

Búsqueda de compuestos antiprotozoarios en especies de la flora medicinal argentina

Valeria P. Sülsen*

Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 2° piso (1113) Buenos Aires, Argentina.

*Autor a quien dirigir correspondencia: vsulsen@ffyb.uba.ar

Compendio de tesis

Lugar y fecha de aprobación de la tesis:

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. 16 de marzo de 2009.

Resumen

Los extractos orgánicos y acuosos de once especies medicinales argentinas fueron evaluados *in vitro* sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Las especies *Ambrosia tenuifolia*, *A. scabra*, *Baccharis spicata*, *Acanthostyles buniifolium* (Asteraceae), *Lippia integrifolia* (Verbenaceae) y *Clinopodium gilliesii* (Lamiaceae) fueron activas con inhibiciones mayores al 70 % en la concentración de 100 µg/ml. Los extractos orgánicos de *A. tenuifolia* y de *A. scabra* presentaron además, actividades leishmanicida y antiplasmódica con porcentajes de inhibición superiores al 50 y 40 %, respectivamente, a 10 µg/ml. Del fraccionamiento bioquímico del extracto orgánico de *A. tenuifolia* se aislaron dos lactonas sesquiterpénicas y un flavonoide activos sobre epimastigotes de *T. cruzi*: psilostachina (IC₅₀ = 1,2 µg/ml) y peruvina (IC₅₀ = 1,6 µg/ml) e hispidulina (IC₅₀ = 14,0 µg/ml), respectivamente. A partir del extracto orgánico de *A. scabra* se aisló la lactona sesquiterpénica psilostachina C, que fue activa con un valor de IC₅₀ de 0,6 µg/ml. La psilostachina y la psilostachina C también fueron activas *in vitro* sobre tripomastigotes de *T. cruzi*, promastigotes de *Leishmania mexicana* y sobre cepas sensibles y resistentes a cloroquina de *Plasmodium falciparum*. Ambos compuestos presentaron actividad *in vivo* sobre ratones infectados con *T. cruzi*, disminuyeron el número de parásitos circulantes y aumentaron el tiempo de sobrevida de los animales. Psilostachina y psilostachina C indujeron alteraciones ultraestructurales en *T. cruzi* a concentraciones menores que 1 µg/ml.

Search for antiprotozoal compounds in species of the Argentine medicinal flora

Summary

The organic and aqueous extracts of eleven Argentinian medicinal plants have been tested for their *in vitro* trypanocidal activity on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. The species *Ambrosia tenuifolia*, *A. scabra*,

Palabras clave: *Ambrosia* spp. - lactonas sesquiterpénicas - flavonoides - psilostachina - psilostachina C - *Trypanosoma cruzi* - *Leishmania* sp. - *Plasmodium falciparum*.

Key words: *Ambrosia* spp. - sesquiterpenelactones - flavonoids - psilostachyin - psilostachyin C - *Trypanosoma cruzi* - *Leishmania* sp. - *Plasmodium falciparum*.

Baccharis spicata, *Acanthostyles buniifolium* (Asteraceae), *Lippia integrifolia* (Verbenaceae) y *Clinopodium gilliesii* (Lamiaceae) showed trypanocidal activity with percentages of growth inhibition higher than 70 % at a concentration of 100 µg/ml. The organic extracts of *A. tenuifolia* and *A. scabra* showed leishmanicidal and antiplasmodial activities with percentages inhibitions higher than 50 and 40 %, respectively, at 10 µg/ml. Bioassay guided fractionation of the organic extract of *A. tenuifolia* led to the isolation of two sesquiterpenelactones and one flavonoid that were active against *T. cruzi* epimastigotes: psilostachyin (IC₅₀ = 1,2 µg/ml) and peruvín (IC₅₀ = 1,6 µg/ml) and hispidulin (IC₅₀ = 14,0 µg/ml). From the organic extract of *A. scabra* the sesquiterpenelactone psilostachyin C was isolated, showing an IC₅₀ value of 0,6 µg/ml on *T. cruzi* epimastigotes. Psilostachyin and psilostachyin C were also active *in vitro* on *T. cruzi* trypomastigotes, *Leishmania mexicana* promastigotes and on chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. Both compounds showed *in vivo* activity on *T. cruzi* infected mice, lowering parasitemia levels and increasing the survival rate of the animals. Psilostachyin and psilostachyin C induced ultrastructural alterations on *T. cruzi* at concentrations below 1 µg/ml.

Las enfermedades protozoarias

Las enfermedades causadas por protozoos, como la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis y la malaria, continúan siendo un importante problema de salud pública que afecta a millones de personas, en particular, en los países en desarrollo. Estas enfermedades son consideradas entre las más prevalentes y de mayor impacto en el nivel mundial no solo por el número de personas afectadas y en riesgo de adquirir la infección, sino también por la discapacidad y la deformidad (graves y permanentes) que producen y por ende, el efecto en el desarrollo económico de los países donde estas enfermedades son endémicas.

En Latinoamérica, la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, ocupa el cuarto lugar en importancia como causa de discapacidad y, en consecuencia, se constituye en un problema grave de salud en el continente. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen alrededor de 10 millones de personas infectadas en el mundo, principalmente en Latinoamérica, y se considera que más de 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad. Se estima que durante el año 2008 más de 10 mil personas murieron a causa de esta enfermedad (OMS, 2010). La enfermedad de Chagas es producida por el *T. cruzi*, parásito responsable de daños progresivos a diferentes órganos, principalmente el corazón, el esófago y el intestino grueso. En su ciclo biológico participan, como vectores, insectos triatomíneos

(*Triatoma infestans*) conocidos en la Argentina como “vinchucas”, y como “barbeiros” en Brasil. El mal de Chagas es la principal enfermedad endémica de importancia sanitaria en la República Argentina con aproximadamente 2 a 3 millones de personas infectadas de las cuales entre un 25 a un 30 % desarrollan cardiopatías graves (ALCHA, 2012; DNDi, 2010; Fernández Carral y col., 2010). La enfermedad de Chagas afecta principalmente a las áreas rurales del interior de la Argentina, donde habita el vector *T. infestans*. Sin embargo, las migraciones internas y externas ocurridas en los últimos años desde zonas endémicas hacia las grandes ciudades, ha dado como resultado la “urbanización” de la enfermedad de Chagas. Debido a esta situación, se encuentran personas infectadas viviendo en zonas marginales del conurbano bonaerense y en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá y países europeos (Fernández Carral y col., 2010; Graebín y col., 2009; De Rosa y col., 2010; Auger y col., 2005).

La leishmaniasis es una parasitosis producida por protozoos del género *Leishmania*, caracterizada por lesiones cutáneas, mucosas o viscerales y es transmitida por las picaduras de insectos dípteros de la sub-familia Phlebotominae. Esta enfermedad afecta aproximadamente a 12 millones de personas en el mundo y se estima que se producen 2 millones de casos nuevos por año (OMS, 2012a). En la Argentina, la leishmaniasis es endémica en las provincias del norte, donde es frecuente encontrar pacientes coinfectados con *T. cruzi* y *Leishmania* sp. (Frank y col., 2003).

La malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa producida por especies de *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*) y tiene como vector a insectos del género *Anopheles*. De acuerdo con la OMS, durante el año 2010 esta enfermedad afectó a 216 millones de personas y se estima que se produjeron 655 mil muertes (OMS, 2012b). En la Argentina, esta enfermedad afecta principalmente a la región norte, donde los casos están ligados, por lo general, a movimientos migratorios en la zona de fronteras (OPS, 2008). La malaria causada por el *P. falciparum* es considerada la más seria, ya que a menudo resulta en casos fatales debido a complicaciones en el nivel cerebral. Actualmente esta especie es resistente a la cloroquina y a otras drogas antimaláricas.

Estas enfermedades protozoarias, junto con otras como el dengue, la fiebre amarilla y otras parasitosis como la filariasis y la esquistosomiasis, se conocen como “enfermedades olvidadas”, “enfermedades abandonadas” o “enfermedades desatendidas” ya que afectan principalmente a poblaciones pobres de los países en vías de desarrollo y permanecen al margen del mercado farmacéutico.

Las drogas utilizadas para el tratamiento de estas parasitosis se comercializan desde hace años y sus usos están limitados principalmente a causa de sus efectos adversos, su toxicidad, el costo y la resistencia emergente. Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se dispone únicamente de dos fármacos: nifurtimox y benznidazol, que fueron desarrollados en la década de 1970. Estas drogas son efectivas solamente durante la etapa aguda de la enfermedad y son poco toleradas por sus graves efectos adversos. Los fármacos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis son los antimoniales pentavalentes, la anfotericina B y la pentamidina. Estas drogas presentan toxicidad principalmente en los niveles renal y cardíaco, y se administran únicamente por vía parenteral. En el caso de la pentamidina se requiere un uso intrahospitalario, que muchas veces conduce a discontinuar el tratamiento. Para el tratamiento de la malaria se utilizan principalmente la quinina y sus derivados (mefloquina y cloroquina) y la sesquiterpenlactona artemisinina y sus análogos, artemeter, arteeter y artesunato. Las principales limitaciones de estas drogas están relacionadas con el desarrollo de resistencia del parásito, la seguridad y el elevado costo.

Las plantas como fuente de drogas anti-parasitarias

El uso de preparaciones a base de plantas con fines medicinales se remonta a los tiempos más antiguos; los primeros registros datan del año 2600 a.C. Los productos naturales derivados de las plantas han sido utilizados por las poblaciones para el tratamiento de numerosas enfermedades, principalmente las infecciosas y actualmente, la mayor parte de la población de los países en desarrollo todavía utiliza prácticas de la medicina tradicional y plantas medicinales para el cuidado primario de la salud (Cragg y col., 1999; Strohl, 2000; Phillipson, 1999).

Muchos fármacos que se utilizan actualmente en la terapéutica, han tenido su origen en la naturaleza. La utilización de *Digitalis purpurea* L. (Plantaginaceae) para el tratamiento de enfermedades cardíacas, condujo al aislamiento del agente cardiotónico digoxina. Además, hay numerosos ejemplos, como la morfina, analgésico aislado en 1816 de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae); la reserpina, agente antihipertensivo de *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz (Apocynaceae); la efedrina aislada por primera vez de *Ephedra sinica* Stapf (Ephedraceae) en 1887 y la tubocurarina, relajante muscular aislado de especies de *Chondrodendron* Ruiz et Pavon (Menispermaceae). Los alcaloides atropina y pilocarpina, aislados de *Atropa belladonna* L. (Solanaceae) y especies de *Pilocarpus* Vahl (Rutaceae) respectivamente, y la vinblastina y la vincristina, de *Catharanthus roseus* (L.) G. Dohn (Apocynaceae) constituyen otros ejemplos de drogas obtenidas de plantas y que son utilizadas en la actualidad. Entre las drogas antiparasitarias se encuentran la quinina, aislada de la corteza de diferentes especies de *Cinchona* L. (Rubiaceae) y la artemisinina, obtenida a partir de *Artemisia annua* L. (Asteraceae), especie utilizada en la medicina china para el tratamiento de la fiebre.

Existen diferentes argumentos que justifican la exploración de los productos naturales en la búsqueda de nuevas drogas. Los productos naturales son más propensos a parecerse a intermediarios biosintéticos o metabolitos endógenos que los compuestos sintéticos y, por lo tanto, a aprovechar los mecanismos de transporte activos. Por otro lado, en la biosíntesis de los compuestos naturales se produce generalmente un solo estereoisómero, a diferencia de lo que ocurre con los compuestos sintéticos.

A partir de varios compuestos de origen natural se han desarrollado derivados más eficaces y selectivos y se lograron óptimas propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Un ejemplo lo constituye la morfina, droga utilizada en la actualidad y a partir de la cual se han desarrollado derivados semisintéticos y sintéticos basados en el mismo farmacóforo (Ganesan, 2008). También se pueden incluir las drogas antiasmáticas salbutamol y salmetrol, análogos de la aspirina, y el docetaxel, análogo semisintético del paclitaxel, droga anticancerígena aislada de especies de *Taxus* L. (Taxaceae), entre otros. Con relación a las drogas antiparasitarias, se pueden mencionar los derivados de la quinina, como cloroquina y mefloquina, y los derivados de la artemisinina (artemeter y arteeter), utilizados en la actualidad como agentes antimaláricos (Butler, 2004; Cragg y col., 1999).

Búsqueda de compuestos antiprotozoarios en especies de la flora argentina

Acorde con lo expuesto previamente, y en relación con la falta de drogas efectivas para tratar la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis y la malaria, y las ventajas que presentan los productos naturales en los procesos de descubrimiento de nuevas drogas, la finalidad de este trabajo fue buscar moléculas de origen vegetal que puedan ser útiles para el desarrollo de fármacos más efectivos para el tratamiento de estas enfermedades protozoarias.

En este contexto, se realizó un *screening* preliminar de actividad tripanocida *in vitro* sobre epimastigotes de *T. cruzi* de 32 extractos acuosos y orgánicos de 12 especies vegetales de la medicina tradicional argentina. La selección de las especies que se ensayaron se realizó, sobre la base de sus usos etnomédicos para el tratamiento y el alivio de síntomas relacionados con enfermedades parasitarias; incluso se tuvo en cuenta criterios quimiotaxonómicos. Se seleccionaron las siguientes especies medicinales argentinas: *Ambrosia tenuifolia* Spreng., *A. scabra* Hook. et Arn. (Asteraceae), *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr., *C. glutinosa* Cham. et Schltdl., *C. ingrata* Cham. et Schltdl. (Lythraceae), *Gentianella multicaulis* (Gillies ex Griseb.) Fabris (*Syn. G. achalensis* (Hieron. ex Gilg) T.N. Ho et S.W. Liu) (Gentianaceae), *Lippia integrifolia* (Griseb.) Hieron. (Verbenaceae), *Clinopodium gilliesii* (Benth.) Kuntze

(*Syn. Satureja parvifolia* (Phil.) Epling) (Lamiaceae), *Acanthostyles buniifolium* (Hook. et Arn.) R.M. King et H. Rob. (*Syn. Eupatorium buniifolium* Hook. et Arn.), *Eupatorium candolleianum* Hook. et Arn. y *Baccharis spicata* (Lam.) Baill. (Asteraceae).

Los extractos orgánicos de *Ambrosia tenuifolia* y *A. scabra* (Asteraceae) presentaron una actividad significativa sobre las formas epimastigotes de *T. cruzi* con porcentajes de inhibición superiores al 70 %, a la concentración de 100 µg/ml (Sülsen y col., 2006). Estos resultados indicaron que estos extractos podían ser una fuente potencial de compuestos líderes con actividad tripanocida y fueron seleccionados para continuar su estudio por medio de fraccionamientos guiado por bioensayos.

Ambrosia tenuifolia (Asteraceae)

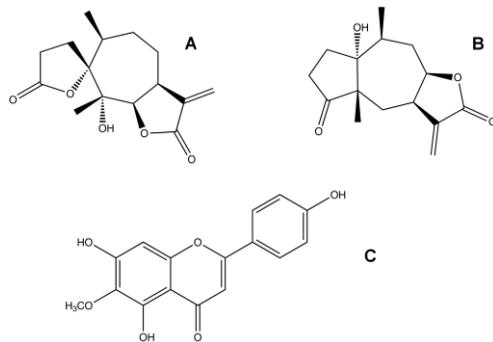
A. tenuifolia es conocida con el nombre vulgar de “altamisa”, “ajenjo”, “ajenjo del campo” o “artemisia” (Foto 1). Está ampliamente distribuida en el norte y centro de la Argentina, sur de Brasil, Paraguay y Uruguay. Las decocciones de esta planta se utilizan como estimulantes y antineurálgicas, para tratar fiebres intermitentes y para eliminar parásitos intestinales, por sus acciones como vermífuga y antihelmíntica (Hieronymus, 1882; Saggese, 1959).

Foto 1.- *Ambrosia tenuifolia* (Asteraceae)



De la especie *A. tenuifolia* se aislaron -por fraccionamiento guiado por bioensayos y utilizando técnicas cromatográficas- las lactonas sesquiterpénicas (STLs) peruvina y psilostachina y el flavonoide hispidulina con significativa actividad tripanocida (Figura 1).

Figura 1.- Estructuras químicas de los compuestos aislados



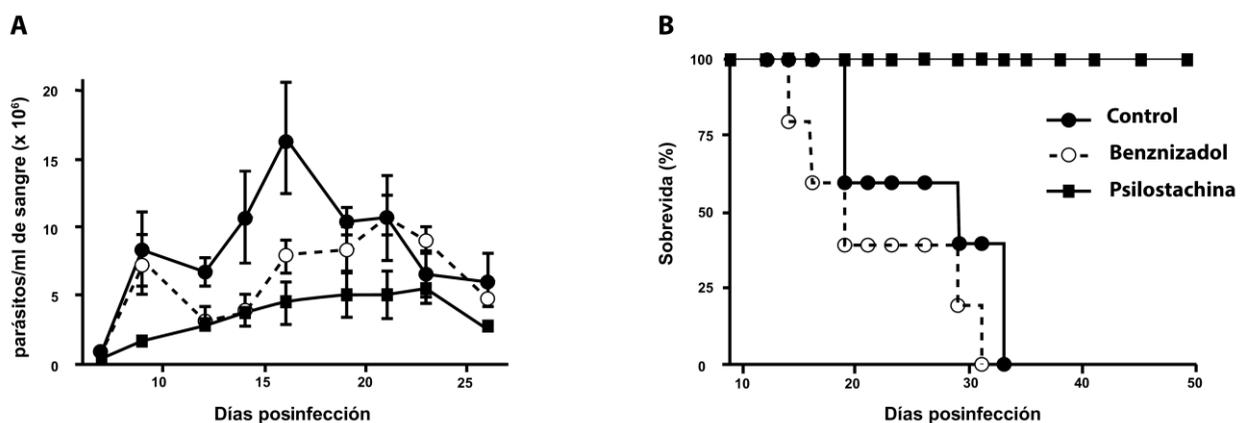
A: psilostachina; **B:** peruvina; **C:** hispidulina.

Psilostachina y peruvina fueron activas sobre las formas epimastigotes de *T. cruzi* (RA) con valores de concentración inhibitoria 50 % (IC_{50}) de 1,2 $\mu\text{g/ml}$ y de 1,6 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, mientras que la hispidulina presentó una IC_{50} de 14,0 $\mu\text{g/ml}$. Estos compuestos también fueron evaluados sobre las formas infectivas (tripomastigotes) de *T. cruzi*, la psilostachina fue el compuesto más activo con una IC_{50} de 0,8 $\mu\text{g/ml}$ (Sülsen y col., 2007; Sülsen y col., 2008). Los tres compuestos fueron activos sobre promastigotes

de *L. mexicana*, con valores de IC_{50} inferiores que 1,8 $\mu\text{g/ml}$. Con relación a la actividad antiplasmódica, psilostachina y peruvina fueron activas sobre las cepas F32 (sensible a cloroquina) y W2 (resistente a cloroquina) de *Plasmodium falciparum*, pero presentaron una mayor actividad sobre la cepa sensible a cloroquina (Sülsen y col., 2011a). La psilostachina fue el compuesto más activo sobre la cepa W2 (IC_{50} = 1,8 $\mu\text{g/ml}$), mientras que la hispidulina resultó inactiva frente a ambas cepas del parásito (IC_{50} > 100 $\mu\text{g/ml}$).

Se llevaron a cabo estudios de citotoxicidad en células de mamíferos (linfocitos T murinos). Los valores de concentración citotóxica 50 % (CC_{50}) fueron de 25,7; 35,0 y > 50 $\mu\text{g/ml}$ para la psilostachina, peruvina e hispidulina, respectivamente. Con el objetivo de evaluar la selectividad de acción de los compuestos bioactivos, se realizó el cálculo del índice de selectividad (IS) para cada compuesto por medio de la relación de los valores de CC_{50} y IC_{50} . En este sentido, la psilostachina fue el compuesto más activo y selectivo sobre las formas tripomastigotes con un IS de 33,8; por este motivo se decidió realizar su evaluación *in vivo* en ratones infectados con *T. cruzi*. Los animales se trataron con dosis de 1 mg/kg/día por vía intraperitoneal durante 5 días consecutivos. En el día 16 (pico de parasitemia), en los animales tratados con psilostachina se redujo significativamente el nivel de parásitos circulantes comparado con los animales controles y con los que recibieron la droga de referencia benznidazol. También se evaluó el tiempo de sobrevida de los animales, y se obtuvo un 100 % de sobrevida en los ratones tratados con psilostachina (Figura 2) (Sülsen y col., 2008).

Figura 2.- Niveles de parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* tratados con psilostachina



A: Animales tratados; **B:** curva de sobrevida.

El efecto de la psilostachina fue evaluado también sobre el crecimiento y la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen. Este compuesto presentó un efecto irreversible sobre los parásitos en concentraciones mayores que 1,0 µg/ml. Con el objetivo de ahondar en el posible mecanismo de acción se evaluó la actividad tripanocida en presencia de glutatión. La adición de este compuesto bloqueó parcialmente la actividad de la psilostachina. También se estudió el efecto de esta sesquiterpenlactona en el nivel de la ultraestructura de *T. cruzi* mediante microscopía electrónica. La psilostachina indujo alteraciones ultraestructurales a concentraciones de 0,5 µg/ml, con hinchamiento mitocondrial y deformidad del kinetoplasto (Sülsen y col., 2010).

Ambrosia scabra (Asteraceae)

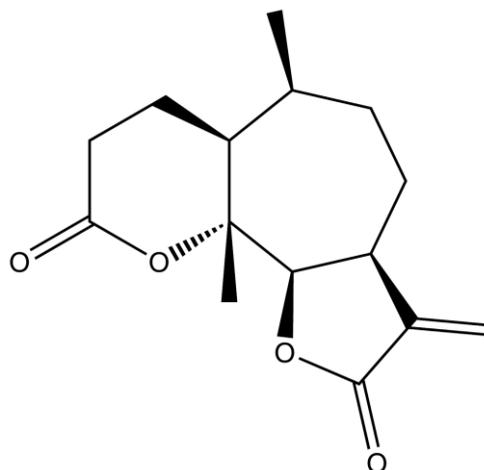
A. scabra es una especie relacionada que se conoce con los mismos nombres vulgares que *A. tenuifolia* y se utiliza principalmente como febrífuga y vermífuga (Hieronymus, 1882) (Foto 2).

Foto 2.- *Ambrosia scabra* (Asteraceae)



De la especie *A. scabra* se aisló por fraccionamiento bioguiado y empleando técnicas cromatográficas la STL psilostachina C (Figura 3), que fue activa *in vitro* sobre epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* con valores de IC₅₀ de 0,6 y 3,5 µg/ml, respectivamente (Sülsen y col., 2011b).

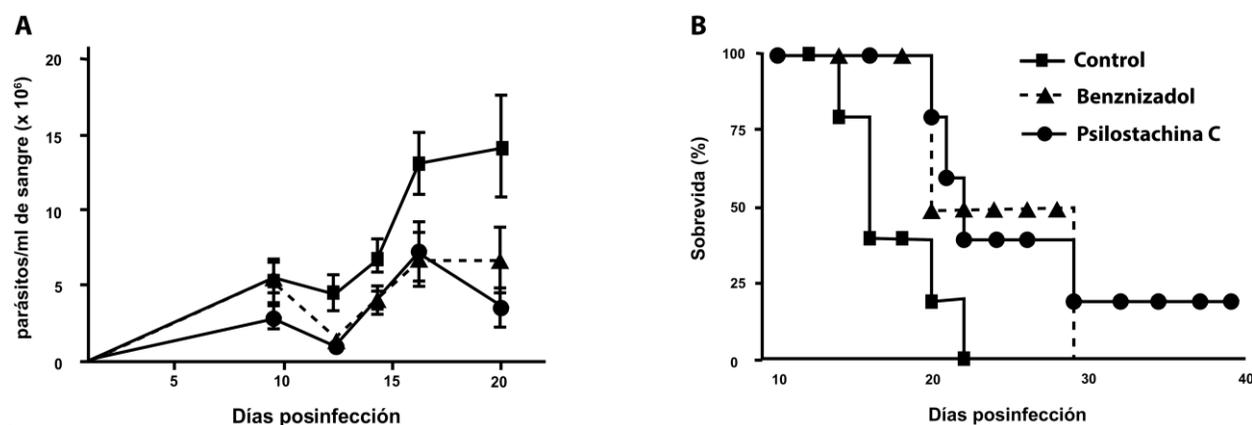
Figura 3.- Estructura química de psilostachina C



Este compuesto también presentó actividad sobre promastigotes de *L. mexicana* (IC₅₀ = 1,2 µg/ml) y sobre *P. falciparum* (Sülsen y col., 2011b). La citotoxicidad sobre células de mamífero fue de 87,5 µg/ml (CC₅₀), hecho que indica selectividad de acción sobre tripomastigotes (IS = 25). En el ensayo *in vivo* sobre un modelo murino, los animales tratados con psilostachina C presentaron niveles de parasitemia menores que los del grupo control y comparables con los que recibieron benznidazol. A los 29 días posteriores a la infección, los ratones tratados con esta STL presentaron una sobrevida del 20 %, mientras que todos los animales tratados con la droga de referencia murieron. En el día del pico de parasitemia, en los animales tratados con psilostachina C se redujo significativamente el nivel de parásitos circulantes comparado con el de los animales del grupo control (Figura 4) (Sülsen y col., 2011b).

En el nivel ultraestructural esta STL indujo alteraciones en el parásito como vacuolizaciones y la aparición de cuerpos multivesiculares a concentraciones menores a 0,2 µg/ml (Sülsen y col., 2011b).

Figura 4.- Niveles de parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* tratados con psilostachina C



Consideraciones finales

De los cuatro compuestos con actividad anti-protozoaria aislados de *Ambrosia tenuifolia* y *A. scabra*, tres pertenecen al grupo de las lactonas sesquiterpénicas: psilostachina, peruvina y psilostachina C.

Las sesquiterpenlactonas son compuestos terpenoides naturales de gran diversidad estructural característicos de la familia Asteraceae. Estos compuestos actuarían protegiendo a las plantas contra organismos patógenos, herbívoros, insectos y mamíferos, como reguladores del crecimiento y como agentes alelopáticos en competencia con otras plantas (Picman, 1986). Tienen actividades antitumoral, citotóxica, antibacteriana, antifúngica, insecticida, cardiotónica, antiulcerogénica y antiprotozoaria (Picman, 1986; Robles y col., 1995; Chaturvedi, 2011). La presencia de la función α -metileno- γ -lactona sería la responsable de las propiedades biológicas informadas para este grupo de compuestos. El grupo exometileno sería esencial por su capacidad de alquilar nucleófilos biológicos (Jiménez-Ortiz y col., 2005; Picman, 1986; Schmidt y col., 2002).

En la bibliografía se encuentran numerosas referencias de actividad antiparasitaria de lactonas sesquiterpénicas sobre diversos protozoos (Fournet y Muñoz, 2002; Salem y Werbovetz, 2006; Schmidt y col., 2012). El interés por la actividad antiprotozoaria potencial de estos compuestos se ha

incrementado a partir del desarrollo de la droga antimalárica artemisinina, actualmente en uso clínico. De acuerdo con diferentes autores, estos compuestos pueden ser considerados como drogas potenciales con un alto impacto en el futuro desarrollo de agentes terapéuticos (Salem y Werbovetz, 2006; Kayser y col., 2003; Wang y col., 2005).

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo promisorio de compuestos en la búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios. De acuerdo con los antecedentes de actividad antiparasitaria de este grupo de compuestos y los resultados obtenidos para las lactonas sesquiterpénicas psilostachina, peruvina y psilostachina C, continuamos con la investigación de otras especies pertenecientes a la familia Asteraceae con el fin de aislar nuevas moléculas activas. Asimismo, se están llevando a cabo estudios sobre un grupo de lactonas sesquiterpénicas, en el cual están incluidas las aisladas por nuestro grupo de investigación, con el fin de determinar cuáles son los requerimientos estructurales mínimos para la actividad observada y para poder, de esta manera, orientar la síntesis de nuevos compuestos con un mejor perfil farmacológico.

Referencias bibliográficas

ALCHA - Asociación de Lucha contra el Mal de Chagas. <<http://www.alcha.org.ar/enfermedad/index.htm>>. [Consulta: diciembre de 2012].

- Auger, S.; Casadó, S.; Ferreño, D.; Newman, M.; Rollet, R. (2005). "La enfermedad de Chagas". *Boletín Científico*. Asociación de Médicos Municipales de la CBA. Año 10 (N° 46): 1-6.
- Butler, M. (2004). "The role of natural product chemistry in drug discovery". *Journal of Natural Products* 67(12): 2141-2153.
- Cragg, G.; Boyd, M.; Khanna, R.; Kneller, R.; Mays, T.; Mazan, K.; Newman, D.; Sausville, E. (1999). "International collaboration in drug discovery and development: the NCI experience". *Pure and Applied Chemistry* 71(9): 1619-1633.
- Chaturvedi, D. (2011). "Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities", en: Tiwari, V.; Mishra, B. (ed.) *Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, Cap.10. Transworld Research Network, Kerala, India: 313-334.
- De Rosa, M.; Auger, S.; Storino, R. (2010). "Cardiopatía chagásica: métodos de diagnóstico y tratamiento", en: Storino, R.A. (ed.) *Chagas en el siglo XXI. De la enfermedad a la problemática social*. Akadia, Buenos Aires: 137-151.
- DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative) (2010). "Argentina: more action needed". *Newsletter* 19: 5.
- Fernández Carral, S.; Aragües, A.; Jait, A.; Ochoa, A.; Pérez, N.; Rios, E.; Sanmartino, M.; Spano, R.; Storino, R.A. (2010). "Viejos problemas, nuevas alternativas: un abordaje desde una gestión pública", en: Storino, R.A. (ed.) *Chagas en el siglo XXI. De la enfermedad a la problemática social*. Akadia, Buenos Aires: 247-259.
- Fournet, A.; Muñoz, V. (2002). "Natural Products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs". *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2(11): 1213-1235.
- Frank, F.; Fernández, M.; Taranto, N.; Cajal, S.; Margni, R.; Castro, E.; Thomaz-Soccol, V.; Malchiodi, E. (2003). "Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the North-west of Argentina: immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involved". *Parasitology* 126 (Pt 1): 31-39.
- Ganesan, A. (2008). "The impact of natural products upon modern drug discovery". *Current opinion in Chemical Biology* 12(3): 306-317.
- Graebin, C.; Uchoa, F.; Bernardes, L.; Campo, V.; Carvalho, I.; Eifler-Lima, V. (2009). "Antiprotazoal Agents: an overview". *Anti-infective Agents in Medicinal Chemistry* 8(4): 345-366.
- Hieronymus, J. (1882). *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba*. Tomo IV. Buenos Aires: 345-346.
- Jiménez-Ortiz, V.; Brengio, S.; Giordano, O.; Tonn, C.; Sánchez, M.; Burgos, M.; Sosa, M. (2005). "The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes". *Journal of Parasitology* 91(1): 170-174.
- Kayser, O.; Kiderlen, A.; Croft, S. (2003). "Natural Products as antiparasitic drugs". *Parasitology Research* 90(S2): 55-62.
- Organización Mundial de la Salud (2010). "Chagas disease (American trypanosomiasis)". *Fact sheet* N°340. Junio de 2010. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. [Consulta: diciembre de 2012].
- Organización Mundial de la Salud (2012a). "Leishmaniasis. Magnitude of the problem". <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>. [Consulta: diciembre de 2012].
- Organización Mundial de la Salud (2012b). "Malaria". *Fact sheet* N°94. Abril de 2012. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html>>. [Consulta: diciembre de 2012].
- Organización Panamericana de la Salud (2008). "Informe de la situación del Paludismo en las Américas". <<http://new.paho.org/>>. [Consulta: diciembre de 2012].
- Phillipson, J. (1999). "New Drugs from Nature - It Could be Yew". *Phytotherapy Research* 13(1): 2-8.
- Picman, A. (1986). "Biological activities of sesquiterpene lactones". *Biochemical Systematics and Ecology* 14(3): 255-281.
- Robles, M.; Aregullin, M.; West, J.; Rodríguez, E. (1995). "Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones". *Planta Medica* 61(3): 199-203.
- Saggese, D. (1959). *Yerbas Medicinales Argentinas*. 10ª ed, Rosario: 26.
- Salem, M.; Werbovetz, K. (2006). "Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis". *Current Medicinal Chemistry* 13(21): 2571-2598.
- Schmidt, T.; Brun, R.; Willuhn, G.; Khalid, S. (2002).

- “Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones”. *Planta Medica* 68(8): 750-751.
- Schmidt, T.; Khalid, S.; Romanha, A.; Alves, T.; Biavatti, M.; Brun, R.; Da Costa, F.; de Castro, S.; Ferreira, V.; de Lacerda, M.; Lago, J.; Leon, L.; Lopes, N.; das Neves Amorin, R.; Niehues, M.; Ogungbe, I.; Pohlit, A.; Scotti, M.; Setzer, W.; de N. C. Soeiro, M.; Steindel, M.; Tempone, A. (2012). “The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I”. *Current Medicinal Chemistry* 19(14): 2128-2175.
- Strohl, W. (2000). “The role of natural products in a modern drug discovery program”. *Drug Discovery Today* 5(2): 39-41.
- Sülsen, V.; Güida, C.; Coussio, J.; Paveto, C.; Muschietti, L.; Martino, V. (2006). “*In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine”. *Parasitology Research* 98(4): 370-374.
- Sülsen, V.; Cazorla, S.; Frank, F.; Redko, F.; Anesini, C.; Coussio, J.; Malchiodi, E.; Martino, V.; Muschietti, L. (2007). “Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal species”. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77(4): 654-659.
- Sülsen, V.; Frank, F.; Cazorla, S.; Anesini, C.; Malchiodi, E.; Freixa, B.; Vila, R.; Muschietti, L.; Martino, V. (2008). “Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae)”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(7): 2415-2419.
- Sülsen, V.; Barrera, P.; Muschietti, L.; Martino, V.; Sosa, M. (2010). “Antiproliferative effect and ultrastructural alterations induced by psilostachyin on *Trypanosoma cruzi*”. *Molecules* 15(1): 545-553.
- Sülsen, V.; Gutiérrez Yappu, D.; Laurella, L.; Anesini, C.; Giménez Turba, A.; Martino, V.; Muschietti, L. (2011a). “*In vitro* antiplasmodial activity of psilostachyin and peruvín from *Ambrosia tenuifolia*”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 352938.
- Sülsen, V.; Frank, F.; Cazorla, S.; Barrera, P.; Freixa, B.; Vila, R.; Sosa, M.; Malchiodi, E.; Muschietti, L.; Martino, V. (2011b). “Psilostachyin C: a natural compound with trypanocidal activity”. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37(6): 536-543.
- Wang, G.; Tang, W.; Bidigare, R. (2005). “Terpenoids as Therapeutic Drugs and Pharmaceutical Agents”, en: Zhang, L.; Demain, A. (ed.) *Natural Products Drug Discovery and Therapeutic Medicine*. Cap 9. Humana Press, Totowa, New Jersey: 197-227.