi* (formas extracelulares no infecciosas y proliferativas presentes en el insecto vector conocido como vinchuca) de la cepa Y, así como su citotoxicidad contra las líneas celulares HeLa y NRK.

Los epimastigotes fueron tratados a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml de los alcaloides. Aunque ninguno de los compuestos probados mostró inhibición del crecimiento a 1 µg/ml, se observaron efectos inhibitorios significativos para 1b-i y 2b-h/k,l,n, a 10 µg/ml (**Figuras 52 y 53**), estos datos fueron expresados como porcentaje de inhibición de crecimiento de los epimastigotes en relación con el control negativo. Cabe destacar que ni los alcaloides base 1 y 2, ni sus productos bromados, 1a y 2a, fueron activos contra los parásitos en las concentraciones evaluadas. En general, se pudo observar que los derivados de flindersiamina fueron más activos que los obtenidos a partir de kokusaginina.

Aunque existe un consenso en desconsiderar el uso de epimastigotes de *T. cruzi* para el cribado inicial de bibliotecas de compuestos como una única prueba, reemplazándola por el uso de amastigotes intracelulares que persisten en la fase crónica de la infección, la búsqueda de compuestos contra *T. cruzi* que afecten a todas las etapas del parásito sigue siendo un enfoque en debate. Esto es especialmente útil cuando se estudia un objetivo molecular o una vía metabólica similar. Además, un fármaco que sea activo contra todas las etapas del parásito evita el problema de la expresión diferencial dependiente de la etapa del blanco molecular.

Considerando esto último, aquellos compuestos que no fueron considerados citotóxicos y presentaron actividad biológica en epimastigotes, fueron ensayados sobre cultivos de tripomastigotes (forma infecciosa y no proliferativa presente en el huésped mamífero) de las cepas RA e Y. Aquellos cuyo índice de selectividad (IS) fueron iguales o mayores a 20, fueron analizados sobre los amastigotes (formas proliferativas intracelulares presentes en el huésped mamífero) de la cepa Y y sobre tripomastigotes liberados.

Dos de los candidatos, los compuestos 1c y 1e, se destacaron por su efecto dual contra los estadios epimastigotes (cepa Y) y tripomastigotes (cepas RA e Y), con una alta inhibición del crecimiento para la forma no infecciosa (epimastigotes) y valores bajos de IC50 para la forma infecciosa (tripomastigotes).

Contrariamente a los resultados observados contra los epimastigotes, los tripomastigotes fueron más afectados por los derivados de la serie de kokusaginina que por los de la serie de flindersiamina. Además, ambos compuestos mostraron citotoxicidad muy baja contra líneas celulares diferentes. Los índices de selectividad también fueron relativamente altos contra ambas cepas de tripomastigotes (1c: 41.0 para RA y 26.0 para Y; 1e:20.0 para RA y 71.0 para Y).

Como se muestra en la **Figura 54**, el compuesto 1c produjo una disminución en el número de amastigotes (cepa Y) y en los tripomastigotes liberados a los 7 días post infección, en comparación con el control negativo (DMSO 0,1%) en la concentración más alta probada (5,98 µM), sin citotoxicidad hacia las células hospedadoras (IC50 en células Hela a las 48 horas 78,6±0,3 µM). De esta manera, se observó que el compuesto 1c fue capaz de ejercer un efecto sobre las tres etapas de desarrollo del *T. cruzi,* por lo que puede ser un candidato adecuado para un análisis farmacológico más profundo. Estos resultados están en línea con nuestro objetivo de obtener compuestos prometedores como punto de partida para el desarrollo de nuevas terapias contra la enfermedad de Chagas. Los resultados de este capítulo se encuentran publicados en la revista *ChemMedChem* https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cmdc.202100784

De esta manera, los alcaloides de furoquinolina sustituidos en C-4 se convierten ahora en andamios interesantes para el desarrollo de nuevos compuestos tripanocidas, y abren la posibilidad de realizar modificaciones estructurales adicionales y estudios de relación estructura-actividad. Al mismo tiempo, el descubrimiento de actividades biológicas para los metabolitos del Guatambú y sus derivados puede promover el uso medicinal y sostenible de *B. riedelianum* e impulsar la preservación de esta especie, que se considera en peligro de extinción desde 1998, y promover los proyectos de reforestación que actualmente están en acción.

7. Referencias

(1) World Health Organization; UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; Pan American Health Organization. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas : 17-20 de abril de 2005, actualizado en julio de 2007, Buenos Aires, Argentina./ Editado por Felipe Guhl y Janis K. Lazdins-Helds. **2007**, No. TDR/GTC/09.

(2) Rassi, A.; Rassi, A.; Marcondes de Rezende, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2012**, *26* (2), 275–291. https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002.

(3) *Hoja informativa detallada*. https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/informativa/detallada.html (accessed 2023-04-17).

(4) Simpson, A. G. B.; Stevens, J. R.; Lukes, J. The Evolution and Diversity of Kinetoplastid Flagellates. *Trends Parasitol.* **2006**, *22* (4), 168–174. https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.006.

(5) Justi, S. A.; Galvão, C. The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends Parasitol.* **2017**, *33* (1), 42–52. https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.002.

(6) Peña-Callejas, G.; González, J.; Cortés, J. G.; De Fuentes-Vicente, J.; Salazar-Schettino, P.; Bucio, M.; Cabrera-Bravo, M.; Flores-Villegas, A. Chagas Disease: Biology and Transmission of Trypanosoma Cruzi. *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas* **2022**, *25*, 1–19. https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.

(7) Rassi, A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet Lond. Engl.* **2010**, *375* (9723), 1388–1402. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X.

(8) Moretti, N. S.; Mortara, R. A.; Schenkman, S. Trypanosoma Cruzi. *Trends Parasitol.* **2020**, *36* (4), 404–405. https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002.

(9) Álvarez-Hernández, D.-A.; Franyuti-Kelly, G.-A.; Díaz-López-Silva, R.; González-Chávez, A.-M.; González-Hermosillo-Cornejo, D.; Vázquez-López, R. Chagas Disease: Current Perspectives on a Forgotten Disease. *Rev. Médica Hosp. Gen. México* **2018**, *81* (3), 154–164. https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.010.

(10) Vianna Martins, A.; Patrícia Gomes, A.; de Mendonça, E. G.; Rangel Fietto, J. L.; Alberto Santana, L.; de Almeida Oliveira, M. G.; Geller, M.; Freitas Santos, R. de; Roger Vitorino, R.; Siqueira-Batista, R. Biology of Trypanosoma Cruzi: An Update. *Infectio* **2012**, *16* (1), 45–58. https://doi.org/10.1016/S0123-9392(12)70057-7.

(11) Garcia, E. S.; Genta, F. A.; de Azambuja, P.; Schaub, G. A. Interactions between Intestinal Compounds of Triatomines and Trypanosoma Cruzi. *Trends Parasitol.* **2010**, *26* (10), 499–505. https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.07.003.

(12) Onyekwelu, K. C. *Life Cycle of Trypanosoma Cruzi</Em> in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts*; IntechOpen, 2019. https://doi.org/10.5772/intechopen.84639.

(13) Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P. H.; Souza, W. de. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma Cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6* (8), e1749. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749.

(14) Zingales, B. Trypanosoma Cruzi Genetic Diversity: Something New for Something Known about Chagas Disease Manifestations, Serodiagnosis and Drug Sensitivity. *Acta Trop.* **2018**, *184*, 38–52. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017.

(15) Tibayrenc, M. Genetic Epidemiology of Parasitic Protozoa and Other Infectious Agents: The Need for an Integrated Approach. *Int. J. Parasitol.* **1998**, *28* (1), 85–104. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00180-x.

(16) Lima, L.; Espinosa-Álvarez, O.; Ortiz, P. A.; Trejo-Varón, J. A.; Carranza, J. C.; Pinto, C. M.; Serrano, M. G.; Buck, G. A.; Camargo, E. P.; Teixeira, M. M. G. Genetic Diversity of Trypanosoma Cruzi in Bats, and Multilocus Phylogenetic and Phylogeographical Analyses Supporting Tcbat as an Independent DTU (Discrete Typing Unit). *Acta Trop.* **2015**, *151*, 166–177. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015.

(17) Zingales, B.; Miles, M. A.; Campbell, D. A.; Tibayrenc, M.; Macedo, A. M.; Teixeira, M. M. G.; Schijman, A. G.; Llewellyn, M. S.; Lages-Silva, E.; Machado, C. R.; Andrade, S. G.; Sturm, N. R. The Revised Trypanosoma Cruzi Subspecific Nomenclature: Rationale, Epidemiological

Relevance and Research Applications. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2012**, *12* (2), 240–253. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009.
(18) Galvão, C.; Carcavallo, R.; Rocha, D. D. S.; Jurberg, J. <p>A Checklist of the Current Valid Species of the Subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and Their Geographical Distribution, with Nomenclatural and Taxonomic Notes</Strong></P>. *Zootaxa* **2003**, *202* (1), 1–36. https://doi.org/10.11646/zootaxa.202.1.1.
(19) Lenz, R. *Diccionario etimológico: de las voces chilenas derivadas de lenguas indígenas americanas*; Universidad de Chile, Seminario de Filología Hispánica, 1980.
(20) Dujardin, J. P.; Schofield, C. J.; Tibayrenc, M. Population Structure of Andean Triatoma Infestans: Allozyme Frequencies and Their Epidemiological Relevance. *Med. Vet. Entomol.* **1998**, *12* (1), 20–29. https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.1998.00076.x.
(21) Lent, H.; Wygodzinsky, P. W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and Their Significance as Vectors of Chagas' Disease. Bulletin of the AMNH ; v. 163, Article 3. *Triatominae* **1979**.
(22) Dujardin, J. P.; Bermudez, H.; Casini, C.; Schofield, C. J.; Tibayrenc, M. Metric Differences Between Silvatic and Domestic Triatoma Infestans (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *J. Med. Entomol.* **1997**, *34* (5), 544–551. https://doi.org/10.1093/jmedent/34.5.544.
(23) Peixoto, S.; Belintani, T.; Rocha, D.; Fontes, F.; Frota, N.; Galvão, C. Characterization of Triatoma Infestans (Klug, 1834) (Hemiptera: Heteroptera, Reduviidae) from Residual Foci in the States of Bahia and Rio Grande Do Sul, Brazil, Using Geometric Morphology. *Insects* **2023**, *14* (4), 325. https://doi.org/10.3390/insects14040325.
(24) Ronderos, R. A.; Schnack, J. A.; Mauri, R. A. Resultados preliminares respecto de la ecologiá de Triatoma infestans (Klug) y especies congenéricas con referencia especial a poblaciones peridomiciliarias. *Med. BAires* **1980**, 187–196.
(25) Rocha, D.; Galvão, C.; Jurberg, J.; Carcavallo, R. Caracterizacion Morfologica de Triatoma Infestans (Klug, 1834) Del Estado de Veracruz México (Hemiptera, Reduviidae). *Entomol. Vectores* **2002**, *9*, 423–429.
(26) Cazorla-Perfetti, D. Revisión De Los Vectores De La Enfermedad De Chagas En Venezuela (hemiptera-Heteroptera, Reduviidae, Triatominae). *SABER Rev. Multidiscip. Cons. Investig. Univ. Oriente* **2016**, *28* (3), 387–470.
(27) *Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara*. https://www2.fcfar.unesp.br/#!/triatominae/subfamilia-triatominae/triatoma/triatoma-infestans/ (accessed 2023-09-04).
(28) *La herramienta que impulsa el ritmo de la investigación*. https://www.conicet.gov.ar/?post_type=post&p=43048 (accessed 2023-09-04).
(29) Chagas, C. CARLOS CHAGAS, PIONERO DE LA SALUD EN EL INTERIOR DEL BRASIL. 14.
(30) Lewinsohn, R. Carlos Chagas (1879-1934): The Discovery of Trypanosoma Cruzi and of American Trypanosomiasis (Foot-Notes to the History of Chagas's Disease). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1979**, *73* (5), 513–523. https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90042-7.
(31) Kropf, S. P.; Sá, M. R. The Discovery of Trypanosoma Cruzi and Chagas Disease (1908-1909): Tropical Medicine in Brazil. *Hist. Cienc. Saude--Manguinhos* **2009**, *16 Suppl 1*, 13–34. https://doi.org/10.1590/s0104-59702009000500002.
(32) Lidani, K. C. F.; Andrade, F. A.; Bavia, L.; Damasceno, F. S.; Beltrame, M. H.; Messias-Reason, I. J.; Sandri, T. L. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Health* **2019**, *7*, 166. https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166.
(33) Lewinsohn, R. Carlos Chagas and the Discovery of Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). *J. R. Soc. Med.* **1981**, *74* (6), 451–455. https://doi.org/10.1177/014107688107400612.
(34) Bestetti, R. The Non-Award of the Nobel Prize of 1921 to Carlos Chagas: A Tragic Mistake. *J. Infect. Dis. Ther.* **2015**, *03*. https://doi.org/10.4172/2332-0877.1000220.
(35) Zabala, J. P. Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política. *História Ciênc. Saúde-Manguinhos* **2009**, *16*, 57–74. https://doi.org/10.1590/S0104-59702009000500004.

(36) Fornaciari, G.; Castagna, M.; Viacava, P.; Tognetti, A.; Bevilacqua, G.; Segura, E. L. Chagas' Disease in Peruvian Inca Mummy. *Lancet Lond. Engl.* **1992**, *339* (8785), 128–129. https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91043-8.
(37) Guhl, F.; Jaramillo, C.; Vallejo, G. A.; Cárdenas A-Arroyo, F.; Aufderheide, A. Chagas Disease and Human Migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2000**, *95* (4), 553–555. https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000400018.
(38) Clayton, J. Chagas Disease 101. *Nature* **2010**, *465* (7301), S4–S5. https://doi.org/10.1038/nature09220.
(39) Díaz, M. L.; González, C. I. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de Trypanosoma cruzi como una vía de transmisión re-emergente. *Rev. Univ. Ind. Santander Salud* **2014**, *46* (2), 177–188.
(40) Beltrão, H. de B. M.; Cerroni, M. de P.; Freitas, D. R. C. de; Pinto, A. Y. das N.; Valente, V. da C.; Valente, S. A.; Costa, E. de G.; Sobel, J. Investigation of Two Outbreaks of Suspected Oral Transmission of Acute Chagas Disease in the Amazon Region, Para State, Brazil, in 2007. *Trop. Doct.* **2009**, *39* (4), 231–232. https://doi.org/10.1258/td.2009.090035.
(41) Salvador, F.; Treviño, B.; Sulleiro, E.; Pou, D.; Sánchez-Montalvá, A.; Cabezos, J.; Soriano, A.; Serre, N.; Gómez I Prat, J.; Pahissa, A.; Molina, I. Trypanosoma Cruzi Infection in a Non-Endemic Country: Epidemiological and Clinical Profile. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *20* (7), 706–712. https://doi.org/10.1111/1469-0691.12443.
(42) Moncayo, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2003**, *98* (5), 577–591. https://doi.org/10.1590/s0074-02762003000500001.
(43) Schofield, C. J.; Galvão, C. Classification, Evolution, and Species Groups within the Triatominae. *Acta Trop.* **2009**, *110* (2–3), 88–100. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010.
(44) Oliveira, I.; Torrico, F.; Muñoz, J.; Gascon, J. Congenital Transmission of Chagas Disease: A Clinical Approach. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2010**, *8* (8), 945–956. https://doi.org/10.1586/eri.10.74.
(45) Yamagata, Y.; Nakagawa, J. Control of Chagas Disease. *Adv. Parasitol.* **2006**, *61*, 129–165. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61004-4.
(46) Toloza, A. C. Estudio sobre la resistencia a insecticidas piretroides en huevos de Triatoma infestans Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae) de Argentina y Bolivia. *Rev. Patol. Trop. J. Trop. Pathol.* **2008**, *37* (3), 291–293. https://doi.org/10.5216/rpt.v37i3.5072.
(47) Segura, E. L.; Sosa Estani, S.; Esquivel, M. L.; Gómez, A.; Salomon, O. D. [Control of the transmission of Trypanosoma cruzi in Argentina 1999]. *Medicina (Mex.)* **1999**, *59 Suppl 2*, 91–96.
(48) Moscatelli, G.; Moroni, S.; García-Bournissen, F.; Ballering, G.; Bisio, M.; Freilij, H.; Altcheh, J. Prevention of Congenital Chagas through Treatment of Girls and Women of Childbearing Age. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, *110* (4), 507–509. https://doi.org/10.1590/0074-02760140347.
(49) *Enfermedad de Chagas y sus manifestaciones neurológicas*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87482021000200154#B8 (accessed 2023-04-22).
(50) Apt B, W.; Heitmann G, I.; Jercic L, M. I.; Jofré M, L.; Muñoz C. del V, P.; Noemí H, I.; San Martin V, A. M.; Sapunar P, J.; Torres H, M.; Zulantay A, I. Guías Clínicas de La Enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas En El Adulto, La Infancia y Adolescencia. *Rev. Chil. Infectol.* **2008**, *25* (3), 194–199. https://doi.org/10.4067/S0716-10182008000300009.
(51) Jaramillo Jaramillo, L. I.; Ruiz Mejía, C.; Martínez Sánchez, L. M.; Vera Henao, S. Enfermedad de Chagas: Una Mirada Alternativa al Tratamiento. *Rev. Cubana Med. Trop.* **2017**, *69* (2), 01–13.
(52) Carod-Artal, F. J. American Trypanosomiasis. *Handb. Clin. Neurol.* **2013**, *114*, 103–123. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00007-8.
(53) Elizari, M. V. [Chagasic myocardiopathy: historical perspective]. *Medicina (Mex.)* **1999**, *59*

Suppl 2, 25–40.
(54) Gascón, J.; Albajar, P.; Cañas, E.; Flores, M.; Gómez i Prat, J.; Herrera, R. N.; Lafuente, C. A.; Luciardi, H. L.; Moncayo, A.; Molina, L.; Muñoz, J.; Puente, S.; Sanz, G.; Treviño, B.; Sergio-Salles, X. [Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where Trypanosoma cruzi infection is not endemic]. *Rev. Esp. Cardiol.* **2007**, *60* (3), 285–293.
(55) De Bona, E.; Lidani, K. C. F.; Bavia, L.; Omidian, Z.; Gremski, L. H.; Sandri, T. L.; de Messias Reason, I. J. Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy? *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1842. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01842.
(56) Schijman, A. G.; Alonso-Padilla, J.; Longhi, S. A.; Picado, A. Parasitological, Serological and Molecular Diagnosis of Acute and Chronic Chagas Disease: From Field to Laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2022**, *117*, e200444. https://doi.org/10.1590/0074-02760200444.
(57) Siqueira-Batista, R.; Meneses Quintas, L. E.; Storino, R. A. Diagnóstico de laboratorio de la Enfermedad de Chagas. *Rev Méd Costa Rica Centroam* **1994**, 69–75.
(58) Diez, M.; Favaloro, L.; Bertolotti, A.; Burgos, J. M.; Vigliano, C.; Lastra, M. P.; Levin, M. J.; Arnedo, A.; Nagel, C.; Schijman, A. G.; Favaloro, R. R. Usefulness of PCR Strategies for Early Diagnosis of Chagas' Disease Reactivation and Treatment Follow-up in Heart Transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **2007**, *7* (6), 1633–1640. https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01820.x.
(59) Flores et al. - ENFERMEDAD DE CHAGAS.Pdf. https://seimc.org/contenidos/gruposdeestudio/gepi/Dcientificos/documentos/gepi-dc-2021-Chagas.pdf (accessed 2023-05-04).
(60) Gascón, J.; Albajar, P.; Cañas, E.; Flores, M.; Gómez i Prat, J.; Herrera, R. N.; Lafuente, C. A.; Luciardi, H. L.; Moncayo, Á.; Molina, L.; Muñoz, J.; Puente, S.; Sanz, G.; Treviño, B.; Sergio-Salles, X. Diagnóstico, manejo y tratamiento de la cardiopatía chagásica crónica en áreas donde la infección por Trypanosoma cruzi no es endémica. *Rev. Esp. Cardiol.* **2007**, *60* (3), 285–293. https://doi.org/10.1157/13100280.
(61) Dias, J. C.; Kloetzel, K. The Prognostic Value of the Electrocardiographic Features of Chronic Chagas' Disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1968**, *10* (3), 158–162.
(62) Kratz, J. M. Drug Discovery for Chagas Disease: A Viewpoint. *Acta Trop.* **2019**, *198*, 105107. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105107.
(63) Klein, K.; Burrone, M. S.; Alonso, J. P.; Ares, L. R.; Martí, S. G.; Lavenia, A.; Calderón, E.; Spillmann, C.; Estani, S. S. [Strategy to improve access to etiological treatment of Chagas disease at the first level of care in Argentina]. *Rev. Panam. Salud Publica Pan Am. J. Public Health* **2017**, *41*, e20. https://doi.org/10.26633/RPSP.2017.20.
(64) Stoppani, A. O. [The chemotherapy of Chagas disease]. *Medicina (Mex.)* **1999**, *59 Suppl 2*, 147–165.
(65) Klein, K.; Roberti, J.; Rouvier, M.; Belizan, M.; Cafferata, M. L.; Berrueta, A. M.; Alonso, J. P. Design and Feasibility of an Implementation Strategy to Address Chagas Guidelines Engagement Focused on Attending Women of Childbearing Age and Children at the Primary Healthcare Level in Argentina: A Pilot Study. *BMC Prim. Care* **2022**, *23* (1), 277. https://doi.org/10.1186/s12875-022-01886-6.
(66) Jannin, J.; Villa, L. An Overview of Chagas Disease Treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, *102 Suppl 1*, 95–97. https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000106.
(67) Bermudez, J.; Davies, C.; Simonazzi, A.; Real, J. P.; Palma, S. Current Drug Therapy and Pharmaceutical Challenges for Chagas Disease. *Acta Trop.* **2016**, *156*, 1–16. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017.
(68) Alonso-Padilla, J.; Cortés-Serra, N.; Pinazo, M. J.; Bottazzi, M. E.; Abril, M.; Barreira, F.; Sosa-Estani, S.; Hotez, P. J.; Gascón, J. Strategies to Enhance Access to Diagnosis and Treatment for Chagas Disease Patients in Latin America. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2019**, *17* (3), 145–157. https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1577731.
(69) Rodriques Coura, J.; de Castro, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97* (1), 3–24. https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000100001.

(70) Viotti, R.; Vigliano, C.; Lococo, B.; Alvarez, M. G.; Petti, M.; Bertocchi, G.; Armenti, A. Side Effects of Benznidazole as Treatment in Chronic Chagas Disease: Fears and Realities. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2009**, *7* (2), 157–163. https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157.
(71) Contra-El-Olvido-Informe-Mayo2012.Pdf. https://www.msf.es/sites/default/files/legacy/adjuntos/Contra-el-olvido-informe-mayo2012.pdf (accessed 2023-06-17).
(72) Morillo, C. A.; Waskin, H.; Sosa-Estani, S.; Del Carmen Bangher, M.; Cuneo, C.; Milesi, R.; Mallagray, M.; Apt, W.; Beloscar, J.; Gascon, J.; Molina, I.; Echeverria, L. E.; Colombo, H.; Perez-Molina, J. A.; Wyss, F.; Meeks, B.; Bonilla, L. R.; Gao, P.; Wei, B.; McCarthy, M.; Yusuf, S.; STOP-CHAGAS Investigators. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *69* (8), 939–947. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.12.023.
(73) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75* (3), 311–335. https://doi.org/10.1021/np200906s.
(74) Thirumurugan, D.; Cholarajan, A.; Raja, S. S. S.; Vijayakumar, R. An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. In *Secondary Metabolites - Sources and Applications*; Vijayakumar, R., Raja, S. S. S., Eds.; InTech, 2018. https://doi.org/10.5772/intechopen.79766.
(75) Bennett, R. N.; Wallsgrove, R. M. Secondary Metabolites in Plant Defence Mechanisms. *New Phytol.* **1994**, *127* (4), 617–633. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x.
(76) Teoh, E. S. Secondary Metabolites of Plants. *Med. Orchids Asia* **2015**, 59–73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24274-3_5.
(77) Demain, A. L.; Fang, A. The Natural Functions of Secondary Metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2000**, *69*, 1–39. https://doi.org/10.1007/3-540-44964-7_1.
(78) Herbert, R. B. *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*; Springer Science & Business Media, 1989.
(79) Pascual Casamayor, D.; Pérez Campos, Y. E.; Morales Guerrero, I.; Castellanos Coloma, I.; González Heredia, E. Algunas Consideraciones Sobre El Surgimiento y La Evolución de La Medicina Natural y Tradicional. *MEDISAN* **2014**, *18* (10), 1467–1474.
(80) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83* (3), 770–803. https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
(81) Warhurst, D. C. Cinchona Alkaloids and Malaria. *Lancet Lond. Engl.* **1981**, *2* (8259), 1346. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)91364-7.
(82) Vitto, L. a. D.; Petenatti, E. M. Asteráceas De Importancia Económica Y Ambiental. Primera Parte. Sinopsis Morfológica Y Taxonómica, Importancia Ecológica Y Plantas De Interés Industrial. *Multequina* **2009**, No. 18, 87–115.
(83) Alvarenga, S. A. V.; Ferreira, M. J. P.; Emerenciano, V. P.; Cabrol-Bass, D. Chemosystematic Studies of Natural Compounds Isolated from Asteraceae: Characterization of Tribes by Principal Component Analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *56* (1), 27–37. https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00103-4.
(84) *Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review | Request PDF*. https://www.researchgate.net/publication/281578692_Asteraceae_species_with_most_prominent_bioactivity_and_their_potential_applications_A_review (accessed 2023-04-25).
(85) *Familia: Asteraceae - EcoRegistros*. https://www.ecoregistros.org/site/familia.php?id=1230 (accessed 2023-04-25).
(86) Negri Brusamarello, M.; Brusamarello, A. P.; Alves da Cunha, M. A.; Busso, C. Biological and Phytochemical Potential of Baccharis Trimera (Less.) DC Leaf Extract on Swine Clinical Isolates. *Nat. Prod. Res.* **2023**, 1–7. https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2222217.
(87) da Silva, A. C. N.; do Nascimento, R. M. C.; Rodrigues, D. C. do N.; Ferreira, P. M. P.; Pessoa, C.; Lima, D. J. B.; Moraes Filho, M. O. de; de Almeida, R. M.; Ferreira, S. R.; Fujiwara, R. T.; do Nascimento, A. M. In Vitro Activity Evaluation of Seven Brazilian Asteraceae against Cancer Cells and Leishmania Amazonensis. *South Afr. J. Bot.* **2019**, *121*, 267–273. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.11.008.

(88) Kamaraj, C.; Ragavendran, C.; Kumar, R. C. S.; Ali, A.; Khan, S. U.; Mashwani, Z. ur-Rehman; Luna-Arias, J. P.; Pedroza, J. P. R. Antiparasitic Potential of Asteraceae Plants: A Comprehensive Review on Therapeutic and Mechanistic Aspects for Biocompatible Drug Discovery. *Phytomedicine Plus* **2022**, *2* (4), 100377. https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2022.100377.
(89) Pink, R.; Hudson, A.; Mouriès, M.-A.; Bendig, M. Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4* (9), 727–740. https://doi.org/10.1038/nrd1824.
(90) Bero, J.; Hannaert, V.; Chataigné, G.; Hérent, M.-F.; Quetin-Leclercq, J. In Vitro Antitrypanosomal and Antileishmanial Activity of Plants Used in Benin in Traditional Medicine and Bio-Guided Fractionation of the Most Active Extract. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137* (2), 998–1002. https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.022.
(91) Zahari, Z.; Jani, N. A.; Amanah, A.; Latif, M. N. A.; Majid, M. I. A.; Adenan, M. I. Bioassay-Guided Isolation of a Sesquiterpene Lactone of Deoxyelephantopin from Elephantopus Scaber Linn. Active on Trypanosome Brucei Rhodesience. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2014**, *21* (3), 282–285. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.011.
(92) *Achillea millefolium L. | Plants of the World Online | Kew Science*. Plants of the World Online. http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:2294-2 (accessed 2023-05-04).
(93) Strzępek-Gomółka, M.; Gaweł-Bęben, K.; Kukula-Koch, W. Achillea Species as Sources of Active Phytochemicals for Dermatological and Cosmetic Applications. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, *2021*, 6643827. https://doi.org/10.1155/2021/6643827.
(94) Saeidnia, S.; Gohari, AR.; Mokhber-Dezfuli, N.; Kiuchi, F. A Review on Phytochemistry and Medicinal Properties of the Genus Achillea. *DARU J. Fac. Pharm. Tehran Univ. Med. Sci.* **2011**, *19* (3), 173–186.
(95) Santoro, G. F.; Cardoso, M. G.; Guimarães, L. G. L.; Mendonça, L. Z.; Soares, M. J. Trypanosoma Cruzi: Activity of Essential Oils from Achillea Millefolium L., Syzygium Aromaticum L. and Ocimum Basilicum L. on Epimastigotes and Trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* **2007**, *116* (3), 283–290. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.018.
(96) Shaba, P.; Pandey, N. N.; Sharma, O. P.; Rao, J. R.; Mishra, A. K.; Singh, R. K. SCREENING OF ACHILLEA MILLEFOLIUM L (YARROW) FLOWERS FOR ITS ANTITRYPANOSOMAL ACTIVITY. **2012**, *2*.
(97) *Baccharis trimera (Less.) DC. | Plants of the World Online | Kew Science*. Plants of the World Online. http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:183819-1 (accessed 2023-05-04).
(98) Silveira Rabelo, A. C.; Caldeira Costa, D. A Review of Biological and Pharmacological Activities of Baccharis Trimera. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *296*, 65–75. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.09.002.
(99) Gazim, Z. C.; Valle, J. S.; Carvalho dos Santos, I.; Rahal, I. L.; Silva, G. C. C.; Lopes, A. D.; Ruiz, S. P.; Faria, M. G. I.; Piau Junior, R.; Gonçalves, D. D. Ethnomedicinal, Phytochemical and Pharmacological Investigations of Baccharis Dracunculifolia DC. (ASTERACEAE). *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*, 1048688. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1048688.
(100) Yoko Suzuki, É.; Caneschi, C. A.; Costa Fochat, R.; Fernandes Brandão, M. A.; Rezende Barbosa Raposo, N. Aceite Esencial de Baccharis Trimera (Less.) DC. (Carqueja-Amarga): Actividad Antimicrobiana. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2016**, *21* (3), 346–358.
(101) Llaure-Mora, A. M.; Ganoza-Yupanqui, M. L.; Suárez-Rebaza, L. A.; Bussmann, R. W. Baccharis Genistelloides (Lam.) Pers. "Carqueja": A Review of Uses in Traditional Medicine, Phytochemical Composition and Pharmacological Studies. *Ethnobot. Res. Appl.* **2021**, *21*, 1–37.
(102) do Nascimento Kaut, N. N.; Rabelo, A. C. S.; Araujo, G. R.; Taylor, J. G.; Silva, M. E.; Pedrosa, M. L.; Chaves, M. M.; Rossoni Junior, J. V.; Costa, D. C. Baccharis Trimera (Carqueja) Improves Metabolic and Redox Status in an Experimental Model of Type 1 Diabetes. *Evid.-Based Complement. Altern. Med. ECAM* **2018**, *2018*, 6532637. https://doi.org/10.1155/2018/6532637.
(103) Datwyler, S. L.; Weiblen, G. D. On the Origin of the Fig: Phylogenetic Relationships of Moraceae from ndhF Sequences. *Am. J. Bot.* **2004**, *91* (5), 767–777.

https://doi.org/10.3732/ajb.91.5.767.
(104) *Moraceae - an overview | ScienceDirect Topics*. https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/moraceae (accessed 2023-04-27).
(105) Rohwer, J. G.; Berg, C. C. Moraceae. In *Flowering Plants · Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families*; Kubitzki, K., Rohwer, J. G., Bittrich, V., Eds.; The Families and Genera of Vascular Plants; Springer: Berlin, Heidelberg, 1993; pp 438–453. https://doi.org/10.1007/978-3-662-02899-5_51.
(106) Rahman, A. H. M. M.; Khanom, A. A Taxonomic and Ethno-Medicinal Study of Species from Moraceae (Mulberry) Family in Bangladesh Flora. *Res. Plant Sci.* **2013**, *1* (3), 53–57. https://doi.org/10.12691/plant-1-3-1.
(107) Kuete, V.; Kamga, J.; Sandjo, L. P.; Ngameni, B.; Poumale, H. M.; Ambassa, P.; Ngadjui, B. T. Antimicrobial Activities of the Methanol Extract, Fractions and Compounds from Ficus Polita Vahl. (Moraceae). *BMC Complement. Altern. Med.* **2011**, *11*, 6. https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-6.
(108) Ranasinghe, R. a. S. N.; Maduwanthi, S. D. T.; Marapana, R. a. U. J. Nutritional and Health Benefits of Jackfruit (Artocarpus Heterophyllus Lam.): A Review. *Int. J. Food Sci.* **2019**, *2019*, 4327183. https://doi.org/10.1155/2019/4327183.
(109) Rodrigues, E. L.; Marcelino, G.; Silva, G. T.; Figueiredo, P. S.; Garcez, W. S.; Corsino, J.; Guimarães, R. de C. A.; Freitas, K. de C. Nutraceutical and Medicinal Potential of the Morus Species in Metabolic Dysfunctions. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (2), 301. https://doi.org/10.3390/ijms20020301.
(110) Machado, R. D.; de Morais, M. C.; da Conceição, E. C.; Vaz, B. G.; Chaves, A. R.; Rezende, K. R. Crude Plant Extract versus Single Compounds for Vitiligo Treatment: Ex Vivo Intestinal Permeability Assessment on Brosimum Gaudichaudii Trécul. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2020**, *191*, 113593. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113593.
(111) Mickely W Engelbrecht, L.; Vicente Ribeiro, R.; Cristiane Yoshida, N.; Dos Santos Gonçalves, V.; Pavan, E.; Tabajara de Oliveira Martins, D.; Luiz Dos Santos, É. Chemical Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of the Edible Fruits of Brosimun Gaudichaudii Trécul, a Native Plant of the Cerrado Biome. *Chem. Biodivers.* **2021**, *18* (7), e2001068. https://doi.org/10.1002/cbdv.202001068.
(112) Queiroz e Silva, S. M. F.; Pinheiro, S. M. B.; Queiroz, M. V. F.; Pranchevicius, M. C.; Castro, J. G. D.; Perim, M. C.; Carreiro, S. C. [In vitro activity of crude extracts of two plant species in the Cerrado on yeast of the Candida SPP variety]. *Cienc. Saude Coletiva* **2012**, *17* (6), 1649–1656. https://doi.org/10.1590/s1413-81232012000600028.
(113) Ferreira, P. C. Toxicidade e atividade tripanocida do extrato bruto de Brosimum gaudichaudii trécul (Moraceae) (Mama-cadela) no pré-tratamento e tratamento de camundongos infectados por Trypanosoma cruzi. **2008**.
(114) Wagner, S. T.; Hesse, L.; Isnard, S.; Samain, M.-S.; Bolin, J.; Maass, E.; Neinhuis, C.; Rowe, N. P.; Wanke, S. Major Trends in Stem Anatomy and Growth Forms in the Perianth-Bearing Piperales, with Special Focus on Aristolochia. *Ann. Bot.* **2014**, *113* (7), 1139–1154. https://doi.org/10.1093/aob/mcu044.
(115) ZHU, X.-X.; LI, X.-Q.; Liao, S.; Du, C.; WANG, Y.; WANG, Z.-H.; YAN, J.; Zuo, Y.; Ma, J. Reinstatement of Isotrema, a New Generic Delimitation of Aristolochia Subgen. Siphisia (Aristolochiaceae). *Phytotaxa* **2019**, *401*, 1. https://doi.org/10.11646/phytotaxa.401.1.1.
(116) Freitas, J.; Lirio, E. J. de; Moraes, Q. dos S.; Miranda, V. S.; Amaral, R. N.; González, F.; Araújo, A. A. Nuevos registros de Aristolochia (Aristolochiaceae) de Brasil: la importancia de la ciencia ciudadana como herramienta para estudiar la distribución geográfica, la conservación y las interacciones insecto-planta. *Rev. Mex. Biodivers.* **2022**, *93*. https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2022.93.4971.
(117) *Aristolochiaceae - an overview | ScienceDirect Topics*. https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/aristolochiaceae (accessed 2023-04-27).
(118) Kuo, P.-C.; Li, Y.-C.; Wu, T.-S. Chemical Constituents and Pharmacology of the

Aristolochia (馬兜鈴 Mǎdōu Ling) Species. *J. Tradit. Complement. Med.* **2012**, *2* (4), 249–266.
(119) Abdelgadir, A. A.; Ahmed, E. M.; Eltohami, M. S. Isolation, Characterization and Quantity Determination of Aristolochic Acids, Toxic Compounds in Aristolochia Bracteolata L. *Environ. Health Insights* **2011**, *5*, 1–8. https://doi.org/10.4137/EHI.S6292.
(120) Kamagaju, L.; Mukazayire, M.; Nyiligira, J.; Gnoula, C.; Mugiraneza, J. P.; Duez, P. Preliminary Phytochemical Screening, Cytotoxicity and Acute Toxicity of Aristolochia Albida Ethanolic Extract. *Planta Medica - PLANTA MED* **2007**, *73*. https://doi.org/10.1055/s-2007-987276.
(121) *Aristolochia triangularis Cham. | Plants of the World Online | Kew Science*. Plants of the World Online. http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:93402-1 (accessed 2023-05-04).
(122) Kott, V.; Barbini, L.; Cruañes, M.; Muñoz, J. D.; Vivot, E.; Cruañes, J.; Martino, V.; Ferraro, G.; Cavallaro, L.; Campos, R. Antiviral Activity in Argentine Medicinal Plants. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *64* (1), 79–84. https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00098-1.
(123) de Araújo, F. H. S.; Nogueira, C. R.; Trichez, V. D. K.; da Rosa Guterres, Z.; da Silva Pinto, L.; Velter, S. Q.; Mantovani Ferreira, G. A.; Machado, M. B.; de Oliveira Gomes Neves, K.; Vieira, M. do C.; Lima Cardoso, C. A.; Heredia-Vieira, S. C.; de Oliveira, K. M. P.; Piva, R. C.; Oesterreich, S. A. Anti-Hyperglycemic Potential and Chemical Constituents of Aristolochia Triangularis Cham. Leaves − A Medicinal Species Native to Brazilian Forests. *J. Ethnopharmacol.* **2023**, *303*, 115991. https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115991.
(124) Che, C. T.; Ahmed, M. S.; Kang, S. S.; Waller, D. P.; Bingel, A. S.; Martin, A.; Rajamahendran, P.; Bunyapraphatsara, N.; Lankin, D. C.; Cordell, G. A. Studies on Aristolochia III. Isolation and Biological Evaluation of Constituents of Aristolochia Indica Roots for Fertility-Regulating Activity. *J. Nat. Prod.* **1984**, *47* (2), 331–341. https://doi.org/10.1021/np50032a017.
(125) Rücker, G.; Langmann, B.; de Siqueira, N. S. [Constituents of Aristolochia triangularis]. *Planta Med.* **1981**, *41* (2), 143–149. https://doi.org/10.1055/s-2007-971691.
(126) Oliveira, S. Q.; Kratz, J. M.; Chaves, V. C.; Guimarães, T. R.; Costa, D. T. M.; Dimitrakoudi, S.; Vontzalidou, A.; Bordignon, S. A. L.; Simionato, C. P.; Steindel, M.; Reginatto, F. H.; Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P. Chemical Constituents and Pharmacology Properties of Aristolochia Triangularis: A South Brazilian Highly-Consumed Botanical with Multiple Bioactivities. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2019**, *91* (3), e20180621. https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180621.
(127) Olmstead, R. G.; Zjhra, M. L.; Lohmann, L. G.; Grose, S. O.; Eckert, A. J. A Molecular Phylogeny and Classification of Bignoniaceae. *Am. J. Bot.* **2009**, *96* (9), 1731–1743. https://doi.org/10.3732/ajb.0900004.
(128) Chávez Fernández, J.; Lizárraga Lazo, V.; Vargas de Nieto, E.; Chávez Fernández, J.; Lizárraga Lazo, V.; Vargas de Nieto, E. Caracterización Físico Química de Los Componentes Volátiles Del Tecoma Fulva Subsp. Arequipensis (Cahuato). *Rev. Soc. Quím. Perú* **2020**, *86* (3), 246–259. https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.298.
(129) *Lapachol - an overview | ScienceDirect Topics*. https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/lapachol (accessed 2023-04-29).
(130) Bowers, M. D. Hostplant Suitability and Defensive Chemistry of the Catalpa Sphinx, Ceratomia Catalpae. *J. Chem. Ecol.* **2003**, *29* (10), 2359–2367. https://doi.org/10.1023/a:1026234716785.
(131) Lino von Poser G, null; Schripsema, J.; Henriques, A. T.; Rosendal Jensen S, null. The Distribution of Iridoids in Bignoniaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28* (4), 351–366. https://doi.org/10.1016/s0305-1978(99)00076-9.
(132) *Jacaranda caroba (Vell.) DC. | Plants of the World Online | Kew Science*. Plants of the World Online. http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:109780-1 (accessed 2023-05-04).
(133) Ragsac, A. C.; Farias-Singer, R.; Freitas, L. B.; Lohmann, L. G.; Olmstead, R. G. Phylogeny of the Neotropical Tribe Jacarandeae (Bignoniaceae). *Am. J. Bot.* **2019**, *106* (12), 1589–1601.

https://doi.org/10.1002/ajb2.1399.
(134) Botion, L. M.; Ferreira, A. V. M.; Côrtes, S. F.; Lemos, V. S.; Braga, F. C. Effects of the Brazilian Phytopharmaceutical Product Ierobina on Lipid Metabolism and Intestinal Tonus. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *102* (2), 137–142. https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.046.
(135) Gachet, M. S.; Schühly, W. Jacaranda--an Ethnopharmacological and Phytochemical Review. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *121* (1), 14–27. https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.10.015.
(136) Palencia, M.; Combatt, E.; Arrieta, Á. Estudio Fitoquímico de Las Hojas de Jacaranda Caroba (Vell.) DC. *Rev. Soc. Quím. Perú* **2016**, *82* (3), 364–372.
(137) Pereira, V. V.; Duarte, L. P.; Silva, R. R.; Takahashi, J. A. New Jacaranone Glucoside from Jacaranda Oxyphylla Leaves. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30* (21), 2421–2428. https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1195378.
(138) Ribeiro, T. G.; Chávez-Fumagalli, M. A.; Valadares, D. G.; Franca, J. R.; Lage, P. S.; Duarte, M. C.; Andrade, P. H. R.; Martins, V. T.; Costa, L. E.; Arruda, A. L. A.; Faraco, A. A. G.; Coelho, E. A. F.; Castilho, R. O. Antileishmanial Activity and Cytotoxicity of Brazilian Plants. *Exp. Parasitol.* **2014**, *143*, 60–68. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.05.004.
(139) Ogura, M.; Cordell, G. A.; Farnsworth, N. R. Potential Anticancer Agents. III. Jacaranone, a Novel Phytoquinoid from Jacaranda Caucana. *Lloydia* **1976**, *39* (4), 255–257.
(140) Roy, D.; Rahman, A. H. M. Systematic Study and Medicinal Uses of Rutaceae Family of Rajshahi District, Bangladesh. *Plant Environ. Develoment* **2016**, *5*, 26–32.
(141) *Rutaceae - an overview | ScienceDirect Topics*. https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/rutaceae (accessed 2023-04-29).
(142) Mutinda, E. S.; Mkala, E. M.; Nanjala, C.; Waswa, E. N.; Odago, W. O.; Kimutai, F.; Tian, J.; Gichua, M. K.; Gituru, R. W.; Hu, G.-W. Traditional Medicinal Uses, Pharmacology, Phytochemistry, and Distribution of the Genus Fagaropsis (Rutaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2022**, *284*, 114781. https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114781.
(143) *Helietta apiculata Benth. | Plants of the World Online | Kew Science*. Plants of the World Online. http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77221758-1 (accessed 2023-05-04).
(144) Ombito, J. O.; Chi, G. F.; Wansi, J. D. Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus Vepris (Rutaceae): A Review. *J. Ethnopharmacol.* **2021**, *267*, 113622. https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113622.
(145) Ferreira, M. E.; de Arias, A. R.; Yaluff, G.; de Bilbao, N. V.; Nakayama, H.; Torres, S.; Schinini, A.; Guy, I.; Heinzen, H.; Fournet, A. Antileishmanial Activity of Furoquinolines and Coumarins from Helietta Apiculata. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2010**, *17* (5), 375–378. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.09.009.
(146) Elena Ferreira, M.; Rojas de Arias, A.; Yaluff, G.; Vera de Bilbao, N.; Nakayama, H.; Torres, S.; Schinini, A.; Torres, S.; Serna, E.; Torrecilhas, A. C.; Fournet, A.; Cebrián-Torrejón, G. Helietta Apiculata: A Tropical Weapon against Chagas Disease. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *33* (22), 3308–3311. https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1472594.
(147) Fernandes, T. S.; Copetti, D.; do Carmo, G.; Neto, A. T.; Pedroso, M.; Silva, U. F.; Mostardeiro, M. A.; Burrow, R. E.; Dalcol, I. I.; Morel, A. F. Phytochemical Analysis of Bark from Helietta Apiculata Benth and Antimicrobial Activities. *Phytochemistry* **2017**, *141*, 131–139. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.05.017.
(148) *Balfourodendron riedelianum (Engl.) Engl. | Plants of the World Online | Kew Science*. Plants of the World Online. http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:28809-2 (accessed 2023-05-04).
(149) Silva, L. L. da; Paoli, A. A. S. Morfologia e anatomia da semente de Balfourodendron riedelianum (Engler) Engler - Rutaceae. *Rev. Bras. Sementes* **2006**, *28*, 16–20. https://doi.org/10.1590/S0101-31222006000100003.
(150) Pérez, M.; Pis Diez, C. M.; Belén Valdez, M.; García, M.; Paola, A.; Avigliano, E.; Palermo, J. A.; Blustein, G. Isolation and Antimacrofouling Activity of Indole and Furoquinoline Alkaloids from "Guatambú" Trees (Aspidosperma Australe and Balfourodendron Riedelianum). *Chem. Biodivers.* **2019**, *16* (11), e1900349. https://doi.org/10.1002/cbdv.201900349.

(151) Veiga, T. A. M.; King-Díaz, B.; Marques, A. S. F.; Sampaio, O. M.; Vieira, P. C.; da Silva, M. F. das G. F.; Lotina-Hennsen, B. Furoquinoline Alkaloids Isolated from Balfourodendron Riedelianum as Photosynthetic Inhibitors in Spinach Chloroplasts. *J. Photochem. Photobiol. B* **2013**, *120*, 36–43. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.01.006.
(152) Basco, L. K.; Mitaku, S.; Skaltsounis, A. L.; Ravelomanantsoa, N.; Tillequin, F.; Koch, M.; Le Bras, J. In Vitro Activities of Furoquinoline and Acridone Alkaloids against Plasmodium Falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (5), 1169–1171. https://doi.org/10.1128/AAC.38.5.1169.
(153) Prendergast, F. G.; Mann, K. G. Chemical and Physical Properties of Aequorin and the Green Fluorescent Protein Isolated from Aequorea Forskålea. *Biochemistry* **1978**, *17* (17), 3448–3453. https://doi.org/10.1021/bi00610a004.
(154) Bank, R. P. D. *RCSB PDB: Homepage*. https://www.rcsb.org/ (accessed 2023-09-05).
(155) Pérez Millán, M. I.; Becú-Villalobos, D. La Proteína Verde Fluorescente Ilumina La Biociencia. *Med. B. Aires* **2009**, *69* (3), 370–374.
(156) Cormack, B. Green Fluorescent Protein as a Reporter of Transcription and Protein Localization in Fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**, *1* (4), 406–410. https://doi.org/10.1016/s1369-5274(98)80057-x.
(157) Gerdes, H. H.; Kaether, C. Green Fluorescent Protein: Applications in Cell Biology. *FEBS Lett.* **1996**, *389* (1), 44–47. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00586-8.
(158) Poppenborg, L.; Friehs, K.; Flaschel, E. The Green Fluorescent Protein Is a Versatile Reporter for Bioprocess Monitoring. *J. Biotechnol.* **1997**, *58* (2), 79–88. https://doi.org/10.1016/s0168-1656(97)00134-x.
(159) Elväng, A. M.; Westerberg, K.; Jernberg, C.; Jansson, J. K. Use of Green Fluorescent Protein and Luciferase Biomarkers to Monitor Survival and Activity of Arthrobacter Chlorophenolicus A6 Cells during Degradation of 4-Chlorophenol in Soil. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3* (1), 32–42. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2001.00156.x.
(160) Webb, J. S.; Barratt, S. R.; Sabev, H.; Nixon, M.; Eastwood, I. M.; Greenhalgh, M.; Handley, P. S.; Robson, G. D. Green Fluorescent Protein as a Novel Indicator of Antimicrobial Susceptibility in Aureobasidium Pullulans. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67* (12), 5614–5620. https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5614-5620.2001.
(161) Kessler, R. L.; Gradia, D. F.; Pontello Rampazzo, R. de C.; Lourenço, É. E.; Fidêncio, N. J.; Manhaes, L.; Probst, C. M.; Ávila, A. R.; Fragoso, S. P. Stage-Regulated GFP Expression in Trypanosoma Cruzi: Applications from Host-Parasite Interactions to Drug Screening. *PloS One* **2013**, *8* (6), e67441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067441.
(162) Alfonso, S.; Núñez-Durán, J.; Gualdron López, M.; Concepción, J. L.; García-Marchan, Y.; Serrano-Martín, X. Nuevo método de evaluación del efecto antiparasitario en modelos in vitro e in vivo, a través de la visualización de Trypanosoma cruzi-GFP. *Salus* **2016**, *20* (3), 35–40.
(163) Ullmann, A. Escherichia Coli and the French School of Molecular Biology. *EcoSal Plus* **2010**, *4* (1). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.1.1.1.
(164) Xing, W. J. [The establishment process of lac operon model and the analysis of several teaching problems]. *Yi Chuan Hered.* **2019**, *41* (6), 548–563. https://doi.org/10.16288/j.yczz.19-084.
(165) Wilson, C. J.; Zhan, H.; Swint-Kruse, L.; Matthews, K. S. The Lactose Repressor System: Paradigms for Regulation, Allosteric Behavior and Protein Folding. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **2007**, *64* (1), 3–16. https://doi.org/10.1007/s00018-006-6296-z.
(166) Husain, Q. Beta Galactosidases and Their Potential Applications: A Review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2010**, *30* (1), 41–62. https://doi.org/10.3109/07388550903330497.
(167) Smale, S. T. Beta-Galactosidase Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, *2010* (5), pdb.prot5423. https://doi.org/10.1101/pdb.prot5423.
(168) Buckner, F. S.; Verlinde, C. L.; La Flamme, A. C.; Van Voorhis, W. C. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against Trypanosoma Cruzi Using Parasites Expressing Beta-Galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40* (11), 2592–2597. https://doi.org/10.1128/AAC.40.11.2592.
(169) Vega, C.; Rolón, M.; Martínez-Fernández, A. R.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A. A New

Pharmacological Screening Assay with Trypanosoma Cruzi Epimastigotes Expressing Beta-Galactosidase. *Parasitol. Res.* **2005**, *95* (4), 296–298. https://doi.org/10.1007/s00436-005-1300-3.
(170) Juers, D. H.; Matthews, B. W.; Huber, R. E. LacZ β-Galactosidase: Structure and Function of an Enzyme of Historical and Molecular Biological Importance. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2012**, *21* (12), 1792–1807. https://doi.org/10.1002/pro.2165.
(171) Pelisek, J.; Armeanu, S.; Nikol, S. Evaluation of Beta-Galactosidase Activity in Tissue in the Presence of Blood. *J. Vasc. Res.* **2000**, *37* (6), 585–593. https://doi.org/10.1159/000054092.
(172) Yin, S.; Zhu, H.; Shen, M.; Li, G.; Lu, S.; Zhao, Y.; Le, S.; Tan, Y.; Peng, Y.; Hu, F.; Wang, J. Surface Display of Heterologous β-Galactosidase in Food-Grade Recombinant Lactococcus Lactis. *Curr. Microbiol.* **2018**, *75* (10), 1362–1371. https://doi.org/10.1007/s00284-018-1531-z.
(173) *Beta-Galactosidase - an overview | ScienceDirect Topics*. https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/beta-galactosidase (accessed 2023-04-30).
(174) Levitsky, K. L.; Toledo-Aral, J. J.; López-Barneo, J.; Villadiego, J. Direct Confocal Acquisition of Fluorescence from X-Gal Staining on Thick Tissue Sections. *Sci. Rep.* **2013**, *3* (1), 2937. https://doi.org/10.1038/srep02937.
(175) Zhang, Y. S. Blue-White Screening Liquid Can Eliminate False Positives in Blue-White Colony Screening. *Genet. Mol. Res. GMR* **2016**, *15* (2). https://doi.org/10.4238/gmr.15027925.
(176) Rodig, S. J. Detecting β-Galactosidase-Labeled Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2020**, *2020* (5), 099739. https://doi.org/10.1101/pdb.prot099739.
(177) Sanchez-Ramos, J.; Song, S.; Dailey, M.; Cardozo-Pelaez, F.; Hazzi, C.; Stedeford, T.; Willing, A.; Freeman, T. B.; Saporta, S.; Zigova, T.; Sanberg, P. R.; Snyder, E. Y. The X-Gal Caution in Neural Transplantation Studies. *Cell Transplant.* **2000**, *9* (5), 657–667. https://doi.org/10.1177/096368970000900510.
(178) *Resazurin Assay - an overview | ScienceDirect Topics*. https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/resazurin-assay (accessed 2023-04-30).
(179) Schmitt, D. M.; O'Dee, D. M.; Cowan, B. N.; Birch, J. W.-M.; Mazzella, L. K.; Nau, G. J.; Horzempa, J. The Use of Resazurin as a Novel Antimicrobial Agent against Francisella Tularensis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2013**, *3*, 93. https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00093.
(180) Yao, K.; Youn, H.; Gao, X.; Huang, B.; Zhou, F.; Li, B.; Han, H. Casein Kinase 2 Inhibition Attenuates Androgen Receptor Function and Cell Proliferation in Prostate Cancer Cells. *The Prostate* **2012**, *72* (13), 1423–1430. https://doi.org/10.1002/pros.22493.
(181) Voytik-Harbin, S. L.; Brightman, A. O.; Waisner, B.; Lamar, C. H.; Badylak, S. F. Application and Evaluation of the alamarBlue Assay for Cell Growth and Survival of Fibroblasts. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **1998**, *34* (3), 239–246. https://doi.org/10.1007/s11626-998-0130-x.
(182) Al-Nasiry, S.; Geusens, N.; Hanssens, M.; Luyten, C.; Pijnenborg, R. The Use of Alamar Blue Assay for Quantitative Analysis of Viability, Migration and Invasion of Choriocarcinoma Cells. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **2007**, *22* (5), 1304–1309. https://doi.org/10.1093/humrep/dem011.
(183) Davoren, M.; Ní Shúilleabháin, S.; Hartl, M. G. J.; Sheehan, D.; O'Brien, N. M.; O'Halloran, J.; Van Pelt, F. N. a. M.; Mothersill, C. Assessing the Potential of Fish Cell Lines as Tools for the Cytotoxicity Testing of Estuarine Sediment Aqueous Elutriates. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **2005**, *19* (3), 421–431. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.12.002.
(184) Fai, P. B.; Grant, A. A Rapid Resazurin Bioassay for Assessing the Toxicity of Fungicides. *Chemosphere* **2009**, *74* (9), 1165–1170. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.078.
(185) Yajko, D. M.; Madej, J. J.; Lancaster, M. V.; Sanders, C. A.; Cawthon, V. L.; Gee, B.; Babst, A.; Hadley, W. K. Colorimetric Method for Determining MICs of Antimicrobial Agents for Mycobacterium Tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **1995**, *33* (9), 2324–2327. https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2324-2327.1995.
(186) Rolón, M.; Vega, C.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A. Development of Resazurin Microtiter

Assay for Drug Sensibility Testing of Trypanosoma Cruzi Epimastigotes. *Parasitol. Res.* **2006**, *99* (2), 103–107. https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y.
(187) Torchelsen, F. K. V. da S.; Silva, T. M.; Milagre, M. M.; Silva, R. R.; Reis, L. E. S.; Branquinho, R. T.; Silva, G. N.; de Lana, M. Evaluation of the Anti-Trypanosoma Cruzi Activity in Vitro and in Vivo of Silibinin and Silibinin in Association to Benznidazole. *Parasitol. Res.* **2021**, *120* (4), 1511–1517. https://doi.org/10.1007/s00436-020-06944-5.
(188) Debenedetti, S.; Mangiaterra, A. Evaluación de Parámetros Botánicos y Fitoquímicos Para El Control de Calidad de «carqueja», 2004. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.5187.5443.
(189) Fullas, F.; Hussain, R. A.; Bordas, E.; Pezzuto, J. M.; Soejarto, D. D.; Kinghorn, A. D. Gaudichaudiosides A–E, Five Novel Diterpene Glycoside Constituents from the Sweet-Tasting Plant, Baccharis Gaudichaudiana. *Tetrahedron* **1991**, *47* (40), 8515–8522. https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)82394-2.
(190) Gelbaum, L. T.; Zalkow, L. H.; Hamilton, D. Cytotoxic Agent from Senecio Anonymus Wood. *J. Nat. Prod.* **1982**, *45* (3), 370–372. https://doi.org/10.1021/np50021a024.
(191) Cardoso-Lopes, E. M.; Maier, J. A.; da Silva, M. R.; Regasini, L. O.; Simote, S. Y.; Lopes, N. P.; Pirani, J. R.; Bolzani, V. da S.; Young, M. C. M. Alkaloids from Stems of Esenbeckia Leiocarpa Engl. (Rutaceae) as Potential Treatment for Alzheimer Disease. *Mol. Basel Switz.* **2010**, *15* (12), 9205–9213. https://doi.org/10.3390/molecules15129205.
(192) Lima, T. C.; Ferreira, A. R.; Silva, D. F.; Lima, E. O.; de Sousa, D. P. Antifungal Activity of Cinnamic Acid and Benzoic Acid Esters against Candida Albicans Strains. *Nat. Prod. Res.* **2018**, *32* (5), 572–575. https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1317776.
(193) Richardson, J. S. M.; Sethi, G.; Lee, G. S.; Malek, S. N. A. Chalepin: Isolated from Ruta Angustifolia L. Pers Induces Mitochondrial Mediated Apoptosis in Lung Carcinoma Cells. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16* (1), 389. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1368-6.
(194) Patre, R. E.; Shet, J. B.; Parameswaran, P. S.; Tilve, S. G. Cascade Wittig Reaction-Double Claisen and Cope Rearrangements: One-Pot Synthesis of Diprenylated Coumarins Gravelliferone, Balsamiferone, and 6,8-Diprenylumbelliferone. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (47), 6488–6490. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.017.
(195) Macís, F. A.; Massanet, G. M.; Rodriguez-Luis, F.; Salvá, J. 13C NMR of Coumarins I: 3-(1,1-Dimethylallyl) Derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **1989**, *27* (7), 705–707. https://doi.org/10.1002/mrc.1260270721.
(196) Steck, W.; Bailey, B. K.; Shyluk, J. P.; Gamborg, O. L. Coumarins and Alkaloids from Cell Cultures of Ruta Graveolens. *Phytochemistry* **1971**, *10* (1), 191–194. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90269-3.
(197) Velappan, A. B.; Datta, D.; Ma, R.; Rana, S.; Ghosh, K. S.; Hari, N.; Franzblau, S. G.; Debnath, J. 2-Aryl Benzazole Derived New Class of Anti-Tubercular Compounds: Endowed to Eradicate Mycobacterium Tuberculosis in Replicating and Non-Replicating Forms. *Bioorganic Chem.* **2020**, *103*, 104170. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104170.
(198) Silva, A. T. M. e; Magalhães, C. G.; Duarte, L. P.; Mussel, W. da N.; Ruiz, A. L. T. G.; Shiozawa, L.; Carvalho, J. E. de; Trindade, I. C.; Vieira Filho, S. A. Lupeol and Its Esters: NMR, Powder XRD Data and in Vitro Evaluation of Cancer Cell Growth. *Braz J Pharm Sci Online* **2017**, e00251–e00251.
(199) He, A.; Wang, M.; Hao, H.; Zhang, D.; Lee, K.-H. Hepatoprotective Triterpenes from Sedum Sarmentosum. *Phytochemistry* **1998**, *49* (8), 2607–2610. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00434-8.
(200) Fernandes, T. S. Análise fitoquímica de duas espécies de Rutaceae: Helietta apiculata Benth e Zanthoxylum fagara (L.) Sarg. Tese, Universidade Federal de Santa Maria, 2016. http://repositorio.ufsm.br/handle/1/4280 (accessed 2023-11-15).
(201) Yajima, T.; Munakata, K. SYNTHESIS OF 2- AND 4-BROMOQUINOLINES WITH A NEW BROMINATING REAGENT, PBr3-DMF. *Chem. Lett.* **1977**, *6* (8), 891–892. https://doi.org/10.1246/cl.1977.891.
(202) Roquero, I.; Cantizani, J.; Cotillo, I.; Manzano, M. P.; Kessler, A.; Martín, J. J.; McNamara, C. W. Novel Chemical Starting Points for Drug Discovery in Leishmaniasis and Chagas Disease. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **2019**, *10*, 58–68.

https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.05.002.
(203) Muelas-Serrano, S.; Le-Senne, A.; Fernández-Portillo, C.; Nogal, J. J.; Ochoa, C.; Gómez-Barrio, A. In Vitro and in Vivo Anti-Trypanosoma Cruzi Activity of a Novel Nitro-Derivative. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 553–557. https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000400019.
(204) *ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS MÉTODOS DE RESAZURINA Y MTT EN ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES HUMANAS*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000100009 (accessed 2023-08-14).
(205) Alfonso, S.; Núñez-Durán, J.; Gualdron López, M.; Concepción, J. L.; García-Marchan, Y.; Serrano-Martín, X. Nuevo método de evaluación del efecto antiparasitario en modelos in vitro e in vivo, a través de la visualización de Trypanosoma cruzi-GFP. *Salus* **2016**, *20* (3), 35–40.
(206) Fuse, H.; Okumura, M.; Kazama, T.; Katayama, T. Comparison of Resazurin Test Results with Various Sperm Parameters. *Andrologia* **1993**, *25* (3), 153–157.
(207) Cabrera, E.; Murguiondo, M. G.; Arias, M. G.; Arredondo, C.; Pintos, C.; Aguirre, G.; Fernández, M.; Basmadjián, Y.; Rosa, R.; Pacheco, J. P.; Raymondo, S.; Di Maio, R.; González, M.; Cerecetto, H. 5-Nitro-2-Furyl Derivative Actives against Trypanosoma Cruzi: Preliminary in Vivo Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (10), 3909–3914. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.04.015.
(208) Kinnamon, K. E.; Poon, B. T.; Hanson, W. L.; Waits, V. B. Trypanosoma Cruzi: A Novel Chemical Class (Nitrobenzofurans) Active against Infections of Mice (Mus Musculus). *Exp. Parasitol.* **1998**, *89* (2), 251–256. https://doi.org/10.1006/expr.1998.4288.
(209) Gallerano, R. H.; Marr, J. J.; Sosa, R. R. Therapeutic Efficacy of Allopurinol in Patients with Chronic Chagas' Disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1990**, *43* (2), 159–166. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.159.
(210) Schenkman, S.; Jiang, M. S.; Hart, G. W.; Nussenzweig, V. A Novel Cell Surface Trans-Sialidase of Trypanosoma Cruzi Generates a Stage-Specific Epitope Required for Invasion of Mammalian Cells. *Cell* **1991**, *65* (7), 1117–1125. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90008-m.
(211) Reis, F. C. G.; Costa, T. F. R.; Sulea, T.; Mezzetti, A.; Scharfstein, J.; Brömme, D.; Ménard, R.; Lima, A. P. C. A. The Propeptide of Cruzipain--a Potent Selective Inhibitor of the Trypanosomal Enzymes Cruzipain and Brucipain, and of the Human Enzyme Cathepsin F. *FEBS J.* **2007**, *274* (5), 1224–1234. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05666.x.
(212) Fairlamb, A. H. Future Prospects for the Chemotherapy of Human Trypanosomiasis: 1. Novel Approaches to the Chemotherapy of Trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1990**, *84* (5), 613–617. https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90124-W.
(213) Pereira, M. D. P.; da Silva, T.; Aguiar, A. C. C.; Oliva, G.; Guido, R. V. C.; Yokoyama-Yasunaka, J. K. U.; Uliana, S. R. B.; Lopes, L. M. X. Chemical Composition, Antiprotozoal and Cytotoxic Activities of Indole Alkaloids and Benzofuran Neolignan of Aristolochia Cordigera. *Planta Med.* **2017**, *83* (11), 912–920. https://doi.org/10.1055/s-0043-104776.
(214) Lerma-Herrera, M. A.; Beiza-Granados, L.; Ochoa-Zarzosa, A.; López-Meza, J. E.; Navarro-Santos, P.; Herrera-Bucio, R.; Aviña-Verduzco, J.; García-Gutiérrez, H. A. Biological Activities of Organic Extracts of the Genus Aristolochia: A Review from 2005 to 2021. *Mol. Basel Switz.* **2022**, *27* (12), 3937. https://doi.org/10.3390/molecules27123937.
(215) Morais, T. R.; Romoff, P.; Fávero, O. A.; Reimão, J. Q.; Lourenço, W. C.; Tempone, A. G.; Hristov, A. D.; Di Santi, S. M.; Lago, J. H. G.; Sartorelli, P.; Ferreira, M. J. P. Anti-Malarial, Anti-Trypanosomal, and Anti-Leishmanial Activities of Jacaranone Isolated from Pentacalia Desiderabilis (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). *Parasitol. Res.* **2012**, *110* (1), 95–101. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2454-9.
(216) Sahid, E. D. N.; Claudino, J. C.; Oda, F. B.; Carvalho, F. A.; Santos, A. G. D.; Graminha, M. A. S.; Clementino, L. da C. Baccharis Trimera (Less.) DC Leaf Derivatives and Eupatorin Activities against Leishmania Amazonensis. *Nat. Prod. Res.* **2022**, *36* (6), 1599–1603. https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1887175.

(217) Pavão, F.; Castilho, M. S.; Pupo, M. T.; Dias, R. L. A.; Correa, A. G.; Fernandes, J. B.; da Silva, M. F. G. F.; Mafezoli, J.; Vieira, P. C.; Oliva, G. Structure of Trypanosoma Cruzi Glycosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Complexed with Chalepin, a Natural Product Inhibitor, at 1.95 Å Resolution. *FEBS Lett.* **2002**, *520* (1), 13–17. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02700-X.

(218) Pardo-Rodriguez, D.; Cifuentes-López, A.; Bravo-Espejo, J.; Romero, I.; Robles, J.; Cuervo, C.; Mejía, S. M.; Tellez, J. Lupeol Acetate and α-Amyrin Terpenes Activity against Trypanosoma Cruzi: Insights into Toxicity and Potential Mechanisms of Action. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2023**, *8* (5), 263. https://doi.org/10.3390/tropicalmed8050263.

(219) Soeiro, M. de N. C. Perspectives for a New Drug Candidate for Chagas Disease Therapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2022**, *117*, e220004. https://doi.org/10.1590/0074-02760220004.

(220) Schönian, G.; Mauricio, I.; Cupolillo, E. Is It Time to Revise the Nomenclature of Leishmania? *Trends Parasitol.* **2010**, *26* (10), 466–469. https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.013.

(221) Fraga, J.; Fernández-Calienes, A.; Montalvo, A. M.; Maes, I.; Deborggraeve, S.; Büscher, P.; Dujardin, J.-C.; Van der Auwera, G. Phylogenetic Analysis of the Trypanosoma Genus Based on the Heat-Shock Protein 70 Gene. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2016**, *43*, 165–172. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.016.

(222) Avigliano, E.; Rosso, J. J.; Lijtmaer, D.; Ondarza, P.; Piacentini, L.; Izquierdo, M.; Cirigliano, A.; Romano, G.; Nuñez Bustos, E.; Porta, A.; Mabragaña, E.; Grassi, E.; Palermo, J.; Bukowski, B.; Tubaro, P.; Schenone, N. Biodiversity and Threats in Non-Protected Areas: A Multidisciplinary and Multi-Taxa Approach Focused on the Atlantic Forest. *Heliyon* **2019**, *5* (8), e02292. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02292.

(223) Shang, X.-F.; Morris-Natschke, S. L.; Liu, Y.-Q.; Guo, X.; Xu, X.-S.; Goto, M.; Li, J.-C.; Yang, G.-Z.; Lee, K.-H. Biologically Active Quinoline and Quinazoline Alkaloids Part I. *Med. Res. Rev.* **2018**, *38* (3), 775–828. https://doi.org/10.1002/med.21466.

(224) Muelas, S.; Di Maio, R.; Cerecetto, H.; Seoane, G.; Ochoa, C.; Escario, J. A.; Gómez-Barrio, A. New Thiadiazine Derivatives with Activity against Trypanosoma Cruzi Amastigotes. *Folia Parasitol. (Praha)* **2001**, *48* (2), 105–108. https://doi.org/10.14411/fp.2001.015.

(225) Singh, B.; Bernatchez, J. A.; McCall, L.-I.; Calvet, C. M.; Ackermann, J.; Souza, J. M.; Thomas, D.; Silva, E. M.; Bachovchin, K. A.; Klug, D. M.; Jalani, H. B.; Bag, S.; Buskes, M. J.; Leed, S. E.; Roncal, N. E.; Penn, E. C.; Erath, J.; Rodriguez, A.; Sciotti, R. J.; Campbell, R. F.; McKerrow, J.; Siqueira-Neto, J. L.; Ferrins, L.; Pollastri, M. P. Scaffold and Parasite Hopping: Discovery of New Protozoal Proliferation Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11* (3), 249–257. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00453.