



CIENCIAS BIOMÉDICAS

Artículo Original de Investigación

Potencial antileishmanial de productos derivados de *Bixa orellana* L. (Bixaceae) sobre la leishmaniasis cutánea

Lianet Monzote ¹ <https://orcid.org/0000-0002-1958-809X>
Marley García ¹ <https://orcid.org/0000-0001-5600-6987>
Laura Machín ² <https://orcid.org/0000-0002-0708-6789>
Ramón Scull ² <https://orcid.org/0000-0001-6401-221X>
Ana M. Montalvo ¹ <https://orcid.org/0000-0001-5776-937X>
Abel Piñón ¹ <https://orcid.org/0000-0001-6268-8523>
Beatriz Tamargo ² <https://orcid.org/0000-0001-9128-7876>
Caridad Atíes ² <https://orcid.org/0000-0003-2102-0724>
Yamilet Gutiérrez ² <https://orcid.org/0000-0002-8885-4849>

¹ Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. La Habana, Cuba

² Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: monzote@ipk.sld.cu

RESUMEN

Introducción. La investigación basada en plantas medicinales es una de las estrategias recomendadas para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis. En este estudio, se demuestran las potencialidades de productos derivados de *Bixa orellana* L. sobre *Leishmania amazonensis*, agente causal de la leishmaniasis cutánea (LC). **Métodos.** Se obtuvieron los productos de las semillas de *Bixa* (extractos, fracciones, subfracciones y aceite esencial), los cuales fueron evaluados en diferentes modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*. **Resultados.** El extracto hidroalcohólico causó inhibición del crecimiento de promastigotes y amastigotes, fue capaz de controlar el desarrollo de la LC experimental en ratones BALB/c (100 mg/kg/día/15 días/intraperitoneal), y se obtuvo su perfil químico. Posteriormente, se realizó un estudio bioguiado con 4 fracciones y 28 sub-fracciones, de las cuales BO-B1 y BO-B3 resultaron promisorias y se identificaron un grupo de isómeros alifáticos (bixina y la norbixina). El aceite esencial fue el otro producto obtenido, el cual fue caracterizado químicamente, inhibió el crecimiento de amastigotes, mostró una citotoxicidad 7 veces menor respecto a la actividad sobre el parásito, fue efectivo contra la LC experimental (30 mg/kg/día/15 días/intraperitoneal e intralesional) y se evidenció una inhibición de manera específica del consumo de oxígeno y el complejo II mitocondrial. El aceite esencial formulado en nanococleatos demostró una alta eficacia en el modelo murino al administrar 4 dosis por vía intralesional. Los resultados de esta investiga-

Revisores

Roberto Cañete Villafranca
Dirección de Salud Pública. Universidad de
Ciencias Médicas. Matanzas, Cuba

Ivette Camayd Viera
Centro Nacional de Genética Médica.
La Habana, Cuba

Editora

M. Sc. Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

Traductor

Dr. C. Yoan Karell Acosta González
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba



ción demuestran las potencialidades de las semillas de *B. orellana* sobre *L. amazonensis* para el tratamiento de la LC, enfermedad con diversas presentaciones clínicas que cuenta actualmente con limitadas opciones terapéuticas.

Palabras clave: *Bixa orellana*; *Leishmania amazonensis*; leishmaniasis cutánea; nanococleatos; mitocondria

Antileishmanial potential of derived product from *Bixa orellana* L. (*Bixaceae*) against cutaneous leishmaniasis

ABSTRACT

Introduction. Research based on medicinal plants is one of the recommended strategies for the search for new therapeutic alternatives against leishmaniasis. In this study, the potential of products derived from *Bixa orellana* L. on *Leishmania amazonensis*, a causal agent of cutaneous leishmaniasis (CL), is demonstrated. **Methods.** *Bixa* seed products (extracts, fractions, sub-fractions and essential oil) were obtained, which were evaluated in different in vitro and in vivo biological models. **Results.** The hydroalcoholic extract caused inhibition of the growth of promastigotes and amastigotes, was able to control the development of experimental CL in BALB/c mice (100 mg/kg/day/15 days/intraperitoneal), and its chemical profile was obtained. Subsequently, a bio-guided study was performed with 4 fractions and 28 sub-fractions, which BO-B1 and BO-B3 were promising and a group of aliphatic isomers (bixin and norbixin) were identified. The essential oil was the other product obtained, which was chemically characterized, inhibited the growth of amastigotes, showed a cytotoxicity seven times lower with respect to the activity on the parasite, was effective against the experimental CL (30 mg/kg/day/15 days/intraperitoneal and intralesional) and a specific inhibition of oxygen consumption and mitochondrial complex II was evidenced. The essential oil formulated in nanocochleates showed high efficacy in the murine model when 4 doses were administered intralesionally. The results of this research demonstrate the potential of *B. orellana* seeds on *L. amazonensis* for the treatment of CL, a disease with various clinical presentations that currently has limited therapeutic options.

Keywords: *Bixa orellana*; *Leishmania amazonensis*; cutaneous leishmaniasis; nanocochleates; mitochondria

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es causada por la transmisión zoonótica o antroponótica de parásitos protozoarios del género *Leishmania* (*Trypanosomatidae*). Estas enfermedades siguen siendo enfermedades tropicales desatendidas, reportándose cerca de 20 especies de parásitos de *Leishmania* que alternan su ciclo de vida en 2 formas: a) el promastigote extracelular y b) el amastigote intracelular. ⁽¹⁾

Históricamente, la leishmaniasis se ha limitado a regiones endémicas, aunque las estimaciones actuales sugieren

que más de 10 millones de personas están infectadas, con 2 millones de casos nuevos y más de 20 000 muertes anualmente. ⁽²⁾ El diagnóstico de estas enfermedades es limitado. Dependiendo de la especie involucrada y la respuesta inmune del huésped, pueden presentarse un amplio espectro de manifestaciones clínicas que varían desde la leishmaniasis cutánea (LC) a la forma visceral (LV). ⁽³⁾

Los tratamientos antileishmaniales que actualmente se encuentran disponibles incluyen los derivados de antimonio pentavalente, la pentamidina, la miltefosina, la anfotericina B y la paramomicina, cuyo uso está principalmente limitado en

regiones endémicas, debido a la ineficacia, toxicidad y altos costos. ^(4,5) Además, la ausencia de vacunas, conlleva a la necesidad de buscar nuevas opciones de tratamiento para los pacientes infectados por *Leishmania*. Durante la última década, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto como una de las estrategias más atractivas la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antileishmanial a partir de fuentes naturales. En este sentido, la actividad antileishmanial de productos derivados fundamentalmente de plantas ha sido ampliamente explorado. ⁽⁶⁾ Teniendo en cuenta la amplia y rica flora existente en Cuba, diferentes productos han sido evaluados, entre los que figuran los derivados de *Bixa orellana* L (familia *Bixaceae*). Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron las potencialidades de extractos, fracciones, subfracciones y el aceite esencial obtenido de las semillas de esta planta sobre la LC.

MÉTODOS

Plantas y productos de *B. orellana*: Las plantas fueron colectadas en los alrededores del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana e identificadas por el MSc. Ramón Scull. Un espécimen fue depositado en el Jardín Botánico Nacional de La Habana, Cuba, con el número de ejemplar JBN-9600288. Las semillas fueron seleccionadas y secadas en estufa con ventilación. El extracto fluido se preparó mediante maceración de 7 días con etanol al 80 % de acuerdo con el reglamento NR309. ⁽⁷⁾ A partir de este, se realizó un primer paso de fraccionamiento por agotamiento utilizando diferentes solventes de polaridad creciente (n-hexano, acetato de etilo y metanol) para obtener 4 fracciones con el residuo final: BO-A,

BO-B, BO-C, y BO-D. El disolvente se evaporó y cada fracción se sometió a un segundo paso de subfraccionamiento en una columna LH-20 sephadex de 2 cm x 30 cm utilizando metanol como fase móvil para obtener 10, 5, 4 y 9 subfracciones de BO-A, BO-B, BO-C, y BO-D, respectivamente. En todos los casos se evaporó el disolvente y se liofilizó.

El aceite esencial se obtuvo mediante hidrodestilación de las semillas utilizando un equipo tipo Clevenger durante 5 h. Este producto en particular fue utilizado para obtener una formulación basada en nanococleatos. De todos los productos se separó una muestra para realizar la caracterización química y otra fue diluida en dimetilsulfóxido a una concentración de 20 mg/mL para los ensayos biológicos.

Modelos biológicos: Para las evaluaciones biológicas de los productos obtenidos de *B. orellana* se utilizó la cepa de referencia de *L. amazonensis* (MHOM/77BR/LTB0016) y en los estudios de mecanismo de acción la especie de *L. tarentolae* (P10). Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo sobre promastigotes o amastigotes intracelulares; mientras que para los experimentos *in vivo* se utilizó el modelo de LC experimental en ratones BALB/c (código de aprobación CEI-IPK 14-12).

RESULTADOS

El extracto hidroalcohólico evaluado mostró actividad significativa contra promastigotes y amastigotes con una concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 22,1 $\mu\text{g/mL} \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ y 9,1 $\mu\text{g/mL} \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Sin embargo, la toxicidad fue moderada, con una concentración citotóxica media (CC_{50}) de 224,6 $\mu\text{g/mL} \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$ e índice de selectividad de 25, lo que sugirió la actividad específica para *Leish-*

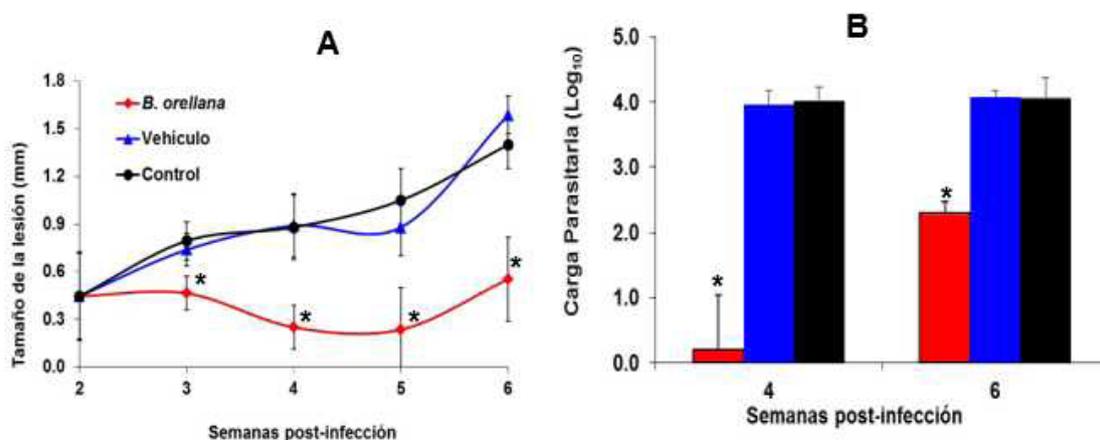


Fig. 1. Efecto del extracto hidroalcohólico de semillas de *Bixa orellana* en ratones BALB/c infectados con *Leishmania amazonensis*. A: Tamaño de la lesión; B: Carga parasitaria. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al vehículo y el control

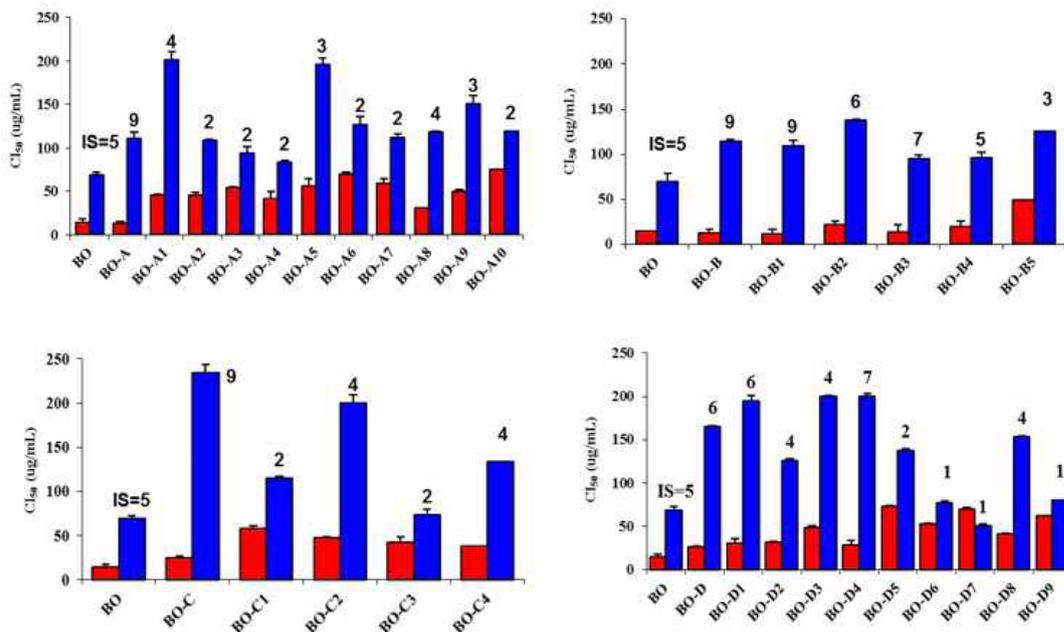


Fig. 2. Actividad sobre amastigotes de *Leishmania amazonensis* e índice de selectividad de fracciones de semillas de *Bixa orellana*

mania. El tratamiento de ratones con el extracto no provocó la muerte o pérdida de peso superior al 10 %. Una reducción significativa ($p < 0,05$) en el tamaño de las lesiones en los animales tratados con el extracto fue observado durante los primeros 14 días en comparación con el otro grupo (figura 1A), lo cual fue corroborado mediante la determinación de la carga parasitaria (figura 1B).

La figura 2 muestra la actividad antileishmanial y citotoxicidad de los extractos, fracciones y subfracciones de semillas de *B. orellana*. Las fracciones BO-A y BO-B mostraron la mayor actividad con valores de CI_{50} de $12,9 \mu\text{g/mL} \pm 4,1 \mu\text{g/mL}$ y $12,4 \mu\text{g/mL} \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Las subfracciones BO-B1 y BO-B3 mantuvieron la misma actividad ($p > 0,05$) que la fracción original con valores de CI_{50} de $11,8 \mu\text{g/mL} \pm 3,8 \mu\text{g/mL}$ y $13,6 \mu\text{g/mL} \pm 4,7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. El análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) de la sub-fracción BO-B1 mostró las principales señales en la región alifática del espectro de ^1H RMN que sugiere la presencia de compuestos alifáticos, en específico isómeros de la bixina y su análogo la norbixina.

Los resultados de los análisis cualitativos y cuantitativos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial de las semillas de *B. orellana* mostró un total de 73 compuestos. El ishwarano fue el componente principal, constituyendo 18,6 % del aceite, con menores cantidades de geranilgeraniol (9,1 %), biciclogerma-

creno (8,4 %), germacreno D (6,9 %) y δ -selineno (6,2 %). En los ensayos biológicos, el aceite de *B. orellana* mostró actividad contra amastigote de *L. amazonensis*, con una CI_{50} de $8,5 \pm 0,8 \text{ mg/mL}$. La CC_{50} fue 7 veces mayor para las células hospederas en comparación con los parásitos. Por otra parte, se demostró la capacidad de este producto para controlar la enfermedad establecida en ratones BALB/c. El efecto sobre la progresión de la LC fue evidente por el tamaño de la lesión y la carga parasitaria, que mostraron una reducción significativa ($p < 0,05$) en ratones tratados con el aceite en comparación con los animales tratados con el vehículo o sin tratar (figura 3). Paralelamente, no se observaron muertes ni pérdidas de peso superior al 10 %.

El aceite esencial inhibió el consumo de oxígeno de promastigotes de *Leishmania* en concentraciones comparables ($p > 0,05$) con las que causaron inhibición del crecimiento (figura 4). En consecuencia, examinamos su impacto sobre los complejos de la cadena de transporte electrónico, donde se evidenció una inhibición del complejo I y II, con CI_{50} de $0,8 \mu\text{g/mL} \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ y $41,9 \mu\text{g/mL} \pm 2,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, los cuales fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) que los mostrados para la célula hospedera.

A partir del aceite esencial se diseñaron y prepararon nanocoleatos basados en fosfolípidos obtenidos de lecitina de soya, los cuales fueron evaluados en los diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. En relación al ensayo anti-amastigote, la for-

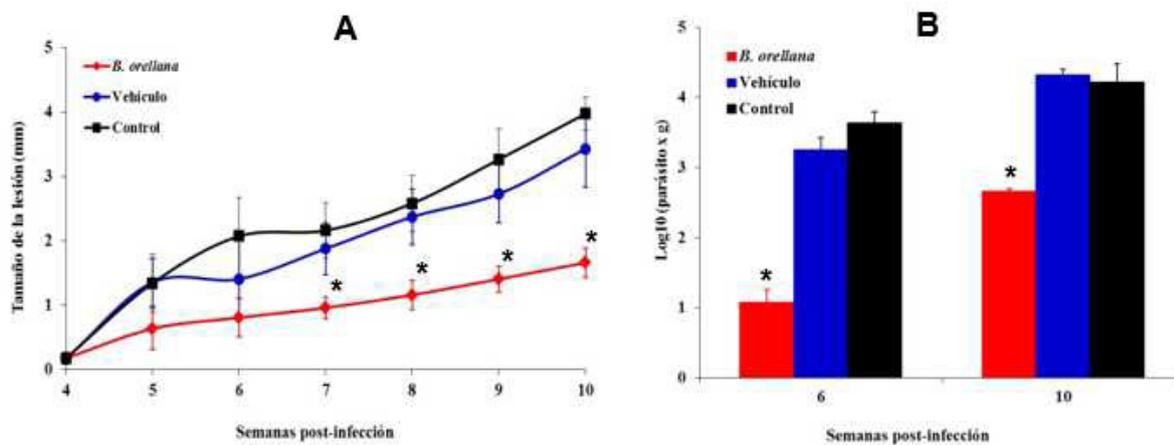


Fig. 3. Efecto del aceite esencial de semillas de *Bixa orellana* en ratones BALB/c infectados con *Leishmania amazonensis*. A: Tamaño de la lesión; B: Carga parasitaria. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al vehículo y el control.

mulación de nanococleato mantuvo la actividad leishmanicida *in vitro* ($p > 0,05$) y redujo la citotoxicidad ($p < 0,05$) con respecto al aceite solo, con valores de CI_{50} y CC_{50} de $15,4 \mu\text{g/mL} \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$ y $94,6 \mu\text{g/mL} \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. En el ensayo *in vivo*, el tratamiento de ratones con el aceite esencial puro y en su formulación (30 mg/kg/vía intralesional/cada 4 días/4 dosis total) no causó mortalidad ni pérdida de peso superior al 10 %. Sin embargo, los animales tratados con la formulación del nanococleato mostraron menor tamaño de la lesión ($p < 0,05$) que los controles y comparable ($p > 0,05$) a los efectos del Glucantime® (fármaco de referencia). Adicionalmente, la carga parasitaria del grupo tratado fue de $\text{Log}_{10} = 3,33\text{-}3,93$ parásito/g (figura 5).

DISCUSIÓN

A pesar de los esfuerzos, la ausencia de vacunas antileishmaniales en un futuro próximo hace que el descubrimiento de quimioterapias efectivas es una necesidad urgente, especialmente para las regiones endémicas pobres. (8) En consecuencia, los productos a partir de fuentes naturales han llegado a representar una fuente ilimitada de entidades químicas con actividad antileishmanial. (9)

De forma general, los productos evaluados en este trabajo a partir de las semillas de *B. orellana* cumplen los criterios internacionales recomendados para la selección de compuestos promisorios con actividad antileishmanial, (10,11) que incluyen: a) actividad inhibitoria *in vitro* con CI_{50} menor que

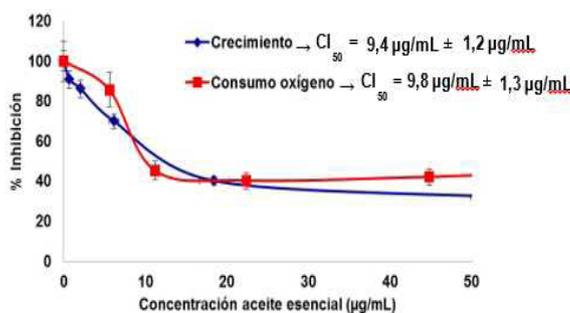


Fig. 4. Efecto del aceite esencial de semillas de *Bixa orellana* sobre la viabilidad y el consumo de oxígeno de promastigotes de *Leishmania tarentolae*. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar.

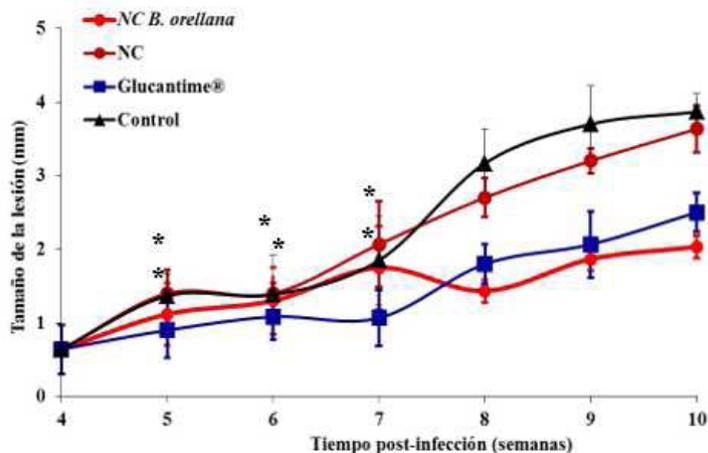


Fig. 5. Efecto de nanococleatos con el aceite esencial de semillas de *Bixa orellana* en ratones BALB/c infectados con *Leishmania amazonensis* sobre el tamaño de la lesión. NC B. orellana: nanococleato con el aceite de *Bixa*, NC: Nanococleato vacío. *: Diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto al vehículo y el control.

10 µg/mL; b) índice de selectividad mayor que 5; c) activo *in vivo* a dosis menor e igual 100 mg/kg por vía intraperitoneal y a dosis menor que 100 mg/kg por vía oral o intralesional, y d) no causar signos de toxicidad a las dosis terapéuticas.

Conclusiones

Por lo tanto, se describe por primera vez a nivel internacional la obtención de diferentes productos con actividad antileishmanial potencial de las semillas de *B. orellana* cultivada en Cuba. (12-17) El estudio bioguiado resultó en una fracción con actividad antileishmanial promisorio, al igual que el aceite esencial, del cual además se demostró su mecanismo de acción. En particular, se destacan los nanococleatos del aceite esencial como una nueva formulación para el tratamiento de la LC, enfermedad con diversas presentaciones clínicas que cuenta actualmente con limitadas opciones terapéuticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 2017;10:82.
2. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New world and old world leishmania infections: A practical review. *Dermatol. Clin.* 2015;33:579-93.
3. Torres Guerrero E, Quintanilla Cedillo MR, Ruiz Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: A review. *F1000 Research* 2017;6:750.
4. Monzote L. Antileishmanial current drugs and relevant patents. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2011;6:1-26.
5. Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drug Resist.* 2014;4:95-111.
6. Cortes S, Bruno de Sousa C, Morais T, Lago J, Campino L. Potential of the natural products against leishmaniasis in Old World - a review of in-vitro studies. *Pathog Glob Health.* 2020;114:170-82.
7. Ramal N: NRSP 309: Medicamentos de Origen Vegetal. Droga Cruda. Métodos de Ensayos. Habana, MINSAP,1992.
8. Ogungbe IV, Singh M, Setzer WN. Antileishmanial natural products from plants. *Stud Nat Prod Chem.* 2012;36:331-81.
9. Oryan A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iran J Vet Res.* 2015;16:1-19.
10. Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, van Huijsduijnen RH, Kaneko T, Kita K, *et al.* Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing World. *Nat Rev Drug Discover.* 2015;14:751-8.
11. Caridha D, Vesely B, van Bocxlaer K, Arana B, Mowbray CE, Rafati S, *et al.* Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. *IJP: Drug Drug Resist.* 2019;13:73-88.
12. García M, Monzote L. *Bixa orellana*: Properties and Applications. *Rec Prog Med Plant* 2010;30(2):25-35.
13. García M, Monzote L, Montalvo AM, Scull R. *Bixa orellana* against *Leishmania amazonensis*. *Res Complementary* 2011;18:351-3.
14. García M, Scull R, Cuesta O, Boulet G, Maes L, Cos P, Monzote L. Bioassay-guided in vitro study of the antileishmanial and cytotoxic properties of *Bixa orellana* seed extract. *J Coastal Life Med* 2014;2(6):484-9.
15. Monzote L, Staniek K, Scull R, Cuesta Rubio O, Gille L. The mitochondrial electron transport chain as drug target in the development of new anti-protozoal agents. *Rev Cub Farmacia* 2014;48(1):30.
16. Monzote L, García M, Scull R, Cuellar A, Setzer WN. Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. *Phytother Res* 2014;28(5):753-8.
17. Machín L, Tamargo B, Piñón A, Atíes RC, Scull R, Setzer WN, Monzote L. *Bixa orellana* L. (Bixaceae) and *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Amaranthaceae) Essential Oils Formulated in Nanococleates against *Leishmania amazonensis*. *Molecules* 2019;24:4222.

Recibido: 20/11/2021

Aplicado: 16/01/2022

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración científico-técnica del Profesor Lars Gille, Profesor William N. Setzer, Profesor Osmany Cuesta-Rubio, Profesora Katrin Staniek y Profesor Paul Cos. Agradecemos además la concesión de una beca Ernst Mach a Lianet Monzote por la Agencia Austriaca para la Movilidad Internacional y la Cooperación en la Educación, Ciencia e Investigación (OEAD) de Austria.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses entre ellos, ni con la investigación presentada.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Lianet Monzote

Curación de datos: Lianet Monzote, Marley García, Laura Machín

Análisis formal: Marley García, Laura Machín, Ramón Scull, Yamilet Gutiérrez

Investigación: Lianet Monzote, Marley García, Laura Machín, Ramón Scull, Abel Piñón, Caridad Atías

Metodologías: Lianet Monzote, Ana M. Montalvo, Beatriz Tamargo

Administración de proyecto: Lianet Monzote

Recursos: Ana M. Montalvo, Beatriz Tamargo

Supervisión: Lianet Monzote

Visualización: Lianet Monzote, Marley García, Laura Machín

Redacción-borrador original: Lianet Monzote, Marley García, Laura Machín

Redacción-revisión y edición: Lianet Monzote, Marley García, Laura Machín, Ramón Scull, Ana M. Montalvo, Abel Piñón, Beatriz Tamargo, Caridad Atías, Yamilet Gutiérrez

Financiación

Este proyecto fue financiado por el Ministerio de Salud Pública y Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba (1003021/2010).

Cómo citar este artículo

Monzote L, García M, Machín L, Scull R, *et al.* Potencial antileishmanial de productos derivados de *Bixa orellana L. (Bixaceae)* sobre la leishmaniasis cutánea. An Acad Cienc Cuba [internet] 2022 [citado en día, mes y año];12(3):e1179. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1179>

