

# ESTUDIOS QUÍMICOS, BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE *GALIPEA LONGIFLORA*, KRAUSE

Alberto Giménez<sup>a</sup>, J. Antonio Avila<sup>a</sup>, Grace Ruiz<sup>a</sup>, Magali Paz<sup>a</sup>, Enrique Udaeta<sup>a</sup>, J. Carlos Ticona<sup>a</sup>, Efraín Salamanca<sup>a</sup>, Crispín Paredes<sup>a</sup>, Norka Rodríguez<sup>a</sup>, Katia Quints<sup>a</sup>, Carolina Feraudy<sup>b</sup>, Iván Gutiérrez<sup>c</sup>, Rogelio Chuqui<sup>d</sup>, Celín Quenevo<sup>e</sup>, María Fanny Dalence<sup>f</sup> y Marcelo Bascope<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas-IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Casilla 3239, La Paz, Bolivia. <sup>b</sup> Laboratorio de Patología del Hospital General de Clínicas, La Paz. <sup>c</sup> Universidad Nacional Autónoma Gabriel Rene Moreno, Santa Cruz, Bolivia. <sup>d</sup> Comunidad de Santa Rosa de Maravilla, Provincia A. Iturralde, La Paz, Bolivia. <sup>e</sup> Consejo Indígena de los Pueblos Tacana-CIPTA, Tumupasa, La Paz, Bolivia. <sup>f</sup> Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.  
[agimenez@megalink.com](mailto:agimenez@megalink.com)

**Key words:** *Galipea longiflora*, evanta, *Leishmania*, alcaloides quinolínicos, toxicidad aguda y subcrónica, parámetros farmacocinéticos, cultivo semi-continuo

## RESUMEN

La especie medicinal *Galipea longiflora* (Evanta) es utilizada por las etnias amazónicas: Tacana, Mosekene y Tsimane, como antiparasitario. Los alcaloides totales de esta especie vegetal serán centro de estudios clínicos como tratamiento alternativo para la leishmaniasis cutánea. Nuestros estudios detallan el aislamiento y caracterización de alcaloides quinolínicos, de la corteza y hojas, todos con actividad leishmanicida evaluada sobre promastigotes de: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. chagasi*. Mediante modelos toxico cinéticos, se ha determinado la toxicidad aguda, subcrónica y parámetros farmacocinéticos, para el extracto crudo, en modelo murino. Se establecen las condiciones para el cultivo semi-continuo, *in vitro*, de células de Evanta.

## ABSTRACT

The medicinal species *Galipea longiflora* (Evanta) is used as antiparasitic agent by the amazonian ethnic groups: Tacana, Mosekene and Tsimane. The total alkaloids, of this plant, will be focus of clinical studies against *Leishmania* cutaneous. The current studies give details of the isolation and characterization of quinolinic alkaloids, from bark and leaves, with leishmanicidal activity evaluate on promastigote of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* and *L. chagasi*. We have evaluated the acute and subchronic toxicity together with pharmaco-kinetic parameters, for the crude extract, in murine model. Details for the, *in vitro*, semi continuous cell culture of Evanta are provided.

## INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una histoparasitosis de gran importancia epidemiológica y de múltiples manifestaciones clínicas, causada por protozoarios de género *Leishmania* transmitido al hombre mediante la picadura de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. El género *Leishmania* está constituido por una gran cantidad de especies y subespecies las cuales varían dependiendo de su ubicación geográfica y de sus características bioquímicas e inmunobiológicas. Cerca de 20 especies de *Leishmania* han sido involucradas como causantes de enfermedad en humanos. Esta enfermedad, manifestada por sus formas: cutánea, mucocutánea, y/o visceral, es el resultado de la compleja interacción entre la especie del parásito involucrado y la respuesta inmunológica del paciente<sup>1</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud, hay cerca de 1.500.000 de personas afectadas por las diversas formas de leishmaniasis en todo el mundo, con una incidencia de 600.000 casos nuevos declarados cada año y distribuidos en 88 países<sup>2</sup>. Estas cifras representan evidentemente una importante subestimación del problema debido a diferentes factores: lugares de transmisión muy dispersos, casos no diagnosticados o diagnóstico erróneo y medicamentos específicos no disponibles. La leishmaniasis representa un freno al desarrollo, al retrasar o detener proyectos agrícolas e industriales. En América del Sur, la leishmaniasis es uno de los factores que contribuye a la inestabilidad de asentamientos humanos.

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentran en alto riesgo de infectarse con parásitos de *Leishmania* en 7 de 9 Departamentos. En el Brasil la forma cutánea y mucocutánea están muy difundidas, en 24 de los 26 Estados se han registrado casos de leishmaniasis cutánea. Los agentes etiológicos son: *L. guyanensis*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis*, así como algunas nuevas especies, *L. lainsoni*, *L. maiffi* y *L. shawi*<sup>3</sup>.

En el Perú la leishmaniasis andina (UTA) y la selvática (ESPUNDIA) son las dos formas que pertenecen al género *Viannia*. El año 1990 se han notificado 5.500 casos (22% leishmaniasis andina y 78% leishmaniasis selvática). La transmisión humana se relaciona directamente con las actividades ocupacionales en el bosque primario, donde existe mucho contacto entre el hombre y el vector, los casos se están incrementando debido a los nuevos asentamientos en tierras bajas. La forma UTA con lesiones en la cara especialmente en niños se presenta en las laderas occidentales de los Andes y valles interandinos entre 900 y 3.000 m.s.n.m. Vectores potenciales son: *Lu. peruensis* y *Lu. verrucarum* además de la *Lu. ayacuchensis* y *Lu. osornoi*<sup>3</sup>.

En algunas de las enfermedades parasitarias la quimioterapia tiene poca eficacia, mayormente debido a la supresión o a la distorsión de la respuesta inmune. Los tratamientos comúnmente empleados contra la leishmaniasis (cutánea, mucocutánea y visceral) incluyen los derivados pentavalentes de antimonio, glucantime y pentostan, ketoconazol y algunos derivados imidazólicos, anfotericina B, sulfato de aminosidina y pentamidina<sup>4</sup>. Todos estos medicamentos presentan el inconveniente de ser mal tolerados por el paciente provocando importantes efectos secundarios (fiebres, trastornos cardíacos, hepáticos y renales) y en muchos casos haciendo necesaria su hospitalización, lo cual representa una carga social sumamente elevada.

Entre los años 1985-91, un grupo de investigadores Franco-Boliviano, que trabajo en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA), de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), La Paz, Bolivia, confirmó la actividad antiparasitaria, de los extractos de la especie Evanta (*Galipea longiflora*), planta medicinal antiparasitaria utilizada por el pueblo Tsimane. Un total de 12 alcaloides quinolínicos, fueron aislados e identificados de las hojas, raíces y corteza de tronco de esta especie<sup>5,6,7</sup>. Algunos de los principios activos aislados de las hojas de esta especie, resultaron ser nuevas estructuras y debido a la eficacia demostrada<sup>8,9,10</sup> y la baja toxicidad determinada en modelos *in vivo*<sup>11,12,13</sup>,

fueron patentados (Chimaninas A, B, C y D, US4209519/15/04/93), estrategia que a la fecha no ha dado ningún resultado tangible.

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, desde 1993 esta trabajando en la evaluación biológica de especies medicinales listadas en Farmacopeas Tradicionales<sup>14,15,16</sup> a través de proyectos multidisciplinarios<sup>17,18,19</sup>. Nuestro mayor éxito, es el estar involucrados en el equipo que esta preparando los estudios clínicos sobre leishmaniasis en los que se utilizarán formulaciones desarrolladas, en el IIFB, sobre la base de extractos de Evanta (*Galipea longiflora*) planta medicinal antiparasitaria conocida por las etnias: Tacana, Mosekene y Tsimane, asentadas en la amazonía Boliviana. Esta especie ha sido seleccionada de entre mas de 800 extractos que han sido evaluados por su actividad antiparasitaria *in vitro* en la última década<sup>20,21,22</sup>.

Los resultados clínicos permitirán establecer las bases para un estudio de aprovechamiento sostenible de esta especie medicinal involucrando en el proceso a comunidades Tsimane, Tacana, Mosekene, Colonos, la Universidad y la Empresa Privada. Como una estrategia de apoyo en el tratamiento de infectados con *Leishmania* y al mismo tiempo promover un turismo mas seguro, en las zonas tropicales gracias al desarrollo de un profiláctico natural, de amplio espectro, que ayudaría a proteger del contagio de infecciones parasitarias incluyendo leishmaniasis, durante la estadía de los turistas en las zonas tropicales de mayor incidencia.

*Galipea longiflora* Krause (sinónimo *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki,) tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta. Es un árbol de hasta 12 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un peciolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos. En Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos del Beni y La Paz. El uso tradicional mas frecuente es en forma de cocción en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos<sup>15</sup>. Para el tratamiento de la leishmaniasis, la corteza fresca o seca es molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las ulceras, además de beber infusiones durante tres días. Este género cuenta con unas cuarenta especies distribuidas desde Guatemala, Cuba, hasta Bolivia y el Sur de Brasil<sup>23</sup>.

Sobre la base de los antecedentes arriba descritos, el IIFB ha desarrollado formulaciones farmacéuticas, tópicos y sistémicas, a base de los alcaloides totales de corteza de la Evanta. Como parte de un grupo multidisciplinario, estamos a punto de iniciar estudios clínicos Fase I (tratamiento de un número reducido pero representativo de voluntarios sanos para documentar posibles alteraciones bioquímicas al recibir la medicación) y Fase II (tratamiento de un grupo selecto de enfermos seleccionados de acuerdo a parámetros médicos bien definidos). El presente trabajo presenta los resultados de nuestros estudios pre-clínicos que han permitido generar el primer proyecto, a nivel nacional, sobre estudios clínicos a partir de una planta documentada en farmacopeas tradicionales amazónicas, que cuenta con el apoyo del Ministerio de Salud, La Sociedad Boliviana de Medicina Tradicional y la Agencia Internacional de Cooperación de Suecia<sup>24</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento y purificación de los metabolitos biológicamente activos se logro entre los laboratorios del IIFB-UMSA y el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Lund, mediante cromatografía líquida al vacío (CLV) sobre Sílica gel, 70-230mesh, (Aldrich), cromatografía en capa delgada, (TLC) sobre placas DC-Alufolien 20x20cm, Sílica gel 60 F254 (Merck), placas preparativas (PLC) sobre placas de vidrio 20x20cm Sílica gel 60 F254, 1 y 2mm (Alltech), con los sistemas de eluyentes: A) Tolueno:Acetato de etilo (90:10); B) Tolueno:Dietil eter (80:20) y C) n-Hexano:Dietil eter:Metanol (75:15:5, x3corridas). Los solventes para cromatografía fueron: Tolueno puriss (Riedel-deHaen, 24529), n-Hexane (Merck, Suprasolv), Dichloromethane (Merck, Lichrosolv), Diethyl ether (ACS reagent, Aldrich), Methanol (HPLC, Lab Scan). Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C NMR (1D, 2D, COSY, HMBC y HMQC) fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker operando a 400.1316 MHz (<sup>1</sup>H) y 100.6337 MHz (<sup>13</sup>C), con CDCl<sub>3</sub> como solvente y referencia interna a  $\delta$  7.24 y 77.24ppm para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo Micro mass Q-Tof micro, operando con Electrón Spray a: Polarity ES+; Reference cone Voltage (V) 90.000; Capillary (V) 1469.0; Sample Cone (V) 40.0; Extraction Cone (V) 0.5; Source Temp (C) 80.0; Syringe rate (ul) 5.0; Collision Energy 7.0; Low and High resolution 3.0; RF lens 10.9; Pre/post filter 8.5. Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro de doble haz Cintra 5(180-400nm) en celdas de cuarzo de 5mm utilizando HCl 1N como disolvente. Los rotaevaporadores utilizados fueron: Buchi rotavapor RE 111, y Heidolph Laborota-400 con bomba de vacío

Diaphragm Vacuum Pump DC-4. Las bombas de alto vacío fueron: AEG-VDE0530 y Edwards 5 (ambas de doble etapa). Para las evaluaciones biológicas y cultivos celulares, los materiales y medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave All American 25X, por 15 min. a 121°C.

## Colectas Vegetales

La colecta de árboles de Evanta, se ha llevado a cabo alrededor de la Comunidad Tacana de Santa Rosa de Maravilla, entre los meses de Agosto de 2003 (S13°56'587 y W0.68°00'308) y Septiembre y 2004 (S13°56'574 W0.68°00'474) a una altura de 293 m.s.n.m, en la Provincia Abel Iturralde, La Paz, Bolivia. Su identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con las muestras vaucher (AS49 y SD17) depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia.

## Métodos de Extracción

### Extracción continua

En dos equipos de extracción continua (soxhlet), corteza (25g) y hojas (25g), finamente molidos fueron extraídos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(250mL) por 2.5hr. Los extractos obtenidos, por rotaevaporación (120rpm y 40°C), fueron secados con bomba de alto vacío, hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 3.7% (corteza) y 3.1% (hojas), con relación al peso seco de la planta.

### Maceración

El material vegetal seco finamente molido (4K) fue macerado por 3 días en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10L x 3veces), en percoladores cónicos de acero inoxidable (diámetro inferior 22cm x diámetro superior 42cm x 74cm de alto). El extracto fue filtrado y concentrado a 40°C y secado con una bomba de alto vacío hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 4.6% (corteza) y 3.9% (hojas), con relación al peso seco de la planta.

### Obtención de alcaloides totales

El extracto crudo (50g) fue disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL) y sometido a lavados sucesivos con HCl 1N(100mL x 3veces, c/u por 30min. sobre agitador magnético). Los lavados ácidos fueron controlados con un espectrofotómetro UV, combinados y llevados a precipitación completa con NaOH 2N(ca.150mL). El sólido formado fue extraído con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mLx3veces). La solución orgánica fue deshidratada con NaSO<sub>4</sub>, filtrada, evaporada al vacío y secada con una bomba de alto vacío hasta peso constante. Los rendimientos fueron del 2.0%(corteza) y 0.57%(hojas).

### Purificación de los alcaloides de la corteza

Los alcaloides totales (17.6g) fueron disueltos en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (70mL) y se adiciono Sílica gel (65g). La muestra fue secada utilizando rotaevaporador y sometida a alto vacío por 30min. Este material fue utilizado como cabeza en la columna VLC (10cm diámetro x10cm alto), con Sílica gel (275g). La columna fue eluída (bajo vacío) con Tolueno (2L, Fracción 1, 4.5g); Tolueno-dietil eter (80:20; 0.50L, Fracción 2, 4.7g); Tolueno-dietil eter (80:20; 0.75L, Fracción 3, 4.1g) y Tolueno-metanol (80:20, 0.50L, Fracción 4, 3.5g). Las Fracciones 1 y 2, fueron controladas por TLC (solvente A), unidas y sometidas a cristalización con n-hexano caliente, para obtener la 2-fenil-quinolina (**1**) (51%, con relación al peso de alcaloides totales),  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ , estructura confirmada por espectros de MS de alta resolución;  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D. La Fracción 3 fue analizada por TLC-MS, confirmándose la presencia de los alcaloides **1**  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ ; **2**  $[\text{MS}+1]=200.1439(\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N})$ ; **3**  $[\text{MS}+1]=236.1075(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO})$  y **4**  $[\text{MS}+1]=172.1126(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N})$ . La fracción fue purificada por PLC (Solvente B) y los principales alcaloides: **2**, **3** y **4** se identificaron por MS alta resolución;  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D. La Fracción 4, fue analizada por TLC-MS, confirmándose la presencia de los alcaloides **1**  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ ; **2**  $[\text{MS}+1]=200.1439(\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N})$ ; **3**  $[\text{MS}+1]=236.1075(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO})$ ; **4**  $[\text{MS}+1]=172.1126(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N})$  y **5**  $[\text{MS}+1]=278.1181(\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_2)$ , acompañados de los alcaloides minoritarios **6**  $[\text{MS}+1]=230.1545(\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO})$  y **7**  $[\text{MS}+1]=308.1287(\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3)$ . La fracción fue purificada por PLC (Solvente C) y los principales alcaloides: **4** y **5** fueron identificados por MS de alta resolución;  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D

### Purificación de los alcaloides de las hojas

La purificación de los principios activos a partir de los extractos totales de hojas, siguieron los procedimientos arriba descritos para la corteza. Así de la Fracción 1, mediante cristalización con n-hexano caliente, se obtuvo la 2-fenil-quinolina (30%, con relación al peso de alcaloides totales),  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ , estructura confirmada por espectros de MS de alta resolución;  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D. Las Fracciones 2, 3 y 4 fueron analizadas por TLC-MS, encontrándose como alcaloides mayoritarios a las moléculas **1**  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ ; **3**  $[\text{MS}+1]=236.1075(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO})$ ; **4**  $[\text{MS}+1]=172.1126(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N})$ ; **8**  $[\text{MS}+1]=200.1075(\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO})$ ; **9**  $[\text{MS}+1]=186.0919(\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO})$  y **10**  $[\text{MS}+1]=170.0970(\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N})$ . Los alcaloides mayoritarios **8**, **9** y **10** fueron purificados por PLC (Solvente C) y se identificaron por MS de alta resolución,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D. Como alcaloides

minoritarios en los extractos de hojas se detectaron por MS de alta resolución, a los compuestos **7**  $[\text{MS}+1]=308.1287(2(\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3))$  y **11**  $[\text{MS}+1]=294.1494(\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2)$

### Evaluaciones antiparasitarias in vitro

La actividad de las muestras fue medida sobre cultivos *in vitro* del estadio promastigote de *Leishmania*: complejo *L. amazonensis* (cepa PH8, cepa 690), complejo *L. braziliensis* (cepa M2903, cepa 2252), complejo *L. donovani* (cepa pp75) y complejo *L. chagasi* (cepa 642), cultivados a  $26^\circ\text{C}$  en medio Schneider suplementado al 5% con suero bovino fetal inactivado ( $56^\circ\text{C}$  x 30min). Parásitos en fase de crecimiento logarítmico fueron distribuidos en microplacas de 96 pozos a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL, cada pozo fue tratado con diferentes concentraciones de los extractos: 100, 50 y  $25\mu\text{g/mL}$ . Los resultados de actividad leishmanicida son expresados en valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentración de la droga que inhibe el 50% del desarrollo del parásito), obtenido mediante una típica curva dosis respuesta (log de la concentración de la droga vs % de inhibición), como factor de tratamiento fueron realizadas tres replicas. Las cepas fueron provistas por Dr. Jean-Pierre Dedet (Instituto Pasteur-Francia).

### Estudios tóxico-cinéticos

En el bioterio del IIFB, ratones albinos de la cepa Balb/c adultos, de ambos sexos (25-30g), fueron organizados en grupos experimentales y ratas Wistar (200-300g), fueron mantenidos en condiciones controladas, iluminación (ciclo claro/oscuras de 12hr), temperatura ( $18$  y  $20^\circ\text{C}$ ) con agua y alimento *ad libitum* y humedad relativa entre 30-70%. Los animales permanecieron de 8 a 24 horas en ayunas antes de la administración por vía oral (cánulas 19G  $\times 1^{-1/2}$  pulg para ratones y 18G  $\times 3^{-1/2}$  pulg para ratas) del extracto de la Evanta, en un vehículo oleoso a dosis de: 5.0, 2.5, 1.0 y  $0.5\text{g/kg}$  de peso. Observándose a los animales en ambulancia sobre una superficie plana libre. Los ratones fueron evaluados según criterios establecidos<sup>25</sup>.

### Determinación de toxicidad aguda

La dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ) se determino en condiciones de bioterio arriba descritas. Un grupo de ratones (10 animales de 25 a 30g) recibió por vía oral el extracto oleoso ( $5.0\text{g/kg}$  peso, el grupo control recibió el vehículo oleoso, volumen calculado según peso) los cuales fueron observados por 14 días. El experimento se realizó por triplicado (ratones hembras y machos) para valorar la repetición. La  $\text{DL}_{50}$  se determino usando el método de Hill<sup>26</sup>.

### Determinación de toxicidad subcrónica

Los niveles de toxicidad subcrónica se determinaron en condiciones de bioterio descritas. Un grupo de ratones (60 animales con  $\pm$ 20% variación de peso) recibió por vía oral el extracto oleoso diariamente a la misma hora por un periodo de 28 días (5.0, 2.5 0.5g/kg, el grupo control recibió el vehículo oleoso, volumen calculado según peso). Paralelamente se trabajó con un grupo satélite de 20 ratas (10 por cada sexo) tratadas con el extracto (2.5g/kg) por 28 días para las determinaciones bioquímicas clínicas (urea, fosfatasa alcalina, GOT/AST, GPT/AST) en sangre cada 7 días. Los exámenes histopatológicos se realizaron cada 7 días (cerebro, hígado y riñón) en concordancia a criterios establecidos<sup>27</sup>.

### Determinación de los parámetros farmacocinéticos

Grupos de ratones (8 animales con  $\pm$ 20% variación de peso) fueron administrados con extracto oleoso (1.0g/kg y grupo control, con vehículo oleoso). Muestras de sangre de la cola se colectaron en tubos de hematocrito heparinizado (1, 2, 3, 5, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 55hr). Las muestras sanguíneas fueron tratadas con de fosfato buffer (pH 7.4, 2mL) y extraídas con  $\text{CHCl}_3$  (20mL), y secadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (2.0g). La cuantificación de alcaloides se realizó utilizando el

espectrofotómetro UV-Vis entre 200-400nm mediante parámetros definidos<sup>28</sup>.

### Inducción del cultivo de Evanta *in vitro*

Hojas de plántulas de *G. longiflora* fueron esterilizadas superficialmente en etanol 70%(v/v x30seg) y cloruro de piridonio 0.15%(v/v x30seg), hipoclorito de sodio 2%(v/v x30min), Benlate® 0,1%(p/v, x5 min) y anfotericina B (15mg/L x10 min). Las hojas tratadas fueron seccionadas en piezas de 5mm por lado y colocadas en cajas de Petri conteniendo el medio basal M&S completo<sup>29</sup> (Sigma) con la adición de vitaminas Gamborg's B5 (Sigma) y la adición de 100mg/L de mio-inositol y 3%(p/v) de sacarosa. A este medio se adicionaron las combinaciones hormonales (2,4-D/BAP; 2,4-D/Kin; NAA/BAP y NAA/Kin) descritas, el medio fue ajustado a pH 5,8 y se adicionó agar 8%(p/v) (Sigma) y esterilizado en autoclave. El medio fue transferido a cajas de Petri, una vez gelificado, se transfirieron segmentos de hojas y se incubaron a 25 °C dentro de una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16hr. luz a una intensidad de  $50\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ . Las porciones friables de los callos fueron sub-cultivados durante ocho ciclos de 3 semanas c/u en los medios sólidos antes de inducir las suspensiones celulares.

Combinaciones Hormonales	Tratamiento A 2,4-D/BAP	Tratamiento B 2,4-D/Kin	Tratamiento C NAA/BAP	Tratamiento D NAA/KIN
M1	0/10	0/10	0/10	0/10
M2	0.1/5	0.1/5	0.1/5	0.1/5
M3	0.5/5	0.5/5	0.5/5	0.5/5
M4	1/1	1/1	1/1	1/1
M5	5/5	5/5	5/5	5/5
M6	5/0.1	5/0.1	5/0.1	5/0.1
M7	10/0	10/0	10/0	10/0
M8	0	0	0	0

### Suspensiones celulares semi-continuas

Las suspensiones celulares se iniciaron a partir de tejido de callo (1.0g) y se transfirieron a matraces (125mL) con medio líquido M&S (50mL), vitaminas medio Gamborg's B5, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (5mg/L) y cinetina (0.1mg/L). Los cultivos celulares fueron incubados en cámara de cultivo a 25°C sobre un agitador orbital rotatorio (Heidolph 2010) a 100r.p.m. en oscuridad completa, por un periodo de 30 días, monitoreando en intervalos de 5 días el incremento de biomasa y la producción de alcaloides en el medio líquido.

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

Un total de 10 árboles de Evanta, de entre 7 a 11 metros de altura y entre 10 a 12 cm de diámetro a la altura del pecho, fueron colectados y los diferentes órganos secados y tamizados por separado. La Figura 1 presenta el promedio de peso, seco en kilogramos, de los órganos por árbol. El material fue extraído y los extractos evaluados frente a parásitos de *Leishmania*, en modelos *in vitro*, este trabajo se centra sobre los extractos de hojas y de corteza principal.

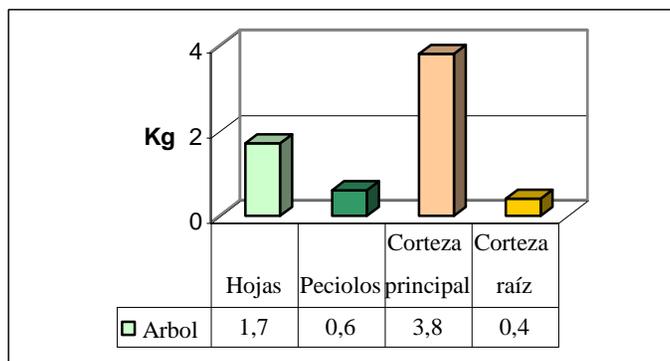


Figura 1. Peso seco promedio, en kilogramos, de los diferentes órganos de árboles de Evanta.

El material vegetal, seco y finamente molido fue sometido a procesos de extracción por maceración y por extracción continua (soxhlet), con y sin previa humectación utilizando NaOH 0.1N(10,15, 20mL) y

1N (10, 20mL). La Figura 2 presenta, los resultados de las extracciones con y sin humectación y la Figura 3 muestra que es conveniente llevar el proceso de maceración por 3 días, sin humectación previa.

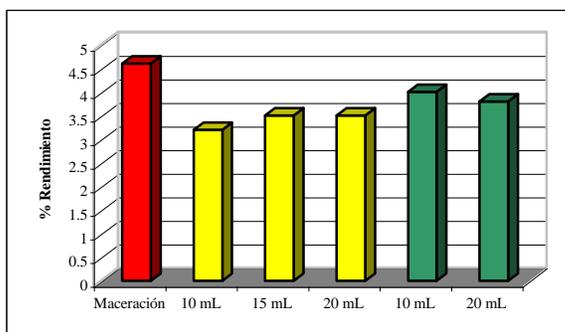


Figura 2. Rendimientos de extracción por maceración sin humectación (Maceración). Humectando con NaOH 0.1N, 10, 15 y 20mL y Humectando con NaOH 1.0N, 10 y 20mL.

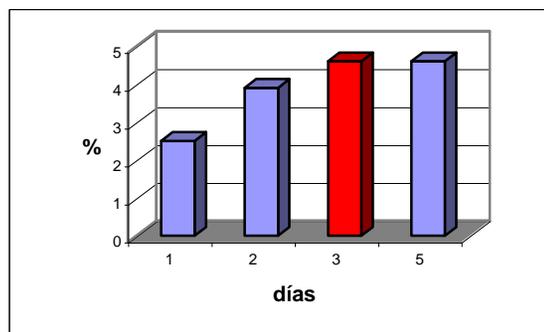


Figura 3. Rendimiento de extracción por Maceración, sin previa humectación, en días.

Los rendimientos de obtención de los alcaloides totales, con HCl 1N, a partir del extracto crudo se muestra en la Figura 4, mientras que en la Figura 5 se

muestra, mediante espectros de UV de cada uno de los tres lavados realizados, la extracción sucesiva de los alcaloides.

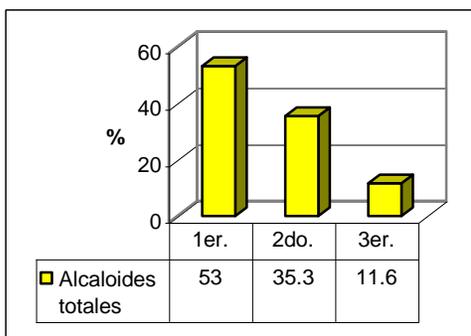


Figura 4. Rendimiento de los lavados del extracto crudo de corteza en la obtención de alcaloides totales utilizando HCl 1N.

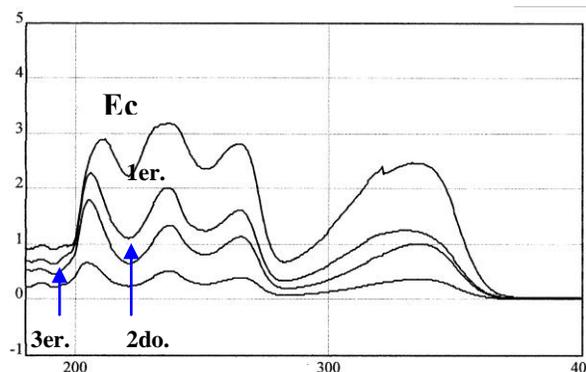


Figura 5. Espectros de UV del extracto crudo (Ec), primero (1er), segundo (2do) y tercer (3er) lavados en medio ácido.

Nuestros estudios de extracción, de tres repeticiones, de 4.0 kilogramos de corteza seca y molida rindieron un promedio de 185.7 gramos de extracto crudo (4.6%, con relación al peso seco de la planta), a partir del cual se obtuvieron como promedio 83.0 gramos de alcaloides totales (2.0% con relación al peso seco de la planta y/o un 44.7% a partir del extracto crudo). De igual manera, partir de 3.8 kilogramos de hojas secas y pulverizadas se obtuvieron 147.8 gramos de extracto crudo (3.9%, con relación al peso seco de la planta) y 21.7 gramos de alcaloides totales (0.57% con relación

al peso seco de la planta y/o un 14.6% a partir del extracto crudo).

Los extractos crudos y los alcaloides totales obtenidos, fueron evaluados frente a las cepas de parásitos de *Leishmania* que se manejan en el IIFB. En la Tabla 1, se presentan los promedios de los valores de la IC50 (entre 58 a 61 repeticiones) y se puede observar que los alcaloides totales de la corteza muestran una actividad superior cercana a cuatro veces la del extracto crudo y los alcaloides totales de hojas muestran actividad superior a más de dos veces a actividad del extracto crudo correspondiente.

Tabla 1. Promedios de valores de IC50 de extractos crudos y alcaloides totales de corteza y hojas de *G. longiflora* frente a diferentes cepas de *Leishmania*.

Cepas de <i>Leishmania</i>	IC50 en µg/ml Corteza Principal		IC50 en µg/ml Hojas	
	E. crudo	A. Totales	E. crudo	A. Totales
<i>L. amazonensis</i> (PH8)	86.4	21.5	55.6	20.8
<i>L. amazonensis</i> (690)	98.4	-	60.2	-
<i>L. braziliensis</i> (M2903)	91.1	22.1	52.7	20.7
<i>L. braziliensis</i> (2252)	76.5	-	64.7	-
<i>L. donovani</i> (pp75)	90.4	26.4	52.8	21.8
<i>L. chagasi</i> (642)	125.2	-	77.9	-

Los extractos orgánicos de hojas (IC50 entre 52.8 y 77.9µg/ml) y de corteza (IC50 entre 76.5 y 125.2µg/ml) presentan actividad Leishmanicida *in vitro* sobre promastigotes de cepas de *Leishmania*: *L. amazonensis* (690 y PH8) *L. braziliensis* (M22903 y 2252), *L. donovani* (pp75) y *L. chagasi* (642). Utilizando el programa estadístico ANOVA, del análisis de varianza, una vía, en base a los valores de las IC50 se observó que no existen diferencias significativas en la actividad leishmanicida (entre cepas de la misma patología) y podemos concluir que, en términos generales, los extractos orgánicos de hojas presentan una mayor actividad leishmanicida que los extractos de corteza, excepto frente a la cepa *L. braziliensis* (2252) que pese a presentar diferencias en sus medias (corteza 76.5µg/ml y hoja 64.7µg/ml), la variabilidad existente entre las poblaciones estudiadas son del mismo orden de magnitud que de los errores, por lo tanto, se considera que las medias de los

tratamientos son iguales y las diferencias observadas se deben a la variabilidad biológica o a un error experimental. Sin embargo al realizar el mismo análisis sobre especies diferentes *L. donovani* (pp75, corteza 90.4µg/ml y hoja 52.8µg/ml) y *L. chagasi* (642, corteza 125.2µg/ml y hoja 77.9µg/ml), cepas que representan la misma patología (leishmaniasis visceral) se puede evidenciar actividad biológica significativamente diferente. Por un análisis semejante, podemos concluir que no existen diferencias significativas entre los valores de las IC50 de los alcaloides totales, de hojas y corteza, frente a las cepas evaluadas.

Los alcaloides totales fueron parcialmente purificados y divididos en cuatro fracciones por cromatografía de vacío (VLC) sobre sílica gel utilizando mezclas de tolueno, éter dietílico y metanol, de acuerdo a polaridad creciente, la Tabla 2 presenta los rendimientos de las fracciones respectivas.

Tabla 2. Resultados del fraccionamiento de los alcaloides totales en cromatografía de VLC

	Corteza		Hojas	
Extracto crudo	17.6g		6.9g	
SiO <sub>2</sub> cabeza	65.0g		25.0g	
SiO <sub>2</sub> columna	275.0g		124.0g	
Fracción 1: Tolueno (Tol)	4.2g	26%	2.1g	33%
Fracción 2: Tol-(Etil) <sub>2</sub> O (8:2)	4.7g	28%	3.1g	46%
Fracción 3: Tol-(Etil) <sub>2</sub> O (8:2)	4.1g	25%	1.1g	16%
Fracción 4: Tol-MeOH (8:2)	3.5g	21%	0.3g	5%
Total Fracciones	16.5g		6,6g	

De las fracciones 1 y 2 de los alcaloides totales de la corteza y de la Fracción 1 de los alcaloides totales de las hojas, se aisló la 2-fenilquinolina (**1**), por cristalización de n-hexano caliente, con un rendimiento de 51% (con relación al peso de los alcaloides totales de la corteza) y 30% (con relación al peso de los alcaloides totales de las hojas). En los alcaloides totales de la corteza el compuesto **1**, está acompañado de los compuestos: 2-pentilquinolina (**2**); 4-metoxi-2-fenilquinolina (**3**); 2-propilquinolina (**4**) y 2-(3,4-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**5**), en relación 1:05:0.28:0.28, respectivamente. Las moléculas **1** a **5** representan cerca del 99% del total de los alcaloides totales. Las estructuras fueron determinadas por espectrometría de masas de alta resolución y por RNM de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (1 y 2D), las asignaciones correspondientes están detalladas en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Por técnicas de TLC-MS, se ha podido establecer que entre los alcaloides minoritarios se encuentran las sustancias 4-metoxi-2-pentilquinolina (**6**) y 4-metoxi-2-(3,4-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**7**).

Mientras que en los alcaloides totales de las hojas, el compuesto **1** está acompañado de los compuestos: 4-metoxi-2-fenilquinolina (**3**); 2-propilquinolina (**4**); 4-metoxi-2-(E)-prop-1'-enilquinolina (Chimanina C, **8**); Chimanina D (**9**) y Chimanina B (**10**). Las estructuras fueron determinadas por espectrometría de masas de alta resolución y por espectroscopia de RNM de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (1 y 2D). Por técnicas de TLC-MS, se ha podido establecer que entre los alcaloides minoritarios se encuentran las sustancias 4-metoxi-2-(3,4-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**7**) y 2-(3,4-dimetoxifeniletíl)-fenilquinolina (**11**).

Tabla 3. Asignación de los desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H de los alcaloides quinolínicos obtenidos de la corteza de Evanta (CDCl<sub>3</sub>, δ = 7.24ppm y 400MHz)

□ Protón	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
C3	7.85(1H, d) J=8.6Hz	7.20(1H, d) J=8.4Hz	7.07(1H, s)	7.15(1H, d) J=8.4Hz	7.08(1H, d) J=8.4Hz
C4	8.23(1H, br d) J=8.6Hz	7.95(1H, brd) J=8.4Hz	-	7.95(1H, brd) J=8.4Hz	7.93(1H, brd) J=8.4Hz
C6	7.81(1H, brd) J=8.1Hz	7.63(1H, brd) J=8.0Hz	7.73(1H, brd) J=8.1Hz	7.63(1H, brd) J=8.4Hz	7.63(1H, brd) J=8.0Hz
C7	7.51(1H, m)	7.35(1H, dd) J=8.0 y 6.7Hz	7.51(1H, m)	7.35(1H, dd) J=8.4 y 6.7Hz	7.35(1H, dd) J=8.0 y 6.7Hz
C8	7.76(1H, t) J=7.9Hz	7.56(1H, dd) J=7.1 y 6.7Hz	7.76(1H, t) J=7.9Hz	7.56(1H, dd) J=7.1 y 6.7Hz	7.56(1H, dd) J=7.1 y 6.7Hz
C9	8.18(1H, brd) J=7.9Hz	7.79(1H, brd) J=7.1Hz	8.18(1H, brd) J=7.9Hz	7.97(1H, brd) J=7.1Hz	7.97(1H, brd) J=7.1Hz
C1'	-	2.90(2H, brdd) J=7.8 y 8.0Hz	-	2.83(2H, dd) J=7.6 y 6.1Hz	2.83(2H, dd) J=7.6 y 6.1Hz
C2'	8.20(2H, d) J=7.0Hz	1.75(2H, brpen) J=7.5Hz	8.20(2H, d) J=7.0Hz	1.76(2H, sex) J=7.7Hz	Sist AB 3.13 (2H) (J=10.2 y 8.9Hz)
C3'	7.55(2H, t) J=7.0Hz	1.32(4H, brm)	7.55(2H, t) J=7.0Hz	0.91(3H, t) J=7.3Hz	Sist AB 2.97 (2H) (J=10.2 y 8.8Hz)
C4'	7.48(1H, t) J=7.0Hz	1.32(4H, brm)	7.48(1H, t) J=7.0Hz	-	-
C5'	7.55(2H, t)	0.85(3H, t)	7.55(2H, t)	-	-

	$J=7.0\text{Hz}$	$J=7.1\text{Hz}$	$J=7.0\text{Hz}$		
C6'	8.20(2H, d) $J=7.0\text{Hz}$	-	8.20(2H, d) $J=7.0\text{Hz}$	-	-
C2''	-	-	-	-	6.56(1H, dd) $J=8.0$ y $1.3\text{Hz}$
C3''	-	-	-	-	6.80(1H, d) $J=8.0\text{Hz}$
C6''	-	-	-	-	6.97(1H, d) $J=1.3\text{Hz}$
OCH <sub>3</sub>	-	-	3.94(3H, s)	-	
OCH <sub>2</sub> O	-	-	-	-	5.77(2H, s)

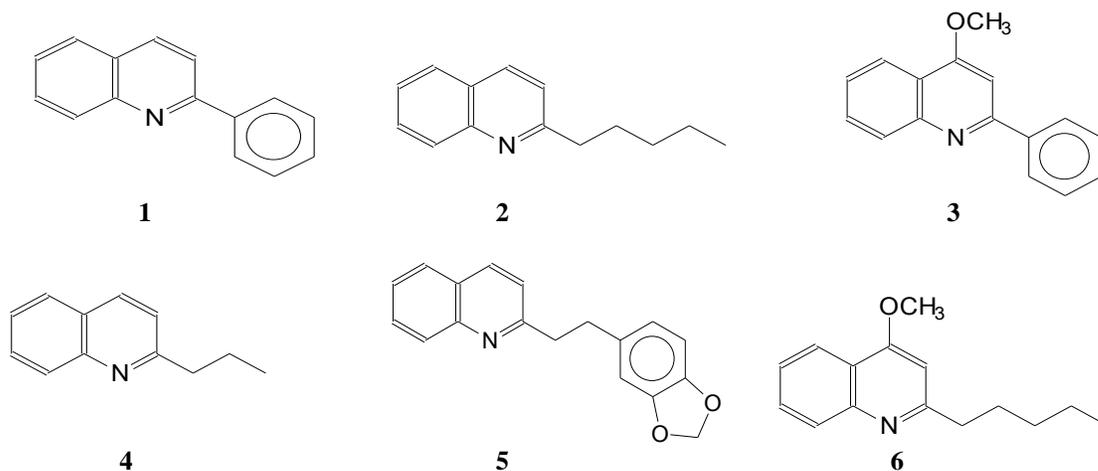
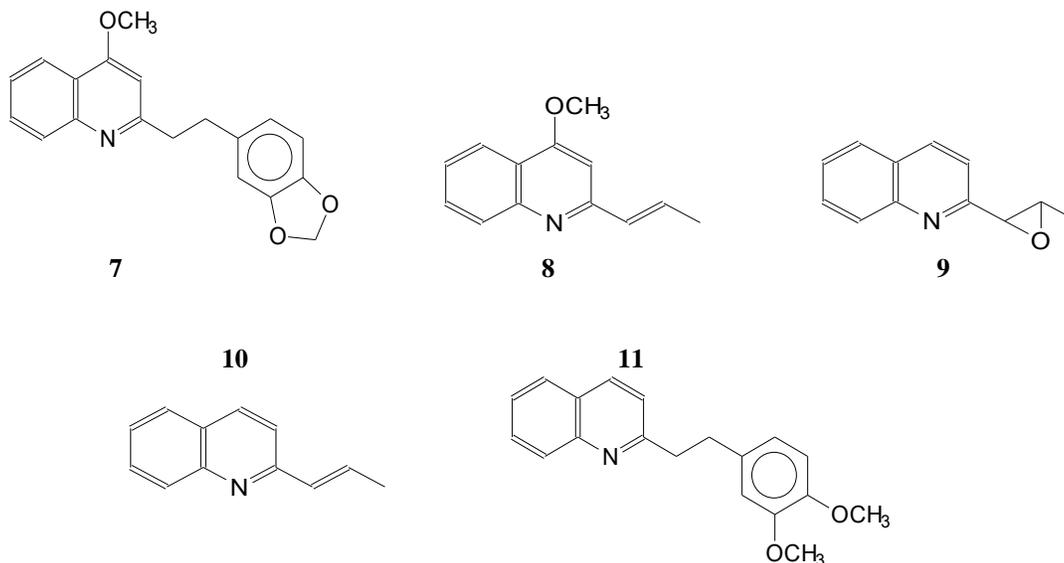


Tabla 4. Asignación de los desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C de los alcaloides quinolínicos obtenidos de la corteza y hojas (CDCl<sub>3</sub>, δ=77.24ppm, 100MHz)

□ Carbono	1	2	3	4	5	8	9	10
C2	157.2	162.7	158.8	163.5	162.5	156.5	156.5	158.0
C3	118.0	121.3	98.0	121.5	121.6	97.2	118.4	116.7
C4	136.6	136.1	162.8	136.3	136.2	158.8	136.2	137.5
C5	127.3	126.6	120.3	126.8	126.9	121.5	127.2	127.8
C6	127.4	127.4	130.0	127.6	127.5	125.0	127.6	127.7
C7	129.5	125.2	129.1	125.7	125.9	125.0	125.9	126.5
C8	129.8	128.7	129.2	129.5	129.4	130.1	129.6	129.8
C9	129.9	129.2	121.6	128.9	128.8	129.4	128.9	129.2
C10	148.2	147.8	149.1	148.0	147.0	148.8	148.2	147.6
C1'	139.6	39.3	140.3	41.4	41.3	132.5	60.4	132.4
C2'	127.6	29.7	127.6	23.4	35.7	132.8	58.3	132.2
C3'	128.9	31.7	128.7	14.1	-	18.8	17.9	18.4
C4'	126.2	22.5	125.4	-	-	-	-	-
C5'	128.9	14.0	128.7	-	-	-	-	-
C6'	127.6	-	127.6	-	-	-	-	-
C1''	-	-	-	-	135.4	-	-	-
C2''	-	-	-	-	109.1	-	-	-
C3''	-	-	-	-	147.1	-	-	-
C4''	-	-	-	-	145.6	-	-	-
C5''	-	-	-	-	121.4	-	-	-
C6''	-	-	-	-	108.2	-	-	-
OCH <sub>3</sub>	-	-	55.6	-	-	55.5	-	-
OCH <sub>2</sub> O	-	-	-	-	100.8	-	-	-



El extracto de la corteza de la Evanta, disuelto en un vehículo oleoso, fue administrado a ratones albinos de la cepa BALB/c por vía oral a concentración de 5g/kg y dio como resultado una Dosis Letal cero (DL<sub>0</sub>), dado que no se observaron signos de toxicidad ni muertes entre el grupo control que recibió solamente el vehículo, por tanto se concluye que ambos grupos tienen un efecto similar. A partir de los resultados obtenidos en el estudio preclínico de los extractos de la Evanta, mediante modelos toxicocinéticos en ratones BALB/c y ratas Wistar podemos inferir que el uso popular de la Evanta utilizada por las etnias Tacana,

Chiman y Mosekene en el tratamiento de la leishmaniasis no evidencia toxicidad por vía oral. Con respecto al estudio hematológico podemos concluir que no se observaron diferencias significativas en los valores de hematocrito entre el grupo control y el grupo tratado con el extracto de la Evanta, a una concentración de 2.5g/kg, y que ambos grupos tienen un valor similar de hematocrito en %, las diferencias observadas en las medias de tratamientos son debidas al azar. La evaluación de parámetros químicos clínicos en ratas Wistar evidencia cambios pocos significativos en el procesamiento enzimático ver cuadro (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de los estudios de toxicidad subcrónica, en ratones BALB/c y ratas Wistar administrados con extractos crudos de Evanta

ESPECIE UTILIZADA	PARÁMETRO EVALUADO	RESULTADO
Ratón albino cepa BALB/c	Mortalidad	Ninguna
Ratón albino cepa BALB/c	Peso corporal	Promedio 30g $\pm$ 0.5g
Ratón albino cepa BALB/c	Consumo de agua y alimentos	Agua = 3mL $\pm$ 0.5mL día. Comida = 4g $\pm$ 0.5g día.
Ratón albino cepa BALB/c	Ensayos hematológicos	Hematocrito = 63% $\pm$ 0.5 %. Recuento de GB = 10.062mm <sup>3</sup> Cayados = 0% Segmentados = 32% Eosinófilos = 0% Basófilos = 0% Linfocitos = 66% Monocitos = 2%
Ratas Wistar	Bioquímico Clínicos	Urea = 36 – 45mg/L GOT/AST = 137–146U/L GPT/AST = 42–46U/L Fosfatasa Alcalina = 209–243U/L

El estudio histopatológico muestra que no existe evidencia de daño en los órganos diana expuestos en el tratamiento subcrónico. (ver Cuadro 2). Los resultados del modelo farmacocinético, contribuyen a proponer un régimen de dosificación a partir de los datos obtenidos, puesto que al conocer la cinética del extracto es posible calcular la dosis de carga debido a las diferencias entre las concentraciones en función al tiempo. Este trabajo fue el primer paso en este tipo de investigaciones donde se ha cumplido una primera fase, que son los problemas en la administración por vía oral.

Actualmente, se está trabajando en determinar los niveles de bio-disponibilidad de los alcaloides totales, en forma de sustancias puras, utilizando conejos, para

poder definir las concentraciones ideales de los preparados farmacéuticos sistémicos, elaborados a base de Evanta y que serían utilizados en los estudios clínicos.

La semivida de eliminación o vida media biológica (tiempo necesario para que desaparezca del organismo el 50% del extracto) encontrado para el extracto de Evanta es de 17.41 horas (la quinina tiene 11+/- 2horas). Esto se debe a que la constante de absorción,  $K_a=0.5389$ , es mayor que la de eliminación  $K_e=3.98 \times 10^{-2}$  lo cual muestra una absorción más rápida que la eliminación. Este dato nos permite plantear un esquema de administración en forma tal que se asegure el mantenimiento a un nivel sanguíneo efectivo sin peligro de intoxicación (Cuadro 3)

*Cuadro 2. Estudio histopatológico en ratones BALB/c tratados con extractos crudos de Evanta*

ESPECIE /CEPA UTILIZADA	PARÁMETRO	RESULTADO	
Ratón albino cepa BALB/c	Histopatológico	Primera Semana	Cerebro: Histográficamente preservado, sin lesión patológica. Hígado: Histográficamente preservado sin lesión patológica. Riñón: Discreta necrosis tubular por hipoxia y cambios post mortem iniciales.
Ratón albino cepa BALB/c	Histopatológico	Segunda Semana	Cerebro: Discreto edema inicial por signos de hipoxia leve. Hígado: tumefacción turbia y congestión de venas centrales. Riñón: marcada infiltración grasa.
Ratón albino cepa BALB/c	Histopatológico	Tercera Semana	Cerebro: sin lesión patológica. Hígado: sin lesión patológica. Riñón: Sin lesión patológica, solo se evidencian cambios iniciales post mortem.
Ratón albino cepa BALB/c	Histopatológico	Cuarta Semana	Cerebro: sin lesión patológica. Hígado: sin lesión patológica. Riñón: sin lesión patológica. Cambios iniciales post mortem.

Para determinar la cinética del extracto crudo de Evanta (absorción, distribución y eliminación en función al tiempo), se administró por vía oral una dosis de 1g/kg de peso a grupos de 4 ratones con un peso

promedio de 25-30g, a los cuales se les tomó sangre a diferentes horas para cuantificar por espectroscopia de UV la concentración del extracto de Evanta en sangre (Figura 6).

Cuadro 3. Resultados de los parámetros fármaco-cinéticos

PARAMETRO	UNIDAD
Volumen de distribución (Vd)	96.70 L
Constante de absorción (Ka)	A = -4.86 B = 0.5389
Constante de eliminación (Ke)	A = 4.86 B = $3.98 \times 10^{-2}$
Semivida de Absorción ( $t_{1/2}$ )	1.28 horas
Semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ )	17.41 hr
Area bajo la curva ABC	98.121 $\mu\text{g/hr/mL}$
Depuración	3.84 mL/min

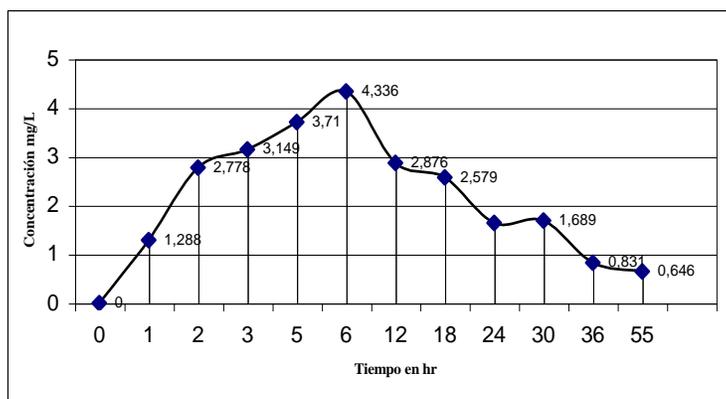
- El cálculo de los resultados se realizó por el programa computarizado Tallarida<sup>30</sup>.

El volumen de distribución fue de 96.70 litros, y es otro parámetro de importancia para discutir los procesos de disponibilidad de los fármacos, puesto que nos ayuda a relacionar la cantidad de extracto administrado y su concentración en sangre. Este valor elevado, hace suponer que la mayor parte del compuesto estaría unido a la albúmina o a una glucoproteína, por la naturaleza del alcaloide básico. El volumen de distribución puede variar ampliamente con dependencia del pKa del extracto oleoso, del grado de fijación a las proteínas plasmáticas, del coeficiente de

partición lipídico del extracto. También puede variar en función a la edad, sexo o una patología y la composición orgánica del organismo sobre el que se aplica.

La determinación del área bajo la curva (ABC) es el parámetro más importante de la biodisponibilidad pues determina la cantidad del medicamento absorbido en la circulación después de la administración del extracto, indicando la magnitud de absorción y la bioequivalencia (ver Figura 6)

Figura 6. Tiempo en horas vs. concentración en mg/L del extracto de Evanta en plasma sanguíneo



A partir de los resultados obtenidos en el estudio preclínico de los extractos de la Evanta, mediante modelos toxicocinéticos, podemos inferir que su uso popular por las etnias Tacana, Chiman y Mosekene como alternativa en el tratamiento de la leishmaniasis no evidencia toxicidad por vía oral.

La validez del modelo planteado obedece a la repetición de los resultados en función al análisis estadístico, lo que nos inclina a concluir que el extracto oleoso de la corteza de la Evanta, proveniente de los bosques tropicales en los últimos contrafuertes

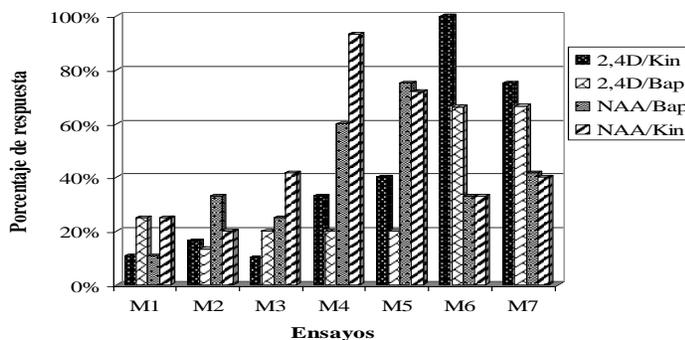
bolivianos del Alto Beni de los departamentos de La Paz y el Beni, administrados a ratones albinos de la cepa BALB/c por vía oral no mostraron toxicidad significativa. No se observaron diferencias significativas sobre los signos de toxicidad ni muertes entre el grupo control que recibió solamente el vehículo, ni el grupo que recibió el extracto a una concentración de 5g/kg.

Dada la importancia de esta especie medicinal, en el desarrollo de tratamientos alternativos para la leishmaniasis, hemos comenzado estudios orientados al

establecimiento *in vitro* de un sistema de cultivo celular semi-continuo, destinado al estudio de la producción de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida, bajo condiciones controladas. Así los tejidos de hojas esterilizadas y expuestos a la combinación de 5mg/L de 2,4-DAA y 0.1mg/L de cinetina dieron lugar a la formación de callos friables a los 20 días de iniciado su cultivo (Figura 7). En los demás tratamientos, si bien se observó la formación de callos, los mismos presentaron una consistencia poco friable. Por otra parte se ha determinado que la exposición de los callos a la luz condiciona un proceso de vitrificación evidente del material vegetal, en oscuridad completa este proceso no fue observado.

Disponer de un sistema de cultivos en suspensión de esta planta es relevante para futuros trabajos, dirigidos a incrementar el contenido de alcaloides, dado que permitiría la aplicación de condiciones de inducción tanto biótica como abiótica que puedan promover la acumulación de estos alcaloides. Este sistema permitirá también realizar estudios sobre la enzimas involucradas en la síntesis de los alcaloides de interés con el fin de identificar los puntos de regulación más importantes. Estudios orientados a la producción de estos alcaloides leishmanicidas, *in vitro*, están en curso.

Figura 7. Porcentaje de formación de callos a partir de explantes de hojas de *G. longiflora* en función a la concentración de auxinas y citocininas. El % de respuesta se refiere al número de eventos de formación de callos a partir de 18 explantes después de 30 días de cultivo.



## AGRADECIMIENTOS

Los estudios biológicos, han sido parcialmente financiados por la OEA Proyecto Multilateral “Flora Regional como Fuente de nuevos Fármacos”. El aislamiento y la asignación estructural de las sustancias activas se ha desarrollado en la Universidad de Lund, programa UMSA-Sida/SAREC, proyecto BIOMIC, Laboratorios de Bioteknik, Prof. Bo Mattiasson, y los

espectros de RMN y MS fueron obtenidos en los laboratorios de Bioorganisk Kemi, Prof. Olov Sterner. Los estudios de establecimiento de sistemas celulares semi-continuos, se ha logrado a través del proyecto “Jeunes Equipe” (IRD-BIOLEISH). Los estudios de Evanta se han iniciado dentro del programa CYTED, Sub Programa X, Proyecto X.5.

## Referencias Bibliográficas

- Giménez, A.; Gupta, M.; Deharo, E. Editores. “Manual de Técnicas de Laboratorio para la Evaluación de Sustancias Tripanocidas y Leishmanicidas” Editorial Prisa, La Paz, Bolivia, 2005, pp 85-88
- Desjeux P., *Leishmaniosis*, (1993), WHO/CTD/MIP/WP, 93, 8.
- OPS/OMS-Bolivia, Ministerio de Salud y Previsión Social, Dirección General de Epidemiología “Anuario Epidemiológico 2000” Editorial Quality s.r.l., La Paz, Bolivia, 2000, pp 75-81.
- Dedet, J.P., “*Les Leishmanioses*”, University Francophones, 1999, pp 213-226.
- Fournet, A.; Vagneur, B.; Richomme, P.; Bruneton, J. *Can. J. Chem.*, **1989**, 67, 2116 – 2118.
- Fournet, A.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cave, A.; Richomme, P.; Bruneton, J. *Journal of Natural Products*, **1993** 56, 1547 – 1552
- Munos, M.H.; Mayrargue, J.; Fournet, A.; Gantier, J.C.; Hocquemiller, R.; Moskowitz, H. *Chem. Pharm., Bull.* **1994** 42 (9) 1914-1916.

- <sup>8</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V. *Journal of Ethnopharmacology*, **1994**, *41*, 19-37
- <sup>9</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Cave, A.; Bruneton, J. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**, *37*, 859-863.
- <sup>10</sup> Fournet, A.; Ferreira, M.E.; Rojas de Arias, A.; Torres de Ortiz, S.; Fuentes, S.; Nakayama, H.; Hocquemiller, R. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1996**, *40* (11), 2447-2451.
- <sup>11</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cave, A.; Richomme, P.; Bruneton, J. *Phytotherapy Research* **1994**, *8*, 174-178.
- <sup>12</sup> Fournet, A.; Gantier, J.C.; Gautheret, A.; Leysalles, L.; Munos M.H.; Mayrargue, J.; Moskowitz, H.; Cave, A.; Hocquemiller, R.; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1994**, *33*, 537-544.
- <sup>13</sup> Gantier, J.C, et al *Planta Medica* **1996**, *62* 3: 285-286
- <sup>14</sup> Bourdy, G.; Conbes, I.; varios otros coautores "Plantas del Chaco II. Usos tradicionales Izoceño-Guaraní". Editores: UMSA; Fundación KAA IYA; IRD; WCS Bolivia; HNB; CYTED; OEA; Ediciones SIRENA color, Santa Cruz, Bolivia, 2002, pp 10-441
- <sup>15</sup> Bourdy, G.; Giménez, A.; Quenevo, C.; varios otros coautores "TACANA: ECUANASHA AQUÍ, ECUANASHA ID'RENE CUANA, ME SCHANAPAQUE" (TACANA: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas). Editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD (ex ORSTOM). Ediciones Plural, La Paz, Bolivia, 1999, pp 11-496
- <sup>16</sup> Bourdy, G.; Giménez, A. y varios otros coautores "Guía de Salud: Utilización de las Plantas Medicinales Tacana y de Algunos Remedios de la Farmacia". Editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; ORSTOM; UNICEF. Ediciones Plural, La Paz, Bolivia, 1998, pp 9-238
- <sup>17</sup> Bourdy, G.; Oporto, P.; Giménez, A. Deharo, E. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004** *93*, 269-277
- <sup>18</sup> Muñoz, V.; Sauvain, M.; Bourdy, G.; Callapa, J.; Bergeron, S.; Rojas, I.; Bravo, J.A.; Balderrama, L.; Ortiz, B.; Giménez, A.; Deharo E. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000** *69*, 127-137
- <sup>19</sup> Bourdy, G.; DeWalt, S.J.; Chávez de Michel, L.R.; Roca, A.; Deharo, E.; Muñoz, V.; Balderrama, L.; Quenevo, C.; Giménez, A. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000** *70*, 87-109
- <sup>20</sup> Proyecto Multilateral OEA "Flora Regional como Fuente de Fármacos contra Parásitos, Hongos y Cáncer". Coordinador CIFLOPAN de Panamá y participación de Argentina, Bolivia, Colombia y Guatemala. 2001-2004.
- <sup>21</sup> Proyecto CYTED-X.5 "Búsqueda Obtención y evaluación de Nuevos Agentes Antiparasitarios" Subprograma X, Química Fina Farmacéutica. 1999-2003.
- <sup>22</sup> UMSA: IIFB-IBBA-IIQ y IRD Proyecto de "Validación de la Medicina Tradicional a través de estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos en Bolivia I y II" Financiado por FONAMA-EIA, 1993-1999.
- <sup>23</sup> Killeen, T.; Garcia, E.; Stephan, B. "Guía de Árboles de Bolivia" Editorial Quipus s.r.l., La Paz, Bolivia, 1993, pp 709-710.
- <sup>24</sup> Programa UMSA-Asdi Sarec, Proyecto "Enfermedades Infecciosas" Financiamiento de Asdi-Sarec,. Universidad de Estocolmo, Departamento de Inmunología Prof. Marita Troye-Blomberg, y Servicios de Laboratorio y Diagnóstico en Salud (SELADIS) UMSA
- <sup>25</sup> M. H. Malone *Pharmacological Approaches to Natural Product Screening and Evaluation*. 1977
- <sup>26</sup> Goodman, Alfred y otros, *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México D. F. Editorial Médica Panamericana. Octava Edición. 1990.
- <sup>27</sup> Guidelines for testing chemical by repeated dose in oral toxicity-rodent, 90 days study. 1987.
- <sup>28</sup> Manual of Pharmacological Calculations With computer Programs 1987.
- <sup>29</sup> Murashige T & F. Skoog *Physiol. Plant.* **1962**, *15*: 473-497
- <sup>30</sup> Tallarida, Ronald., Rodney B. Murray, *Manual of Pharmacological Calculations*. Philadelphia. USA. Springer-Verlag. Second Edition. 1987.