

El fruto de *Swinglea glutinosa* (Bl) Berr. cubano con demostrada actividad anti protozoaria contra *Leishmania amazonensis*

The fruit of *Swinglea glutinosa* (Bl) Berr. Cuban with demonstrated antiprotozoal activity against *Leishmania amazonensis*

Eva Salas Olivet¹, Yoslaidis Montes de Oca Crombet², Armando Cuéllar Cuéllar³, David Marrero Delange⁴, Lianet Monzote Fidalgo⁵

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba. evaso@ifal.uh.cu

² Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba. yolymontes00401@gmail.com

³ Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba. cuellarmandocuellar@gmail.com

⁴ Centro de Productos Naturales. (CPN) CENIC, Cuba. davidmdelanfe@gmail.com

⁵ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK), Cuba. monzote@ipk.sld.cu



PARA CITAR ESTE ARTÍCULO

Salas Olivet, E., Montes de Oca Crombet, Y., Cuéllar Cuéllar, A., Marrero Delange, D., Monzote Fidalgo, L., (2023) El fruto de *Swinglea glutinosa* (Bl) Berr. cubano con demostrada actividad anti protozoaria contra *Leishmania amazonensis*. *Alternativas*, 24(2).

DOI

<https://doi.org/10.23878/alternativas.v24i2.427>

CORRESPONDENCIA

evaso@ifal.uh.cu



UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE SANTIAGO DE GUAYAQUIL

Av. Carlos Julio Arosemena, Km 1,5. Guayaquil, Ecuador

Teléfono: +593 4 380 4600

Correo electrónico: revista.alternativas@cu.ucsg.edu.ec

Web: www.ucsg.edu.ec



© The Autor(s), 2023

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. To view a copy of this license visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

El fruto de *Swinglea glutinosa* (Bl) Berr. cubano con demostrada actividad anti protozoaria contra *Leishmania amazonensis*

The fruit of *Swinglea glutinosa* (Bl) Berr. Cuban with demonstrated antiprotozoal activity against *Leishmania amazonensis*

Eva Salas Olivet¹, Yoslaidis Montes de Oca Crombet², Armando Cuéllar Cuéllar³, David Marrero Delange⁴, Lianet Monzote Fidalgo⁵

¹ Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba. evaso@ifal.uh.cu

² Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba. yolymontes00401@gmail.com

³ Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana, Cuba. cuellararmandocuellar@gmail.com

⁴ Centro de Productos Naturales. (CPN) CENIC, Cuba. davidmdelange@gmail.com

⁵ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK), Cuba. monzote@ipk.sld.cu

RESUMEN

Swinglea glutinosa Bl Merr es un género monotípico de plantas, perteneciente a la familia RUTACEAE. Su única especie: *Swinglea glutinosa* de frutos de 10-12cm no es comestible. Se trazó el objetivo: "definir su uso contra *Leishmania amazonensis* y si era conocida por la población cubana". Se encuestaron un total de 48 personas. Los resultados expresaron desconocimientos de la planta; ni su uso contra *Leishmania amazonensis*. Se caracteriza por la presencia de alcaloides, en su ruta biosintética, el cual fue purificado a partir de un extracto total del fruto; obtenido por el Método de Maceración. Evaluados frente a promastigotes de *L. amazonensis* y citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. La actividad anti-leishmanial; todos los extractos evaluados (I, II, III) se consideraron activos, ya que mostraron una $CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. Los extractos presentaron actividad en el mismo rango, no presentando diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). La Pentamidina, fármaco de referencia utilizado en este estudio, mostró una CI_{50} de $0,4 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ frente a promastigotes de *L. amazonensis* y de $11,7 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$. La actividad de este producto fue mayor que la de los extractos evaluados, pero hay que significar que la pentamidina es un compuesto con un alto grado de pureza ($> 98 \%$); mientras que los productos nuevos evaluados en este trabajo son extractos donde es posible que el principio activo responsable de la actividad anti-leishmanial se encuentre en un bajo porcentaje; no obstante, se evidencia la novedad científica al comprobarse sin dudas actividad anti-leishmanial.

PALABRAS CLAVE

(*Swinglea glutinosa* Bl Merr), alcaloides, toxico, cítricos de fruto no comestible, contra *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Swinglea glutinosa Bl Merr is a monotypic genus of plants, belonging to the RUTACEAE family. Its only species: *Swinglea glutinosa* with 10-12cm fruits is not edible. The objective was set: "to define its use against *Leishmania amazonensis* and if it was known by the Cuban population." A total of 48 people were surveyed. The results express ignorance of the plant; nor its use against *Leishmania amazonensis*. It is characterized by the presence of alkaloids, in its biosynthetic pathway, which was purified from a total extract of the fruit; obtained by the Maceration Method. Evaluated against *L. amazonensis* promastigotes and cytotoxicity against BALB/c mouse peritoneal macrophages. Antileishmania activity; All extracts evaluated (I, II, III) were considered active, since they showed an $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. The extracts presented activity in the same range, with no significant differences between them ($p > 0.05$)... Pentamidine, the reference drug used in this study, showed an IC_{50} of $0.4 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ against *L. amazonensis* promastigotes and $11.7 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$. The activity of this product was higher than that of the extracts evaluated, but it must be noted that pentamidine is a compound with a high degree of purity ($> 98\%$); while the new products evaluated in this work are extracts where it is possible that the active principle responsible for the anti-leishmanial activity is found in a low percentage; However, the scientific novelty is evident when anti-leishmanial activity is proven without a doubt.

KEYWORDS

(*Swinglea glutinosa* Bl Merr), alkaloids, toxic, citrus of inedible fruit, against *Leishmania amazonensis*.

RECIBIDO: 20/01/2023
ACEPTADO: 10/04/2023

DOI: <https://doi.org/10.23878/alternativas.v24i2.427>

Introducción

La fitoterapia entendida como la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar enfermedades, es tan antigua como el hombre, siendo el tipo de medicamento más antiguo del mundo. El empleo terapéutico de las especies vegetales fue la base principal de la medicina árabe y griega. Se calcula que existen en el mundo más de 250 mil especies vegetales, de ellas se consideran como potencialmente medicinales unas 12 mil especies, sin embargo hasta el 2003 solo se tenía conocimiento científico de un 10% del total de las especies existentes (Vanaclocha y col., 2003). Pese a los avances de la medicina moderna, las plantas de uso medicinal han seguido teniendo un lugar principal en el desarrollo de la farmacología, ya sean preparadas en forma de decocciones e infusiones, hasta su uso como base para el desarrollo de medicamentos más complejos como los quimioterápicos (Alonso, 2010). Debido a su complejidad química las plantas consideradas medicinales, han constituido y constituyen una fuente muy valiosa de principios activos y de modelos para la síntesis o semisíntesis química de numerosos e importantes medicamentos y principios activos, (Alonso, 2007) Varias investigaciones científicas sugieren que el género *Swinglea* es una fuente rica de alcaloides, especialmente la especie *Swinglea glutinosa*. Esta planta conocida popularmente como Limón Swinglea es originaria de, Luzón, archipiélago de Filipinas (sureste de Asia) donde es conocido como Tabog, se encuentra distribuido alrededor del mundo sobre las zonas tropicales y subtropicales cercanas al paralelo cero o línea del Ecuador, crece en varias condiciones de clima ecuatorial, alta humedad y clima de costa. C. M. Morton, 2009; Mahecha, 2004). El exocarpo del fruto del género *Swinglea*, es similar a la cáscara de la naranja; esta contiene glándulas posicionadas radicalmente y cargadas de aceites esenciales (AE). Tales glándulas mucilaginosas aún no han sido encontradas en otro género de la subtribu *Balsamocitrinae*; pero pueden aparecer en forma menos frecuente en las paredes delgadas del género *Aegle* y posiblemente otros géneros de dicha subtribu. La familia RUTACEAE se caracteriza por la presencia de diferentes tipos de metabolitos secundarios en su ruta biosintética, tales como: alcaloides, flavonoides, triterpenoides, lignanos, crómenos, terpenos, AE, furanos, coumarinas, metoxiflavonas, ácido cinámico, ácido benzoico, fenoles, alco-

holes, aldehídos, antraquinonas, chalconas, limonoides, xantonas, acetobenzofenonas y otros esqueletos moleculares poco comunes con un amplio espectro de actividad biológica por lo que atraen la atención de investigadores (Gil, 2006; Chlouchi y col., 2006; Weniger y col., 2001; Lizalda, 2008; Purcaro y col., 2009; Salimon y col., 2010; Koba y Baczek, 2011; Cerqueira y col., 2012; Weniger, B.; Um, B-H.; Valentin, A.; Estrada, A.; Lobstein, A.; Anton, R.; Maillé, M.; Sauvain, M.; J., 2001, Weninger B, 2001, Weninger B.; S. Robledo; G. J. Arango; E. Deharo; R. Aragón; V. Muñoz; J. Callapa; A. Lobstein y R. Anton., 2001., Wu, T-S.; Chen, C-M, 2000., Wu, T-S.; Kuoh, C-S.; Furukawa, 1983., Yamamoto, N.; Furukawa, H.; Ito, Y.; Yoshida, S.; Maeno, K.; Nishiyama, Y, 1989. Precisamente por la demostrada presencia de alcaloides de acridona, las especies cítricas han sido investigadas. Lo mismo ocurre con la especie *S. glutinosa* donde los estudios químicos se dirigen a la extracción y caracterización de alcaloides severínicos, acridónicos y sus respectivos derivados biosintéticos, así como de sus AE. (Weninger, 2001). Existen reportes internacionales sobre cuatro alcaloides de la acridona (Weninger, 2001), extraídos de la corteza de *S. glutinosa* y ensayados sobre cepas de *Plasmodium falciparum*, reportándose actividad inhibitoria del protozoo y por consiguiente, acción antimalárica. En otro estudio se informó la evaluación de la actividad biológica de los extractos apolares sobre cepas de *leishmania*, causante de la enfermedad conocida como leishmaniosis, sin un resultado significativo. Algunos alcaloides presentes en la familia RUTACEAE son usados como antileishmanicidas, es el caso de los extractos de las especies *Dictyoloma peruvianum* Planch, *Galipea longiflora* Kr, usadas en la medicina popular de las comunidades bolivianas. Se ha informado que los alcaloides de acridona son compuestos con actividad prometedora contra *Plasmodium Falciparum*; Weniger y col., 200, y también tiene actividad antiviral Kawaii y col., 1999; y efectos antiproliferativos sobre líneas de células cancerígenas; Perez, 2016; Wang y col., 2008). La familia de plantas RUTACEAE es reconocida por el alto número de especies utilizadas en el tratamiento de la malaria seguida por Compositae y Celestraceae. En las comunidades del distrito de Merú, Kenia el uso de la raíz de algunas de las especies de estas familias en infusión es frecuentemente recomendado como remedio antimalárico. Varias clases de metabolitos secundarios son responsables por

la actividad antiplasmodial; la más importante y diversa biopotencia observada en el tratamiento contra la malaria ha sido en alcaloides, sesquiterpenlactonas, quinolinas, derivados de artemisinina, coumarinas, triterpenos y limonoides.

Materiales y Métodos. Procesamiento del material vegetal

Swinglea glutinosa (Bl.) Merr (Rutáceae) fue colectada en estado fenológico de fructificación-floración. Se tomó una muestra representativa de la totalidad de la especie que se encuentra exactamente en el patio del Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL) perteneciente a la Universidad de La Habana, ubicado en Calle 222, # 2317, entre 23 y 31, La Coronela, municipio La Lisa, provincia La Habana. La planta fue colectada por la Lic. Yoslaidis Montes de Oca Crombet. Una parte del material colectado se herborizó y depositó en el herbario del Instituto de Ecología y Sistemática perteneciente a la Academia de Ciencias de Cuba, situado en Carretera de Varona, No. 11835, entre Oriente y Lindero, Reparto Paragón, municipio Boyeros, provincia La Habana. El material vegetal fue recolectado en época de seca.

El trabajo experimental se desarrolló en los laboratorios de Síntesis y Química Farmacéutica del Departamento de Farmacia perteneciente al Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL), Universidad de La Habana; Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK); Centro de Productos Naturales (CPN); Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB).

Se emplearon frutos de plantas adultas bien saludables y limpias. Para el desarrollo de la investigación; cada parte del fruto fue separada en exocarpo (I), el mesocarpo (II) y las semillas (III).



Figura 1. Imagen del fruto de *Swinglea glutinosa* Bl. Merr. Determinación de sustancias solubles

Para la determinación de sólidos totales o sustancias solubles se utilizó agua destilada, para la misma se empleó una zaranda, una balanza

analítica marca Sartorius BS 2202S, estufa y plancha de calentamiento (Miranda y Cuellar, 2001). Los resultados se expresan mediante la fórmula siguiente:

$$Ss. = \frac{R \times 500 \times 100}{C_1 \times 100} M$$

donde:

Ss = Porcentaje de sólidos totales (%)

H = Humedad de la muestra (%)

M = Masa de la muestra (g)

500 y 100 = Factores matemáticos para los cálculos

R = Residuo de la muestra (g)

Obtención de los extractos hidroalcohólicos de I, II y III de *Swinglea Glutinosa* Bl. Merr para la evaluación farmacognóstica y antimicrobiana.

Cada material vegetal fue procesado empleando frutos de limón *Swinglea* de plantas adultas floridas, los cuales se recolectaron manualmente, seleccionándolos de acuerdo a su apariencia, y se lavaron con agua potable. Para el desarrollo de la investigación en cada fruto fueron separados el exocarpo (I-cáscara), el mesocarpo y endocarpo (II-corteza) y las semillas (III).

Para este proceso se utilizó un bisturí No. 3, de acero inoxidable. Una vez separadas las partes, fueron cortadas en pequeños trozos.

Se tomaron 50 g de I, II y III pesados en una balanza analítica marca Sartorius BS 2202S y se colocaron cada uno en un Erlenmeyer de 250 ml, se le añadieron 100 ml de la solución hidroalcohólica al 70% medidos con probeta de 100 ml, se maceró durante 48 horas, empleando agitación esporádica con el uso de un agitador de vidrio, transcurrido este tiempo se filtró a través de un embudo de vidrio y gasa para evitar el arrastre del material vegetal, se midió el volumen del filtrado con una probeta de 100 ml.

En Cuba no es conocida popularmente; ni científicamente *Swinglea glutinosa* Bl. Merr al no encontrar en el estado del arte antecedentes o información al respecto; para corroborarlo se diseñó la encuesta siguiente:

CUESTIONARIO A LA POBLACION O ENCUESTA

Con la siguiente encuesta sólo se pretende recoger el estado de opinión de la población sobre el conocimiento y consumo de plantas medicinales y medicamentos fitoterápicos y si *Swinglea glutinosa* Bl. Merr es conocida por la población cubana (Limón ornamental)(IndiKit, Guía Rápida, encuesta, 2017)

Sexo_____ Edad_____

Nivel escolar_____

1. ¿Conoce Ud. Sobre plantas medicinales y fitoterapia?
☐ Sí ☐ No

2. Los conocimientos que tiene sobre las plantas medicinales han sido adquiridos por:
☐ Tradición familiar
☐ Indicación médica
☐ Indicación de amigos o vecinos
☐ Información del farmacéutico
☐ Programas radiales y/o televisivos
☐ Propaganda escrita y/o boletines informativos
☐ Falta de medicamentos
☐ Cursos
☐ Otros, señale_____

3. Con relación a la frecuencia con que usa las plantas medicinales, responda en una escala de 1 a 5, considerando 1 como el no uso y 5 como un uso muy frecuente.

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

4. ¿Cómo evaluaría en una escala de 1 a 5 el nivel de confianza que le tiene a las plantas medicinales considerando el 1 como que no confía y el 5 como confía mucho?

☐ 1 ☐ 2 ☐ 3 ☐ 4 ☐ 5

5. Sobre el limón ornamental o *Swinglea glutinosa* Bl Merr

☐ ¿Lo conoce?
☐ ¿No lo conoce?

6. ¿Conoce otros nombres por los que lo identificaría?

☐ Sí ☐ No

Cuál_____

7. ¿Lo ha empleado alguna vez?

☐ Sí ☐ No

8. ¿Para qué lo ha empleado?

9. ¿Cómo lo ha empleado?

10. ¿Qué parte de la planta ha usado?

☐ Hojas
☐ Tallo
☐ Raíz
☐ Fruto

11. Forma de uso

☐ Cataplasma
☐ Infusión
☐ Cocimiento
☐ Fitofármacos

Dicha encuesta fue evaluada estadísticamente; reportándose el análisis en Resultados y Discusión.

Antecedente sobre la presencia de alcaloides en *Swinglea glutinosa* Bl Merr

La familia RUTÁCEAE se destaca por la presencia de varios metabolitos secundarios tales como: alcaloides (especialmente los derivados del ácido antranílico), coumarinas (furano y pirano), lignanos, limonoides, flavonoides (flavonas, chalconas, flavonoides), crómenos, terpenos (mono y tri), aceites esenciales; todos estos compuestos atraen la atención de investigadores debido a la importancia biológica y quimiosistemática de muchos de estos metabolitos.

Estudios realizados mostraron que los alcaloides de acridina son compuestos con actividad prometedora contra *Plasmodium Falciparum* (Yamamoto y col., 1989 y Weniger y col., 2001 y), y también tiene actividad antiviral (Kawaii y col., 1999) y efectos antiproliferativos sobre líneas de células cancerígenas (Wu, 1983. Los cítricos de géneros asiáticos y *Swinglea* son miembros de las Rutáceae y son incluidos en la subfamilia Aurantioideae. Las especies cítricas han sido investigadas y caracterizadas por poseer alcaloides de acridina. Estos datos estimularon una investigación sobre *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. En búsqueda de las principales acridinas. Teniendo en cuenta que sinérgicamente con otros metabolitos presentes en *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr los alcaloides juegan una función biológica determinante contra (*Plasmodium falciparum*; el parásito más agresivo de la malaria) leishmaniosis, se procedió a un: procedimiento de purificación de alcaloides del fruto cubano *Swinglea glutinosa* Bl Merr

Se procedió triturando bajo 2mm 50g de frutos de, *Swinglea glutinosa* Bl Merr el cual se maceró con 500mL de etanol al 95% durante 21 día para obtener un extracto total al que se le

realizó un procedimiento de filtración a vacío, se midió el volumen del extracto total así obtenido. Se evaporó el extracto a vapor de agua en una cápsula de porcelana para retirar el etanol y llevar a semisólido. El que se redisolvió con 100mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Se filtró y aplicó el ensayo de dragendorff donde se comprobó la presencia de alcaloides. Se añadió hidróxido de sodio al 10% en agua hasta PH alcalino se trasvasó a un embudo separador con 100mL de cloroformo (primer lavado con cloroformo), se agitó vigorosamente y se dejó en reposo hasta separación de fase. La fase inferior es la clorofórmica I, La fase superior fue la alcalina; se lavó en el embudo separador con 100mL de cloroformo (segundo lavado con cloroformo) donde se agitó y se esperó la separación en fase; obteniéndose la fase clorofórmica inferior II. La que se unió con la fase clorofórmica I. Se rotoevaporó en baño maría a 40 grados centígrados hasta reducir el volumen hasta aproximadamente 200mL de la fase clorofórmica. Así se obtiene el residuo de alcaloides que debe ser analizado por cromatografía. Volviendo a la solución alcalina superior obtenida en el segundo lavado con cloroformo; mezclar con n-butanol $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ para separar las fases a partir de un embudo separador obteniéndose solución alcalina con cristales la cual es sometida a filtrar a vacío con frita con tapón horadado. Se proceden a analizar los cristales resultantes por cromatografía. Se regresa a solución de n-butanol; la que se mezclar con cloroformo, agitando bien hasta homogeneizar la que se va a evaporar en cápsula de porcelana con baño de agua. La muestra así obtenida se analiza por cromatografía (Cuéllar, 2015).

Obtención de los extractos hidroalcohólicos de I, II y III de *S. glutinosa* para la evaluación farmacognóstica y antileishmaniasis. Para la obtención del extracto hidroalcohólico al 70% cada material vegetal fue procesado como se describe a continuación: Se tomaron 50 g de I, II y III pesados en una balanza analítica marca Sartorius BS 22025 y se colocaron cada uno en un erlenmeyer de 250 mL, se le añadieron 100 mL de la disolución hidroalcohólica al 70 % medidos con probeta de 100 mL, se maceró durante 48 horas, mediante agitación esporádica con el uso de una zaranda. Transcurrido este tiempo se filtró a través de un embudo de vidrio y gasa para evitar el arrastre del material vegetal, se midió el volumen del filtrado con una probeta de 100 mL (Miranda y Cuéllar, 2000 y 2001).

Ensayo del efecto antiparasitario y citotóxico de los extractos hidroalcohólicos al 70 % de I, II y III del fruto de *S. glutinosa*.

Parásitos. Se utilizó la cepa MHOM/BR/77/LTB0016 de *Leishmania amazonensis*, la cual fue cultivada en medio Schneider (SIGMA, St. Louis, MO, USA) al 10 % de suero fetal bovino (SIGMA) y penicilina-estreptomicina como antibióticos (SIGMA). **Productos a evaluar.** Se evaluaron los tres extractos hidroalcohólicos el exocarpo (I), mesocarpo (II) y las semillas (III) del fruto de *Swinglea glutinosa* Bl Merr brindados por el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana, Cuba, obtenidos según se describe. Estos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO, BDH, Poole, Inglaterra), de forma tal que las soluciones quedaran a una concentración final de 20 $\square$ 0,1 mg/mL.

Fármaco de referencia. La pentamidina (Ritchi, Bueno Aires, Argentina) fue utilizada como fármaco de referencia a una concentración de 10 mg/mL.

Determinación de la Actividad Frente a Promastigotes. Se aplicaron 2 μ L de los extractos a 98 μ L de medio de cultivo Schneider con suero y antibióticos. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas 1:2 con el objetivo de evaluar concentraciones entre 12,5 y 200 μ g/L y se les adicionó 50 μ L de promastigotes de *Leishmania* en fase de crecimiento logarítmico a una concentración de 4 x 10⁵ parásitos/mL. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a 28°C durante 72h. Posteriormente, se adicionó a cada pozo 20 $\square$ L de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT, SIGMA) preparada a razón de 5mg de MTT/mL en solución salina fisiológica estéril y se incubó la placa nuevamente bajo las mismas condiciones. A las 4h se eliminó el sobrenadante y la sal de tetrazolio precipitada se disolvió en 100 $\square$ L de DMSO. Se realizó la lectura en un Espectrofotómetro (Sirio S Reader, 2.4-0, Italia) a 540nm y a 620nm como longitud de onda de referencia (Sladowski y col., 1993).

Determinación de la citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. Se sacrificaron ratones BALB/c por dislocación cervical y los macrófagos fueron extraídos mediante lavados con RPMI (SIGMA, St. Louis, MO, USA) suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200UI, estreptomicina 200mg/L). Los macrófagos se sembraron en placas de 98 pozos e incubaron durante 2h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, se eliminaron las células libres y a la monocapa

celular se le añadió medio RPMI y el extracto a una concentración de 200 mg/mL, de la cual se realizaron 4 diluciones seriadas 1:2 y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones. A las 72h de incubación, se añadieron a cada pozo 15mL de una solución de MTT y se incubó la placa nuevamente. A las 4 h se eliminó el sobrenadante y la sal de tetrazolio precipitada se disolvió en 100mL de DMSO (Sladowski y col., 1993).

Análisis estadístico y cálculo del índice de selectividad. En cada caso se calcularon las absorbancias netas para cada concentración y se graficaron las absorbancias resultantes contra las concentraciones evaluadas. Estas curvas dosis-respuestas se ajustaron mediante un modelo de regresión lineal y se obtuvo la Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}) para cada extracto frente a parásitos de *L. amazonensis* o macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. Los valores de CI_{50} para cada producto son expresados como la media de tres experimentos por separado y su desviación estándar. Posteriormente, se compararon los valores de CI_{50} entre los extractos frente a promastigotes de *Leishmania* y de cada extracto frente a ambos modelos para cada extracto mediante la prueba de Mann-Whitney utilizando el programa STATISTICA para Windows Versión 4.5.

Resultados y discusión. Resultados del procedimiento de Herborización. Este arbus-to cubano fue identificado por la Dra. Ramona Oviedo la cual autentificó la especie vegetal como *Swinglea glutinosa* Bl Merr con el número de herbario SV 43068.

RESULTADOS DE LA ENCUESTA

TOTAL DE ENCUESTADOS 48 Personas= 100%

SEXO: FEMENINO= 29= 60.4%
MASCULINO= 19= 39.5%

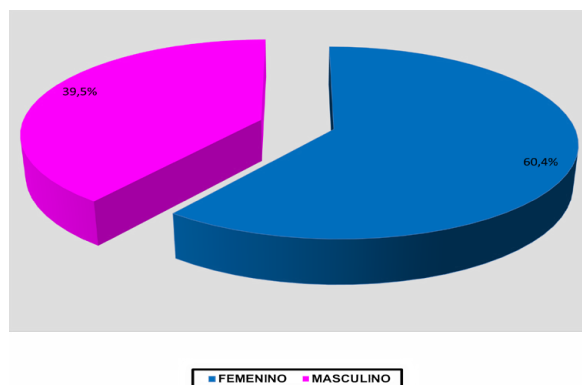


Figura 2. Total de encuestados por sexo

EDAD

18-35 = 17 (35.4%)
36-45 = 13 (27%)
46-60 = 12 (25%)
> 60 = 6 (12.5%)

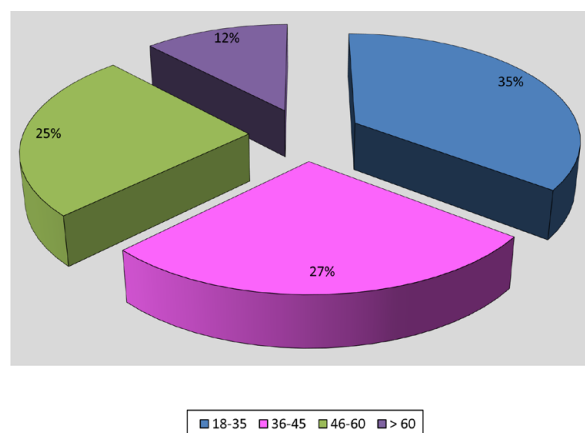


Figura 3. Total de encuestados por edades

CONOCIMIENTO SOBRE PLANTAS MEDICINALES

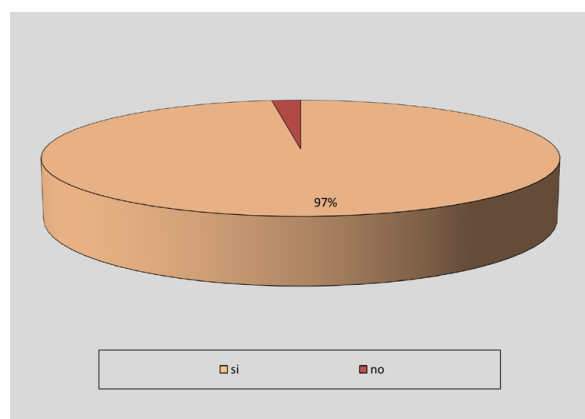


Figura 4. Uso de las plantas medicinales

Por tradición familiar: 34
Indicación médica: 10
Indicación de amigos y vecinos: 32
Información del farmacéutico: 8
Programas radiales y/o televisivos: 19
Propaganda escrita y/o boletines informativos: 11
Falta de medicamentos: 1
Cursos: 1
Otros: 1

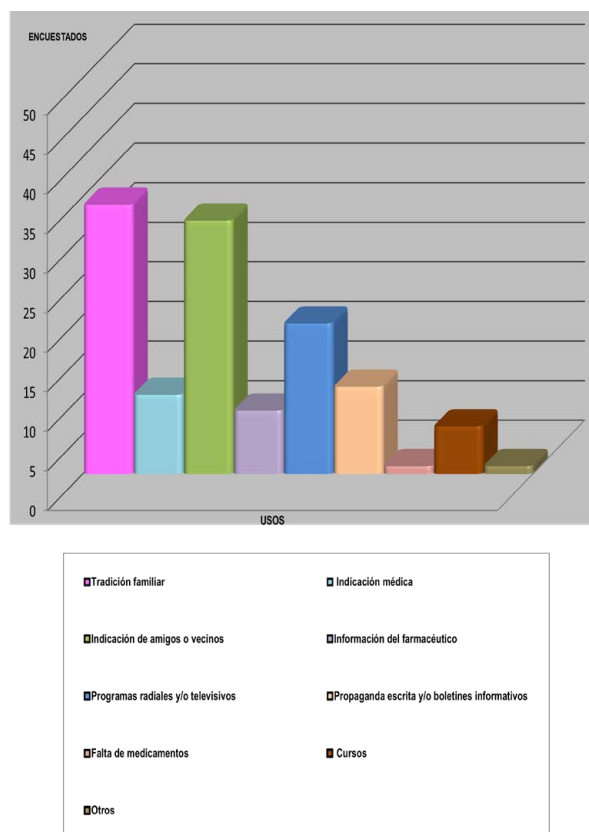


Figura 5. Conocimiento de Plantas Medicinales

Los encuestados refieren que ni los médicos ni los farmacéuticos brindan gran información sobre el uso de las plantas medicinales.

FRECUENCIA DE USO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

1(No uso): 6 (12.5%)
 2: 13 (27%)
 3: 16(33%)
 4: 10(20.8%)
 5(Muy frecuentemente): (4%)

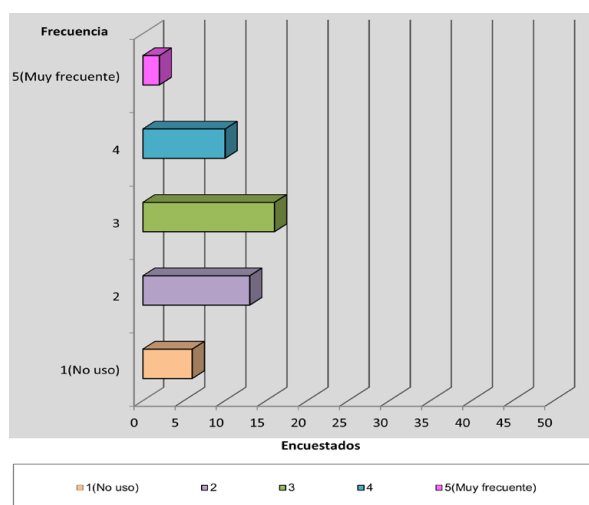


Figura 6. Frecuencia de uso de plantas medicinales.

CONFIANZA

1 (No Confían): 8 (16.6%)
 2: 8 (16.6%)
 3: 11 (22.9%)
 4: 16 (33.3%)
 5 (Mucha confianza): 4 (8.3%)

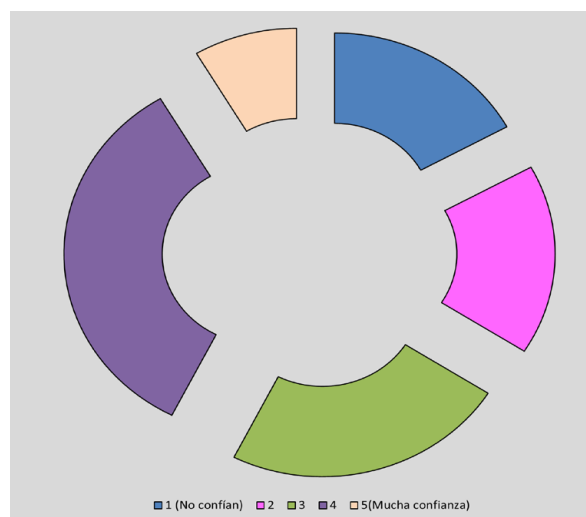


Figura 7. Confianza

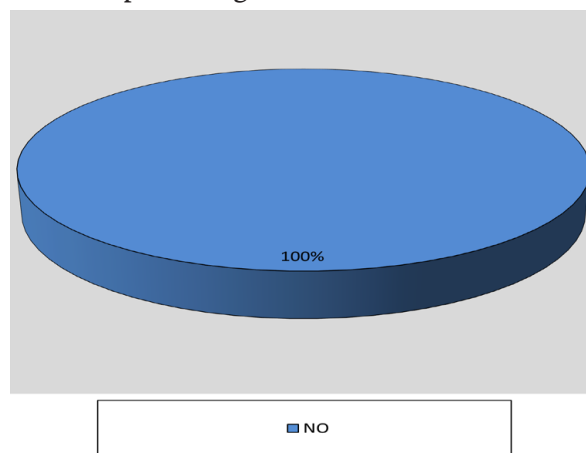
LIMÓN ORNAMENTAL o *Swinglea glutinosa* Bl Merr

Lo conoce

Sí: 0

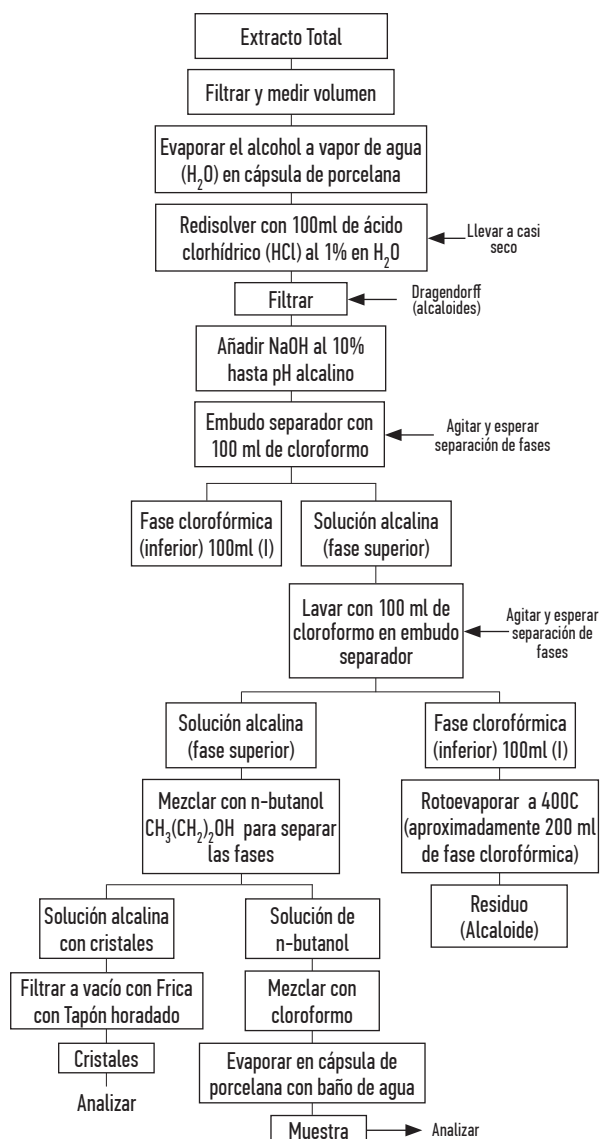
No: 48

Lo ha empleado alguna vez



PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN DE ALCALOIDES DEL FRUTO DE *Swinglea glutinosa* Bl Merr

Procesamiento del material vegetal. Para la recolección y procesamiento del material vegetal se tuvo en cuenta que los frutos seleccionados fueran lo más saludables y representativo posible. (Miranda y Cuéllar, 2001) Para lo cual se diseñó el siguiente Diagrama de Flujo:



Durante éste fraccionamiento fue factible verificar la presencia de alcaloides en *Swinglea glutinosa* Bl Merr cubana tanto por tamizaje fitoquímico; por Cromatografía; así como los reportados anteriormente en la literatura. Se evidenció el carácter ácido débil que puede estar dado tanto por la presencia de diferentes metabolitos secundarios tales como: fenoles, flavonoides, taninos, triterpenoides y esteroides detectados en el tamizaje fitoquímico, fundamentalmente fenoles y taninos en cuyas estructuras presentan grupos funcionales como los hidroxilos fenólicos que aportan esta característica al medio; la posible presencia de los ácidos ascórbico y cítrico (en los cristales obtenidos, durante el fraccionamiento) así como a las propiedades ácidas débiles que aporta la disolución hidroalcohólica empleada en la elaboración del extracto.

También en el tamizaje y en las cromatografías se identificaron la presencia de flavonoides, alcaloides y triterpenoides, se llevó a cabo la obtención y caracterización de los extractos hidroalcohólicos de las diferentes partes del fruto de esta especie; caracterizados e informados con anterioridad.

Ensayo del efecto antiparasitario y citotoxicidad de los extractos hidroalcohólicos de I, II y III del fruto de *S. glutinosa*.

Ensayo del efecto antiparasitario. La actividad de los extractos hidroalcohólicos del exocarpo (I), el mesocarpo (II) y las semillas (III) del fruto de *Swinglea glutinosa* Bl Merr evaluados frente a promastigotes de *L. amazonensis* y citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c se muestra en la figura 2. En relación a la actividad anti-leishmanial, todos los extractos evaluados se consideraron activos, ya que mostraron una $CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ frente a promastigotes (García 1992). Como puede apreciarse, todos los extractos presentaron una actividad en el mismo rango, no presentando diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$).

Ensayo del efecto de citotoxicidad En cuanto a la citotoxicidad demostrada frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, tampoco se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los extractos. En general la composición química de los tres extractos referida en el tamizaje fitoquímico, CCD, CLAR, IR y UV es similar. Sin embargo, al comparar los valores de CI_{50} de actividad y citotoxicidad, pudo apreciarse que todos los productos evaluados presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Estos resultados nos permiten sugerir la actividad anti-leishmanial específica de *Swinglea glutinosa* Bl Merr considerándose un resultado científico novedoso; sin precedentes en Cuba.

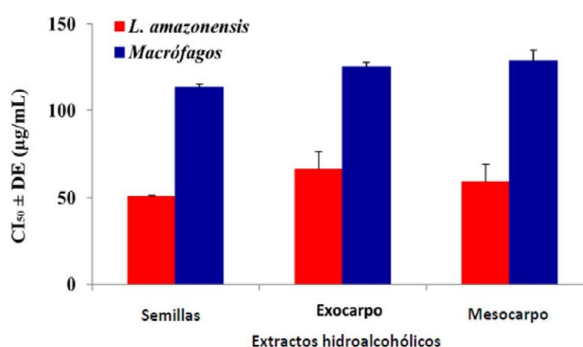


Figura 8. Valores de CI_{50} de los extractos de *Swinglea glutinosa* Bl Merr frente a promastigotes de *L. amazonensis* y macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. CI_{50} : Concentración que causa el 50 % de inhibición del crecimiento; DE: Desviación estándar de tres experimentos.

Determinación de la citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

Por otra parte, la pentamidina, fármaco de referencia utilizado en este estudio, mostró una CI_{50} de $0,4 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ frente a promastigotes de *L. amazonensis* y de $11,7 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c (Beach, Campbell & Andrews, 1999). Como puede apreciarse, la actividad de este producto fue mayor que la de los extractos evaluados, pero hay que tener en cuenta que la pentamidina es un compuesto con un alto grado de pureza (>98%); mientras que los productos nuevos evaluados en este trabajo son extractos donde es posible que el principio activo responsable de la actividad anti-leishmanial se pudiera encontrar en un bajo porcentaje. En paralelo, los extractos presentan una mezcla compleja de compuestos, por lo que pueden existir interacciones entre ellos que potencien o antagonicen el efecto causado. No obstante, el simple hecho de demostrar el efecto esperado (actividad anti-leishmanial) es muy alentador por consiguiente sólo restaría ajustar la dosis en cuanto a concentración y pureza, teniendo en cuenta que es la primera investigación realizada en Cuba que aporta resultados científicos y datos novedosos

Conclusiones

Como resultado de la encuesta el 100% de los encuestados para un 60.4% del sexo femenino y 39.5% masculino, distribuidos en edades: 35% entre 18-35 años; 27% entre 36-45 años; 25% entre 46-69 años; 12% >60 años concluyeron que no conocen el limón ornamental o *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr cubano; ni su uso contra leishmania

Los frutos de *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr cubano; no son comestibles por que los aldehídos terpénicos acíclicos están dentro de la composición química de la planta en elevadas concentraciones; los cuales causan Toxicidad Aguda Oral.

Los extractos hidroalcohólicos al 70% de las tres partes del fruto presentaron actividad anti-leishmanial y citotoxicidad frente a macrófagos con valores de CI_{50} menores que $100 \mu\text{g/mL}$. Dando lugar a que el presente trabajo, constituye el primero realizado en Cuba y aporta resultados científicos y datos novedosos.

El procedimiento de aislamiento y purificación de alcaloides extraídos del extracto total de *Swinglea glutinosa* Bl Merr y ensayos sobre cepas de *Plasmodium falciparum*, reportándose actividad inhibitoria del protozoo y, por consiguiente, acción antimalárica.

Referencias bibliográficas

- Alonso, J. 2007. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Edit Corpus
- Alonso, M. J. 2010. Plantas medicinales: del uso tradicional al criterio científico. Discurso leído en el acto de ingreso de la Académica Correspondiente. Barcelona.
- Beach, J., R. M. Campbell and D. J. Andrews. 1999. Exposure of health care workers to pentamidine isethionate. *Occup. Med.*, 1999; 49(4), 243-245.
- C. M. Morton, .2009. Phylogenetic relationships of the Auratioideae (Rutaceae) based.; Science-Direct.com. <https://www.sciencedirect.com/pii>
- Cerqueira. C.; Dos Santos.d.; Malaquias. K.; Castro. M.; Fernandez da Silva. F.; Batista. J.; Vieira. P. 2012. Novels N-benzoyltyramines of *Swinglea glutinosa* (Rutaceae). *Quím. Nova*, vol.35 no.11 São Paulo
- Chaya, N.; Terauchi, K.; Yamagata, Y.; Kinjo, J.; Okabe, H.; *Biol. 2004. Pharm. Bull.* 27, 1312
- Chlouchi, G.C. et al., 2006. Taxonomically significant coumarins from three *Philothea* species (Rutaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2007: 35, 251-254
- Cuéllar, P. 2015. Comunicación personal. Procedimiento de fraccionamiento y purificación de alcaloides a partir de *Swinglea glutinosa* Merr, cubana.
- D. A. González, 2020. Diversidad, recambio de especies y rasgos funcionales. Repositorio Institucional Javeriano. <https://repository.javeriana.edu.co...PDF>
- García B. H., *Flora Medicinal De Colombia*. Vol. I, II. 1992, Bogotá: Tercer Mundo Editores. 83, 95
- Gil, A.I. 2006. Actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Swinglea glutinosa* Merr... *Academia.edu*. <https://www.academia.edu>. Activi
- IndiKit, Guía Rápida para Encuestas, 2017. <https://www.indikit>files.PDF>.
- Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M.; Takemura, Y.; Motoharu, J.; Ito, C.; Furuhashi, H.; *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 587.
- Lizalda, C. 2008. Estudio Fitoquímico y Alelopático de Extractos Polares de las Hojas de las hojas de *Swinglea glutinosa* Merr. (Rutaceae).
- Martínez Aguilar. 2012. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos. *SciELO Cuba*..<http://scielo.sld.cu>scielo>
- Miranda, M. y Cuéllar, A. 2000. Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia. y productos naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, 44-49.
- Miranda, M. y Cuéllar, A. 2001. Farmacognosia y productos naturales. Editorial Félix Varela. La Habana 2001, 118. ISBN 959-258-129-0. Libro
- Pérez, F. 2016. Phylogenetic relationships of the Aurantioideae (Rutaceae) based on the nuclear ribosomal DNA ITS region and three noncoding chloroplast DNA regions, atpB-rbcL spacer, rps16, and trnL-trnF
- Purcaro, R.; Schrader, K. K.; Burandt, C.; DellaGreca, M.; Meepagala, K. M.; J. 2009. *Agric. Food Chem.*, 57, 10632.
- Salimon y col. 2010. Antiparasitic Activities of Acridone Alkaloids from *Swinglea*...*ResearchGate*. <https://www.researchgate.net >244>
- Sladowski, D. Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improve MTT assay. *J Immunol Methods* 1993; 157:203-7
- Vanaclocha, B. y S. Cañigüeral, 2003. *Fitoterapia. Vademécum de prescripción*. Masson. 4ª edición.
- Wang, Y., 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, 106: 277-284.
- Weninger B.; S. Robledo; G. J. Arango; E. Deharo; R. Aragón; V. Muñoz; J. Callapa; A. Lobstein y R. Anton. 2001. Antiprotozoal Activities Of Colombian Plants, *journal of ethnopharmacology*. 78:193-200
- Weninger, B. 2001 Bioactive Acridone Alkaloids from *Swinglea Glutinosa*, *journal of Natural Products*. 64, 1221-1223
- Weninger, B.; Um, B-H.; Valentin, A.; Estrada, A.; Lobstein, A.; Anton, R.; Maillé, M.; Sauvain, M.; J. 2001 *Nat. Prod.*, 64, 1221.
- Wu, T-S.; Chen, C-M.; *Chem. Pharm. Bull.* 2000. 48, 85.
- Wu, T-S.; Kuoh, C-S.; Furukawa, H.; *Phytochemistry*. 1983, 22, 1493.
- Martínez Aguilar. 2012. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos. *SciELO Cuba*..<http://scielo.sld.cu>scielo>
- Yamamoto, N.; Furukawa, H.; Ito, Y.; Yoshida, S.; Maeno, K.; Nishiyama, Y.; *Antiviral Res.* 1989, 12, 21.
- Yamamoto, N.; Furukawa, H.; Ito, Y.; Yoshida, S.; Maeno, K.; Nishiyama, Y. 1989. *Antiviral Res.*, 12, 21.

