



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TAXONOMÍA DEL VECTOR *LUTZOMYIA* Y ANÁLISIS DEL FLAVONOIDE RUTINA
SOBRE LA VIABILIDAD DE *LEISHMANIA MEXICANA*.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA.

PRESENTA
DIANA LIZBETH SALINAS CHÁVEZ

TUTOR
DR. JOSÉ SOTERO DELGADO DOMÍNGUEZ

CD.MX. 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: GUTIERREZ RAMOS ABEL.**
VOCAL: **Profesor: RIVERO CRUZ BLANCA ESTELA.**
SECRETARIO: **Profesor: DELGADO DOMINGUEZ JOSE SOTERO.**
1er. SUPLENTE: **Profesor: FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA.**
2° SUPLENTE: **Profesor: CORDERO HERNANDEZ JOSE.**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE INMUNOPARASITOLOGÍA DE LA UNIDAD DE MEDICINA EXPERIMENTAL (UME)
DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM).
LABORATORIO 113, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DR. JOSÉ SOTERO DELGADO DOMÍNGUEZ

SUSTENTANTE:

DIANA LIZBETH SALINAS CHÁVEZ.

AGRADECIMIENTO.

Al programa de apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza por distinguirme como becaria del Proyecto PAPIME PE200620.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| Lista de abreviaturas y acrónimos | VII |
| Lista de figuras | IX |
| Lista de tablas | X |
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 3. ANTECEDENTES | 5 |
| 3.1 Leishmaniasis | 5 |
| 3.1.1 Generalidades | 5 |
| 3.1.2 Generalidades de <i>Lutzomyia sp.</i> | 7 |
| 3.1.2.1 Taxonomía de <i>Lutzomyia sp.</i> | 9 |
| 3.1.3 Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i> | 9 |
| 3.1.4 Cuadros clínicos de la Leishmaniasis | 11 |
| 3.1.4.1 Leishmaniasis cutánea | 11 |
| 3.1.4.2 Leishmaniasis mucocutánea | 13 |
| 3.1.4.3 Leishmaniasis visceral | 14 |
| 3.1.5 Tratamientos de la Leishmaniasis | 15 |
| 3.1.5.1 Antimoniales pentavalentes | 15 |
| 3.1.5.2 Anfotericina B | 16 |
| 3.1.5.3 Pentamidina | 17 |
| 3.1.5.4 Miltefosina | 17 |
| 3.2 Medicina tradicional | 20 |
| 3.3 Familia <i>Cleomaceae</i> | 20 |
| 3.3.1 Farmacología | 22 |
| 3.4 <i>Cleoserrata serrata</i> | 22 |
| 3.4.1 Ubicación taxonómica | 23 |
| 3.4.2 Descripción taxonómica | 23 |
| 3.4.3 Sinónimos y nombres comunes | 23 |
| 3.4.4 Distribución geográfica | 24 |
| 3.5 Rutina | 24 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 27 |
| 5. OBJETIVOS | 28 |
| 5.1 Objetivo general | 28 |
| 5.2 Objetivos particulares | 28 |
| 6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 6.1 Evaluación y clasificación de las laminillas preparadas con ejemplares de Flebótomos | 29 |
| 6.2 Colecta de <i>Cleoserrata serrata</i> | 29 |
| 6.3 Preparación del extracto de <i>Cleoserrata serrata</i> | 29 |
| 6.4 Identificación del ácido ursólico en la fase orgánica | 31 |
| 6.4.1 Cromatografía capa fina | 31 |
| 6.5 Identificación de la rutina en la fase acuosa | 31 |
| 6.5.1 Tratamiento con Amberlita XADHN16N | 31 |
| 6.5.1.1 Lavado de la resina Amberlita XAD16N | 31 |
| 6.5.1.2 Procedimiento | 31 |
| 6.6 Pruebas de cuantificación del extracto crudo | 32 |
| 6.6.1 Preparación de la muestra (M1) | 32 |
| 6.6.2 Cuantificación de flavonoides por el método Kumazawa | 32 |
| 6.6.2.1 Preparación de las disoluciones para la curva de calibración de quercetina | 32 |
| 6.6.2.2 Procedimiento | 33 |
| 6.6.3 Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu | 33 |
| 6.6.3.1 Preparación de las disoluciones para la curva de calibración de ácido gálico | 33 |
| 6.6.3.2 Procedimiento | 33 |
| 6.6.4 Determinación de la capacidad antioxidante del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH [·]) | 34 |
| 6.6.4.1 Preparación de las disoluciones para la curva de calibración de Trolox | 34 |
| 6.6.4.2 Procedimiento | 34 |
| 6.7 Evaluación de la actividad biológica de Rutina en promastigotes de la cepa <i>Leishmania mexicana</i> LAC. | 34 |
| 6.7.1 Cosecha de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> | 35 |
| 6.7.2 Preparación de los tubos para la evaluación de la Rutina sobre los promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 35 |
| 7. RESULTADOS | 37 |
| 7.1 Clasificación taxonómica | 38 |
| 7.1.1 <i>Lutzomyia olmeca olmeca</i> | 38 |
| 7.1.2 <i>Lutzomyia cruciata</i> | 41 |
| 7.1.3 <i>Lutzomyia shannoni</i> | 44 |
| 7.1.4 <i>Lutzomyia panamensis</i> | 47 |
| 7.1.5 <i>Lutzomyia aclydifera</i> | 50 |
| 7.2 Extracto crudo de <i>Cleoserrata serrata</i> | 53 |
| 7.2.1 Rendimiento de la preparación del extracto crudo | 53 |
| 7.2.2 Determinación del contenido de flavonoides totales por el método Kumazawa | 53 |

| | | |
|-------|--|----|
| 7.2.3 | Determinación del contenido de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu | 54 |
| 7.2.4 | Determinación del efecto antioxidante del 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH [•]) | 55 |
| 7.3 | Rendimiento del extracto después de hacer la partición con n-Hexano y Metanol | 57 |
| 7.4 | Identificación de componentes de la fase orgánica del extracto | 57 |
| 7.5 | Identificación de componentes de la fase acuosa del extracto | 58 |
| 7.5.1 | Muestra tratada con Amberlita XAD16N | 59 |
| 7.6 | Efecto de la Rutina sobre el crecimiento y viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> | 62 |
| 8. | DISCUSIÓN | 66 |
| 9. | CONCLUSIONES | 73 |
| 10. | PERSPECTIVAS | 74 |
| 11. | BIBLIOGRAFÍA | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

| | |
|---------------------------------|---|
| AcOEt | Acetato de etilo |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AlCl ₃ | Tricloruro de aluminio |
| ANMAT | Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y |
| Tecnología | Médica |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| <i>C. brachycarpa</i> | <i>Cleome brachycarpa</i> |
| <i>C. scaposa</i> | <i>Cleome scaposa</i> |
| <i>C. serrata</i> | <i>Cleome serrata</i> |
| CBD | Convention on Biological Diversity |
| CC ₅₀ | Concentración citotóxica 50 |
| CCF | Cromatografía en capa fina |
| CDC | Centro de control de enfermedades |
| CENAPRECE | Centro Nacional de Programas preventivos y Control de |
| Enfermedades | |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| Cl ₅₀ | Concentración Inhibitoria 50 |
| CICY | Centro de investigación Científica de Yucatán |
| cm | Centímetros |
| CoA | Coenzima A |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picrilhidrazil |
| ER | Estándar de referencia |
| g | gramo |
| H ₂ O | Agua |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta resolución |
| IMSS | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| <i>L. aclydifera</i> | <i>Lutzomyia aclydifera</i> |
| <i>L. amazonensis</i> | <i>Leishmania amazonensis</i> |
| <i>L. cruciata</i> | <i>Lutzomyia cruciata</i> |
| <i>L. donovani</i> | <i>Leishmania donovani</i> |
| <i>L. infantum</i> | <i>Leishmania infantum</i> |
| <i>L. longipalpis</i> | <i>Lutzomyia longipalpis</i> |
| <i>L. major</i> | <i>Leishmania major</i> |
| <i>L. mexicana</i> | <i>Leishmania mexicana</i> |
| <i>L. olmeca olmeca</i> | <i>Lutzomyia olmeca olmeca</i> |
| <i>L. shannoni</i> | <i>Lutzomyia shannoni</i> |
| <i>L. tropica</i> | <i>Leishmania tropica</i> |
| <i>L. panamensis</i> | <i>Lutzomyia panamensis</i> |
| LCD | Leishmaniasis cutánea difusa |
| LCL | Leishmaniasis cutánea localizada |

| | |
|---------------------------------|---|
| m | Metro |
| MPA | Medio de parásitos ajustados |
| MS | Espectrometría de masas |
| Na ₂ CO ₃ | Carbonato de sodio |
| nm | Nanómetros |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OPS | Organización panamericana de la Salud |
| RMN | Resonancia Magnética Nuclear |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SSA | Secretaría de Salud (México) |
| µg | Microgramo |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |
| UV | Ultravioleta |
| WHO | World Health Organization |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Distribución geográfica del número de casos de leishmaniasis cutánea reportados por la OMS en 2021 | 5 |
| Figura 2. Distribución de leishmaniasis en México | 6 |
| Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i> | 9 |
| Figura 4. Cuadros clínicos de leishmaniasis cutánea localizada | 10 |
| Figura 5. Cuadros clínicos de leishmaniasis cutánea difusa | 11 |
| Figura 6. Cuadros clínicos de leishmaniasis mucocutánea | 12 |
| Figura 7. Paciente con esplenomegalia | 13 |
| Figura 8. <i>Cleoserrata serrata (jacq) Ittis</i> | 20 |
| Figura 9. Distribución geográfica de <i>C. serrata</i> en México | 22 |
| Figura 10. Estructura de la rutina | 23 |
| Figura 11. Diagrama para la obtención de las fracciones a partir del extracto crudo | 11 |
| Figura 12. Posición en la que se colocaron la muestra y la referencia de ácido ursólico, en la placa de aluminio recubierta con gel sílice | 29 |
| Figura 13. Posición en la que se colocaron la referencia de rutina y cada una de las fracciones obtenidas, en la placa de aluminio recubierta de gel sílice | 30 |
| Figura 14. Clave ilustrada de <i>L. olmeca olmeca</i> | 36 |
| Figura 15. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de <i>L. olmeca olmeca</i> | 37 |
| Figura 16. Clave ilustrada de <i>L. cruciata</i> | 39 |
| Figura 17. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de <i>L. cruciata</i> | 40 |
| Figura 18. Clave ilustrada de <i>L. shannoni</i> | 42 |
| Figura 19. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de <i>L. shannoni</i> | 43 |
| Figura 20. Clave ilustrada de <i>L. panamensis</i> | 45 |
| Figura 21. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de <i>L. panamensis</i> | 46 |
| Figura 22. Clave ilustrada de <i>L. aclydifera</i> | 48 |
| Figura 23. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de <i>L. aclydifera</i> | 49 |
| Figura 24. Curva de calibración de quercetina para determinación de flavonoides totales en la muestra de <i>C. serrata</i> | 51 |
| Figura 25. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales en la muestra de <i>C. serrata</i> | 52 |
| Figura 26. Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante en la muestra de <i>C. serrata</i> | 53 |
| Figura 27. Curva de calibración del porcentaje de actividad antioxidante en la muestra de <i>C. serrata</i> con respecto a la concentración de Trolox | 53 |
| Figura 28. Cromatografía en capa fina | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 29. Cromatografía en capa fina de la fase acuosa | 56 |
| Figura 30. Cromatofolio revelado con sulfato cérico amoniacal | 57 |
| Figura 31. Cromatofolio observado a $\lambda=320$ nm | 57 |
| Figura 32. Cromatofolio perteneciente a la fracción 10% MeOH-H ₂ O | 58 |
| Figura 33. Curva de crecimiento de promastigotes de <i>L. mexicana</i> incubados a diferentes concentraciones de rutina por 120 horas | 60 |
| Figura 34. Porcentaje de viabilidad de promastigotes <i>L. mexicana</i> incubados a diferentes concentraciones de rutina por 120 horas | 61 |
| Figura 35. Determinación de la CI ₅₀ en los ensayos <i>in vitro</i> utilizando <i>L. mexicana</i> | 62 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Plantas con actividad leishmanicida contra leishmaniasis cutánea probadas de forma <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> | 17 |
| Tabla 2. Actividades farmacológicas de diferentes especies de <i>Cleome</i> | 19 |
| Tabla 3. Diluciones seriadas realizadas para la evaluación de rutina en promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 33 |
| Tabla 4. Rendimiento del extracto de <i>C. serrata</i> | 50 |
| Tabla 5. Resultados obtenidos al realizar la determinación del contenido de flavonoides, fenoles totales y capacidad antioxidante del extracto crudo de <i>C. serrata</i> | 53 |
| Tabla 6. Rendimiento del extracto; fase acuosa y fase orgánica | 54 |
| Tabla 7. Resultados de la cromatografía en capa fina | 54 |

1. RESUMEN

Una forma de controlar y vigilar a los flebótomos transmisores del parásito *Leishmania sp.*, es a través de los estudios entomológicos en los que se incluye la clasificación taxonómica, por lo que investigadores como Galati, Ibañez, Young y Duncan han descrito las estructuras morfológicamente relevantes (cibario, ascoides, espermateca y gonopodio) para los flebótomos del género *Lutzomyia*, (vector transmisor de *Leishmania sp.* en América). A pesar de esto, las claves presentan el inconveniente de ser complejas y estar dispersas en los diferentes trabajos publicados por los mismos, complicando la clasificación de estos ejemplares.

Por otra parte, los tratamientos actuales utilizados para tratar la leishmaniasis tienen el inconveniente de ser tóxicos, costosos y presentar farmacorresistencia, por lo que la investigación de tratamientos alternativos es una de las acciones a seguir para tratar la enfermedad. Como tratamientos alternativos se ha recurrido a la medicina tradicional a base de plantas siendo así que la parte aérea de *Cleoserrata serrata* (*C. serrata*) ha demostrado ser leishmanicida contra amastigotes y promastigotes de *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*).

En el presente estudio, se revisaron, resumieron y unificaron las claves taxonómicas para 5 especies de flebótomos presentes en México *Lutzomyia olmeca olmeca* (*L. olmeca olmeca*), *Lutzomyia cruciata* (*L. cruciata*), *Lutzomyia shannoni* (*L. shannoni*), *Lutzomyia panamensis* (*L. panamensis*) y *Lutzomyia aclydifera* (*L. aclydifera*) de las cuales las primeras cuatro están incriminadas en la transmisión del parásito de *Leishmania*, así como se cuantificó la presencia de flavonoides y fenoles de un extracto metanólico de *C. serrata* recolectada en los Tuxtlas Veracruz, con valores de 26.67 ± 0.34 mg de quercetina por gramo de extracto y 39.99 ± 0.58 mg de ácido gálico por gramo de extracto, obteniendo así un valor de $52.51 \pm 0.25\%$ de actividad antioxidante con respecto a Trolox. Adicionalmente, el análisis cromatográfico del extracto repartido entre acetato de etilo y agua permitió la identificación del ácido ursólico en la fase orgánica y rutina de la fase acuosa. El efecto de la rutina sobre promastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC mostró un efecto dosis dependiente sobre la viabilidad del parásito,

obteniendo una concentración inhibitoria cincuenta (CI_{50}) de $9.41 \pm 0.90 \mu\text{g/mL}$ a las 72h y de $10.50 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$ a las 96 h. Con base en estos hallazgos es posible concluir que la rutina representa una molécula con potencial para ser utilizada en el tratamiento contra la leishmaniasis causada por *L. mexicana*. Sin embargo, aún se requieren experimentos adicionales que permitan demostrar el efecto leishmanicida de la rutina en amastigotes, así como entender el mecanismo de acción de esta.

2. INTRODUCCIÓN.

La leishmaniasis se encuentra entre las diez enfermedades tropicales desatendidas con más de 12 millones de personas infectadas y 0.9 a 1.6 millones de casos nuevos al año (OPS/OMS, 2017). Es causada por protozoarios del género *Leishmania* transmitidos a través de la picadura de flebótomos hembra de la familia *Psychodidae* (Kasper et. al., 2012) (Torres et. al., 2017)(CDC, 2022) (Palma et. al., 2021).

Los flebótomos responsables de transmitir este parásito en Europa, Asia y África son del género *Phlebotomus* y en América son del género *Lutzomyia* (Neuber, 2008) (Zaragozano et. al., 2001), En México se han registrado cerca de 44 especies (Mikery et. al., 2012) de las cuales 11 son vectores responsables de la transmisión de *Leishmania sp.* (CENAPRECE, 2015) aunado a esto, cada una de las especies de *Lutzomyia* son únicas y complejas, por lo que aspectos sobre reproducción, alimentación, dispersión y comportamiento influyen directamente en la epidemiología de la leishmaniasis (CENAPRECE, 2015). Es por ello, que uno de los enfoques para abordar la leishmaniasis es el control de los vectores que la transmiten, a través de la vigilancia entomológica (SIMUDAT).

Una de las actividades en el estudio entomológico es la clasificación de especímenes recolectados en diferentes áreas geográficas; un método económico y accesible para identificar a los flebótomos es el método clásico que consiste en clasificar de acuerdo con las claves taxonómicas ya existentes descritas por investigadores como Ibañez, Galati, Young y Duncan (Young & Duncan, 1994) (Ibañez, 2005) (Galati, et. al., 2017).

Estos estudios entomológicos, permiten hacer un mapeo de las diferentes especies que transmiten la leishmaniasis en diferentes zonas geográficas debido a que diversas actividades económicas, deforestación y el cambio climático provocan la migración de estos flebótomos a zonas pobladas contribuyendo al incremento de casos reportados en zonas endémicas y no endémicas (OMS, 2022).

La leishmaniasis se manifiesta en tres formas principales; visceral, cutánea (localizada y difusa) y mucocutánea (OMS, 2022). La de tipo cutánea localizada

es la que se presenta con mayor frecuencia en México y afecta los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Yucatán, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Morelos y Puebla (CENAPRECE, 2015).

Actualmente existen fármacos para tratar la leishmaniasis, como los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®), pero estos tienen el inconveniente de ser costosos y tóxicos, aumentando aún más la resistencia de los parásitos a estos compuestos (Ghorbani et. al., 2017) (Alamilla et. al., 2018), por lo que en algunas regiones se ha implementado el uso de la medicina tradicional a base de plantas, también llamada fitoterapia, entre las plantas utilizadas como tratamiento en las úlceras causadas por *Leishmania* se encuentra *C. serrata*, la cual de forma *in vitro* ha demostrado tener efecto leishmanicida sobre los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* (Alamilla et. al., 2018).

Por otra parte, la rutina es un glucósido de flavonol (Chua, 2013), que ha demostrado efectos anticancerígenos, antioxidantes, citoprotectores, antiinflamatorios, antiplaquetarios, antitrombóticos, vasoprotector, cardioprotector, neuroprotector, antimicrobianos, antitumorales, antiasmáticos, antifúngicos, antimicóticos, antipalúdicos, (Chua, 2013) (Gegotek et al., 2017) (Ganeshpurkar & Saluja, 2017) y en recientes estudios ha demostrado potencial leishmanicida contra promastigotes de *Leishmania donovani* (*L. donovani*) lo que sugiere que la rutina puede ser utilizada en la terapia contra la leishmaniasis (Chauhan et. al., 2018).

En este contexto, el presente trabajo de investigación resume las claves taxonómicas ya existentes para identificar a *L. olmeca olmeca*, *L. cruciata*, *L. shannoni*, *L. panamensis* y *L. aclydifera* especies presentes en México, así como ilustrar las estructuras taxonómicas relevantes con ejemplares físicos. Aunado a esto y contribuyendo al estudio de tratamientos alternativos para la leishmaniasis se identificó a la rutina a través de cromatografía en capa fina de la fase acuosa del extracto de *C. serrata*, así mismo se analizó el efecto *in vitro* de este compuesto sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana* cepa LAC.

3. ANTECEDENTES

3.1 Leishmaniasis

3.1.1 Generalidades.

La leishmaniasis, es una enfermedad zoonótica y antroponótica que puede comprometer la piel, mucosas y vísceras, es causada por 20 parásitos intracelulares de la familia *Trypanosomatidae* del género *Leishmania*, el parásito es transmitido por la picadura de un flebótomo hembra *Diptera* de la familia *Phlebotomidae* infectada (Kasper, et. al., 2012) (Torres et. al., 2017)(CDC, 2022) (Palma et. al., 2021).

La leishmaniasis constituye una de las diez enfermedades tropicales desatendidas, con más de 12 millones de personas infectadas, con 0.9 a 1.6 millones de nuevos casos al año, causando de entre 20,000 a 30,000 defunciones y 350 millones de personas en riesgo de infectarse (OPS/OMS, 2018).

Esta patología está directamente relacionada con condiciones socioeconómicas (condiciones de vivienda, deficiencia de saneamiento de viviendas), malnutrición (dietas bajas en proteínas, hierro vitamina A y Zinc), movilidad de la población y cambios ambientales (cambios de temperatura, precipitaciones y humedad), ya que impactan directamente en la distribución y la cantidad de vectores y reservorios (OPS/OMS, 2018) (OMS, 2022).

Se presenta en mamíferos de todos los continentes excepto Oceanía y la Antártida (CDC, 2022) siendo así que depende de la ubicación geográfica del género del flebótomo transmisor del parásito *Leishmania sp.*, en el hemisferio Occidental (Nuevo Mundo) se encuentra el género *Lutzomyia* (México, América central y América del Sur) y en el hemisferio Oriental (Viejo Mundo) se encuentra el género *Phlebotomus* (Asia, Medio Oriente, región tropical de África, norte de África y el sur de Europa) (CDC, 2022) (Boelaert et. al., 2014).

De acuerdo con los registros de la OMS, en el 2021, los países que reportaron más casos de leishmaniasis cutánea fueron Siria, Afganistán, Pakistán, Brasil, Irán, Iraq,

Argelia, Colombia y Perú mientras que México reportó 505 casos (WHO, 2023) (Figura 1).

Aunado a esto, la OPS menciona que los países que concentran el mayor número de casos de leishmaniasis visceral son India, Sudán del Sur, Sudán, Brasil, Etiopía y Somalia (OPS, 2018).

En México, la leishmaniasis se presenta en áreas agrícolas comúnmente donde se siembra y cosecha cacao, café o árboles chicleros, razón por la cual a la leishmaniasis también se le conoce como “Úlcera de los chicleros”. Aproximadamente 9 millones de personas se encuentran en riesgo, distribuyéndose en 3 regiones (Golfo, Pacífico y Centro) (SSA, 2022) (Figura 2).

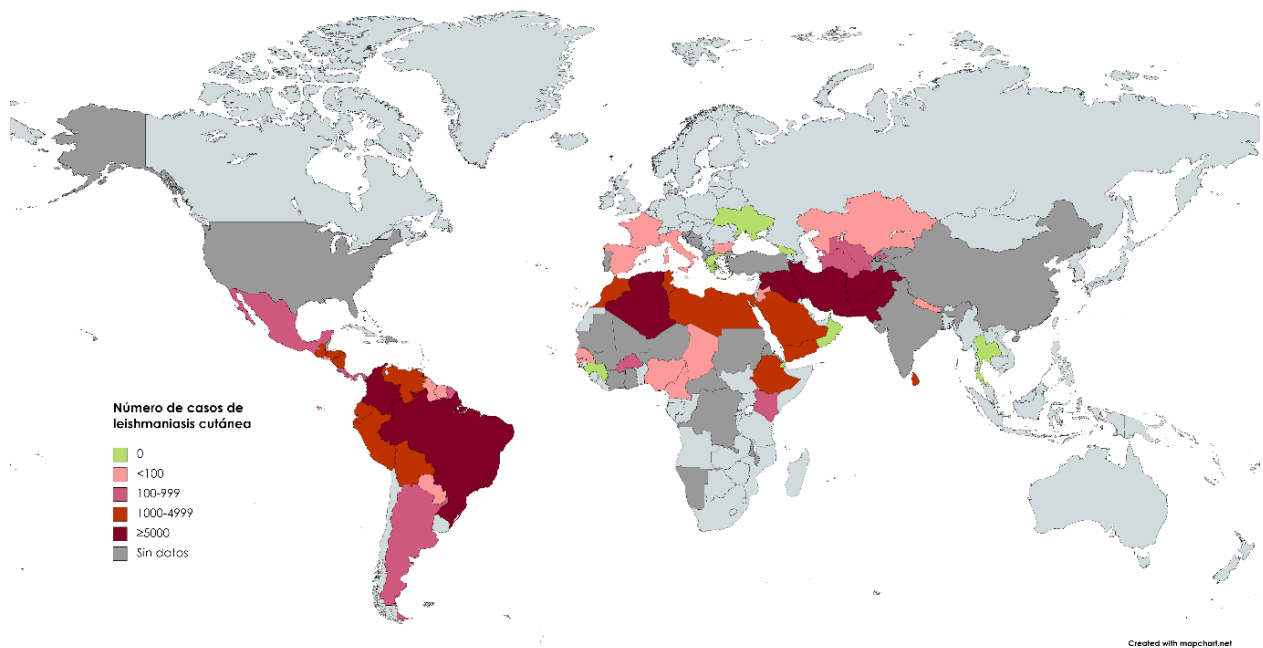


Figura. 1. Distribución geográfica del número de casos de leishmaniasis cutánea reportados por la OMS en 2021. Mapa realizado en mapchart.net tomado de Leishmaniasis. Número de casos de leishmaniasis cutánea reportados en 2020 (https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html?geog=0&indicator=i2&date=2020&bbox=-230.24100000000004,-62.897000000000006,230.24100000000004,90.597000000000002&printmode=true)



Figura 2. Distribución de Leishmaniasis en México. La región del Golfo comprende los estados de Veracruz, Quintana Roo, Yucatán y Campeche. La región del Pacífico comprende los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Tabasco. La región del Centro comprende los estados de Morelos y Puebla. Mapa realizado en mapchart.net tomando datos de Leishmaniasis(2016). (<https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/leishmaniasis>)

3.1.2 Generalidades de *Lutzomyia* sp.

Los flebotomos son pequeños dípteros de la familia *Psychodidae* de importancia médica por ser vectores de la leishmaniasis, tal es el caso del género *Lutzomyia* el cual es responsable de transmitir la Leishmaniasis cutánea y visceral (Boelaert et al., 2014).

La *Lutzomyia*, también conocida como mosca chiclera, la chiclera, papalotilla o palomilla (CENAPRECE, 2015), es un artrópodo e insecto incluidos en el orden *Diptera*, suborden *Nematocera*, familia *Psychodidae* y subfamilia *Phlebotominae* (Cecílio et al., 2022), tiene una longitud de 2 a 3 mm, con el cuerpo y alas densamente cubierto de sedas y un período de vida en la naturaleza aproximadamente de 40 a 50 días (Sierra et al., 2000). Su ciclo de vida comprende cuatro etapas principales: huevos, larvas, pupas y adultos (Cecílio et al., 2022).

Los flebotómicos también conocidos como moscas de la arena en promedio depositan de 30 a 70 huevos en lugares protegidos elegidos en función de la humedad y la presencia de materia orgánica como la hojarasca (Cecílio et al., 2022)

(Sierra et al., 2000), usualmente los huevos son oscuros, elípticos y en la superficie tienen surcos y otras protuberancias que forman patrones típicos de la especie o del complejo de especies (Sierra et al., 2000).

Por lo general, los huevos eclosionan entre 4 y 20 días después de la oviposición, aunque este tiempo puede extenderse en climas más fríos, ya que los huevos pueden tener una pausa en condiciones desfavorables (Cecílio et al., 2022).

Posteriormente, eclosionan en larvas cursando cuatro estadios larvales y el desarrollo larvario generalmente se completa de 20 a 30 días, dependiendo de la especie de mosca de la arena, así como la temperatura y disponibilidad de los alimentos. (Cecílio et al., 2022)

La pupa suele tardar entre 6 y 13 días y los adultos emergen durante las horas de la oscuridad, a menudo justo antes del amanecer. (Cecílio et al., 2022)

Normalmente la oviposición se produce entre cinco y ocho días después de la alimentación con sangre, aunque se sabe que algunas especies se alimentan varias veces antes de desarrollar con éxito huevos viables (Cecílio et al., 2022) porque algo importante a mencionar es que las hembras son las únicas que se alimentan de sangre para el proceso de oviposición, aunado a que también se alimentan de azúcares de origen vegetal como lo hacen los machos (Godínez E Ibáñez, 2010).

Entre las 1000 especies/subespecies de flebotomos validadas/descritas hasta ahora en todo el mundo, solo la décima parte son vectores comprobados o sospechosos de parásitos de *Leishmania sp.* los cuales se separan en dos grupos de vectores; restrictivos y permisivos (Cecílio et al., 2022).

Los vectores restrictivos son aquellos que muestran especificidad notable por las especies de *Leishmania* mientras que los vectores permisivos permiten el desarrollo de especies distintas de *Leishmania* (Cecílio et al., 2022)

En México se han registrado hasta ahora un total de 44 especies de flebotominos (Mikery et. al., 2012) de los cuales se ha encontrado como principal transmisor de *L. mexicana* a *L. olmeca olmeca* aunque otros estudios muestran que también están incriminadas las especies de *L. cruciata*, *L. shannoni* y *L. panamensis* (Vargas et al., 2011) (Rodríguez et al., 2017) por otra parte a *L. longipalpis* es la principal

especie transmisora de *Leishmania infantum* (*L. infantum*) (Caliguri, 2016) (Vivero et al., 2009).

3.1.2.1 Taxonomía de *Lutzomyia* sp.

La taxonomía es la ciencia de nombrar, describir y clasificar organismos e incluye todas las plantas, animales y microorganismos del mundo (CBD, 2010).

Un método utilizado para la clasificación taxonómica de los flebótomos se basa en el análisis morfológico, incluyendo un análisis externo también conocido como flebometría y otro interno. (Cecílio et al., 2022)

Entre las estructuras que se consideran para hacer la clasificación taxonómica con ayuda de las claves ya existentes son; los ascoides, el cibario, las alas, la espermateca (hembras) y el gonopodio (machos) (Ibáñez, 2005a) (Ibáñez, 2005b) (Galati et. al., 2017), siendo así que todos estos muestran características únicas entre las diferentes especies del género *Lutzomyia*.

Por otra parte, en los últimos años se han utilizado métodos modernos en el que se incluyen el análisis de cromosomas, análisis de isoenzimas, análisis moleculares y filogenéticos, así como la espectrometría de masas (MALDI-TOF), permitiendo una mejor identificación y clasificación de los especímenes. (Cecílio et al., 2022)

3.1.3 Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

La infección por *Leishmania* sp. comienza cuando un flebótomo hembra infectada por protozoarios de *Leishmania* sp. en su etapa infectiva (promastigotes), muerde a un huésped humano u otro mamífero para alimentarse de sangre (Teixeira et al., 2013), el flebótomo con sus piezas bucales en forma de sierra las agitan sobre la piel para producir una pequeña herida en la que fluya la sangre, formando un charco de sangre (Bates, 2007), el cual es posible debido a la presencia de moléculas anticoagulantes en la saliva del flebótomo (Teixeira et al., 2013).

Este daño tisular provoca la activación del sistema inmunitario del huésped movilizando a los macrófagos al sitio en el que se formó el charco de sangre, conllevando a que éstas células inmunitarias fagociten a los promastigotes

metacíclicos que el flebótomo regurgitó en el charco de sangre al alimentarse (Bates, 2007) (CDC, 2023) (Teixeira et al., 2013)

Debido a cambios como el pH y la temperatura los promastigotes se transforman en amastigotes los cuales se multiplican por división simple y proceden a infectar a otras células fagocíticas mononucleares (CDC, 2023), esto último se debe a que, por la intensa multiplicación, se rompe la membrana del macrófago, liberando los amastigotes en el tejido y estos pueden invadir nuevos macrófagos (Teixeira et al., 2013).

El parásito, el huésped y otros factores afectan si la infección se vuelve sintomática y si se produce leishmaniasis cutánea o visceral (CDC, 2023).

De igual forma la carga parasitaria del huésped puede ser ingerida por un nuevo flebótomo hembra durante su ingesta de sangre (Teixeira et al., 2013) (CDC, 2023), siendo así que una vez dentro del vector, en el intestino medio los amastigotes se transforman en promastigotes para posteriormente migrar a su probóscide, y al realizar la ingesta de sangre el ciclo de infección se repite (CDC, 2023) (Figura 3).

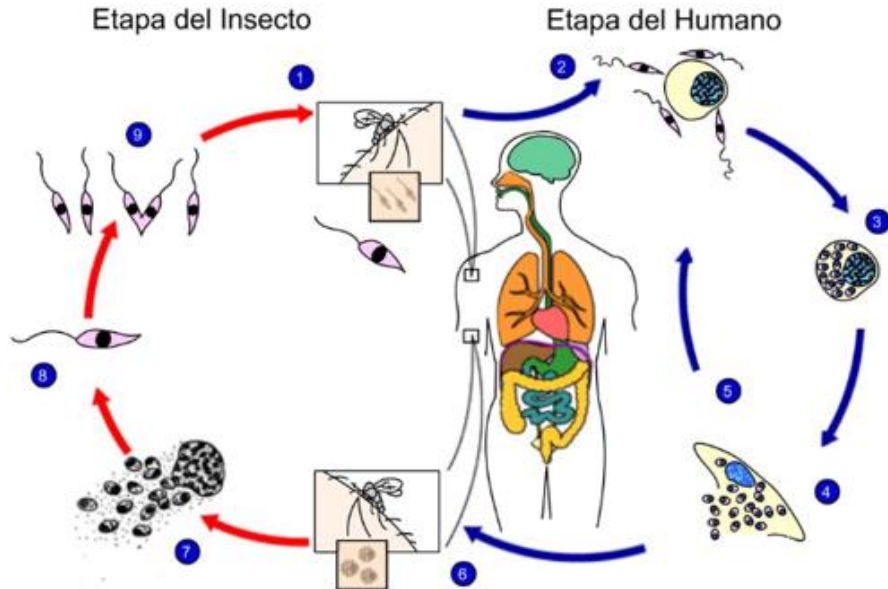


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania sp.* (1) inoculación de promastigote por picadura, (2) fagocitosis del promastigote, (3) diferenciación del promastigote a la fase de amastigote, multiplicación de amastigotes, (4) lisis del macrófago y liberación de amastigotes, (5) fagocitosis de amastigotes liberados, (6) ingestión por el vector (7-9) desarrollo del promastigote dentro del vector. Adaptada de Leishmaniasis CDC (2017) <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

3.1.4 Cuadros clínicos de la Leishmaniasis.

De acuerdo con la OMS, la Leishmaniasis, se manifiesta de tres formas clínicas diferentes; cutánea (localizada o difusa), mucocutánea y visceral o Kala-azar, dependiendo de la especie, el medio ambiente y la respuesta inmunológica del huésped (WHO, 2021)

Dependiendo de la severidad del cuadro clínico se clasifica la leishmaniasis cutánea como la de menor severidad, seguida por la leishmaniasis mucocutánea y finalmente la leishmaniasis visceral o Kala azar.

3.1.4.1 Leishmaniasis cutánea.

En México *L. mexicana* causa dos cuadros clínicos de leishmaniasis cutánea; leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

LCL tiene un periodo de incubación que va de las dos semanas a seis semanas aproximadamente (Trejo et. al., 2020), se caracteriza porque el mismo día que el flebótomo se alimenta aparece una mancha eritematosa, que posteriormente progresa a una pápula y después cambia a un nódulo que puede durar dos semanas aproximadamente, este nódulo aumenta de tamaño hasta que se ulcera (Trejo et. al., 2020). Esta úlcera tiene características particulares, pues es de fondo limpio y bordes duros. Por lo general es tratada con antimoniales pentavalentes, dejando una cicatriz (SSA., 2015) (Figura 4). Por otro lado, la LCD se caracteriza por lesiones cutáneas nodulares o en placas que tienden a diseminarse en la piel de todo el cuerpo (SSA., 2015) (Figura 5), a excepción en el cuero cabelludo, axilas, palmas y plantas de los pies (Trejo et. al., 2020), al tener un curso crónico implacable por lo general es refractaria al tratamiento (Kumari et. al., 2018)

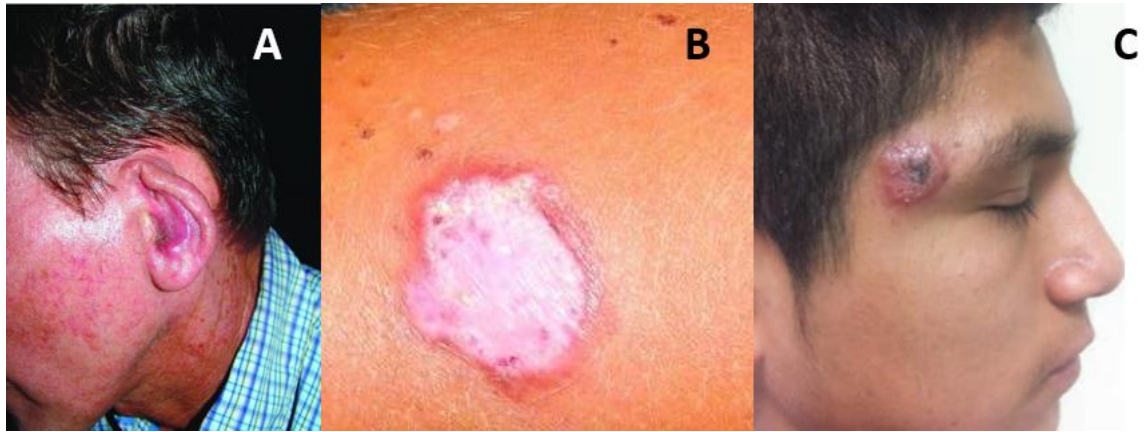


Figura 4. Cuadros clínicos de Leishmaniasis cutánea localizada. (A) Úlcera del chiclero con lecho sangrante y periferia recubierta de fibrina (B) Cicatriz atrófica en el antebrazo (C) Dermatitis de tres meses de evolución. Tomado (A) y (B) de Leishmaniasis: a Review por Torres et al. 2017, rev F100Res 6 (750) y (C) de Leishmaniasis cutánea localizada (p.16-19) por Trejo, et. al. 2020, rev *Cent Dermatol Pasqua*; 29(1)



Figura 5. Cuadros clínicos de Leishmaniasis cutánea difusa. (A) Lesiones nodulares en la espalda. (B) Lesiones con aspecto verrugoso y vegetante, distribuidas en la cara y las alas de la nariz. Tomado (A) de Leishmaniasis: a Review por Torres et. al. 2017, rev F100Res 6 (750) y (B) de Leishmaniasis cutánea y mucosa OPS/OMS (2012) https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=es#gsc.tab=0

3.1.4.2 Leishmaniasis mucocutánea.

La Leishmaniasis mucocutánea, puede ser ocasionada por *Leishmaniasis braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania panamensis* (WHO, 2010), se caracteriza por lesiones iniciales de piel que, aunque cicatrizan, producen metástasis, meses o años después de cicatrizar, (Sáenz et. al. 2013), siendo así una invasión lenta, afectando la mucosa y cartílagos, particularmente nariz y faringe (SSA, 2015).

Al inicio de la infección, hay infiltración de la mucosa con ulceraciones superficiales, posteriormente, cuando las úlceras están bien desarrolladas, sus bordes tienen un aspecto necrótico y se desgarran, siendo así que la úvula, los pilares del paladar y amígdalas pueden destruirse (Torres et. al., 2017) y en casos extremos causar la muerte.

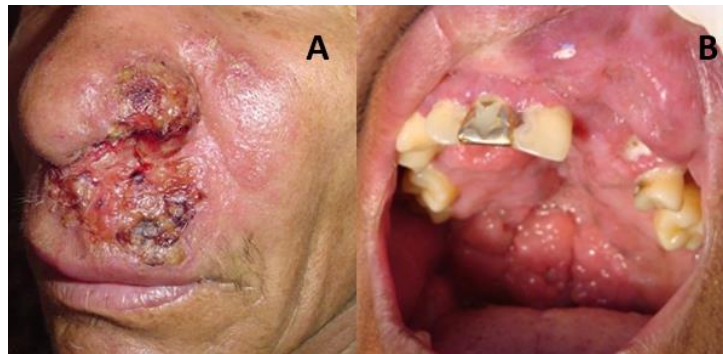


Figura 6. Cuadros clínicos de Leishmaniasis mucocutánea. (A) Proceso inflamatorio extendido por contigüidad a la piel vecina del ala nasal, el labio superior y la mejilla (B) Lesión granulomatosa con edema e infiltración en región gingival y paladar duro. Adaptado (A) y (B) de Leishmaniasis cutánea y mucosa OPS/OMS (2012) https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=es#gsc.tab=0

3.1.4.3 Leishmaniasis visceral.

La leishmaniasis visceral o Kala-azar constituye el cuadro clínico más severo ya que si no es tratada conduce a la muerte (SSA., 2015). Tiene un periodo de incubación que varía de los 10 a los 24 meses (Cruz et. al., 2013) y la población en riesgo incluye niños en edad preescolar e individuos inmunodeprimidos y desnutridos (Torres et. al., 2017).

Está se caracteriza porque los pacientes tienen fiebre que puede ser constante o irregular, esplenomegalia (Figura 7) que se manifiesta en la gran mayoría de los pacientes, hepatomegalia que puede o no estar presente, palidez causada por anemia grave, leucopenia, trombocitopenia y pérdida de peso que ocurre de forma lenta y progresiva (OPS, 2018).



Figura 7. Paciente con esplenomegalia. Tomada de Leishmaniasis visceral, reporte de cuatro casos y revisión de la bibliografía, por Cruz et al., 2013, Medigraphic, 29:204-209.

3.1.5 Tratamientos de Leishmaniasis.

Hoy en día existen diferentes tratamientos para la leishmaniasis dependiendo de las manifestaciones clínicas que muestre el paciente, la ubicación geográfica, el vector y las características relacionadas al paciente (OMS, 2022) .

Como fármacos de primera línea se encuentran los basados en el antimonio pentavalente los cuales se desarrollaron hace más de 70 años (Gutiérrez et. al., 2017) pero en muchos casos no han sido efectivos debido a la farmacorresistencia y a los efectos adversos graves (Gutiérrez et. al., 2017).

Los fármacos de segunda línea incluyen a la pentamidina y la anfotericina B, sin embargo, presentan los mismos problemas que los fármacos de primera línea pues el parásito desarrolló mecanismos de resistencia aunado a los efectos adversos graves y los costos (Ghorbani et. al., 2017).

Y como fármaco de tercera línea utilizado en el tratamiento de la Leishmaniasis está la Miltefosina, la cual presenta limitaciones en el tratamiento por sus efectos teratogénicos y su largo tiempo de vida útil lo que podría favorecer la farmacorresistencia (Ghorbani et. al., 2017).

3.1.5.1 Antimoniales pentavalentes.

Los antimoniales pentavalentes constituyen los fármacos de primera elección, están presentes en dos formulaciones; antimoniales de meglumina (Glucantime®) y estibogluconato de sodio (Pentostam®) (Ghorbani et. al., 2017).

El mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes, aún no se conoce bien, pero estudios han demostrado que probablemente actúan inhibiendo la actividad de las vías glucolítica y oxidativa de los ácidos grasos en los amastigotes, pues la conversión de Sb^{5+} a Sb^{3+} puede producir una fuerte toxicidad para matar al parásito (Lindoso et. al., 2012) (Ghorbani et. al., 2017).

Entre las desventajas de utilizar los antimoniales pentavalentes se encuentra el aumento de la resistencia al fármaco por parte del parásito, debido a que el tratamiento se prolonga por largos periodos de tiempo dependiendo de la respuesta del paciente (Gutiérrez et. al., 2017), aunado a los efectos secundarios graves,

como insuficiencia renal, pancreatitis aguda, teratogénesis, neuropatía periférica, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad, mialgia, artralgia, anorexia, dolor de cabeza, fiebre, vómitos mareos, entre otros (Gutiérrez et. al., 2017) (Lindoso et. al., 2012) limitando así el tratamiento en mujeres embarazadas, personas de la tercera edad, personas con enfermedades cardíacas, renales y/o hepáticas (Lindoso et. al., 2012).

3.1.5.2 Anfotericina B.

La anfotericina B, es un antibiótico poliénico con actividad leishmanicida, está disponible en cuatro formulaciones; anfotericina B desoxicolato, anfotericina B liposomal, dispersión coloidal de la anfotericina y complejo lipídico de anfotericina B (Lindoso et. al., 2012).

En general, la anfotericina B, actúa tanto sobre los promastigotes y los amastigotes, dirige su acción sobre el ergosterol presente en la membrana superficial del parásito, causando el aumento de la permeabilidad y la entrada de iones (Lindoso et. al., 2012).

El tratamiento con desoxicolato de anfotericina B se ve limitado debido a los efectos secundarios graves que incluyen náuseas, escalofríos, vómitos, fiebre, hipopotasemia, insuficiencia renal, anemia y problemas cardíacos (Lindoso et. al., 2012) (Ghorbani et. al., 2017).

Aunado a esto último, tiene una biodisponibilidad muy baja por vía oral, por lo que se administra por vía intravenosa en infecciones sistémicas utilizando micelas de desoxicolato, contribuyendo a la toxicidad de la anfotericina B (Ghorbani et. al., 2017).

Por otro lado, la anfotericina B liposomal, puede circular en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo y penetrar en los tejidos de manera eficiente debido a su tamaño pequeño, minimizando la toxicidad del fármaco (Ghorbani et. al., 2017), el inconveniente de esta formulación es su elevado costo especialmente para países en desarrollo, promoviendo la farmacorresistencia (Ghorbani et. al., 2017).

3.1.5.3 Pentamidina.

El isotianato de pentamidina es un medicamento antiparasitario utilizado como tratamiento alternativo de leishmaniasis visceral resistente a los antimoniales pentavalentes o para el tratamiento de leishmaniasis cutánea producida por *L. panamensis* y *L. braziliensis* (Robledo et. al., 2006).

La pentamidina es una dibenzamidina que interfiere con la incorporación de nucleótidos y ácidos nucleicos del ADN e inhibe la fosforilación oxidativa y la biosíntesis del ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos de *Leishmania*, actuando sobre el cinetoplasto y la membrana mitocondrial provocando la muerte del parásito (Lindoso et. al., 2012) (ANMAT, 2010).

La limitante de este fármaco son los efectos secundarios que provoca, entre los que están la hipotensión, mialgia, absceso en el lugar de la inyección, hipoglucemia, nefrotoxicidad y diabetes mellitus, estos últimos dos efectos se han observado en tratamientos prolongados con dosis altas empleados en pacientes con coinfección de VIH-*Leishmania* (Lindoso, et. al., 2012) (Robledo, et. al., 2006).

3.1.5.4 Miltefosina

La miltefosina o hexadecilo 2-etil fosfato se considera un fármaco antileishmanial de tercera línea utilizado para tratar la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis cutánea por vía oral, aunque inicialmente fue desarrollado para el tratamiento de cáncer (Lindoso et. al., 2012) (Ghorbani et. al., 2017).

El fármaco miltefosina inhibe la biosíntesis de fosfolípidos y esteroides en los promastigotes de *Leishmania sp.* (Soto, et. al., 2006).

La administración oral de miltefosina reduce las inyecciones al paciente aumentando la adherencia terapéutica del mismo, además de reducir costos (Soto et. al., 2006), pero tiene como limitantes que la miltefosina es teratogénica y que el largo tiempo de vida útil podría favorecer la promoción de la farmacorresistencia (Lindoso et. al., 2012) (Soto et. al., 2006).

3.2 Medicina tradicional.

Entre las alternativas para tratar y aliviar diferentes enfermedades se encuentra la medicina tradicional basada en el uso de plantas, también llamada fitoterapia, siendo así que, en algunas partes del mundo, la población depende de las plantas medicinales para satisfacer la atención primaria de la salud o incluso como medicina complementaria o alternativa (Bermúdez et. al., 2005) (OMS, 2013).

Muchas plantas presentan propiedades antiparasitarias e inmunomoduladoras, de tal forma que presentan bioactivos que pueden ser utilizados en el tratamiento contra la Leishmaniasis, tales como flavonoides, isoflavonoides, saponinas, alcaloides, calconas, triterpenoides, naftoquinonas, quinonas, lignanos, esteroides, sesquiterpenoides, polisacáridos, taninos, indoles y glucanos (Oliveira et. al., 2018) (Oryan, 2015).

Entre las plantas con potencial leishmanicida se encuentran *Aloe vera*, *Lippia sidoides*, *Cymbopogon citratus*, *Cleoserrata serrata*, entre otras que se muestran en la Tabla 1.

| Nombre científico | Parte de la planta utilizada | Preparación | Concentración/dosis | Organismo probado | Forma de uso | Principales resultados |
|---|---|--|---|--|--|--|
| <i>Croton pullei</i> var. <i>Glabrior</i> | Corteza de tallo | Julocrotina, alcaloide aislado de <i>C. pullei</i> | Concentración de 1 mg/mL, IC50: 19.8 µM | Amastigotes y promastigotes de <i>L. amazonensis</i> | <i>In vitro</i> | 80% de inhibición reducción significativa en el número de amastigotes y cambios morfológicos en promastigotes sin ninguna toxicidad |
| <i>Lippia sidoides</i> Cham (Alecrim pimentón) | Partes aéreas | Aceite esencial | Concentración de 250µg/ mL, IC50: 44.38 µg/mL | Amastigotes y promastigotes de <i>L. amazonensis</i> | <i>In vitro</i> | Reducción de la supervivencia de amastigotes y promastigotes sin efectos citotóxicos |
| <i>Valeriana wallichii</i> DC | Raíz | Extractos de agua, metanol y cloroformo | (Promastigotes): 1-500 µg/mL para los extractos y 1-20 µg/mL para las fracciones, anfotericina B: 0.01-10 µM (amastigote) 0.001 a 100 µg/mL para los extractos y fracciones | Promastigotes de <i>L. donovani</i> y promastigotes y amastigotes de <i>L. major</i> | <i>In vitro</i> | Extractos MeOH y Cloroformo (3-7 µg/mL para ambos promastigotes y 0.3 µg/mL contra amastigotes de <i>L. major</i>) mostraron actividad contra las tres opciones a través de la muerte celular apoptótica |
| <i>Aloe vera</i> contra <i>tamarix aphylla</i> | Hojas vs. Corteza | Extracto metanólico | 25-100 µg/mL | Promastigotes de <i>L. tropica</i> | <i>In vitro</i> | Especialmente <i>T. aphylla</i> , excepto por la concentración más baja, tuvo un efecto muy significativo sobre la motilidad del parásito y con actividad antipromastigota. |
| <i>Cymbopogon citratus</i> y <i>citral</i> | Partes aéreas | Aceite esencial | Concentración:10-400 µg/mL y IC50: de 25 a 52 µg/mL y de 34 a 42 µg/mL, respectivamente | Promastigotes de <i>L. infantum</i> , <i>L. tropica</i> y de <i>L. major</i> | <i>In vitro</i> | Ambos fueron efectivos para inhibir el crecimiento de parásitos por apoptosis sin inducción de citotoxicidad |
| Acetogeninas, annonacinona y corossolona de <i>Annona muricata</i> y escoparona de cumarina de <i>Platymiscium floribundum</i> | Tallo de <i>P. floribundum</i> y hojas y semillas de <i>A. muricata</i> | Una cumarina escoparona de <i>P. floribundum</i> y dos acetogeninas annonacinona y corossolona de <i>A. muricata</i> | 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL | Promastigotes de <i>L. donovani</i> , <i>L. mexicana</i> y <i>L. major</i> | <i>In vitro</i> | <i>L. donovani</i> y <i>L. major</i> fueron más susceptibles a la annonacinona y <i>L. mexicana</i> a annonacinona y la escoparona, tres especies tuvieron una susceptibilidad similar a la corossolona y la corossolona fue la más tóxica |
| <i>Tridax procumbens</i> solo y en combinación con <i>Allium sativum</i> (ajo) | Planta entera y bulbos, respectivamente | Metanol y acuoso respectivamente | 20 mg/kg por separado y 40 mg/kg de la mezcla durante 2 semanas, IP | Promastigotes de <i>L. mexicana</i> , Leishmaniasis cutánea | <i>In vivo</i> En ratón con Leishmaniasis cutánea | Aumento de la relación IgG2/IgG1 y respuesta inmune tipo Th1 con la mezcla. La mezcla fue mejor para controlar la infección sin citotoxicidad. |
| <i>Cleoserrata serrata</i> (Jacq.) Iltis (Alamilla et. al. 2018) | Partes aéreas | Metanol | Promastigotes: 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 µg/mL DL50: 23.2 µg/mL Amastigotes: 1, 2.5, 3.75, 5, 6.25, 7.5, 10 µg/mL DL50: 6.11 µg/mL | Promastigotes y amastigotes de <i>L. mexicana</i> | <i>In vitro</i> | El extracto inhibió el crecimiento de promastigotes y amastigotes, este último es más relevante ya que es la etapa infectiva que se encuentra en los huéspedes mamíferos. |

Tabla 1. Plantas con actividad Leishmanicida contra Leishmaniasis cutánea probadas de forma *in vitro* e *in vivo*. Nota. Datos tomados de la Tabla 2 Actividad leishmanicida de compuestos derivados de plantas contra CL y VL probada *in vitro* e *in vivo* del artículo Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. Iran J Vet Res. 2015 Winter;16(1):1-19. Y datos de *Cleoserrata serrata* tomados del artículo Leishmania mexicana cell death achieved by *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis: Learning from Maya healers. *J Ethnopharmacol*. 2018 Jan 30;211:180-187. doi: 10.1016/j.jep.2017.09.037. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28965753.

3.3 Familia *Cleomaceae*

El género *Cleome* consta de 180 a 200 especies (Hall, 2008), perteneciente a la familia *Cleomaceae*.

Las plantas de este género se caracterizan por crecer encima del nivel del mar hasta 2400 m, requieren luz solar por lo que se encuentran en regiones tropicales y templadas cálidas (Chand et. al., 2022) (Singh, et. al., 2018). El periodo de germinación es entre los meses de junio y julio (Chand et. al., 2022).

Las plantas son rectas de entre 0.5 y 1.0 m de altura y ramificadas, con una raíz principal larga con pocas raíces secundarias. Los tallos y pecíolos están cubiertos de pelos glandulares que varían de verde a rosa o de violeta a púrpura. Las plantas tienen hojas alternas y venación palmeada y miden entre 2 y 10 cm de largo y entre 2 y 4 cm de ancho. Las flores son bisexuales y tienen seis estambres con filamentos largos, cuatro sépalos, libres de avados a lanceolados de hasta 8 mm de largo, glandulares, cuatro pétalos angostos en forma de garra y varían de color amarillo a rosa y blanco (Chand et. al., 2022).

Las plantas de la familia *Cleomaceae* se utilizan como verdura y las hojas y los brotes de las plantas poseen un fuerte sabor a mostaza. Las semillas contienen proteínas, ácidos grasos, aminoácidos dietéticos y lípidos (Chand et. al., 2022).

En general, constuyen una fuente rica en glucósidos de flavonol, flavonoides, aceites esenciales, diterpenos bicíclicos, diterpenos, triterpenoides, cumarinolignoides, dipiridodiazepinona, sesquiterpenos, derivados del ácido carboxílico y lactona, esteroides y saponinas (Chand et. al., 2022).

3.3.1 Farmacología

El género *Cleomaceae* tiene actividades farmacológicas importantes como antioxidante, análgésico, antiinflamatorio, antipirético, antimicrobiano, anticancerígeno, antifúngico, cicatrizante, antiartrítico, hepatoprotector, etc. (Juárez et. al., 2019) (Singh et. al., 2018) (Chand et. al., 2022) y esto es debido a sus metabolitos secundarios como lo son los flavonoides, aceites esenciales, terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides (Chand et. al., 2022). La tabla 2 resume algunas especies de *Cleome* y sus actividades farmacológicas estudiadas.

| Especie | Partes y extracto. | Clase fitoquímico | Metabolitos secundarios presentes | Actividad farmacológica |
|--------------------------------|--|--|--|---|
| <i>C. gynandra</i> Linn. | Aceite de semilla | Ácidos grasos, Ácido glucárico. | Ácido oleico, linoleico, palmítico, esteárico, cafeoilglucárido. | Antiinflamatorio, anticancerígeno, antioxidante, antipalúdico, antifúngico, antiartrítico, hepatoprotectora |
| | Extracto alcohólico desgrasado de semilla | Esteroles, Alcohol graso, flavonol. | Beta-sitosterol, hexacosanol, Kaempferol | |
| | Extracto metanólico de semillas desengrasadas | Flavonoides | Luteolina, 5-hidroxi 3',4',7-trimetoxiflavona. | |
| | Extracto metanólico de hoja | Flavonol glucósido, Triterpenoides pentacíclicos, Esteroles. | Kaempferol-3,7-di-O-glucósido, quercitrina, miricitrina, beta-amirina, alfa-amirina, taraxasterol, beta-sitosterol, metilglucosinolato, centauridina. | |
| | Extracto alcohólico de Flor fresca | Flavonoides | Rutina | |
| | Extracto de éter de petróleo de toda la planta | Triterpenoides, Dammarane | Cleoginol | |
| | Toda la planta | Aceite esencial de alcohol diterpénico monoterpénico. | Trans-2-metil-ciclopentanol Beta-cariofileno, Carvacrol, Linalool, Trans-fitol | |
| <i>C. viscosa</i> | Hojas | Terpeno bicíclico Glucósido de flavonol | Cleomeolida Visconósido A y B, Vinceetoxicósido A, Kaempferitrina, Kaempferida-3-O-β-D-glucopiranosido-7-O-α-L-ramnopiranosido, Kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosido-7-O-α-L-ramnopiranosido, isorramnetin-3-O-β-D-glucopiranosido7 | Anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, psicofarmacológico |
| | Partes aéreas | Diterpeno cembranoide | Ácido cleomáldico | |
| | Flores | Glucósido de Flavonol | Quercetina-3-O-(2"-O-acetil)-glucósido | |
| | Semillas | Cumarinolignoides Dipiridodiazapinona | Cleomiscosina A, B, C, D, Nevirapina | |
| <i>C. rutidosperma</i> DC. | Partes aéreas | Alquilbenceno, alqueno, diterpeno, alcohol | Eugenol 1-heptadeceno (Z)-Fitol | Antipaludico, antituberculoso |
| <i>C. brachycarpa</i> Linn. | Toda la planta | Triterpenoide pentacíclico | Branquicarpone, Deacetoxibranquicarpone, ácido ursólico | Aumento de la memoria y mejora de la coordinación neuromuscular |
| <i>C. droserifolia</i> Del. | Partes aéreas | Flavonoides | Pinocembrina, Quercetina-3-O-glucósido-7-O-ramnósido, calicopterina | Anticanceroso, antidiabético |
| <i>C. serrata</i> Linn. | Partes aéreas | Alcohol diterpénico | Fitol | Antimicrobiano, Leishmanicida (Alamilla, L., et. al., 2017) |

Tabla 2. Actividades farmacológicas de diferentes especies de *Cleome*. Nota. Datos resumidos del artículo Phytochemistry and polypharmacology of cleome species: A comprehensive Ethnopharmacological review of the medicinal plants. Chand et al., 2022 *Journal of Ethnopharmacology* 10;282:114600 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114600>

3.4 *Cleoserrata serrata*

3.4.1 Ubicación taxonómica (The Institute of regional conservation, 2020) (GBIF, 2015).

Reino: *Plantae*

Subreino: *Viridiplantae*

Filo: *Tracheophyta*

Subfilo: *Spermatophytina*

Clase: *Magnoliopsida*

Superorden: *Rosanae*

Orden: *Brassicales*

Familia: *Cleomaceae*

Género: *Cleoserrata*

Especie: *Serrata*

Nombre binomial: *Cleoserrata serrata*



Figura 8. *Cleoserrata serrata* (jacq.) Ittis.. Tomada de *Leishmania mexicana* cell death archived by *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Ittis: *Learning from Maya Healers* por Alamilia et al., 2018, *Journal of Ethnopharmacology* 211, 180-187 <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.037>

3.4.2 Descripción taxonómica

Son plantas anuales, rectas de entre 0.5 a 1.5 m de altura poco ramificadas, con glabras o glabrescentes glandulares, inermes. Las hojas son palmiticompuestas, pecíolos de 1.5 a 15 cm de largo, estipulas diminutas e hilinas; presenta de 3 a 9 folículos, rara vez 1, elípticos ovados lanceolados u oblanceolados, márgenes crenulados, denticulados o denticulados ciliados. Las flores son ligeras o notoriamente zigomórficas, sépalos persistentes o deciduos, pétalos angostándose hacia la base, de 7 a 35 mm de largo, 6 estambres de 0.5 a 7 cm de largo, sin apófisis. Sus frutos son elipsoidales, fusiformes o cilíndricos, de 3 a 15 cm de largo, estipados, androginóforo de 1 a 18 mm de largo, ginóforo de 1 a 85 mm de largo; estilo reducido en fruto de 0 a 1 mm de largo. Sus semillas son numerosas, verdes, pardas o negras de 1 a 4 mm de diámetro, arilo ausente, hendidura seminal completamente cubierta (Figura 8) (Guzmán et. al., 2017)

3.4.3 Sinónimos y nombres comunes.

Sinónimos; *Cleome serrata* Jacq., *Neocleome serrata* (Jacq.) Pequeño, *Cleome polygama* L., *Cleome polygama* var. *Isophylla* Urb., *Cleome ternata* Willd. Ex Eichler, *Cleome triphylla* Descourt.

Nombres comunes; Toothed spiderflower, Caballero (Yucatán), Mastuerzo, Zumkak (Alamilla et. al., 2017) (The Institute of regional conservation, 2020) (Raimundo, et. Al., 2017)

3.4.4 Distribución geográfica.

Nativa de las Antillas mayores, Norteamérica (sureste de Estados Unidos [Georgia], este y sur de México [Chiapas, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz], Centroamérica y norte de Sudamérica (Cicy, 2023) (Guzmán et. al. 2017).



Figura 9. Distribución geográfica de *C. serrata* en México. Mapa realizado en mapchart.net tomando los datos de Flora de la Península de Yucatán, Cicy 2023 https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1145#:~:text=Distribuci%C3%B3n%20en%20M%C3%A9xico%3A%20Chis.%2C.Distribuci%C3%B3n%20general%3A%20Neotr%C3%B3pico y de Flora de Guerrero No.74 de Guzmán & Quintanar A., 2017 <http://biologia.fciencias.unam.mx/plantasvasculares/PDF%20FLORAS/074%20Cleomaceae.pdf>

3.5 Rutina

La Rutina, es un flavonoide natural polifenólico también conocido como quercetina-3-O-rutinósido y vitamina P. Por su estructura química se identifica como (2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3- [2S, 3R, 4S 5S, 6R) -3,4,5-trihidroxi-6-[[2S, 3R, 4S 5S, 6R) -3,4,5-trihidroxi-6-metil-Oxan-2-il] oximetil] Oxan-2 il] oxi-cromen-4-ona, (Chua, 2013) (Figura 10).

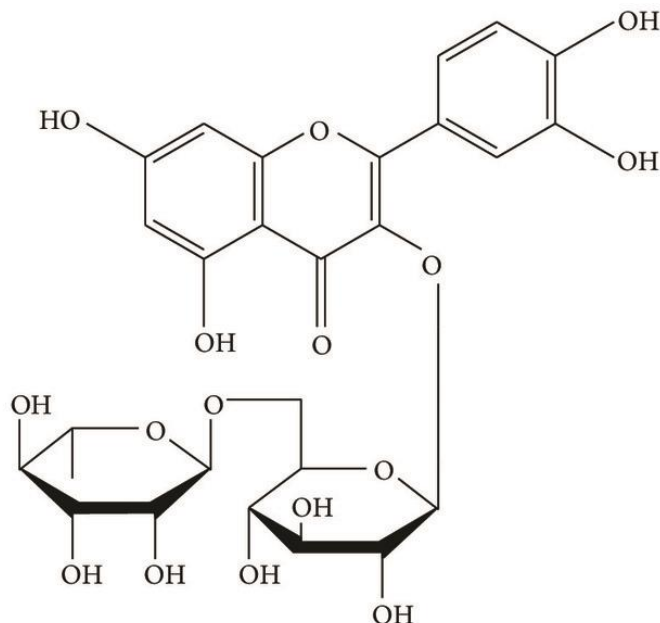


Figura 10. Estructura de la rutina. Tomada de Rutin as a mediator of lipid metabolism and cellular signaling pathways interactions in fibroblasts altered by UVA and UVB radiation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 4721352 <https://doi.org/10.1155/2017/4721352>

Esta molécula es un glucósido del tipo flavonol compuesto por quercetina y el disacárido rutinosa que está muy extendido en el reino vegetal (Gegotek et. al., 2017) (Chua, 2013), por lo que se encuentra en productos de consumo diario como la sémola de trigo, verduras y frutas cítricas (Gegotek et. al., 2017) aunado a que se conocen más de 70 especies de plantas que contienen rutina como *Ruta graveolens L. (Rutaceae)*, *Sophora japónica L. (Fabaceae)*, *Maranta leuconeura E. Morren (Marantaceae)*, *Orchidantha maxillarioides (Ridl) Schum (Lowiaceae)*, *Strelitzia regunae Banks ex Aiton (Strelitziaceae)*, *Eucalyptus spp. (Myrtaceae)*, *Canna indica L. (Cannaceae)*, *Canna edulis Ker Gawl (Cannaceae)* *Labisia punilla (Blume) Mez (Primulaceae)* (Chua, 2013) *C. gynandra (Linn)* (Chand et. al., 2022). Se obtiene a partir de la vía biosintética de los fenilpropanoides o también conocida como la vía del ácido shikímico, en la que se lleva a cabo la transformación del aminoácido fenilalanina en 4-cumaroil-CoA y malonil-CoA (Chua, 2013). La rutina es una molécula lipofílica por lo que es soluble en disoluciones orgánicas como piridina, metanol y etanol (Chua,2013), por lo que para extraerla a partir de

material vegetal se han propuesto diferentes métodos entre los que se incluyen la extracción por reflujo de calor asistida por ultrasonido, extracción mecanoquímica, microextracción en fase sólida, extracción con fluido supercrítico, extracción asistida por microondas y extracción con líquido presurizado (Chua, 2013).

Por otra parte, la rutina ha sido de importancia por su capacidad antioxidante para la industria farmacéutica, nutracéutica y cosmética como estabilizante, conservante y colorante natural (Chua, 2013), además de que estudios han demostrado su capacidad anticancerígena, antioxidante, citoprotectora, antiinflamatoria, antiplaquetaria, antitrombótica, vasoprotectora, cardioprotectora, neuroprotectora, antimicrobiana, antitumoral, antiasmática, antifúngica, antimicótica, antipalúdica, etc. (Chua, 2013) (Gegotek et al., 2017) (Ganeshpurkar & Saluja, 2017).

4. JUSTIFICACIÓN.

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoarios de la familia *Trypanosomatidae* del género *Leishmania*, el cual es transmitido por la picadura de un flebótomo hembra infectada de la familia *Psycodidae*, en el continente americano este flebótomo es de la especie *Lutzomyia*, en México se encuentran 11 especies incriminadas en la transmisión del parásito (CENAPRECE, 2015), por lo que una de las estrategias para abordar la leishmaniasis es la vigilancia y control de los vectores, dando relevancia a los estudios entomológicos de *Lutzomyia*. Estos estudios entomológicos incluyen la clasificación taxonómica de los ejemplares recolectados y el método más común es a través de la observación de los caracteres morfológicos relevantes comparándolos con las claves taxonómicas ya existentes descritas por investigadores como Ibañez, Galati, Young y Duncan, pero el inconveniente de estas claves es la complejidad y la dispersión de estas, en los diferentes trabajos publicados por los mismos, por lo que es necesario la unificación y síntesis de estas.

La vigilancia y control de vectores corresponde a la parte preventiva, pero una vez que el flebótomo ya transmitió el parásito a un humano y este dependiendo de diferentes aspectos desarrollará la enfermedad, por lo que será necesario un tratamiento. Actualmente los tratamientos para tratar la leishmaniasis son tóxicos, costosos y presentan farmacorresistencia (Sundar & Singh, 2018), aunado a que las zonas donde se presentan la mayor incidencia de casos son zonas rurales por lo que el acceso a los servicios de salud es mínimo, por lo que en estas zonas es común el uso de la medicina tradicional basada en plantas para tratar diferentes padecimientos incluida la leishmaniasis. En el 2018 Alamilla y colaboradores, describieron como curanderos mayas, utilizan las hojas secas de *C. serrata* para tratar las úlceras causadas por el parásito *Leishmania sp.*, por lo que probaron el extracto de esta planta sobre promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, demostrando que *C. serrata* tiene potencial leishmanicida. Considerando este estudio etnofarmacológico, el siguiente paso para tener un tratamiento seguro, eficaz y accesible es la caracterización de las moléculas biológicamente activas

presentes en *C. serrata*, así como la evaluación del efecto leishmanicida sobre la viabilidad del promastigotes de *L. mexicana*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

- Analizar y clasificar taxonómicamente preparaciones de flebótomos capturados en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas Veracruz, del instituto Nacional de Biología de la UNAM, así como identificar la presencia de Rutina en un extracto metanólico de *Cleoserrata serrata* y evaluar *in vitro* el potencial leishmanicida.

5.2 Objetivos particulares

- Utilizar, aprender y resumir las claves taxonómicas de Ibáñez, Young & Duncan y Galati para identificar las diferentes especies de *Lutzomyia sp.*
- Realizar la identificación taxonómica de los diferentes flebótomos capturados en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas Veracruz.
- Obtención del extracto metanólico de *Cleoserrata serrata*.
- Identificar por cromatografía en capa fina la presencia de ácido ursólico y rutina en el extracto metanólico de *Cleoserrata*.
- Determinar el potencial leishmanicida *in vitro* de la Rutina sobre el crecimiento y viabilidad de *Leishmania mexicana*.

6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

6.1 Evaluación y clasificación taxonómica de las laminillas preparadas con ejemplares de flebótomos.

Los flebótomos utilizados en el presente estudio fueron recolectados de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas Veracruz, fueron preparadas en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina UNAM, donde las estructuras como la cabeza, las alas y el cuerpo se encontraban separados, de tal forma que las estructuras relevantes como el cibario, los ascoides, espermateca, gonopodio y la bomba eyaculadora quedarán expuestas para su fácil identificación.

Cada una de las laminillas preparadas en el Laboratorio de Inmunoparasitología fueron observadas en un microscopio óptico, donde primero se evaluó que los ejemplares fueron procesados correctamente, es decir, que no contuvieran trazas de agua, maceración adecuada y disección correcta (cabeza, alas y cuerpo). Posteriormente, se unificaron las claves taxonómicas de Ibáñez, Galati, Young y Duncan, para identificar las estructuras relevantes como el cibario, los ascoides, espermateca, gonopodio y la bomba eyaculadora y después se clasificaron y etiquetaron de acuerdo con sus características taxonómicas.

6.2 Colecta de *Cleoserrata serrata*.

La parte aérea de *C. serrata* utilizada en el presente estudio fue colectada en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz en octubre del 2021. Esta Estación de Biología se localiza a 30 km Noreste del poblado de Catemaco (Veracruz). Las coordenadas geográficas son 95° 04´-95°09´ de longitud oeste y a 18° 34'-18° 36´ de latitud norte en la porción sur del estado de Veracruz. La identificación taxonómica de la especie fue realizada por la Dra. Lorena Noemí Alamilla Fonseca. El ejemplar de herbario se depositó en el Herbario IMSS con el número de registro 16,848.

6.3 Preparación del extracto crudo de *Cleoserrata serrata*.

El material vegetal seco y molido (500 g pulverizados en un molinillo eléctrico marca Electrical grinder IKA MF 10, mesh: diámetro de poro 0.5mm) se extrajo tres veces mediante un proceso de maceración con una mezcla de CH_2Cl_2 -MeOH (1:1). El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida. Posteriormente, 18.397 g del extracto resultante se sometió a un fraccionamiento preliminar mediante un proceso de partición entre metanol acuoso (90%; 50 mL) y hexano (100 mL) (Figura 11).

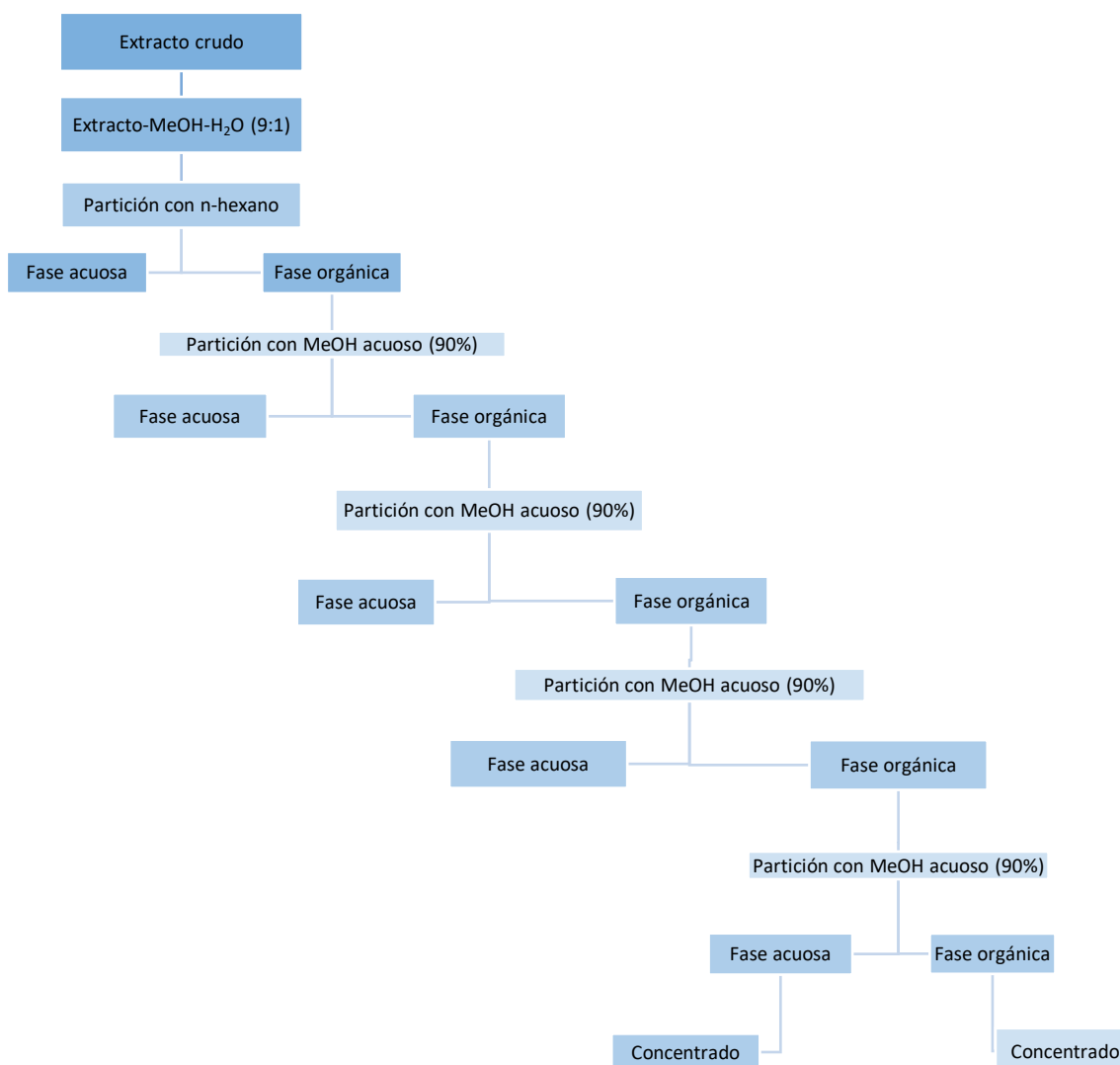


Figura 11. Diagrama para la obtención de las fracciones a partir del extracto crudo.

6.4 Identificación del ácido ursólico en la fase orgánica.

6.4.1 Cromatografía en capa fina

El análisis cromatográfico en capa fina se realizó en placas de aluminio recubiertas del gel de sílice (silica gel 60 F₂₅₄). El sistema de elución consistió en una mezcla constituida por n-hexano, CH₂Cl₂ y AcOEt en proporción 1:1:1. Como agente cromógeno se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal.

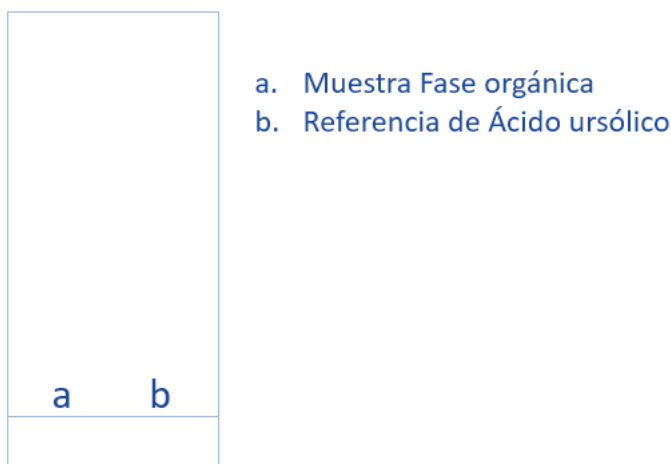


Figura 12. Posición en la que se colocaron la muestra y la referencia de ácido ursólico, en la placa de aluminio recubierta de gel sílice.

6.5 Identificación de la rutina en la fase acuosa.

6.5.1 Tratamiento con Amberlita XAD16N.

6.5.1.1 Lavado de la resina Amberlita XAD16N.

Se pesó 5.0288 g de Amberlita XAD16N, y se lavó con 250 mL de H₂O utilizando un embudo Buchner empleando vacío, una vez seca la resina, se lavó con 250 mL de MeOH y se secó del mismo modo. Finalmente, se hizo un tercer lavado utilizando 250 mL de H₂O y se secó empleando vacío.

6.5.2 Procedimiento muestra-Amberlita XAD16N.

La fase acuosa se suspendió con 250 mL de H₂O con ayuda del sonicador: enseguida, se adicionó la Amberlita XAD16N y se mantuvo en agitación lenta durante 21 horas. Una vez transcurrido el tiempo de agitación la mezcla se filtró a

vacío empleando un embudo Buchner. La resolución de la fracción acuosa se realizó con diferentes proporciones de MeOH (2, 4, 6, 8, 10, 30 y 100%) obteniendo 7 diferentes fracciones secundarias. Finalmente, las fracciones obtenidas se analizaron cromatográficamente y se reunieron aquellas que resultaron similares. El sistema de elución consistió en una mezcla AcOEt: Piridina:H₂O: MeOH en proporciones 80:20:10:5 (Figura 13).

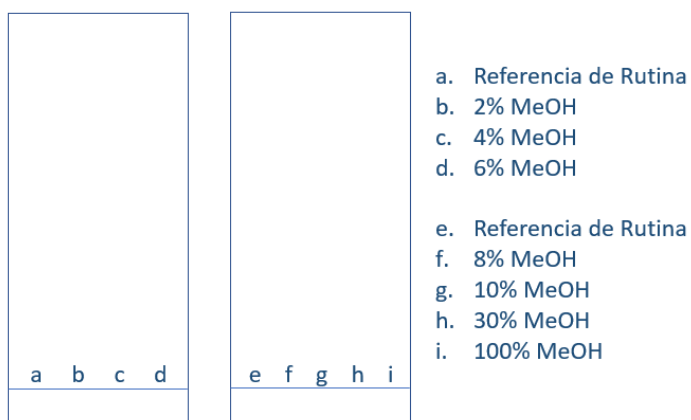


Figura 13. Posición en la que se colocaron la referencia de rutina y cada una de las fracciones obtenidas, en la placa de aluminio recubierta de gel sílice.

6.6 Pruebas de cuantificación del extracto crudo.

6.6.1 Preparación de la muestra (M1).

Se pesaron 12.4 mg del extracto crudo de *C. serrata* y se aforó en un matraz volumétrico de 5.0 mL utilizando MeOH como disolvente, para obtener una disolución metanólica 2.48 mg/mL de *C. serrata* (Muestra M1), la cual se utilizó en las cuantificaciones de flavonoides, fenoles totales y actividad antioxidante.

6.6.2 Cuantificación de flavonoides por el método Kumazawa.

6.6.2.1 Preparación de las disoluciones para la curva de calibración de quercetina.

Se preparó una disolución madre estándar 0.1 mg/mL de quercetina, usando un estándar de referencia (ER) y MeOH como disolvente de la cual se prepararon 11

disoluciones con las siguientes concentraciones; 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{g/mL}$.

6.6.2.2 Procedimiento.

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos (250 μL). Para ello se transfirieron a los pozos 100 μL de las disoluciones que conforman la curva de calibración, MeOH (blanco) o la disolución de la muestra M1. Enseguida se adicionaron 100 μL de tricloruro de aluminio (AlCl_3) al 2%; previa agitación mecánica, la placa, se mantuvo en reposo durante 30 min en la oscuridad. Al término de este periodo se registraron las absorbancias de cada pozo en un lector de microplacas Epoch™ BioTeck a 420 nm. Cada muestra se trabajó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.

6.6.3 Cuantificación de Fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.

6.6.3.1 Preparación de las disoluciones para la curva de calibración de ácido gálico.

Se preparó una disolución madre estándar 0.2 mg/mL de ácido gálico, de la cual se prepararon 10 disoluciones con las siguientes concentraciones; 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, y 200 $\mu\text{g/mL}$.

6.6.3.2 Procedimiento.

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos (250 μL). Para ello, se transfirieron a los pozos 20 μL de las disoluciones que conforman la curva de calibración, H_2O (blanco) o la disolución de la muestra M1. Enseguida, se agregaron 100 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N; previa agitación mecánica, la placa, se dejó en reposo durante 5 min en la oscuridad. Al término de este periodo de reposo se adicionaron 80 μL de la solución de carbonato de sodio al 7.5%. De nueva cuenta, la placa se agitó mecánicamente y se mantuvo en reposo durante 30 min en la oscuridad. Al término de este segundo periodo de reposo se registró la absorbancia en un lector de microplacas Epoch™ Biotek a 760 nm.

Cada muestra se trabajó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.

6.6.4 Determinación de la capacidad antioxidante del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[·])

6.6.4.1 Preparación de las disoluciones para la curva de calibración de trolox.

Se preparó una disolución madre estándar 1000 µM de trolox usando un ER y MeOH como disolvente, de la cual se prepararon 8 diluciones con las siguientes concentraciones 1.25, 6.25, 12.5, 25, 37.5, 50, 62.5, y 75 µM.

6.6.4.2 Procedimiento.

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos (250 µL). Para ello se transfirieron a los pozos 100 µL de las disoluciones que conforman la curva de calibración, MeOH (blanco) o la disolución de la muestra M1. Enseguida, se adicionaron 100 µL de la disolución DPPH[·] Y se agitó mecánicamente para homogenizar. Se dejó en reposo durante 30 minutos en la oscuridad. Al término de este periodo se registró la absorbancia en un lector de microplacas Epoch™ BioTeck a 540 nm. Cada muestra se trabajó por triplicado y los resultados se presentan como el promedio de las determinaciones.

6.7 Evaluación de la actividad biológica de Rutina en promastigotes de la cepa *L. mexicana* LAC.

6.7.1 Cosecha de promastigotes de *L. mexicana*.

La evaluación *in vitro* de la Rutina, se llevó a cabo en promastigotes de la cepa *L. mexicana* LAC, los cuales fueron cosechados en el día cinco de cultivo.

Para la cosecha de los parásitos de *L. mexicana*, primero se revisó el cultivo para asegurarse que estuviese libre de contaminación, posteriormente se realizó la cuenta de los promastigotes en una cámara de Neubauer, utilizando

Paraformaldehído al 2% para fijarlos y poder determinar el número de parásitos por mililitro.

Los parásitos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El botón celular formado fue lavado y centrifugado tres veces con amortiguador de fosfatos (PBS) estéril a pH=7. Después del último lavado los parásitos fueron ajustados a 1×10^6 promastigotes/ 10 μ L en medio 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (MPA).


6.7.2 Preparación de los tubos para la evaluación de la rutina sobre los promastigotes de *L. mexicana*

Para realizar esta evaluación, primero se realizó una solución stock de rutina a una concentración de 20 mg/mL solubilizando con DMSO y se prepararon 10 tubos de 5 mL cada uno debidamente etiquetados con las concentraciones que se evaluaron (0, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 μ g/mL).

Al tubo etiquetado como 200 μ g/mL se le añadieron 4.0 mL del medio M199 suplementado con 10% SFB, mientras que a los demás tubos se le les añadieron 2.0 mL de este medio. Posteriormente al tubo etiquetado como 200 μ g/mL se le adicionaron 40 μ L de la solución stock de rutina y se homogenizó (Solución S1).

A partir de esta se hicieron una serie de diluciones seriadas de tal forma que para la primera se tomaron 2000 μ L de la solución S1 y se adicionaron al tubo de 100 μ g/mL y se homogenizó. Posteriormente, de esta solución 100 μ g/mL se tomaron 2000 μ L y se adicionaron al tubo de 50 μ g/mL y se homogenizó. Estas diluciones se continuaron haciendo hasta llegar al último tubo etiquetado como 0.78 μ g/mL, tal como se muestra en la tabla 4; al final, cada uno de los tubos tenía un volumen de 2.0 mL a excepción del último tubo (0.78 μ g/mL) del cual se tomaron 2000 μ L de esta solución y se descartaron.

Una vez terminadas estas diluciones seriadas, se añadieron 20 μ L del medio MPA (2×10^6 promastigotes) a cada tubo y se homogenizó para finalmente incubarlos a 26°C. Se contó el número de parásitos cada 24 horas durante 5 días, utilizando la cámara Neubauer. Con estos datos se calculó la CI_{50} de rutina a las 72 y 96 horas utilizando el programa *GraphPad* versión 8.0.1 para Windows.

| Tubo | Concentración µg/MI | Dilución 2000 µL | Medio M199 10% SFB mL | Solución stock de Rutina 20 mg/mL |
|------|---------------------|---|-----------------------|-----------------------------------|
| 1 | 200 |  | 4 | 40 µL |
| 2 | 100 | | 2 | X |
| 3 | 50 | | 2 | X |
| 4 | 25 | | 2 | X |
| 5 | 12.5 | | 2 | X |
| 6 | 6.25 | | 2 | X |
| 7 | 3.125 | | 2 | X |
| 8 | 1.56 | | 2 | X |
| 9 | 0.78 | | 2 | X |

2000 µL descartar

Tabla 4. Diluciones seriadas realizadas para la evaluación de rutina en promastigotes de *L. mexicana*.

7. Resultados.

7.1 Clasificación taxonómica.

Después de revisar en el microscopio óptico, las laminillas con los ejemplares recolectados en la Estación de Biología Tropical de la UNAM, Los Tuxtlas Veracruz, se hizo la clasificación taxonómica comparando los ejemplares con las claves taxonómicas ya existentes.

Por lo que el primer paso fue la revisión bibliográfica de las claves de Ibáñez, Young & Duncan y Galati, para flebótomos, posteriormente éstas claves se unificaron.

De las laminillas revisadas se tomaron fotografías de las estructuras taxonómicas relevantes como la cabeza, el cibario, los ascoides, la espermateca y el gonopodio de las especies *L. olmeca olmeca*, *L. cruciata*, *L. shannoni*, *L. panamensis* y *L. aclydifera*, con el fin de poder ilustrar como se ven las estructuras taxonómicas en los ejemplares físicos (Figuras 15, 17, 19, 21 y 23), pues uno de los problemas para clasificar correctamente a los especímenes es justamente que las claves existentes sólo muestran esquemas dibujados (Figuras 14, 16, 18, 20 y 22) y no imágenes reales.

7.1.1 *Lutzomyia olmeca olmeca*

De acuerdo con las claves taxonómicas ya existentes para *L. olmeca olmeca* describen para el cibario, hileras transversales de dientes grandes verticales que por su disposición parecen formar hileras longitudinales (Ibáñez, 2005b) (Ibáñez, 2001) además poseen de 10 a 12 dientes horizontales largos y puntiagudos (Figura 14 C y Figura 15 C) , para el caso de los ascoides ubicados en los flagelómeros son simples y están insertados al mismo nivel (Figura 14 D y Figura 15 D), por otro lado para las estructuras genitales para las hembras presentan la espermateca anillada con un promedio de 8 a 13 anillos distintos, así como posee la perilla terminal más ancha (Young & Duncan, 1994) además de que el conducto individual tiene la misma longitud que la espermateca y el conducto espermatecal común es tres veces la medida de la espermateca (Ibáñez, 2005b) (Figura 14 B y Figura 15 B). Por otro lado, para la genitalia masculina, en la región del gonoestilo, posee un par de setas espiniformes proximales insertadas dentro de la mitad distal (Ibáñez, 2001) (Ibáñez, 2005a) una en posición apical y otra preapical, y el conducto eyaculador es de 3.8x (Figura 14 E y Figura 15 E).

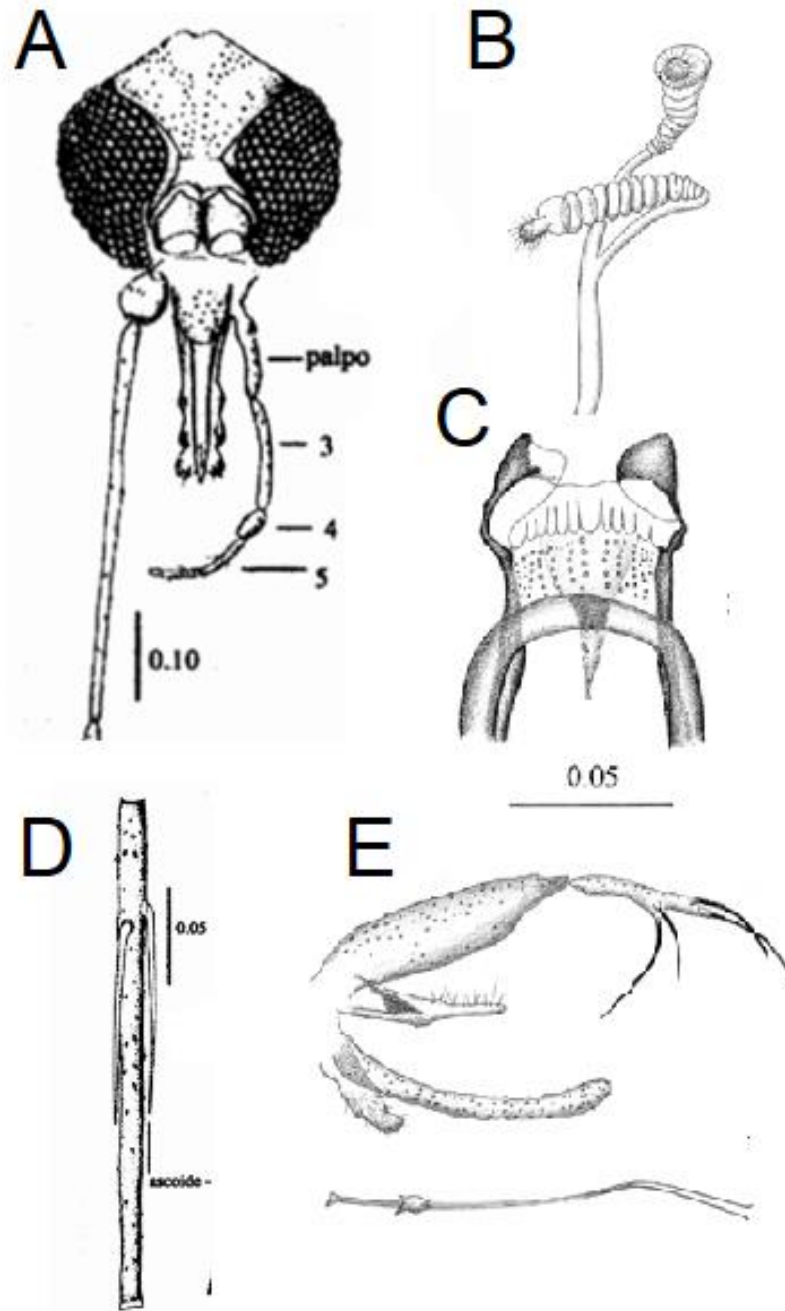


Figura 14. Clave ilustrada de *L. olmeca olmeca*. A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca anillada, C al cibario D muestra los ascoides simples insertados al mismo nivel y E muestra la genitalia masculina. Tomado A y D de Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) de México. V.-Clave ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia* Franca por Ibañez, 2005, *Folia Entomológica Mexicana* 44(1) 49-66 B,C y E tomadas de Notes on the Psychodidae (Diptera) of Belize: Subfamilies Bruchomyiinae and Phlebotominae por Ibañez, 2001, *Entomological Society of America* 94(3) 367-385.

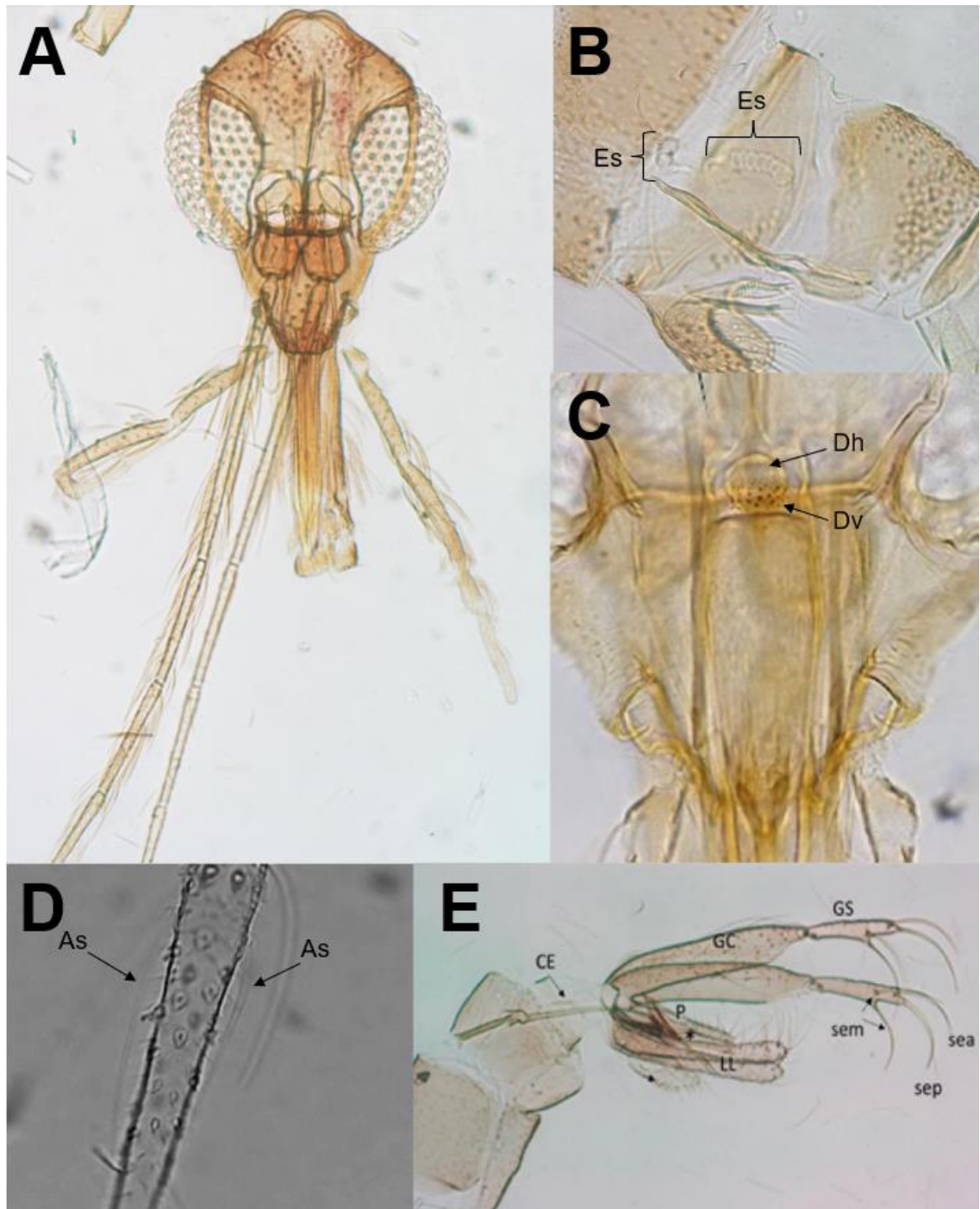


Figura 15. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de *Lutzomyia olmeca olmeca*. A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca (Es), C al cibario en donde se muestran los dientes horizontales (Dh) y los dientes verticales (Dv) organizados en hileras, D muestra los ascoides (As) simples insertados al mismo nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito (GC), el Gonoestilo (GS); el cual presenta cuatro sedas espiniformes: apical (se), preapical (sep) y dos en la parte media (sem), el Lóbulo lateral (LL), el parámero (P) y el conducto eyaculador (CE). C y E tomadas por la M. en C Isabel Cristina Cañeda Guzmán.

7.1.2 *Lutzomyia cruciata*

Por otra parte, las claves taxonómicas para *L. cruciata*, describen que el cibario posee 4 dientes horizontales (Ibáñez, 2005b) además de poseer de 13 a 18 dientes verticales pequeños organizados en hileras transversales irregulares (Figura 16 C y Figura 17 C). Otra estructura relevante son los ascoides, los cuales son simples al igual que los de *L. olmeca olmeca* pero están insertados a diferente nivel (Figura 16 D y Figura 17 D), tal como los posee *L. panamensis*, por otro lado, en las hembras la espermateca se encuentra anillada con un promedio de 20 a 30 anillos delimitados por estrías finas y el último segmento es globular y ancho (Figura 16 B y Figura 17 B), el conducto espermatecal común tiene una longitud menor a la espermateca mientras que el conducto espermatecal es cuatro veces más largo que la espermateca. (Ibáñez, 2001) (Ibáñez, 2005b) . En los machos el gonocoxito presenta un mechón basal con setas alveolados en un arreglo similar a una frambuesa, mientras que el gonostilo presenta cuatro sedas espiniformes una preapical, una apical y dos en la parte media, la longitud del gonostilo es largo (más largo que 0.5 la longitud del gonocoxito) (Ibáñez, 2001) (Figura 16 E y Figura 17 E).

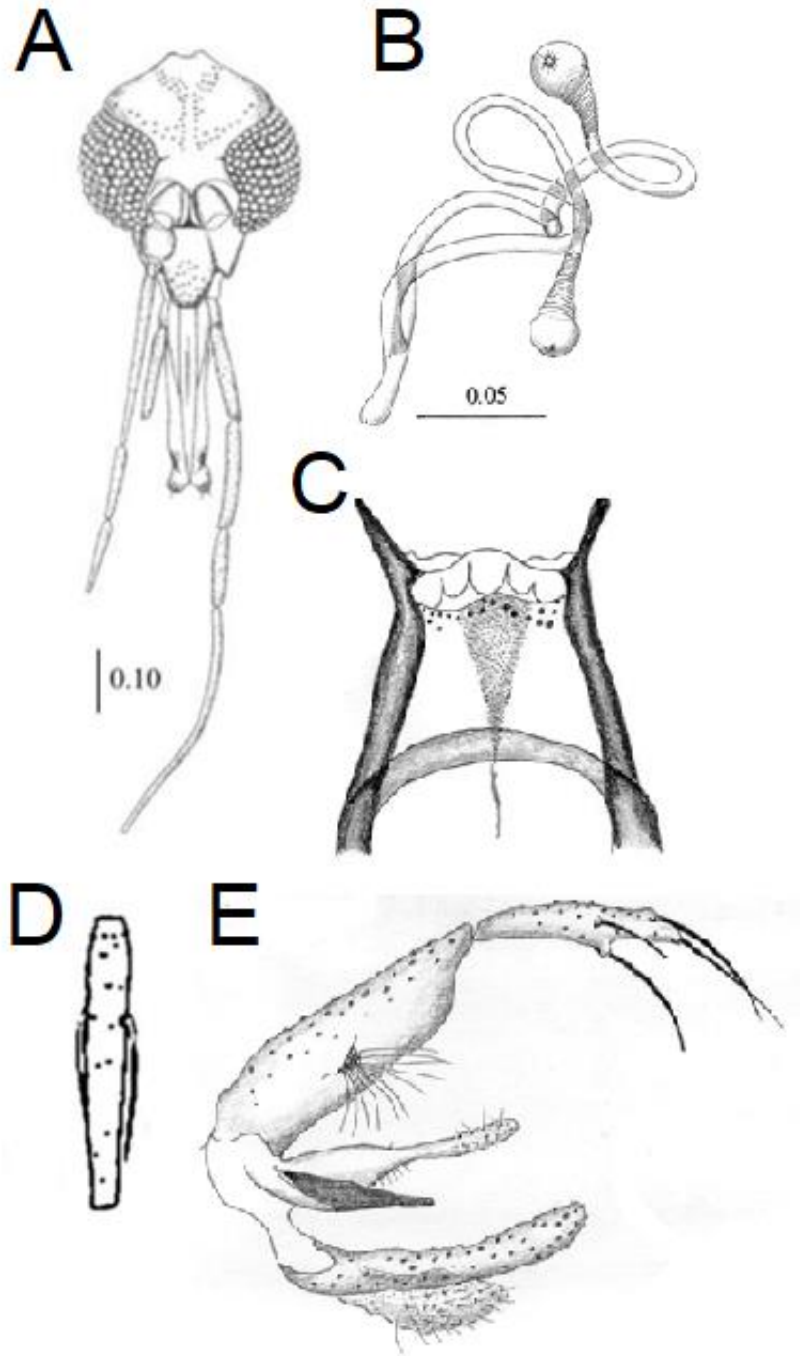


Figura 16. Clave ilustrada de *L. cruciata* A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca, C al cibario, D muestra los ascoides (As) simples insertados a diferente nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito y el Gonoestilo. Adaptadas A de Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las Hembras de *Lutzomyia franca* por Ibañez, 2005, *Folia Entomológica Mexicana* 44(1) 195-212. B, C y E de Notes on the *Psychodidae* (Diptera) of Belize: Subfamilies *Bruchomyiinae* and *Phlebotominae*, por Ibañez, 2001, *Entomological Society of America* 94(3) 367-385 y D Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, The west indies, central and south America (Diptera:Phycodidae) por Young & Duncan, 1994, *American Entomological Institute*. Num. 54 pp. 72

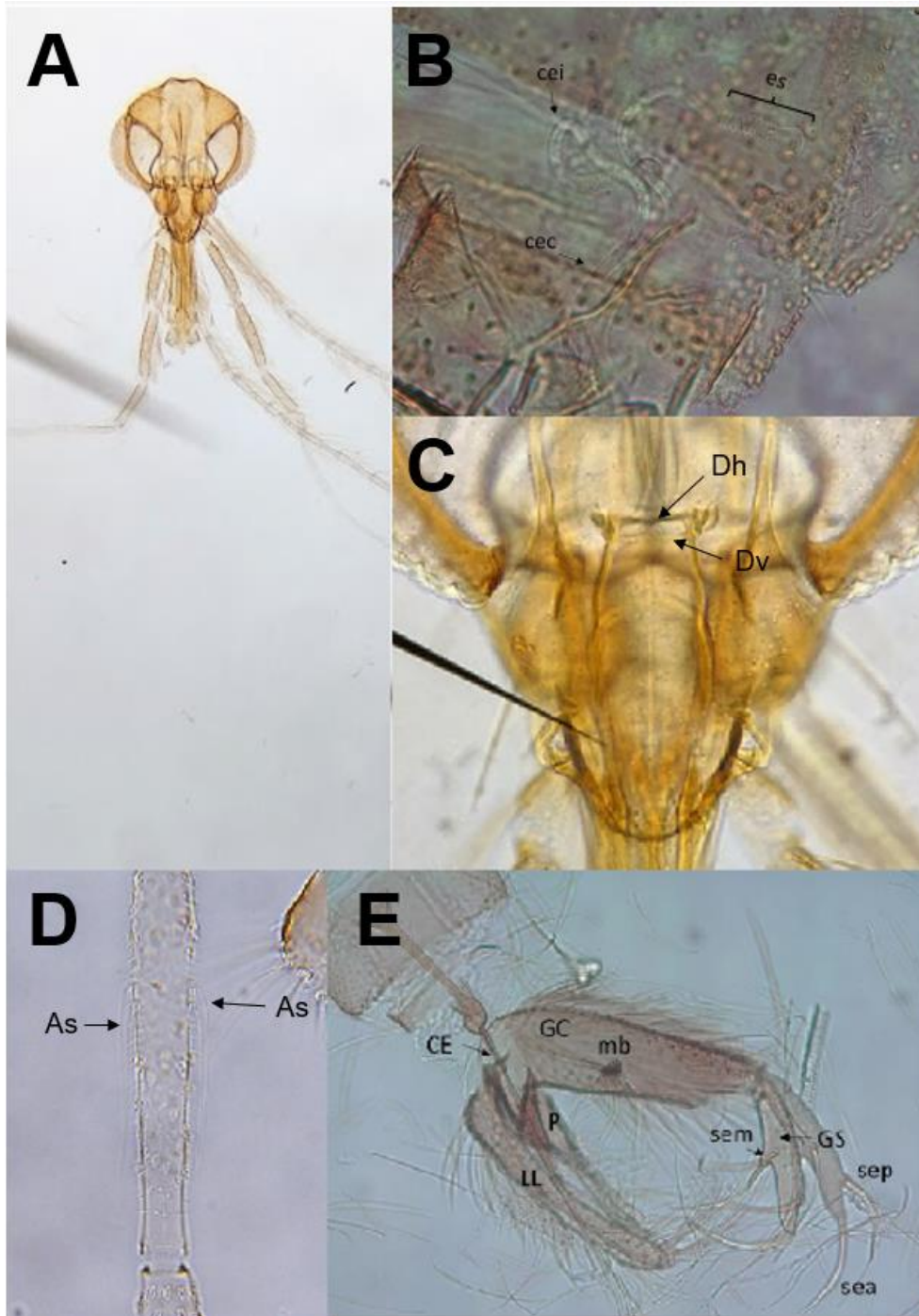


Figura 17. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de *Lutzomyia cruciata*. A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca (Es), C al cibario en donde se muestran los dientes horizontales (Dh) y los dientes verticales (Dv) organizados en hileras irregulares, D muestra los ascoides (As) simples insertados a diferente nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito (GC); el cual presenta un mechón basal (mb), el Gonoestilo (GS); el cual presenta cuatro sedas espiñoformes: una apical (se), una preapical (sep) y dos en la parte media (sem), el Lóbulo lateral (LL), el parámero (P) y el conducto eyaculador (CE). B y E tomadas por la M. en C Isabel Cristina Cañeda Guzmán.

7.1.3 *Lutzomyia shannoni*

Continuando con la clasificación taxonómica, para *L. shannoni* el cibario se describe con cuatro dientes horizontales, delgados largos y puntiagudos (Ibáñez, 2005b) (Ibáñez, 2001) y varios dientes verticales (Figura 18 C y Figura 19 C). Por otro lado, los ascoides tienen un espolón proximal largo, y están insertado a diferente nivel (Figura 18 D y Figura 19 D) al igual que *L. aclydifera*. La genitalia de las hembras se describe con forma tubular lisa (coloquialmente descritas como una salchicha) (Figura 18 B y Figura 19 B) cuyo conducto espermatecal individual es corto (0.5 la longitud de la espermateca) y el conducto espermatecal común es mayor a dos veces la longitud de la espermateca (Ibáñez, 2005b). Por el contrario, la genitalia masculina en la zona del Gonocoxito el parámero se describe como simple sin setas modificadas (Ibáñez, 2001) y el gonostilo muestra cuatro sedas espiniformes; una preapical, otra apical y dos en la parte media (Figura 18 E y Figura 19 C).

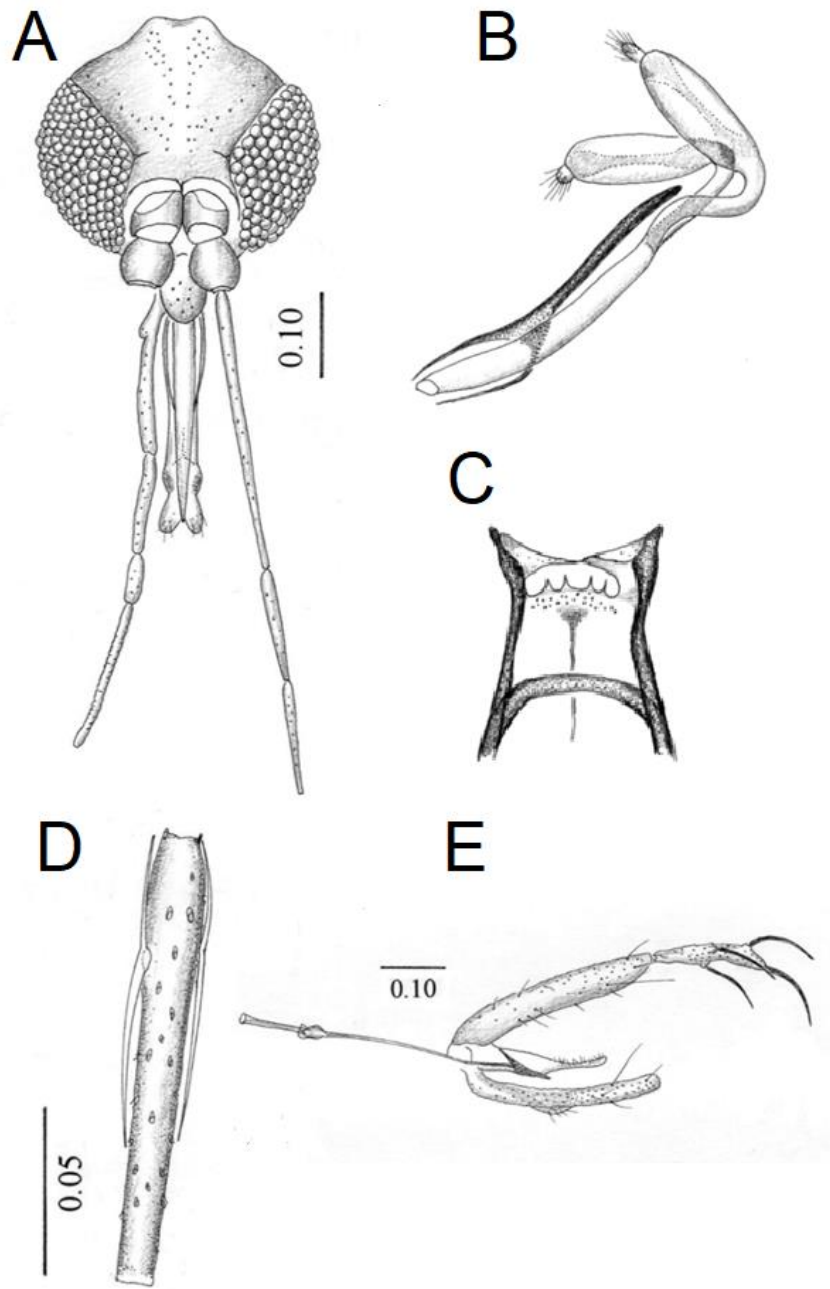


Figura 18. Clave ilustrada de *L. shannoni*. A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca, C al cibario, D muestra los ascoides con espolón proximal largo insertados a diferente nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito, el Gonoestilo y el conducto eyaculador. A, B, C, D y E adaptadas de Notes on the *Psychodidae* (Diptera) of Belize: Subfamilies *Bruchomyiinae* and *Phlebotominae* por Ibañez, 2001, *Entomological Society of America* 94(3) 367-385.

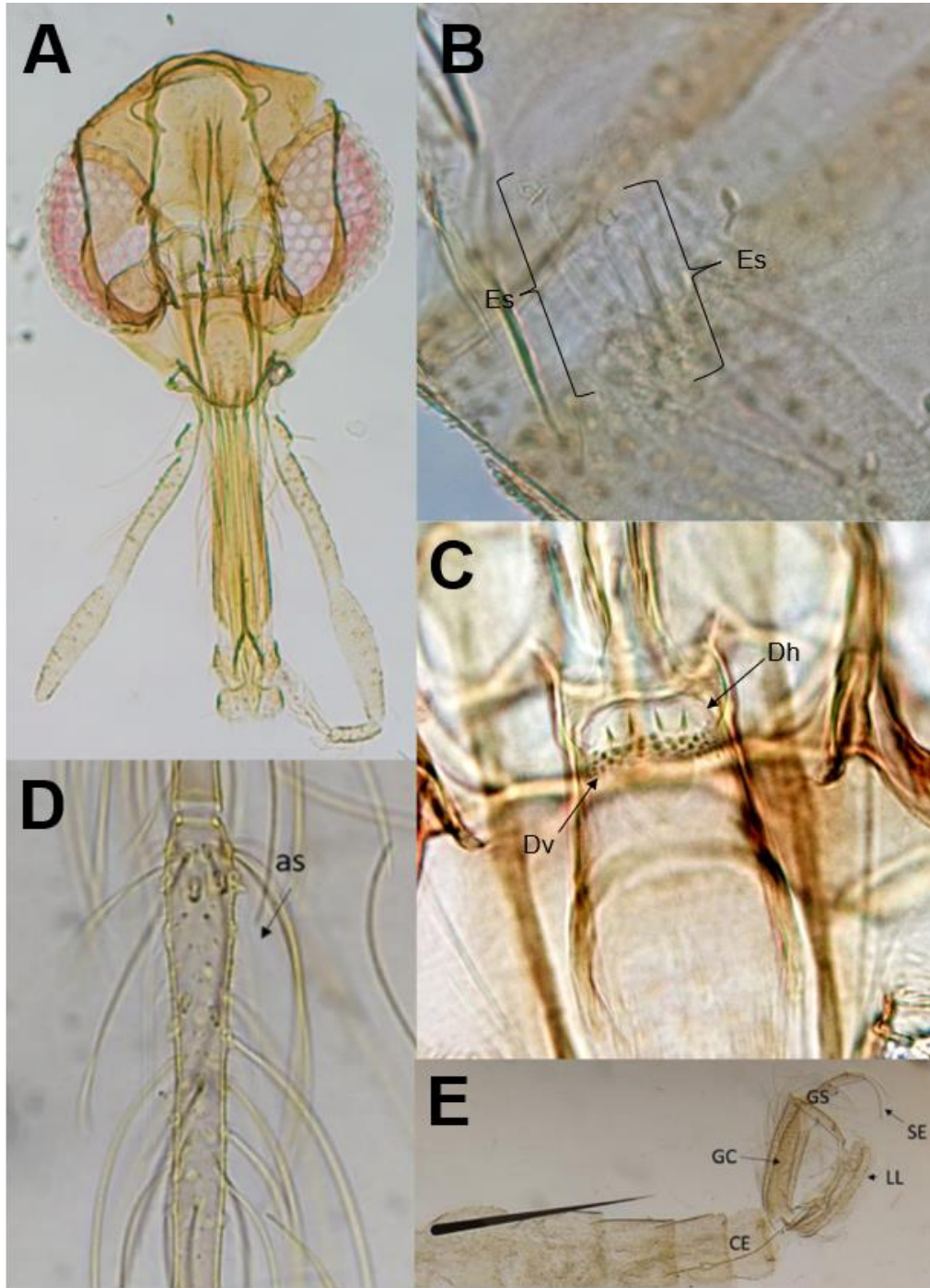


Figura 19. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de *Lutzomyia shannoni*. A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca (Es), C al cibario en donde se muestran los dientes horizontales (Dh) y los dientes verticales (Dv), D muestra los ascoides (As) con espolón proximal largo insertados a diferente nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito (GC), el Gonoestilo (GS); el cual presenta cuatro sedas espiniformes (SE): una apical, una preapical y dos en la parte media, el Lóbulo lateral (LL) y el conducto eyaculador (CE). A, B, D y E tomadas por la M en C Isabel Cristina Cañeda Guzmán.

7.1.4 *Lutzomyia panamensis*

Las claves taxonómicas existentes para *L. panamensis* describen el cibario con dientes verticales grandes y anchos, dispuestos en hileras longitudinales (Ibáñez, 2005b) así como la presencia de aproximadamente cuatro dientes horizontales agudos (Figura 20 C y Figura 21 C). Los ascoides son simples y están insertados a diferente nivel (Figura 20 D y Figura 21 D), al igual que *L. cruciata*. Por otra parte, para la genitalia femenina la espermateca se encuentra imbricada casi tan larga como el conducto espermatecal común, este último presenta la mitad basal no estriada y débil (Ibáñez, 2005b) (Ibáñez, 2001) (Figura 20 B y Figura 21 B). Con respecto a la genitalia masculina para el gonopodio se describe que presenta un parámero complejo con dos tubérculos dorso-basales con setas lanceoladas y porción distal delgada con dos setas fuertes una apical y otra preapical, aunado a esto el gonostilo presenta cuatro sedas espiniformes todas insertadas a diferente nivel (Ibáñez, 2001) (Young & Duncan, 1994) (Figura 20 E y Figura 21 E).

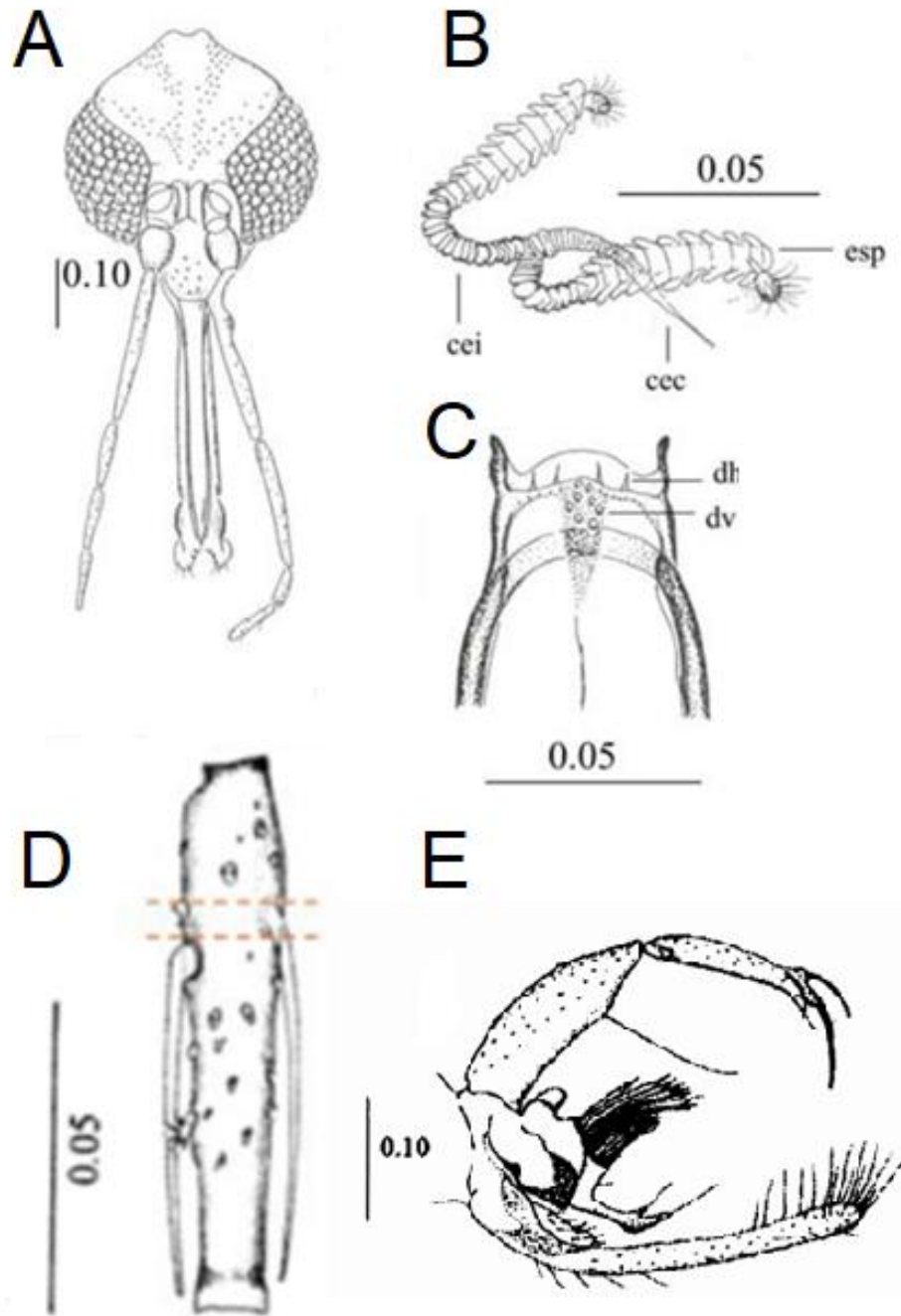


Figura 20. Clave ilustrada de *L. panamensis* A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca C al cibario, D muestra los ascoides simples insertados a diferente nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito y el Gonoestilo. A adaptada de Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las Hembras de *Lutzomyia franca* por Ibañez, 2005, *Folia Entomológica Mexicana* 44(1) 195-212, B y C adaptadas de Notes on the *Psychodidae* (Diptera) of Belize: Subfamilies *Bruchomyiinae* and *Phlebotominae* por Ibañez, 2001, *Entomological Society of America* 94(3) 367-385. D adaptada de Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, The west indies, central and south America (Diptera:Phycodidae) por Young & Duncan, 1994, *American Entomological Institute. Num. 54 pp. 607*. Y E adaptada de Phlebotominae (Diptera:Psychodidae) de México. V.-Clave ilustrada para la identificación de los machos de *Lutzomyia Franca* por Ibañez, 2005, *Folia entomológica mexicana* 44(1) 49-66

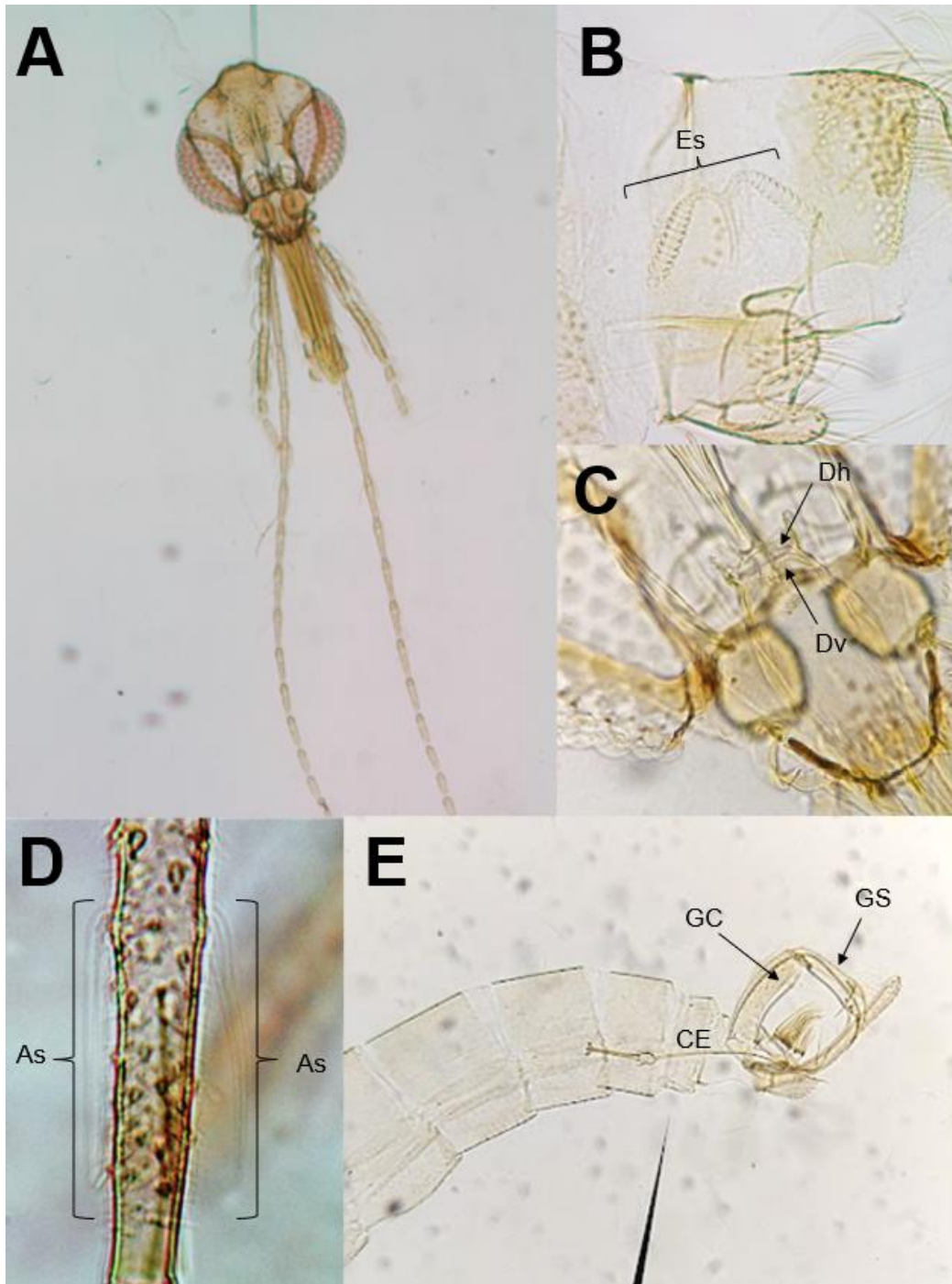


Figura 21. Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de *Lutzomyia panamensis* A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca (Es), C al cibario en donde se muestran los cuatro dientes horizontales (Dh) y los dientes verticales (Dv), D muestra los ascoides (As) simples insertados a diferente nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito (GC); el cual presenta un mechón basal, el Gonoestilo (GS); el cual presenta cuatro sedas espiniformes a diferente nivel, el parámero y el conducto eyaculador (CE) A y B tomadas por la M en C Isabel Cristina Cañeda Guzmán.

7.1.5 *Lutzomyia aclydifera*

Finalmente, para *L. aclydifera* las claves taxonómicas existentes describen que tiene un cibario con dos hileras transversales de dientes verticales finos (Ibáñez, 2005b) así como la presencia de 10-12 dientes horizontales puntiagudos (Figura 22 C y Figura 23 C, F), así mismo, los ascoides presentan un espolón proximal largo, insertados a diferente nivel, tal como también lo presenta *L. shannoni* (Figura 22 D y Figura 23 D). En cuanto a la genitalia femenina, la espermateca presenta alrededor de 10 anillos gruesos, anchos en la porción posterior y delgados en la anterior, por lo que se observa más o menos imbrincada como la espermateca de *L. panamensis*; presenta el capítulo con forma de mazo grande, conducto espermatecal común con una longitud aproximada a la de la espermateca y el conducto espermatecal individual es 1.5 veces la longitud de la espermateca (Ibáñez, 2005b) (Ibáñez, 2001) (Figura 22 B y Figura 23 B). Ahora bien, para la genitalia masculina se describe que el gonocoxito presenta dos mechones uno en la parte media y otra en la parte distal, además de que el primero presenta sedas modificadas. En la misma región se encuentra el parámero el cual presenta una gran cantidad de sedas modificadas que se originan de un tubérculo dorsal, por otra parte, para el gonostilo se describe sin seta delicada terminal, pero si presenta setas espiñoformes, el conducto eyaculador con ápice aguda y débilmente curvada (Ibáñez, 2001) (Ibáñez, 2005a) (Figura 22 E y Figura 23 E).

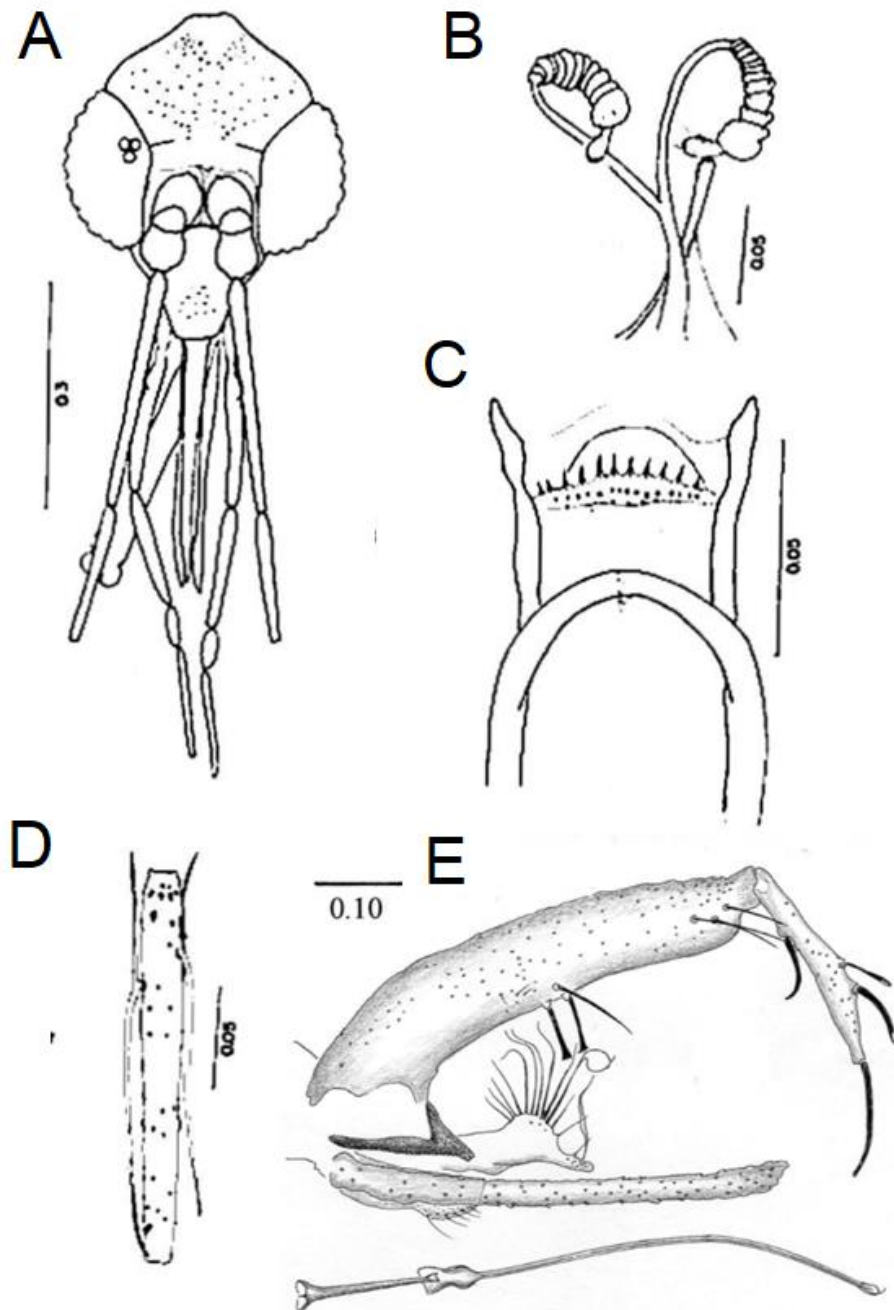


Figura 22. Clave ilustrada de *L. aclydifera* A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca, C al cibario, D muestra los ascoides con espolón proximal largo insertados a diferente nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito, el Gonoestilo y el conducto eyaculador. A, B, C y D adaptadas de Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, The west Indies, central and south America (Diptera:Phycodidae) por Young & Duncan, 1994, *American Entomological Institute. Num. 54 pp. 414* y E adaptada de Notes on the *Psychodidae* (Diptera) of Belize: Subfamilies *Bruchomyiinae* and *Phlebotominae* por Ibañez, 2001, *Entomological Society of America* 94(3) 367-385

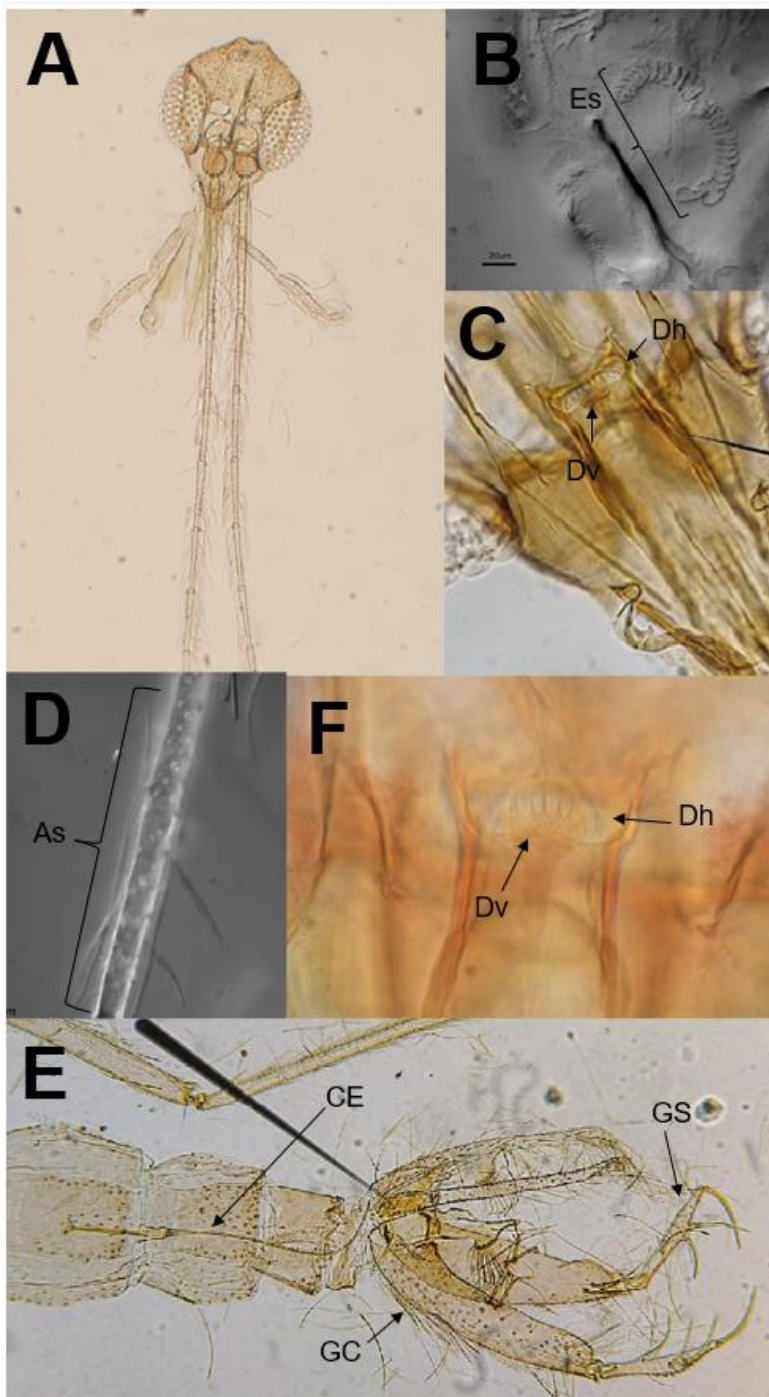


Figura 23 Estructuras relevantes para la clasificación taxonómica de *Lutzomyia aclydifera* A corresponde a la cabeza, B Genitalia femenina compuesta por la Espermateca (Es), C al cibario en donde se muestran de 10-12 dientes horizontales (Dh) y los dientes verticales (Dv) pequeños organizados en una hilera, D muestra los ascoides (As) con espolón proximal largo insertados a diferente nivel y E muestra la genitalia masculina compuesta por el Gonocoxito (GC); el cual presenta un mechón basal, el Gonostilo (GS); el cual presenta cuatro sedas modificadas en la parte media y otro grupo de 2-4 sedas simples, Lóbulo lateral, el parámetro y el conducto eyaculador (CE) C y F tomadas por la M en C Isabel Cristina Cañeda Guzmán.

7.2 Extracto crudo de *Cleoserrata serrata*

7.2.1 Rendimiento de la preparación del extracto.

Después de la caracterización taxonómica de la especie vegetal recolectada en los Tuxtlas Veracruz, correspondiente a *C. serrata*, se eliminaron los materiales extraños y las hojas se secaron a temperatura ambiente, obteniendo un total de 500 g. Estas hojas se pulverizaron y se maceraron con MeOH por una semana repitiendo este proceso tres veces.

Finalmente se evaporó el disolvente con ayuda de un Rotavapor teniendo un rendimiento del 10.8% con respecto a las hojas secas. Como se muestra en la Tabla 4.

| <i>Especie vegetal</i> | <i>Peso de hojas secas (g)</i> | <i>Peso del extracto (g)</i> | <i>% Rendimiento con respecto a las hojas secas</i> |
|------------------------|--------------------------------|------------------------------|---|
| <i>C. serrata</i> | 500 | 54 | 10.8 |

Tabla 4. Rendimiento del extracto de *C. serrata*.

7.2.2 Determinación de flavonoides totales por el método Kumazawa.

Para determinar la concentración de flavonoides totales en el extracto de *C. serrata*, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Quercetina ($r=0.9912$) (Figura 24).

En esta determinación, la muestra M1 de *C. serrata* tuvo una absorbancia promedio de 1.412 ± 0.027 , la cual después de emplear la ecuación de la recta obtenida con la curva de calibración de quercetina (Figura 24), la muestra M1 mostró tener una concentración de 0.074 ± 0.001 mg/mL equivalentes a quercetina, posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la concentración de flavonoides equivalentes a quercetina en un gramo de extracto crudo de *C. serrata* la cual fue de 29.67 ± 0.54 mg equivalentes de quercetina (Tabla 5).

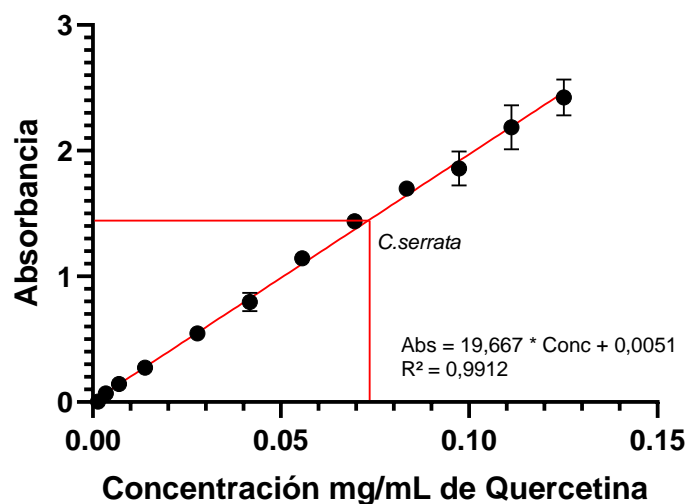


Figura 24. Curva de calibración de Quercetina para la determinación de flavonoides totales en la muestra de *C. serrata*. Nota. Para determinar la concentración de la muestra se utilizó $Concentración = \frac{Absorbancia - 0,0051}{19,667}$

7.2.3 Determinación del contenido de fenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu.

Para determinar la concentración de fenoles totales en el extracto de *C. serrata*, se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico ($r=0.9902$) (Figura 25).

En esta determinación, la muestra M1 de *C. serrata*, tuvo una absorbancia promedio de 0.290 ± 0.008 , la cual después de emplear la ecuación de la recta obtenida con la curva de calibración de ácido gálico (Figura 25), la disolución mostró tener una concentración de 0.087 ± 0.001 mg/mL equivalentes a ácido gálico, posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la concentración de fenoles equivalentes a ácido gálico en un gramo de extracto crudo de *C. serrata* la cual fue de 39.99 ± 0.58 mg equivalentes de ácido gálico (Tabla 5).

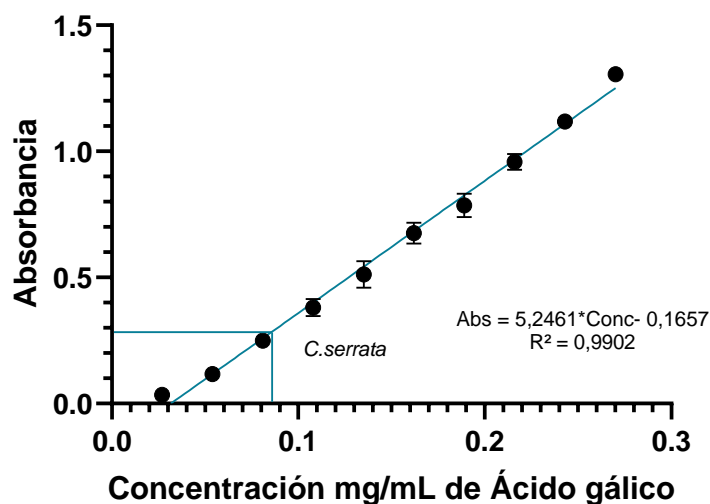


Figura 25. Curva de calibración de Ácido gálico para la determinación de fenoles totales en la muestra de *C. serrata*. Nota. Para determinar la concentración de la muestra se utilizó $Concentración = \frac{Absorbancia + 0.1657}{5.2461}$

7.2.4 Determinación de la capacidad antioxidante del 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH[•])

Para determinar la capacidad antioxidante equivalente a Trolox del extracto de *C. serrata*, mediante la actividad inhibitoria del DPPH[•] se realizó una curva de calibración con diferentes concentraciones de Trolox ($r=0.995$) (Figura 26).

En esta determinación, la muestra M1 de *C. serrata* tuvo una absorbancia promedio de 0.333 ± 0.002 , la cual después de emplear la ecuación de la recta obtenida con la curva de calibración de Trolox (Figura 26), la disolución mostró tener una concentración de 60.56 ± 0.30 mg/mL equivalentes a Trolox, posteriormente se realizaron los cálculos para determinar la concentración de antioxidantes equivalentes a Trolox presentes en un gramo del extracto crudo de *C. serrata*, la cual fue de $24,418.16 \pm 121.25$ mM equivalentes a Trolox (Tabla 5).

Con los datos obtenidos de la curva de calibración anterior (Figura 26) se procedió a determinar el porcentaje de la capacidad antioxidante en el extracto de *C. serrata*, mediante la actividad inhibitoria del DPPH[•] por lo que se realizó una curva de calibración ($r=0.995$) (Figura 27).

Y al interpolar el valor de la concentración obtenida con la curva de calibración de Trolox (Figura 26) con la ecuación de la curva de calibración del porcentaje de actividad antioxidante (Figura 27) se obtiene un valor de 52.51 ± 0.25 % de actividad antioxidante con respecto a Trolox (Tabla 5).

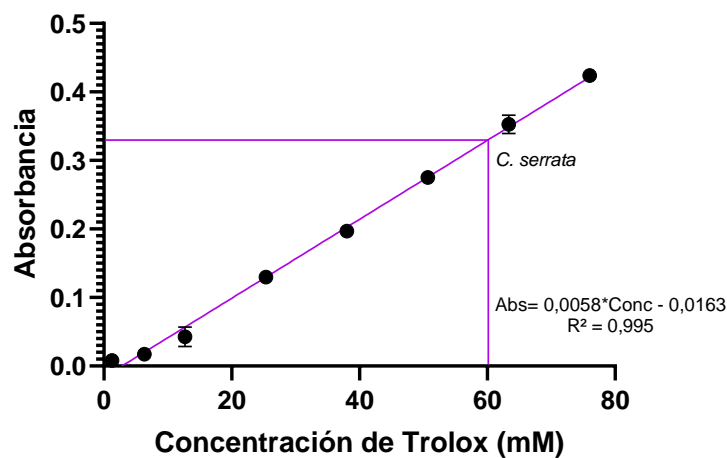


Figura 26. Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante en la muestra de *C. serrata*.

Nota. Para determinar la concentración de la muestra se utilizó $Concentración = \frac{Absorbancia + 0,0163}{0,0058}$

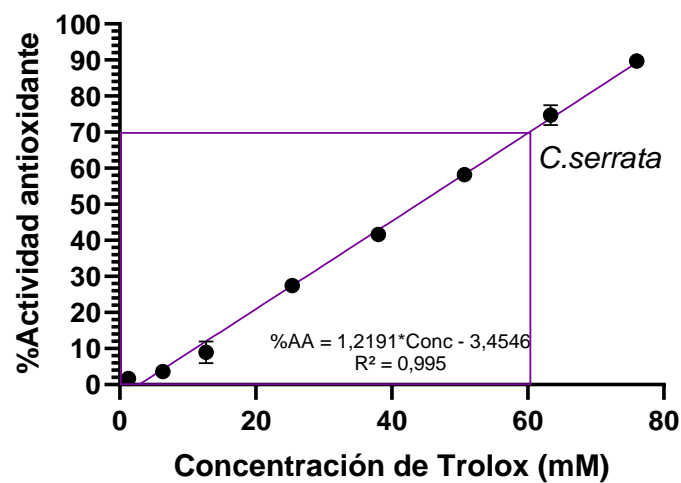


Figura 27. Curva de calibración del porcentaje de actividad antioxidante en la muestra de *C. serrata* con respecto a la concentración de Trolox. Nota. Para determinar el porcentaje de actividad antioxidante de la muestra se utilizó $\%Actividad\ antioxidante = 1.2191 * Concentración - 3.4546$

| Prueba | Gramos de extracto | Resultado | |
|------------------------|--------------------|--|---------------------------------------|
| Flavonoides totales | 1 | 29.67 ± 0.54 mg equivalentes de quercetina | |
| Fenoles totales | 1 | 39.99 ± 0.58 mg equivalentes de Ácido gálico | |
| Capacidad antioxidante | 1 | 24418.16 ± 121.25 mM equivalentes a Trolox | 52.51 ± 0.25 % Actividad antioxidante |

Tabla 5. Resultados obtenidos al realizar la determinación del contenido de flavonoides, fenoles totales y capacidad antioxidante del extracto crudo de *C. serrata*.

7.3 Rendimiento del extracto después de hacer la partición con n-Hexano y Metanol.

Del extracto metanólico crudo de *C. serrata*, obtenido después del proceso de maceración, se tomaron 18.3970 g los cuales se fraccionaron mediante un proceso de partición ente MeOH acuoso (90%; 50 mL) y n{hexano (100 mL). Los rendimientos de las fracciones orgánica y acuosa se resumen en la tabla 6.

| Fase | Peso (gramos) | Porcentaje de rendimiento |
|--------------------------------|---------------|---------------------------|
| Extracto antes de la partición | 18.3970 | - |
| Orgánica | 3.0300 | 16.47 |
| Acuosa | 15.3578 | 83.48 |

Tabla 6. Rendimiento del extracto; fase acuosa y fase orgánica.

7.4 Identificación de componentes de la fase orgánica del extracto.

El objetivo de usar n-hexano como fase orgánica fue extraer aquellos compuestos menos polares o no polares como triglicéridos, fitoesteroles, y fosfolípidos, aunado a que usualmente este tipo de fracciones contiene grandes concentraciones de clorofila y/o ceras (Levente, 2005).

En algunas especies de la familia *Cleomaceae* como *C. scaposa* y *C. brachycarpa* (Abbasi et. al., 2017) (Kasem et. al. 2016), se ha encontrado Ácido ursólico como metabolito secundario. El ácido ursólico es un compuesto triterpénico pentacíclico, de baja polaridad, que podría encontrarse en la fase orgánica (Mlala, et. al., 2019). Con base en estas consideraciones se realizó una CCF para identificar su presencia en *C. serrata*, para ello, se utilizó como fase móvil una mezcla de n-hexano, CH₂Cl₂ y AcOEt (1:1:1). Las manchas observadas tanto en la muestra como en la referencia corresponden en color, intensidad y R_f idéntico. Con base en los resultados

obtenidos es posible concluir que el ácido ursólico está presente en la especie *C. serrata* (Tabla 7) (Figura 28).

En la Figura 28 se observan adicionalmente dos compuestos; uno de ellos podría ser el ácido oleanólico un isómero del ácido ursólico el cual generalmente se encuentra presente junto con el ácido ursólico (Gudoityte, et. al., 2021). Sin embargo, para confirmar este supuesto se deben realizar análisis espectroscópicos y espectrométricos comparativos con ER.

| Muestra | Rf |
|------------------------------|------|
| Referencia de Ácido ursólico | 0.54 |
| Muestra Fase orgánica | 0.55 |

Tabla 7. Resultados de la cromatografía en capa fina.



Figura 28. Cromatografía en capa fina (a) corresponde a la Fase orgánica del extracto de *C. serrata* y (b) a la referencia de ácido ursólico.

7.5 Identificación de componentes de la fase acuosa del extracto.

La Rutina es un compuesto fenólico perteneciente al grupo de glucósidos flavonoides; este compuesto está presente en muchas plantas y juega un papel importante en la protección de las plantas contra la radiación ultravioleta o los patógenos. (Kianersi et. al., 2020). En especies como *C. spinosa* se ha identificado

mediante RMN la presencia de este glucósido (Bezerra et. al., 2019) también se ha identificado en *C.gynandra* (Chand et. al., 2022).

Para confirmar la posible presencia de rutina en la fase acuosa, se realizó una CCF. El sistema de elución que permitió la mejor resolución del extracto consistió en una mezcla de AcOEt, Piridina, H₂O y MeOH (80:20:10:5) (Figura 29).

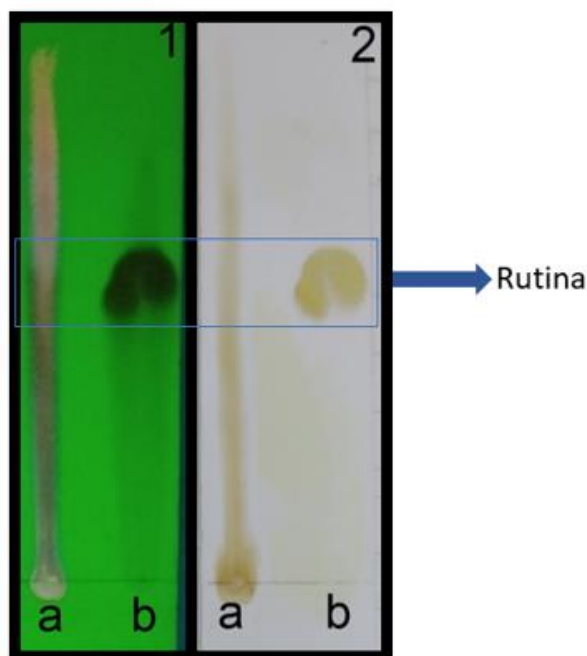


Figura 29. Comatografía en capa fina de la fase acuosa. (1) $\lambda=302$ a)es la Fase acuosa y b) es la rutina. (2) Revelado con sulfato cérico amoniacal a)es la fase acuosa y b) es la rutina.

7.5.1 Muestra tratada con Amberlita XAD16N.

Para disminuir la complejidad del extracto (Figura 29) y eliminar las interferencias que afectaban la identificación de la rutina se decidió tratar la fase acuosa con una resina llamada Amberlita XAD16N.

La Amberlita es una resina de intercambio catiónico, usada para extraer polifenoles presentes en muestras vegetales (Neggad et. al., 2021) (Alvarez et. al., 2009). Químicamente es poliaromática hidrofóbica, con una superficie de área de 900 m² /g, un tamaño de poro de 10 nm y un tamaño de partícula de 0.3-1.2 mm (Seif, et. al., 2022).

Para su elución se decidió utilizar diferentes proporciones de MeOH-H₂O; el proceso generó 7 eluatos (b-h) que fueron analizados cromatográficamente para reunir aquellos que mostraron similitud cromatográfica (Figura 30). En las fracciones b-f

se observó la mayor proporción de rutina cuando se visualizó la placa a 302 nm (Figura 31). Como se observa en la Figura 32, la fracción eluída Con MeOH al 10% mostró la mayor concentración de rutina junto con el de menor número de constituyentes. Sin embargo, no fue posible realizar la separación y purificación de los tres constituyentes observados debido a la poca cantidad de muestra. Con base en estos hallazgos es posible concluir que el extracto de *C. serrata* contiene rutina entre sus componentes mayoritarios.

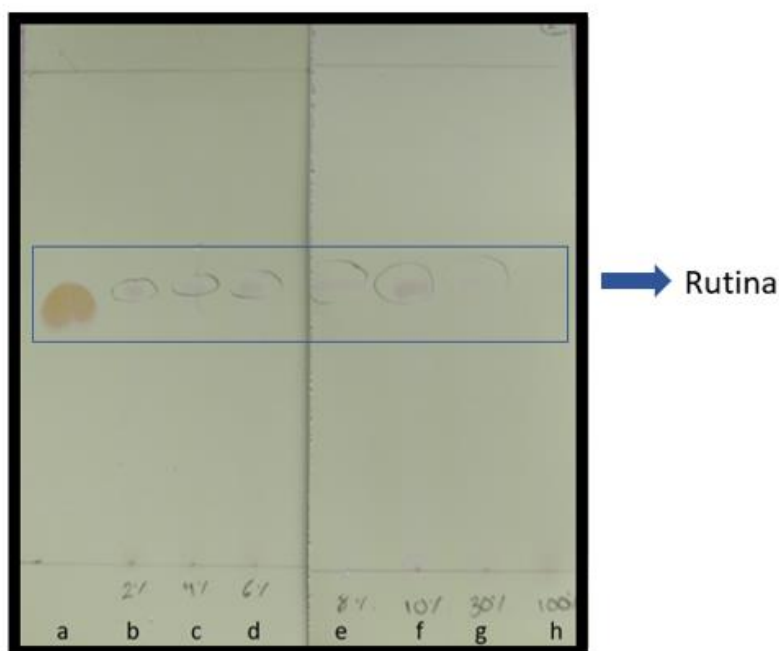


Figura 30. Cromatofolio revelado con Sulfato cérico amoniacal. (a) rutina (b) MeOH 2% (c) MeOH 4% (d) MeOH 6% (e) MeOH 8% (f) MeOH 10% (g) MeOH 30% (h) MeOH 100%

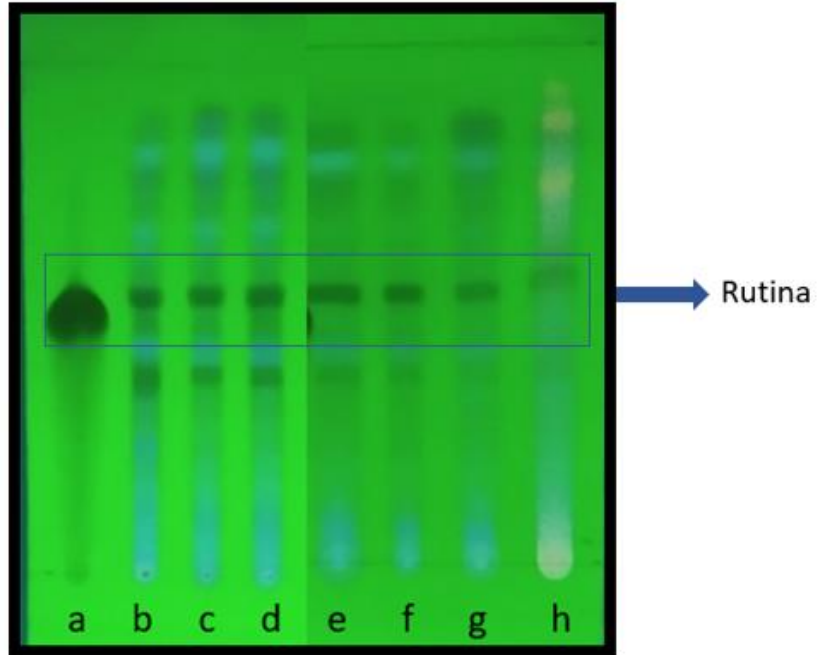


Figura 31. Cromatofolio observado a $\lambda=302$ (a) rutina (b) MeOH 2% (c) MeOH 4% (d) MeOH 6% (e) MeOH 8% (f) MeOH 10% (g) MeOH 30% (h) MeOH 100%

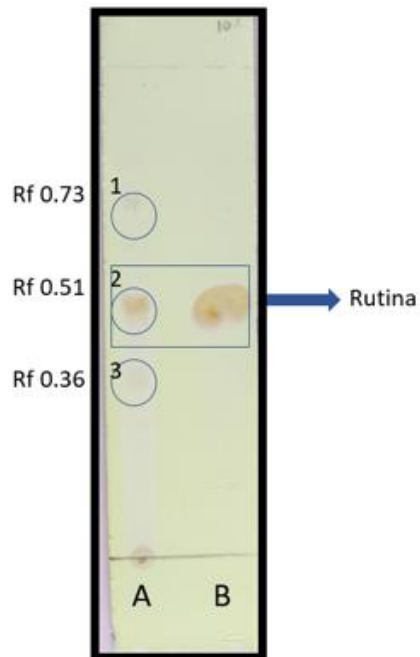


Figura 32. Cromatofolio perteneciente a la fracción 10% MeOH-H₂O. A Fracción 10% MeOH-H₂O donde (1) Compuesto 1 (2) rutina (3) compuesto 2. B rutina.

7.6 Efecto de la Rutina sobre el crecimiento y viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*.

La evaluación de la Rutina se realizó *in vitro* en promastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC, en el cual se incubaron 2×10^6 promastigotes por 120 h con diferentes concentraciones de rutina (0.78 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), posteriormente la viabilidad se estableció contando los promastigotes cada 24 h en una cámara Neubauer.

La figura 33 muestra el número de promastigotes viables que se contaron cada 24h durante 5 días en las diferentes concentraciones de rutina, además de tener un control negativo.

Se realizó la cinética de crecimiento de *L. mexicana* en presencia o ausencia de rutina a diferentes concentraciones de 0.78 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en estos resultados se puede observar un efecto dosis dependiente (Figura 33), a las 24 y 48 horas el efecto que ejerce la rutina sobre la viabilidad de los promastigotes no es estadísticamente significativo en relación con los parásitos sin tratamiento (Figura 34 A y B). Interesantemente de las 72 a las 120 horas la rutina a las concentraciones de 25 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ muestran una reducción significativa sobre la viabilidad de los promastigotes con respecto al control (Figura 34 C, D y E). Para el cálculo de la CI_{50} se tomaron los datos a las 72 y 96 horas.

La CI_{50} es una medida que indica la concentración a la cual un fármaco es capaz de inhibir un proceso biológico en un 50% (Aykul et. al., 2016), enfocado en el presente estudio, la Rutina presenta una CI_{50} de $9.41 \pm 1.09 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $10.50 \pm 1.17 \mu\text{g}/\text{mL}$ para 72 y 96 hrs respectivamente (Figura 35).

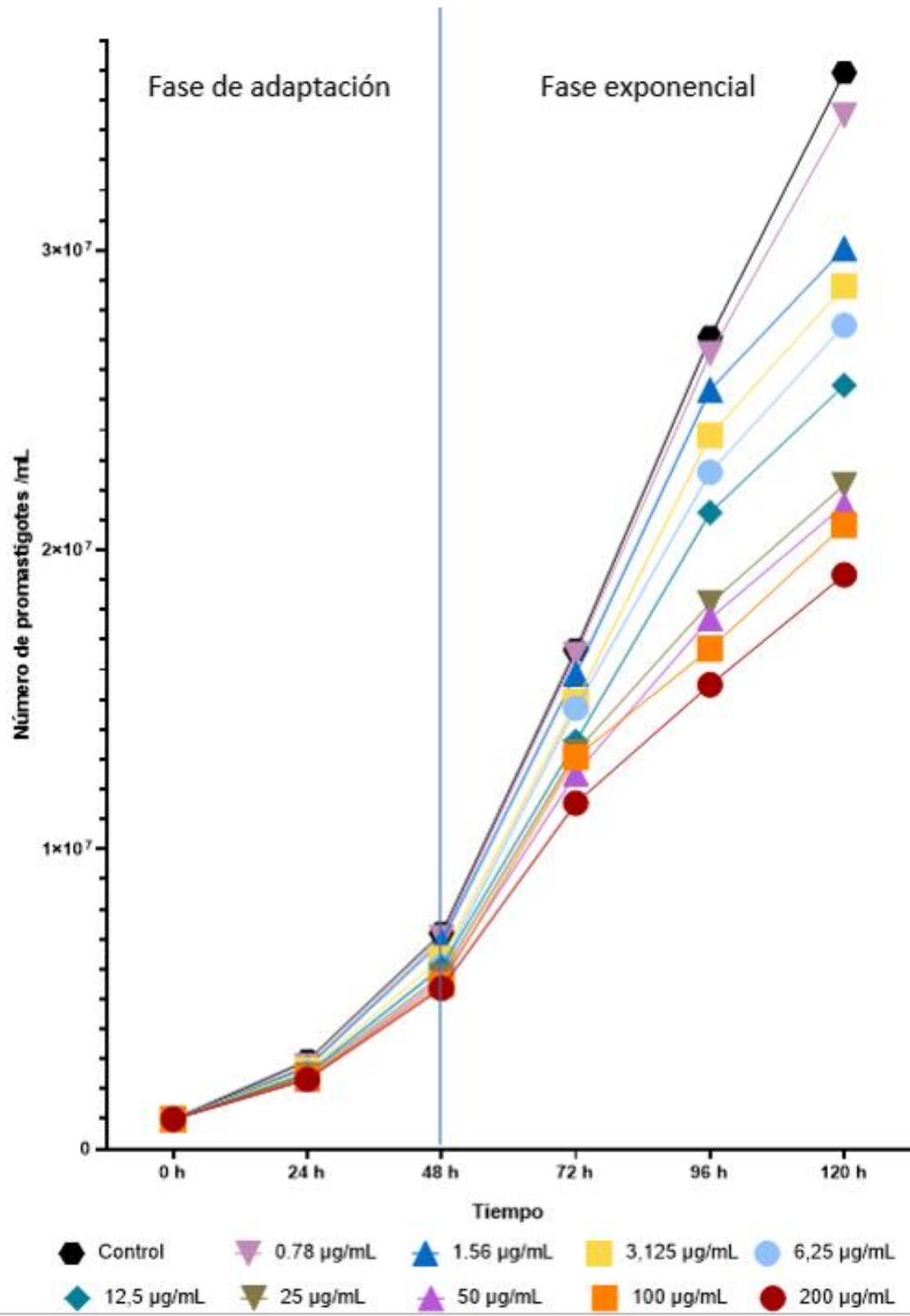
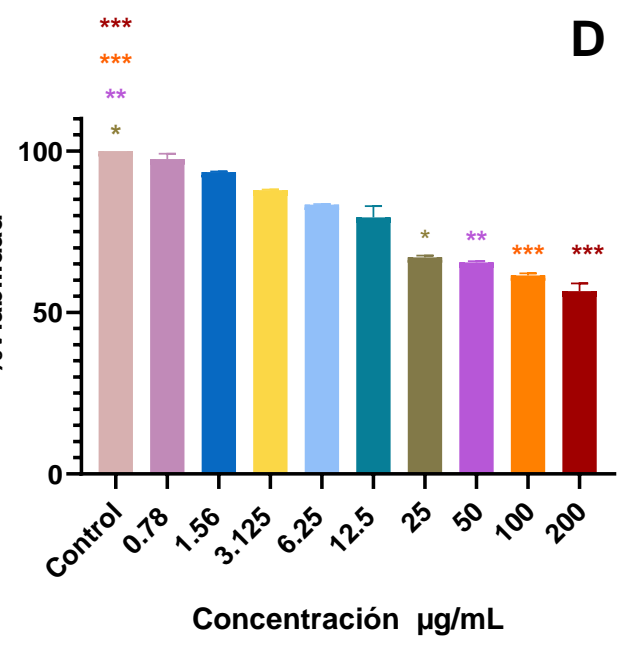
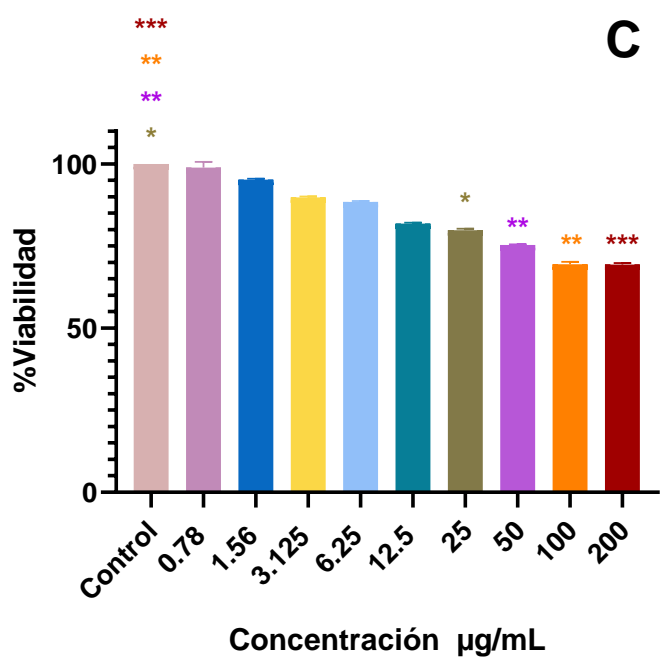
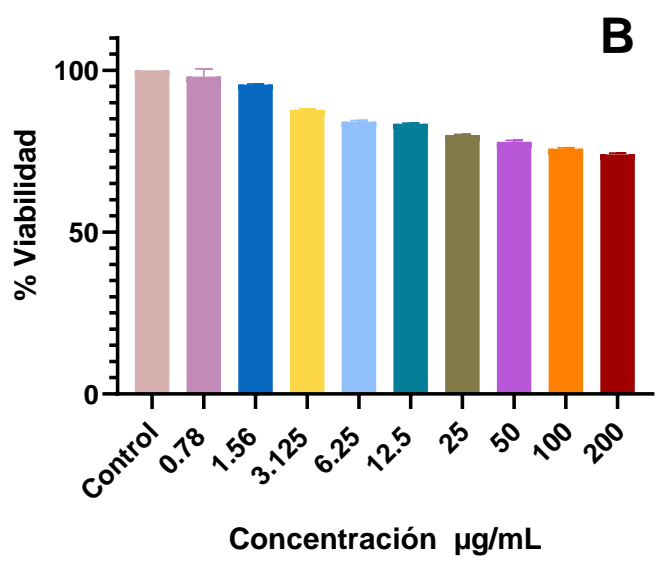
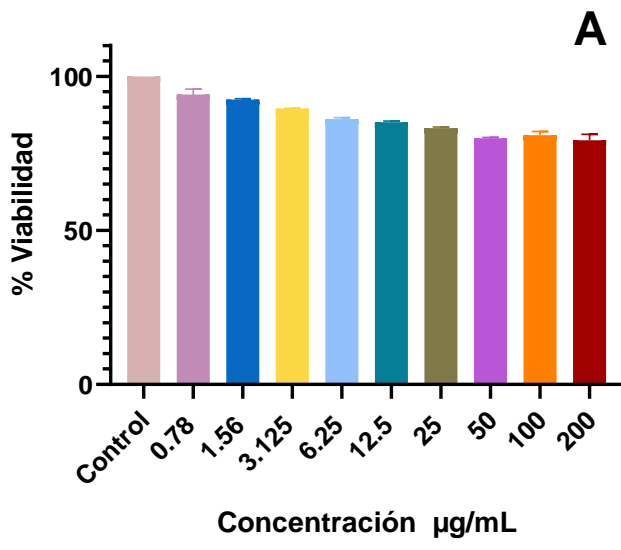


Figura 33. Curva de crecimiento de promastigotes *L. mexicana* incubados a diferentes concentraciones de rutina por 120 horas.



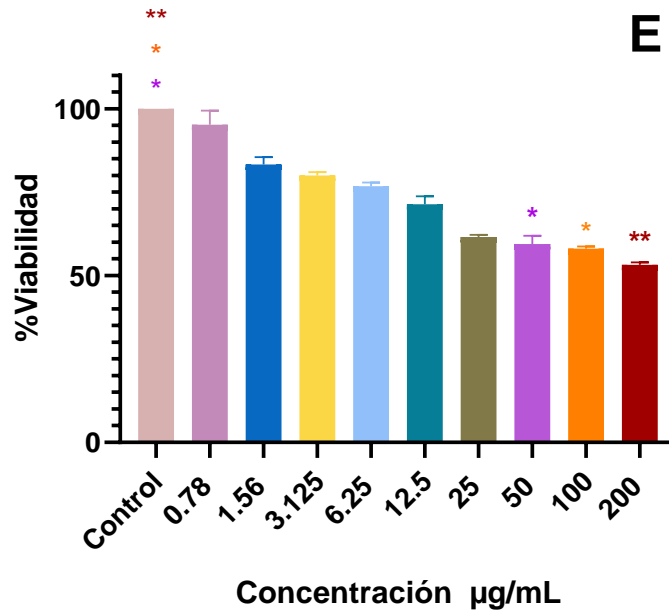


Figura 35. Porcentaje de Viabilidad de promastigotes *L. mexicana* incubados a diferentes concentraciones de Rutina por 120 horas. A pertenece a las 24 h, B a las 48 h, C a las 72 h, D a las 96 h y E a las 120h. Los datos representan el promedio \pm SD de 4 experimentos independientes. El símbolo * representa que los datos son estadísticamente significativos ($p \leq 0.05$) con respecto al control.

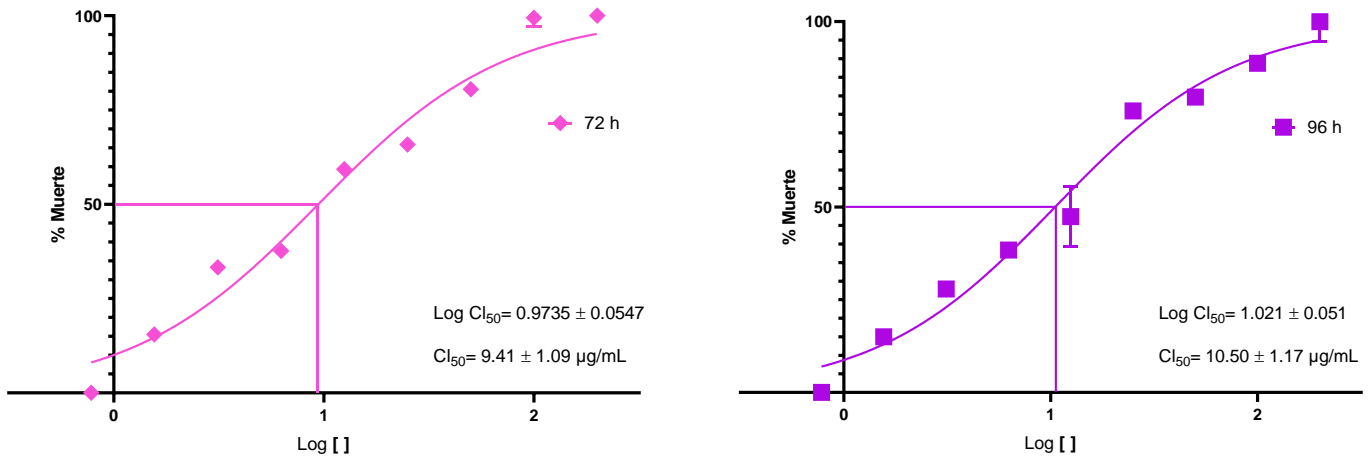


Figura 35. Determinación de la CI_{50} en los ensayos *in vitro* utilizando *L. mexicana*. Nota Las curvas representan el porcentaje de muerte de los promastigotes contra el logaritmo de la concentración de rutina.

8. DISCUSIÓN

La Leishmaniasis es una enfermedad zoonótica y antroponótica que puede comprometer piel, mucosas y vísceras, es causada por protozoarios de la familia *Trypanosomatidae*, del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos a través de la picadura de un flebótomo hembra de la familia *Psychodidae* (Kasper et. al., 2012) (Torres et. al., 2017)(CDC, 2022) (Palma et. al., 2021)

En el continente americano, el género del flebótomo responsable de la transmisión del parásito de *Leishmania* es *Lutzomyia*, siendo así que se han descrito 535 especies de flebótomos y de éstas 45 son vectores de *Leishmania* (Gómez & Zapata, 2022).

Ahora bien, en México se han descrito un total aproximado de 44 especies de flebótomos (Mikery et. al., 2012) de los cuales, de acuerdo con el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, 11 son responsables de la transmisión del parásito que causa la leishmaniasis las cuales son; *L. olmeca olmeca*, *L. cruciata*, *L. panamensis*, *L. shannoni*, *L. diabolica*, *L. anthophora*, *L. gomezi*, *L. ovallesi*, *L. ylephiletor*, *L. longipalpis* y *L. evansi* (CENAPRECE, 2015).

Estas especies de flebótomos son únicas y complejas, debido a que pueden compartir o diferir en aspectos como la reproducción, la alimentación, dispersión y comportamiento que influyen directamente en la epidemiología de la leishmaniasis (CENAPRECE, 2015), es por ello que no se debe dejar a un lado su estudio, pues los estudios entomológicos son necesarios para determinar las acciones a realizar como medidas preventivas y de control (CENAPRECE, 2015). Una manera de contribuir al estudio entomológico es justamente identificar las especies presentes en determinadas áreas geográficas, es por ello que se hizo la revisión, síntesis y unificación de las claves taxonómicas ya existentes para cinco especies presentes en México; *L. olmeca olmeca*, *L. cruciata*, *L. shannoni*, *L. panamensis* y *L. aclydifera*, de las cuales, las primeras cuatro son vectores incriminados en la transmisión del parásito *Leishmania* (CENAPRECE, 2015).

Los ejemplares utilizados en el presente estudio primero fueron sometidos a un proceso de aclaración y montaje, tal como lo describe Ibañez (Ibañez, 1999),

posteriormente la clasificación se basó en los caracteres morfológicos; como el cibario, ascoides, espermateca y gonopodio (Sierra et. al., 2000).

Para realizar la clasificación taxonómica de forma más rápida y eficaz, la primera estructura que propongo se debe revisar es la genitalia de ambos géneros; espermateca (hembras) y gonopodio (machos).

La espermateca es un órgano ectodérmico responsable de recibir, mantener y liberar esperma para fertilizar los óvulos (Pascini & Martins, 2017), esta se encuentra en la parte terminal del abdomen, sus características morfológicas cambian entre cada una de las especies de *Lutzomyia* es por ello que es utilizado para la clasificación taxonómica. De las especies revisadas las únicas espermatecas que podrían ser confundidas debido a su similitud son las de *L. panamensis* y *L. aclydifera* por lo que para estas especies se deberá revisar otro carácter morfológico para discriminar mejor la especie a la que corresponde el ejemplar, mientras que para las otras especies es suficiente con revisar esta estructura.

Por otra parte, el gonopodio es una estructura presente en los machos cuya función es la transferencia de esperma durante la cópula (Angus et. al., 2001). La región terminal de esta estructura se llama gonostilo, el cual para las cinco especies revisadas es similar pues cuentan con cuatro sedas espiniformes por lo que no es adecuada para discriminar entre especies. Por el contrario, la región del gonocoxito sí es diferente entre cada una de estas especies comenzando con que *L. olmeca olmeca*, *L. shannoni* y *L. panamensis* no presentan un mechón de sedas en esta región a comparación con *L. cruciata* y *L. aclydifera*.

Para discernir entre *L. olmeca olmeca*, *L. shannoni* y *L. panamensis*, se debe revisar el Parámero, el cual para las dos primeras especies es simple pero para *L. panamensis* es diferente, pues presenta dos tubérculos dorso-basales con setas lanceoladas y la porción distal con dos setas fuertes una apical y otra preapical (Ibáñez, 2001) (Figura 21 E), por último para discernir entre *L. olmeca olmeca* y *L. shannoni* se debe revisar otro carácter morfológico debido a la similitud de estos.

Ahora bien, para discernir entre los machos de *L. cruciata* y *L. aclydifera*, debemos enfocarnos en la región del Parámetro ya que *L. aclydifera* presenta un tubérculo dorsal con una gran cantidad de sedas modificadas (Ibáñez, 2001) , mientras que *L. cruciata* no presenta este tubérculo siendo así fácilmente diferenciados.

Una vez revisadas las genitalias, el siguiente carácter morfológico que sugiero revisar son los ascoides, éstos son estructuras que están insertadas en pares en cada flagelómero presente en las antenas (Ilango, 2000) , por lo que para diferenciar entre las hembras de *L. panamensis* y *L. aclydifera* basta con revisar esta estructura ya que la primera de éstas presenta ascoides simples insertados a diferente nivel y para *L. aclydifera* presenta ascoides con espolón proximal largo insertados a diferente nivel siendo así fácilmente diferenciados.

Y por otra parte para diferenciar a los machos de *L. olmeca olmeca* y *L. shannoni*, también basta con revisar los ascoides, pues la diferencia es que *L. olmeca olmeca* tiene ascoides simples insertados al mismo nivel y los de *L. shannoni* presentan espolón proximal largo insertado a diferente lugar.

Finalmente, el carácter morfológico del cibario, sugiero revisarlo en caso de que no se tenga alguno de los caracteres morfológicos anteriormente mencionados debido a que por su ubicación y el proceso de aclaramiento en muchas ocasiones los dientes no son visibles, imposibilitando así la clasificación correcta de los ejemplares.

Adicionalmente, estos flebotomos se encuentran en zonas selváticas o bosques tropicales (CENAPRECE, 2015), las cuales corresponden a regiones rurales, por lo que la incidencia de casos de leishmaniasis se presenta en estas zonas complicando el acceso a los servicios de salud, es por ello que en estas comunidades el uso de la medicina tradicional a base de plantas es un uso común para tratar diferentes enfermedades de las cuales la leishmaniasis no es la excepción. Entre las plantas utilizadas en el tratamiento contra la leishmaniasis se encuentra *Cleoserrata serrata* la cual fue descrita por Alamilla y colaboradores en el artículo *Leishmania mexicana* cell death archived by *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis Learning from Maya healers. En este artículo mencionan que los

curanderos mayas de la región de La Chontalpa recolectan la planta de *Cleoserrata serrata*, cuyas hojas son lavadas, secadas al sol y tostadas en un comal de barro para posteriormente aplicarla sobre las úlceras de leishmania previamente lavadas con agua y jabón, cubriéndolas con vaselina, repitiendo el proceso durante 5-10 días, obteniendo resultados satisfactorios (Alamilla et. al., 2018).

Por lo que en el presente estudio se hizo el estudio fitoquímico del extracto metanólico de *C. serrata* obteniendo de primera instancia que el extracto crudo contenía flavonoides y fenoles tal como lo muestra Alamilla y colaboradores (Alamilla et. al., 2018) en las proporciones; 29.67 ± 0.54 mg equivalentes de quercetina por gramo de extracto y 39.99 ± 0.58 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto, respectivamente, los cuales impactan directamente en el resultado de la capacidad antioxidante (52.51 ± 0.25 % Actividad antioxidante con respecto a Trolox) esto se debe a que los compuestos fenólicos comprenden un grupo de moléculas como; ácidos fenólicos, taninos, ligninas y flavonoides. Estos últimos son de interés en área farmacológica debido a su diversidad estructural, pues muchos de ellos tienen mecanismos antioxidantes que pueden ser mediados por reacciones de óxido-reducción o por captación de radicales libres (Hernandez, et. al., 2022).

Posteriormente, de la fracción orgánica (n-hexano) del extracto de *C. serrata* se identificó por medio de la cromatografía en capa fina, la presencia de Ácido ursólico; un compuesto triterpénico pentacíclico (Mlala, et. al., 2019) también identificado en la especie *C. brachycarpa* (Singh et. al., 2018). En este estudio se describe por primera vez la presencia de ácido ursólico en *C. serrata*, debido a que sólo se ha reportado Fitol, un alcohol diterpénico en las partes aéreas de la planta, por medio de una cromatografía de gases (Singh et. al., 2018) (NcNeil et. al., 2012).

Por otro lado, para la fracción acuosa (MeOH), se realizó el tratamiento con Amberlita XAD16N, una resina reticulada hidrofóbica no iónica (DuPont™ 2020) usada para la recuperación de flavonoides de extractos de plantas ricos en compuestos polares y azúcares (Tomás et. al., 1992) del mismo modo, está

resina ya ha sido utilizada obteniendo resultados satisfactorios para la extracción de flavonoides como rutina, naringenina, quercetina, y tangeretina, tal como lo presentó Tomás y colaboradores (1992) y Bretag y colaboradores (2009). Finalmente, de la muestra tratada con Amberlita XAD16N se identificó Rutina por el método cromatográfico en capa fina usando como fase móvil AcOEt, Piridina, H₂O y MeOH (80:20:10:5) tal como lo recomienda Juszczak y colaboradores (2019) para glucósidos flavonoides.

Debido a que la rutina, ha demostrado tener efectos farmacológicos relevantes (anticancerígena, antioxidante, citoprotectora, antiinflamatoria, antiplaquetaria, antitrombótica, vasoprotectora, cardioprotectora, neuroprotectora, antimicrobiana, antitumoral, antiasmática, antifúngica, antimicótica, antipalúdica, etc (Chua, 2013) (Gegotek et al., 2017) (Ganeshpurkar & Saluja, 2017) (Prasad & Prasad, 2019) y que se encuentra de forma comercial, se probó en promastigotes de *L. mexicana*, una de las tres especies de *Leishmania* que se han reportado en México, además de ser la especie causal más frecuente de leishmaniasis cutánea (CENAPRECE, 2015), teniendo como resultado que la rutina mostró tener efecto leishmanicida dosis dependiente, cuyas CI₅₀ fueron de $9.41 \pm 1.09 \mu\text{g/mL}$ a las 72 horas y $10.50 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$ a las 96 h, relacionado a esto, un estudio reportado por Chauhan y colaboradores en el 2018, probaron de igual manera rutina pero sobre promastigotes de *L. donovani* (agente causal de leishmaniasis visceral) sensibles al estibogluconato de sodio, utilizando una metodología similar, obtuvieron un valor de CI₅₀ de $12.64 \pm 0.86 \mu\text{g/mL}$ a las 72h, lo que nos lleva a pensar que los valores no son tan diferentes, considerando que son reactivos, condiciones y especies diferentes, a diferencia de otro estudio realizado por Kahvecioğlu & Canım en el 2022 donde también probaron de forma *in vitro* la rutina contra promastigotes de *L. infantum* (agente causal de la Leishmaniasis visceral) reportando una CI₅₀ de $29.2 \pm 4.5 \mu\text{g/mL}$ a las 48 horas, siendo así un poco más del doble de la CI₅₀ que yo reporto para *L. mexicana* y lo que Chaun y colaboradores reportaron para *L. donovani* a las 72 h. A pesar de esto, los valores de CI₅₀ reportados para Rutina en estas tres diferentes especies son bajos, demostrando que son eficaces contra el parásito *Leishmania sp.* en

concentraciones que no son venenosas para el huésped (Kahvecioğlu & Canım, 2022).

Ahora bien, el posible mecanismo de acción de la Rutina sobre promastigotes fue descrito por Mehwish y colaboradores (2021) en el artículo Bioflavonoid-Induced Apoptosis and DNA Damage and Promastigotes of *Leishmania donovani*: Deciphering the Mode Action, en el cual de primera instancia mencionan que la rutina induce apoptosis y daño en el material genético, aunado a cambios ultraestructurales de las células de *L. donovani*.

Una célula de *Leishmania* está compuesta por un cinetoplasto alargado con ADN densamente condensado y una sola mitocondria con crestas adecuadas extendidas por toda la célula del parásito (Mehwish, et. al., 2021) jugando un papel importante en el metabolismo energético, esencial para la supervivencia del parásito (Cataneo, et. al., 2019), por lo que si existe una pérdida del potencial de membrana mitocondrial conduce a la generación de ROS (Cataneo, et. al., 2019) tal y como lo demostraron Fonseca y colaboradores en el 2011 al probar quercetina, una molécula análoga de la rutina sobre promastigotes de *L. amazonensis*, reportando inducción de la muerte en promastigotes a través de la disfunción mitocondrial que resultó en la producción de ROS y por consecuencia la muerte del parásito por apoptosis/necrosis. (Fonseca, et. al., 2011)

Continuando con el estudio de Mehwish y colaboradores (2021), reportaron que la rutina causó apoptosis temprana y tardía así como la presencia de vesículas en la membrana y esto último se explica porque la apoptosis, es un fenómeno que involucra; la permeabilidad de la membrana, daño del ADN y la activación de las caspasas, siendo así que éstas últimas inducen la degradación de proteínas celulares produciendo el encogimiento de las células, lo que conduce a la formación de vesículas en la membrana, la condensación de la cromatina y la rotura del DNA (Elmore, 2007), siendo así que esto mismo podría estar produciendo la rutina en los promastigotes de *L. mexicana*.

En general, con los resultados obtenidos en el presente estudio la rutina tiene potencial para ser utilizada como tratamiento alternativo contra la leishmaniasis causada por *L. mexicana*, basándonos en todas las propiedades y características

que se le atribuyen a la rutina tales como antibacteriano (Prasad & Prasad, 2019), matar promastigotes, no ser carcinogénico (Ganeshpurkar & Saluja, 2017) y estar disponible comercialmente cuyos requisitos de almacenamiento no son rigurosos, aunque, aún se debe probar la rutina sobre macrófagos infectados por amastigotes de *L. mexicana* para poder escalar a experimentos *in vivo* sobre ratones BALB/c infectados y así confirmar que la rutina puede ser utilizada como tratamiento alternativo contra la leishmaniasis, adicionalmente se deben caracterizar los mecanismos de acción implicados en la muerte de *L. mexicana*.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio, muestra una forma más rápida y eficaz para clasificar taxonómicamente a las especies de *L. olmeca olmeca*, *L. cruciata*, *L. shannoni*, *L. panamensis* y *L. aclydifera*, la cual se logró después de revisar, sintetizar y unificar las claves taxonómicas ya existentes de Galati, Ibañez, Young y Duncan, de las estructuras morfológicas relevantes (cibario, ascoides, espermateca y gonopodio), contribuyendo a la prevención de la leishmaniasis a través del control y vigilancia de los vectores incriminados.

Por otra parte, del extracto metanólico de *C. serrata* se cuantificó la presencia de flavonoides y fenoles con valores de 26.67 ± 0.34 mg de quercetina por gramo de extracto y 39.99 ± 0.58 mg de ácido gálico por gramo de extracto respectivamente, obteniendo así un valor de $52.51 \pm 0.25\%$ de actividad antioxidante con respecto a Trolox. Adicionalmente de este extracto metanólico, se identificó por cromatografía en capa fina al ácido ursólico en la fase orgánica y rutina de la fase acuosa, esta última se evaluó sobre promastigotes de *L. mexicana* de la cepa LAC mostrando un efecto dosis dependiente sobre la viabilidad de estos, obteniendo una CI_{50} de 9.41 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$ a las 72h y de 10.5 ± 1.17 $\mu\text{g/mL}$ a las 96 h, por lo que convierte a la rutina en una molécula con potencial leishmanicida, exponiendo así que podría ser una opción terapéutica de bajo costo, efectiva y accesible contra la leishmaniasis.

10. PERSPECTIVAS

Con respecto al vector:

- Divulgar las claves taxonómicas unificadas y resumidas al personal encargado de hacer colectas y clasificación taxonómica de las especies de *Lutzomyia*.
- Resumir y unificar las claves taxonómicas de las demás especies de *Lutzomyia* que son de importancia médica presentes en México.

Con respecto al tratamiento alternativo:

- Realizar la separación, purificación y caracterización estructural de los metabolitos presentes en *C. serrata*.
- Determinar el efecto *in vitro* de la rutina sobre la viabilidad de macrófagos infectados por amastigotes de *L. mexicana*, a través del cálculo de la CC_{50} y poder determinar el índice de selectividad de esta.
- En caso de que el índice de selectividad sea mayor a 1, determinar el efecto de la rutina de forma *in vivo* sobre ratones BALB/c infectados por *L. mexicana*.
- Determinar una formulación tópica adecuada que permita la absorción eficaz de la rutina.
- Comprobar el mecanismo de acción que ejerce la rutina sobre las células de *Leishmania*.

11. BIBLIOGRAFÍA.

Abbasi, W. M., Ahmad, S., Perveen, S., & Rehman, T. (2017). Preliminary phytochemical analysis and in vivo evaluation of antipyretic effects of hydro-methanolic extract of *Cleome scaposa* leaves. *Journal of traditional and complementary medicine*, 8(1), 147–149. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.05.004>

Alamilla-Fonseca, L. N., Delgado-Domínguez, J., Zamora-Chimal, J., Cervantes-Sarabia, R. B., Jiménez-Arellanes, A., Rivero-Cruz, J. F., & Becker, I. (2018). Leishmania mexicana cell death achieved by *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis: Learning from Maya healers. *Journal of ethnopharmacology*, 211, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.037>

Alvarez, S.J.M, Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., Battito, M., (2009) Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honer:A review. *Current Analytical Chemistry* 5(4), 293-302. <https://doi.org/10.2174/157341109789077768>

Angus, R. A., McNatt, H. B., Howell, W. M., & Peoples, S. D. (2001). Gonopodium development in normal male and 11-ketotestosterone-treated female mosquitofish (*Gambusia affinis*): a quantitative study using computer image analysis. *General and comparative endocrinology*, 123(2), 222–234. <https://doi.org/10.1006/gcen.2001.7669>

ANMAT (2010) consultada el 30 de marzo 2023 en http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/diciembre_2010/Dispo_8181-10.pdf

Bates P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*, 37(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

Bermúdez, A., Oliveira, M., María A., & Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 453-459. Consultado el 30 de junio 2022 en http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442005000800005&lng=es&tling=es.

Bezerra, J. W. A., Coronel, C., Gomez, M.C.V., Rolón, M., Nunez, C.V., Silva, D.R., Silva, L.A., Rodrigues, F.C., Boligon, A.A., Souza, M.A., Linhares, K.V., Silva, M.A.P., Morais-Braga, M.F.B., (2019) Evaluation of antiparasitary, cytotoxic and antioxidant activity and chemical analysis of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. (*Cleomaceae*). *South Africa Journal of Botany* 124, 546-555 <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.05.025>

Boelaert, M., & Sundar, S. (2014). Leishmaniasis. *Manson's Tropical Infectious Diseases*, 631-651.e4. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-5101-2.00048-0>

Bretag, J., Kammerer, D. R., Jensen, U., & Carle, R. (2009). Adsorption of rutin onto a food-grade styrene–divinylbenzene copolymer in a model system. *Food Chemistry*, 114(1), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.034>

Caligiuri, Lorena Gisel. (2016) Tesis de doctorado; Análisis de posibles agentes de control biológico de *Lutzomyia longipalpis*, vector de leishmaniasis visceral <https://doi.org/10.35537/10915/55094>

Cataneo, A. H. D., Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M. M., Assolini, J. P., Panis, C., Kian, D., Yamauchi, L. M., Colado Simão, A. N., Casagrande, R., Pinge-Filho, P., Costa, I. N., Verri, W. A., Jr, Conchon-Costa, I., & Pavanelli, W. R. (2019). Quercetin promotes antipromastigote effect by increasing the ROS production and anti-amastigote by upregulating Nrf2/HO-1 expression, affecting iron availability. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 113, 108745. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108745>

CBD (2010) What is Taxonomy? Retrieved January 25, 2023, from Cbd.int website: <https://www.cbd.int/gti/taxonomy.shtml>

CDC - Leishmaniasis - Biology. (2023). Consultada el 24 de enero 2023 en <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html#:~:text=Leishmaniasis%20is%20transmitted%20by%20the,types%20of%20mononuclear%20phagocytic%20cells>.

CDC - Leishmaniasis - Epidemiology & Risk Factors. (2022). Retrieved December 9, 2022, from <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/epi.html>

CDC-DPDx- (2017). Leishmaniasis. Consultada el 30 de marzo del 2023 en <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

Cecílio, P., Cordeiro-da-Silva, A., & Oliveira, F. (2022). Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with Leishmania parasites. *Communications biology*, 5(1), 305. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z>

CENAPRECE (2015). Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de la Leishmaniasis <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ManualLeishmaniasis2015.pdf>

Chand, J., Panda, S. R., Jain, S., Murty, U. S. N., Das, A. M., Kumar, G. J., & Naidu, V. G. M. (2022). Phytochemistry and polypharmacology of cleome species: A comprehensive Ethnopharmacological review of the medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 282, 114600. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114600>

Chauhan, K., Kaur, G., & Kaur, S. (2018). Activity of rutin, a potent flavonoid against SSG-sensitive and -resistant Leishmania donovani parasites in

experimental leishmaniasis. *International immunopharmacology*, 64, 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.09.026>

Chua L. S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology*, 150(3), 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.036>

Cicy Flora: Península de Yucatán. (2023). Retrieved January 12, 2023, from Cicy.mx website: https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1145#:~:text=Distribuci%C3%B3n%20en%20M%C3%A9xico%3A%20Chis.%2C,Hierba%20anual%20hasta%201.40%20m

Cruz, V., León, S., Cruz, M., Sosa, R., Arango, A. & González, E. (2013) Leishmaniasis visceral, reporte de cuatro casos y revisión de la bibliografía. *Medigraphic*. 29:204-209

DuPont™ (2020) AmberLite™ Consultada el 30 de marzo 2023 en <https://www.dupont.com/products/amberlitexad16n.html>

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Fonseca-Silva, F., Inacio, J. D., Canto-Cavalheiro, M. M., & Almeida-Amaral, E. E. (2011). Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PloS one*, 6(2), e14666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>

Galati, E. A. B., Galvis-Ovallos, F., Lawyer, P., Léger, N., & Depaquit, J. (2017). An illustrated guide for characters and terminology used in descriptions of Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). Guide illustré des caractères et de la terminologie utilisés dans les descriptions de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae). *Parasite (Paris, France)*, 24, 26. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017027>

Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 25(2), 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025>

GBIF (2015). *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis. Retrieved January 12, 2023, from Gbif.org website: <https://www.gbif.org/es/species/3872003>

Gęgotek, A., Rybałtowska-Kawałko, P., & Skrzydlewska, E. (2017). Rutin as a Mediator of Lipid Metabolism and Cellular Signaling Pathways Interactions in Fibroblasts Altered by UVA and UVB Radiation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 4721352. <https://doi.org/10.1155/2017/4721352>

Ghorbani, M., & Farhoudi, R. (2017). Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy?. *Drug design, development and therapy*, 12, 25–40. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>

Godínez-Álvarez, Adriana, & Ibáñez-Bernal, Sergio. (2010). Catálogo de Psychodidae (Diptera) de la Colección de Artrópodos con Importancia Médica del INDRE, Secretaría de Salud, México. *Acta zoológica mexicana*, 26(1), 99-121. Recuperado en 24 de enero de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372010000100008&lng=es&tlng=es.

Gómez-Vargas, Wilber, & Zapata-Úsuga, Giovani. (2022). Especies de Lutzomyia (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) en el área de influencia de la Central Hidroeléctrica Sogamoso (Santander, Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 26(1), 121-133. Epub June 08, 2022. <https://doi.org/10.17151/bccm.2022.26.1.9>

Gudoityte, E., Arandarcikaite, O., Mazeikiene, I., Bendokas, V., & Liobikas, J. (2021). Ursolic and Oleanolic Acids: Plant Metabolites with Neuroprotective Potential. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4599. <https://doi.org/10.3390/ijms22094599>

Gutiérrez-Rebolledo, G. A., Drier-Jonas, S., & Jiménez-Arellanes, M. A. (2017). Natural compounds and extracts from Mexican medicinal plants with anti-leishmaniasis activity: An update. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 10(12), 1105–1110. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.016>

Guzmán V., Quintanar A., (2017) Flora de Guerrero No. 74 Consultada el 11 de enero 2023 en <http://biologia.fciencias.unam.mx/plantasvasculares/PDF%20FLORAS/074%20Cleomaceae.pdf>

Hernández-Moreno, Lida Vanessa, Salazar, Juan Rodrigo, Pabón, Ludy C., & Hernández-Rodríguez, Patricia. (2022). Actividad antioxidante y cuantificación de fenoles y flavonoides de plantas colombianas empleadas en infecciones urinarias. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 25(1), e1690. Epub February 15, 2022. <https://doi.org/10.31910/rudca.v25.n1.2022.1690>

Ibáñez-bernal, S. (2001) Notes on the Psychodidae (Diptera) of Belize: Subfamilies Bruchomyiinae and Phlebotominae, *Annals of the Entomological Society of America*, Volume 94, Issue Pages 367–385, [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2001\)094\[0367:NOTPDO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2001)094[0367:NOTPDO]2.0.CO;2)

Ibáñez-Bernal, S. 2005 a. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. V. Clave ilustrada para la identificación de los machos de Lutzomyia França. *Folia Entomol. Mex.* 44(1): 49-66.

Ibáñez-Bernal, S. 2005 b. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. VI. Clave ilustrada para la identificación de las hembras de *Lutzomyia* Franca. *Folia Entomol. Mex.* 44(2): 195-212.

Ibáñez-Bernal, S. 1999. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) de México. I.– *Brumptomyia* Franca y Parrot; *Lutzomyia* Franca, las especies de L. (*Lutzomyia*) Franca y del grupo *verrucarum*. *Folia Entomológica Mexicana*, 107: 61–116.

Ilango K. (2000). Morphological characteristics of the antennal flagellum and its sensilla chaetica with character displacement in the sandfly *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti sensu lato (Diptera: psychodidae). *Journal of biosciences*, 25(2), 163–172.

Juárez, M., Jiménez, M., (2019). Phytochemical investigation, anti-inflammatory and antinociceptive activities from some species of Cleomaceae family: A systematic review. *Advancement in Medicinal Plant Research*, 7(4), 107-128 <https://doi.org/10.30918/AMPR.74.19.039>

Juszczak, A. M., Zovko-Končić, M., & Tomczyk, M. (2019). Recent Trends in the Application of Chromatographic Techniques in the Analysis of Luteolin and Its Derivatives. *Biomolecules*, 9(11), 731. <https://doi.org/10.3390/biom9110731>

Kahvecioğlu Çetin, F. & Canım Ateş, S. (2022). In vitro Investigation of Rutin-Loaded PLGA Nanoparticles on *Leishmania infantum* Promastigotes . Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi , 26 (3) , 427-434 . DOI: 10.19113/sdufenbed.1074029

Kasem, W. T., & Fatahy, S. (2016). Flavonoids and isoenzymes as chemotaxonomic markers in *Cleome* L.(Cleomaceae Bercht. & J.Presl). *Current Botany*, 7, 11–16. <https://doi.org/10.19071/cb.2016.v7.3026>

Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, L., & Loscalzo, J. (2012) *Leishmaniasis, Principios de Medicina interna* (1387-1393) McGraw-Hill Medical. <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1717>

Kianersi, F., Abdollahi, M. R., Mirzaie-Asl, A., Dastan, D., & Rasheed, F. (2020). Identification and tissue-specific expression of rutin biosynthetic pathway genes in *Capparis spinosa* elicited with salicylic acid and methyl jasmonate. *Scientific reports*, 10(1), 8884. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65815-2>

Levente, L. D., (2005). Chlorophyll removal from edible oils. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 3, 81-88.

Lindoso, J. A. L., Costa, J. M. L., Queiroz, I. T., & Goto, H. (2012). Review of the current treatments for leishmaniasis. *Research and reports in tropical medicine*, 3, 69–77. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S24764>

May-Uc, Emigdio, Hernández-Arana, Héctor A., & Rebollar-Téllez, Eduardo A.. (2011). Distribución de flebotominos (Diptera: Psychodidae) en Quintana Roo, México. *Acta zoológica mexicana*, 27(2), 273-289. Recuperado en 25 de enero de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372011000200005&lng=es&tlng=es.

McNeil, M. J., Porter, R. B., & Williams, L. A. (2012). Chemical composition and biological activity of the essential oil from Jamaican *Cleome serrata*. *Natural product communications*, 7(9), 1231–1232.

Mehwish, S., Varikuti, S., Ali Khan, M., Khan, T., Khan, I. U., Satoskar, A., Elsayed Elserahy, H. A., & Ullah, N. (2021). Bioflavonoid-Induced Apoptosis and DNA Damage in Amastigotes and Promastigotes of *Leishmania donovani*: Deciphering the Mode of Action. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(19), 5843. <https://doi.org/10.3390/molecules26195843>

Mikery-Pacheco, Oscar, Marina-Fernández, Carlos, Ibáñez-Bernal, Sergio, Sánchez-Guillen, Daniel, & Castillo-Vera, Alfredo. (2012). Infección natural de *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) con *Wolbachia* en cafetales de Chiapas, México. *Acta zoológica mexicana*, 28(2), 401-413. Recuperado en 30 de marzo de 2023, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372012000200012&lng=es&tlng=es

Mlala, S., Oyedeji, A. O., Gondwe, M., & Oyedeji, O. O. (2019). Ursolic Acid and Its Derivatives as Bioactive Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 2751. <https://doi.org/10.3390/molecules24152751>

Neggad, A., Benkaci-Ali, F., Laurent, S., & Ayata, G. (2021). A new method of extracting polyphenols from honey using a biosorbent compared to the commercial resin amberlite XAD2. *Journal of separation science*, 44(10), 2089–2096. <https://doi.org/10.1002/jssc.202001221>

Neuber H. (2008). Leishmaniasis. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 6(9), 754–765. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2008.06809.x>

Oliveira, R. M. de, Melo, S. de A., Penha-Silva, T. A. da, Almeida-Souza, F., & Abreu-Silva, A. L. (2018). Alternative Treatment for Leishmaniasis. InTech. doi: 10.5772/intechopen.75895

OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Consultado el 30 de junio 2022 en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95008>

OMS. (2022, January 8). Leishmaniasis. Retrieved December 10, 2022, from Who.int website: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>

OPS, Organización Panamericana de la Salud. (2018). Leishmaniasis Retrieved December 10, 2022, from Paho.org website: <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis#:~:text=Los%20pa%C3%ADses%20que%20concentran%20el,manejo%20cl%C3%ADnico%20y%20el%20tratamiento>

OPS/OMS (2017). Leishmaniasis en las Américas-Hoja informativa para los trabajadores de salud. Pan American Health Organization/World Health Organization. Consultada el 30 de marzo 2023 en https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13648:leishmaniasis-fact-sheet-health-workers&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0

OPS/OMS Organización Panamericana de la Salud. (2018) Leishmaniasis cutánea y mucosa Consultado el 31 de mayo 2021 en <https://www.paho.org/es/temas/leishmaniasis/leishmaniasis-cutanea-mucosa>

Oryan A. (2015). Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian journal of veterinary research*, 16(1), 1–19.

Palma, D., Mercuriali, L., Figuerola, J., Montalvo, T., Bueno-Marí, R., Millet, J. P., Simón, P., Masdeu, E., & Rius, C. (2021). Trends in the Epidemiology of Leishmaniasis in the City of Barcelona (1996-2019). *Frontiers in veterinary science*, 8, 653999. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.653999>

Pascini, T. V., & Martins, G. F. (2017). The insect spermatheca: an overview. *Zoology (Jena, Germany)*, 121, 56–71. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.12.001>

Prasad, R., & Prasad, S.B. (2019). A review on the chemistry and biological properties of Rutin, a promising nutraceutical agent. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.31024/AJPP.2019.5.S1.1>

Raimundo, N., Barbosa, M., Roalson, E., (2017) Cleoserrata (Cleomaceae): Taxonomic consideration and new species. *Phytotaxa* 179 (324) <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.324.2.6>

Robledo, S. M., Puerta, J. A., Muñoz, D. L., Guardo, M., & Darío Vélez, I. (2006). Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (V.) panamensis* en Colombia. *Biomédica*, 26(1), 188-193.

Rodríguez-Rojas, J. J., Rodríguez-Moreno, Á., Berzunza-Cruz, M., Gutiérrez-Granados, G., Becker, I., Sánchez-Cordero, V., Stephens, C. R., Fernández-Salas, I., & Rebollar-Téllez, E. A. (2017). Ecology of phlebotomine sandflies and putative reservoir hosts of leishmaniasis in a border area in Northeastern Mexico: implications for the risk of transmission of *Leishmania mexicana* in Mexico and the USA. *Écologie des phlébotomes et hôtes putatifs de la leishmaniose dans une zone frontalière du nord-est du Mexique : implications pour le risque de transmission de Leishmania mexicana au Mexique et aux États-Unis. Parasite (Paris, France)*, 24, 33. <https://doi.org/10.1051/parasite/2017034>

Sáenz, E., Sialer, M., Thomas, E., Tejada, E. & Casanova, E. (2013) Leishmaniasis mucocutánea con presentación atípica: setenta años posprimoinfección. *Dermatol Perú*, Vol 23 (1)

Secretaria de Salud. (2015) Centro Nacional de vigilancia epidemiológica y control de enfermedades dirección general de programas preventivos, programa de enfermedades transmitidas por vector. Consultado el 22 de mayo 2021 en <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ManualLeishmaniasis2015.pdf>

Seif Zadeh, N., & Zeppa, G. (2022). Recovery and Concentration of Polyphenols from Roasted Hazelnut Skin Extract Using Macroporous Resins. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(13), 1969. <https://doi.org/10.3390/foods11131969>

Sierra A, Diana, Vélez B, Iván Darío, & Uribe S, Sandra. (2000). Identificación de *Lutzomyia* spp. (Diptera: Psychodidae) grupo verrucarum por medio de microscopia electrónica de sus huevos. *Revista de Biología Tropical*, 48(2-3), 615-622. Retrieved January 24, 2023, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77442000000200033&lng=en&tlng=es.

SIMUDAT, Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis. Consultada el 30 de marzo 2023 en http://simudatsalud-risaralda.co/normatividad_inv7/Entomologica%20Leishmaniasis.pdf

Singh, H., Mishra, A., & Mishra, A. K. (2018). The chemistry and pharmacology of Cleome genus: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 101, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.02.053>

Soto, J., & Soto, P. (2006). Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*, 26(1), 207-217.

SSA. Secretaría de Salud. (2022). LEISHMANIASIS. Retrieved December 10, 2022, from gob.mx website: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/leishmaniasis#:~:text=La%20leishmaniasis%20es%20una%20enfermedad,conocida%20como%20papalotilla%20o%20je%C3%A9n>.

Sundar, S., & Singh, B. (2018). Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(6), 467–486. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1472241>

Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F., & de Souza, W. (2013). The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. *PLoS pathogens*, 9(10), e1003594. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003594>

The Institute for Regional Conservation. (2020). Retrieved January 12, 2023, from Regionalconservation.org website: <https://www.regionalconservation.org/ircs/database/plants/PlantPagePR.asp?TXCODE=Cleoserr>

Tomás-Barberán, F. A., Blázquez, M.A., García-Viguera, C., Ferreres F., & Tomás-Lorente, F. (1992) A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. *Phytochemical Analysis*, 3(4), 178–181. <https://doi.org/10.1002/pca.2800030407>

Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, 6, 750. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

Trejo, J., Navarrete, G., Ramírez, A., Jiménez, E., (2020) Leishmaniasis cutánea localizada. *Rev Cent Dermatol Pascua*; 29 (1): 16-19 doi: 10.35366/96265

Vargas MF, Torres G, Arenas R, et al. Leishmaniasis en México. *Med Cutan Iber Lat Am*. 2011;39(4):163-183.

Vivero, R., Beharano, E., Pérez A., Florez F., Estrada L., Torres C., Muskus C. Nuevos registros de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), con el hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), en los alrededores de la Ciudad de Sincelejo, Colombia / New records of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae), with the report of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), surrounding the City of Sincelejo, Colombia *Biota neotrop. (Online, Ed. port.)*; 9(4): 277-280, Oct.-Dec. 2009. *ilus, tab*

WHO. World Health Organization (2023) Consultada el 30 de marzo del 2023 en https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html?geog=0&indicator=i2&date=2020&bbox=-230.24100000000004,-62.897000000000006,230.24100000000004,90.59700000000002&printmode=true

WHO/ OMS Organización Mundial de la Salud (2021) Consultado el 29 de mayo 2021 en https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html

Young, D. G. & Duncan M. A. (1994) Guide to the Identification and Geographic Distribution of *Lutzomyia* Sand Flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute* 1994;54:1-881.

Zaragozano, F., Rodríguez Martínez, G, & Parrilla, C. (2001). Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos. *Medicina Integral*, 38(6), 264-269. <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-leishmaniasis-visceral-cutaneomucosa-aspectos-epidemiologicos-13020963>