



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas

**METABOLITOS CON ACTIVIDAD LEISHMANICIDA
AISLADOS DE LA RAÍZ DE *Dorstenia contrajerva***

Tesis que presenta

DEISY YOLANDA MEDRANO NAHUAT

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

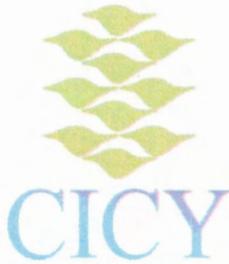
Mérida, Yucatán, México

Octubre, 2014



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **METABOLITOS CON ACTIVIDAD LEISHMANICIDA AISLADOS DE LA RAÍZ DE *Dorstenia contrajerva*** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

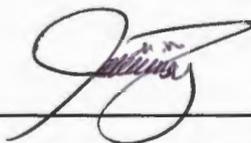
Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota
Director de Docencia
Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Mérida, Yucatán, a 14 de octubre de 2014.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales y de Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Deisy Yolanda Medrano Nahuat

DEDICATORIAS

A mis padres, Deisy Nahuat Tuz y José Medrano Lizama por su amor, comprensión, y porque me han dado todo lo que soy como persona, mi carácter, mis principios, mi empeño y perseverancia para conseguir mis objetivos.

A mis hermanitas, Karla y Salma por brindarme siempre su apoyo y ser incondicionales ante todo, es especial a Karla por ser un ejemplo vivo de que nunca hay que dejarse vencer por las adversidades y siempre salir adelante.

A mi novio Carlos, por su amor, paciencia, su apoyo en todo momento y por permanecer siempre a mi lado en todo este tiempo.

Les dedico de todo corazón este logro más en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo financiero a través del proyecto de Ciencia Básica 105346 con título "Aislamiento y evaluación *in vitro* de metabolitos de plantas nativas de Yucatán con actividad antiprotozoaria" y por la beca mensual otorgada con número 334485.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por las facilidades para la realización de este proyecto, en especial a la Unidad de Biotecnología así como también a la Subdirección de Posgrado.

A mi director de tesis el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, por la confianza brindada al permitirme una vez más ser parte de su equipo de trabajo y por sus valiosos aportes de carácter científico para la realización y culminación exitosa de este trabajo.

Al técnico M. en C. Luis W. Torres Tapia, por compartir sus conocimientos fitoquímicos y por su constante apoyo y disposición.

A la Dra. Rosario García Miss y a la técnica Q.F.B. Mirza Mut Martín, del Laboratorio de Inmunobiología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la UADY, por las facilidades prestadas y por compartir sus conocimientos para la realización de los bioensayos de este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial, Dr. Felipe Barahona Pérez y Dra. Rubí Gamboa León, por las contribuciones y críticas constructivas que ofrecieron para mejorar este trabajo.

A los integrantes de mi comité revisor de tesis, Dr. Ignacio Hernández Chávez y Dra. Marcela Gamboa Angulo, por su apoyo y tiempo dedicados para la revisión de este documento.

Al Téc. Paulino Simá Polanco, de la Unidad de Recursos Naturales del CICY, por el apoyo brindado para la colecta e identificación taxonómica de la planta *Dorstenia contrajerva*.

A mis amigos de laboratorio, Arely Vargas, Ana Carrillo, Ana Ruiz, Carlos Quintal, Ángel Cruz, Carely Arjona y Daniela Hurtado, por sus consejos, ayuda y gratos momentos compartidos que hicieron que esta experiencia sea aún más fructífera.

INDICE

INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	7
2.1. LEISHMANIOSIS	7
2.1.1. CICLO DE TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIA	10
2.1.2. EPIDEMIOLOGÍA	11
2.1.3. TRATAMIENTOS.....	13
2.1.4. METABOLITOS SECUNDARIOS CON ACTIVIDAD LEISHMANICIDA.....	15
2.2. PLANTAS MEDICINALES Y PRODUCTOS NATURALES COMO FUENTES DE NUEVAS DROGAS	17
2.3. <i>DORSTENIA CONTRAJERVA</i>	18
2.3.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y TAXONÓMICA DE <i>DORSTENIA CONTRAJERVA</i>	19
2.3.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE <i>DORSTENIA CONTRAJERVA</i>	20
2.3.3. FITOQUÍMICA DE <i>DORSTENIA CONTRAJERVA</i>	21
2.3.4. USOS ETNOBOTÁNICOS DE <i>DORSTENIA CONTRAJERVA</i>	23
2.3.5. DATOS FARMACOLÓGICOS DE <i>DORSTENIA CONTRAJERVA</i>	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVO	25
5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25

BIBLIOGRAFÍA.....	27
CAPITULO II	35
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>DORSTENIA</i> <i>CONTRAJERVA</i> PRESENTES EN LAS FRACCIONES ACTIVAS CONTRA PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA MEXICANA</i>.....	35
2.1. INTRODUCCIÓN	35
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.2.1. MATERIALES EN GENERAL	35
2.3. MATERIAL VEGETAL	37
2.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO Y PARTICIONES	37
2.5. FRACCIONAMIENTO DE DCR-2A.....	38
2.5.1. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 1	39
2.5.2. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 2	39
2.5.3. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 3	40
2.5.4. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 4	41
2.5.5. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 5	43
2.5.6. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 6	45
2.5.7. AISLAMIENTO DEL COMPUESTO 7	46
2.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
2.7. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y PARTICIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	47
2.8. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 1	47
2.9. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 2	49
2.10. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 3	54
2.11. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 4	61
2.12. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 5	61
2.13. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 6	69
2.14. IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 7	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

CAPITULO III	89
ACTIVIDAD CONTRA PROMASTIGOTES DE <i>L. MEXICANA</i> DEL EXTRACTO METANÓLICO Y COMPUESTOS AISLADOS DE LAS RAÍCES DE <i>D. CONTRAJERVA</i>	89
3.1. INTRODUCCIÓN	89
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	89
3.3. BIOENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA MEXICANA</i>	89
3.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	89
3.3.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS, FRACCIONES Y COMPUESTOS PUROS DE <i>DORSTENIA CONTRAJERVA</i>	90
3.3.3. CURVA DE CRECIMIENTO.....	91
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
3.5. ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES DE <i>D. CONTRAJERVA</i>	92
3.6. ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE METABOLITOS AISLADOS DE <i>D. CONTRAJERVA</i>	94
REFERENCIAS	97
CAPÍTULO IV	98
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	99
4.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	99
4.2. CONCLUSIONES GENERALES	100
PERSPECTIVAS	101
REFERENCIAS	102

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. a) Úlcera en extremidad superior con fondo sucio y bordes eritematosos cortados a pico, b) úlcera en pabellón infiltrada y con fondo ligeramente hemorrágico	8
Figura 1.2. Leishmaniosis difusa	9
Figura 1.3. Leishmaniosis mucocutánea	9
Figura 1.4. Ciclo vital de la <i>Leishmania</i> spp	11
Figura 1.5. Número de casos en 2009 de leishmania cutánea en México	12
Figura 1.6. Gráfico de la tendencia de la leishmania cutánea en México de 1994-2010	13
Figura 1.7. Gráfico de los nuevos fármacos aprobados por la FDA	18
Figura 1.8. Hojas de <i>Dorstenia contrajerva</i>	20
Figura 1.9. Distribución geográfica de <i>D. contrajerva</i> L. en la península de Yucatán	20
Figura 1.10. Estructuras químicas de 1) contrajervina, 2) la 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo-[3-2-g][1]-benzopiran-7-ona, 3) α -L-rhamnopiranosil(-1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil-bergaptol, 4) bergapteno, 5) bergaptol, 6) catequina 8) epicatequina y 9) dorsteniol	21
Figura 1.11. Diagrama de la metodología general	26
Figura 2.1. Esquema de partición del extracto metanólico de raíces de <i>Dorstenia contrajerva</i>	38
Figura 2.2. Diagrama de obtención del compuesto 1 de la fracción DCR-3a.	39
Figura 2.3. Diagrama de obtención del compuesto 2 de la fracción DCR-3d y el compuesto 3 de la fracción DCR-3f	41
Figura 2.4. Diagrama de obtención del compuesto 4 de la fracción DCR-3g	42
Figura 2.5. Diagrama de obtención del compuesto 5 de la fracción DCR-3h	44
Figura 2.6. Diagrama de obtención de los compuestos 6 y 7 de la fracción DCR-3h	46
Figura 2.7. Estructura química del compuesto escualeno (compuesto 1)	48
Figura 2.8. Cromatograma de gases del escualeno (compuesto 1)	48

Figura 2.9.	Espectro de masas del escualeno (compuesto 1)	49
Figura 2.10.	Placa CCD del compuesto 2, corrida en Hx:AcOEt:MeOH (8:1.3:0.2) y revelada con ácido fosfomolibdico	50
Figura 2.11.	Cromatograma de gases del psoraleno (compuesto 2)	50
Figura 2.12.	Espectro de masas del psoraleno (compuesto 2)	51
Figura 2.13.	Espectro de RMN- ¹³ C del psoraleno (compuesto 2) (150 MHz, CDCl ₃)	52
Figura 2.14.	Espectro de RMN- ¹ H del psoraleno (compuesto 2) (600 MHz, CDCl ₃)	53
Figura 2.15.	Estructura del psoraleno (compuesto 2)	54
Figura 2.16.	Placa CCD del compuesto 3, corrida en Hx:AcOEt:MeOH (7:1.7:0.3) y revelada en ácido fosfomolibdico	55
Figura 2.17.	Cromatograma de gases del compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3)	55
Figura 2.18.	Espectro de masas del compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3).	56
Figura 2.19.	Esqueleto base del psoraleno sustituido en C-5 del compuesto 3	56
Figura 2.20.	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3) (150 MHz, CDCl ₃)	57
Figura 2.21.	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3). (600 MHz, CDCl ₃).	58
Figura 2.22.	Fracción 4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil de la estructura del compuesto 3	59
Figura 2.23.	Estructura del 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3)	60
Figura 2.24.	Placa CCD del compuesto 4 corrida en Hx:An (3:1) y revelada con ácido fosfomolibdico	61
Figura 2.25.	Espectro de IR del contrajervatriol (compuesto 4)	61

Figura 2.26.	Espectro de RMN- ¹³ C del contrajervatriol (compuesto 4) (150 MHz, metanol- <i>d</i> ₄).	62
Figura 2.27.	Espectro de RMN- ¹ H del contrajervatriol (compuesto 4) (600 MHz, metanol- <i>d</i> ₄)	63
Figura 2.28.	Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4)	64
Figura 2.29.	Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4). Se observan las correlaciones del protón H-8'	65
Figura 2.30.	Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4). Se observan las correlaciones de los protones H-10' y H-11	65
Figura 2.31.	Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4). Se observa las correlaciones del protón H-10	66
Figura 2.32.	Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4). Se observa las correlaciones de los protones H-2', H-5' y H-6'	67
Figura 2.33.	Estructura del contrajervatriol (compuesto 4)	67
Figura 2.34.	Placa CCD del compuesto 5 corrida en Hx:CH ₂ Cl ₂ :MeOH (3:1.2:0.3) y revelada con ácido fosfomolibdico	69
Figura 2.35.	Espectro de IR del 1-O-(9Z,12Z,15Z-octa-decatrienoil)2-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoil)3-O-β-D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5)	69
Figura 2.36.	Espectro de RMN- ¹ H del 1-O-(9Z,12Z,15Z-octa-decatrienoil)2-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoil)3-O-β-D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5) (600 MHz, CDCl ₃)	70
Figura 2.37.	Espectro de RMN- ¹³ C del 1-O-(9Z,12Z,15Z-octa-decatrienoil)2-O-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoil)3-O-β-D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5) (150 MHz, CDCl ₃).	71
Figura 2.38.	Ampliación del espectro HMBC de la fracción de glicerol del compuesto 5. Se observa las correlaciones de los protones H-1 y H-3	72
Figura 2.39.	Ampliación del espectro ¹ H- ¹ H COSY de la fracción de glicerol del compuesto 5. Se observa la correlación los acoplamiento	72

	vecinales de H-1 y H-3	
Figura 2.40.	Ampliación del espectro de HMBC de la fracción de la galactosa del compuesto 5. Se observan las correlaciones de los protones H-1', H-2', H-3', H-4', H-5' y H-6'	73
Figura 2.41.	Ampliación del espectro de HMBC del compuesto 5. Se observan las correlaciones de los protones H-2''/H-2'' y H-3''	74
Figura 2.42.	Estructura del 1-O-linolenil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5)	75
Figura 2.43.	Placa CCD del compuesto 6 corrida en Hx:CH ₂ Cl ₂ :MeOH (3:1.2:0.3) y revelada con ácido fosfomolibdico	77
Figura 2.44.	Espectro de IR del compuesto 6	78
Figura 2.45.	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 6 (600 MHz, acetona-d ₆)	79
Figura 2.46.	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 6 (150 MHz, acetona-d ₆)	80
Figura 2.47.	Espectro de HSQC del compuesto 6	81
Figura 2.48.	Espectro de HMBC del compuesto 6. Se observa la correlación del protón a δ _H 1.33	82
Figura 2.49.	Ampliación del espectro de HMBC del compuesto 6. Se observa la correlación del protón a δ 1.33	82
Figura 2.50.	Cromatograma de gases del γ-sitosterol (compuesto 7)	84
Figura 2.51.	Espectro de masas del γ-sitosterol (compuesto 7)	84

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1. Compuestos con actividad biológica contra parásitos de <i>Leishmania</i>	15
Tabla 1.2. Algunos metabolitos de diferentes especies del género <i>Dorstenia</i>	22
Tabla 2.1. Rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de <i>Dorstenia contrajerva</i>	47
Tabla 2.2. Datos de los desplazamientos de RMN- ¹³ C del psoraleno en CDCl ₃ en comparación con los reportados en la literatura	53
Tabla 2.3. Datos de los desplazamientos de RMN- ¹ H del psoraleno en CDCl ₃ en comparación con los reportados en literatura	53
Tabla 2.4. Datos de los desplazamientos de RMN- ¹³ C del compuesto 3 en CDCl ₃ en comparación con los reportados en la literatura	59
Tabla 2.5. Datos de los desplazamientos de RMN- ¹ H del compuesto 3 en CDCl ₃ en comparación con los reportados en la literatura	60
Tabla 2.6. Datos espectroscópicos de RMN- ¹³ C del contrajervatriol (compuesto 4) en metanol- <i>d</i> ₄	68
Tabla 2.7. Datos de los desplazamientos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de la fracción del glicerol y galactosa del compuesto 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol en comparación con lo reportado en la literatura	76
Tabla 2.8. Datos de los desplazamientos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del ácido estéarico del compuesto 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol en comparación con lo reportado en la literatura	76
Tabla 2.9. Datos espectroscópicos de RMN- ¹³ C y ¹ H del compuesto 6 en acetona- <i>d</i> ₆	83
Tabla 3.1. Actividad leishmanicida de las fracciones obtenidas por medio de una CLV de la fracción hexánica	93
Tabla 3.2. Actividad leishmanicida de los metabolitos aislados	94
Tabla 3.3. Relación estructura-actividad del psoraleno con respecto a sus derivados	95

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
An- d_6	Acetona deuterada
$CDCl_3$	Diclorometano deuterado
CCD	Cromatografía de capa delgada
CCG	Cromatografía por columna de gravedad
CCS	Cromatografía por columna de sephadex
CCF	Cromatografía por columna flash
CG	Cromatógrafo de gases
CGS	Cromatógrafo de gases sólido
CGL	Cromatógrafo de gases líquido
CLV	Columna líquida de vacío
$CHCl_3$	Cloroformo
GC-MS	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas
CH_2Cl_2	Diclorometano
CLV	Columna líquida de vacío
δ	Desplazamiento químico en partes por millón
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
EM	Espectrometría de masas
Hz	Hertz
HMBC	Correlación de enlace heteronuclear múltiple (por sus siglas en inglés)
HSQC	Correlación cuántica heteronuclear múltiple (por sus siglas en inglés)
Hx	Hexano
IR	Infrarrojo
IC_{50}	Concentración inhibitoria al 50%
J	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
metanol- d_4	Metanol deuterado

MHz	MegaHertz
m/z	Relación masa-carga en espectrometría de masas
m	Multiplete
ppm	Partes por millón
R_f	Factor de retención
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN ¹³ C	Resonancia magnética de carbono trece
s	Singulete
T_R	Tiempo de retención

RESUMEN

Leishmaniosis es el nombre colectivo de la zoonosis que da lugar a un gran número de síndromes clínicos. La leishmaniosis cutánea localizada en México, conocida comúnmente como "úlceras del chiclero", es la principal leishmaniosis que afecta en el sur de la península de Yucatán. En la actualidad para tratar la leishmaniosis se utilizan sales de antimonio, las cuales son poco efectivas, tóxicas a nivel hepático, resistentes y en algunos casos se requiere de un tratamiento prolongado. Estos tratamientos resultan difíciles de llevar a cabo, principalmente en personas que viven en áreas endémicas rurales, debido a los altos costos y los problemas logísticos de accesibilidad. Por lo tanto, en la búsqueda de terapias contra la leishmaniosis causada por *Leishmania mexicana*, basadas en un producto natural, no tóxico, con menos efectos secundarios, accesible y de bajo costo; se eligió como objetivo de estudio a *Dorstenia contrajerva*. Esta especie por tener trabajos previos sobre su actividad antiprotozoaria y por sus usos tradicionales resulta interesante para evaluar y aislar metabolitos secundarios con actividad biológica contra promastigotes de *L. mexicana*.

Las raíces de *D. contrajerva* se sometieron a maceración con metanol, seguida por particiones líquido-líquido con disolventes de menor a mayor polaridad. Posteriormente, por medio de técnicas cromatográficas se llevó a cabo el aislamiento de metabolitos de la fracción hexánica que resultó más activa en el bioensayo *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana*.

Como resultado de lo anterior se purificaron siete compuestos. El compuesto 1 se identificó como escualeno mediante análisis de cromatografía de gases acoplado a masas, el cual resultó no ser activo. El compuesto 2 se identificó como psoraleno mediante comparación de sus datos espectroscópicos con la literatura. Esta furanocumarina presentó una actividad moderada. El compuesto 3, fue identificado como 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo-[3-2-g][1]-benzopiran-7-ona de acuerdo con el análisis de su datos espectroscópicos. Este compuesto resultó ser no activo. El compuesto 4 se identificó como contrajervatriol. El metabolito 5 se identificó como 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol. El compuesto 6 no ha sido identificado todavía. Por último, el compuesto 7 fue identificado como γ-sitosterol de acuerdo con su análisis de cromatografía de gases acoplado a masas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is the collective name of the zoonosis that gives rise to a large number of clinical syndromes. Localized cutaneous leishmaniasis in Mexico, commonly known as "the chiclero ulcer", is the primary leishmaniasis present in the southern part of the Yucatan peninsula. Nowadays antimony salts are used to treat leishmaniasis that are little effective and toxic to the liver, for which some *Leishmania* strains are resistant and in some cases prolonged treatment is required.

Therefore in the search for new therapies against *Leishmania mexicana*, based on a non-toxic, accessible and low-cost natural product, with fewer side effects, the plant *Dorstenia contrajerva* was chosen based on its previous studies and its traditional uses, as a target to look for secondary metabolites with biological activity against of *L. mexicana* promastigotes.

The roots of *D. contrajerva* were subjected to a maceration with methanol, following of a liquid-liquid partitioning with solvents from lower to higher polarity. Subsequently through chromatographic techniques I twas carried out the isolation of metabolites of the hexane fraction which was the most active, in the *in vitro* bioassay against *L. mexicana* promastigotes.

As a result seven compounds were purified. Compound 1 was identified as squalene through analysis of gas chromatography coupled to mass spectrometry, which proved to be not active. Compound 2 was identified as psoralen by comparison of their spectroscopic data with the literature. This furanocoumarina presented a moderate activity. Compound 3, was identified as 4-[[3-(4,5-dihydro-5,5-dimethyl-4-oxo-2-furanyl)butyl]oxy]-7*H*-furo[3,2-*g*] [1]benzopyran-7-one) according to the analysis of its spectroscopic data. This compound proved to be not active. Compound 4 was identified as contrajervatriol. Compound 5 was identified as 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*- β -D-galactopiranosil glicerol. Compound 6 has not been identified. Finally, compound 7 was identified as γ -sitosterol according to its analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry, which was proved not to be active in the bioassay against *L. mexicana*.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1. Introducción

A lo largo de la historia la humanidad ha estado ligada con el reino vegetal. Antes de emplear el fuego y domesticar a los animales, su subsistencia y salud dependía en gran parte de la miel, las hierbas, los frutos y los jugos que extraía de las plantas; asimismo, siempre se ha mencionado que “la enfermedad existe desde que hay vida” y ambas constituyen un complejo cambiante. Los hombres desde siempre han tratado de combatir a las enfermedades como mejor saben; la naturaleza fue sin duda su primer médico y la farmacia inicial a la que recurrieron. Instintivamente el animal irracional tomó provisiones contra la enfermedad y recurre entre otras, a las hierbas. El hombre pudo notar ese instinto en los animales y orientado por observaciones propias constató que las plantas tenían un poder curativo (Waizel y Martínez, 2011).

Todo el origen que se conoce de las plantas medicinales ha formado parte importante de la historia y de la cultura de los pueblos indígenas, el uso y aplicación de remedios para enfermedades constituye un conocimiento que, aun en nuestros días, se transmite en forma oral de generación en generación.

Se reconocen como plantas medicinales a todas aquellas que contienen principios activos en algunos de sus órganos, los cuales son administrados en dosis suficientes a los hombres y los animales en general. Se calcula que de las 260,000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recopiladas en los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas, por presentar algún uso.

El estudio de los principios activos de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica sobre el ser humano, y estos pueden ser desde sustancias simples o bien mezclas complejas (Cosme, 2008).

Las zoonosis representan un grupo de aproximadamente 200 enfermedades, muchas de ellas con repercusión a nivel mundial (Acha y Szyfres, 2001; 2003a; 2003b). Son enfermedades que se transmiten en forma natural de los animales domésticos o silvestres a los humanos (Hubálek, 2003). Actualmente se han descrito más de 150 zoonosis que

afectan a la población humana y muchas de ellas se presentan prácticamente en todo el mundo (Acha y Szyfres, 2003a). Éstas conforman un grupo complejo de padecimientos infecciosos generados por una amplia variedad de organismos entre los que se encuentran bacterias, virus, hongos, protozoos, helmintos y algunos artrópodos (Shimshony, 2008). De forma general se pueden clasificar en zoonosis de transmisión por contacto directo con los animales (por ejemplo rabia, carbunco) o por contacto indirecto como ingestión de alimentos, vías respiratorias, agua contaminada (por ejemplo salmonelosis, brucelosis, leptospirosis, hantavirus) y aquellas transmitidas por artrópodos vectores (por ejemplo leishmaniosis, enfermedad de chagas, filariasis). Estas enfermedades son importantes ya que aproximadamente el 60% de los patógenos que afectan al hombre son de origen zoonótico y al menos 800 patógenos son causantes de zoonosis (Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005). A pesar de lo anterior, muchas de las zoonosis se encuentran entre las enfermedades clasificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2006) como “olvidadas o rezagadas” y otras están en el grupo de las enfermedades identificadas como emergentes o reemergentes.

Leishmaniosis es un tipo de zoonosis y es una enfermedad causada por protozoos intracelulares del género *Leishmania* (familia Trypanosomatidae). Dependiendo de la especie ésta se expresa como visceral o cutánea. La primera produce daños en diferentes órganos de la persona infectada y la segunda puede extenderse a las mucosas identificándose como mucocutánea. Ambas formas se distribuyen ampliamente en el mundo, principalmente en zonas tropicales y subtropicales (Acha y Szyfres, 2003a).

Los agentes causantes de la leishmaniosis son conocidos y estudiados desde 1903 y hasta la fecha no existe una cura efectiva para la enfermedad. Los agentes quimioterapéuticos más comúnmente usados para el tratamiento de la leishmaniosis son estiboglucanato sódico (Pentostam®), antimonio de N-metilglucamina (Glucantime®), pentamidina (Pentacarinat®) y anfotericina B (Fungizone®, Ambisome®). Estos tratamientos siempre requieren largos períodos de aplicación y a causa de eso los efectos secundarios son graves, incluyendo toxicidad cardíaca y renal. Esto ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a enfatizar en la necesidad de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la leishmaniosis (Akendengue *et al.*, 2002; Getti *et al.*, 2009; Murray, 2001).

La información respecto al uso de plantas en la medicina tradicional ha sido de un interés considerable para la adquisición de nuevos y mejores productos farmacéuticos. Se estima que cerca del 90% de todas las especies de plantas todavía no se han estudiado para determinar su potencial como agentes leishmanicidas (Getti *et al.*, 2009).

México es reconocido por poseer una biodiversidad muy rica y sin explorar, que incluye más de 20,000 especies de plantas, de éstas 7,000 son de uso común en la práctica de la medicina tradicional, con 800 de ellas reconocidas como plantas medicinales en la península de Yucatán. Sin embargo, menos del 2% de las especies de plantas clasificadas como medicinales han sido examinadas desde una perspectiva fitoquímica o farmacológica (Getti *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Peraza-Sánchez *et al.* (2007) se reporta que el extracto metanólico de *Dorstenia contrajerva* mostraba buena actividad contra promastigotes de *L. mexicana*.

Dorstenia contrajerva es una planta de la familia Moraceae, que se encuentra en áreas tropicales y subtropicales. Varias partes de ella han sido utilizadas en la medicina tradicional para reducir la fiebre, tratar resfriados, diarrea y mordeduras de serpientes, y sus reportes de actividad biológica se han atribuido a cumarinas, chalconas, flavonas y flavononas (Abegaz *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta las propiedades evaluadas de *D. contrajerva* y su potencial como un agente quimioterapéutico, en esta investigación se efectuó el estudio de la planta realizando una purificación de metabolitos secundarios de manera biodirigida con el objetivo de aislar y elucidar compuestos con actividad leishmanicida.

2. ANTECEDENTES

2.1. Leishmaniosis

La leishmaniosis es un grupo de enfermedades producidas por parásitos protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*. La leishmaniosis es una zoonosis transmitida por insectos dípteros de los géneros *Phlebotomus* (Europa, Norte de África, Medio Oriente, Asia y parte de Sudamérica) y *Lutzomyia* (desde Estados Unidos hasta norte de Argentina) (Gamboa, 2009 y Vera-Izaguirre, 2006).

Considerando las leishmaniosis según su perfil clínico patológico, pueden establecerse las siguientes formas clínicas:

La leishmaniosis cutánea localizada (LCL), conocida como “úlceras de los chicleros” (recolectores de la goma de mascar natural) en el sur de México, fue descrita por Seidelin en 1912. *Leishmania mexicana* es el principal agente que causa LCL y su vector potencial es *Lutzomyia olmeca olmeca* (Andrade-Narvaez *et al.*, 2005). La dermatosis existe en áreas expuestas a la picadura de insectos, siendo afectadas en orden de frecuencia: orejas, nariz, labio superior, mejillas, piernas, manos, antebrazos y tobillos (Vargas *et al.*, 2011); con un periodo de incubación que se reporta entre una a cuatro semanas (Rábago *et al.*, 2006), pero que podría ser hasta de varios años (Vera-Izaguirre, 2006) sin existir hasta el momento elementos para aseverar o rechazar esta última afirmación. Los primeros síntomas son subjetivos y sólo afectan de manera local, que se caracterizan por aumento de temperatura y de volumen, coincidiendo con prurito (el cual es sumamente intenso al principio, ocasionando el rascado de la lesión inicial con la consiguiente formación de la úlcera por el traumatismo) y acompañado más tarde de ardor y dolor leves que pueden irradiar hacia el cuello y las sienes (Figura 1.1).



Figura 1.1. a) Úlcera en extremidad superior con fondo sucio y bordes eritematosos cortados a pico, b) úlcera en pabellón infiltrada y con fondo ligeramente hemorrágico.

Los agentes causantes de la leishmaniosis cutánea difusa (LCD) (Figura 1.2) son *L. mexicana* y *L. amazonensis* (OMS, 2010); se caracteriza por anergia, es decir falta de respuesta inmunitaria celular hacia antígenos del parásito, permitiendo la diseminación de éste por vía tisular, linfa y por sangre, con desarrollo de lesiones en casi toda la piel, con excepción de piel cabelluda y en ocasiones involucra las mucosas. Predomina en zonas expuestas, pabellones auriculares, mejillas y extremidades. Inicia generalmente con la

aparición de nódulos eritematosos, de color pardo rojizo y consistencia firme que pueden o no ulcerarse y que se presentan primero en la cara y posteriormente aparecen de manera progresiva en extremidades y mucosas y que en ocasiones pueden llegar a abarcar toda la superficie cutánea. Esta forma clínica es muy difícil de tratar, no hay resolución espontánea y se ha documentado tan larga como 20 años (Vera-Izaguirre, 2006; Rábago, 2006; Bravo y Sanchez, 2003).



Figura 1.2. Leishmaniosis difusa.

La leishmaniosis mucocutánea (LMC), cutaneomucosa o cutánea americana (Figura 1.3) es una forma clínica causadas por las especies *L. braziliensis* y *L. panamensis* (OMS, 2012). Inicia con invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea. La invasión se hace poco a poco, en ocasiones sin grandes molestias al principio, lo que permite a la lesión de la mucosa pasar inadvertida para el enfermo o, en algunas ocasiones, acompañándose de prurito local ocasional (Vargas *et al.*, 2011). Generalmente, las lesiones se inician en la mucosa nasal y se propaga a la mucosa orofaríngea, la laringe, la piel de la nariz y labios (Vera-Izaguirre, 2006).



Figura 1.3. Leishmaniosis mucocutánea.

La leishmaniosis visceral (LV) o Kala-Azar (fiebre negra), se debe a *L. infantum* y *L. donovani* (OMS, 2010). Produce lesiones en el sistema retículo endotelial, es oligosintomática o francamente sintomática y se manifiesta por adenomegalias, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, leucopenia, fiebre, sudores nocturnos, debilidad, anorexia, astenia, pigmentación cutánea y pérdida de peso (Murray *et al.*, 2005; Collin, 2004).

2.1.1. Ciclo de transmisión de la leishmania

Es el flebotómíneo hembra infectado quien requiere de sangre para el desarrollo de su progenie, de tal manera que es ella quien pica al hospedero. El agente causal es un protozoo unicelular obligado de la familia Trypanosomatidae y género *Leishmania*. Son conocidos dos estadios en el ciclo de vida: promastigotes que son flagelados y miden de 12 a 20 μm de largo y se encuentra en artrópodos los cuales constituyen el vector que se infecta al alimentarse de la sangre de los hospederos vertebrados y es en el intestino del díptero donde al paso de 4 a 25 días muestra el segundo estadio, el amastigote el cual carece de flagelo, es intracelular obligado y se localiza en las células fagocitadas del hospedero y mide 2.5 a 3.5 μm de diámetro (García-Miss, 1995). La ruptura de los macrófagos infectados propaga la enfermedad. Los insectos ingieren sangre de un mamífero y expulsan promastigotes en la piel del hospedero; éstos son reconocidos por receptores de superficie de los macrófagos y células dentríticas y son fagocitados. Dentro de la célula hospedera los parásitos se transforman a amastigotes, los cuales se multiplican intensamente por división binaria. La ruptura de los macrófagos infectados libera amastigotes, los cuales son fagocitados por nuevos macrófagos; de esta forma se propaga la enfermedad. Los amastigotes ingeridos por nuevos insectos que chupan de un hospedero infectado se transforman en promastigotes en el tracto digestivo del insecto vector, donde permanecen de cuatro a siete días, se diferencian a infectivos, migran hacia la válvula cardíaca y bloquean la proboscis del insecto (Figura 1.4) (Molineux y Killick-Kendrick, 1987).

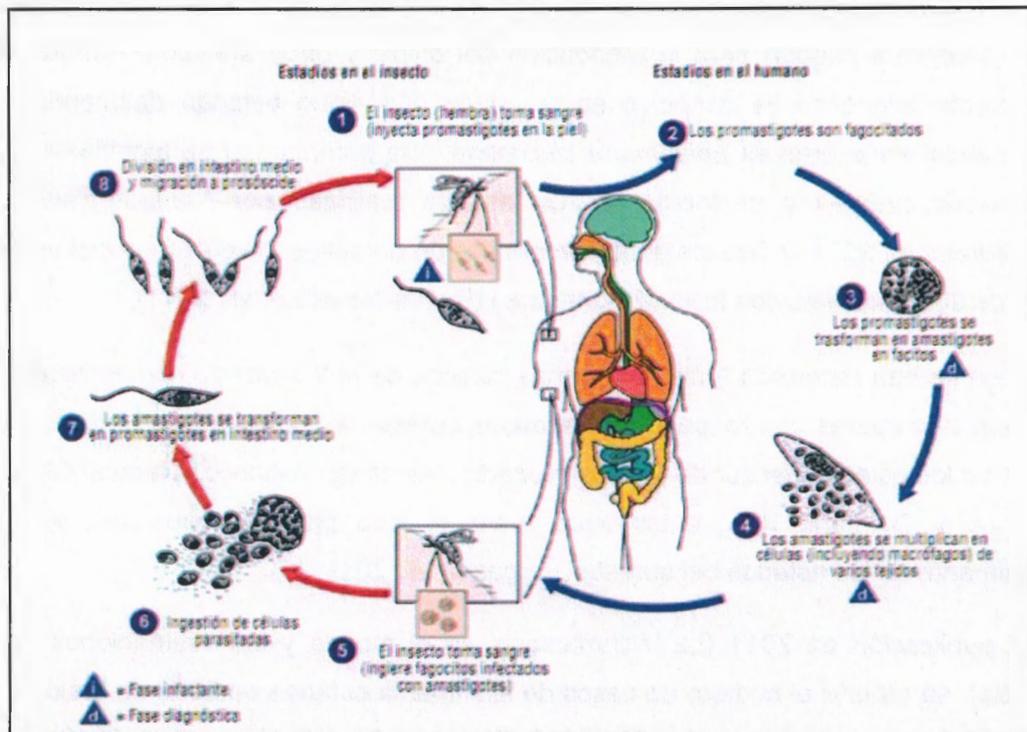


Figura 1.4. Ciclo vital de la *Leishmania* ssp. La hembra del insecto vector pica al mamífero reservorio (5). Los amastigotes pasan de los tejidos infectados o de la sangre al tracto digestivo del mosquito (6). En el intestino medio se transforman en promastigotes (7) y se multiplican rápidamente. Aproximadamente a los 10 días rellenan la faringe y probóscide del mosquito hasta una nueva picadura (8). En ese momento, son inoculados en un nuevo huésped (1) (Díaz *et al.*, 2012).

2.1.2. Epidemiología

La leishmaniosis es una enfermedad endémica en 88 países en cuatro continentes, es de alta prevalencia en muchas regiones tropicales y subtropicales y se encuentra entre una de las enfermedades que siguen siendo olvidadas en el mundo, afectando generalmente a las regiones más pobres; 350 millones de personas se consideran en riesgo de contraer leishmaniosis y se estiman 2 millones de nuevos casos cada año (OMS, 2010).

Los estudios en Yucatán sobre esta enfermedad comenzaron desde 1912, a la cual se le conocía como úlcera de los chicleros, debido a su alta prevalencia que presentaban las

personas que trabajaban en el interior de las selvas para extraer el látex de árboles de zapote (*Manilkara zapota*) para la fabricación del chicle y otros artículos. Aunque este padecimiento zoonótico es conocido en la región aún sigue estando desatendido. El agente causal en el área es *Leishmania mexicana*, y la enfermedad se manifiesta como leishmaniosis cutánea o mucocutánea. Un estudio realizado por Andrade-Narvaez y colaboradores en 2001, indica los altos porcentajes de personas infectadas por el parásito (65.1% de 683 pacientes con lesiones cutáneas) (Reyes-Novelo *et al.*, 2011).

En México se han reportado todas las formas clínicas de la leishmania, sin embargo, los casos han sido menos con respecto a leishmania cutánea en cuyas zonas endémicas se encuentran los estados del sur de México, Yucatán, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Campeche y Quintana Roo, entre otros, pero el foco principal endémico se halla principalmente en los estados del sureste (Vargas *et al.*, 2011).

En una publicación en 2011 (La leishmaniosis en el mundo y las estimaciones de su incidencia), se reporta el número de casos de leishmania cutánea en 2009 en México, así como la tendencia de la misma de 1994-2010 (Figuras 1.5 y 1.6) (Alvar *et al.*, 2012).

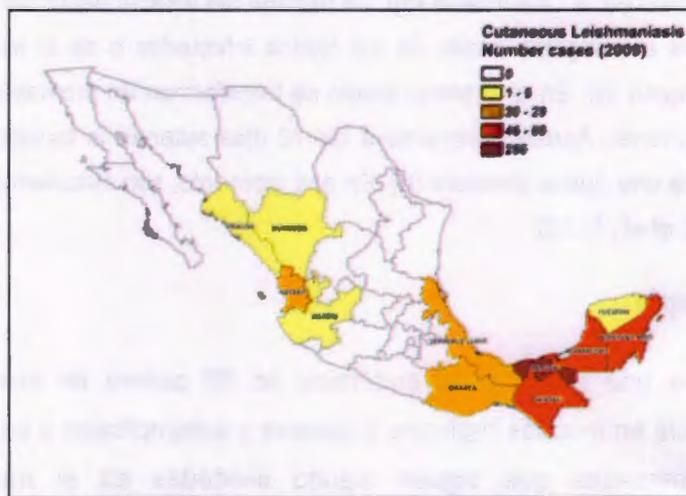


Figura 1.5. Número de casos de leishmania cutánea en México en 2009. Fuente: Alvar *et al.*, 2011.

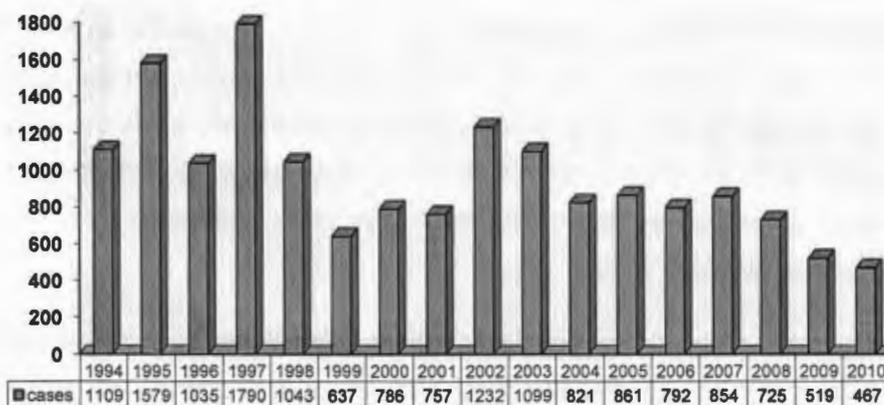


Figura 1.6. Gráfico de la tendencia de la leishmaniasis cutánea en México de 1994-2010.

Fuente: Alvar *et al.*, 2011.

A pesar de su gran importancia epidemiológica, la leishmaniasis es considerada por la OMS como una enfermedad manejada con negligencia por los diferentes organismos públicos y privados de financiamiento a la salud y de fomento a la investigación, a pesar de su importancia epidemiológica (Vera-Izaguirre *et al.*, 2006; Reithinger *et al.*, 2007). Un fenómeno recientemente analizado es la adaptación del vector al ambiente semi-urbano y urbano, fungiendo en este alterno y nuevo ciclo biológico como hospederos oportunistas los animales domésticos (Reithinger *et al.*, 2007).

2.1.3. Tratamientos

La leishmaniasis es una enfermedad que se caracteriza por su gran polimorfismo clínico y sus diferentes manifestaciones dependen de la especie infectante, por lo tanto la elección del tratamiento debe estar determinada por la eficacia, toxicidad, costo y por la disponibilidad del medicamento así como de las características clínicas de la enfermedad en el paciente que será tratado.

Dependiendo de las lesiones existen diferentes tipos de tratamientos, los de tipos sistémicos donde se encuentran los de primera y segunda línea, los locales, los de terapias físicas y los tratamientos alternativos.

Es bien conocido que el tratamiento de primera elección para cualquier tipo clínico de leishmaniasis son los fármacos antimoniales pentavalentes, como el estibogluconato

sódico (EGS, Pentostam®) y el antimonio de meglumina (AM, Glucantime®). Los compuestos de antimonio pentavalente no pueden administrarse por vía oral y los problemas que presentan son su costo, toxicidad como: vómitos, diarreas, mareos, arritmias cardíacas, anemia, trombocitopenia y el desarrollo de farmacoresistencia (Díaz *et al.*, 2012). Estas drogas están contraindicadas durante el embarazo y no deben ser utilizadas en pacientes que presenten problemas cardiacos, hepáticos, renales o pancreáticos (Gamboa 2009).

Las drogas conocidas de segunda línea son la anfotericina B y la pentamidina. Ambas son más tóxicas que los antimoniales y por eso se requiere que su uso sea intrahospitalario (Gamboa 2009).

La pentamidina es una diamina aromática y es tóxica para numerosos protozoos y hongos. Es usada como una alternativa a los antimoniales pentavalentes (Blum *et al.*, 2004). Dado a sus importantes efectos adversos como son el daño al páncreas, riñón y médula ósea es un fármaco que está siendo abandonado para su uso (Díaz *et al.*, 2012).

La anfotericina B es un agente antifúngico que es activo contra diferentes tipos de especies de leishmania. Es un medicamento de uso limitado por sus serios efectos adversos y secundarios como hiperpirexia, malestar severo, hipotensión, tromboflebitis, azotemia, daño tubular renal, hipocaliemia, anemia y hepatitis (Gamboa 2009).

Existen otros fármacos que han sido utilizados como alternativas, entre ellos la miltefosina oral que es activa contra la membrana de leishmania de la mayoría de las especies. Entre sus efectos adversos están vómitos, náuseas y diarreas. Los antifúngicos azoles como el ketoconazol, itraconazol y el más reciente fluconazol se han empleado como tratamiento alternativo para la leishmaniosis cutánea del Viejo Mundo. Se ha demostrado que el alopurinol inhibe el crecimiento de leishmania *in vitro* y se ha sugerido como posible agente terapéutico. La pentoxifilina oral tiene efectos anti-leishmania y disminuye la reacción inflamatoria y el daño tisular (Díaz *et al.*, 2012; Murray, 2004).

En la búsqueda de tratamientos alternativos surgen los llamados tradicionales que implementan el uso de hierbas medicinales que han sido empleadas en zonas donde el acceso a otras medicinas es muy difícil. Por lo tanto, la medicina tradicional es usada en los tratamientos de la leishmaniosis utilizando generalmente plantas nativas. El método de

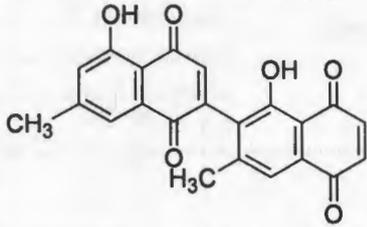
curación consiste en la administración oral del extracto crudo de la planta para la forma sistémica de la enfermedad y preparaciones tópicas para infecciones en la piel. De tal forma que el tratamiento de las lesiones producidas por leishmania ha sido objeto de múltiples investigaciones y, al día de hoy, se puede decir que no se ha encontrado el tratamiento ideal (Díaz *et al.*, 2012; Iwu *et al.*, 1994). Se necesita refortalecer mezclas de plantas para lograr un efecto totalmente curativo contra la leishmaniosis como es el caso de la mezcla de los extractos *Allium sativum* y *Tridax procumbens* (Gamboa-León *et al.*, 2014).

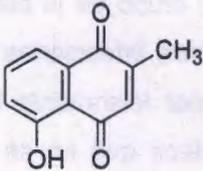
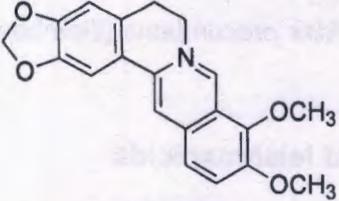
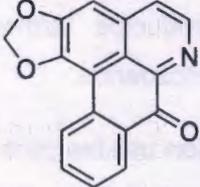
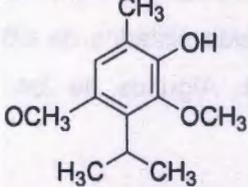
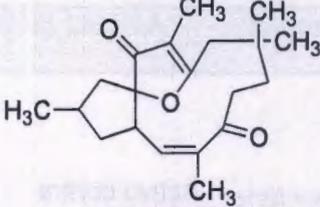
2.1.4. Metabolitos secundarios con actividad leishmanicida

En la actualidad la evaluación de plantas medicinales usadas como remedios ha beneficiado a la medicina moderna con nuevos productos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos protozoarios.

Los metabolitos obtenidos y evaluados de plantas que son usadas para el tratamiento de la leishmaniosis incluyen en su mayoría los de tipo alcaloides, quinonas, terpenos, chalconas, derivados fenólicos entre otros. Chan-Bacab y Peña-Rodríguez (2001) reportaron una recopilación de compuestos que han sido aislados de diferentes géneros de plantas y que presentan actividad leishmanicida. Algunos de los compuestos se observan en la siguiente tabla (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Compuestos con actividad biológica contra parásitos de leishmania.

Producto natural	Especie (familia)	Actividad biológica
 <p>Diospirina</p>	<p><i>Diospyros montana</i> (Ebenaceae)</p>	<p>Activo contra promastigotes de <i>L. donovani</i> con una MIC de 1 µg mL⁻¹</p>

 <p>Plumbagina</p>	<p>Género: <i>Plumbago</i></p>	<p>$CI_{50} = 0.42 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra amastigotes de <i>L. donovani</i> y</p> <p>$CI_{50} = 1.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ contra amastigotes de <i>L. amazonensis</i></p>
 <p>Berberina</p>	<p>Familias: <i>Annonaceae</i>, <i>Berberidaceae</i>, <i>Menispermaceae</i></p>	<p>Una concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ elimina parásitos de <i>L. major</i> en macrófagos de ratones</p>
 <p>Liriodenina</p>	<p><i>Rollinia emarginata</i> (<i>Annonaceae</i>)</p>	<p>CI_{100} de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ en promastigotes de <i>L.</i> <i>braziliensis</i>, <i>L.</i> <i>amazonensis</i> y <i>L.</i> <i>donovani</i></p>
 <p>Espintanol</p>	<p>Aislado de corteza de árbol de <i>Oxandra espintana</i> (<i>Annonaceae</i>)</p>	<p>Promastigotes de doce especies de <i>Leishmania</i>, incluyendo <i>L. mexicana</i></p>
 <p>Jatrofona</p>	<p>Familia <i>Euphorbiaceae</i></p>	<p>Actividad contra promastigotes de <i>L.</i> <i>braziliensis</i>, <i>L.</i> <i>amazonensis</i> y <i>L.</i> <i>chagasi</i> con un $CI_{100} = 5$ $\mu\text{g mL}^{-1}$</p>

Existen alrededor de más de 239 compuestos de origen natural que han sido evaluados y reportados con actividad leishmanicida contra diferentes tipos de especies de leishmania. La mayor parte de ellos no presenta ni reúne todas las características esenciales en el desarrollo de nuevos fármacos (Pink *et al.*, 2005). Pero muchos de estos estudios han

permitido establecer los requisitos estructura-actividad para diferentes compuestos y por lo tanto permiten el establecimiento de un modelo para el desarrollo de nuevos fármacos.

De tal forma que el reino vegetal es considerado como una vasta fuente de productos naturales con algún valor medicinal y de estos pueden partir para el desarrollo de nuevas moléculas, modificaciones semisintéticas o fármacos antiparasitarios (Harvey, 2008).

2.2. Plantas medicinales y productos naturales como fuentes de nuevas drogas

De acuerdo con la OMS, la medicina tradicional incluye la medicación, preparados y productos acabados a base de hierbas que contienen ingredientes activos de plantas u otros materiales vegetales o combinaciones de las mismas (OMS, 2002).

Los productos naturales son metabolitos secundarios de plantas, hongos y organismos marinos cuya función no se conoce con exactitud, pero se cree que se originaron para defenderse de diversos agentes externos. Los productos naturales poseen muchas y variadas actividades biológicas, por lo que se han utilizado como modelo para realizar nuevas estructuras específicas y por lo tanto generar nuevos fármacos (Kingston y Newman, 2005).

De los 1,355 nuevos fármacos aprobados por la FDA desde 1981 hasta 2010, el 54% son productos naturales, derivados y/o sintetizados de productos naturales, como se observa en la Figura 1.7 (Newman y Cragg, 2012).

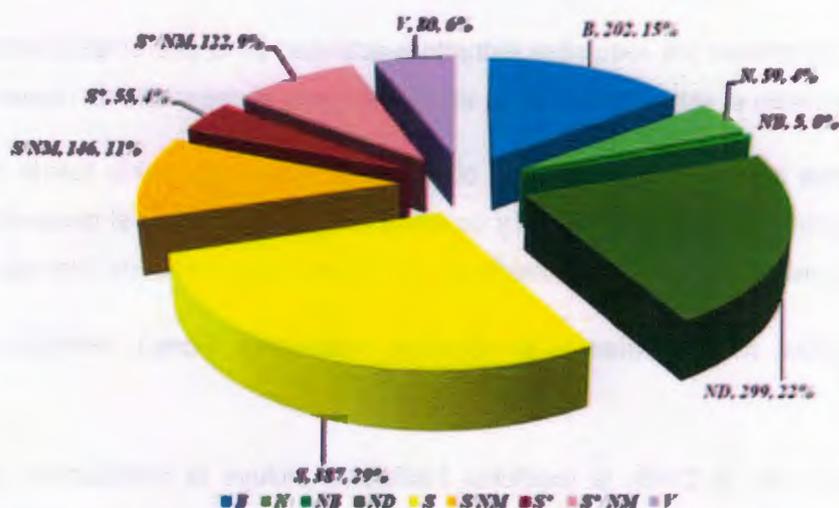


Figura 1.7. Gráfico de los nuevos fármacos aprobados por la FDA. B: De origen biológico, N: Productos naturales, NB: Producto natural "botánico", ND: Derivado de un producto natural, S: Droga totalmente sintética, S/NM: Droga totalmente sintética de un producto natural imitado, S*: Fabricado por síntesis total pero el fármaco es/era de un producto natural, S*/NM: Síntesis total de un producto natural imitado V: Vacunas.

De acuerdo con lo anterior, la utilización de plantas con propiedades medicinales y como potentes productoras de fármacos naturales se encuentra en un punto de gran impacto en el mundo en la actualidad, influyendo que en el futuro cercano la medicina tradicional cobre más importancia.

2.3. *Dorstenia contrajerva*

Dorstenia contrajerva es una de las plantas que es utilizada en la medicina tradicional en diferentes lugares tanto de la República Mexicana como en algunos países de América Latina.

Existen dos reportes en cuanto a la actividad antiprotozoaria de esta planta, el primero fue un estudio realizado por Calzada *et al.* (2006) donde se presenta la actividad contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, teniendo una mejor susceptibilidad *in vitro* frente a *Giardia lamblia* con una $CI_{50} = 23.3 \mu\text{g/mL}$. En el segundo se reporta la evaluación de plantas nativas de la península de Yucatán, donde el extracto de *D. contrajerva* presentó una actividad de $CI_{50} = 23.0 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes de *L. mexicana* (Peraza-Sánchez

et al., 2007). En dicho estudio se pudo observar que la evaluación llevada a cabo fue con toda la planta, sin embargo en este estudio únicamente se trabajó con las raíces de esta especie ya que en la mayoría de los reportes en la medicina tradicional son llevados a cabo a partir de éstas.

Por lo tanto el extracto de la raíz de *D. contrajerva* fue seleccionado como objetivo de estudio por presentar una buena actividad capaz de inhibir el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*.

2.3.1. Descripción botánica y taxonómica de *Dorstenia contrajerva*

Dorstenia es un género de plantas herbáceas de la familia Moraceae que se encuentra en el Centro y Sur de América, y particularmente rico en furocumarinas (Hostettman *et al.*, 1995; Orellana, 1987). Es representado por cerca de 170 especies en el mundo, muchas de las cuales poseen significativo valor medicinal y algunas especies de este género son utilizadas para tratar mordeduras de serpientes en muchas comunidades (Abegaz, *et al.*, 2000).

La especie *Dorstenia contrajerva* L. (Figura 1.8) recibe los nombres comunes de contrahierba, mano de león (Quezaltenango) hierba de sapo (Petén) y *kambal jau* (Maya) (Standley y Steyermark, 1946). Es una planta con rizomas cortos de hasta 25 cm, con tallos parcialmente subterráneos, cortos, de 3 a 14 mm de ancho, puberulentos a casi glabros, entrenudos usualmente cortos, en ocasiones hasta de 2.5 cm de largo en tallos delgados y rizomatosos con todos o algunos entrenudos largos; las hojas están dispuestas en espiral, rosuladas o más o menos separadas, estípulas persistentes, triangulares a ovadas, hasta de 6 mm de largo (Carvajal, 2007). Hojas sagitadas o 5-7-pinnatilobadas con los lobos más anchos hacia el ápice o con el ancho de los lobos más o menos uniformes, 8-18 cm de largo y 8-24 cm de ancho, ápice agudo a atenuado, base leve a profundamente lobada y mayormente decurrente sobre el pecíolo y a veces produciendo un pequeño par de lóbulos en el pecíolo (Stevens *et al.*, 2001).

Se pueden encontrar tres variedades en las hojas de *D. contrajerva* y pueden separarse de la siguiente manera: aquellas de hojas casi enteras son *D. contrajerva* var. *houstonii* (L.) Bureau; aquellas con lobos largos, delgados y no ensanchados distalmente son *D.*

contrajerva var. *tenuiloba*; y aquella con lobos atenuados hacia la base son *D. contrajerva* var. *contrajerva* (Stevens et al., 2001).



Figura 1.8. Hojas de *Dorstenia contrajerva*.

2.3.2. Distribución geográfica de *Dorstenia contrajerva*

Dorstenia contrajerva L. es una hierba nativa en matorrales húmedos y los bosques del sur de México a Venezuela y Perú, y menos difundida en el sur de las Antillas de Puerto Rico, Guatemala, Panamá y Costa Rica (Gupta, 1995; Orellana, 1987). En América Tropical y África se encuentran 50 especies, y en México se encuentran nueve (<http://www.cicy.mx/sitios/flora>).

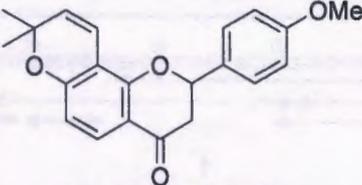
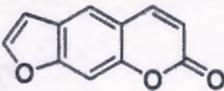
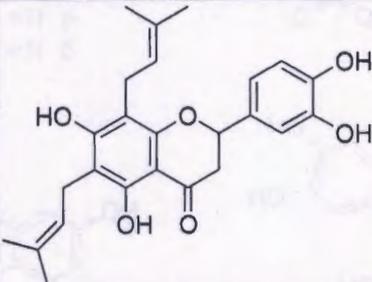
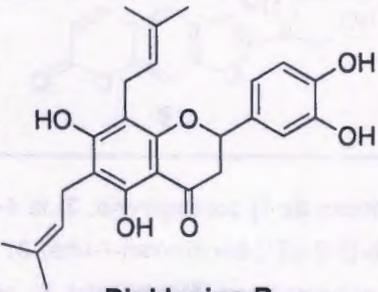
En México *D. contrajerva* se encuentra distribuida en Chiapas, Guerrero, Nayarit, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Su distribución en la península de Yucatán se muestra en la Figura 1.9 (Flora digital: Península de Yucatán, 2010).



Figura 1.9. Distribución geográfica de *D. contrajerva* L. en la península de Yucatán.

Sin embargo, en el género *Dorstenia* se ha reportado la presencia de triterpenos (Vilegas *et al.*, 1997a, 1997b), ácidos grasos, esteroides (Kuster *et al.*, 1994; Vilegas *et al.*, 1997b), diferentes benzofuranos (Woldu *et al.*, 1988; Ngadjui *et al.*, 1999b), varios compuestos prenilados y flavonoides (Abegaz *et al.*, 1998; Ngadjui *et al.*, 1998, 1999a, 1999b, 1999c; Tsopmo *et al.*, 1998), algunos de estos están descritos en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Algunos metabolitos de diferentes especies del género *Dorstenia*.

Espece	Compuesto	Referencia
<i>D. poinsettifolia</i>	 <p>Dorspoinsettifolina</p>	Ngadjui <i>et al.</i> , 1999
<i>D. psilurus</i>	 <p>Psoraleno</p>	Ngadjui <i>et al.</i> , 1998
<i>D. mannii</i>	 <p>6,8-Diprenilferiodictiol</p>	Ngadjui <i>et al.</i> , 1998
<i>D. dinklagei</i>	 <p>Dinklagina B</p>	Ngadjui <i>et al.</i> , 2002

2.3.4. Usos etnobotánicos de *Dorstenia contrajerva*

En la medicina tradicional existen reportes que varias partes de *D. contrajerva* son usadas para aliviar distintos malestares. Específicamente para México en varios estados del sureste se ocupa para tratar la mordedura de víbora o serpiente. En el estado de Quintana Roo se ingiere el rizoma seco y pulverizado. En Tabasco, elaboran un té con las hojas de la planta. En Yucatán, preparan una infusión con la hierba y la endulzan con miel, y la toman cada una a dos horas, según sea el caso, también beben el cocimiento de la raíz y hojas, junto con otras plantas, como contraveneno para la mordedura de víbora, de perro rabioso o cualquier intoxicación alimenticia (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). En Puebla, el látex de la planta se utiliza para curar las heridas y las inflorescencias para aliviar la picazón de las encías de los niños cuando están dentando. En Honduras la raíz se usa para tratar la diarrea, la disentería y el dolor de estómago, y la raíz ligeramente tostada se utiliza para los parásitos y gusanos, y también la raíz triturada con agua para tratar mordeduras de serpientes. En Costa Rica las inflorescencias son hervidas y se utiliza para hacer que el cordón umbilical de los bebés se caiga, la raíz hervida la usan para curar las diarreas y su infusión para tratar la fiebre. En Nicaragua de igual manera las raíces hervidas son usadas para prevenir la diarrea, malestar estomacal así como indigestión y enfermedad con gusanos. En El Salvador las raíces hervidas son usadas de manera tradicional para evitar los vómitos (Ocampo y Balick, 2009).

2.3.5. Datos farmacológicos de *Dorstenia contrajerva*

Dorstenia contrajerva ha sido evaluada en algunos bioensayos con el fin de validar sus propiedades.

Terreaux *et al.* (1995) usaron toda la planta de *D. contrajerva* para obtener un extracto de diclorometano y posteriormente once fracciones para evaluar su actividad larvicida. El extracto de diclorometano presentó una leve actividad contra *Aedes aegypti* y propiedades antibacterianas. De las once fracciones evaluadas, sólo tres presentaron actividad.

Chávez *et al.* (1997) evalúan la actividad anticrustácea y citotóxica del extracto etanólico de 100 plantas en Puerto Rico, entre ellas se encontraba *D. contrajerva* la cual demostró

que tiene una actividad del 95% contra *A. salina*. El ensayo tuvo como finalidad predecir la actividad antitumoral. Además, no produjo ningún efecto citotóxico en cultivos celulares de células de ovario de hámster chinos y células HeLa.

De un extracto acuoso de *D. contrajerva* se aisló el péptido contrajervina para evaluar su actividad anti-HIV, el cual produjo una fuerte inhibición del efecto citopático de la infección del virus de inmunodeficiencia adquirida HIV en una línea celular de linfocitos T-linfoblastos humanos (Bokesch *et al.*, 2004).

Calzada *et al.* (2006) realizaron un estudio con plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de trastornos gastrointestinales. *D. contrajerva* presentó actividad contra *E. histolytica* y *G. lamblia*, teniendo una mejor susceptibilidad *in vitro* frente a *G. lamblia* con una $CI_{50} = 23.3 \mu\text{g/mL}$.

Peraza-Sánchez *et al.* (2007) reportaron la evaluación de extractos metanólicos de plantas nativas de la península de Yucatán contra *Leishmania*. El extracto de *D. contrajerva* presentó actividad con una $CI_{50} = 23.0 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes de *L. mexicana*.

En otro estudio se determinó la actividad micobactericida de catorce plantas utilizadas en infecciones pulmonares. Entre los extractos etanólicos utilizados se evaluó la actividad *in vitro* del extracto de hojas de *D. contrajerva*, el cual demostró que no tiene actividad inhibitoria contra *M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis* ATCC 607 (Quiñones *et al.*, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Recientemente las investigaciones fitoquímicas han centrado su objetivo principal en la búsqueda de productos farmacéuticos de origen natural como una estrategia de revaloración de la herbolaria mexicana y de proporcionar un impulso a nuevos tratamientos que permitan la cura o control de enfermedades.

Por lo tanto este proyecto tiene la finalidad de evaluar de manera *in vitro* a *D. contrajerva* contra promastigotes de *Leishmania mexicana* con el fin de hallar nuevos metabolitos que presenten actividad contra la leishmaniosis, enfermedad endémica de la península de

Yucatán que se encuentra en el olvido, así como también ampliar su conocimiento fitoquímico de dicha especie.

4. HIPÓTESIS

Existen metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de las raíces de *Dorstenia contrajerva* que tienen actividad biológica contra promastigotes de *Leishmania mexicana*.

5. OBJETIVO

Aislar e identificar metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de las raíces de *Dorstenia contrajerva* que presenten actividad antiprotozoaria contra promastigotes de *Leishmania mexicana*.

5.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto metanólico de las raíces de *D. contrajerva* y fracciones por partición utilizando disolventes de menor a mayor polaridad.
- Evaluar la actividad leishmanicida de las fracciones resultantes de la partición cromatográfica utilizando promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- Purificar las fracciones que presenten mayor actividad leishmanicida con técnicas cromatográficas.
- Aislar y purificar los metabolitos de las fracciones activas.
- Elucidar la estructura molecular de los metabolitos aislados por técnicas espectroscópicas (UV, IR, RMN y EM).
- Evaluar los compuestos puros contra promastigotes de *L. mexicana*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo los objetivos señalados, este trabajo se realizó en varias etapas: a) Recolección, limpieza y secado del material vegetal, b) Obtención del extracto metanólico y particiones, c) Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios, d) Bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*, e) Elucidación

estructural de los compuestos aislados por diferentes técnicas espectroscópicas. Estos procesos se resumen en la Figura 1.11.

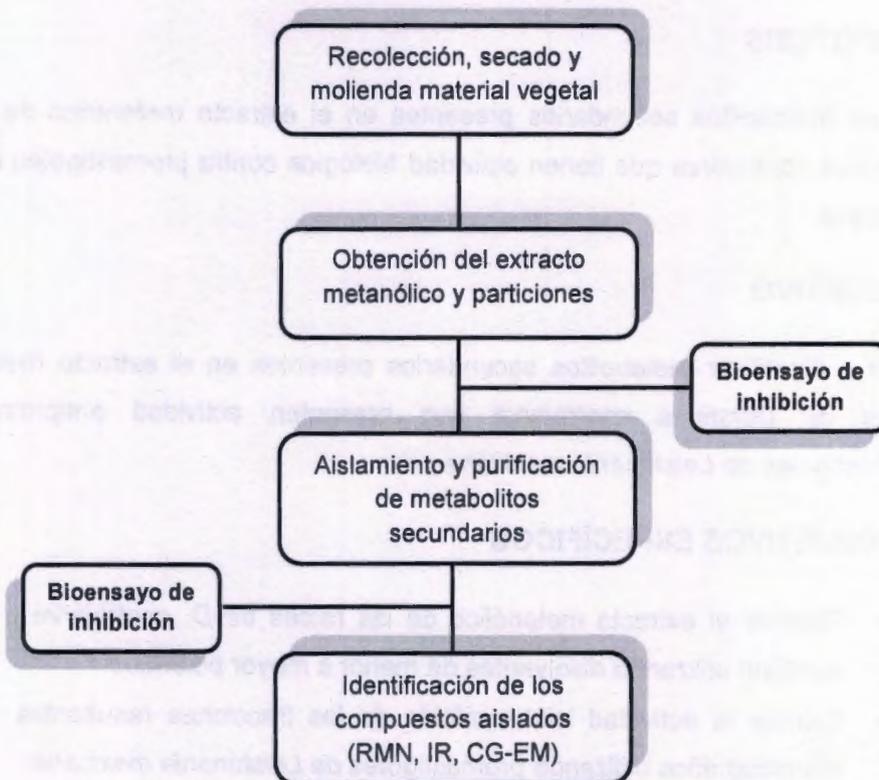


Figura 1.11. Diagrama de la metodología general.

BIBLIOGRAFÍA

- Acha, P. y B. Szyfres (2001). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, Volumen I: Bacteriosis y Micosis, Organización Panamericana de la Salud (ed). Washington, D.C.
- Acha, P. y B. Szyfres (2003a). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, Volumen III: Parasitosis. Organización Panamericana de la Salud (ed). Washington.
- Acha, P. y B. Szyfres (2003b). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, Volumen II: Clamidiosis, rickettsiosis y virosis. Organización Panamericana de la Salud (ed). Washington, D.C.,
- Akendengue, B., F. Roblot, P. Loiseau, C. Bories, E. Ngoumilama, A. Laurens y R. Hocquemiller (2002). Klaivanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. *Phytochemistry*, 59, 885-888.
- Andrade-Narvaez, F., S. Medina-Peralta, A. Vargas-Gonzales, S. Canto-Lara y S. Estrada-Parra (2005). The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 47, 191-194.
- Alvar, J., I. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin y M. Boer, the WHO Leishmaniasis control team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plosone*, 7, 1-12.
- Abegaz, B., B. Ngadjui, E. Dongo, y M. Bezabih (2000). Chemistry of the genus *Dorstenia*. *Current Organic Chemistry*, 4, 1079-1090.
- Abegaz, B., B. Ngadjui, E. Dongo y H. Tamboue (1998). Prenylated chalcones and flavones from the leaves of *Dorstenia kameruniana*. *Phytochemistry*, 49, 1147-1150.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009). *Contrajerba* [Online]. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana, disponible en: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Dorstenia_contrajerba&id=7352 [Acceso 9 de febrero de 2014].

- Bokesch, H., R. Charan, K. Meragelman, J. Beutler, R. Gardella, B. O'Keefe, T. McKee y J. McMahon (2004). Isolation and characterization of anti-HIV peptides from *Dorstenia contrajerva* and *Treculia obovoidea*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 567, 287-290.
- Blum, J., P. Desjeux, E. Schwartz, B. Beck y C. Hatz (2004). Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 158-166.
- Bravo, F. y M. Sanchez (2003). New and re-emerging cutaneous infectious diseases in Latin America and other geographic areas. *Dermatologic Clinics*, 21, 655-668.
- Caceres, A., L. Rastrelli, F. de Simone, G. de Martino, C. Saturnino, P. Saturnino y R. Aquino (2001). Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*, 72, 376-381.
- Calzada, F., L. Yépez-Mulia y A. Aguilar (2006). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 367-370.
- Carvajal, S. (2007). *Moraceae*. *Flora del Bajío y regiones adyacentes*, 147, 1-57.
- Chan-Bacab, M. y Peña-Rodríguez LM. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Reports*, 18, 674-688.
- Collin, S., R. Davidson y K. Ritmeijer (2004). Conflict and Kala Azar: Determinants of adverse outcomes of Kala-Azar among patients in Southern Sudan. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 612-619.
- Cosme, P. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural*. Universidad Veracruzana Intercultural. México. [Revista en línea]. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/handle/123456789/8921> [Acceso 23 de septiembre de 2014].
- Chavez, P., L. Sánchez, F. González, J. Rodríguez y F. Axelrod (1997). Cytotoxicity correlation of Puerto Rican plants using a simplified brine shrimp lethality screening procedure. *Pharmaceutical Biology*, 35, 222-226.

- Díaz, J., S. Barrientos, y S. Morell (2012). Actualizaciones *Leishmania* cutánea. Formación médica continuada en atención primaria (FMC), 19, 117-128.
- Flora digital: Península de Yucatán (2010). *Dorstenia contrajerva* [Online]. Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales disponible en: http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=1837 [Acceso 13 de mayo de 2012].
- García-Miss, M. (1995). Cellular response to leishmaniasis. *Revista Biomédica*, 6, 92-100.
- Gamboa, R., (2009). Leishmaniasis cutánea. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica* LXVI, 169-172.
- Gamboa-Leon, R., M. Vera-Ku, SR. Peraza-Sanchez, C. Ku-Chulim, A. Horta-Baas y M. Rosado-Vallado (2014). Antileishmanial activity of a mixture of *Tridax procumbens* and *Allium sativum* in mice. *Parasite*, 21, 15.
- Getti, G., P. Durgadoss, D. Domínguez-Carmona, Z. Martín-Quintal, S. Peraza-Sánchez, LM. Peña-Rodríguez y D. Humber (2009). Leishmanicidal activity of Yucatecan medicinal plants on *Leishmania* species responsible for cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology*, 95, 456-460.
- Harvey, A. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13, 894-901.
- Hostettman, K., A. Marston, M. Maillard y K. Hamburger (1995). *Phytochemistry of plants used in traditional medicine*. Clarendon Press, Oxford. 359-398 p.
- Hubálek, Z. (2003). Emerging human infectious diseases: anthroponoses, zoonoses, and sapronoses. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 403-404.
- Iwu, M.M., J.E. Jackson y B.G. Schuster (1994). Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today*, 10, 65-68.
- Kuster, R., R. Bernardo, A. Da Silva, J. Parente y W. Mors (1994). Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. *Phytochemistry*, 36, 221-223.

- Kingston, D. y D. Newman (2005). Natural products as drugs leads: An old process or the new hope for drug discovery? *IDrugs: The Investigational Drugs Journal*, 8, 990-992.
- Molineux, W. y R. Killick-Kendrick (1987). Leishmaniasis in Biology and Medicine, En: *Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Peters, W. y Killick-Kendrick, R. (ed). Academic Press. New York. pp. 20, 794-845.
- Murray, H. (2001). Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2185-2197.
- Murray, H. (2004). Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 787-794
- Murray, H., J. Berman, C. Davies y N. Saravia (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, 366, 1561-1577.
- Ngadjui, BT., E. Dongo, E. Happi, M.T. Benzabih y B. Abegaz (1998). Prenylated flavones and phenylpropanoid derivatives from roots of *Dorstenia psilurus*. *Phytochemistry*, 48, 733-737.
- Ngadjui, BT., E. Dongo, H. Tamboue, K. Fogue y BM. Abegaz (1999a). Prenylated flavones from the twigs of *Dorstenia mannii*. *Phytochemistry*, 50, 1401-1406.
- Ngadjui, BT., GWF. Kapche, H. Tamboue, BM. Abegaz y JD. Connolly (1999b). Prenylated flavonoids and a dihydro-4-phenylcoumarin from *Dorstenia poinsettifolia*. *Phytochemistry*, 51, 119-123.
- Ngadjui, BT., T. Tabopda, E. Dongo, G. Kapche y P. Sandor y BM. Abegaz (1999c). Dorsilurin C, D and E, three prenylated flavonoids from the roots of *Dorstenia psilurus*. *Phytochemistry*, 52, 731-735.
- Ngadjui, B., E. Dongo, BM. Abegaz, S. Fotso y H. Tamboue (2002). Dinklagins A, B and C: three prenylated flavonoids and other constituents from the twigs of *Dorstenia dinklagei*. *Phytochemistry*, 61, 99-104.
- Newman, D. y G. Cragg (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311-335.

- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. WHO/EDM/TRM/2002.1. Ginebra: Programa de Medicina Tradicional OMS.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2006). The control of neglected zoonotic diseases. A route to poverty alleviation. World Health Organization. Geneva.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (2010). Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO expert committee on the control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010.
- Orellana, S., (1987). Indian Medicine in Highland Guatemala. University of New Mexico Press, Albuquerque, 200-220 p.
- Ocampo, R. y M. Balick (2009). Plants of semillas sagradas: An ethnomedicinal garden in Costa Rica. Finca Luna Nueva Extractos de Costa Rica, S.A., USA. 40 p.
- Peraza-Sánchez, S.R., F. Cen-Pacheco, A. Noh-Chimal, F. May-Pat, P. Simá-Polanco, E. Dumontieil, M. García-Miss y M. Mut-Martín (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Pink, R., A. Hudson, M. Mouriés y M. Bendig (2005). Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 727-740.
- Quiñones, S., M. Samoya, V. García, A. Cáceres y V. Matta (2008). *Revista Científica, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 4, 9-15.
- Rábago, J., SD. Asz, L. López, J. Banquera, ME. Solloa y R. Arenas y CL. Jáuregui (2006). Leishmaniasis cutánea. Reportes de un caso. *Medicina Interna de México*, 22, 343-346.
- Reithinger, R., J. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander y S. Brooker (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases*, 7, 581-596.
- Reyes-Novelo, E., H. Ruíz-Piña, J. Escobedo-Ortegón, I. Rodríguez-Vivas, M. Bolio-González, A. Polanco-Rodríguez y P. Manrique-Saide (2011). Situación actual y

perspectivas para el estudio de las enfermedades zoonóticas emergentes, reemergentes y olvidadas en la península de Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14: 35-54.

Standley, P. y J. Stenyermark (1946). *Flora of Guatemala*. Fieldiana: Botany. Chicago Natural History Museum Press, E.U.A. 67-88 p.

Stevens, W.D., C. Ulloa, A. Pool y O. Montiel (2001). *Flora de Nicaragua*. Missouri Botanical Garden Press, U.S.A. 1519-1520 pp.

Shimshony, A. (2008). Zoonoses remain a significant concern in modern medicine. *Infectious Disease News*, 21, 8.

Terreaux, C., M. Maillard, H. Stoeckli-Evans, M. Gupta, K. Downum, J. Quirke y K. Hostettmann (1995). Structure revision of a furanocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. *Phytochemistry*, 39, 645-647.

Tovar-Miranda, R., R. Cortés-García, N. Santos-Sánchez y P. Joseph-Nathan (1998). Isolation, total synthesis, and relative stereochemistry of a dihydrofurocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. *Journal of Natural Products*, 61, 1216-1220.

Tsopmo, A., M. Tene, P. Kamnaing, D. Ngnokam, J. Ayafor y O. Sterner (1998). Geranylated flavonoids from *Dorstenia poinsettifolia*. *Phytochemistry*, 48, 345-348.

Vargas, F., E. Torres, R. Arenas y MR. Quintanilla (2011). Leishmaniasis en México. *Medicina Cutánea Ibero-Latina-Americana*, 39, 163-183.

Vera-Izaguerre, D., E. Vega-Memije. M. Quintanilla y R. Arenas (2006). Leishmaniasis revisión. *Dermatología, Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 4, 252-260.

Vilegas, W., E. Vasconcelos, G. Pozetti y J. Villegas (1997a). Coumarins and terpenoids from *Dorstenia asaroides* Gardn. *Revista Brasileña de Ciencias Farmacéuticas*, Sao Paulo, 18, 145-151.

Vilegas, J., F. Lancas, W. Vilegas y G. Pozetti (1997b). Further triterpenes, steroids and furocoumarins from Brazilian medicinal plants of *Dorstenia genus* (Moraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 8, 529-535.

Waizel-Bucay, J. y I. Martínez (2011). Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. Artículo de investigación. Revista Asociación Dental Mexicana, 68, 73-88.

Woolhouse, M. y S. Gowtage-Sequeria (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. Emerging Infectious Diseases, 11, 1842-1847.

Woldu, Y., B. Abegaz, B. Botta, G. Monache y F. Monache (1988). Styrenes from *Dorstenia barmimiana*. Phytochemistry, 27, 1227-1228.

CAPITULO II

Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de *Dorstenia contrajerva* presentes en las fracciones activas contra promastigotes de *Leishmania mexicana*

2.1. Introducción

El análisis fitoquímico permite el estudio de todas las sustancias que hay en un extracto vegetal. Por lo tanto el proceso de aislamiento y purificación de metabolitos secundarios consta de una serie de procesos que comprende desde las operaciones de molienda, extracción, concentración, purificación y secado, así como métodos cromatográficos que facilitan la separación, identificación y determinación de compuestos.

En este capítulo se describen los métodos de obtención del extracto metanólico y de las fracciones de diferente polaridad de las raíces de *D. contrajerva* así como la purificación e identificación mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos de los metabolitos secundarios de la fracción que presentó mayor actividad leishmanicida.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Materiales en general

Los disolventes utilizados fueron de grado industrial, destilados en el laboratorio, grado reactivo y de diferentes polaridades.

El proceso de secado del extracto, particiones y fracciones se llevó a cabo en un evaporador rotatorio Büchi (Re 111) con baño maría a 40 °C, hasta reducir a un volumen mínimo.

Para el proceso de fraccionamiento de los extractos se emplearon diferentes técnicas cromatográficas: cromatografía líquida al vacío (CLV), cromatografía de columna por gravedad (CCG), cromatografía de columna flash (CCF), cromatografía de capa delgada preparativa (CCP) y el monitoreo de la purificación se hizo por cromatografía de capa delgada (CCD) de gel de sílice 60F₂₅₄ de la marca Merck.

Para la visualización y detección de puntos o bandas de algunos de los compuestos fluorescentes se utilizó luz UV de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) y las placas se revelaron impregnándolas con una disolución de ácido fosfomolibdico (una disolución al 4% de ácido fosfomolibdico con trazas de sulfato cérico en H₂SO₄ al 5%) y posterior calentamiento.

Las fases estacionarias empleadas fueron de gel de sílice 60 (GF₂₅₄, tamaño de partícula de 0.015-0.040 mm, Merck), gel de sílice 60Å de 70-230 mesh (Sigma-Aldrich) y gel de sílice 60Å de 230-400 mesh (Sigma-Aldrich) y Sephadex LH-20.

El análisis e identificación de las sustancias puras se llevó a cabo por medio de un cromatógrafo de gases (CG), un cromatógrafo de gases acoplado a un detector másico (CG-EM), espectrofotometría de infrarrojo (IR), espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C), incluyendo experimentos bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC), y espectrometría de masas (EM).

Cromatografía de gases (CG)

Los cromatogramas fueron obtenidos en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A con un detector de ionización de flama (flame ionization detector, FID). Equipado con una columna HP-5 y las condiciones de corrida: 180° durante 3 min, una rampa de 30 °C/min hasta 300 °C durante 35 min, velocidad de flujo: 1 mL/min y como gas acarreador se empleó nitrógeno.

Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM)

Los espectros de masas fueron obtenidos en un cromatógrafo de gases 6890N acoplado a un detector selectivo de masas 5975B, ambos de marca Agilent Technologies, con una columna Ultra 1 y las condiciones de corrida: 160 °C durante 3 min, una rampa de 10 °C/min hasta 300 °C durante 30 min, velocidad de flujo: 1.5 mL/min y como gas acarreador se empleó helio.

Espectrofotometría de infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un espectrómetro Nicolet Protegé 460, las muestras se analizaron en pastillas de bromuro de potasio (KBr).

(9.5:0.5) y Hx:An (8:2), por medio de una bomba con un flujo de 1 pulgada/min. Se recolectaron 150 fracciones, se monitorearon por CCD y se agruparon las que tenían composición similar en quince fracciones marcadas como DCR-11a hasta DCR-11ñ. De la fracción DCR-11k mediante precipitación se purificó 16.9 mg de un sólido blanco denominado compuesto 2 (Figura 2.3) y su pureza fue seguida mediante CCD observada bajo luz UV de onda corta, onda larga y revelada con ácido fosfomolibdico.

Compuesto 2 (Psoraleno): $C_{11}H_6O_3$; sólido color blanco; $R_f = 0.3$ en sistema Hx:AcOEt:MeOH (8:1.3:0.2). CG-EM $t_R = 5.62$ min, m/z : 186.0 [M^+], 158.1, 102.1, 87.0, 76.0, 63.0, 51.1. RMN- 1H (600 MHz, $CDCl_3$) δ 6.37 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-3), 6.82 (1H, dd, $J = 2.5$ y 1.0 Hz, H-3'), 7.46 (1H, s, H-8), 7.67 (1H, s, H-5), 7.79 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-4), 7.89 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-2'). RMN- ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) δ_c 99.8 (C-8), 106.3 (C-3'), 114.6 (C-3), 115.3 (C-10), 119.8 (C-5), 124.8 (C-6), 144.0 (C-4), 146.8 (C-2'), 152.0 (C-9), 156.3 (C-7), 160.9 (C-2).

2.5.3. Aislamiento del compuesto 3

La fracción DCR-3f fue sometida a una columna flash; 3.1 g se disolvieron en un volumen mínimo de CH_2Cl_2 y luego se mezcló con 4.6 g de gel de sílice (70-230 mesh, 60Å) para preparar la cabeza. La columna de 5.0 cm de diámetro se empacó con gel de sílice (230-400 mesh) hasta una altura de 30.0 cm y eluida con una mezcla de disolventes Hx:An (9.5:0.5) y Hx:An (6:1). Se recolectaron 178 fracciones, se monitorearon por CCD y se agruparon las que tenían composición similar en doce fracciones marcadas como DCR-16a hasta DCR-16l.

De la fracción DCR-16i, 209.2 mg se utilizaron en una columna de Sephadex LH-20 y eluida con una mezcla de disolventes CH_2Cl_2 :MeOH (1:1). Se recolectaron 40 fracciones las cuales fueron agrupadas en cinco fracciones con base en su similitud por medio de CCD y fueron marcadas como DCR-18a hasta DCR-18e. De la fracción DCR-18b se obtuvieron 66.1 mg de un sólido color blanco, que fue purificado mediante precipitación con MeOH y su pureza fue seguida mediante CCD observada bajo luz UV de onda corta y onda larga e impregnada con el revelador ácido fosfomolibdico, el cual se denominó compuesto 3 (Figura 2.3).

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C), fueron obtenidos con un instrumento Varian-Agilent de 600 MHz en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) en Mérida, Yucatán.

2.3. Material vegetal

La planta *D. contrajerva* fue recolectada el 7 de febrero de 2012, alrededor de la zona arqueológica de Xpujil en Chetumal, Quintana Roo. La identificación fue realizada por un taxónomo de la Unidad de Recursos Naturales del CICY y un ejemplar fue depositado en el herbario *U Najil Tikin Xiw* del CICY con el número de voucher PSimá 3065.

El material vegetal se limpió y se separaron tallo y hojas de las raíces. Las raíces fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente por tres días, después se colocaron en cámaras de secado con temperatura controlada (50 °C) por dos días. Una vez que las raíces ya estaban completamente secas se pesaron y se molieron, obteniéndose 6,200 g y a esto se le sumó 528.4 g más de raíces molidas de una colecta anterior, lo que dio un total de material molido de 6,728.4 g.

2.4. Obtención del extracto metanólico y particiones

El extracto crudo metanólico se obtuvo por maceración de 6,728.4 g del material molido, el cual se depositó en un reactor o tanque al que se añadió 18 L de MeOH hasta cubrir todo el material vegetal. El contenido fue agitado regularmente y después de 24 h se hizo la primera extracción y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio Büchi (R-151) a baño maría a 40 °C hasta un volumen mínimo y posterior secado a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó dos veces más, juntándose los tres extractos obtenidos. Finalmente el extracto crudo se colocó en un frasco de vidrio previamente tarado, obteniéndose un total de 938.3 g de extracto crudo metanólico.

Se tomaron 200 g del extracto crudo para realizar las particiones (Figura 2.1). El extracto se disolvió en una cantidad mínima de MeOH (230 mL) y se le agregó agua en una relación 1:3 (MeOH/H₂O); esta suspensión fue sometida a una extracción líquido-líquido empleando disolventes de menor a mayor polaridad (Hx, CH₂Cl₂ y AcOEt).

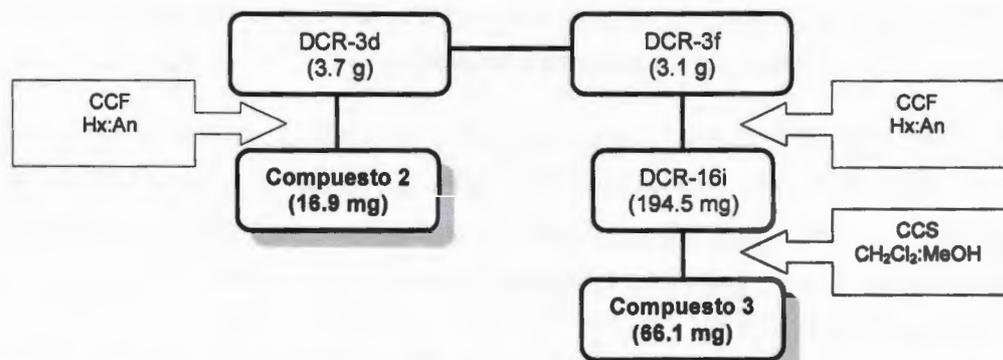


Figura 2.3. Diagrama de obtención del compuesto 2 de la fracción DCR-3d y el compuesto 3 de la fracción DCR-3f. CCF = cromatografía por columna flash, CCS = cromatografía por columna de Sephadex).

Compuesto 3 (4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1] benzopiran-7-ona): $C_{21}H_{20}O_6$; sólido color blanco; $R_f = 0.3$ Hx:AcOEt:MeOH (7:1.7:0.3). CG-EM $t_R = 16.43$ min, m/z : 368.2 $[M^+]$, 202.0, 174.0, 139.1 (pico base), 111.1, 69.1. RMN- 1H (600 MHz, $CDCl_3$) δ 1.33 (3H, s, 7'''-CH $_3$), 1.35 (3H, s, 6'''-CH $_3$), 1.35 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-4''), 2.10, 2.24 (2H, dt, $J = 13.7, 6.2$ Hz, 2''-CH $_2$), 3.0 (1H, m, $J = 7.0$ Hz, H-3'''), 4.44, 4.48 (2H, dt, $J = 9.4, 6.0$ Hz, 1''-CH $_2$), 5.40 (1H, s, H-3'''), 6.27 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-3), 6.88 (1H, dd, $J = 2.4, 1.0$, H-3'), 7.13 (1H, s, H-8), 7.58 (1H, dd, $J = 2.4, 1.0$ Hz, H-2'), 8.10 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-4). RMN- ^{13}C (150 MHz, $CDCl_3$) δ_c 17.8, 22.8 (2 \times), 32.4, 34.2, 70.2, 88.6, 94.3, 100.1, 104.7, 106.8, 112.8, 113.4, 138.9, 145.0, 148.4, 152.6, 158.1, 160.9, 193.9, 207.0.

2.5.4. Aislamiento del compuesto 4

Un total de 1.2 g de la fracción DCR-3g fue sometido a una columna de gravedad empacada con gel de sílice (70-230 mesh, 60Å), eluida con mezclas de Hx:An (9:1) hasta Hx:An (6:4), An:CH $_2$ Cl $_2$ (6:4), An:CH $_2$ Cl $_2$ (4:6) y An:MeOH (5:5) hasta An:MeOH (3:7). La cabeza se preparó con 1.8 g de gel de sílice y empacada en una columna de 3 cm de diámetro hasta una altura de 30.0 cm. Se recolectaron 263 fracciones, se monitorearon por CCD y se agruparon las que tenían composición similar en veinticinco fracciones etiquetadas como DCR-5a hasta DCR-5y.

Las fracciones DCR-5v, DCR-5w y DCR-5x se reunieron obteniendo un peso de 143.9 mg, se sometieron a una columna de Sephadex LH-20 eluida con MeOH al 100%. Se

recolectaron 45 fracciones, se monitorearon por CCD y se agruparon las que tenían composición similar en seis fracciones etiquetadas como DCR-7a hasta DCR-7f.

De la fracción DCR-7f, 24.7 mg se utilizaron en una columna de Sephadex LH-20 eluida con EtOH 100%. Se recolectaron 23 fracciones, fueron monitoreadas por CCD y se agruparon las de composición similar en DCR-29a y DCR-29b. La fracción DCR-29a resultó pura al ser observada y revelada por CCD, se obtuvo 8.3 mg y se denominó compuesto 4 (Figura 2.4).

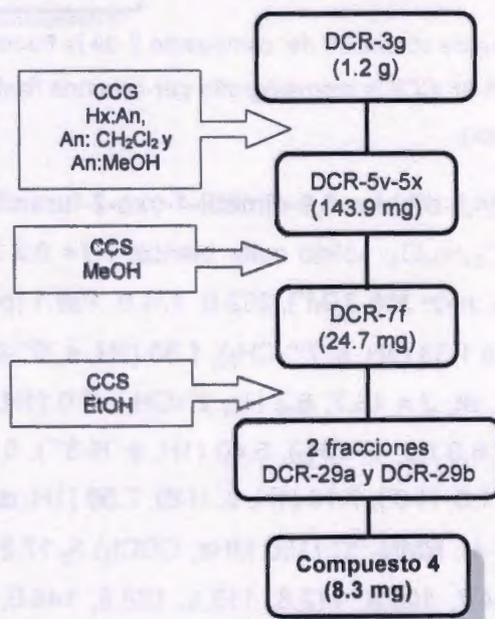


Figura 2.4. Diagrama de obtención del compuesto 4 de la fracción DCR-3g. CCG = cromatografía por columna de gravedad, CCS = cromatografía por columna de Sephadex LH-20.

Compuesto 4: $C_{21}H_{22}O_5$; sólido color rojo; Rf: Hx:An (3:2). IR $\nu_{\text{máx}}$ (An) cm^{-1} : 3500, 2974-2831, 1699-1425, 1287-1000. RMN- ^1H (600 MHz, metanol- d_4) δ 1.63 (3H, s, 11'- CH_3), 1.75 (3H, s, 10'- CH_3), 3.50 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, 7'- CH_2), 3.76 (3H, d, $J = 1.3$ Hz, 7-O CH_3), 3.88 (2H, s, 10- CH_2), 5.25 (1H, m, $J = 7.3, 1.3$ Hz, H-8'), 6.19 (1H, s, H-3), 6.59 (1H, dd, $J = 8.1, 1.8$ Hz, H-6'), 6.69 (1H, d, $J = 7.9, 2.6$ Hz, H-5'), 6.70 (1H, d, $J = 1.1$ Hz, H-2'), 6.73 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-5). RMN- ^{13}C (150 MHz, metanol- d_4) δ_c 16.5, 22.9, 24.4, 33.6, 60.1, 102.2, 102.8, 114.9, 115.5, 118.0, 119.7, 122.0, 124.2, 129.2, 131.2, 142.9, 143.5, 144.8, 146.2, 147.7, 158.4.

2.5.5. Aislamiento del compuesto 5

La fracción DCR-3h fue sometida a una columna flash, 1.8 g se disolvieron en un volumen mínimo de An y luego se mezcló con 2.7 g de gel de sílice (70-230 mesh, 60Å) para preparar la cabeza. La columna de 5 cm de diámetro se empacó con gel de sílice (230-400 mesh) hasta una altura de 36.1 cm y eluida con una mezcla de disolventes Hx:CH₂Cl₂:MeOH (3:1.8:0.2), Hx:An:MeOH (3:1.8:0.2) y An:MeOH (1:1). Se recolectaron 163 fracciones, se monitorearon por CCD y se agruparon las que tenían composición similar en ocho fracciones etiquetadas como DCR-25a hasta DCR-25g.

De la fracción DCR-25c, 100.0 mg se utilizaron en una columna de Sephadex LH-20 y eluida con MeOH 100%. Se recolectaron 36 fracciones las cuales fueron agrupadas en dos fracciones con base en su similitud por medio de CCD, las fracciones 8 y 9 se etiquetaron como DCR-26a y las fracciones restantes se colocaron en su vial original (DCR-25c).

De la fracción DCR-26a, 37.1 g fueron purificados en una columna flash. La columna de 1.3 cm de diámetro se empacó con gel de sílice (230-400 mesh) hasta una altura de 40.0 cm y eluida con una mezcla de disolventes CH₂Cl₂:MeOH (3.8:0.2). Se recolectaron 114 fracciones, se monitorearon por CCD y se agruparon las que tenían composición similar en siete fracciones marcadas como DCR-27a hasta DCR-27g. La fracción DCR-27b, 27c, 27d y 27e resultaron puras al ser observadas y reveladas por CCD, se reunieron y se obtuvo 23.0 mg y se etiquetó como compuesto 5.

De la fracción DCR-32b, la cual se obtuvo de DCR-25c, 27.4 mg se utilizaron en una columna flash con un diámetro de 1.3 cm, la cual se empacó con gel de sílice (230-400 mesh) hasta una altura de 30.0 cm y eluida con una mezcla de disolventes Hx:An (3:1.5) hasta Hx:An (3:3). Se recolectaron 59 fracciones, se monitorearon por CCD y se agruparon las que tenían composición similar en seis fracciones etiquetadas como DCR-33a hasta DCR-33f. Las fracciones DCR-33c y DCR-33d con un peso de 3.7 y 4.4 mg, respectivamente, resultaron puras e iguales al compuesto 5.

De la fracción DCR-32a, 105.0 mg se utilizaron en una columna flash. La columna de 1.3 cm de diámetro se empacó con gel de sílice (230-400 mesh) hasta una altura de 30.0 cm y eluida con una mezcla de disolventes Hx:An (3:1.2). Se recolectaron 61 fracciones, se

monitorearon por CCD y se agruparon en ocho fracciones etiquetadas como DCR-38a hasta DCR-38h. Las fracciones DCR-38f y DCR-38g con un peso de 13.0 y 59.1 mg, respectivamente, resultaron puras e iguales al compuesto 5.

La fracción DCR-32a nuevamente se sometió a una columna flash con las mismas características descritas anteriormente, en la que se obtuvo dos fracciones puras la DCR-39h y DCR-39i con un peso de 21.8 y 24.9 mg, respectivamente, que resultaron ser iguales al compuesto 5.

Finalmente del compuesto 5 obtuvo un total de 149.9 mg (Figura 2.5).

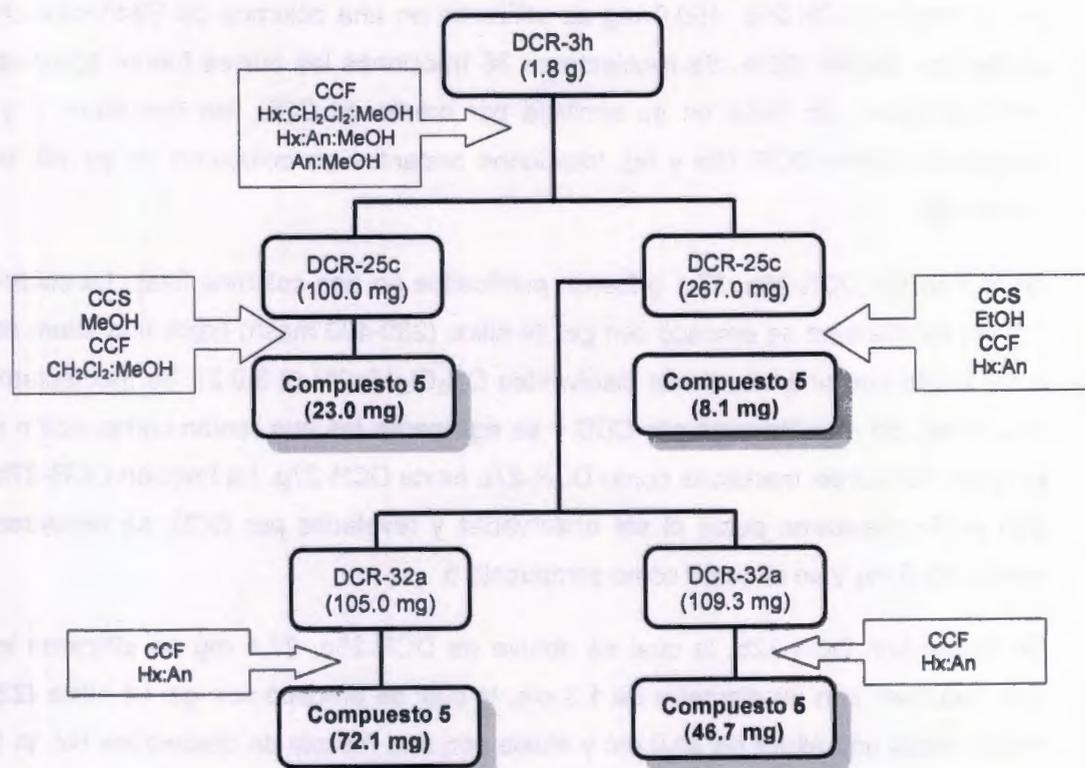


Figura 2.5. Diagrama de obtención del compuesto 5 de la fracción DCR-3h. CCS = cromatografía por columna de sephadex), CCF = cromatografía por columna flash.

Compuesto 5: $C_{45}H_{80}O_{10}$ Sólido color blanco; IR $\nu_{\text{máx}}$ (CH_2Cl_2) cm^{-1} : 3500, 2954-2851, 1741, 1464-1165. RMN- 1H (600 MHz, $CDCl_3$) δ 0.81 (6H, t, $J = 6.6$ Hz, H-18"/H-18"), 1.83 (20H, m, H-6"-H-16",), 1.22 (16H, m, H-4"-H-7", H-4"', H-5"', H-17)'), 1.52 (4H, d, $J = 5.2$ Hz, H-3"/H-3'), 1.93 (4H, q, $J = 5.9$ Hz, H-8"/H-11'), 1.97 (2H, q, $J = 6.8$ Hz, H-17'), 2.24

(4H, q, $J = 7.8$ Hz, H-2''/H-2'''), 2.69 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H-14''), 3.46 (1H, t, $J = 4.6$ Hz, H-5'), 3.51 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 3.59 (1H, t, $J = 8.5$ Hz, H-2'), 3.64 (1H, m, $J = 10.5, 6.8$ Hz, H-3b), 3.77 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6'b), 3.83 (1H, d, $J = 5.2$ Hz, H-6'a), 3.85 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-3a), 3.94 (1H, s, H-4'), 4.13 (1H, dd, $J = 11.9, 6.5$ Hz, H-1b), 4.19 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1'), 4.32 (1H, d, $J = 11.8, 2.3$ Hz, H-1a), 5.22 (1H, d, $J = 5.8, 2.8$ Hz, H-2), 5.27 (6H, $J = 4.3$ Hz, H-9'', H-10'', H-12'', H-13'', H-15'', H-16''). RMN- ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) δ_{C} 14.0 (C-18''/C-18'''), 34.2-31.5 (C-2'', C-2''', C-4''', C-5'''), 29.7-29.0 (C-6''' - C-16'''), 27.2 (C-11''), 27.1 (C-17''), 25.6 (C-14''), 24.8 (C-3'', C-3'''), 22.6 (C-17'''), 22.5 (C-5''), 62.2 (C-6'a, C-6'b), 62.7 (C-1a, C-1b), 68.1 (C-3a, C-3b), 69.2 (C-4'), 70.1 (C-2), 71.3 (C-2'), 73.4 (C-3'), 74.5 (C-5'), 104.0 (C-1'), 127.8 (C-9''), 128.0 (C-10''), 129.6 (C-12''), 129.9 (C-13''), 130.0 (C-15''), 130.2 (C-16''), 173.8 (C-1'''), 173.4 (C-2'').

2.5.6. Aislamiento del compuesto 6

Del fraccionamiento de DCR-3h, 40.3 mg de la fracción de DCR-25d se sometieron a una columna Sephadex LH-20 eluida con EtOH 100%. Se recolectaron 26 fracciones y fueron agrupadas en dos fracciones con base en su similitud por CCD, se etiquetaron como DCR-28a y DCR-28b. La fracción DCR-28b resultó pura con un peso de 1.2 mg y se marcó como compuesto 6.

De la fracción DCR-25c, 267.0 mg se sometieron al procedimiento descrito anteriormente con el objetivo de obtener más del compuesto 6. Se obtuvieron 21 fracciones y se agruparon en cuatro según su similitud etiquetadas como DCR-32a hasta DCR-32d. La fracción DCR-32d resultó pura con un peso de 4.3 mg y se comparó por CCD con el compuesto 6, resultando ser el mismo. En total del compuesto 6 se obtuvo 5.5 mg (Figura 2.6).

Compuesto 6: Sólido color amarillo, R_f : 0.3 Hx:An (3:1) (3 \times). IR $\nu_{\text{máx}}$ (An) cm^{-1} : 2972-2594, 1645-1410, 1217-1123. RMN- ^1H (600 MHz, acetona- d_6) δ_{H} 1.33 (2 \times) (3H, d, $J = 2.9$ Hz), 5.61 (1H, dd, $J = 10.0, 2.9$ Hz), 6.31 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.42 (1H, dd, $J = 8.5, 2.3$), 6.48 (1H, s), 6.53 (1H, dd, $J = 10.0, 2.6$ Hz), 7.00 (1H, dd, $J = 2.7$ Hz), 7.72 (1H, dd, $J = 8.7, 2.9$ Hz). RMN- ^{13}C (150 MHz, acetona- d_6) δ_{C} 27.4 (2 \times), 77.7, 94.5, 103.4, 104.8, 107.5, 108.1, 109.6, 114.9, 128.1, 130.0, 157.0, 158.7, 161.8, 182.6.

2.5.7. Aislamiento del compuesto 7

De la fracción DCR-32a, 105.0 mg se utilizaron en una columna flash. La columna de 1.3 cm de diámetro se empacó con gel de sílice (230-400 mesh) hasta una altura de 30 cm y eluida con una mezcla de disolventes Hx:An (3:1.2). Se recolectaron 61 fracciones, se monitorearon por CCD y se agruparon en ocho fracciones etiquetadas como DCR-38a hasta DCR-38h. La fracción DCR-38b con un peso de 0.9 mg resultó pura al ser observada y revelada por CCD y se denominó compuesto 7.

Con el fin de obtener más del compuesto 7, 109.3 mg se sometieron a una columna flash con las mismas condiciones descritas anteriormente. Se obtuvieron las fracciones DCR-39b y DCR-39c puras con un peso de 0.8 y 2.2 mg, respectivamente. En total del compuesto 7 se obtuvo 3.9 mg (Figura 2.6).

Compuesto 7 (γ -sitosterol). $C_{29}H_{50}O$. Compuesto sólido de color blanco. CG-EM $t_R = 26.85$ min, m/z : 414.4 [M^+], 381.4, 255.2, 213.2, 145.1.

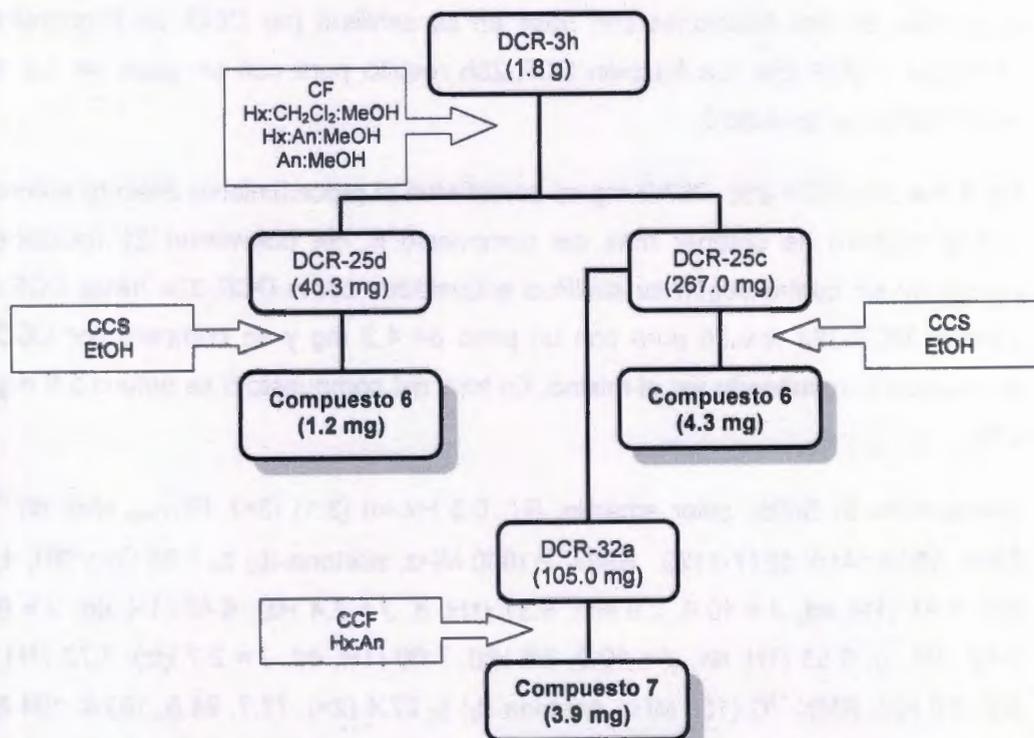


Figura 2.6. Diagrama de obtención de los compuestos 6 y 7 de la fracción DCR-3h. CCS = cromatografía de columna de sephadex), CCF = cromatografía de columna flash.

2.6. Resultados y discusión

2.7. Porcentaje de rendimiento del proceso de extracción y partición del material vegetal

Los rendimientos de las fracciones obtenidas de las raíces de *D. contrajerva* por medio de la partición con hexano, diclorometano y acetato de etilo se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Rendimientos de las fracciones obtenidas del extracto metanólico de *Dorstenia contrajerva*.

Material vegetal (g)	Muestra	Clave	Peso seco (g)	% Rendimiento
6,728.4	Extracto metanólico	(DCR-1a)	938.3 ^a	13.94
	Fracción hexánica	(DCR-2a)	23.4 ^b	11.7
	Fracción diclorometánica	(DCR-2b)	21.9 ^b	10.9
	Fracción de acetato de etilo	(DCR-2c)	8.35 ^b	4.1
	Fracción acuosa	(DCR-2d)	144.3 ^b	72.1

^aPeso obtenido del total de material vegetal. ^bPeso obtenido de 200 g de muestra de extracto metanólico de material vegetal.

La fracción hexánica que resultó la más activa contra promastigotes de *L. mexicana* fue sometida a diferentes técnicas cromatográficas, lo cual permitió la purificación de siete metabolitos. La identificación de cada uno se describe a continuación.

2.8. Identificación del compuesto 1

El compuesto 1 es un aceite de color amarillo que pesó 148.1 mg, es soluble en CH₂Cl₂ y presentó una sola mancha en placa CCD en el sistema Hx:An (6:1).

La identificación del compuesto de la fracción se llevó a cabo con base en la comparación del espectro de masas adquirido con los espectros de masas de la base de datos NIST-05 (National Institute of Standards and Technology) del equipo CG-EM y con lo reportado por Oyugi *et al.* (2011).

El cromatograma indica un pico con un tiempo de retención (t_R) de 16.5 min. En el espectro de masas respectivo se observa un ion molecular a m/z 410 [M^+]; también se observó un pico base a m/z 69.0 de alta intensidad; así como picos de mediana intensidad a m/z 81.0 y m/z 41.0; una comparación con la base de datos sugirió con un 93% de coincidencia que el compuesto pertenece a 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno,2,6,10,15,19,23-hexametil (escualeno, $C_{30}H_{50}$) (Figura 2.7). El cromatograma se observa en la Figura 2.8 y su espectro de masa en la Figura 2.9.

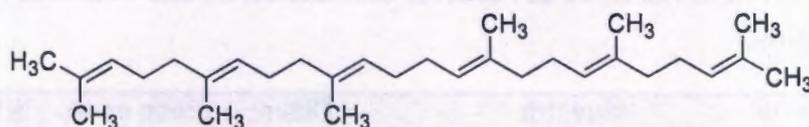


Figura 2.7. Estructura química del escualeno (compuesto 1).

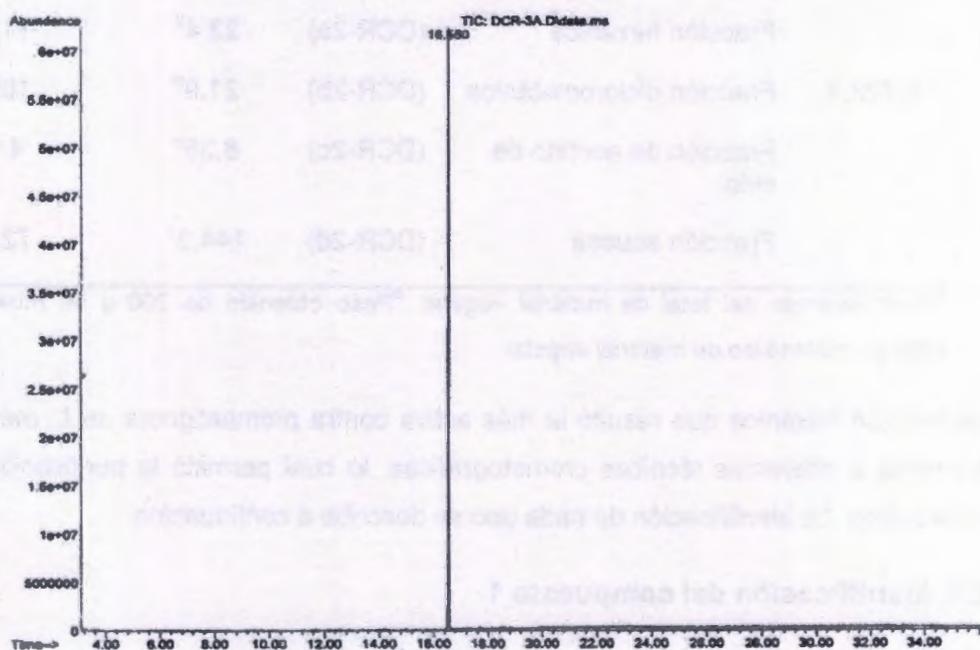


Figura 2.8. Cromatograma de gases del escualeno (compuesto 1).

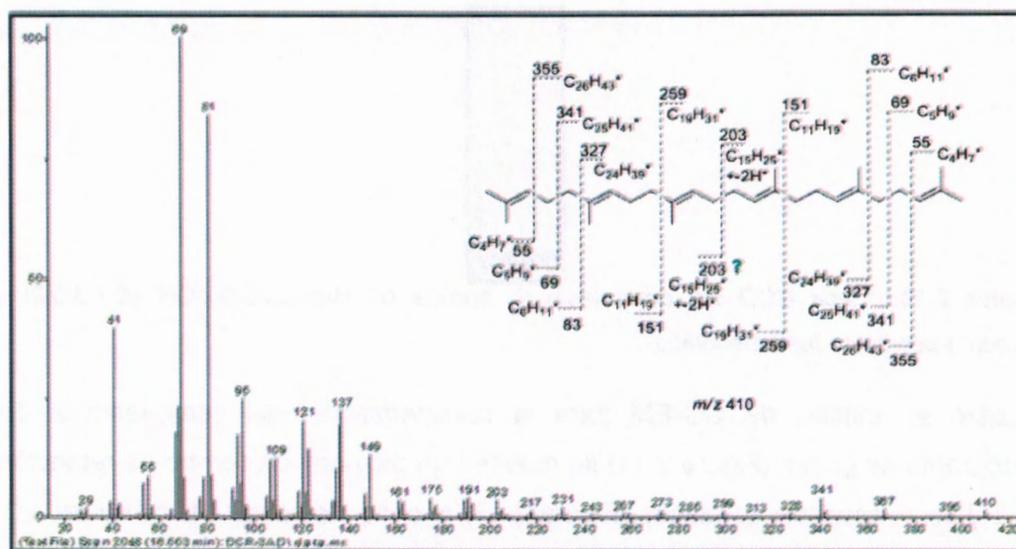


Figura 2.9. Espectro de masas del escualeno (compuesto 1).

El escualeno, un compuesto isoprenoide, es un metabolito intermedio en la biosíntesis de esteroides vegetales y animales. Debe su nombre a que fue aislado por primera vez del hígado de tiburón (*Squalus ssp.*) el cual contiene grandes cantidades y es considerada la fuente más rica. En los aceites vegetales se encuentra dentro de intervalos amplios como en el maní, la calabaza, el aceite de oliva, aceite de palma, aceite de germen de trigo y el aceite de salvado de arroz. También se distribuye de forma ubicua en los tejidos humanos, donde es uno de los principales componentes de lípidos de la superficie de la piel (Huang *et al.*, 2009).

Este metabolito muestra algunas ventajas sobre la piel como un emoliente, antioxidante, hidratante y actividades antitumorales; también se utiliza como un material o aditivo en vehículos aplicados tópicamente, tales como emulsiones de lípidos. Asimismo, el escualeno se extrae con propósitos comerciales para su uso en productos farmacéuticos y vacunas como un adyuvante (Huang *et al.*, 2009 y OMS, 2006).

2.9. Identificación del compuesto 2

El compuesto 2 se obtuvo como un sólido color blanco con un peso de 16.9 mg el cual es soluble en CH_2Cl_2 . El compuesto mostró una sola mancha por CCD con un $R_f = 0.3$ en el sistema Hx:AcOEt:MeOH (8:1.3:0.2); visible en onda larga (color verde fluorescente) y onda corta (color azul oscuro) (Figura 2.10).

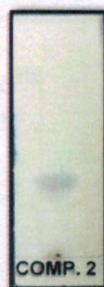


Figura 2.10. Placa CCD del compuesto 2, corrida en Hx:AcOEt:MeOH (8:1.3:0.2) y revelada con ácido fosfomolibdico.

Se realizó el análisis de CG-EM para la caracterización del compuesto 2. En el cromatograma de gases (Figura 2.11) se muestra un pico con un tiempo de retención (t_R) de 5.62 y en el espectro de masas (Figura 2.12) el peso molecular del compuesto 2 con un ion molecular a m/z 186.0 [M^+] que corresponde a la fórmula molecular $C_{11}H_8O_3$. El patrón de fragmentación característico a m/z 158.1, 130.0, 102.1, 87.0, 76.0, 63.0, 51.1 y con lo reportado (Chunyan *et al.*, 2009) permitió la identificación del compuesto conocido como psoraleno.

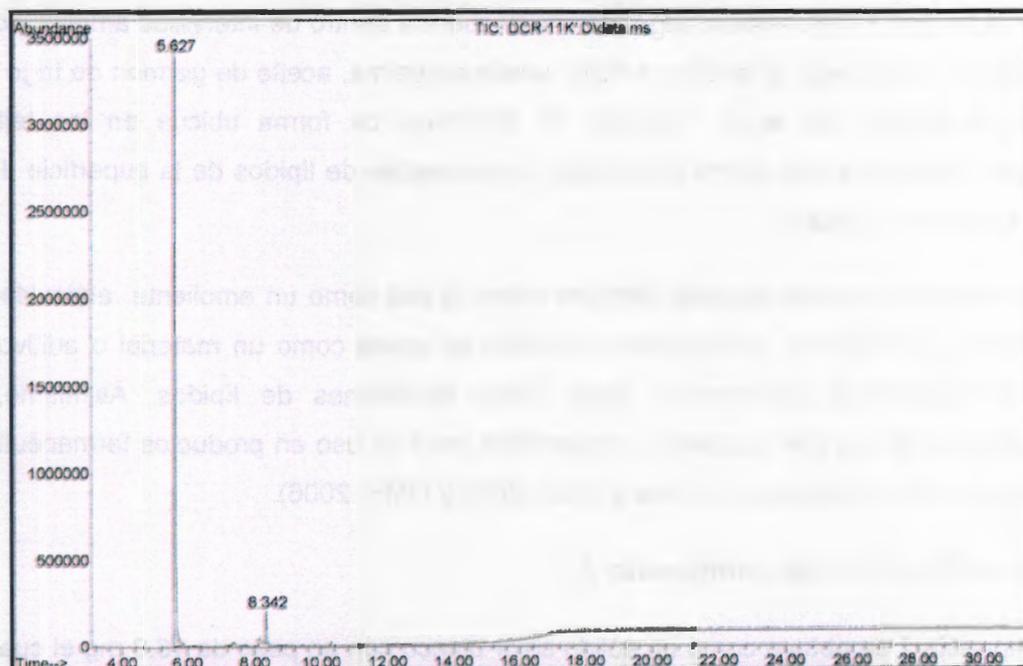


Figura 2.11. Cromatograma de gases del psoraleno (compuesto 2).

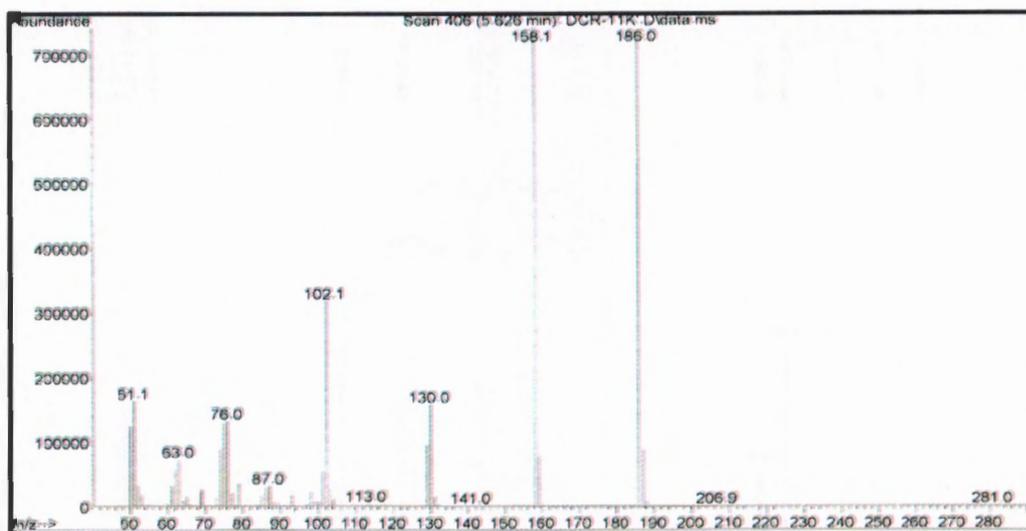


Figura 2.12. Espectro de masas del psoraleno (compuesto 2).

El espectro de RMN-¹³C mostró un total de 11 señales (Figura 2.13). Se determinó que cinco carbonos son cuaternarios con desplazamientos a δ_c 115.3, 124.8, 152.0, 156.3 y 160.9; también que seis señales corresponden a carbonos terciarios (CH) a δ_c 149.8, 144.0, 119.8, 114.6, 106.3 y 99.8.

La señal cuaternaria con un desplazamiento químico a δ_c 160.9 es característica de un carbono de carbonilo α,β -insaturado y se asignó a C-2 del anillo de pirano de la estructura base de una furanocumarina. Las señales a δ_c 156.3 y 152.0 se asignaron a C-7 y C-9 respectivamente, que corresponden a carbonos cuaternarios oxigenados que se encuentran en la región de carbonos aromáticos.

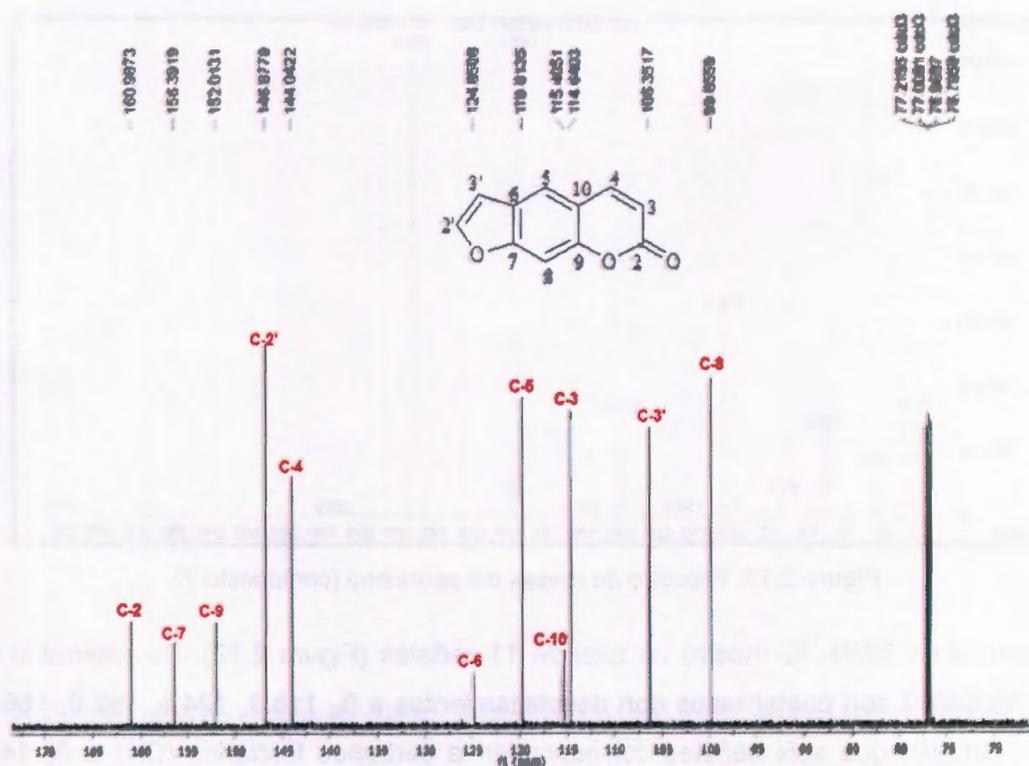


Figura 2.13. Espectro de RMN- ^{13}C del psoraleno (compuesto 2) (150 MHz, CDCl_3).

En el espectro de RMN- ^1H se observaron dos señales de dobletes a δ_{H} 6.37 y 7.79 que se asignaron a H-3 y H-4 del anillo pirano de la furanocumarina con una constante de acoplamiento vinílico *cis* a tres enlaces ($^3J_{\text{H-H}}$) de 9.6 Hz, también un segundo enlace vinílico a δ_{H} 7.89 y 6.82 correspondientes al anillo de furano en las posiciones H-2' y H-3', respectivamente con constantes de acoplamiento a tres enlaces ($^3J_{\text{H-H}}$) de 2.4, 2.5 y 1.0 Hz (Figura 2.14).

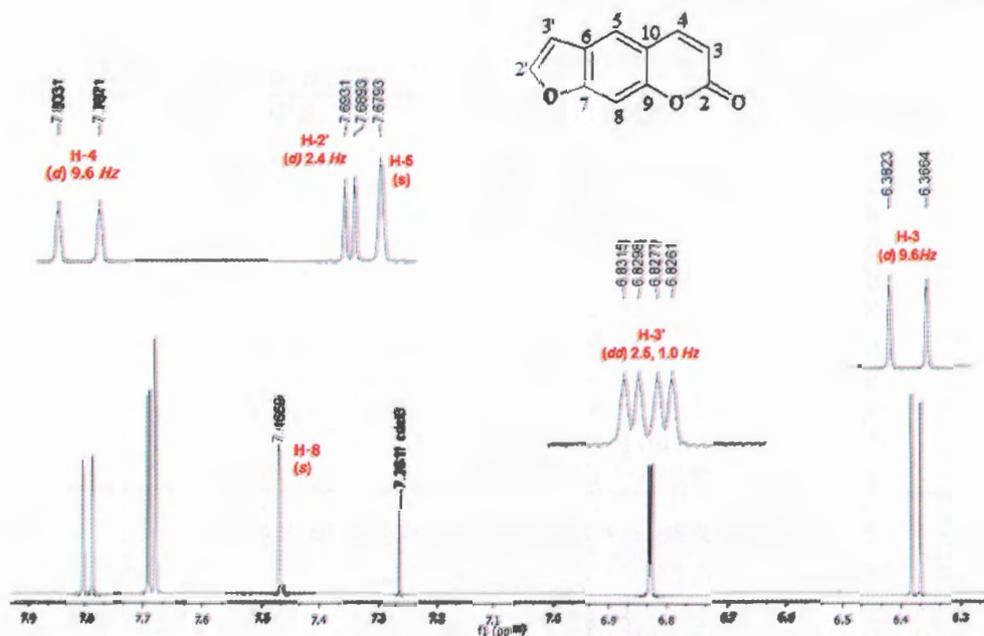


Figura 2.14. Espectro de RMN- ^1H del psoraleno (compuesto 2) (600 MHz, CDCl_3).

El análisis de todo este conjunto de datos permitió asignar e identificar por comparación con lo reportado en la literatura (Chunyan *et al.*, 2009) al compuesto 2 como psoraleno (Tablas 2.2 y 2.3 y Figura 2.15).

Tabla 2.2. Datos de los desplazamientos de RMN- ^{13}C del psoraleno CDCl_3 en comparación con los reportados en la literatura.

Posición	δ_{C}	Carbono	Chunyan <i>et al.</i> , 2009
			δ_{C}
1	-	-	-
2	160.9	C=O	161.0
3	114.6	CH	114.6
4	144.0	CH	144.0
5	119.8	CH	119.8
6	124.8	C	124.8
7	156.3	C	156.4
8	99.8	CH	99.8
9	152.0	C	152.0
10	115.3	C	115.4
2'	146.8	CH	146.9
3'	106.3	CH	106.3

Tabla 2.3. Datos de los desplazamientos de RMN-¹H del psoraleno en CDCl₃ en comparación con los reportados en literatura.

Posición	$\delta^1\text{H}$ (J (Hz))	Chunyan <i>et al.</i> , 2009
		$\delta^1\text{H}$ (J (Hz))
2	-	-
3	6.37 (1H, d, 9.6)	6.38
4	7.79 (1H, d, 9.6)	7.81
5	7.67 (1H, s)	7.67
6	-	-
7	-	-
8	7.46 (1H, s)	7.47
9	-	-
10	-	-
2'	7.89 (1H, d, 2.4)	7.70
3'	6.82 (1H, dd, 2.5, 1.0)	6.84

s = singulete, d = doblete, dd = doble de dobles

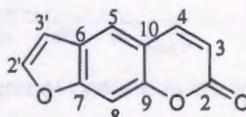


Figura 2.15. Estructura del psoraleno (compuesto 2).

El psoraleno ha sido aislado de otras especies de *Dorstenia* como *D. psilurus* (Ngadjui *et al.*, 1998), *D. brasiliensis* (Kuster *et al.*, 1994) y *D. multiformis* (Balestrin *et al.*, 2008), por lo tanto este sería el primer reporte en las raíces de *D. contrajerva*.

El psoraleno es un compuesto originario de la familia de productos naturales conocidos como furanocumarinas, se produce de forma natural en las semillas de *Psoralea corylifolia*, así como también en *Ficus carica*, el apio y el perejil. Es conocido por sus importantes efectos fotosensibilizantes y fitotóxicos, se ha utilizado en la fotoquimioterapia de trastornos de la piel como el vitiligo, psoriasis y fungoide, así como también existen reportes de tener actividad antibacterial (Parast *et al.*, 2011 y Chwan-Fwu *et al.*, 2007).

2.10. Identificación del compuesto 3

El compuesto 3 se obtuvo con un peso de 66.1 mg, el cual es un sólido color blanco soluble en CH₂Cl₂. Este compuesto mostró una sola mancha por CCD con un R_f = 0.3 en el sistema Hx:AcOEt:MeOH (7:1.7:0.3), y se observa con una fluorescencia verde bajo luz de onda corta (Figura 2.16).



Figura 2.16. Placa CCD del compuesto 3, corrida en Hx:AcOEt:MeOH (7:1.7:0.3) y revelada en ácido fosfomolibdico.

Para la caracterización de este compuesto se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM). En el cromatograma de gases (Figura 2.17) se puede observar un tiempo de retención (t_R) del compuesto 3 de 16.43 min. El espectro de masas (Figura 2.18) muestra un ion molecular a m/z 368.2 [M^+] que corresponde a la fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$. En el patrón de fragmentación se observó una señal a m/z 202.0 que sugiere la pérdida de $C_{11}H_5O_4$, el pico base a m/z 139.1 que indica la pérdida de $C_8H_{11}O_2$ (Kuster *et al.*, 1993).

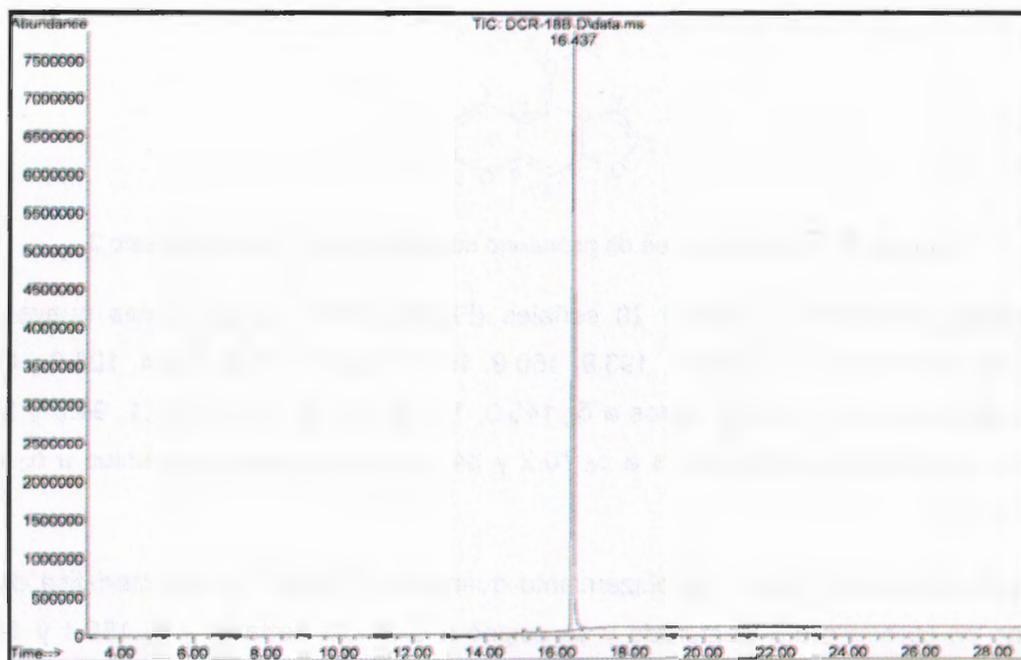


Figura 2.17. Cromatograma de gases del compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanyl)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3).

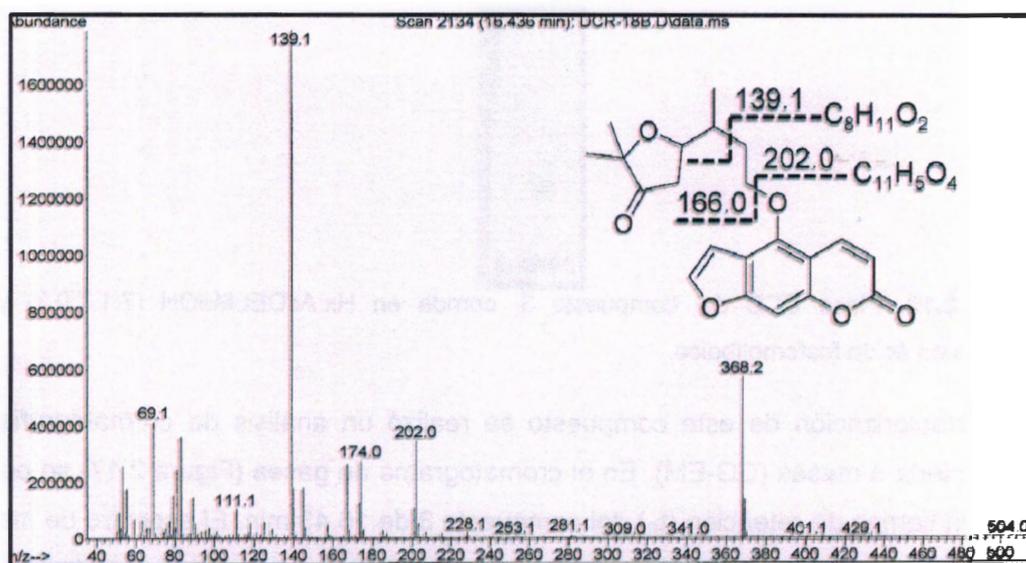


Figura 2.18. Espectro de masas del compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopirán-7-ona (compuesto 3).

La estructura base del compuesto 3 fue atribuida a una furanocumarina lineal con un esqueleto base de psoraleno sustituido en C-5 (Figura 2.19).

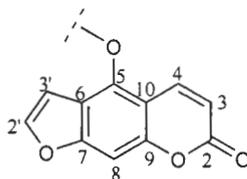


Figura 2.19. Esqueleto base de psoraleno sustituido en C-5 del compuesto 3.

El espectro de RMN- ^{13}C mostró 20 señales (Figura 2.20), de las cuales nueve son carbonos cuaternarios a δ_{C} 207.0, 193.9, 160.9, 158.1, 152.6, 148.4, 133.4, 106.8 y 88.6; siete señales de carbonos terciarios a δ_{C} 145.0, 138.9, 112.8, 104.7, 100.1, 94.3 y 32.4; también dos señales de metilenos a δ_{C} 70.2 y 34.2; y dos señales de metilos a δ_{C} 22.8 (2 \times) y 17.8.

La señal cuaternaria con un desplazamiento químico a δ_{C} 160.9 es característica de un carbono de carbonilo α,β -insaturado y se asignó a C-2. Las señales a δ_{C} 158.1 y 148.4 corresponden a carbonos aromáticos oxigenados y se asignaron a C-7 y C-9, respectivamente. La señal a δ_{C} 152.6 se asignó al carbono C-5 el cual está unido a un átomo de oxígeno (C-O).

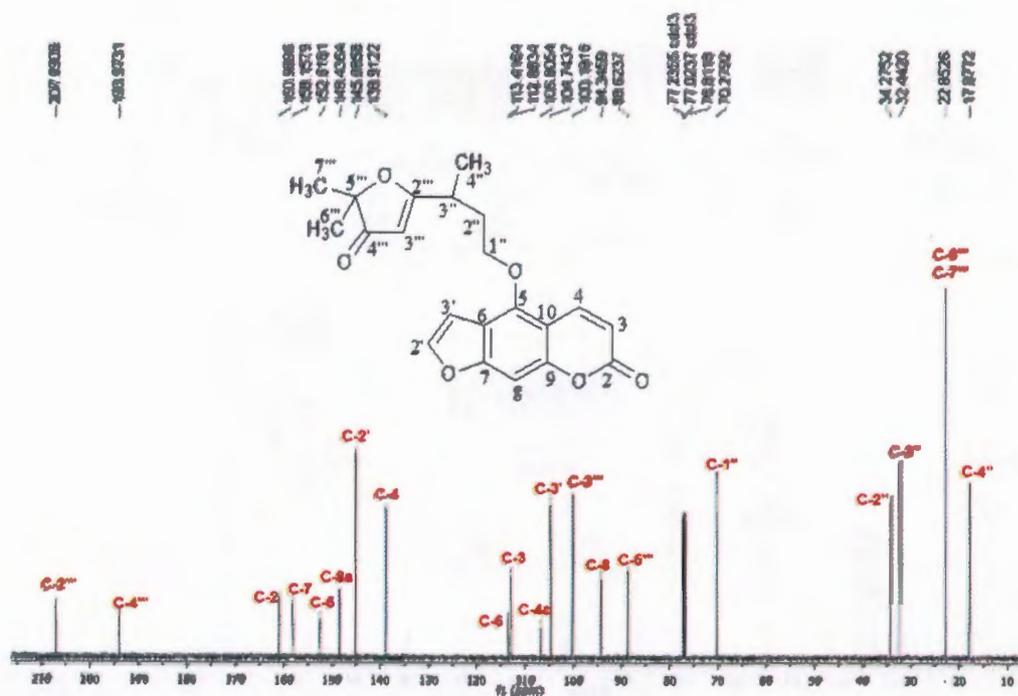


Figura 2.20. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3) (150 MHz, CDCl_3).

El espectro de RMN- ^1H integró para 20 protones (Figura 2.21). Un singulete a δ_{H} 7.13 fue atribuido al protón H-8; las señales a δ_{H} 6.27 y 8.10 se asignaron a H-3 y H-4, respectivamente, con una constante de acoplamiento a tres enlaces ($^3J_{\text{H-H}}$) de 9.8 Hz; dos señales más a δ_{H} 7.58 y 6.88 se asignaron a H-2' y H-3' con dos constantes de acoplamiento a tres enlaces ($^3J_{\text{H-H}}$) de 2.4 y 1.0 Hz.

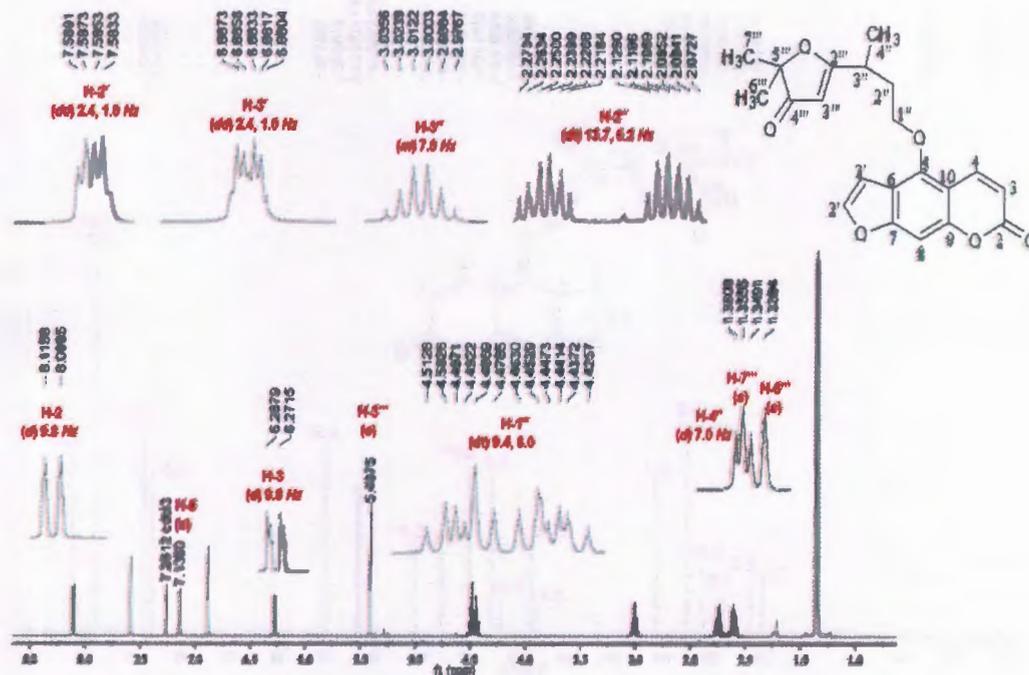


Figura 2.21. Espectro de RMN-¹H del compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3). (600 MHz, CDCl₃).

Las señales restantes de RMN-¹³C corresponden a la porción 4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil el cual está sustituido en el C-5 de la estructura base del psoraleno (Figura 2.22).

La señal de RMN-¹³C a δ_C 193.9 característica de un carbono de carbonilo se asignó a C-4''' del anillo de furano. Tres carbonos tipo metilos a δ_C 17.8 y 22.8 (2 \times) se asignaron a C-4'', C-6''' y C-7''', respectivamente. Dos carbonos de metilenos, uno a δ_C 34.2 y otro que por su desplazamiento se trataba de un metileno de carbono base de oxígeno a δ_C 70.2 se asignaron a C-2'' y C-1'', respectivamente.

La señal de RMN-¹H a δ_H 5.40 fue atribuida a H-3'''; dos señales singuletes de metilos a δ_H 1.33 y 1.35 fueron asignadas a H-6''' y H-7'''; cuatro señales que integran para un protón cada una a δ_H 4.48, 4.44, 2.24 y 2.10 fueron asignadas a H-1''' y H-2''', con dos constantes de acoplamiento a 2 y 3 enlaces ($^2\text{-}^3J_{\text{H-H}}$) de 6.0, 9.4 Hz y 13.7, 6.2 Hz, respectivamente.

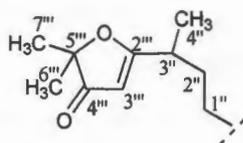


Figura 2.22. Porción 4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil de la estructura del compuesto 3.

El conjunto de datos obtenidos en cada uno de los espectros y con lo reportado en la literatura (Tablas 2.4 y 2.5) (Kuster *et al.*, 1993), permitió comparar e identificar el compuesto 3 como 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7*H*-furo[3,2-*g*][1]benzopiran-7-ona (Figura 2.23).

Tabla 2.4. Datos de los desplazamientos de RMN-¹³C del compuesto 3 en CDCl₃ en comparación con los reportados en la literatura.

Posición	δ_c	Carbono	Kuster <i>et al.</i> , 1993
			δ_c
2	160.9	C=O	160.9
3	112.8	CH	112.7
4	138.9	CH	138.8
5	152.6	C-O	152.5
6	113.4	C	113.3
7	158.1	C	158.0
8	94.3	CH	94.2
9	148.4	C	148.3
10	106.8	C	106.7
2'	145.0	CH	145.0
3'	104.7	CH	104.6
1''	70.2	CH ₂	70.1
2''	34.2	CH ₂	34.1
3''	32.4	CH	32.3
4''	17.8	CH ₃	17.7
2'''	207.0	C	207.0
3'''	100.1	CH	100.1
4'''	193.9	C=O	193.9
5'''	88.6	C	88.5
6'''	22.8	CH ₃	22.7
7'''	22.8	CH ₃	22.7

Tabla 2.5. Datos de los desplazamientos de RMN-¹H del compuesto 3 en CDCl₃ en comparación con los reportados en la literatura.

Posición	$\delta^1\text{H}$ (J (Hz))	Kuster <i>et al.</i> , 1993
		$\delta^1\text{H}$ (J (Hz))
2	-	-
3	6.27 (1H, d, 9.8)	6.29 (1H, d, 9.8)
4	8.10 (1H, d, 9.8)	8.10 (1H, d, 9.8)
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	7.13 (1H, s)	7.15 (1H, s)
9	-	-
10	-	-
2'	7.58 (1H, dd, 2.4, 1.0)	7.54 (1H, d, 2.3)
3'	6.88 (1H, dd, 2.4, 1.0)	6.83 (1H, d, 2.3)
1''	4.48, 4.44 (2H, dt, 9.4, 6.0)	4.47, 4.42, (2H, dt, 9.3, 6.0)
2''	2.10, 2.24 (1H, dt, 13.7, 6.2)	2.08, 2.22, (2H, dt, 13.0, 6.0)
3''	3.0 (1H, m, 7.0)	2.98 (1H, m, 7.0)
4''	1.35 (3H, d, 7.0)	1.33 (3H, d, 7.0)
2'''	-	-
3'''	5.40 (1H, s)	5.43 (1H, s)
4'''	-	-
5'''	-	-
6'''	1.33 (3H, s)	1.32 (3H, s)
7'''	1.35 (3H, s)	1.33 (3H, s)

s = singulete, d = doblete, dd = doble de dobles, dt = doble de triple, m = multiplete

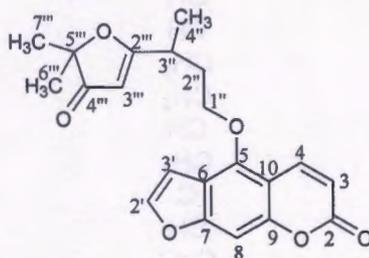


Figura 2.23. Estructura del 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3).

El compuesto 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona ha sido aislado previamente en los rizomas de *D. brasiliensis* (Kuster *et al.*, 1994) en las raíces de *D. drakena* (Rojas-Lima *et al.*, 1999) así como también en las hojas de *D. contrajerva* (Caceres *et al.*, 2001). Sin embargo, éste sería el primer reporte de su aislamiento en raíces de *D. contrajerva*.

2.11. Identificación del compuesto 4

El compuesto 4 se obtuvo como un sólido color rojo con un peso de 8.2 mg y soluble en MeOH. Este compuesto presentó una sola mancha por CCD en Hx:An (3:1) (3×), visible al UV de onda corta (Figura 2.24).



Figura 2.24. Placa CCD del compuesto 4 corrida en Hx:An (3:1) (3×) y revelada con ácido fosfomolibdico.

El análisis de su espectro de IR (Figura 2.25) mostró la presencia de una banda de tensión a 3300 cm^{-1} debido a los estiramientos de grupos O-H; entre 2974 y 2831 cm^{-1} por el estiramiento de enlaces C-H; a 1699 y 1425 cm^{-1} se observan bandas debidas a la presencia de un anillo aromático; entre 1287 y 1000 cm^{-1} estiramientos de tipo C-O.

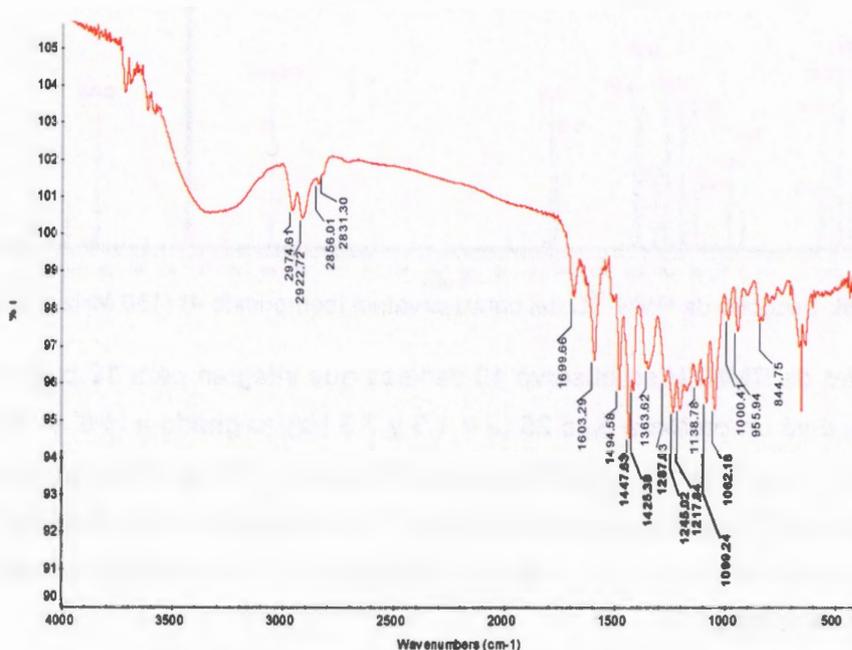


Figura 2.25. Espectro de IR del contrajervatriol (compuesto 4).

En el espectro de RMN- ^{13}C se observó un total de 21 señales (Figura 2.26). Con el análisis del experimento DEPT-90 fue posible detectar seis señales que corresponden a carbonos terciarios o metinos a δ_{C} 122.0, 119.7, 115.5, 114.9, 102.8 y 102.2; y con el DEPT-135 dos señales de metilenos a δ_{C} 33.6 y 22.9; tres señales de metilos, dos a δ_{C} 22.4 y 16.51 y otra que por su desplazamiento químico se trataba de un carbono oxigenado a δ_{C} 60.1. De las diez señales restantes, seis pertenecen a carbonos aromáticos oxigenados a δ_{C} 158.4, 147.7, 146.2, 144.8, 143.5, 142.9 y cuatro a carbonos cuaternarios a δ_{C} 131.2, 129.2, 124.2 y 118.0.

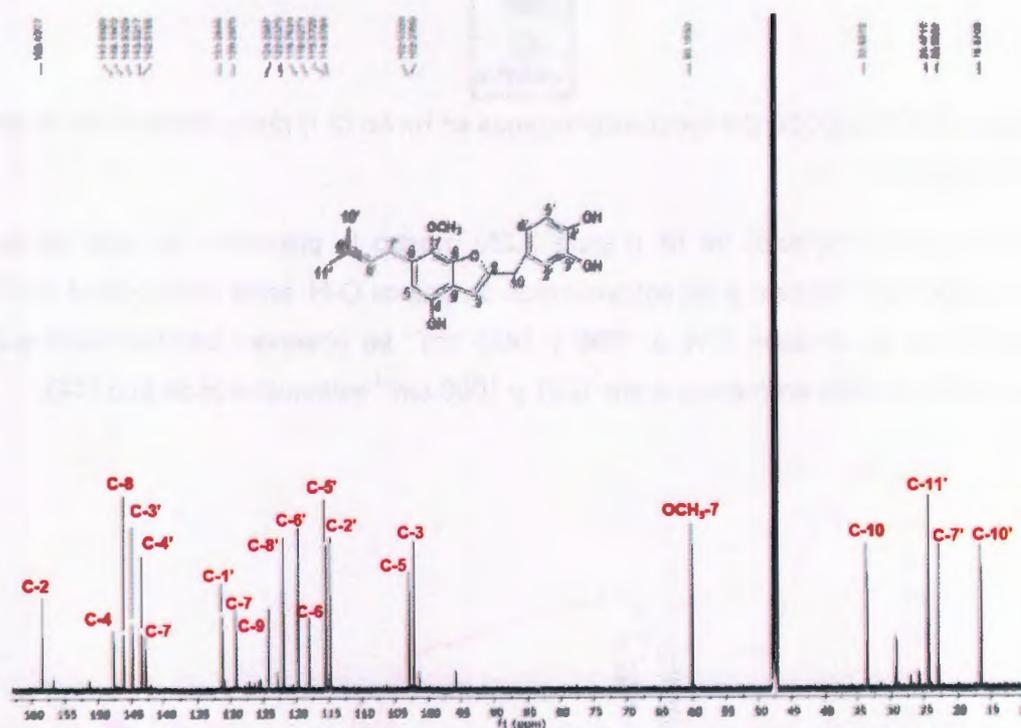


Figura 2.26. Espectro de RMN- ^{13}C del contrajervatriol (compuesto 4) (150 MHz, metanol- d_4).

En el espectro de RMN- ^1H se observó 10 señales que integran para 19 protones (Figura 2.27). Se observó un protón a δ_{H} 5.25 ($J = 1.3$ y 7.3 Hz) asignado a H-8' el cual tiene un acoplamiento $^4J_{\text{H-H}}$ alílico con los protones de metilos a δ_{H} 1.75 y 1.63 asignados como H-10' y H-11' respectivamente, así como también un acoplamiento a tres enlaces $^3J_{\text{H-H}}$ con el protón de un metileno a δ_{H} 3.5 ($J = 7.2$ Hz) asignado a H-7', lo cual sugirió la presencia de un grupo 3,3-dimetilalilo.

También se observó tres señales de protones que se acoplan en un sistema ABX aromático, una señal de doble de dobles a δ_H 6.59 ($J = 1.8$ y 8.1 Hz) que se acopla con dos dobletes en orto/meta a δ_H 6.69 ($J = 1.8$ y 7.9 Hz) y δ_H 6.70 ($J = 1.1$ Hz), respectivamente, localizado en un anillo de benceno trisustituido. El espectro de protón también mostró una señal característica de un grupo metoxilo a δ_H 3.76.

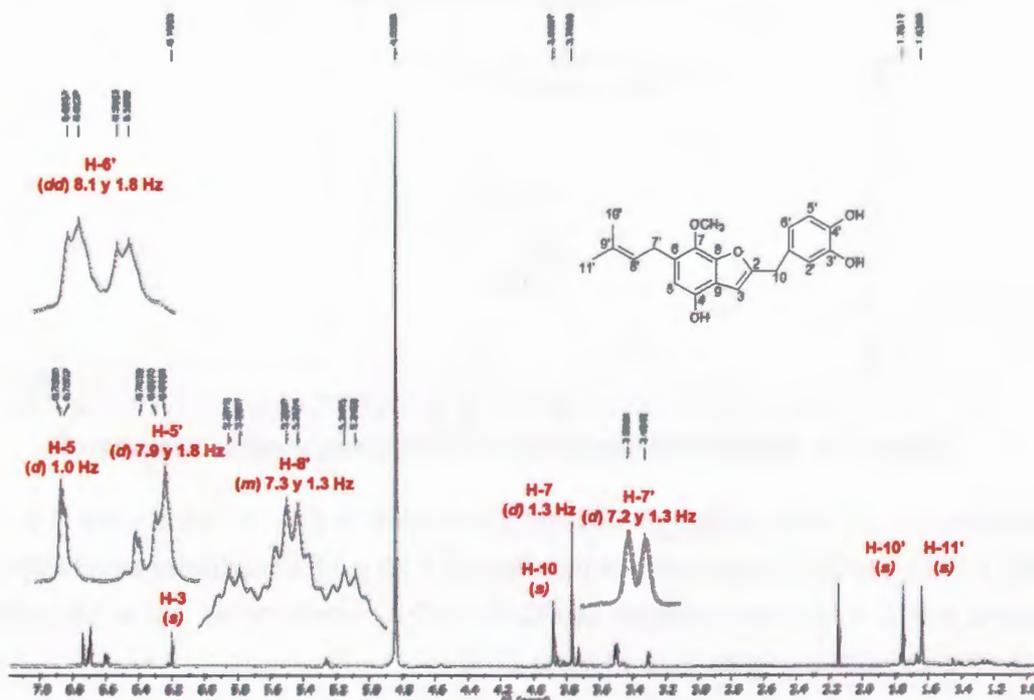


Figura 2.27. Espectro de RMN- ^1H del contrajervatriol (compuesto 4) (600 MHz, metanol- d_4).

La asignación de todos los carbonos y protones de la molécula fue realizado con apoyo de los experimentos bidimensionales HSQC y HMBC.

El experimento HMBC mostró correlación a dos enlaces del metileno H-7' (δ_H 3.5) con el carbono cuaternario C-6 (δ_C 118.0), y con dos carbonos aromáticos oxigenados: a tres enlaces con el C-7 (δ_C 142.9) y a cuatro enlaces con C-4 (δ_C 147.7), lo cual demostró la unión del grupo 3,3-dimetilalilo al anillo A de la estructura; también se observó correlación a dos y tres enlaces con los carbonos C-8' (δ_C 122.0) y C-9' (δ_C 131.2) (Figura 2.28).

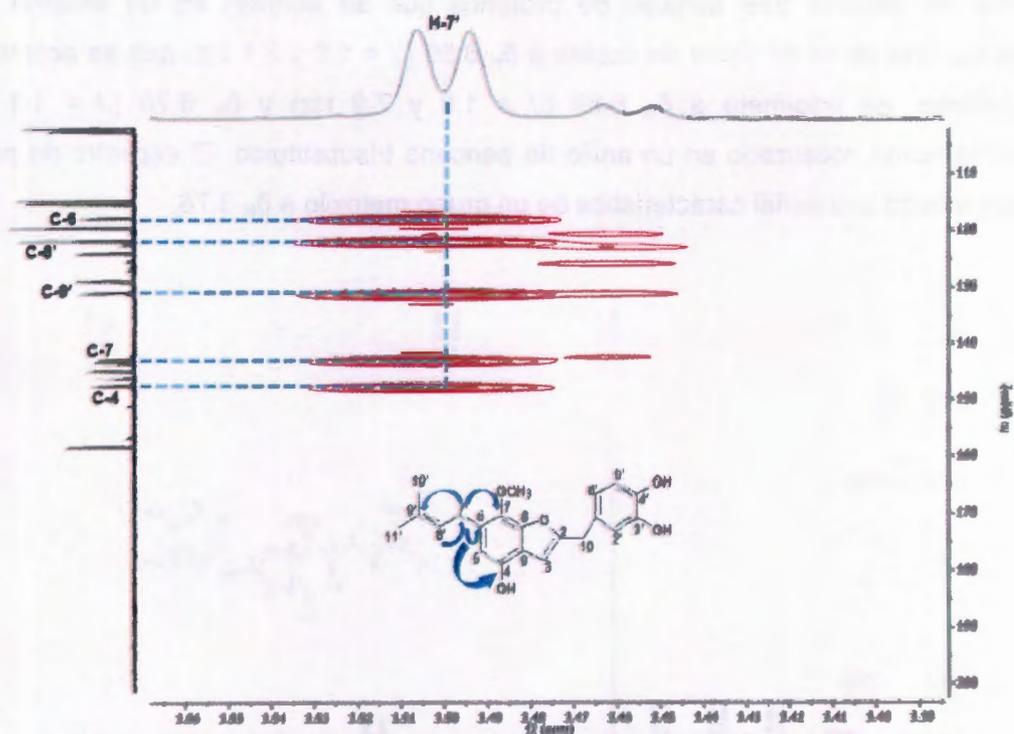


Figura 2.28. Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4).

El protón H-8' (δ_{H} 5.25) mostró correlación a tres enlaces con los dos metilos a C-10' (δ_{C} 16.5) y C-11' (δ_{C} 24.4), a su vez sus protones δ_{C} 1.75 y 1.63 mostraron correlación a dos enlaces con C-9' y a tres enlaces con C-10' y C-8' corroborando así la formación del grupo 3,3-dimetilalilo (Figura 2.29 y Figura 2.30).

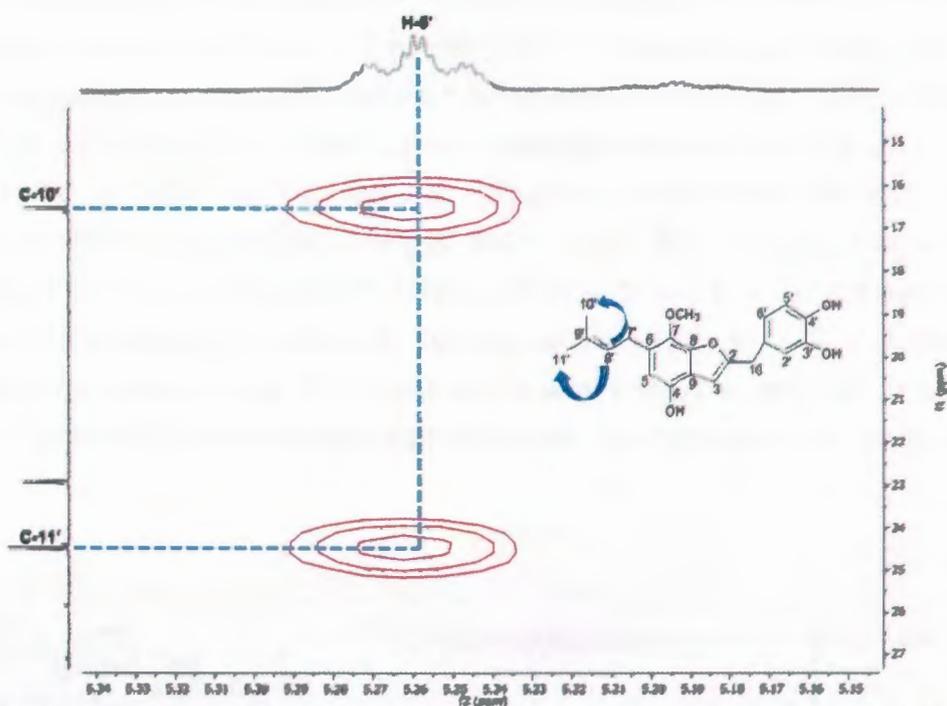


Figura 2.29. Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4). Se observan las correlaciones del protón H-8'.

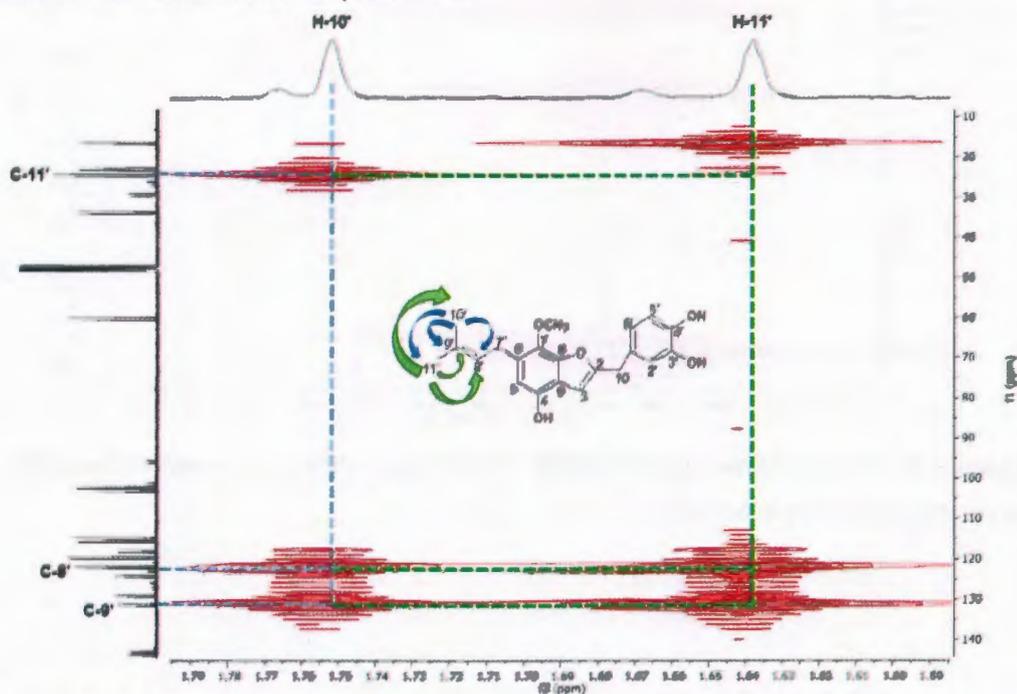


Figura 2.30. Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4). Se observan las correlaciones de los protones H-10' y H-11.

También se observó en el experimento HMBC correlaciones de los protones del metileno H-10 (δ_H 3.80) a dos enlaces con C-2 (δ_C 158.4) y C-1' (δ_C 129.2), y a tres enlaces con C-3 (δ_C 102.2) y C-6' (δ_C 119.7). De igual forma el protón H-6' (δ_H 6.59) correlaciona a $^3J_{C-H}$ con el C-10 (δ_C 33.6) y el carbono oxigenado C-4' (δ_C 143.5) y a $^2J_{C-H}$ con C-5' (δ_C 115.5). El protón H-5' (δ_H 6.69) mostró correlación $^2J_{C-H}$ con C-4' (δ_C 143.5) y C-6' (δ_C 119.7); correlación $^3J_{C-H}$ con C-1' (δ_C 129.2) y C-3' (δ_C 144.8). Así mismo el protón H-2' (δ_H 6.70) correlaciona a $^2J_{C-H}$ con C-1' (δ_C 129.2) y C-3' (δ_C 144.8), a $^3J_{C-H}$ con C-10 (δ_C 33.6), C-4' (δ_C 143.5) y C-6' (δ_C 119.7). Esto permitió demostrar la conformación del sistema aromático ABX del anillo B y que el metileno C-10 se encuentra entre el anillo B trisustituido y el anillo C furánico de la estructura del compuesto 4 (Figuras 2.31 y 2.32).

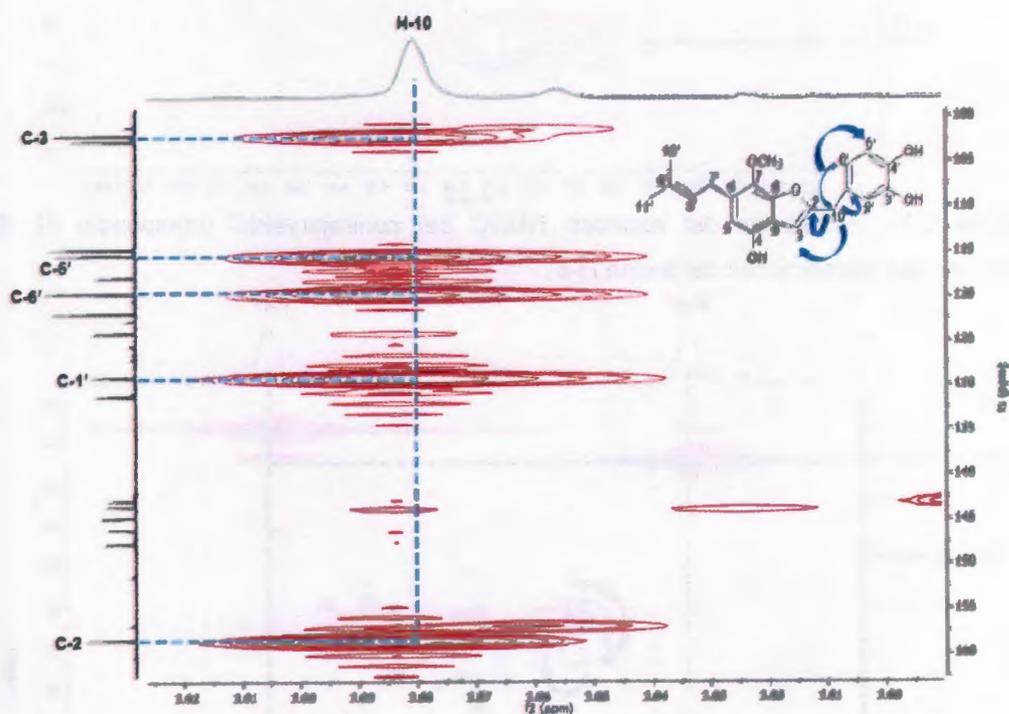


Figura 2.31. Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4). Se observa las correlaciones del protón H-10.

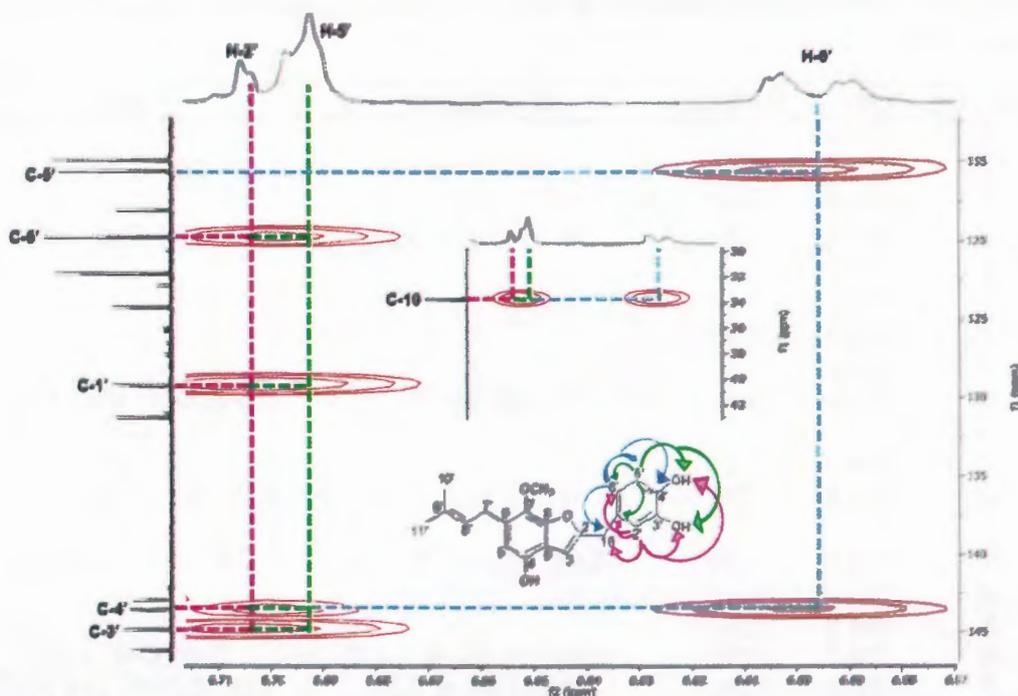


Figura 2.32. Ampliación del espectro HMBC del contrajervatriol (compuesto 4). Se observa las correlaciones de los protones H-2', H-5' y H-6'.

Todo este conjunto de datos permitió proponer la estructura del compuesto 4 ($C_{21}H_{22}O_5$) (Figura 2.33). Basándose en una revisión bibliográfica y una búsqueda en SciFinder el compuesto 4 resultó ser nuevo ya que no ha sido reportado anteriormente en *Dorstenia contrajerva* como tampoco en otras especies de este género y en otras plantas por lo que se le dio el nombre común de contrajervatriol. En la Tabla 2.6 se encuentran las asignaciones completas hechas a la molécula.

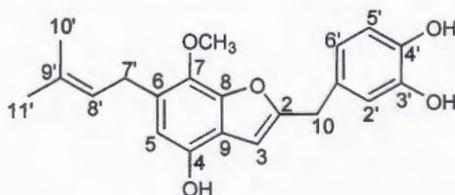


Figura 2.33. Estructura del contrajervatriol (compuesto 4).

Tabla 2.6. Datos espectroscópicos de RMN-¹³C del contrajervatriol (compuesto 4) en metanol-*d*₄.

Posición	δ_c	Carbono	δ^1H (J (Hz))	HMBC
2	158.4	C-O	-	-
3	102.2	CH	6.19 (1H, s)	C-9, C-4, C-2
4	147.6	C-O	-	-
5	102.9	CH	6.73 (1H, d, 1.0)	C-7, C-8, C-4
6	118.0	C	-	-
7	142.9	C-O	-	-
8	146.1	C-O	-	-
9	124.2	C	-	-
10	33.6	CH ₂	3.88 (2H, s)	C-3, C-5', C-6', C-1', C-2
1'	129.2	C	-	-
2'	114.8	CH	6.70 (1H, d, 1.1)	C-6', C-1', C-3', C-4', C- 10
5'	115.5	CH	6.69 (1H, d, 7.9, 1.8)	C-6', C-1', C-3', C-4'
4'	143.5	C-O	-	-
5'	144.8	C-O	-	-
6'	119.7	CH	6.59 (1H, dd, 8.1, 1.8)	C-5', C-4', C-10
7'	22.9	CH ₂	3.50 (2H, d, 7.2)	C-6, C-C-8', C-9', C-7, C-4
8'	122.0	CH	5.25 (1H, m, 7.3, 1.3)	C-10', C-11'
9'	131.2	C	-	-
10'	16.5	CH ₃	1.75 (3H, s)	C-11', C-8', C-9'
11'	24.4	CH ₃	1.63 (3H, s)	C-10', C-8', C-9'
7-OCH ₃	60.1	CH ₃	3.76 (3H, d, 1.3)	C-7

s = singulete, d = doblete, dd = doble de dobles, m = multiplete

2.12. Identificación del compuesto 5

El compuesto 5 se obtuvo como un sólido de color blanco con un peso de 149.9 mg y es soluble en CH_2Cl_2 . Este compuesto mostró una sola mancha por CCD con un $R_f = 0.3$ en el sistema Hx:An (3:2), y no es visible en onda larga ni corta (Figura 2.34).



Figura 2.34. Placa CCD del compuesto 5 corrida en Hx:An (3:2) y revelada con ácido fosfomolibdico.

En el análisis del espectro de IR (Figura 2.35) se observó la presencia de una banda de tensión a 3500 cm^{-1} debido a los estiramientos de grupos O-H; entre 2954 y 2851 cm^{-1} por los estiramientos de enlaces CH y $\text{CH}_2\text{-O}$; a 1741 cm^{-1} por la tensión de C=O de un grupo funcional éster; y entre 1464 y 1165 cm^{-1} por estiramientos de C=C .

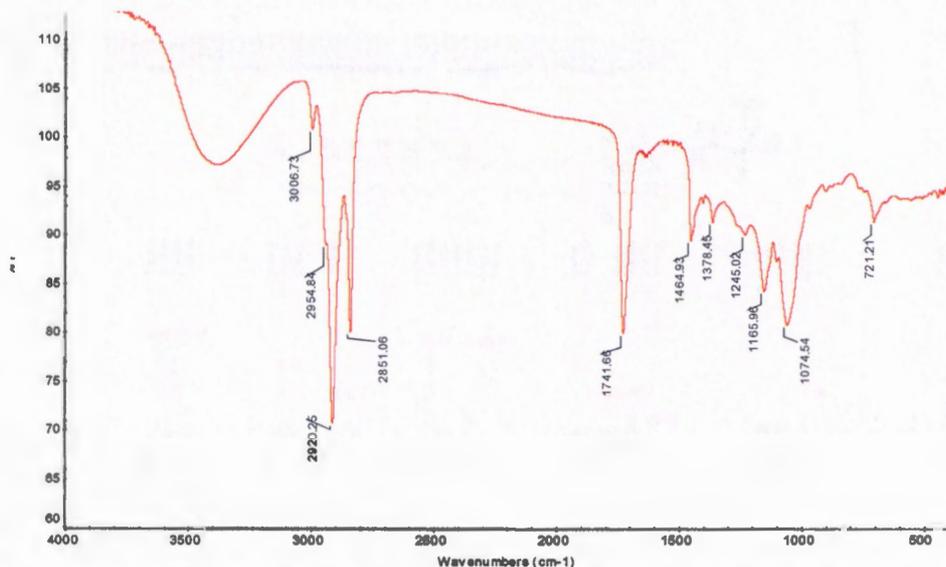


Figura 2.35. Espectro de IR del 1-O-linoleoil-2-O-estearoil-3-O- β -D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5).

Se observa la presencia de tres sistemas de espines que corresponden a un glicerol, una hexosa y dos ácidos grasos.

En el espectro de RMN- ^1H se observó 17 señales (Figura 2.36), siendo evidente la cadena de dos ácidos grasos por la presencia de un triplete de metilo terminal a δ_{H} 0.81 que integra para seis protones, y varias señales de metilenos, dos amplias a δ_{H} 1.22 y 1.18 $[(\text{CH}_2)_n]$ y a δ_{H} 2.69, 2.24, 1.97, 1.93, y 1.52 correspondientes a una cadena alifática. También se hizo evidente la presencia de un azúcar al observar señales en la región entre δ_{H} 4.19 y δ_{H} 3.46 características de una hexosa, identificando el protón anomérico a δ_{H} 4.19. En el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 2.37) se observó dos señales de carbonos tipo carbonilo éster a δ_{C} 173.8 y 173.4; por medio del análisis del experimento DEPT-90 fue posible detectar doce señales que corresponden a carbonos terciarios o metinos a δ_{C} 130.2, 130.0, 129.9, 129.6, 128.0, 127.8, 104.0, 74.5, 73.4, 71.3, 70.1 y 69.2; por el análisis del experimento DEPT-135 se detectó treinta y un señales de metilenos de las cuales tres fueron características por sus desplazamientos a campo alto ya que se tratan de metilenos oxigenados a δ_{C} 68.1, 62.7 y 62.2. También se observó dos señales para carbonos de metilo a δ_{C} 14.0.

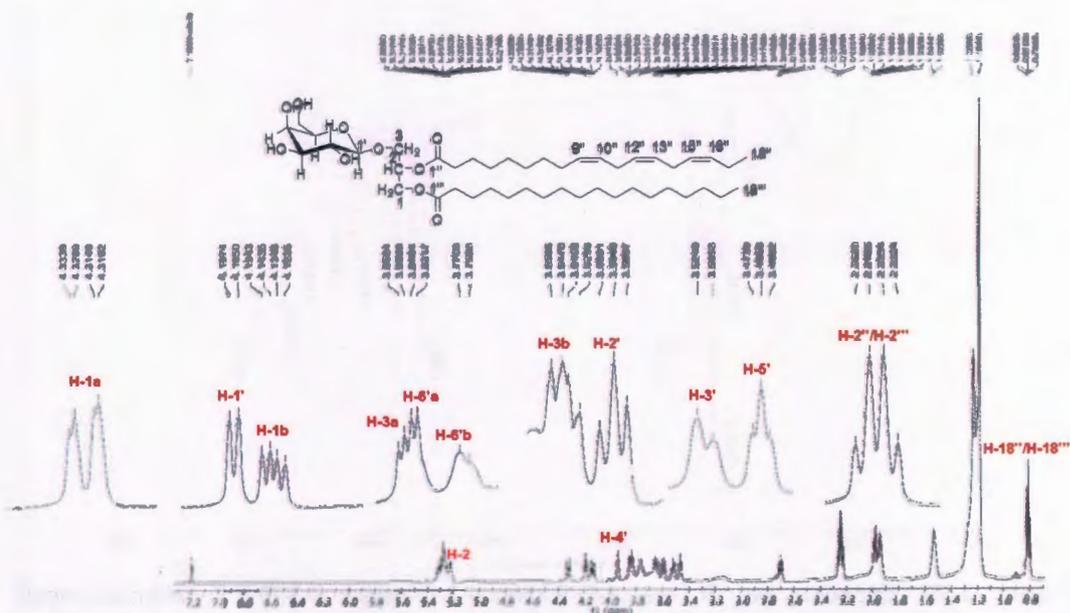


Figura 2.36. Espectro de RMN- ^1H del 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O- β -D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5) (600 MHz, CDCl_3).

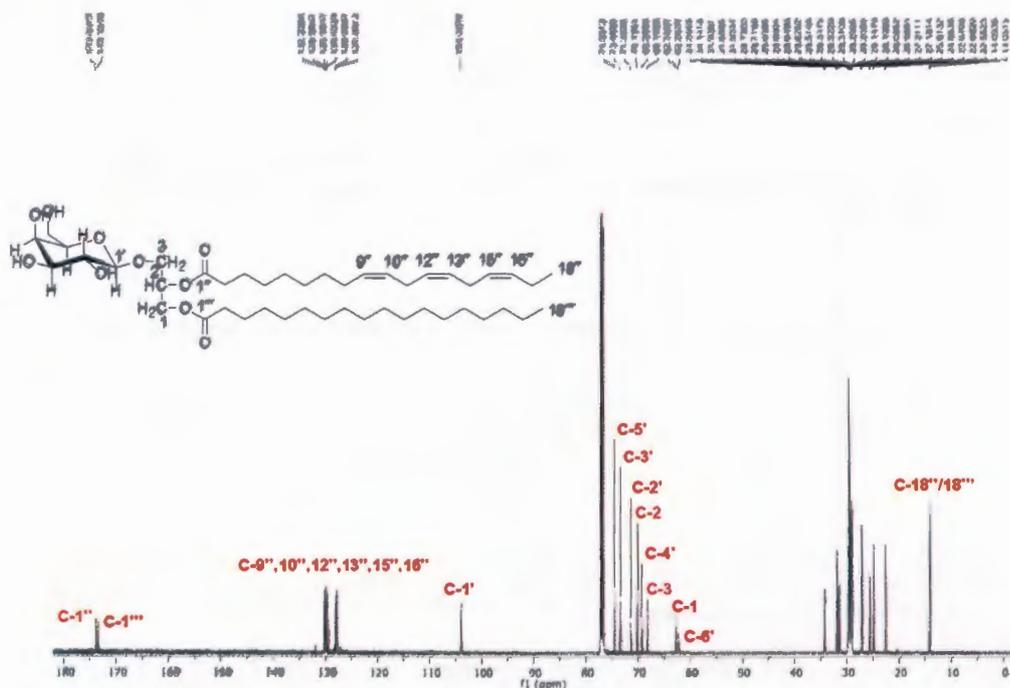


Figura 2.37. Espectro de RMN- ^{13}C del 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O- β -D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5) (150 MHz, CDCl_3).

El primer sistema fue asignado a la fracción de glicerol; las señales a δ_{H} 4.32 y 4.13 (δ_{C} 62.7) se atribuyeron al metileno unido a un grupo O-acilo; la señal a δ_{H} 5.22 (δ_{C} 70.15) se asignó al metino central; y las señales a δ_{H} 3.85 y 3.64 (δ_{C} 68.19) al metileno unido a la hexosa. La presencia del glicerol se confirma por medio del espectro de HMBC (Figura 2.38) en el que se observa el protón a δ_{H} 4.13 que correlaciona a dos enlaces con el metino a δ_{C} 70.1 (C-2), a tres enlaces con el carbono del carbonilo a δ_{C} 173.8 (C1'') y con el carbono a δ_{C} 68.1 (C-3); los protones a δ_{H} 3.85 y 3.64 ppm correlacionan con los carbonos a δ_{C} 62.7 (C-1), 70.1 (C-2), y con el carbono anomérico de la hexosa a δ_{C} 104.0 (C-1') y por último el protón a δ_{H} 5.22 correlaciona con el carbono del carbonilo a δ_{C} 173.4 (C-1'') el cual se encuentra unido a C-2 de la fracción del glicerol. Finalmente, por medio del espectro de ^1H - ^1H COSY (Figura 2.39) se observaron los acoplamiento H-H geminales de los protones δ_{H} 4.32 con δ_{H} 4.13 y los protones δ_{H} 3.85 con δ_{H} 3.64.

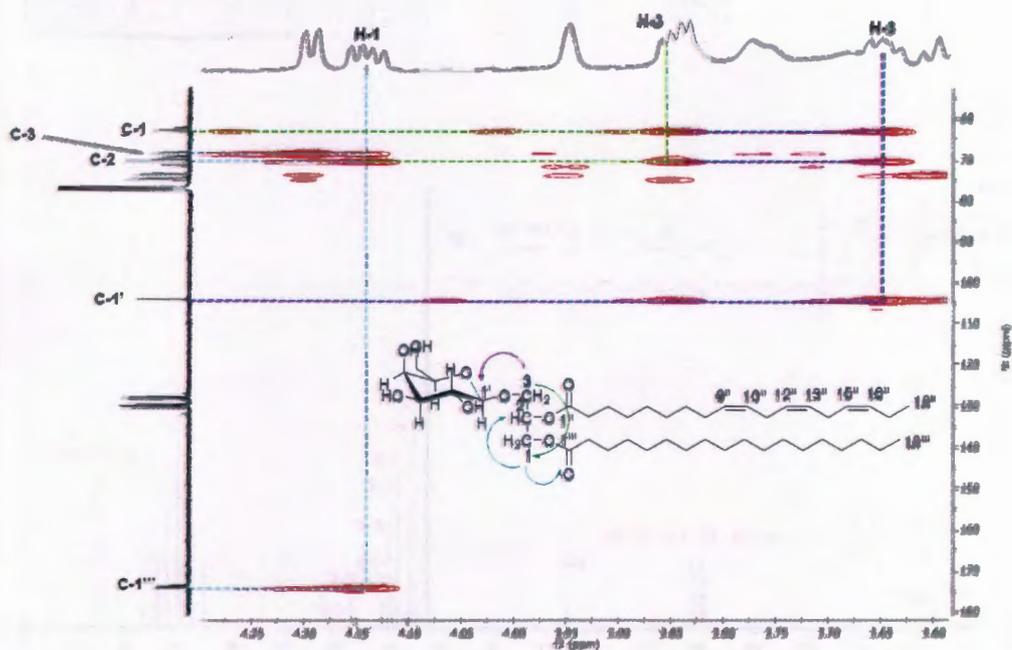


Figura 2.38. Ampliación del espectro HMBC de la fracción de glicerol del compuesto 5. Se observan las correlaciones de los protones de H-1 y H-3.

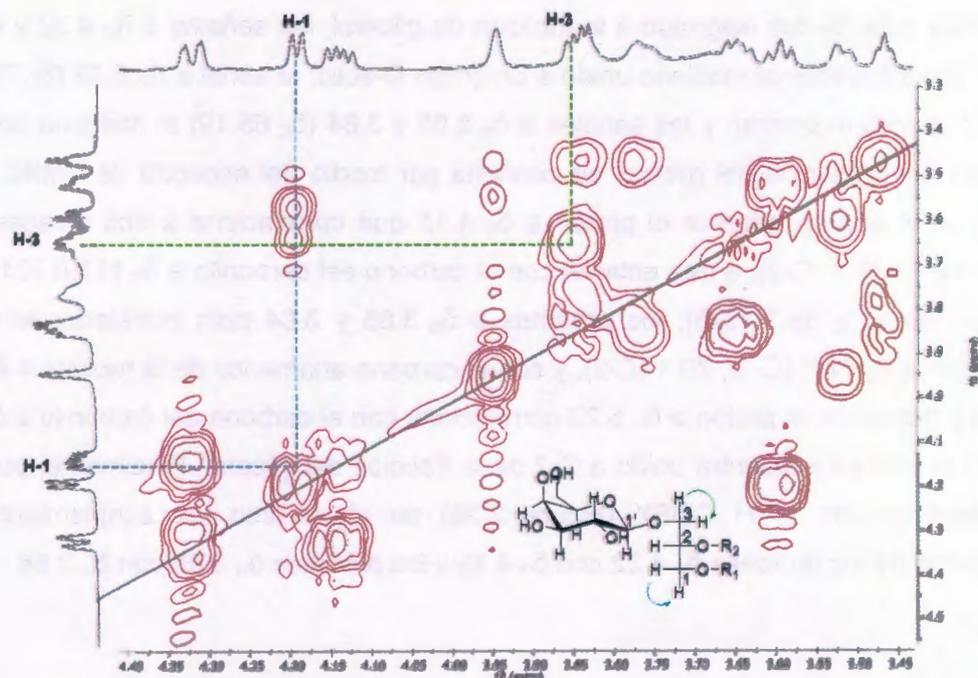


Figura 2.39. Ampliación del espectro ^1H - ^1H COSY de la fracción de glicerol del compuesto 5. Se observan la correlación los acoplamiento geminales de los protones H-1 y H-3.

El segundo sistema de señales fue atribuido a la presencia de una hexosa por las señales a δ_H 4.19 (δ_C 104.0) siendo este el protón anomérico, a δ_H 3.59 (δ_C 71.3), δ_H 3.51 (δ_C 73.4), δ_H 3.94 (δ_C 69.2), δ_H 3.46 (δ_C 74.5), δ_H 3.77 (δ_C 62.2) y δ_H 3.83 (δ_C 62.2). En el espectro de HMBC (Figura 2.40) se corrobora la presencia de la hexosa y su unión al resto del glicerol de la siguiente manera: el protón anomérico del azúcar H-1' correlaciona a $^3J_{H-C}$ con el carbono del glicerol a δ_C 68.1 (C-3), determinando así la posición y la unión del glicosil con el glicerol; el protón a δ_H 3.94 correlaciona a $^4J_{H-C}$ con el carbono a δ_C 73.4 (C-3'); el protón a δ_H 3.83 a $^4J_{H-C}$ con δ_C 104.0 (C-1') y $^2J_{H-C}$ con el carbono a δ_C 74.5 (C-5'); el protón a δ_H 3.59 a $^2J_{H-C}$ con δ_C 73.4 (C-3') y δ_C 104.0 (C-1'); finalmente, el protón a δ_H 3.46 a $^2J_{H-C}$ con los carbonos a δ_C 62.2 (C-6'), 69.2 (C-4') y 104.0 (C-1'). Por las señales características y por medio de su comparación con la literatura (Jung *et al.*, 2005) se identificó el azúcar como galactosa.

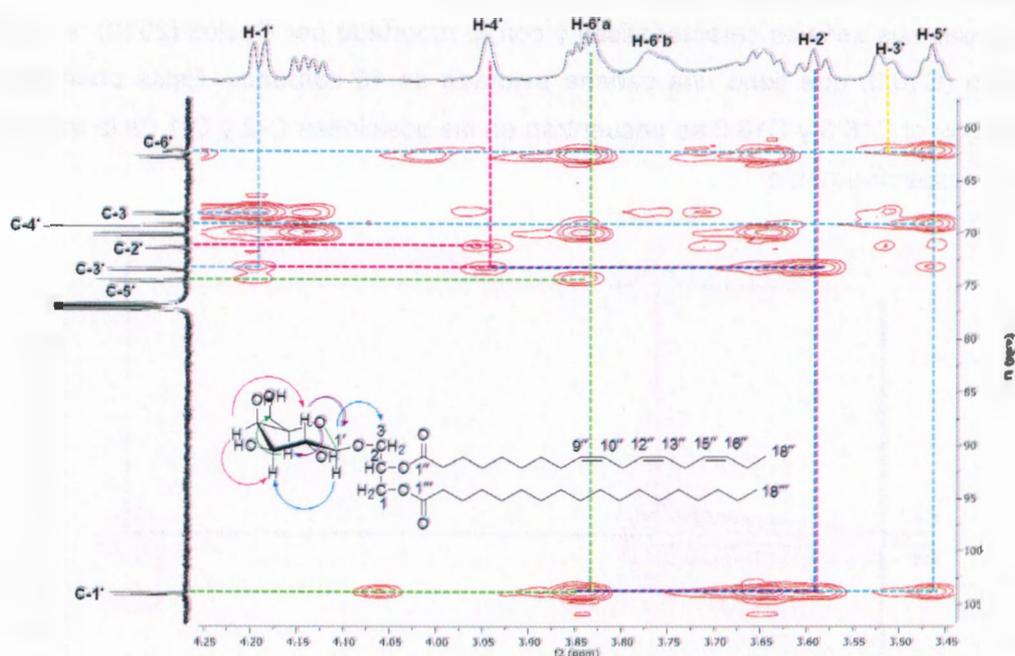


Figura 2.40. Ampliación del espectro de HMBC de la fracción de la galactosa del compuesto 5. Se observan las correlaciones de los protones H-1', H-2', H-3', H-4', H-5' y H-6'.

Finalmente, se tiene la presencia de un tercer sistema de dos ácidos grasos uno saturado (18:0) y otro insaturado (18:3) con tres dobles enlaces (δ_C 130.2, 130.0, 129.9, 129.6, 128.0, 127.8), cuyas señales terminales es de un metilo a δ_H 0.81 (6H, $J = 6.6$ Hz). En el

espectro de HMBC (Figura 2.41) los metilenos a δ_H 2.24 (H-2'') y 1.52 (H-3'') muestran correlación a dos y tres enlaces, respectivamente, con el carbonilo tipo éster a δ_C 173.4 (C-1''); como se mencionó anteriormente, también el protón H-2 de la fracción del glicerol correlaciona con el C-1'' indicando la unión de un ácido graso, el cual se cree que puede ser el ácido linolénico (C18:3) por las señales características de sus tres insaturaciones a lo largo de la cadena de 18 carbonos así como también por lo reportado por Jung *et al.* (2005).

Por otra parte, también se puede observar en el espectro de HMBC (Figura 2.41) que el metileno a δ_H 2.24 (H-2''') correlaciona a dos enlaces con el otro carbono carbonilo tipo éster a δ_C 173.8 (C-1'''). En la Figura 2.38 descrita anteriormente se puede observar también que el protón H-1 del glicerol correlaciona a tres enlaces con el C-1''', indicando la unión de un segundo ácido graso, el cual no presenta dobles enlaces por lo que se cree, dadas sus señales características y con lo reportado por Duclos (2010), es el ácido esteárico (C18:0) que tiene una cadena saturada de 18 carbonos. Estas observaciones indican que el C18:3 y C18:0 se encuentran en las posiciones C-2 y C-1 de la fracción del glicerol, respectivamente.

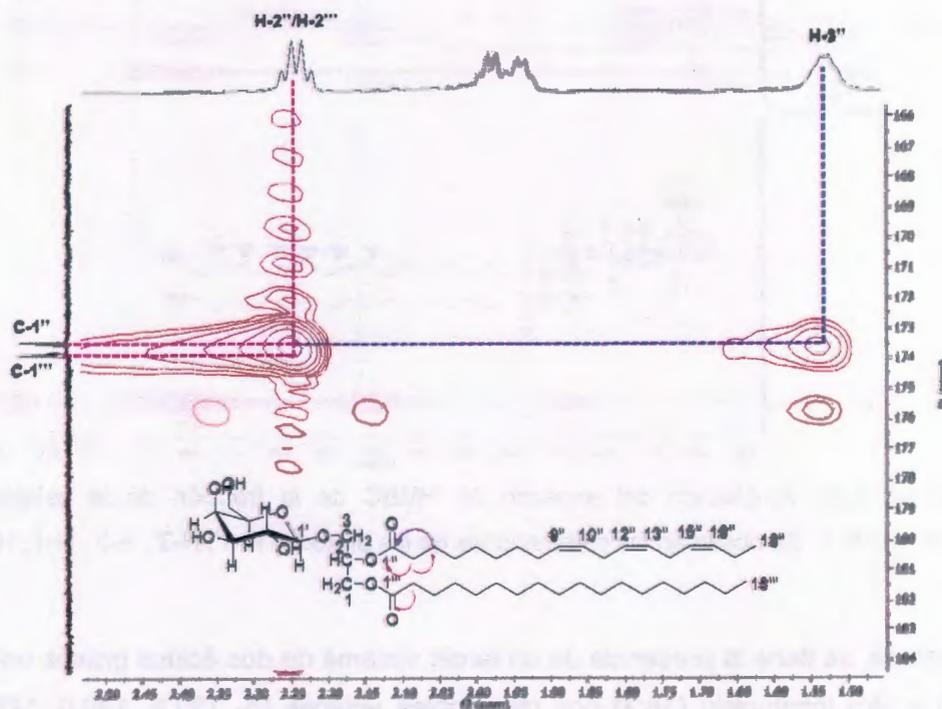


Figura 2.41. Ampliación del espectro de HMBC del compuesto 5. Se observan las correlaciones de los protones H-2''/H-2''' y H-3''.

Por lo tanto, todo este conjunto de datos permite inferir que la posible estructura corresponde a un monogalactosil diacilglicerol (C18:3/18:0) con el nombre de 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol (Figura 2.42).

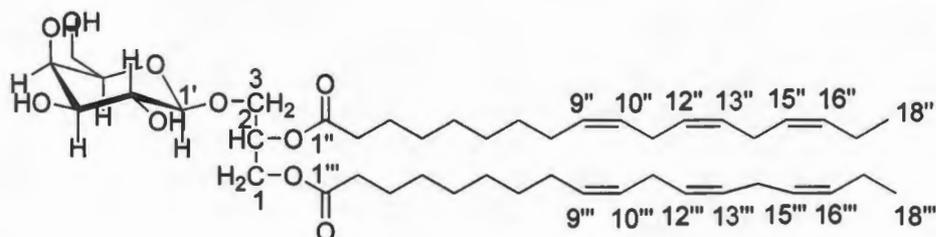


Figura 2.42. Estructura del 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5).

Sin embargo, para poder asignar la estructura del compuesto 5 de forma inequívoca, es necesario corroborar con otros experimentos de RMN y por hidrólisis química cada una de las asignaciones descritas así como también identificar los ácidos grasos que se encuentran unidos al glicerol.

En las tablas siguientes se describen las señales de RMN-¹H y RMN-¹³C observadas del compuesto 5, así como también una comparación de la identificación de la fracción del glicerol y la galactosa con lo reportado por Jung *et al.* (2005) (Tabla 2.7) y la identificación del ácido estearico por Duclos (2010) (Tabla 2.8).

Tabla 2.7. Datos de los desplazamientos de RMN-¹H y RMN-¹³C de la fracción del glicerol y galactosa del compuesto 1-O-linolenil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol en comparación con lo reportado en la literatura.

Posición	Jung <i>et al.</i> , 2005			
	δ ¹ H (J (Hz))	δ _c	δ ¹ H (J (Hz))	δ _c
1a	4.32 (1H, d, 11.8, 2.3)	62.7	4.37 (1H, d, 11.9, 3.4)	62.7
1b	4.13 (1H, dd, 11.9, 6.5)	62.7	4.19 (1H, dd, 11.9, 6.2)	62.7
2	5.22 (1H, d, 5.8, 2.8)	70.1	5.28 (1H, m,)	70.2
3a	3.85 (1H, d, 5.2)	68.1	3.89 (1H, dd, 11.2, 6.3)	68.4
3b	3.64 (1H, dd, 10.5, 6.8)	68.1	3.71 (1H, dd, 11.2, 6.3)	68.4
1'	4.19 (1H, d, 7.4)	104.0	4.25 (1H, d, 7.3)	104.0
2'	3.59 (1H, t, 8.5)	71.3	3.63 (1H, dd, 9.5, 7.3)	70.2
3'	3.51 (1H, d, 8.8)	73.4	3.56 (1H, dd, 9.5, 3.3)	73.5
4'	3.94 (1H, s)	69.2	3.99 (1H, s)	69.4
5'	3.46 (1H, t, 4.6)	74.5	3.52 (1H, dd, 6.1, 4.2)	74.5
6'a	3.83 (1H, d, 5.0)	62.2	3.93 (1H, dd, 11.9, 6.1)	62.5
6'b	3.77 (1H, d, 7.7)	62.2	3.82 (1H, dd, 11.9, 4.2)	62.2
1''	-	173.4	-	173.5
1'''	-	173.8	-	173.8

s = singulete, m = multiplete, d = doblete, dd = doble de dobles

Tabla 2.8. Datos de los desplazamientos de RMN-¹H y RMN-¹³C del ácido estearico del compuesto 1-O-linolenil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol en comparación con lo reportado en la literatura.

Posición	Duclos, 2010			
	δ ¹ H (J (Hz))	δ _c	δ ¹ H (J (Hz))	δ _c
2'''	2.33 (2H, q, 7.3)	34.4	2.24 (2H, t, 7.8)	34.2
3'''	1.40 (2H, m)	24.8	1.52 (2H, d, 5.22)	24.8
4'''-15'''	0.90-1.40 (28H, m)	29.1-29.7	1.18-1.22 (28H, m)	29.7-29.3
16'''	0.90-1.40	31.9	3.89 (1H, dd, 11.2, 6.3)	31.9
17'''	0.90-1.40	22.7	3.71 (1H, dd, 11.2, 6.3)	22.6
18'''	0.88 (3H, d, 6.3)	14.2	4.25 (1H, d, 7.3)	14.0

d = doblete, dd = doble de dobles q = cuarteto, m = multiplete, t = triplete

El compuesto 5 pertenece al grupo de los glicoglicerolípidos que son lípidos que consisten de un residuo glucosídico y uno o más residuos acilos unidos a través de una molécula de glicerol. Este compuesto es de la familia de los monogalactosil diacilglicerol (MGDG), que constituyen el 70-80% de los lípidos totales en las membranas de las hojas. En los últimos años los MGDG naturales y análogos sintéticos han atraído el interés de la comunidad biomédica por las propiedades biológicas, incluyendo las actividades antivirales, antitumorales, antiinflamatorias, así también como inhibidores de la proliferación de líneas celulares cancerosas, también como atrapadores de radicales libres, inmunoestimuladores o inmunosupresores en mamíferos (Kates, 2009, Manzo *et al.*, 2012).

Con base en una búsqueda bibliográfica en diversas bases de datos incluyendo SciFinder se vio que este compuesto no ha sido reportado en *D. contrajerva* ni en otras especies de este género, por lo tanto es un aporte más a la fitoquímica de esta planta.

2.13. Identificación del compuesto 6

El compuesto 6 se obtuvo como un sólido de color amarillo con un peso de 5.5 mg y soluble en An/MeOH (9:1). Este compuesto mostró una sola mancha por CCD con un $R_f = 0.3$ en el sistema Hx:CH₂Cl₂:MeOH (3:1.2:0.3), visible al UV de onda corta y onda larga (Figura 2.43).



Figura 2.43. Placa CCD del compuesto 6 corrida en Hx:CH₂Cl₂:MeOH (3:1.2:0.3) y revelada con ácido fosfomolibdico.

El análisis de su espectro de IR (Figura 2.44) mostró la presencia de bandas de tensión entre 2972 y 2594 cm⁻¹ por el estiramiento de enlaces C-H; entre 1645 y 1410 cm⁻¹ por estiramiento de C=C; y entre 1217 y 1123 cm⁻¹ estiramientos de tipo C-O.

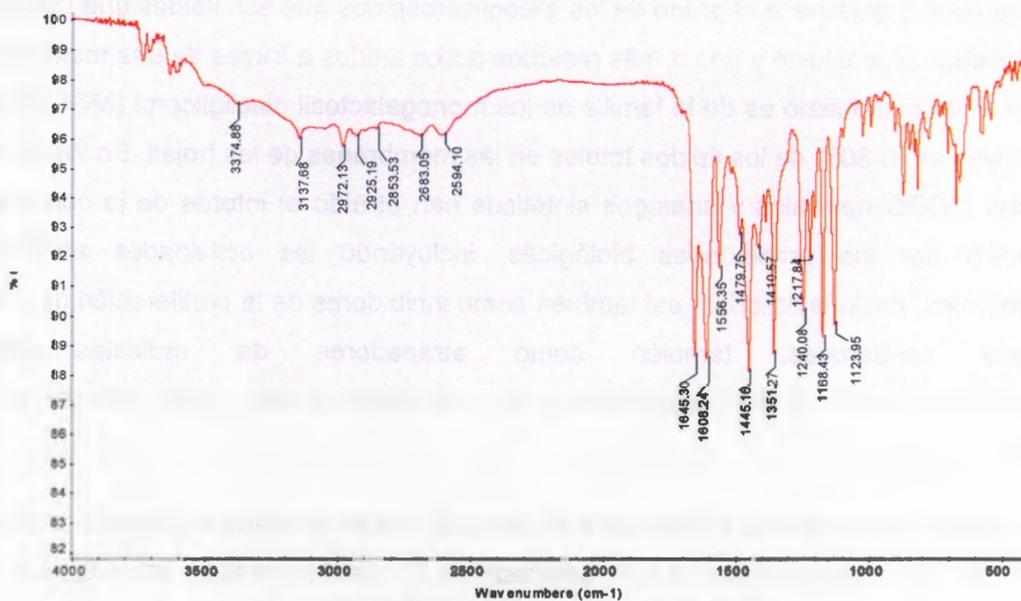


Figura 2.44. Espectro de IR del compuesto 6.

En el espectro de RMN- ^1H se observó ocho señales que integran para 13 protones (Figura 2.45). Se observó una señal singlete a δ_{H} 1.33 correspondientes a dos metilos y dos señales de metinos como doble de dobles que se acoplan entre sí con una constante de acoplamiento tipo *cis* a δ_{H} 5.61 ($J = 2.9$ y 10.0 Hz, dd) y δ_{H} 6.53 ($J = 2.6$ y 10.0 Hz, dd), que junto con los metilos descritos anteriormente hacen suponer la presencia de un grupo 2,2-dimetilpirano. También se pueden observar las señales para cinco protones aromáticos; dos dobles de dobles que integran para un protón cada uno y acoplado entre sí a δ_{H} 7.70 ($J = 8.7$ y 2.9 Hz) y δ_{H} 6.42 ($J = 8.4$ y 2.1 Hz); dos dobletes de un protón cada uno acoplados entre sí a δ_{H} 7.00 ($J = 2.7$ Hz) y δ_{H} 6.31 ($J = 2.4$ Hz); y un singlete a δ_{H} 6.49.

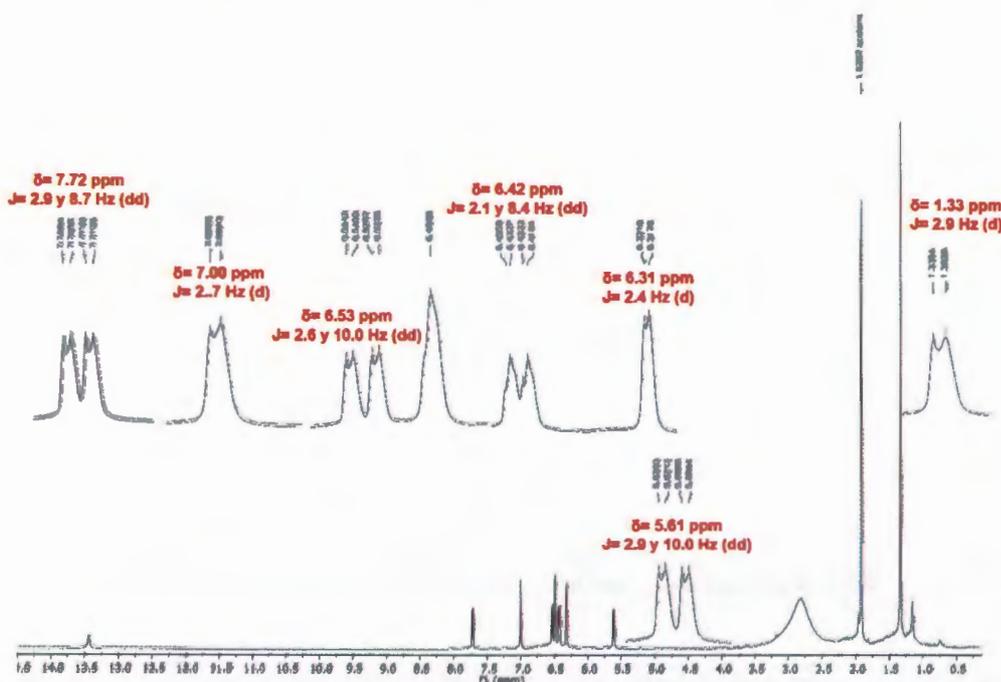


Figura 2.45. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 6 (600 MHz, acetona- d_6).

En el espectro de RMN- ^{13}C se observó un total de 15 señales (Figura 2.46). Por medio del análisis del experimento DEPT-90 fue posible detectar siete señales que corresponden a carbonos terciarios o metinos a δ_{C} 130.0, 128.1, 114.9, 108.1, 107.5, 103.4 y 94.5. Se mostró una señal característica de un carbono tipo carbonilo a δ_{C} 182.6, tres carbonos aromáticos oxigenados a δ_{C} 161.8, 158.7 y 157.0 que indica la presencia de un anillo aromático y que se comprueba por las bandas a 1608 y 1556 cm^{-1} en el espectro de IR, tres carbonos cuaternarios a δ_{C} 109.6, 104.8 y 77.7, siendo esta última una señal que corresponde a un carbono oxigenado; y por último un carbono de metileno a δ_{C} 27.4 ($2\times$).

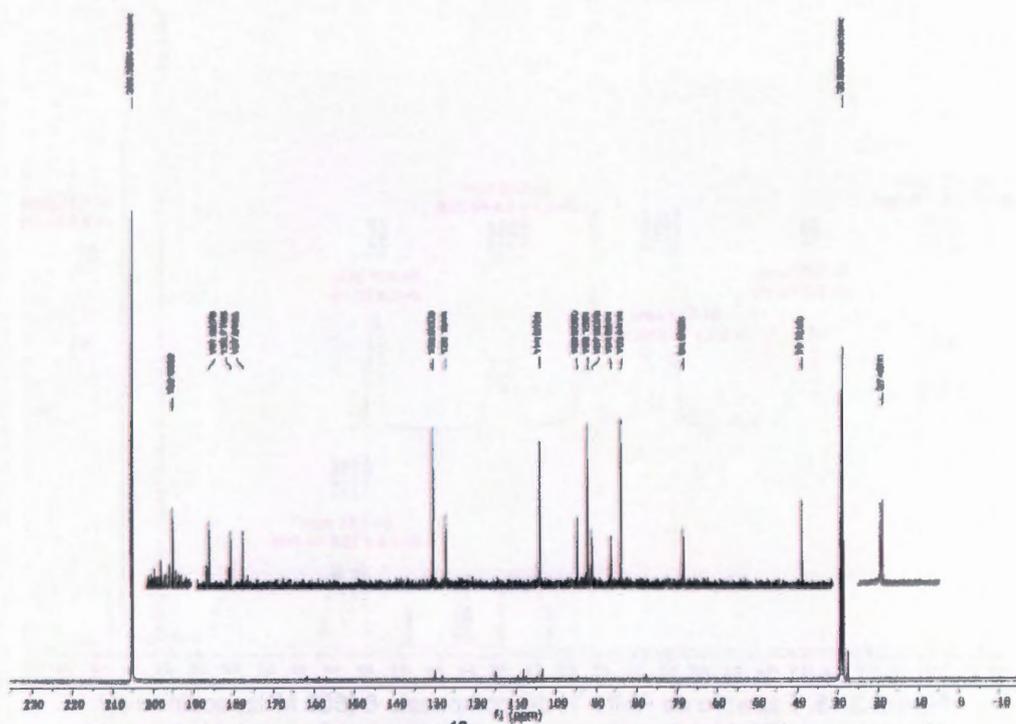


Figura 2.46. Espectro de RMN-¹³C del compuesto 6 (150 MHz, acetona-d₆).

La asignación inequívoca de las señales de RMN-¹H y de RMN-¹³C fue posible por el espectro de HSQC (Figura 2.47).

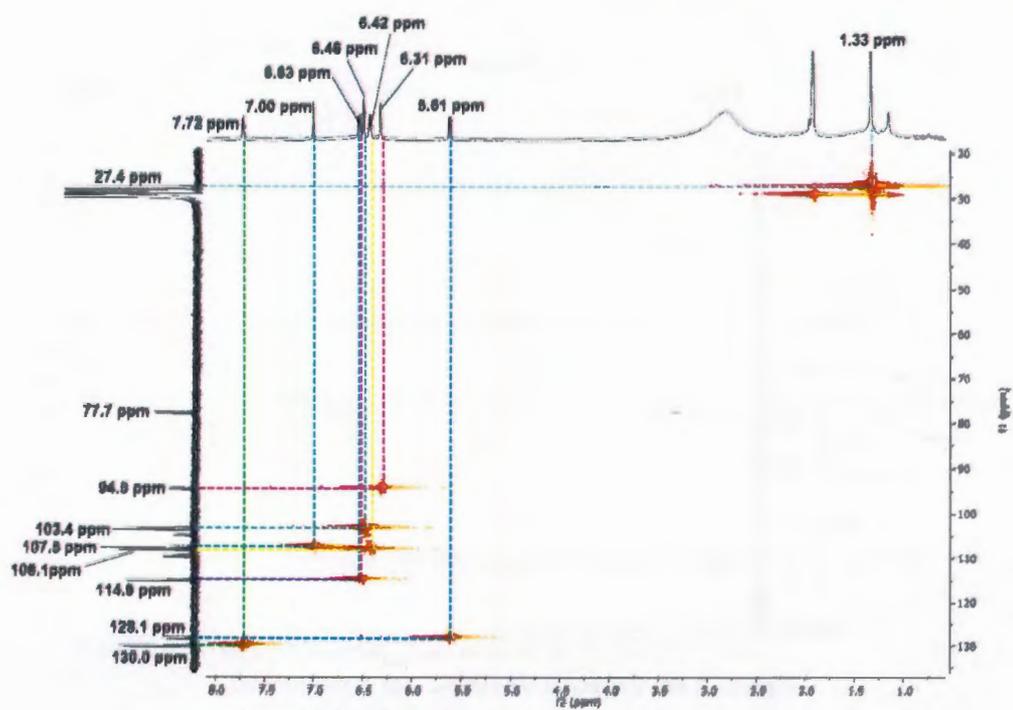


Figura 2.47. Espectro de HSQC del compuesto 6.

En el espectro de HMBC del compuesto 6 (Figuras 2.48 y 2.49), se pudo determinar cada una de las correlaciones a dos o tres enlaces según sea el caso de cada uno de los protones con los carbonos correspondientes. En la Tabla 2.9 se encuentran las correlaciones asignadas.

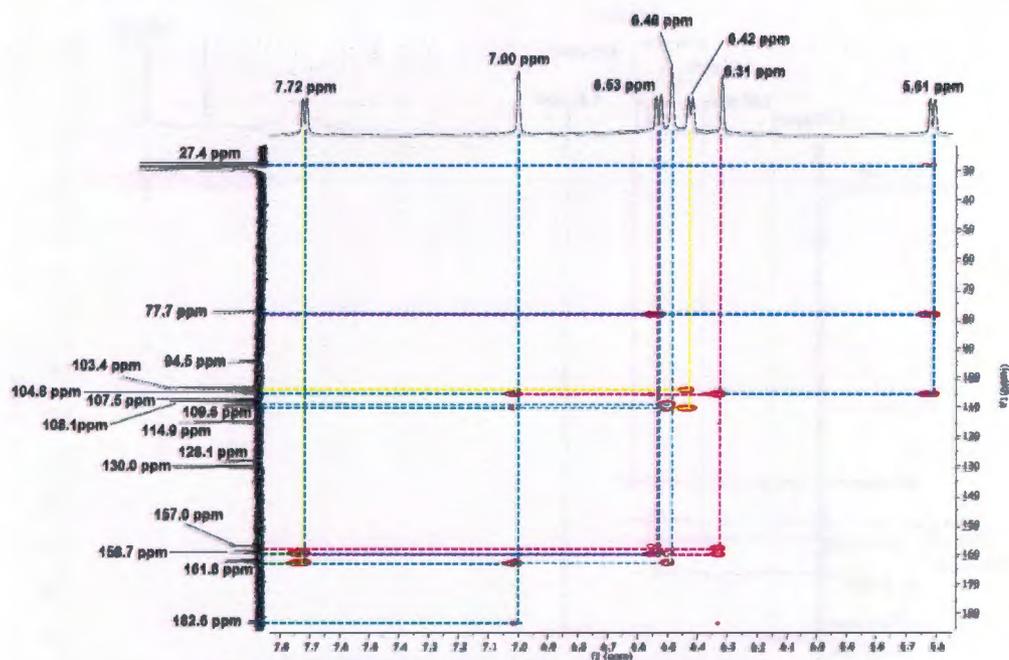


Figura 2.48. Espectro de HMBC del compuesto 6.

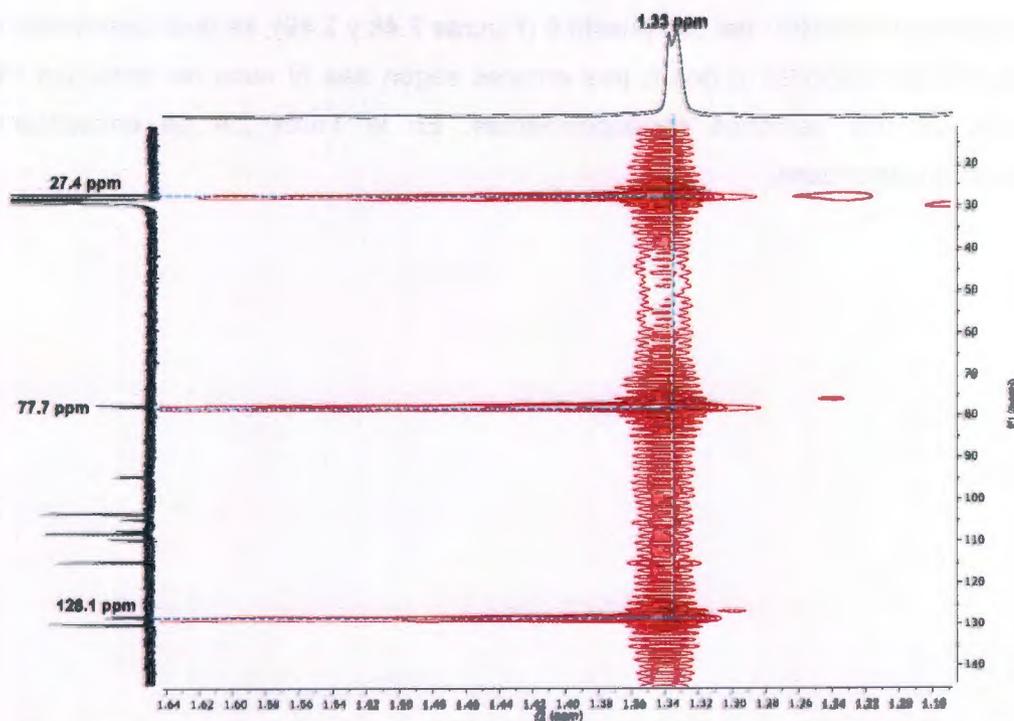


Figura 2.49. Ampliación del espectro de HMBC del compuesto 6. Se observa la correlación del protón a δ_H 1.33.

Tabla 2.9. Datos espectroscópicos de RMN-¹³C y ¹H del compuesto 6 en acetona-*d*₆.

$\delta^{13}\text{C}$	Carbono	$\delta^1\text{H}$ (J (Hz))	HMBC
182.6	C=O	-	-
161.8	C-O	-	-
158.7	C-O	-	-
157.0	C-O	-	-
130.0	C-H	7.72 (1H, dd, 8.7, 2.9)	158.7, 161.8
128.1	C-H	5.61 (1H, dd, 10.0, 2.9)	104.8, 77.7, 27.4
114.9	C-H	6.53 (1H, dd, 10.0, 2.6)	158.7, 77.7
109.6	C	-	-
108.1	C-H	6.42 (1H, dd, 8.5, 2.3)	103.4, 109.6
107.5	C-H	7.00 (1H, dd, 2.7)	104.8, 109.6, 161.8
104.8	C	-	-
103.4	C-H	6.48 (1H, s)	108.1, 109.6, 158.7, 161.8
94.5	C-H	6.31 (1H, d, 2.4)	104.8, 157.0, 158.7
77.7	C	-	-
27.4	CH ₃	1.33 (3H, d, 2.9)	27.4, 77.7, 128.1
27.4	CH ₃	1.33 (3H, d, 2.9)	27.4, 77.7, 128.1

A pesar de tener los datos espectroscópicos de RMN-¹H, RMN-¹³C y el experimento HMBC no se pudo determinar la estructura del compuesto 6, sin embargo, se puede inferir que la base del compuesto pudiera ser de un flavonoide tipo prenilado por algunas de las señales características observadas, por lo que es necesario continuar con su identificación.

2.14. Identificación del compuesto 7

El compuesto 7 se obtuvo como un sólido blanco con un peso de 3.9 mg y soluble en CH_2Cl_2 y An. La identificación del compuesto 7 como γ -sitosterol se llevó a cabo mediante comparación de las estructuras reportadas en la base de datos NIST-05 del equipo de cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM). El cromatograma de gases (Figura 2.50) indicó la presencia de un solo pico con un $t_R = 26.85$ min, el espectro de masas (Figura 2.51) muestra un ión $[\text{M}^+]$ a m/z 414.4 y una secuencia de fragmentación característica de esteroides.

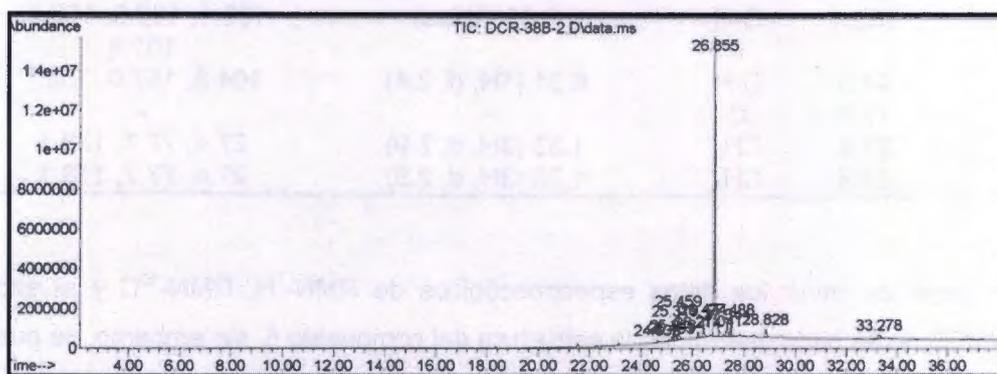


Figura 2.50. Cromatograma de gases del γ -sitosterol (compuesto 7).

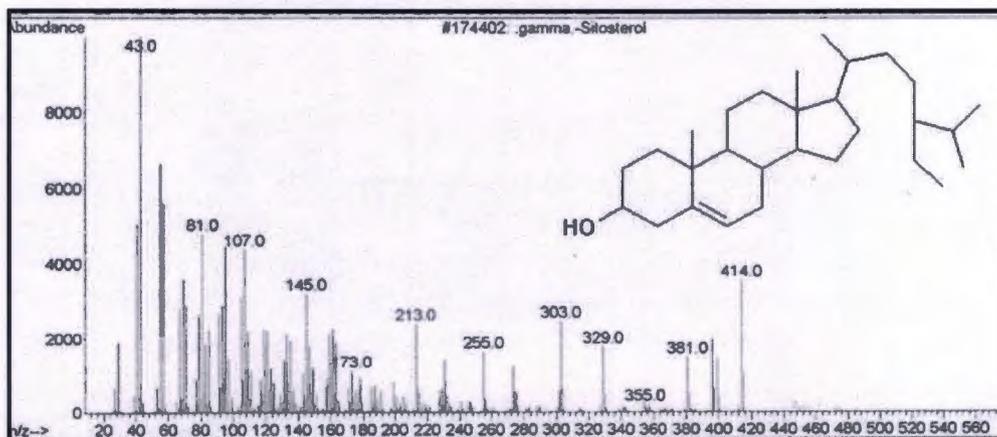


Figura 2.51. Espectro de masas del γ -sitosterol (compuesto 7).

Los fitoesteroles o esteroles son sustancias que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son triterpenos parecidos al colesterol, el cual tiene una cadena lateral compuesta por ocho átomos de carbono, mientras que los fitoesteroles más comunes tienen esta cadena lateral compuesta por nueve o diez átomos de carbono, de un total de 28 a 29 átomos de carbono.

Existen más de 100 tipos de fitoesteroles que han sido reportados en diferentes especies de plantas, siendo los más abundantes el sitosterol, campesterol y estigmasterol. De manera general no se conoce mucho sobre la actividad biológica específica de los fitoesteroles, excepto como componentes de las membranas celulares, sin embargo, son relevantes en la industria farmacéutica (producción de esteroides terapéuticos), nutrición (aditivos anti-colesterol en los alimentos funcionales, propiedad anti-cáncer) y cosméticos (cremas, lápiz labial, etc.) (Fernandes y Cabral, 2007).

Los sitosteroles son importantes en la dieta balanceada por su considerable interés en su capacidad de disminuir el colesterol y su utilidad terapéutica en el tratamiento de la hipersensibilidad prostática benigna. Cabe mencionar que el β -sitosterol es usado en el tratamiento de las patologías antes mencionadas (Fierro *et al.*, 2004).

Es importante señalar que el γ -sitosterol no ha sido aislado en *D. contrajerva* ni en otras especies de este género, por lo que representa un gran aporte al estudio fitoquímico de esta especie vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balestrin, L., J. Gaspari, O. Gomes, D. Dall' Stella y M. Dallarmi (2008). Contribuicao ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em actividade antioxidante. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, 230-235.
- Caceres, A., L. Rastrelli, F. de Simone, G. de Martino, C. Saturnino, P. Saturnino y R. Aquino (2001). Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*, 72, 376-381.
- Chwan-Fwu, L., H. Yu-Ling, C. Mei-Yin, S. Shuenn-Jyi y C. Chien-Chih (2007). Analysis of bakuchiol, psoralen and angelicin in crude drugs and commercial concentrated products of *Fructus psoraleae*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 15, 433-437.
- Chunyan, C., B. Shi, P. Liang, J. Li y I. Yoichiro. (2009). Isolation and purification of psoralen and bergapten from *Ficus carica* L. leaves by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32, 136-143.
- Fernandes, P. y J. Cabral (2007). Phytosterols: applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98, 2335-2350.
- Fierro, A., Y. Vásquez, M. Reyes-Parada, S. Sepúlveda-Boza (2004). Determinación cuantitativa del β -sitosterol presente en vegetales de la dieta. Posibles implicancias para su uso preventivo en poblaciones susceptibles. *Clínica y Ciencia*, 02, 43-48.
- Huang, Z., Y. Lin y J. Fang (2009). Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: Potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, 14, 540-554.
- Jung, K., C. Young-Won, K. Young y K. Jinwoond (2005). Potentially hepatoprotective glycolipid constituents of *Lycium chinense* fruits. *Archival Pharmaceutical Research*, 28, 1381-1385.
- Kates, M. (1990). Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids, In: M. Kates (ed). Plenum Press. New York. pp. 1-122 y pp235-320.

- Kuster, R., R. Bernardo, A. da Silva, J. Parente y W. Mors (1994). Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. *Phytochemistry*, 36, 224-223.
- Manzo, E., M. Ciavatta, D. Pagano, A. Fontana (2012). An efficient and versatile chemical synthesis of bioactive glyco-glycerolipids. *Tetrahedron Letters*, 53, 879-881.
- Oyugi, D., F. Ayorinde, A. Gugssa, A. Allen, E. Izevbigie, B. Eribo y W. Anderson (2011). Biological activity and mass spectrometric analysis of *Vernonia amigdalina* fractions. *Journal of Bioscience and Technology*, 2, 287-304.
- Organización Mundial de la Salud (2006). Iniciativa global sobre la seguridad de las vacunas. Vacunas como adyuvantes que contienen escualeno. Acceso en http://www.who.int/vaccine_safety/committee/topics/adjuvants/squalene/questions_and_answers/es/.
- Parast, B., S. Chetri, K. Sharma y V. Agrawal (2011). *In vitro* isolation, elicitation of psoralen in callus cultures of *Psoralea corylifolia* and cloning of psoralen synthase gene. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 1138-1146.
- Rojas-Lima, S., R. Luis-Santillan, M. Domínguez y A. Gutiérrez (1999). Furanocoumarins of three species of the genus *Dorstenia*. *Phytochemistry*, 50, 863-868.

CAPITULO III

Actividad contra promastigotes de *L. mexicana* del extracto metanólico y compuestos aislados de las raíces de *D. contrajerva*

3.1. Introducción

Las plantas cuentan con una extensa fuente de nuevos productos naturales y de nuevos tipos de estructuras, por lo tanto el factor crucial para el éxito final de una investigación que permita obtener los constituyentes bioactivos de las plantas es el eficiente análisis químico y biológico del extracto seleccionado para la investigación. Dicho esto, para llegar a la detección o purificación de los compuestos activos del extracto de *D. contrajerva* es esencial guiar el aislamiento con el bioensayo de promastigotes de *L. mexicana*, todo con el fin de que las fracciones que muestran una mejor actividad se continúen estudiando para realizar un mayor fraccionamiento químico hasta obtener la purificación de la sustancia activa.

3.2. Materiales y métodos

3.3. Bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*

3.3.1. Material biológico

La determinación de la actividad leishmanicida se obtuvo mediante un bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes (Martín, 2009). Se utilizó la cepa (LV4) MNYC/B2/62/M379 de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Inicialmente los promastigotes se cultivaron en medio TC199, con 10% de suero fetal bovino (SFB) con un pH de 7.4, a 26 °C durante seis días para obtener su forma infectante (promastigotes metacíclicos). Transcurridos los seis días se prosiguió a lavar los promastigotes con medio RPMI-1640 con una disolución de P/S (100 µg/mL de estreptomycin, 100 U/mL de penicilina, 20 mM de piruvato de sodio, 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol, 100 mM de L-glutamina y 1 g/L de bicarbonato de sodio) y se centrifugaron a 850 g (tres ocasiones) durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, quedando un botón de parásitos como sedimento, al cual se le llevó hasta 1 mL de medio

RPMI-1640 con 10% SFB y una disolución de P/S (100 µg/mL de estreptomina, 100 U/mL de penicilina, 20 mM de piruvato de sodio, 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol, 100 mM de L-glutamina y 1 g/L de bicarbonato de sodio). De este cultivo se tomaron 10 µL y se transfirieron a un tubo Eppendorf al cual se le agregó 90 µL de formaldehído al 2% con el fin de inmovilizar a los parásitos y poderlos contar; finalmente se tomaron 10 µL y se contaron en la cámara de Neubauer en la zona de glóbulos blancos con el objetivo 40×. Posteriormente, dependiendo del número de promastigotes contados, se realizó una disolución necesaria con medio RPMI-1640 con SFB al 10% y disolución de P/S para obtener una concentración de 1×10^6 parásitos/mL.

3.3.2. Preparación de extractos, fracciones y compuestos puros de *Dorstenia contrajerva*

El extracto metanólico de *D. contrajerva* se preparó a las concentraciones de 1,000, 100, 10, 1 y 0.1 µg/mL, llamadas disolución A, B, C, D y E, respectivamente. Para preparar la disolución A, 2 mg de extracto se disolvieron en 5 µL de sulfóxido de dimetilo (DMSO) más 995 µL de RPMI-1640 (con 10% de SFB y disolución de P/S); para obtener la disolución B se tomó 50 µL de A y se le añadió 450 µL de RPMI-1640; las posteriores disoluciones (C, D y E) se prepararon de manera seriada de la misma forma.

Las fracciones se prepararon a una única concentración de 500 µg/mL. Se tomó 2 mg por extracto y se disolvió en 5 µL de DMSO más 995 µL de RPMI-1640 (con 10% de SFB y disolución de P/S), siendo esta la disolución A. Posteriormente se tomó 250 µL de la disolución A más 250 µL de RPMI-1640 (con 10% de SFB y disolución de P/S), realizándose el mismo procedimiento respectivamente para cada fracción. Para los compuestos puros las concentraciones a trabajar fueron de 50, 20, 10, 1 y 0.1 µg/mL. La concentración de DMSO no excedió el 0.5% de las disoluciones, ya que a mayores concentraciones afecta el crecimiento de los parásitos, pudiéndose obtener falsos negativos.

Todas las disoluciones se filtraron con filtros millipore (0.45 µm, previamente esterilizados). Todo el procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar para evitar cualquier tipo de contaminación.

Tres controles fueron utilizados, un control de inhibición de crecimiento (anfotericina B, 1 µg/mL), un control de falsos negativos (disolución de parásitos, DMSO, medio RPMI-1640 (SFB 10% y P/S) y un control de crecimiento (disolución de parásitos y medio RPMI-1640 (SFB 10% y P/S).

Para la preparación de la microplaca, se tomaron 100 µL de medio con promastigotes a una concentración de 1×10^6 parásitos/mL o 1×10^5 parásitos/100 µL; esta suspensión fue colocada en los pozos adicionando 100 µL de cada disolución, respectivamente, así como las disoluciones de cada control, todo se realizó por triplicado, incubándose a 26 °C durante seis días.

Después de los seis días, se determinó la posible actividad leishmanicida de las fracciones vegetales por conteo de promastigotes viables en cada uno de los pozos mediante una cámara de Neubauer.

Para el extracto metanólico se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento de los parásitos al 50% (CI_{50}) y para las fracciones sólo se determinó el porcentaje de inhibición a una sola concentración.

Para determinar el porcentaje de inhibición, el número de parásitos contados en presencia de las diferentes disoluciones de las fracciones y compuestos puros fue comparado con el número de los parásitos presentes en el control de crecimiento, usando la siguiente fórmula:

Porcentaje de inhibición de crecimiento = $100 - (\text{promedio de promastigotes vivos en las disoluciones} / \text{promedio de promastigotes vivos en el control de crecimiento}) \times 100$.

La CI_{50} se obtuvo mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición de crecimiento y como su CI_{50} , según sea el caso.

3.3.3. Curva de crecimiento

Se realizó una curva de crecimiento siguiendo la metodología antes descrita, con el fin de corroborar que la fase óptima a la cual se realizaría el bioensayo es al sexto día de

incubación. Se hicieron conteos diarios así como cada tercer día en cámara de Neubauer hasta observar que la cantidad de promastigotes disminuía.

3.4. Resultados y discusión

3.5. Actividad leishmanicida del extracto metanólico y fracciones de *D. contrajerva*

El bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* mostró que el extracto metanólico (DCR-1a) de *D. contrajerva* fue activo con un $CI_{50} = 30.29 \mu\text{g/mL}$. Las fracciones de la partición, la hexánica (DCR-2a), diclorometánica (DCR-2b), acetato de etilo (DRC-2c) y acuosa (DCR-2d) presentaron un porcentaje de inhibición de 88.8, 60.5, 49.4 y 30.0%, respectivamente, presentando la mejor actividad la fracción hexánica, la cual resultó con un $CI_{50} = 5.92 \mu\text{g/mL}$, lo cual confirma los resultados obtenidos por Peraza-Sánchez *et al.* (2007) en esta especie.

Los resultados del bioensayo para el extracto metanólico lo mostró como activo y para el extracto hexánico altamente activo según el criterio de Lima *et al.* (2012) donde clasifica el tipo de actividad de los extractos como: altamente activo $<10 \mu\text{g/mL}$, activo $10 < CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, moderadamente activo $50 < CI_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ y no activo $CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$.

Dado que la fracción hexánica presentó la mejor actividad de las cinco fracciones obtenidas de la partición del extracto metanólico, ésta fue sometida a una CLV, de donde se obtuvieron nueve fracciones, resultando más activas las fracciones DCR-3a, DCR-3d, DCR-3f, DCR-3g y DCR-3h. Los porcentajes de inhibición de las mismas se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Actividad leishmanicida de las fracciones obtenidas por medio de una CLV de la fracción hexánica.

Fracción	% de inhibición
DCR-3a	98.5
DCR-3b	34.7
DCR-3c	35.5
DCR-3d	87.9
DCR-3e	69.1
DCR-3f	82.9
DCR-3g	97.3
DCR-3h	97.9
DCR-3i	38.5
Anfotericina B	100

3.6. Actividad leishmanicida de metabolitos aislados de *D. contrajerva*

Se evaluaron un total de siete compuestos procedentes de la fracción hexánica la cual resultó con la mejor actividad. Los resultados de las concentraciones inhibitorias al 50% de los compuestos se puede observar en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Actividad leishmanicida de los metabolitos aislados

Compuestos	IC ₅₀ (µg/mL)
1	NA
2	7.7
3	NA
4	33.4
5	2.3
6	2.1
7	NA
Anfotericina B	1.0

NA. No activo

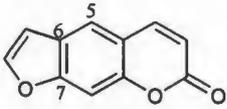
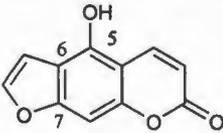
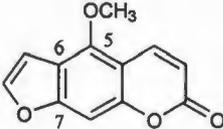
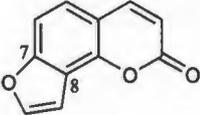
Se obtuvieron tres metabolitos activos los compuestos 2, 5 y 6 y uno moderadamente activo el compuesto 4. Los compuestos 5 y 6 son los que presentaron mejor actividad si se comparan con el fármaco anfotericina B.

El psoraleno (compuesto 2) presentó un $IC_{50} = 7.7 \mu\text{g/mL}$ considerado como activo a pesar de estar un poco alejado del valor que presenta la anfotericina B ($1.0 \mu\text{g/mL}$). Por otra parte, el compuesto 3 (5-[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil) butiloxi]-7H-furo [3,2-g] [1] benzopiran-7-ona) no presentó actividad, lo cual resulta interesante dado que este compuesto sólo es diferente al compuesto 2 al presentar un sustituyente monoterpénico en C-5 que integra para 15 protones. Tal hecho permite afirmar que la inhibición es nula debido a la presencia de este sustituyente. Cabe mencionar que los dos compuestos no han sido evaluados con anterioridad contra alguna actividad protozoaria, por lo que este sería el primer reporte en promastigotes de *L. mexicana*.

Sin embargo, existen reportes de actividad antiprotozoaria de los compuestos bergapteno, bergaptol y angelicina con un $CI_{50} = >30$, 2.5 y 24.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, contra *L. donovani*, que son compuestos derivados del psoraleno (Tasmedir *et al.*, 2006). La presencia de un grupo hidroxilo en la posición 5 del bergaptol en el anillo de la furanocumarina le confiere una mejor actividad que la presencia de un grupo metoxilo en el caso del bergapteno en dicha posición, deduciendo que la sustitución de un OH afecta profundamente a la actividad biológica, concluyendo que posiblemente este efecto se deba a que cambia su coeficiente de partición lípido-agua, aumentando la hidrofiliía y produciendo, por lo tanto, una molécula más soluble en agua. La actividad de angelicina también es afectada por la posición del anillo furánico en 7 y 8 de la benzo- α -pirona (cumarina) para las furanocumarinas angulares, respecto al caso del psoraleno, cuya posición del anillo furánico está en 6 y 7 para su forma lineal (Tabla 3.3) (Tasdemir *et al.*, 2006).

Es importante señalar que la comparación de la actividad leishmanicida respecto a su estructura puede variar dependiendo de la cepa evaluada.

Tabla 3.3. Relación estructura-actividad de psoralenos con respecto a sus derivados.

			
Psoraleno	Bergaptol	Bergapteno	Angelicina
* $CI_{50} = 7.7$ $\mu\text{g/mL}$	** $CI_{50} = 2.5$ $\mu\text{g/mL}$	** $CI_{50} = >30$ $\mu\text{g/mL}$	** $CI_{50} = 24.5$ $\mu\text{g/mL}$

*Actividad evaluada con cepa de *L. mexicana*, ** Actividad evaluada con cepa de *L. donovani*

El compuesto 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O- β -D-galactopiranosil glicerol (compuesto 5) presentó un $CI_{50} = 2.1$ $\mu\text{g/mL}$, considerado activo. Este metabolito es del grupo de los glicoglicerolípidos y constituyente de una importante clase de lípidos de membrana que son sintetizados por ambos organismos procariontas y eucariotas (Kates, 2009). Se cree que su amplio espectro de actividad se debe a los fenómenos implicados en el

reconocimiento celular, adhesión celular y otros fenómenos de membrana, por lo que su actividad puede estar atribuida a estas características. Adicionalmente, los ácidos grasos insaturados aportan más fluidez a la membrana ya que contiene C=C además de C-C. Se ha reportado en la literatura que existe una relación importante entre la hidrofobicidad lipofílica y la actividad anti-parasitaria de los fármacos, por ejemplo se describe que el aumento de solubilidad en el agua o usando drogas anfifílicas catiónicas tienden a aumentar la actividad anti-leishmaniasis y la actividad anti-malaria (Sousa *et al.*, 2011).

REFERENCIAS

- Kates, M. (1990). Glycolipids, phosphoglycolipids, and sulfoglycolipids, In: M. Kates (ed). Plenum Press. New York. pp. 1-122 y pp235-320
- Lima, J., M. Pinheiro, A. Santos, J. Pereira, D. Santos, A. Barison, I. Silva-Jardim y E. Costa (2012). *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, 4, 692-702.
- Martín, Z. (2009). Estudio de *Tridax procumbens* L. para la obtención de metabolitos con actividad antiprotozoaria. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán. México.
- Peraza-Sánchez, S.R., F. Cen-Pacheco, A. Noh-Chimal, F. May-Pat, P. Simá-Polanco, E. Dumontieil, M. García-Miss y M. Mut-Martín (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Sousa, S., C. Junior, F. Silva, N. Andrade, T. Barbosa y M. Vasconcellos (2011). Microwave-promoted morita-baylis-hillman reactions: efficient synthesis of new monoacylglycerols (MAGs) as potential anti-parasitic compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9, 1634-1643.
- Tasdemir, D., M. Kaiser, R. Brun, V. Yardley, T. Schmidt, F. Tosun y P. Rüedi. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Hemotherapy*, 50, 1352-1364.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

4.1. Discusión general

En el presente trabajo se estudió el extracto metanólico obtenido de las raíces de *Dorstenia contrajerva*, el cual resultó ser activo con $CI_{50} = 30.2 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes de *Leishmania mexicana*, lo cual permite corroborar lo reportado por Peraza-Sánchez *et al.* (2007). Dicho extracto fue fraccionado por partición líquido-líquido con hexano, diclorometano y acetato de etilo. Cada una de las fracciones obtenidas fue sometida al bioensayo de inhibición de promastigotes de *L. mexicana* con el fin de ubicar la actividad biológica para posteriormente continuar con su fraccionamiento con las diferentes técnicas de cromatografía en columna hasta obtener los metabolitos puros. Finalmente, los compuestos puros obtenidos fueron elucidados mediante la obtención y análisis de datos espectroscópicos.

La fracción hexánica resultante de la partición cromatográfica del extracto metanólico resultó altamente activa con $CI_{50} = 5.92 \mu\text{g/mL}$ según el criterio de Lima *et al.* (2012), así mismo, se continuó con su fraccionamiento del cual se obtuvieron cinco fracciones activas (DCR-3a, DCR-3d, DCR-3f, DCR-3g y DCR-3h) con un porcentaje de inhibición por encima del 80%.

De la purificación de las fracciones activas se aislaron siete compuestos. De la fracción DCR-3a se purificó escualeno (compuesto 1), el cual fue identificado por medio de su comparación de fragmentación con la base de datos NIST y corroborado con lo reportado por Oyugi *et al.* (2011). Este compuesto resultó inactivo contra promastigotes de *L. mexicana*. De la fracción DCR-3d se purificó un compuesto tipo furanocumarina que fue identificado como psoraleno (compuesto 2) de acuerdo con las señales observadas en los espectros de RMN tanto de protón como de carbono, así como por medio de su comparación por lo reportado por Chunyan *et al.* (2009). Este compuesto presentó una actividad moderada si se compara con los derivados del psoraleno, donde el bergaptol obtuvo una actividad mayor debido a la adición de un hidroxilo en el carbono 5 de la furanocumarina. Por otra parte, la conformación de la furanocumarina lineal en el caso de psoraleno y angular en el caso de angelicina también afecta su actividad, siendo más

activa el psoraleno (Tasdemir *et al.*, 2006). De la fracción DCR-3f se purificó un compuesto tipo furanocumarina que fue identificado como 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona (compuesto 3). De acuerdo con las señales observadas por RMN de protón y carbono se reconoció que este compuesto era muy similar al descrito anteriormente con la única diferencia de la adición de un sustituyente monoterpénico en C-5, por lo tanto, en conjunto con lo reportado por Kuster *et al.* (1993) se logró obtener su estructura. Este compuesto fue inactivo por lo que resulta interesante debido a que el psoraleno, un compuesto que carece del sustituyente monoterpénico, sí presentó actividad, infiriéndose así que la presencia de este sustituyente inhibe la actividad contra promastigotes de *L. mexicana*. De la fracción DCR-3g se aisló el compuesto 4 nombrado como contrajervatriol por ser nuevo, el cual presentó una actividad moderada con $CI_{50} = 33.4 \mu\text{g/mL}$. Por último de la fracción DCR-3h se aislaron tres metabolitos, el compuesto 5 identificado como 1-O-linoleoil-2-O-estearoil-3-O- β -D-galactopiranosil glicerol, el compuesto 6 (no identificado) los cuales presentaron un $CI_{50} = 2.3$ y $2.1 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, y γ -sitosterol (compuesto 7) que se identificó por comparación de su fragmentación con la base de datos NIST con 99% de coincidencia y no tuvo actividad.

4.2. Conclusiones generales

En conclusión, este es el primer informe del efecto antiprotozoario del extracto hexánico de las raíces de *Dorstenia contrajerva* contra promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Como resultado de una serie de fraccionamientos con diferentes técnicas cromatográficas se logró aislar siete compuestos provenientes de las cinco fracciones que presentaron la mejor actividad siendo estos: escualeno, psoraleno, 4-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)-butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona, γ -sitosterol, contrajervatriol y un compuesto del grupo de los glicogliceroles. El psoraleno ya ha sido reportado en otros géneros de *Dorstenia*, sin embargo, este sería su primer reporte en las raíces de *D. contrajerva*. El 5-[[3-(4,5-dihidro-5,5-dimetil-4-oxo-2-furanil)butil]oxi]-7H-furo[3,2-g][1]benzopiran-7-ona se ha reportado tanto en otros géneros de *Dorstenia* como en las hojas de *D. contrajerva* pero no en las raíces, siendo este también su primer reporte en la especie. El compuesto 4 fue nombrado contrajervatriol por ser nuevo, ya que no ha sido reportado en ningún género de *Dorstenia* y tampoco de otras especies de plantas por lo

cual constituye un aporte importante a la fitoquímica de *D. contrajerva* y del género *Dorstenia*. Por revisión en varias bases de datos, en particular SciFinder, se observa también que el tipo de esqueleto de la molécula tampoco se encuentra reportado en la literatura, sin embargo, es necesario continuar corroborando dicha aportación.

El compuesto 5 un glicoglicerolípido con el nombre de 1-O-linolenil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol que tampoco ha sido reportado con anterioridad en ningún género de *Dorstenia*, y que además presentó una buena actividad contra promastigotes de *L. mexicana*, resulta interesante primero por su actividad y segundo porque se logró aislar 149.9 mg, lo que resulta sorprendente, ya que generalmente los compuestos que resultan activos se obtienen en muy poca cantidad, por lo que *D. contrajerva* sería una buena fuente de obtención. En comparación con el compuesto de referencia utilizado (anfotericina B) en los bioensayos, la actividad biológica de los compuestos aislados de *Dorstenia contrajerva* resultan prometedores para futuros estudios, resaltando la importancia de la medicina tradicional en México por la existencia de recursos naturales como fuentes de posibles fitofármacos.

Perspectivas

Como primera instancia se propone continuar con la identificación del compuesto 6, así como también corroborar la identificación de los compuestos 4 y 5.

Se propone en estudios posteriores evaluar la posible citotoxicidad de los compuestos activos aislados de las raíces de *D. contrajerva*.

Se plantea realizar pruebas *in vivo* del extracto y compuestos puros activos.

Se sugiere establecer estudios de relación estructura-actividad que permitan conocer el mecanismo de acción preciso de los compuestos aislados.

Finalmente, se propone continuar con el aislamiento de metabolitos con el fin de encontrar otros posibles compuestos activos, así como continuar enriqueciendo la fitoquímica de la especie.

REFERENCIAS

- Chunyan, C., B. Shi, P. Liang, J. Li, I. Yoichiro. (2009). Isolation and purification of psoralen and bergapten from *Ficus carica* L leaves by high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 32, 136-143.
- Lima, J., M. Pinheiro, A. Santos, J. Pereira, D. Santos, A. Barison, I. Silva-Jardim, E. Costa (2012). *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, 4, 692-702.
- Kuster, R. R. Bernardo, A. da Silva, J. Parente, W. Mors (1994). Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. *Phytochemistry*, 36, 224-223.
- Oyugi, D., F. Ayorinde, A. Gugssa, A. Allen, E. Izevbigie, B. Eribo y W. Anderson. (2011). Biological activity and mass spectrometric analysis of *Vernonia amigdalina* fractions. *Journal of Bioscience and Technology*, 2, 287-304.
- Peraza-Sánchez, S.R., F. Cen-Pacheco, A. Noh-Chimal, F. May-Pat, P. Simá-Polanco, E. Dumontieil, M. García-Miss, M. Mut-Martín (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan península. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Tasdemir, D., M. Kaiser, R. Brun, V. Yardley, T. Schmidt, F. Tosun y P. Rüedi. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 1352-1364.