



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS
LEISHMANICIDAS EN EL RIZOMA DE *DORSTENIA
CONTRAJERVA***

Tesis que presenta

HÉCTOR ARTURO PENICHE PAVÍA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2016

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 de **Héctor Arturo Peniche Pavía**, titulado **“IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS LEISHMANICIDAS EN EL RIZOMA DE *DORSTENIA CONTRAJERVA*”**, fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., en la línea de Farmacobiología, bajo la dirección del **Dr. Sergio R. Peraza Sánchez**, y en el Laboratorio de Inmunobiología del Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección de la **Dra. María del Rosario García Miss**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 20 de octubre de 2016.

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. 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 estos se regirán 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.

Firma:  _____

Nombre: Héctor Arturo Peniche Pavía

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto de ciencia básica Conacyt 105346 titulado “Aislamiento y evaluación *in vitro* de metabolitos de plantas nativas de Yucatán con actividad antiprotozoaria”, en el que se participó bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez.

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 338183.

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 el laboratorio de Inmunobiología del Centro de Investigaciones Regionales (CIR) “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY).

A mis directores de tesis el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y la Dra. Rosario García Miss, 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.

A la técnica Q.F.B. Mirza Mut Martín, por todas sus atenciones, compartirme su tiempo y conocimiento sobre el cultivo celular de leishmania.

Al técnico M. en C. Luis W. Torres Tapia, por el tiempo dedicado a la discusión y elección adecuada de las técnicas cromatográficas, y obtención de datos espectroscópicos de IR y masas de baja, en la presente tesis.

A los integrantes de mi comité tutorial, la Dra. Cecilia Mónica García Rodríguez y el Dr. Rubén Marrero Carballo, por los consejos y críticas constructivas que ofrecieron para mejorar el escrito presente.

Al Dr. Emanuel Hernández Núñez, del CINVESTAV-IPN, Unidad Mérida, y al Dr. Manlio Graniel Sabido, de la Facultad de Química-UADY, por los espectros de resonancia magnética nuclear y los espectros de masas de alta resolución, respectivamente.

A mis amigos de laboratorio Ana Carrillo, Angel Cruz, Ashanty Baas, Carlos Quintal, Carlos Castañeda, Cristina Castillo, Daniela Hurtado, Deisy Medrano, Edwin Rodríguez, Leonor Vila, Lía Valencia, Sara Vila, Tania Tun y Wildo Batún por sus consejos, ánimos, ayuda y gratos momentos compartidos que hicieron que esta experiencia sea aún más fructífera.

El contenido de este trabajo ha sido publicado en la revista *Phytochemistry Letters*, volumen 18, 2016, 141-143; bajo el título “Metabolites isolated from the rhizomes of *Dorstenia contrajeva* with anti-leishmanial activity”.

DEDICATORIAS

A mis amados padres y queridos hermanos: Chessy, Maracas, Bere y Jaime, por sus continuos ánimos, consejos y amor incondicional, los adoro con todo mi ser. Mis tíos y primos por las alegrías, amor y apoyo que siempre hemos tenido. Al más pequeño de la familia, Darío, y a los próximos por venir.

A mi abuelita que siempre me anima a ser mejor persona, y me ha cuidado con todo el amor del mundo desde la cuna hasta la fecha.

A mi chuletita, por el amor, cariños, apoyo, ánimos y comprensión durante todo el camino que hemos recorrido juntos.

Y a todos los amigos/hermanos químicos y compañeros del posgrado, por las experiencias y los grandes momentos que nos sirvieron para madurar y los buenos momentos que fueron para festejar, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1. ANTECEDENTES	3
1.1.1. Leishmaniosis	3
1.1.2. El género <i>Leishmania</i>	4
1.1.3. Leishmaniosis en México	5
1.1.4. Distintos estadios del género <i>Leishmania</i>	6
1.1.5. Ciclo biológico del género <i>Leishmania</i>	6
1.1.6. Tratamiento actual de la leishmaniosis	8
1.1.7. Etnobotánica en la bioprospección de metabolitos bioactivos	9
1.1.8. Obtención de metabolitos activos a partir de extractos de plantas	11
1.1.9. Plantas medicinales leishmanicidas en América	14
1.1.10. Metabolitos secundarios leishmanicidas	14
1.1.11. El género <i>Dorstenia</i>	16
1.1.12. <i>Dorstenia contrajerva</i> L.	18
1.1.13. Actividad biológica de <i>Dorstenia contrajerva</i>	20
1.1.14. Metabolitos secundarios aislados de <i>Dorstenia contrajerva</i>	21
1.2. OBJETIVOS	22
1.3.1. Objetivo general	22
1.3.2. Objetivos específicos	22
1.2. HIPÓTESIS	22
1.4. JUSTIFICACIÓN	23
CAPÍTULO II. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE <i>DORSTENIA CONTRAJERVA</i>	25
2.1. INTRODUCCIÓN	25

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.2.1. Materiales en general	25
2.2.2. Material vegetal	28
2.2.3. Obtención del extracto metanólico y fracciones de la partición	28
2.2.4. CLV de la fracción diclorometánica DCR-2b	29
2.2.5. Aislamiento de metabolitos de la fracción diclorometánica.	30
2.2.5.1. Aislamiento del compuesto 1 (DCRH-9a1, bergapteno) y 2 (DCRH-9b1, dorstenina)	31
2.2.5.2. Aislamiento a partir de la fracción DCRH-3h	32
2.2.5.2.1. Aislamiento del compuesto 3 (DCR-12c1, cicloartocarpesina)	34
2.2.5.2.2. Aislamiento del compuesto 7 (DCR-54a1, xanthoarnol)	35
2.2.5.2.3. Aislamiento del compuesto 8 (DCRH-55a1, dorsjervin A) y 9 (DCRH-55d1, dorsjervin B)	36
2.2.5.2.4. Aislamiento de la fracción DCR-29c1	37
2.2.5.3. Aislamiento a partir de la fracción DCRH-3c	40
2.2.5.3.1. Aislamiento del compuesto 4 (DCRH-22b1, γ -sitosterol)	40
2.2.5.3.2. Aislamiento del compuesto 5 (DCRH-23d1, psoraleno)	42
2.2.5.4. Aislamiento a partir de la fracción DCRH-3k	42
2.2.5.4.1. Aislamiento del compuesto 6 (DCRH-53a1, dorsteniol)	42
2.3. RESULTADOS Y DISCUSION	44
2.3.1. Identificación del compuesto 1 (DCRH-9a1, bergapteno)	44
2.3.2. Identificación del compuesto 2 (DCRH-9b1, dorstenina)	46
2.3.3. Identificación del compuesto 3 (DCRH-12c1, cicloartocarpesina)	49
2.3.4. Identificación del compuesto 4 (DCRH-22b1, γ -sitosterol)	57
2.3.5. Identificación del compuesto 5 (DCRH-23d1, psoraleno)	59
2.3.6. Identificación de la fracción DCRH-29c	61
2.3.7. Identificación del compuesto 6 (DCRH-53a1, dorsteniol)	69
2.3.8. Identificación del compuesto 7 (DCRH-54a1, xanthoarnol)	74
2.3.9. Identificación del compuesto 8 (DCRH-55a1, dorsjervín A)	77
2.3.9. Identificación del compuesto 9 (DCRH-55d1, dorsjervín B)	88
CAPÍTULO III. ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA MEXICANA</i> DE LA FRACCIÓN DICLOROMETÁNICA Y SUS	97

SUBFRACCIONES	
3.1. INTRODUCCIÓN	97
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	98
3.2.1. Bioensayo de inhibición del crecimiento de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	98
3.2.2. Material biológico	98
3.2.3. Preparación de extractos, fracciones y compuestos puros de <i>Dorstenia contrajerva</i>	99
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	100
3.3.1. Actividad leishmanicida de la fracción diclorometánica del extracto metanólico	100
3.3.2. Actividad de los compuestos aislados	101
CAPÍTULO IV	105
4.1. DISCUSIÓN GENERAL	105
4.2. CONCLUSIONES	110
4.3. PERSPECTIVAS	111
BIBLIOGRAFÍA	113
ANEXO	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Morfología de Leishmania. Amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> (A) y <i>donovani</i> (B) y sus formas promastigotes respectivas (C y D).	6
Figura 1.2. Ciclo biológico de la <i>Leishmania</i> .	7
Figura 1.3. Estructuras de los compuestos mencionados en la Tabla 1.5.	18
Figura 1.4. Fotos de <i>D. contrajerva</i> L.	19
Figura 1.5. Metabolitos secundarios aislados de <i>Dorstenia contrajerva</i> L.	21
Figura 2.1. Fracciones obtenidas en el experimento DCRH-3.	29
Figura 2.2. CCD de fracciones obtenidas de la CLV.	30
Figura 2.3. Diagrama de flujo del aislamiento de DCRH-3d1 y DCRH-9b1.	31
Figura 2.4. Estructura de los compuestos DCRH-9a1 y DCRH-9b1.	32
Figura 2.5. CCD revelada en ácido fosfomolibdico de la fracciones DCRH-4h, DCRH-4i y DCRH-4j, en un sistema de Hx/An (7:3, x3).	33
Figura 2.6. Diagrama de aislamiento de dos metabolitos de la fracción DCR-3h.	33
Figura 2.7. Estructura de los compuestos DCRH-12c1 y DCRH-54a1.	36
Figura 2.8. Estructura de los compuestos DCRH-55a1 y DCRH-55d.	37
Figura 2.9. Diagrama del aislamiento de la muestra DCRH-29c1.	38
Figura 2.10. Estructuras propuestas de los flavonoides DCRH-29c1 y DCRH-29c2	39
Figura 2.11. CCD de las fracciones DCRH-19a a DCRH-19f en un sistema de Hx/AcOEt (8.5:1.5), revelada con óleum.	40
Figura 2.12. Aislamiento de metabolitos de la fracción DCRH-3c.	41
Figura 2.13. Estructura de los compuestos de DCRH-22b1 y DCRH-23a1.	
Figura 2.14. Aislamiento de metabolitos de la fracción DCRH-3k.	43
Figura 2.15. Estructura del compuesto DCRH-53a1.	44
Figura 2.16. Metabolito DCRH-3d1 en una placa bajo luz UV a 254 nm, con un Rf de 0.5 en un sistema de tolueno/AcOEt (8:2).	44
Figura 2.17. Espectro de masas del compuesto 1, identificado como bergapteno.	44
Figura 2.18. Fragmentación propuesta para el bergapteno por el método de IE.	45
Figura 2.19. Espectro de infrarrojo del compuesto 1, identificado como bergapteno.	46
Figura 2.20. CCD de bergapteno en UV a 254 nm, con un Rf de 0.35 en Hx/DCM/MeOH (7:1.7:0.3).	46
Figura 2.21. Espectro de masas del compuesto 2, identificado como dorstenina.	47
Figura 2.22. Fragmentación propuesta para dorstenina por el método de IE.	48
Figura 2.23. Espectro de infrarrojo de dorstenina.	48
Figura 2.24. CCD de DCRH-12c1 en UV a 254 nm, con un Rf de 3.0 en	49

Hx/DCM/MeOH (3:1.2:0.3).

Figura 2.25. Espectro de infrarrojo de DCRH-12c1 (compuesto 3).	49
Figura 2.26. Masas de alta resolución de DCRH-12c1, por ionización electro spray.	50
Figura 2.27. RMN- ¹ H (600MHz en acetona- <i>d</i> ₆) de DCRH-12c1.	51
Figura 2.28. RMN- ¹³ C (150 MHz en acetona- <i>d</i> ₆) de DCRH-12c1.	52
Figura 2.29. Correlaciones principales de la cicloartocarpesina (3), que se observan en las Figuras 2.30 y 2.31.	53
Figura 2.30. Ampliación del HMBC con las correlaciones del pirano de origen isopreno y del anillo B.	54
Figura 2.31. Ampliación del espectro de HMBC con las correlaciones entre los protones H-3 y H-8 de la cicloartocarpesina.	55
Figura 2.32. CCD del compuesto 5, identificado como γ -sitosterol, con un <i>R_f</i> de 0.35 en Hx/AcOEt (8.5:1.5).	57
Figura 2.33. Espectro de masas de compuesto 4, identificado como γ -sitosterol.	57
Figura 2.34. Fragmentación propuesta para el γ -sitosterol por el método de IE.	58
Figura 2.35. Espectro de infrarrojo del compuesto 4, identificado como γ -sitosterol.	59
Figura 2.36. CCD del compuesto 4, identificado como psoraleno, con un <i>R_f</i> de 0.35 en Hx/AcOEt (8.5:1.5).	59
Figura 2.37. Espectro de masas del compuesto 5, identificado como psoraleno.	59
Figura 2.38. Fragmentación propuesta para el psoraleno por el método de IE.	60
Figura 2.39. Espectro de infrarrojo del compuesto 5, identificado como psoraleno.	61
Figura 2.40. CCD de la fracción DCRH-29c1 revelada en óleum, con un <i>R_f</i> de 0.2 en Hx/DCM/AcOEt (6.5:2.5:1.5, 3 \times).	61
Figura 2.41 Espectro de infrarrojo de la fracción DCRH-29c	62
Figura 2.42. Cromatograma de líquidos de la fracción DCRH-29c	62
Figura 2.43. Espectro de masas de alta resolución de la fracción DCRH-29c por ionización electrospray.	63
Figura 2.44. Espectro de RMN- ¹ H donde DCRH-29c1 y DCRH-29c2 son A y B, respectivamente.	63
Figura 2.45. Espectro de RMN- ¹³ C de la fracción DCRH-29c	64
Figura 2.46. Estructura propuesta para flavonoides DCRH-29c1 y 29c2.	65
Figura 2.47. Ampliación del HMBC en las correlaciones de H-3 y H-7.	65
Figura 2.48. Ampliación del HMBC enfocando a las correlaciones de los protones del anillo B.	66
Figura 2.49. Estructura de flavonoides prenilados con formula molecular de C ₂₀ H ₁₆ O ₆ son: chalconas (A) y flavanonas (B).	68

Figura 2.50. Posible conectividad del anillo pirano en el anillo A.	68
Figura 2.51. CCD de la fracción DCRH-53a1 bajo UV de 254 nm, con un Rf de 0.29 en Hx/An (7:3) corrida tres veces.	69
Figura 2.52. Espectro de infrarrojo de la fracción DCRH-53a1.	69
Figura 2.53. Espectro de Masas del compuesto DCRH-53a1 sililado.	70
Figura 2.54. Fragmentación de propuesta del compuesto DCRH-53a1 sililado	71
Figura 2.55. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 6, dorsteniol (600 MHz, CD ₃ OD).	71
Figura 2.56. Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 6, dorsteniol (150 MHz, CD ₃ OD).	72
Figura 2.57 CCD de la fracción DCRH-54a1 bajo UV de 365nm el compuesto con dorsteniol de referencia en el carril izquierdo.	74
Figura 2.58. Espectro de masas de la muestra DCRH-54a1 sililada.	74
Figura 2.59. Propuesta de fragmentación del compuesto DCRH-54a1 sililado.	75
Figura 2.60. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 7, xanthoarnol (600 MHz, CD ₃ OD).	76
Figura 2.61 Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto 7, xanthoarnol (150 MHz, CD ₃ OD).	76
Figura 2.62. CCD del dorsjervinA, bajo UV a 254 nm, con un Rf de 0.3 en Hx/An (7:3, 3×)	77
Figura 2.63. Espectro de masas de DCRH-55a1.	78
Figura 2.64. Propuesta de fragmentación para dorsjervín A (DCRH-55a1).	78
Figura 2.65. Espectro de masas de alta resolución de DCRH-55a1.	79
Figura 2.66. Espectro de UV-vis de 55a1, compuesto 8.	80
Figura 2.67. Espectro de infrarrojo de DCRH-55a1, compuesto 8.	80
Figura 2.68. Espectro de RMN- ¹ H (600 MHz, DMSO-d ₆) de DCRH-55a1.	81
Figura 2.69. Espectro de RMN- ¹³ C (150 MHz, DMSO-d ₆) de DCRH-55a1.	82
Figura 2.70. Estructura propuesta por Medrano Nahuat (2014).	82
Figura 2.71. Correlaciones principales en el experimento de HMBC.	83
Figura 2.72. Ampliación del HMBC del compuesto 8, de las correlaciones de H-1", H-2' y 6-OMe.	83
Figura 2.73. Ampliación del HMBC del compuesto 8, de las correlaciones de H-3 y H-7.	84
Figura 2.74. Espectro GSD sintético NOESY-1D (128 scans, 100 ms) selectivo del compuesto DCRH-55a1. Se irradió selectivamente al H-7 y se observa su interacción con 6-OCH ₃ .	85
Figura 2.75. Benzofuranos similares a dorsjervín A.	86
Figura 2.76. Benzofuranos típicos en la literatura, de origen estilbenoide, como moracín A, y derivados del ácido shikímico y el ácido mevalónico, como	87

tremetona y deshidrotremetona.	
Figura 2.77. Posible ruta biosintética de dorsjervín A.	88
Figura 2.78. CCD de C-18 revelada con óleum, H ₂ O/ACN/MeOH (4:4:2, ×3). Compuesto 8 es 55a1 (gris) y 55d1 es compuesto 9 (azul), ambos con R _f = 0.64.	88
Figura 2.79. Espectro de masas del compuesto 9, DCRH-55d1	89
Figura 2.80. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 9.	89
Figura 2.81. Espectro de UV del compuesto 9.	90
Figura 2.82. Espectro de infrarrojo del compuesto 9.	90
Figura 2.83. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 9 (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	91
Figura 2.84. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 9 (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	92
Figura 2.85. Correlaciones del experimento de HMBC del compuesto 9.	93
Figura 2.86. Correlaciones de H-3 y H-7 del compuesto 9 en el espectro de HMBC (ampliación).	93
Figura 2.87. Correlaciones de H-1", H-2 ¹ y 6-OMe del compuesto 9 en el espectro de HMBC (ampliación).	94
Figura 3.1. Formación de aducto ADN-psoraleno por cicloadición 2+2.	101
Figura 3.2. Flavonoides prenilados activos contra especies del género <i>Leishmania</i> .	102
Figura 4.1. Compuestos aislados en el presente trabajo en el rizoma de <i>D.</i> <i>contrajerva</i> .	106
Figura 4.2. Metodología básica para la síntesis de flavonas preniladas.	110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características y distribución de los distintos tipos de leishmaniosis	3
Tabla 1.2. Taxonomía del género <i>Leishmania</i>	4
Tabla 1.3. Medicamentos empleados para tratar leishmaniosis cutánea	8
Tabla 1.4. Metabolitos importantes provenientes de plantas medicinales.	10
Tabla 1.5. Importantes metabolitos secundarios leishmanicidas.	15
Tabla 1.6. Especies de <i>Dorstenia</i> , uso etnobotánico, estudios de farmacología realizados en el extracto y algunos ejemplos de su fitoquímica.	17
Tabla 1.7. Taxonomía de <i>Dorstenia contrajerva</i> L.	19
Tabla 2.1. Peso obtenido de las fracciones y precipitado de DCRH-3.	30
Tabla 2.2. Pesos de las fracciones del experimento DCRH-4.	32
Tabla 2.3. Asignación total espectroscópica de DCRH-12c1, cicloartocarpesina.	53
Tabla 2.4. Comparación de señales de RMN- ¹ H y ¹³ C de DCRH-12c1 y cicloartocarpesina	56
Tabla 2.5. Espectroscopia de RMN de DCRH-29c1	66
Tabla 2.6. Espectroscopia de RMN de DCRH-29c2	67
Tabla 2.7. Datos espectroscópicos de RNM- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto DCRH-53a1 y dorsteniol.	73
Tabla 2.8. Comparación de señales de RMN de ¹ H y ¹³ C del compuesto 7 y xanthoarnol.	77
Tabla 2.9. Resumen de las correlaciones en el experimento HMBC (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	83
Tabla 2.10. Señales de RMN- ¹ H y ¹³ C correspondientes al compuesto 8, dorsjervín A.	84
Tabla 2.11. δ de ¹ H y ¹³ C (en ppm) de los compuestos A-F de la Fig. 2.75.	87
Tabla 2.12. Asignación espectroscópica de dorsjervín B (compuesto 9, DCRH-55d1).	95
Tabla 3.1. Actividad leishmanicida de las fracciones por CLV de DCRH-2b.	100
Tabla 3.2. Metabolitos puros de aislados de la fracción DCRH-2b.	101

ABREVIATURAS

Acetona- d_6	Acetona deuterada
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
An	Acetona
DCM	Diclorometano
EB-RMN	Experimento bidimensional de resonancia magnética nuclear
CG-EM	Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas
CI-EMAR	Cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución
CLV	Cromatografía líquida al vacío
CCG	Cromatografía de columna por gravedad
CET	Cromatografía por exclusión de tamaño con Sephadex LH-20
CF	Cromatografía de columna flash
CCP	Cromatografía de capa delgada preparativa
CCD	Cromatografía de capa delgada
COSY	Correlation spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HTS	High Throughput Screening
IR	Espectrofotometría de infrarrojo
LC	Leishmaniosis cutánea
LCL	Leishmaniosis cutánea localizada
LMC	Leishmaniosis mucocutánea
LV	Leishmaniosis visceral
Ppm	Partes por millón
KBr	Bromuro de potasio
R _f	Relación de frentes
RMN	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
RMN- ^1H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
MeOH	Metanol
MeOH- d_4	Metanol deuterado

RESUMEN

Los protozoarios del género *Leishmania* son responsables del complejo de enfermedades zoonóticas conocidas como leishmaniosis; éstos son transmitidos a los humanos por la picadura de un mosquito hematófago de la subfamilia Phlebotominae. La enfermedad puede producir deformidad en el paciente y está compuesta por tres formas principales: cutánea (localizada y difusa), mucocutánea y visceral.

La OMS en 2016 señaló que en los últimos cinco años se ha registrado más de un millón de casos de leishmaniosis en el mundo. El control y la erradicación de esta enfermedad se obstaculizan debido a que la farmacoterapia tiene un grave problema de toxicidad e infectividad, además de ser difícil de costear porque gran parte de los pacientes son pobres y viven en áreas remotas con escasos servicios de salud.

En el CICY se ha estado investigando plantas medicinales contra enfermedades parasitarias. Los resultados obtenidos han mostrado que el extracto metanólico del rizoma de *Dorstenia contrajerva* (Moraceae) tiene una buena actividad antiprotozoaria en el bioensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Este extracto fue sometido a una separación líquido-líquido por polaridad ascendente; las fracciones obtenidas se evaluaron en el bioensayo antes mencionado y se observó una mejor actividad en las fracciones con menor polaridad (hexánica y diclorometánica).

En esta tesis se estudió la fracción diclorometánica y a través de un proceso de separación por cromatografía fue posible el aislamiento de nueve compuestos, cuyas estructuras se elucidaron con el uso de métodos espectroscópicos (UV, IR, RMN y EM) y por comparación con sus datos publicados en la literatura científica. Los compuestos aislados fueron: bergapteno (**1**), dorstenina (**2**), cicloartocarpesina (**3**), γ -sitosterol (**4**), psoraleno (**5**), dorsteniol (**6**), xanthoarnol (**7**), además de dos compuestos nuevos: dorsjervín A (**8**) y dorsjervín B (**9**). Estos compuestos poseen una estructura de tipo benzofurano con un probable origen biosintético de auronas. Cada compuesto se analizó en el bioensayo de promastigotes de *L. mexicana*, teniendo como resultado que sólo **3** presentó actividad leishmanicida ($CI_{50} = 4.9 \mu M$). Cicloartocarpesina (**3**) es el primer flavonoide prenilado que se ha aislado de una especie del género *Dorstenia* del Nuevo Mundo.

ABSTRACT

Protozoa of the genus *Leishmania* are responsible of the complex of zoonotic diseases known as leishmaniasis; these are transmitted to human by the bite of a hematophagous mosquito of the subfamily Phlebotominae. These diseases produce deformity in the patient and are made up by three main forms: cutaneous (localized and diffuse), mucocutaneous, and visceral, which can be deadly without treatment.

WHO (2016) said that in the last five years more than one million of cases of leishmaniasis have been reported in the world, The control and eradication of this disease are impeded because the present pharmacotherapy has a serious problem of toxicity and infectivity and it is hard to afford the therapy drugs because the greater percent of the patients are poor and live in remote areas with scarce health services.

Research on medicinal plants of the Yucatan Peninsula to cure parasitic diseases is being undertaken at CICY. Data obtained have shown that the methanol extract of rhizomes of *Dorstenia contrajerva* (Moraceae) has a good activity in the *in vitro* assay of growth inhibition of *Leishmania mexicana* promastigotes. The methanol extract was submitted to a liquid-liquid separation using solvents of ascending polarity, obtaining the hexane (Hx), dichloromethane (CH₂Cl₂), ethyl acetate (EtOAc), and aqueous fractions; these fractions were evaluated in the aforementioned assay, observing a better antiprotozoal activity in Hx and CH₂Cl₂ fractions.

Dichloromethane (CH₂Cl₂) fraction was studied in the present thesis. Through a process of several chromatographic separations, it was possible to isolate nine compounds, each one being structurally characterized by using spectroscopic techniques (UV, IR, NMR, and MS) and by comparison of their spectral data to those published in the scientific literature: bergapten (**1**), dorstenin (**2**), cycloartocarpin (**3**), γ -sitosterol (**4**), psoralen (**5**), dorsteniol (**6**), xanthoarnol (**7**), plus the new compounds dorsjervin A (**8**) and dorsjervin B (**9**). Compounds **8** and **9** have a benzofuran structure with a probable biosynthetic origin of auronones. All nine compounds were tested against promastigotes of *L. mexicana*, resulting **3** the only active compound (IC₅₀ = 4.9 μ M). The cycloartocarpin (**3**) is the first prenylated flavonoid isolated from a species of the genus *Dorstenia* in the New World.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es un complejo de enfermedades reconocidas dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (ETD). Las ETD causan alrededor de 1,000 millones de enfermos alrededor del mundo y, a diferencia de otras enfermedades, no reciben grandes apoyos económicos para su investigación (WHO, 2013).

Estimaciones recientes reportan que más de 400 millones de personas en el mundo están en riesgo de contraer tanto leishmaniosis visceral (LV) como leishmaniosis cutánea (LC); mientras, el número de casos nuevos asciende hasta 1.3 millones de personas anualmente, llegando hasta 20 mil a 30 mil los decesos al año (WHO, 2016).

En México, la situación es menos adversa que en países como Brasil, Colombia, Afganistán, Irán, Etiopía, Bangladesh e India. Sin embargo, se reportaron hasta 970 casos nuevos de leishmaniosis en 2013 (SINAVE, 2015), más del 95% de estos casos fueron reportados sólo por la Secretaría de Salud y es posible que esta enfermedad esté siendo subdiagnosticada en nuestro país.

En la región de la península de Yucatán es donde la leishmaniosis, en su manifestación cutánea, es una enfermedad endémica (Paek *et al.*, 2012), la cual es conocida por ser altamente desfigurante y causar deterioro no sólo en la salud, sino también del entorno social del individuo enfermo debido a las estigmatizaciones de las que son objeto por parte de la sociedad (Botero y Restrepo, 2012).

Las opciones farmacéuticas disponibles para la terapia de la leishmaniosis son significativamente tóxicas y caras, lo cual repercute en un aumento de las infecciones refractarias; por ello, la búsqueda de nuevos fármacos es urgente (Vannier-Santos, *et al.*, 2002).

La escasez de fármacos contra la leishmaniosis es un ejemplo de cómo la industria farmacéutica ha sido negligente con las necesidades de países tercermundistas (Strain, 2007), debido a que no se realizan investigaciones sobre las enfermedades que prevalecen en los países donde la mayor parte de la población no tiene la capacidad económica para pagar por los fármacos (WHO, 2013); por lo que han orientado sus esfuerzos hacia las líneas de investigación que resultan redituables, las cuales abordan enfermedades con mayor incidencia que afectan a personas en países desarrollados, como la hipertensión, diabetes, obesidad, VIH/SIDA, cáncer, entre

otras. Así, la innovación en tratamientos para enfermedades que prevalecen en los países en vías de desarrollo es mínima en sus aportaciones (Kremer, 2002).

En décadas anteriores la industria farmacéutica le dio importancia a la generación de bibliotecas de compuestos para la obtención al azar de nuevos fármacos, con el fin de tener mayor cantidad de ellos, en lugar de analizarlos en equipos modernos para ensayos biológicos. Sin embargo, con este enfoque, contrario a lo que se esperaba, se desarrollaron pocos fármacos (Newman y Cragg, 2016; Lahlou, 2013; Butler, 2004). Por lo anterior, se ha regresado a utilizar las estructuras de productos naturales como fuente para desarrollar nuevos compuestos líderes en investigación farmacéutica. Gracias a la complejidad de sus estructuras químicas y su origen biosintético, los productos naturales presentan interacción con dianas terapéuticas, es decir, proteínas como enzimas, receptores de membrana y factores de transcripción (Newman y Cragg, 2016; Butler, 2004).

El presente trabajo consistió en aislar e identificar metabolitos de la fracción diclorometánica del extracto metanólico del rizoma de *Dorstenia contrajerva*. En investigaciones previas, el extracto metanólico y las fracciones menos polares, la hexánica (ya estudiada previamente) y diclorometánica, presentaron actividad leishmanicida en el ensayo *in vitro* de inhibición de promastigotes de *Leishmania mexicana* (Medrano-Nahuat, 2014; Peraza-Sánchez, 2007).

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1. Leishmaniosis

La leishmaniosis es un complejo de enfermedades causadas por protozoarios del género *Leishmania* spp. Estos parásitos son transmitidos por la picadura de mosquitos hembra hematófagas, pertenecientes al subgénero *Phlebotominae*, infectados con especies de *Leishmania* (CDC, 2013); en América, el vector es el mosquito del género *Lutzomyia*, y en África, Asia y Europa el género que prevalece es *Phlebotomus* (Mehlhorn, 2008).

La enfermedad incluye un amplio rango de manifestaciones clínicas descritas brevemente en la Tabla 1.1. Entre ellas, se encuentran la leishmaniosis visceral (LV), también conocida como Kala-azar, la cutánea localizada (LCL), la cutánea difusa (LCD) y la mucocutánea (LMC) (Mehlhorn, 2008).

Tabla 1.1. Características y distribución de los distintos tipos de leishmaniosis.

Tipo	Características	Distribución
LCL	Forma más común de las leishmaniosis. Úlceras en partes expuestas del cuerpo dejando cicatrices permanentes.	Aproximadamente el 95% de los casos ocurren en las Américas, el Mediterráneo, Medio Oriente y Asia Central.
LCD	Se caracteriza por lesiones nodulares prácticamente en todo el tegumento, es de curso crónico.	Ocurre principalmente en Etiopía, Brasil y el Caribe.
LMC	Destrucción total o parcial de las membranas de la nariz, boca o garganta.	Más del 90% de los casos ocurren en tres países latinoamericanos: Perú, Brasil y Bolivia.
LV	Anemia, picos irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepato-esplenomegalia y es fatal si no es tratada.	Más del 90% de los casos nuevos ocurren en seis países: Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán del Sur y Sudán.

Fuente: WHO, 2016; Botero y Restrepo, 2012; Mehlhorn, 2008.

1.1.2. El género *Leishmania*

El género *Leishmania* está incluido en la clase Kinetoplastida (Lukes, 2009), debido a la presencia del cinetoplasto, una subestructura grande y única dentro de la mitocondria, formada por moléculas de ADN circular, la cual se encuentra asociada estrechamente al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo. Este género posee una complicada taxonomía (Tabla 1.2). Característico del género es que cada especie presenta una manifestación clínica particular dependiendo de en qué hospedero vertebrado se desarrolle la infección, con gran variabilidad entre individuos e incluso puede ser asintomática; al igual cada especie de *Leishmania* sólo puede reproducirse en el intestino de algunas especies del género del mosquito vector, *Lutzomyia* o *Phlebotomus*, según su ubicación geográfica (Botero y Restrepo, 2012; Dostálová y Volf, 2012; Mehlhorn, 2008).

Tabla 1.2. Taxonomía del género *Leishmania*

Subgénero	Complejo	Especie	Manifestación	Vector
<i>L. (Leishmania)</i>		<i>L. donovani</i>	LV	<i>Phlebotomus spp.</i>
		<i>L. infantum</i>	LV	<i>Phlebotomus spp.</i>
		<i>L. donovani</i> (<i>L. chagasi</i>)	LV	(<i>Lutzomyia spp.</i>)
		<i>L. archibaldi</i>	LV	<i>Phlebotomus spp.</i>
	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	LC	<i>Phlebotomus spp.</i>
		<i>L. aethiopica</i>	LC	<i>Phlebotomus spp.</i>
	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	LC	<i>Phlebotomus spp.</i>
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	LC	<i>Lutzomyia spp</i>
		<i>L. amazonensis</i>	LC, LMC	<i>Lutzomyia spp</i>
	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	LC
<i>L. guyanensis</i>			LC, LMC	<i>Lutzomyia spp</i>
<i>L. panamensis</i>			LC, LMC	<i>Lutzomyia spp</i>
<i>L. braziliensis</i>		<i>L. braziliensis</i>	LMC	<i>Lutzomyia spp.</i> , <i>Psychodopypus spp.</i>
		<i>L. peruviana</i>	LMC	<i>Lutzomyia spp</i>
<i>L. (Sauroleishmania)</i>		<i>L. tarentolae</i>	(En reptiles)	

Fuente: Schonian *et al.*, 2010.

1.1.3. Leishmaniosis en México

La LCL es una enfermedad endémica del sur de México, y su agente causal es la *Leishmania mexicana*, con más de 970 y 459 casos nuevos registrados en el año 2013 y 2014, respectivamente (SINAVE, 2015). Aunque al ser una enfermedad que ocurre principalmente en comunidades marginadas, de bajos recursos y escasos servicios de salud, es posible que los casos nuevos verdaderos sean superiores a los reportados por las autoridades en la materia.

La LCL es citada de múltiples formas dependiendo del país; por ejemplo, se le conoce como “úlceras orientales” en Asia, “uta” en Perú, “baurú” en Brasil; mientras que en México y Centroamérica se emplea el término “úlceras del chiclero”, debido a que fue considerada una enfermedad ocupacional de los chicleiros, quienes entraban a la zona endémica por largos periodos para recolectar el látex. Por lo tanto, estaban expuestos a ser picados por un mosquito infectado en zonas no protegidas por la ropa, siendo comunes las lesiones en forma de úlceras en las orejas, el rostro y las extremidades. La situación actual de la enfermedad en el país indica que es una enfermedad que afecta principalmente a campesinos entre 15 y 45 años (Botero y Restrepo, 2012; Lainson, 2010).

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en la península de Yucatán por el investigador danés Harald Seidelin en 1912. En 1953, Biagi fue el primero en reconocer al género *Leishmania* como agente causal de la enfermedad, nombrándolo como *Leishmania tropica mexicana*. Sin embargo, en 1962, Garnham la renombró como *Leishmania mexicana*, nombre con el que es conocida la especie hasta la fecha (revisado por Lainson, 2010; revisado por Andrade-Narváez *et al.*, 2001).

En México, en la región de la península de Yucatán, los vectores que se conocen son *Lutzomyia olmeca*, *L. cruciata*, *L. panamensis*, *L. shannoni* y *L. ylephiletor* (Pech-May *et al.*, 2010), aunque *L. cruciata*, al presentar hábitos antropofílicos, es el principal vector para el hombre y los hábitos alimenticios de *L. olmeca* son sobre los roedores *Ototylomys phyllotys* y *Peromyscus yucatanicus* (Chablé-Santos *et al.*, 1995). También se conoce que son los meses de noviembre a marzo en los que existe mayor transmisión en la región peninsular, que concuerda con los meses en los que los “chicleiros” o los trabajadores del campo que recolectan el látex del chicozapote (Andrade-Narváez *et al.*, 2003).

1.1.4. Distintos estadios del género *Leishmania*

En este apartado se mencionan las características morfológicas descritas para el género, el promastigote y el amastigote (Figura 1.1). El promastigote (metacíclico) es la forma infectante, elongada y extracelular, que se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los vectores. Mide 10-20 μm , sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño es prácticamente el mismo que el cuerpo; presenta un gran núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la extensión de la mitocondria, localizado a 1-2 μm del extremo anterior del parásito, de donde emerge el flagelo. El axonema que se origina en el cuerpo basal está contenido dentro del bolsillo flagelar (Mehlhorn, 2008; Kamhawi, 2006).

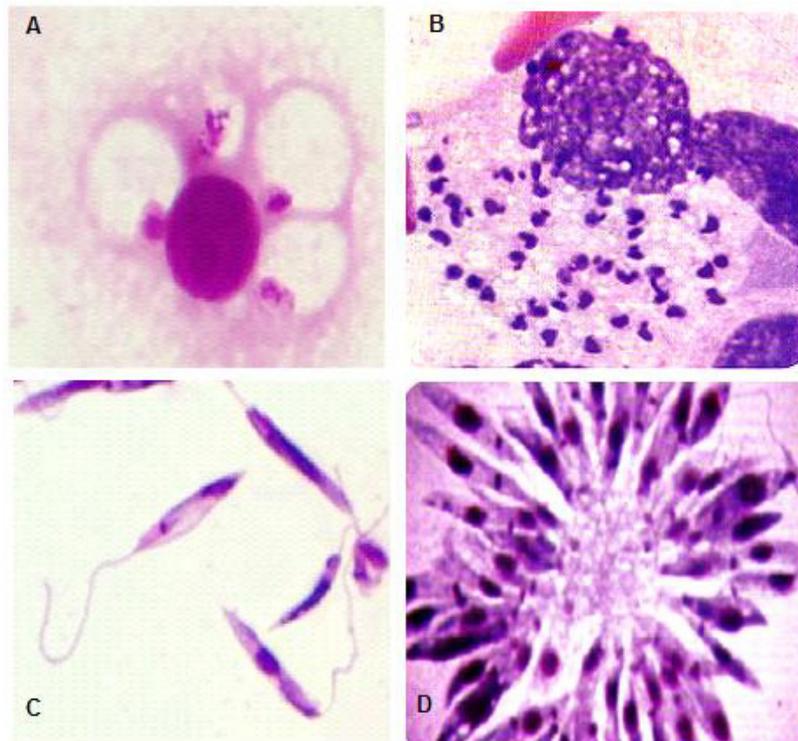


Figura 1.1. Morfología de *Leishmania*. Amastigotes de *Leishmania mexicana* (A) y *donovani* (B) y sus formas promastigotes respectivas (C y D). Créditos: Botero y Restrepo, 2012; Laboratorio de Inmunobiología del CIR-UADY.

El amastigote es la forma replicativa en el hospedero, redonda u oval e intracelular, que reside y se multiplica en fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares; es decir, los macrófagos de distintos tejidos. Mide de 2-4 μm . Con tinción de Giemsa se aprecia un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño, ambos de color púrpura, y un

filamento delgado que une al cinetoplasto y al cuerpo basal; este último apenas un punto visible (Botero y Restrepo, 2012; Mehlhorn, 2008).

1.1.5. Ciclo biológico del género *Leishmania*

El ciclo biológico comienza cuando un mosquito infectado se alimenta. Entonces los promastigotes se regurgitan con la saliva del vector y así llegan al nuevo hospedero como se observa en la Figura 1.2. En el segundo paso, los promastigotes son fagocitados por macrófagos. En el tercer paso, los promastigotes se transforman en amastigotes en un período de 1-4 h y se reproducen por fisión binaria y después de 48 horas, explota la célula infectada, liberando amastigotes que infectan a otros macrófagos (CDC, 2013; Botero y Restrepo, 2012).

El curso clínico dependerá tanto del hospedero como de la especie de *Leishmania*. La propagación de la infección ocurre cuando los vectores se alimentan de un hospedero infectado, entonces los amastigotes son transportados al tracto digestivo del insecto donde se reproducen como promastigotes, bloqueando la alimentación del insecto (pasos 5-8, Figura 1.2), al alimentarse nuevamente transmiten los parásitos (CDC, 2013; Botero y Restrepo, 2012; Vannier-Santos *et al.*, 2002).

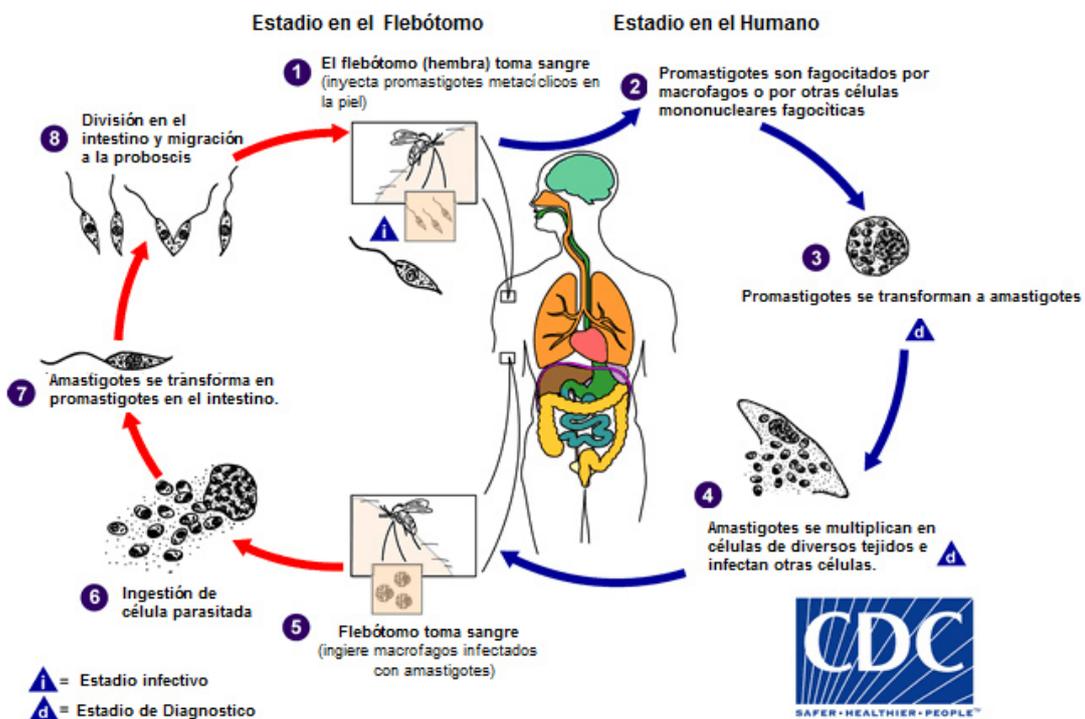


Figura 1.2. Ciclo biológico de la *Leishmania* (CDC, 2013).

1.1.6. Tratamiento actual de la leishmaniosis

El tratamiento que se puede aplicar para curar la leishmaniosis depende tanto de la manifestación clínica de la enfermedad como de la especie de *Leishmania* responsable de la infección. La gran mayoría de los fármacos aceptados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha demostrado perder su efectividad ante la presencia de nuevas cepas resistentes; además que estos compuestos presentan con alta frecuencia reacciones adversas, generando que muchos pacientes no terminen sus tratamientos. Otras dificultades que los pacientes experimentan con el tratamiento, desde la imposibilidad de adquirir el medicamento a pesar de la aparición de genéricos intercambiables, hasta la dificultad de administrar el fármaco ya que muchos se administran por vía intraparenteral. Los fármacos más empleados para la leishmaniosis cutánea se presentan en la Tabla 3.1 (Freitas-Junior *et al.*, 2012; OMS, 2010; Chappuis *et al.*, 2007).

Tabla 1.3. Medicamentos empleados para tratar leishmaniosis cutánea.

Fármaco	Dosis	Reacción adversa o toxicidad
Estibogluconato de sodio y Antimoniato de meglumina	20 mg Sb/Kg/d I.V. o I.M. × 20 días o más	Cardiotoxicidad, pancreatitis, nefrotóxico y hepatotóxico.
Paramomicina	2×/d × 10-20 d, puede ser extendido.	Nefrotoxicidad, ototoxicidad y hepatotoxicidad
Isotianato de pentamidina	2-3 mg/Kg I.V. o I.M. diario o cada segundo día 4-7 mg/Kg.	Hipotensión, hipoglucemia con frecuencia seguida por DM, nefrotóxico, diarrea y vómitos.

Fuente: Freitas-Junior *et al.*, 2012; OMS, 2010; Chappuis *et al.*, 2007.

Debido a los efectos secundarios de los medicamentos actuales, la búsqueda de nuevos compuestos leishmanicidas es urgente, pues se espera que nuevos fármacos presenten menor riesgo de reacciones adversas en el paciente así como una reducción en el tiempo tan prolongado del tratamiento, ya que ambos factores caracterizan los tratamientos actuales y evitan que estos sean exitosos.

1.1.7. Etnobotánica en la bioprospección de metabolitos bioactivos

Durante siglos, la raza humana ha utilizado para su beneficio las propiedades curativas de las plantas que encuentra a su alrededor. Cada grupo humano, a través de la historia, ha empleado un sistema tradicional de medicina herbolaria.

En cada sistema de medicina tradicional, es común encontrar la figura de un curandero o chamán que conserva los conocimientos de una población sobre las distintas anomalías que los afectan (Heinrich *et al.*, 1998). Aunque siempre presentan una parte de misticismo religioso en los tratamientos, no se discute la capacidad que existe en muchos de los remedios herbales, ya que de éstos se han obtenido múltiples compuestos activos (Tabla 1.4) (Fabricant y Farnsworth, 2001), indispensables para diversos padecimientos e incluso enfermedades letales como el cáncer.

En la actualidad, la información generada a través de investigación de campo se complementa con la obtenida a través de las bases de datos. Las bases de datos son herramientas indispensables para realizar búsquedas de información biológica o química de las plantas, con reportes actualizados sobre sus actividades y la química de sus metabolitos (Fabricant y Farnsworth, 2001).

Un alto porcentaje poblacional en todo el mundo, en especial en países en desarrollo, emplean la medicina herbolaria como su principal método de curación para sus afecciones (Gibbons y Heinrich, 2001). Se estima que el 70 al 95% de la población en países en vías de desarrollo recurre a la medicina tradicional, su valor en el mercado internacional esta evaluado en más de 83 mil millones de dólares, con un incremento que ha sido exponencial en los últimos años (WHO, 2011). Además, de los medicamentos recetados a nivel mundial, se estima que el 49% de los fármacos más vendidos son productos naturales o algún derivado (Newman y Cragg, 2016).

Hoy en día, de las más de 300,000 especies de plantas sólo el 15% ha sido estudiado su potencial farmacológico (revisado por Palhares, 2015). Uno de cada cinco especies de plantas se encuentra en peligro de extinción, debido a factores que incluyen desde el cambio climático y la deforestación (RBG Kew, 2016); de hecho las proyecciones para el año 2032 indican que el 70% de la superficie terrestre podría ser destruida o alterada (UNEP, 2002). Por lo tanto, la bioprospección en búsqueda de productos naturales bioactivos es cada vez más importante para el beneficio de la sociedad, ya que cada año desaparece una gran diversidad de especies sin estudiar, disminuyendo así la posibilidad de encontrar nuevas curas a partir de metabolitos secundarios.

Es importante recalcar que los productos naturales poseen una actividad biológica intrínseca gracias a su capacidad para interactuar con proteínas, incluso desde su

propio origen biosintético a través de enzimas y, por lo tanto, aumenta la posibilidad de ser reconocidos por otra diana en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Lahlou, 2013).

Tabla 1.4. Metabolitos importantes provenientes de plantas medicinales.

Metabolito	Uso / actividad	Planta medicinal
Atropina	Anticolinérgico	<i>Atropa belladonna</i> L.
Bromelina	Anti-inflamatorio/proteasa	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill
Cafeína	Estimulante del SNC	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze
(+)-Catequina	Hemostático	<i>Potentilla fragaroides</i> L.
Colchicina	Antitumoral, anti-gota	<i>Colchicum autumnale</i> L.
L-Dopa	Agente anti-Parkinson	<i>Mucuna spp.</i>
Digoxina	Cardiotónico	<i>Digitalis lanata</i> Ehrh.
Emetina	Amebicida; emético	<i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Brotero)
Efedrina	Simpatomimético	<i>Ephedra sinica</i> Stapf.
Etopósido	Agente antitumoral	<i>Podophyllum peltatum</i> L.
Escina	Anti-inflamatorio	<i>Aesculus hippocastanum</i> L.
Glicirricina	Endulzante	<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.
Gossypol	Contraceptivo masculino	<i>Gossypium spp.</i>
Hiosciamina	Anticolinérgico	<i>Hyosciamus niger</i> L.
Morfina	Analgésico	<i>Papaver somniferum</i> L.
Quinina	Antimalárico, antipirético	<i>Cinchona ledgeriana</i> (Howard)
Reserpina	Antihipertensivo	<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) Benth.
Silymarina	Antihepatotóxico	<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn.
Taxol	Agente antitumoral	<i>Taxus brevifolia</i> Nutt.
Vinblastina/Vincristina	Antitumoral	<i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don

Fuente: Fabricant y Farnsworth, 2001.

Debido al consumo generalizado de los extractos herbales y de los productos naturales en muchas comunidades, es necesario realizar pruebas biológicas conocidas como bioensayos para probar y demostrar su actividad. De esta manera, es posible comprobar su eficacia y asociarla a los metabolitos secundarios responsables (Ankli *et al.*, 2002).

Es importante identificar y analizar los metabolitos secundarios responsables del efecto terapéutico de los productos herbales, ya que al cuantificar estos metabolitos conoceremos la cantidad de principio activo presente en los remedios herbales, obteniendo productos herbales estandarizados, también nombrados fitofármacos

(Yuet-Ping *et al.*, 2012). Otra ventaja de esta misma identificación es la obtención de conocimiento nuevo sobre los metabolitos, cuya estructura base es útil para la generación de nuevos derivados semisintéticos o sintéticos, los cuales permiten desarrollar nuevas opciones farmacéuticas (Balunas y Kinghorn, 2005; Butler, 2004).

1.2.8. Obtención de metabolitos activos a partir de extractos de plantas

Existen diversas formas de obtener compuestos activos y algunas de las más simples consisten en generar una biblioteca de extractos de plantas medicinales, de productos naturales, de compuestos sintéticos o semisintéticos. Asimismo, existe una gran cantidad de formas de realizar una evaluación de su actividad biológica, empleando desde ensayos enzimáticos, microorganismos e incluso hasta mamíferos o tejidos y cultivos celulares provenientes de éstos (Reguera *et al.*, 2014; Weller, 2012; Tempone *et al.*, 2011; Pauli *et al.*, 2005).

El enfoque biodirigido es una estrategia de aislamiento de metabolitos que combina el trabajo fitoquímico y la experimentación biológica. Se utiliza frecuentemente en investigaciones cuyo fin es la búsqueda de metabolitos activos para el desarrollo de nuevos fármacos. El objetivo es utilizar sólo las fracciones con mejores resultados en los ensayos biológicos, para continuar con su fraccionamiento por procedimientos cromatográficos y así guiar el trabajo fitoquímico de aislamiento de metabolitos bioactivos (Balunas y Kinghorn, 2005; Pauli *et al.*, 2005; Butler, 2004).

Un ejemplo de aislamiento siguiendo un enfoque biodirigido es la obtención de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol. Este producto natural se obtuvo a partir del extracto metanólico de *Tridax procumbens* por Martín-Quintal *et al.* (2009). En este proceso, las fracciones obtenidas después de cada proceso cromatográfico fueron sometidas a un ensayo contra promastigotes de *L. mexicana* para encontrar cual era la fracción más activa, y este proceso de separación se repitió hasta que se llegó a la obtención del (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol.

En la actualidad, en la mayoría de las investigaciones en productos naturales es cada vez más común emplear el enfoque biodirigido con técnicas como HPLC-EM o CG-EM, que permiten una desreplicación eficaz (identificación de compuestos conocidos) con el fin de encontrar un compuesto novedoso activo, en menos pasos y menos tiempo (Weller, 2012; Wolf y Siems, 2007).

En cuanto a los bioensayos, es común separarlos en cuatro ramas posibles: estudios *in vitro*, *in silico*, *ex vivo* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* son realizados principalmente en placas de 96 pozos y se manejan desde líneas celulares, microorganismos, complejos enzimáticos, proteínas aisladas, ya sean enzimas, receptores o de canal. Estas últimas proteínas son también utilizadas en los estudios *in silico*, en los que, a través de modelos computacionales, se puede evaluar la interacción del compuesto con proteínas. La estructura tridimensional de estas proteínas ha sido caracterizada por métodos como difracción de rayos X. Posteriormente, se accede a bases de datos y se comparan con diferentes compuestos con el fin de encontrar el mejor candidato para el desarrollo de probables fármacos (Tempone *et al.*, 2011; Reguera *et al.*, 2014).

En ensayos *in vitro* es común analizar los compuestos a través de estudios de bioensayo libres de dianas específicas; es decir, una prueba de tipo fenotípico. En este tipo de pruebas se emplea todo el microorganismo, suele realizarse conteo directo bajo microscopio o técnicas colorimétricas como sales de tetrazolio o azul alamar, con un lector de pruebas de ELISA, en placas de 96 o más pozos. Algunos autores prefieren emplear citometría de flujo con leishmanias transgénicas con proteínas fluorescentes o, en otros casos, tintes como yoduro de propidio y SYBR-14. Mientras que el primero de estos tintes permea hasta la membrana nuclear, el segundo sólo es permeable en células muertas (Tempone *et al.*, 2011; Fumarola *et al.*, 2004).

Hoy en día, estas pruebas son realizadas de manera automatizada, miniaturizada y con el empleo del análisis masivo de datos (en inglés, reciben el nombre de *high-throughput-screening*, HTS), con las cuales es posible realizar un cribado de 50,000 a 350,000 en menos de un mes. Este tipo de instrumentación se ha efectuado casi exclusivamente en la industria farmacéutica y su aplicación para ETD es mínima aún (Reguera *et al.*, 2014; Van den Bogaart *et al.*, 2014).

Dentro de los estudios por sitios de acción, tanto *in silico* e *in vitro*, los más relevantes para el estudio dirigido por diana son: la inhibición de las cisteín proteasas, en especial la cisteín proteasa B, la biosíntesis de ergosterol y la enzima 14- α -desmetilasa son blancos preferidos en esta ruta, y del metabolismo redox del protozoario, la tripanotona reductasa es la más empleada. Del metabolismo de las purinas y del ADN, la dihidrofolato reductasa y las topoisomerasas, respectivamente, pues al ser distintas estructuralmente a las del hospedero asegura su selectividad (Reguera *et al.*, 2014; Tempone *et al.*, 2011; Chawla y Madhubala *et al.*, 2010).

El enfoque fenotípico tiene la ventaja de que no depende de la inactivación de una enzima u otra proteína específica para que cumpla con su objetivo primordial, la eliminación del protozoario. Esto nos permite asegurar que, a pesar de la complejidad de las vías metabólicas del microorganismo, es posible que una simple molécula sea capaz de eliminar al patógeno, lo cual constituye una ventaja sobre los dirigidos por diana. Las metodologías HTS que emplean análisis de imágenes para obtener información sobre la estructura del organismo, falta de movilidad, porcentaje de células infectadas, relación citoplasma-núcleo y daño en orgánulos son parte de esta categoría (Reguera *et al.*, 2014; Siqueira-Neto *et al.*, 2012; Freitas-Junior *et al.*, 2012).

En los estudios *in vitro* se puede emplear a los estadios de leishmania en medio axénico o incluso parasitando intracelularmente a macrófagos. Ambos acercamientos se han empleado en la búsqueda de compuestos bioactivos. Debido a que el cultivo de promastigotes es fácil de manejar, se ha concluido que es útil para estudios preliminares de múltiples fracciones o metabolitos. Sin embargo, se deben de reanalizar los compuestos activos, normalmente debajo de 10 μM , en amastigotes intracelulares porque así se asegura la probabilidad del éxito de los compuestos en las siguientes fases del desarrollo del futuro fármaco leishmanicida, las etapas preclínicas. (Freitas-Junior *et al.*, 2014; Tempone *et al.*, 2011; Butler, 2004; Balunas y Kinghorn, 2005; De Muylder *et al.*, 2011).

Los bioensayos *ex vivo* son similares a los *in vitro*, aunque divergen en que los primeros utilizan órganos. Por ejemplo, extractos de bazo o ganglios linfáticos infectados con protozoarios en placas de 96 pozos, que presentan no sólo macrófagos infectados, sino otras células importantes del sistema inmune, como linfocitos CD4+ que permiten evaluar la actividad de los compuestos en un microambiente que refleja la celularidad del sitio donde se genera el proceso patológico de leishmaniosis en el hospedero (Osorio *et al.*, 2011; Peniche *et al.*, 2014).

En los estudios *in vivo* se emplean animales desde ratas, ratones o hámsteres y suelen ser el último paso antes de un estudio clínico en humanos, ya que permiten desarrollar mejores modelos de estudio de fisiopatología de leishmaniosis en humanos. Si en estos modelos los metabolitos activos o sus derivados son capaces de llegar con éxito al sitio de acción, el interior de los macrófagos, sin causar toxicidad a una determinada dosis terapéutica, son candidatos para las fases clínicas (Butler, 2004; Balunas y Kinghorn, 2005; Freitas-Junior *et al.*, 2012).

1.1.9. Plantas medicinales leishmanicidas en América

En Latinoamérica existe una gran cantidad de plantas que se emplean contra la leishmaniosis cutánea. Por ejemplo, las poblaciones rurales y urbanas en Brasil –un país de extenso territorio con la biodiversidad más grande del mundo– han empleado múltiples preparados con el fin de solucionar sus problemas de salud. Entre las plantas empleadas con eficacia leishmanicida demostrada *in vitro* (Passero *et al.*, 2014) se encuentran las siguientes: guatambu (*Aspidosperma ramiflorum*), limoncillo (*Cymbopogon citrates*), alecrimpimienta (*Lippia sidoides*), alfavaca (*Ocimum gratissimum*) y jacaranda (*Jacaranda puberula*). Mientras que las plantas medicinales de Brasil, comprobadas por modelos murinos *in vivo*, son: ajo (*Allium sativum*), matico (*Piper aduncum*), *Aloe vera* y epazote (*Chenopodium ambrosioides*).

En Perú igual se emplean varios remedios contra uta, nombre con el cual es conocida la presentación cutánea de la enfermedad en este país; se destacan por tener decocciones de corteza de cedro (*Cedrela odorata* L.) y la corteza del chiric sanango (*Brunfelsia grandiflora*). En heridas, es común agregar emplastos, por ejemplo, la corteza de tahuari (*Tabebuia schunkevigoi*) y las hojas machacadas del llantén (*Plantago major*) o una aplicación directa del látex de oje (*Ficus insipida*) en las úlceras (IIAP, 1995).

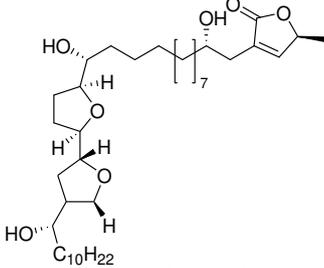
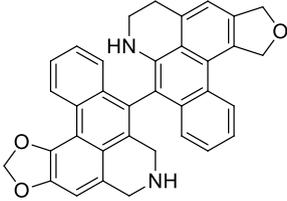
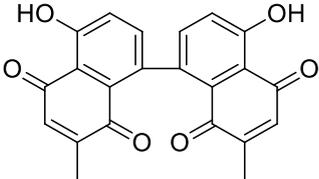
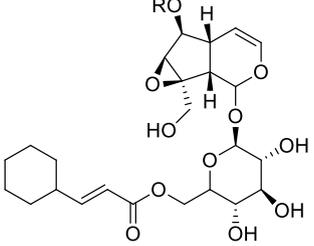
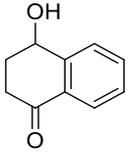
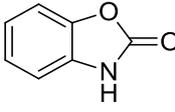
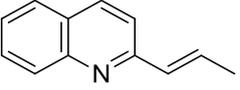
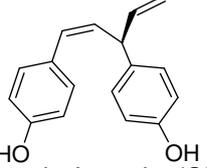
En el caso de México, según estudios etnobotánicos (Jiménez-Arrellanes, 2014), las hojas y raíz del bejuco guaco (*Pentalinon andrieuxii*), la hierba del toro entera (*Tridax procumbens*), los bulbos del ajo (*Allium sativum*), corteza y hojas del yacnic (*Vitex gaumeri*), las hojas del achiote (*Bixa orellana*), las hojas de escobilla (*Sida rhombifolia*), el jugo y fruta de la guayaba (*Psidium guajava*), las hojas del llantén (*Plantago major*), la savia de matapalo (*Ficus dendrocida*), la cáscara y savia del plátano (*Musa paradisiaca*), las hojas del tuari (*Lupinus tauris*), son ampliamente usadas por la población.

1.1.10. Metabolitos secundarios leishmanicidas

Ya se han realizado estudios farmacológicos en más de 100 especies de plantas alrededor del mundo, no sólo con el fin de comprobar su eficacia en medicina tradicional, sino con el objetivo de aislar los metabolitos responsables de la actividad. Entre los compuestos activos aislados se encuentran: alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, diferentes tipos de lactonas, quinoides, flavonoides, diterpenos,

esteroides, diversos lípidos, iridoides, heterociclos con oxígeno, bencenoides, carbohidratos, lignanos, péptidos, cumarinas, fenilpropanoides, dépsidos, compuestos con sulfuro y monoterpenos (Rocha, *et al.*, 2005). En la Tabla 1.5 se presentan ejemplos de productos naturales que podrían ser empleados para el desarrollo de una terapia más eficaz de la leishmaniosis (Carvalho y Ferreira, 2001).

Tabla 1.5. Importantes metabolitos secundarios leishmanicidas.

<p><i>Rollinia emarginata</i> (Raynaud-Le <i>et al.</i>, 2004) Rolliniastatin-1</p>  <p>Promastigotes y amastigote intracelular de <i>L. donovani</i> (CI₅₀ = 4.7 y 5 µM, respectivamente).</p>	<p><i>Unonopsis buchtienii</i> (Waechter <i>et al.</i>, 1999) Unonopsino</p>  <p>Promastigotes de <i>L. donovani</i> y <i>L. major</i> (CI₁₀₀ = 3.12 µg/mL).</p>
<p><i>Pera benensis</i> (Fournet <i>et al.</i>, 1992) 8,8'-Biplumbagina</p>  <p>Promastigotes de <i>L. amazonensis</i>, <i>L. donovani</i> y <i>L. braziliensis</i> (CI₅₀ = 10 µM/mL).</p>	<p><i>Picrorhiza kurroa</i> (Mittal <i>et al.</i>, 1998) Picrórido</p>  <p>Efectivo como hepatoprotector en LV en fases clínicas I y II.</p>
<p><i>Ampelocera edentula</i> (Fournet <i>et al.</i>, 1994b) 4-Hidroxi-1-tetralona</p>  <p>Actividad comparable <i>in vivo</i> a la del glucantime en modelo murino para LC del Nuevo Mundo.</p>	<p><i>Acanthus illicifolius</i> (Singh y Aeri, 2013) 2-Benzoxazolinona</p>  <p>Promastigotes <i>in vitro</i> de <i>L. donovani</i> (CI₅₀ = 40 µg/mL)</p>
<p><i>Galipea longiflora</i> (Fournet <i>et al.</i>, 1994a) Chimanina B</p>  <p>Promastigotes de <i>L. donovani</i>, <i>L. braziliensis</i> y <i>L. amazonensis</i> (CI₉₀ = 25 µg/ml).</p>	<p><i>Asparagus africanus</i> (Oketch-Rabah <i>et al.</i>, 1997) (+)-Nyasol</p>  <p>Promastigotes de <i>L. major</i> (CI₅₀ = 49 µM)</p>

Entre las plantas mexicanas con alta actividad leishmanicida destaca *Dorstenia contrajerva* L. Esta especie está siendo estudiada en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007) y se ha demostrado la presencia de metabolitos activos contra *L. mexicana* (Medrano Nahuat, 2014); falta por aislar e identificar los compuestos de la fracción activa diclorometánica obtenida del extracto metanólico del rizoma de esta especie. Por lo tanto, el proyecto de investigación consiste en aislar los metabolitos responsables de la actividad leishmanicida.

1.2.11. El género *Dorstenia*

Hay aproximadamente 116 especies aceptadas de *Dorstenia* (The Plant List, 2013) que se encuentran principalmente en países africanos y de Centroamérica y Sudamérica, de las cuales 25 se han estudiado químicamente en las últimas cuatro décadas. Algunas especies son comúnmente empleadas en el tratamiento de enfermedades reumáticas, infecciosas y mordeduras de serpiente en Camerún (Abegaz *et al.*, 2000). Mientras en Sudamérica se utiliza una decocción de los rizomas “carapía” para problemas de la piel (Vilegas *et al.*, 1997). En la Figura 1.5 y Tabla 1.6 se hace un hincapié en el conocimiento etnobotánico y farmacológico, más algunos de los metabolitos característicos de algunas especies de *Dorstenia*.

Una característica importante del género son sus inflorescencias, ya que separa al género en dos secciones: uno con receptáculo redondo, nombrado *Emygdioa*, y el cuadrado, denominado *Dorstenia* (Delascio-Chitty, 1998). Las semillas que se desarrollan dentro de frutos múltiples se liberan comúnmente en el género a través de una explosión del fruto maduro.

Dentro del género se pueden encontrar desde árboles con hojas caducifolias ambientados a climas extremos en el continente africano hasta arbustos pequeños en las selvas tropicales del continente americano, donde ambos son reconocidos por sus suculentos tallos y rizomas (Misiewicz y Zerega, 2012; Ribeiro, 2011; The Plant List, 2013).

Tabla 1.6. Especies de *Dorstenia*, uso etnobotánico, estudios de farmacología realizados en el extracto y algunos ejemplos de su fitoquímica.

Especie	Etnobotánica	Extracto y farmacología	Fitoquímica (ej.)
<i>D. barteri</i> var. subtriangularis	Ramas y hojas: dolor, asma y reumatismo ¹	Ramas (CH ₃ OH/CHCl ₃ [1:1]) : actividad antiinflamatoria y antinociceptiva en ratones ¹	Bartericina A (1), y bartericina D (2). ^{2,3}
<i>D. angusticornis</i>	Ramas: Diarrea y gastroenteritis. ⁴	Ramas (CH ₃ OH/CHCl ₃ [1:1] y sus fracciones): MIC contra	Angusticornina A (3) y angusticornina B (4). ³
<i>D. barteri</i> var. multiradiata	Ramas y hojas: paperas, pian y laceraciones. ⁵	diversos cultivos bacterianos y levaduras hasta 9.76 µg/mL. ^{4,5}	Dorstenona (5). ⁶
<i>D. psilurus</i>	Hojas: artralgia, diurético, hipertensión, estimulante y analgésico. ⁷	Ramas (CH ₃ OH/CHCl ₃ , [1:1]): efecto antihipertensivo y aumento de los niveles de insulina en roedores hiperinsulínicos. ⁷	Dorsilurina A (6), dorsilurinas B-J y dorsilurina K (7). ⁸⁻¹⁰
<i>D. gigas</i>	Hojas: flatulencia, enfermedades de la piel e indigestión. ¹¹	Ramas (metanol) IC ₅₀ > 64.0-40.3 contra <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>T. brucei</i> , <i>L. infantum</i> , <i>P. falciparum</i> . ¹¹	Swietenocumarina B (8), furanopinnarina (9) y dimetoxi-chalpensina (10) ¹²
<i>D. convexa</i>	Ramas: Malaria. ¹³	Ramas (CH ₃ OH): alta inhibición del crecimiento por <i>Plasmodium falciparum</i> (IC ₅₀ < 5 µg/ml). ¹³	Psoraleno (11), bergapteno (12), ácido betulínico (13) y más ácidos pentacíclicos. ¹⁴
<i>D. arifolia</i>	Rizoma: Efectos ansiolítico, hipnótico y sedativo. ¹⁵	Rizoma (CH ₃ OH): efecto sedativo y anticonvulsiónante en ratones. ¹⁵	Psoraleno (7), α-amirina (14) y β-amirina (15), y sus 3-O ésteres. ¹⁶
<i>D. picta</i>	Ramas: hipertensión y diabetes ^{17,18}	Ramas (CH ₃ OH): efecto natriurético en ratones y antidiabético en ratas. ^{17,18}	Dorstenpictanona (16), β-sitosterol (17) y bergapteno (8). ¹⁹

Fuente: ¹Omisore *et al.*, 2004, ²Ngameni *et al.*, 2004, ³Ngadjui *et al.*, 2005, ⁴Kuete *et al.*, 2007, ⁵Mbaveng *et al.*, 2008, ⁶Tsopmo *et al.*, 1999, ⁷Dimo *et al.*, 2001, ⁸Ngadjui *et al.*, 1998, ⁹Ngadjui *et al.*, 1999, ¹⁰Tabopda *et al.*, 2008, ¹¹Mothana *et al.*, 2012, ¹²Franke *et al.*, 2001, ¹³Boyom *et al.*, 2009, ¹⁴Poumale *et al.*, 2011, ¹⁵Zapata-Sudo *et al.*, 2010, ¹⁶Fingolo *et al.*, 2013, ¹⁷Ngueguim *et al.*, 2006, ¹⁸Ngueguim *et al.*, 2013, ¹⁹Hussain *et al.*, 2011.

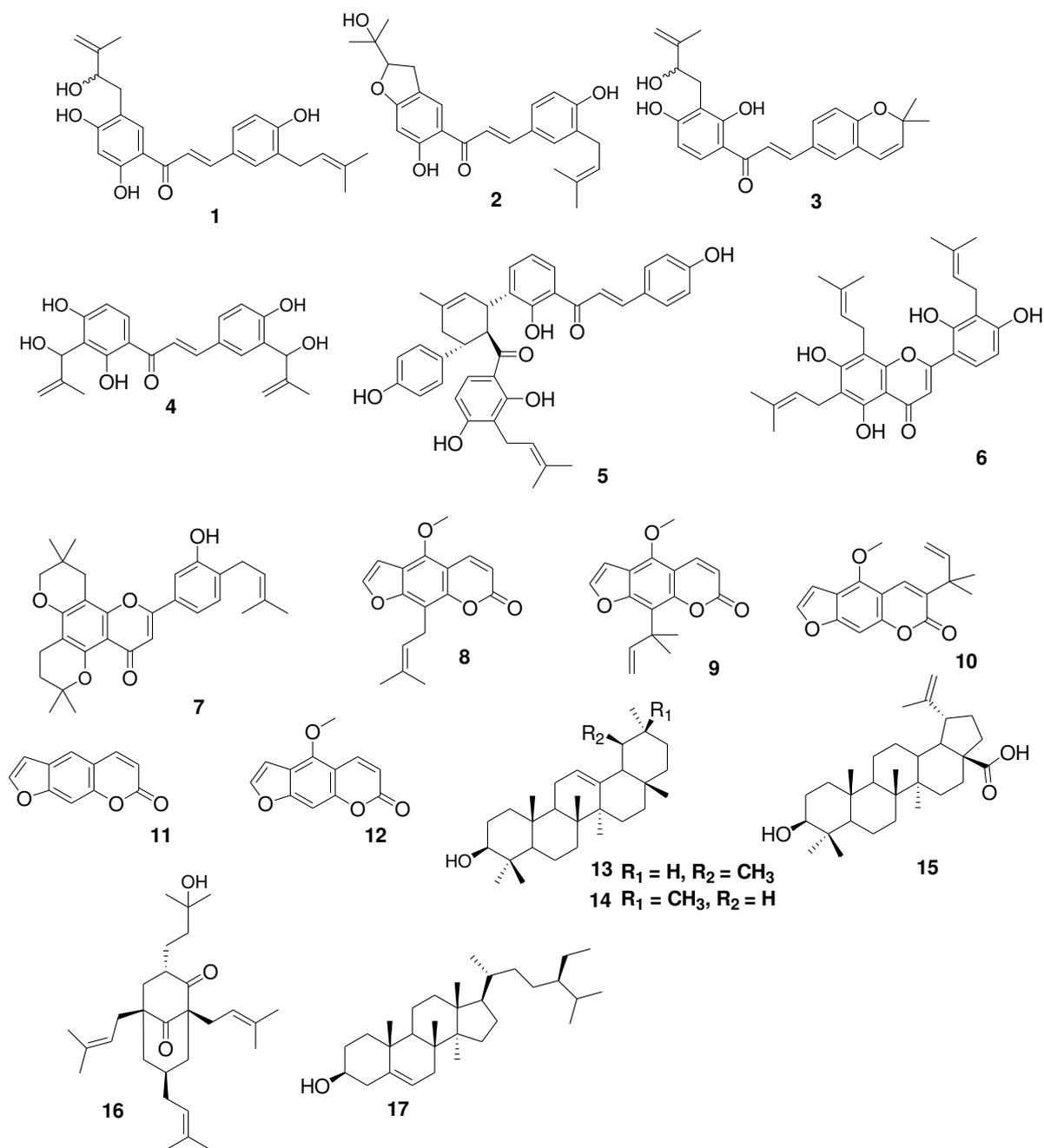


Figura 1.3. Estructuras de los compuestos mencionados en la Tabla 1.5.

1.1.12 *Dorstenia contrajerva* L.

Dorstenia contrajerva L. es una hierba nativa en los matorrales húmedos y bosques encontrados desde el sur de México hasta Venezuela y Perú. También se encuentra difundida, en menor cantidad, en las Antillas nortes de Puerto Rico, en Guatemala, Panamá y Costa Rica (Terreaux *et al.*, 1995; Caceres *et al.*, 2001; House *et al.*, 2007).

En los países de Centroamérica (incluye países como México, Guatemala y Panamá), como parte de los conocimientos y prácticas de la medicina tradicional, se acostumbra usar extractos acuosos de la planta entera o el rizoma como febrífugo, emenagogo y contra el resfriado, el dolor muscular, mordeduras de serpientes y problemas gastrointestinales diversos (Grijelva-Pineda, 2005; Cáceres *et al.*, 2001; Heinrich, 2000).

La altura de las hierbas es normalmente de 30 cm, aunque llegan a medir hasta 45 cm. Los tallos son cortos y las plantas a menudo aparecen casi sin tallo; las hojas y los tallos son jugosos. Pecíolos de 7-25 cm de largo; hojas dispuestas en espiral muy variables en forma y tamaño, comúnmente son pinnatífidas, basifijas, 8-24 cm de largo, 9-20 cm de ancho, discretamente puberulentas, acuminado lobuladas, a menudo contraídas hacia la base, la base truncada de hojas cordadas. Inflorescencias: pedúnculo 7-25 cm; receptáculo plano, curvo u ondulado, cuadrangular o lobulado, a cuadrados. Drupas algo globosas. Rizoma espeso, oloroso, nudoso, con raicillas finas. Semillas de color amarillento, expulsadas de forma explosiva (Croat, 1978; House *et al.*, 2007).

Tabla 1.7. Taxonomía de *Dorstenia contrajerva* L.

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Moraceae
Género	<i>Dorstenia</i> L.
Especie	<i>Dorstenia contrajerva</i> L.

Fuente: ITIS, 2004.

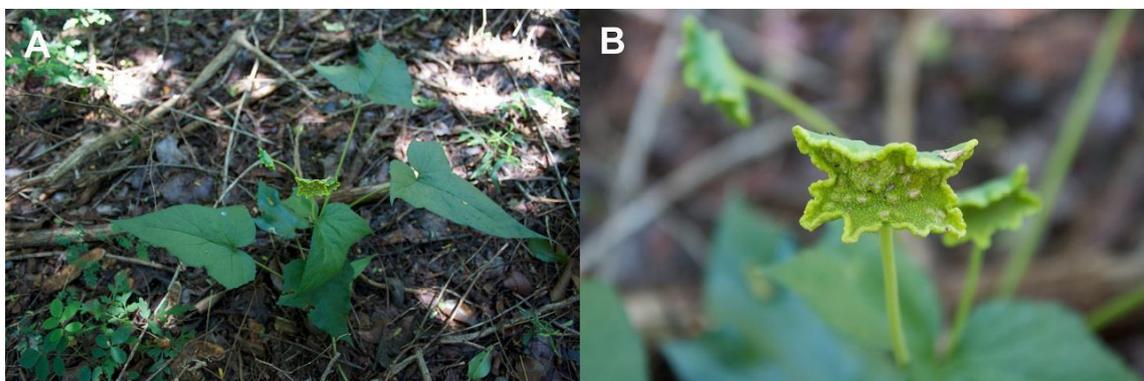


Figura 1.4. *D. contrajerva* L., A) planta completa, B) inflorescencia (Peraza-Flores, 2012).

1.1.13 Actividad biológica de *Dorstenia contrajerva*

Describiendo sus propiedades curativas, se han aislado proteínas antivirales, como la contrajaverina, con un tamaño de 5 kDa, que demostró poseer actividad *in vitro* contra el VIH y reducir el efecto citopático en linfocitos CD4⁺ (Bokesch *et al.*, 2004). Del extracto diclorometánico se observó leve actividad larvicida contra *Aedes aegypti* y actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* (Terreaux *et al.*, 1995). De los extractos metanólicos de la planta entera se ha reportado actividad contra *Giardia lamblia* con $CI_{50} = 34.3 \mu\text{g/mL}$ (Peraza-Sánchez *et al.*, 2005) y contra *L. mexicana* con una CI_{50} de $23.0 \mu\text{g/mL}$ (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007). Empleando sólo las partes aéreas, se observó que el extracto posee un CI_{50} de $47.1 \mu\text{g/mL}$ contra *Entamoeba histolytica* y contra *Giardia lamblia* tuvo una $CI_{50} = 23.3 \mu\text{g/mL}$ (Calzada *et al.*, 2006).

En un bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* (Medrano Nahuat, 2014) se demostró que el extracto metanólico de *D. contrajerva* fue activo con una $CI_{50} = 30.29 \mu\text{g/mL}$. Las fracciones de la partición hexánica, diclorometánica, acetato de etilo y acuosa inhibieron el crecimiento de los promastigotes en 88.8, 60.5, 49.4 y 30.0%, respectivamente, presentando la fracción hexánica la mejor actividad, la cual resultó con una $CI_{50} = 5.92 \mu\text{g/mL}$, lo cual confirma los resultados obtenidos por Peraza-Sánchez *et al.* (2007) con esta especie. El extracto metanólico resultó activo y la partición hexánica es altamente activa, según el criterio de Camacho *et al.* (2003).

En otro estudio se comprobó que el extracto metanólico del rizoma dio actividad en promedio con una $CI_{50} < 36 \mu\text{g/mL}$, en agentes causales como *L. tropica* y *L. aethiopica*, responsables de la leishmaniosis cutánea del Viejo Mundo (Getti *et al.*, 2009). Mientras que un extracto acuoso de las partes aéreas fue evaluado en un ensayo de inhibición de la secreción intestinal con la toxina del cólera en roedores con una dosis de 300 mg/Kg, presentó una inhibición del 44.8% siendo mejor resultado que el control positivo, loperamida, que tuvo una inhibición del 43.3% (Velázquez *et al.*, 2006).

También se ha reportado del extracto etanólico del rizoma de *D. contrajerva* actividad inmunomoduladora con capacidad de inhibir la vía clásica del sistema de complemento, parte del sistema de inmunidad humoral innata, con un $CI_{50} = 12.5 \mu\text{g/mL}$ (Castillo *et al.*, 2005).

1.1.14 Metabolitos secundarios aislados de *Dorstenia contraerva*

El primer compuesto reportado en la especie fue el cardenólido syriogenín (**A**), proveniente de las raíces (Casagrande *et al.*, 1974). El grupo más amplio de moléculas aisladas en la especie son las furanocumarinas. Las primeras en obtenerse fueron de la planta entera: bergapteno (**B**) y dorstenina (**C**) (Terreaux *et al.*, 1995).

A partir de un extracto de cloroformo del rizoma, se obtuvo el dorsteniol (**D**) y además se aisló bergapteno de nuevo (Tovar-Miranda *et al.*, 1998). Mientras que de las partes aéreas se encontró: L-ramnopiranosil-1,6-D-glucopiranosil-bergaptenol (**E**), dorstenina (**C**), bergaptol (**F**), catequina y epicatequina (**G**) (Cáceres *et al.*, 2001).

En un trabajo previo realizado en la Unidad de Biotecnología del CICY (Medrano Nahuat, 2014) se encontró en la fracción hexánica del rizoma de *D. contraerva* el psoraleno (**H**), el 1-O-linolenil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol (**I**) y γ-sitosterol (**J**) (Figura 1.6).

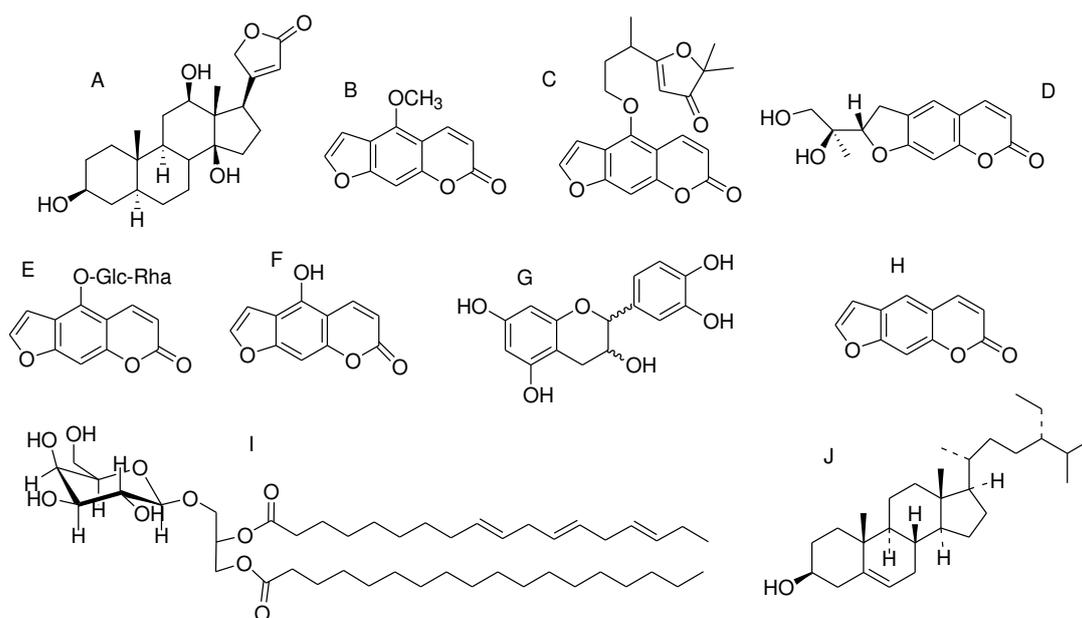


Figura 1.6. Metabolitos secundarios aislados de *Dorstenia contraerva* L.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Aislar moléculas con actividad biocida contra *Leishmania mexicana* a partir de la fracción diclorometánica proveniente del extracto metanólico del rizoma de *Dorstenia contrajerva* L. a través de un enfoque biodirigido.

1.2.2. Objetivos específicos

- Emplear distintas técnicas cromatográficas para purificar la fracción diclorometánica proveniente del extracto metanólico del rizoma de *Dorstenia contrajerva*, con el fin de aislar los metabolitos puros.
- Probar las distintas fracciones en el bioensayo *in vitro* de inhibición del crecimiento contra *Leishmania mexicana* para obtener sus porcentajes de inhibición.
- Elucidar por métodos espectroscópicos las estructuras de las moléculas puras obtenidas de la fracción diclorometánica del extracto metanólico del rizoma de *D. contrajerva*.
- Someter al bioensayo de inhibición de crecimiento de *Leishmania mexicana* los metabolitos puros obtenidos de la fracción diclorometánica obtenida del extracto metanólico del rizoma de *Dorstenia contrajerva* para obtener sus CI_{50} .

1.3. HIPÓTESIS

La fracción diclorometánica activa tiene metabolitos secundarios responsables de su actividad leishmanicida.

1.4. JUSTIFICACIÓN

La leishmaniosis es un complejo de enfermedades con distintas manifestaciones clínicas. Esta enfermedad es endémica en países tropicales, los cuales también se encuentran en vías de desarrollo y presentan millones de habitantes en situación de extrema pobreza en zonas rurales, donde son vulnerables de ser infectados por especies del género *Leishmania*, a través de la picadura de mosquitos infectados con el parásito. Hoy en día, son millones de personas las que cada año son infectadas, produciéndose múltiples complicaciones desde úlceras, mutilaciones de apéndices y extremidades, hasta letalidad.

El tratamiento actual contra la leishmaniosis presenta una serie de problemas. Entre ellos, que puede resultar altamente ineficiente por patógenos resistentes, es muy prolongado, difícil de adquirir o de administrar y, a veces, es muy costoso. El problema más grave y común es la multiplicidad de reacciones adversas y la toxicidad del tratamiento. Por ello, la búsqueda de nuevos leishmanicidas es una necesidad y es importante innovar e investigar en esta área.

La búsqueda de metabolitos activos en plantas medicinales es una vía importante para el desarrollo de moléculas activas, cuya investigación nos brinda nuevas opciones quimioterapéuticas contra enfermedades difíciles de tratar como la leishmaniosis. En México, la principal manifestación de leishmaniosis es la LCL, causada por *L. mexicana*, por lo cual se probarán las fracciones y los metabolitos activos contra *L. mexicana* en un bioensayo estandarizado y publicado previamente.

El rizoma de la especie *Dorstenia contrajerva*, una planta medicinal maya, ha demostrado poseer alta actividad antiprotozoaria, partiendo de un extracto metanólico. Las fracciones activas resultantes de la partición cromatográfica del extracto metanólico fueron la hexánica y la diclorometánica, y hasta la fecha no se ha trabajado con la fracción diclorometánica. Por lo anterior, se plantea investigar la fracción diclorometánica, con el fin de obtener compuestos o estructuras novedosas con actividad leishmanicida, que sirvan de base para desarrollar nuevos fármacos leishmanicidas.

CAPÍTULO II. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS DE *DORSTENIA CONTRAJERVA*

2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo, que forma parte del artículo *Metabolites isolated from the rhizomes of Dorstenia contrajerva with anti-leishmanial activity* y que fue aceptado en la revista *Phytochemistry Letters* (Anexo 1), se describe el estudio fitoquímico realizado sobre el rizoma de *Dorstenia contrajerva*.

Una investigación fitoquímica consiste en el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de un extracto o fracción de una especie vegetal biológicamente activa. Los métodos para realizar estos estudios consisten tradicionalmente en la obtención de la muestra vegetal, la preparación adecuada de la muestra vegetal para su extracción, es decir, el secado y la molienda, la extracción *per se*, una partición cromatográfica, cuyo fin es obtener fracciones de polaridad creciente, purificar los metabolitos secundarios a partir de las fracciones por técnicas cromatográficas y, finalmente, aplicar métodos espectroscópicos para la elucidación estructural e identificación de los metabolitos secundarios aislados.

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 y de las fracciones se llevó a cabo en un evaporador rotatorio Büchi (Re 111) con baño María a 40 °C, hasta reducir a un volumen mínimo.

En la metodología de fraccionamiento de los extractos se emplearon diferentes técnicas cromatográficas: cromatografía líquida al vacío (CLV), cromatografía de columna por gravedad (CCG), cromatografía por gravedad de exclusión de tamaño con Sephadex LH-20 (CET), 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 ultravioleta (UV) de onda corta (254 nm) y onda larga (365

nm) y las placas se revelaron impregnándolas con una disolución de ácido fosfomolibdico (4% de ácido fosfomolibdico y trazas de sulfato cérico en H₂SO₄ al 5%) y posterior calentamiento.

También para la visualización de las placas de CCD se empleó óleum (mezcla de 20:4:1 de ácido acético/agua/ácido sulfúrico con vainillina al 1%), el cual genera un rango de colores al calentar las placas.

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

Cromatografía de líquidos de alta eficiencia semipreparativa (CLAE semipreparativo)

Se empleó un equipo de Agilent Technologies 1260 con una columna C-18, de 10 mm de diámetro por 250 mm de largo. La mezcla de disolventes empleados fue H₂O: acetonitrilo (1:1) los primeros 30 minutos, con una rampa de acetonitrilo al 100% a los 31 minutos hasta el minutos 33, descendiendo al minuto 34 a 1:1 y terminando al minuto 35 la corrida. Ambos disolventes utilizados fueron grado HPLC, previo a su uso fueron pasados por el filtro Merck Millipore de 0.22 µm y luego en ultrasonido para su desgasificación por 45 minutos.

El agua fue colocada en la bomba A y el acetonitrilo (ACN) en la B, a un flujo de 3 mL/min y registrando un promedio de 133 bar entre corridas. Se inyectó como máximo 3.3 mg de muestra, disuelta previamente en ACN, cada inyección manual fue de 200 µL en promedio a una concentración de 16 mg/mL.

La elucidación estructural y la identificación de las sustancias puras se llevaron a cabo por medio de los siguientes métodos e instrumentos:

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

Los espectros de masas de baja resolución 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 con las condiciones de corrida: 160 °C durante 3 min, una rampa de 10 °C/min hasta 300 °C durante 30 min, velocidad de flujo de 1.5 mL/min y como gas acarreador se empleó helio.

Derivatización para análisis en el CG-EM: Sililación

La sililación se hizo en muestras que no se volatilizan a la temperatura en la que se corren las muestras en el CG-EM, por lo cual se derivatizan sus grupos oxhidrilo a éteres de sililo, compuestos con menor punto de ebullición y así obtener sus espectros de masas. La sililación se llevó a cabo usando 50 μ L de reactivo BSTFA + TMCS, 99:1 (Sigma-Aldrich) más 50 μ L de piridina con un 1 mg de la muestra durante 10 min a 100 °C en placa de calentamiento.

Espectroscopia de UV-Vis

Se realizó en celdas de 1 cm de longitud en un espectrómetro DU-800 Beckman Coulter, empleando metanol grado HPLC como disolvente de las muestras y blanco.

Espectrofotometría de infrarrojo (IR)

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

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- 1 H) y de carbono 13 (RMN- 13 C) y bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC) se obtuvieron en un equipo de 600 MHz Varian en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida.

Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) por impacto electrónico

Equipo GEOL GCmate ubicado en la Facultad de Química-UADY (Mérida, México); se empleó para obtener las masas de los compuestos **8** y **9**. Se empleó la inserción directa a la muestra y el módulo de impacto electrónico.

Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución por ionización electrospray (CL-EMAR)

Equipo localizado en Fundación Medina (Granada, España). Los análisis de cromatografías de líquidos fueron realizados en un equipo Agilent 1200, usando una columna Zorbax SB-C8 (2.1 \times 30 mm), mantenido a una temperatura de 40 °C y con una velocidad de flujo de 300 μ L/min. La metodología es la siguiente: una fase móvil

de gradiente a partir de un disolvente A y B, donde el disolvente A consiste en un 10% de acetonitrilo y 90% de agua con 0.01% de ácido trifluoroacético y 1.3 mM de formiato de amonio, mientras que el disolvente B fue 90% de acetonitrilo y 10% de agua con 0.01% de ácido trifluoroacético y 1.3 mM de formiato de amonio. El gradiente comienza usando un 10% de B, hasta llegar al 100% B en 6 min, y se mantuvo a 100% de B por 2 min y se regresó a un 10% de B por 2 min para iniciar el sistema. Escaneos completos de arreglo de diodos UV desde 100 a 900 nm fueron colectados en cada 0.25 sec/scan.

La adquisición de la espectros de masas fue realizado con un equipo Bruker maXis EMAR-QTOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania) acoplado al cromatógrafo de líquidos previamente descrito. Los espectros de masas que se recolectaron fueron desde 150 m/z a 2,000 m/z en modo positivo. Se usaron 20 μL de las muestras para el análisis por LC-HRMS.

2.2.2. 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 del rizoma. Los rizomas fueron lavados y secados a temperatura ambiente por tres días, después se colocaron en cámaras de secado con temperatura controlada (50 °C) por dos días. Una vez que los rizomas estuvieron completamente secos se pesaron y se molieron, obteniéndose un peso de 6,728.4 g.

2.2.3 Obtención del extracto metanólico y fracciones de la partición

La maceración y la partición se realizaron en una investigación previa en la Unidad de Biotecnología del CICY (Medrano Nahuat, 2014).

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, posteriormente, fue 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. 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: hexano (Hx), diclorometano (DCM) y acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose las fracciones hexánica, diclorometánica, de acetato de etilo y acuosa, respectivamente (DCR-2a – DCR-2d).

2.2.4 CLV de la fracción diclorometánica (DCR-2b)

Se utilizó 25 g de la fracción diclorometánica (DCR-2b) para separar por medio de la técnica de CLV; se utilizó esta técnica debido a que permite fraccionar grandes cantidades de muestra en un menor número de fracciones, empleando una fase móvil de gradiente con polaridad ascendente. Por lo tanto, en un experimento de CLV en cada fracción se obtiene una mezcla de metabolitos con propiedades de polaridad similares. Se utilizó 40 g de gel de sílice tipo CCD, en una columna de 6 cm de altura y 10 cm de diámetro.

Se utilizaron 15 sistemas de disolventes: Hex/An (90:10), Hex/An (85:15), Hex/An (80:20) 2x, Hex/An (75:25), Hex/An (70:30), Hex/An (65:35), Hex/An (60:40), Hex/An (55:45), Hex/An (50:50), Hex/An (45:55), Hex/An (40:60), Hex/An (30:70), Hex/An (20:80) y An/MeOH (90:10). Al final, se reunieron en 13 fracciones por su perfil cromatográfico, nombrándolas como DCRH-3a a DCRH-3m (Figura 2.1).



Figura 2.1. Fracciones obtenidas en el experimento DCRH-3.

Desde la fracción DCHR-3d a la fracción DCHR-3j se observó la formación de un precipitado blanco, el cual se filtró en un embudo al vacío y se pesó, reportándose su peso. Cada fracción se concentró en un evaporador rotatorio a baja presión, y los pesos obtenidos de cada fracción se describen en la Tabla 2.1, junto con el peso del precipitado recuperado.

Tabla 2.1. Peso obtenido de las fracciones y precipitado de DCRH-3.

Fracción DCRH-3	a	b	c	d	e	f	g	h
Peso (g)	0.0131	0.055	0.45	1.19	0.79	3.15	1.46	2.13
Fracción DCRH-3	i	j	k	l	m			
Peso (g)	2.20	5.01	2.12	1.18	1.85			
DCRH-3 ppt.	d1	e1	f1	g1	h1	i1	j1	
Peso (g)	0.31	0.46	0.40	0.92	1.34	1.94	0.11	

ppt.: precipitado.

En las placas cromatográficas (Figura 2.2) se observó, desde la fracción DCHR-3c a la DCHR-3i, la presencia de dos manchas con el mayor R_f del sistema Hx /An (7:3) y que poseían una fluorescencia azul-verdosa. Estas manchas o metabolitos son los metabolitos mayoritarios, incluso están presentes en el precipitado obtenido al realizar la CLV.

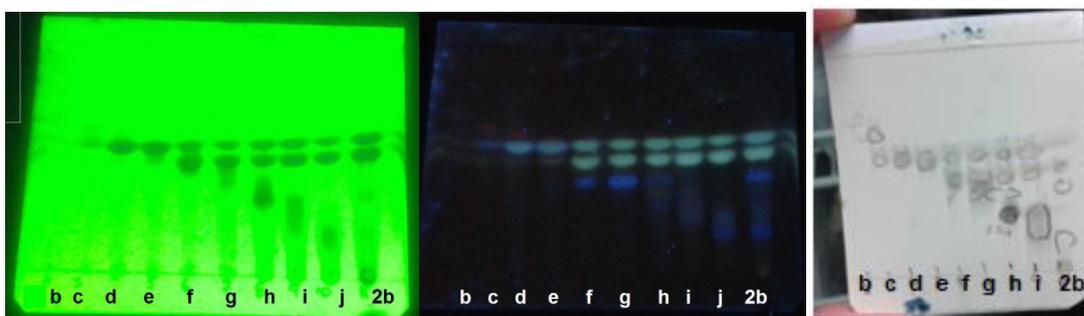


Figura 2.2. De izquierda a derecha: **a)** placa vista bajo luz UV a 254 nm con las fracciones DCHR-3b – DCHR-3j; **b)** placa vista bajo luz UV a 365 nm; **c)** placa revelada con ácido fosfomolibdico.

2.2.5 Aislamiento de metabolitos de la partición diclorometánica

Se aisló un total de nueve metabolitos: compuesto 1 (DCRH-9a1), compuesto 2 (DCRH-9b1), compuesto 3 (DCRH-6c1), compuesto 4 (DCRH-12c1), compuesto 5 (DCRH-22b1), compuesto 6 (DCRH-23d1), compuesto 7 (DCRH-54a1) compuesto 8 (DCRH-55a1), compuesto 9 (DCRH-55d1), una mezcla (DCRH-29c) de dos compuestos, DCRH-29c1 y DCRH-29c2.

2.2.5.1 Aislamiento del compuesto 1 (DCRH-9a1, bergapteno) y compuesto 2 (DCRH-9b1, dorstenina)

Se observó por CCD que los precipitados de las fracciones DCRH-3e hasta DCRH-3j son una mezcla de dos metabolitos, por lo cual se mezclaron las fracciones en una sola con un peso total de 5 g. Se optó por realizar una cromatografía por gravedad con 300 mg de la mezcla, empleando una columna de gel de sílice, de 25 cm de altura y de un diámetro de 2.5 cm de ancho y 3 cm de cabeza. Para ello, se utilizó un sistema de disolventes de polaridad ascendente a partir de Hx/DCM/AcOEt (6:2:2) hasta DCM/AcOEt (1:1) (Figura 2.3). Esta cromatografía se repitió tres veces y se reunió en dos fracciones, obteniéndose dos metabolitos puros, 0.56 g de DCRH-9a1 y 0.346 g de DCRH-9b1 y sus rendimientos a partir del rizoma molido en seco son 0.0034% y 0.021%, respectivamente.

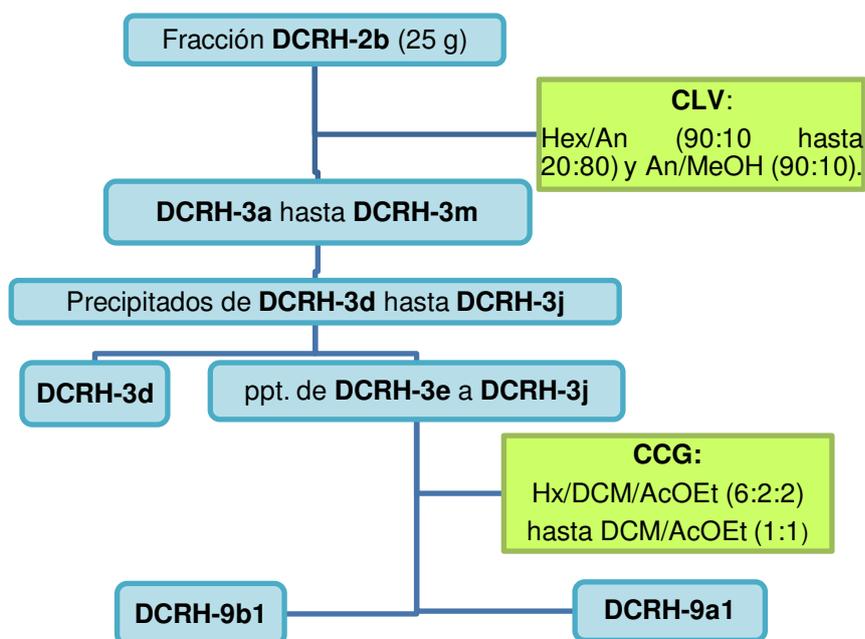


Figura 2.3. Diagrama de flujo del aislamiento de DCRH-9a1 y DCRH-9b1.

Compuesto 1 (DCRH-9a1, bergapteno, Figura 2.4): Sólido en forma de agujas incoloras. **R_f** : 0.5 en tolueno/AcOEt (8:2). **IR:** (ν , cm^{-1}): 3142, 3110, 3090, 1729, 1625, 1498, 1358 y 1123. **EM** (70 eV, m/z): 216 (100), 173 (69), 145 (28), 117 (3), 89 (14) y 51 (10).

Compuesto 2 (DCRH-9b1, dorstenina, Figura 2.4): Sólido en forma de agujas incoloras. **R_f** : 0.3 en sistema de Hx/DCM/MeOH (7:1.7:0.3) 3 \times . **Punto de fusión:**

140.5 -141.5 °C. **IR** (ν , cm^{-1}): 3150, 3125, 2972, 1729, 1704, 1588, 1457, 1356, 1131.

EM (70 eV, m/z): 368 (46), 202.1 (22), 174 (15), 139.1 (100), 111.1 (5) y 69 (18).

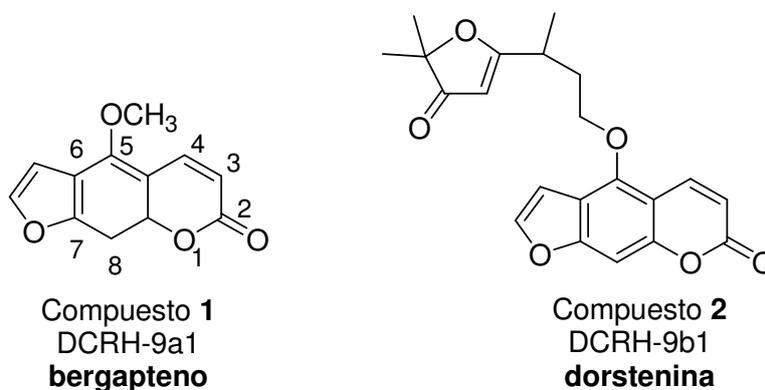


Figura 2.4. Estructura de los compuestos DCRH-9a1 y DCRH-9b1.

2.2.5.2 Aislamiento de metabolitos a partir de la fracción DCRH-3h

Para el fraccionamiento de DCRH-3h se seleccionó la técnica de cromatografía en columna por gravedad, empleando gel de sílice con una altura de la fase estacionaria de 37 cm, un diámetro de 4 cm y 2 g de muestra (DCR-3h), eluyéndose con sistemas de disolventes de polaridad ascendente: 1,200 mL de Hex/An (8:2), 1,200 mL de Hex/An (7:3), 600 mL de Hex/An (6:4), 600 mL de Hex/An (5:5) y 300 mL de An.

Se recolectaron 119 fracciones en tubos de ensayo, cada fracción aproximadamente de 10 mL, las cuales se agruparon según su perfil cromatográfico en 12 fracciones finales desde DCRH-4a hasta DCRH-4l, cuyos pesos están reportados en la Tabla 2.2. A partir de la fracción DCRH-4i (Figura 2.5) se aisló DCRH-12c1, de la fracción DCRH-4j se aislaron tres metabolitos: DCRH-54a1, DCRH-55a1 y DCRH-55d1.

Tabla 2.2. Pesos de las fracciones del experimento DCRH-4.

Fracción	a	b	c	D	e	f
Peso (mg)	130.2	165.6	47.9	60.4	193.4	92.3
Fracción	g	h	i	J	k	l
Peso (mg)	47.3	105.1	150.5	427.8	127.4	104

El aislamiento paso a paso de los metabolitos DCRH-12c1, DCRH-54a1, DCRH-55a1 y DCRH-55d1 se describen en la Figura 2.6. Mientras que de la fracción DCRH-4k se aisló el compuesto DCRH-53a1, descrito en la Figura 2.14.

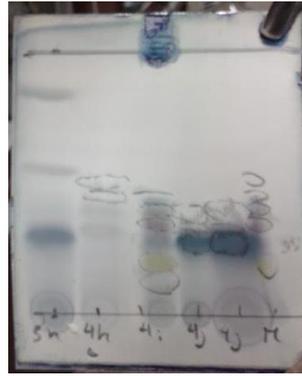


Figura 2.5. CCD revelada en ácido fosfomolibdico de la fracciones DCRH-4h, DCRH-4i y DCRH-4j, en un sistema de Hx/An (7:3, 3x). La mancha amarilla le pertenece al compuesto DCRH-12c1 y la azul oscura a DCRH-6c1.

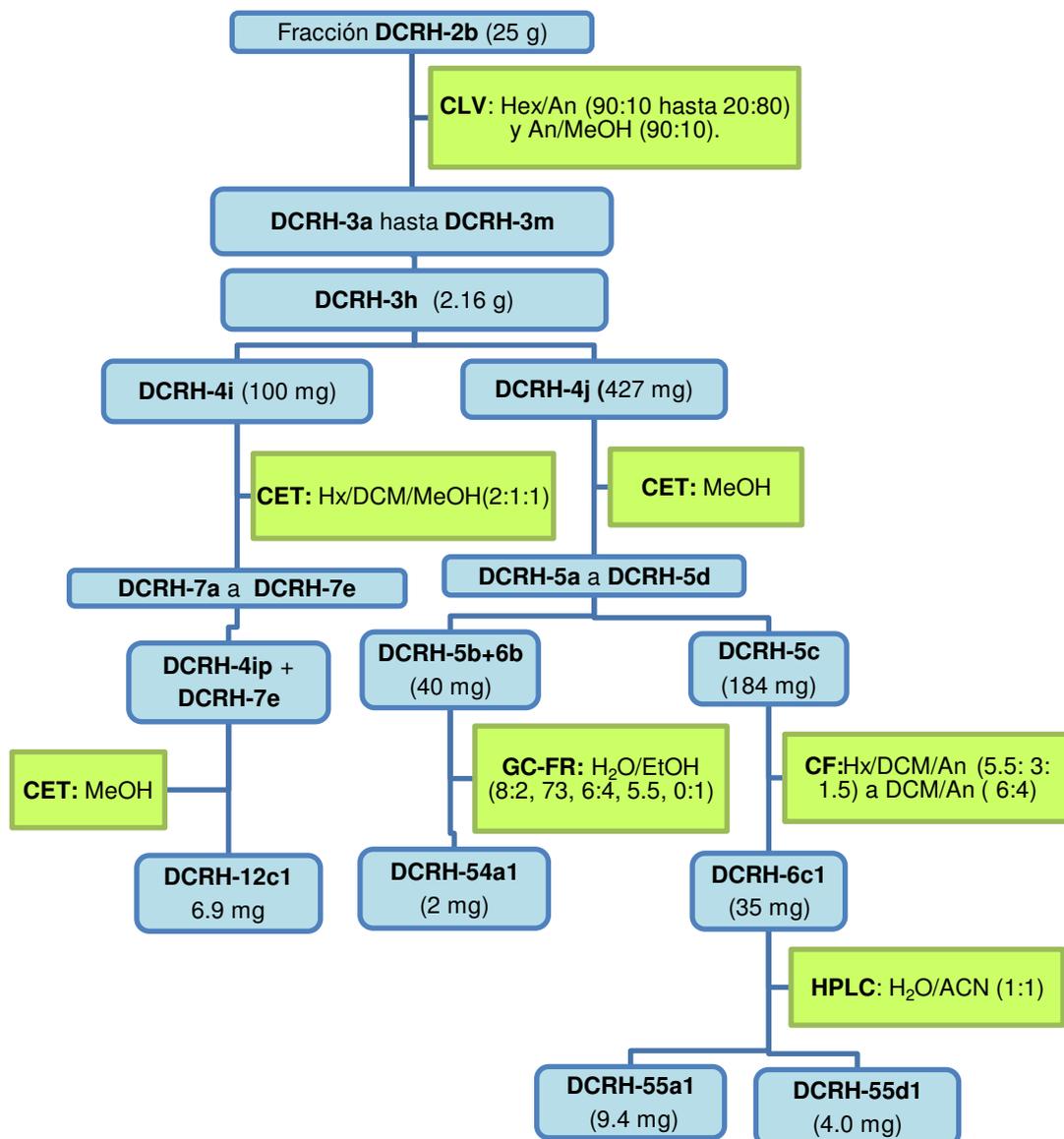


Figura 2.6. Diagrama de aislamiento de los metabolitos de la fracción DCR-3h.

2.2.5.2.1 Aislamiento del compuesto 3 (DCRH-12c1, cicloartocarpesina)

Se utilizaron 80 mg de muestra de la fracción DCRH-4i en una columna de gravedad con Sephadex LH-20 como fase estacionaria, con una altura del soporte de 40 cm de longitud y un cm de diámetro, con una fase móvil de Hx/DCM/MeOH (2:1:1); se colectaron 16 fracciones, las cuales por similitud se juntaron en cinco fracciones finales nombradas DCRH-7a a DCRH-7e. También se obtuvo un precipitado el cual se conservó y se nombró DCRH-4ip (5 mg).

En la fracción DCRH-7e se observó la presencia de una mancha amarilla, tanto en luz visible como en óleoum y ácido fosfomolibdico, lo cual es característico de un metabolito del grupo de los flavonoides; esta misma mancha se observó en la fracción DCRH-4ip. Se juntaron las fracciones DCRH-7e y DCRH-4ip y la mezcla resultante de 17 mg se purificó empleando una columna de gravedad con Sephadex LH-20 como fase estacionaria, con una altura del soporte de 15 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro, con una fase móvil de metanol. Se recolectaron 11 fracciones, las cuales se juntaron en cuatro fracciones finales que fueron nombradas como DCRH-12a a DCRH-12d.

La fracción DCRH-12c se observó pura en CCD por lo cual se nombró como DCRH-12c1. El peso total del metabolito fue 6.9 mg con un rendimiento a partir del rizoma seco de 0.0042%.

Compuesto 3 (DCRH-12c1, cicloartocarpesina, Figura 2.7): Sólido amarillo en forma de agujas. **Rf:** 0.3 en Hx/DCM/MeOH (3:1.2:0.3, 3x). **IR** (ν , cm^{-1}): 3500-3100, 2972, 2925, 2851, 1662, 1608, 1556, 1477, 1165 y 1135. **RMN-¹H** (600 MHz, acetona- d_6) δ 13.44 (1H, s), 7.72 (1H, dd, $J = 8.7, 2.9$ Hz, H-6'), 7.00 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-3), 6.53 (dd, $J = 10.0, 2.6$ Hz, H-1''), 6.49 (1H, s), 6.42 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz, H-5'), 6.32 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-8), 5.61 (1H, dd, $J = 10.0, 2.8$ Hz, H-2'') y 1.34 (6H, s, H-4'' y H-5''). **RMN-¹³C** (150 MHz, acetona- d_6): δ 182.7 (s, C-4), 162.4 (s, C-1), 161.6 (s, C-2'), 159.0 (s, C-7), 158.7 (s, C-4), 157.0 (s, C-8a), 156.7 (s, C-5), 130.9 (d, C-6'), 129.1 (d, C-2''), 114.9 (d, C-1''), 110.5 (s, C-1'), 109.0 (d, C-5'), 108.4 (d, C-3), 104.8 (s, C-6 y C-4a), 104.3 (d, C-3'), 95.4 (d, C-8), 77.7 (s, C-3''), 27.5 (c, C-4'' y C-5''). **EM-AR** (IES, m/z): 353.1021 ($[M + H]^+$), calculado para $C_{20}H_{16}O_6$, m/z 352.0892.

2.2.5.2.2 Aislamiento del compuesto 7 (DCRH-54a1, xanthoarnol)

Se utilizó 427 mg de la fracción DCRH-4j en una columna de gravedad con fase estacionaria de Sephadex LH-20 en metanol al 100%, con una altura de 50 cm de largo y 1 cm de diámetro. Se obtuvieron un total de 11 fracciones y se agruparon por su similitud cromatográfica con base en CCD en 4 fracciones nombradas DCRH-5a – DCRH-5d. Esta columna se repitió una vez más.

Se continuó el proceso de aislamiento con la fracción DCRH-5b, con un peso de 184 mg y se decidió fraccionarla utilizando la técnica cromatográfica flash, ajustando el primer sistema de disolventes elegido para la elución a partir de una mancha con una *R_f* de 0.33 en Hx/DCM/AcOEt (5:3.5:1.5), y se continuó la elución aumentando la polaridad gradualmente hasta llegar a DCM/An (6:4). Al finalizar, se obtuvieron 23 fracciones que se juntaron en cuatro fracciones finales, DCRH-6a – DCRH-6d, por su similitud cromatográfica.

Se observó en CCD de fase reversa similitud en las fracciones DCRH-5b y DCRH-6b, por lo cual se unieron dando un total de 40 mg, y se introdujo la mezcla a una columna de cromatografía tipo flash, de 1 cm de diámetro y 30 cm de largo, con gel de sílice de fase reversa C-18 como soporte.

La fracción DCRH-54a1 resultó ser un compuesto puro por CCD, con una fluorescencia en luz UV de 254 y 365 nm de tipo cumarina. El peso total del metabolito fue 2 mg con un rendimiento a partir del rizoma seco de 0.00012%.

Compuesto 7 (DCRH-54a1, xanthoarnol, Figura 2.7): Sólido café. **R_f**: 0.42 en Hx/An (3:1, 3×). **RMN-¹H** (600 MHz, CDCl₃): δ: 7.61 (1H, s, H-4), 6.84 (1H, s), 6.24 (1H, d, *J* = 9.1, H-9), 7.91 (1H, d, *J* = 9.3, H-10), 5.40 (1H, d, *J* = 4.1, H-2), 4.40 (1H, d, *J* = 4.1, H-3), 1.50 (3H, s, H-2') y 1.45 (3H, s, H-1''). **RMN-¹³C** (150 MHz, metanol-*d*₄): δ: 164.6 (s, C-7a), 163.2 (s, C-8), 156.8 (s, C-6), 146.2 (d, C-10), 129.8 (s, C-3a), 126.6 (d, C-4), 114.7 (s, C-5), 112.8 (d, C-9), 99.1 (d, C-7), 93.3 (d, C-2), 72.1 (t, C-3), 73.1 (s, C-1'), 25.9 (t, C-2') y 25.3 (q, C-1''). **CG-EM** (sililado, IE, 70 eV, *m/z*): 406 (1), 391 (3), 348 (15), 301 (6), 259 (100), 186 (13), 147 (18), 131 (85) y 73 (80). C₁₄H₁₄O₅.

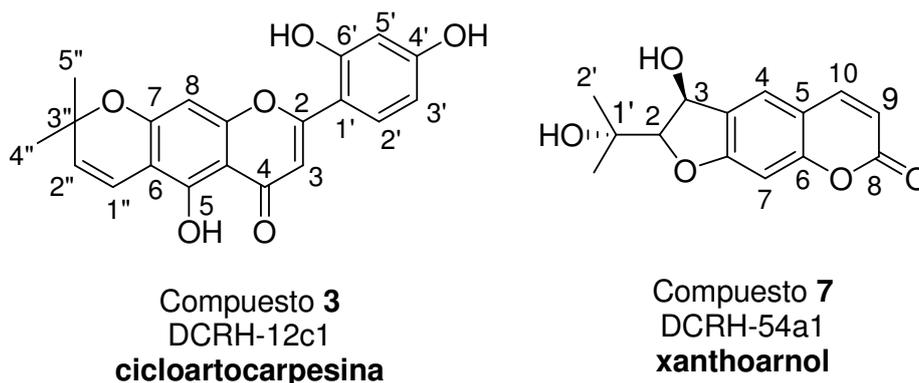


Figura 2.7. Estructura de los compuestos DCRH-12c1 y DCRH-54a1.

2.2.5.2.3 Aislamiento del compuesto 8 (DCRH-55a1, dorsjervin A) y compuesto 9 (DCRH-55d1, dorsjervin B)

Al analizar la fracción DCRH-6c se observó sólo un compuesto por CCD, con un total de 35 mg. Sin embargo, al observar el experimento de RMN se detectó la presencia de dos compuestos similares estructuralmente de tipo 2-bencil-benzofurano, con una relación 3:1. Se decidió separar la fracción por CLAE semipreparativa con la metodología previamente descrita. Al finalizar las corridas se concentró *in vacuo* cuatro fracciones: DCRH-55a1 (dorsjervin A, 9.4 mg), DCRH-55b1 (bergapteno 1.3 mg), DCRH-55c1 (psoraleno, 1.2 mg) y DCRH-55d1 (dorsjervin B, 5.0 mg).

Los rendimientos de DCRH-55a1 y DCRH-55d1 a partir del rizoma seco fueron de 0.00059% y 0.00024%, respectivamente.

Compuesto 8 (DCRH-55a1, dorsjervin A, Figura 2.8): sólido amorfo rojo. **UV** (metanol, $\lambda_{\text{máx}}$, nm, log ϵ): 251(4.49), 289 (4.33), 365 (4.21). **IR** ($\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3600-3100, 2922, 1608, 1519, 1447, 1357, 1284, 1190, 1096, 958, 857. **RMN-¹H** (600 MHz, DMSO- d_6): δ 6.75 (1H, s, H-7), 6.31 (1H, s, H-3), 6.64 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5'), 6.63 (2H, s, H-2'), 6.52 (1H, d, $J = 8$ Hz, H-6'), 5.20 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-2''), 3.85 (2H, s, H-2¹), 3.69 (3H, d, $J = 1.3$ Hz, 6-OCH₃), 3.40 (2H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 1.60 (3H, s, H-4'') y 1.71 (3H, s, H-5''). **RMN-¹³C** (150 MHz, DMSO- d_6): δ 158.1 (s, C-2), 146.6 (s, C-4), 146.6 (s, C-7a), 145.1 (s, C-3'), 143.8 (s, C-4'), 142.8 (s, C-6), 131.2 (s, C-3''), 128.3 (s, C-1'), 123.4 (s, C-3a), 122.1 (s, C-2''), 119.3 (d, C-6'), 117.9 (s, C-5), 116.0 (d, C-2'), 115.4 (d, C-5'), 103.4 (d, C-7), 102.6 (d, C-3), 60.3 (c, 6-OCH₃), 33.5 (t, C-2¹), 25.4 (c, C-4''), 23.1 (t, C-1''), 17.9 (c, C-5''). **EM** (IE, 70 eV, m/z): 410 (10), 354 (100), 338 (10), 323 (10), 123 (60), 297 (7), 269 (7), 163 (12), 77 (5). **EM-AR** (IE, m/z): 354.1467 ([M]⁺) (calculado para C₂₁H₂₂O₅, m/z 354.1467).

Compuesto 9 (DCRH-55d1, dorsjervin B, Figura 2.8): sólido amorfo rojo. **UV** (metanol, $\lambda_{\text{máx}}$, nm, log ϵ): 251(4.49), 289 (4.33), 365 (4.21). **IR** (KBr, $\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3600-3100, 2922, 1605, 1492, 1447, 1101, 1287, 1062, 1012, 953, 859. **RMN-¹H** (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.78 (1H, s, H-7), 6.64 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5'), 6.62 (1H, s, H-2'), 6.51 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6'), 6.38 (1H, s, H-3), 5.16 (1H, tt, $J = 7.3, 1.5$ Hz, H-2''), 3.84 (3H, s, 4-OCH₃), 3.84 (2H, s, H-2¹), 3.39 (2H, d, $J = 7.3$, H-1''), 1.74 (3H, s, H-5'') y 1.64 (3H, s, H-4''). **RMN-¹³C** (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ 156.2 (s, C-2), 150.4 (d, C-4), 147.7 (s, C-7a), 145.1 (s, C-3'), 143.8 (s, C-4'), 142.2 (s, C-6), 131.2 (s, C-3''), 130.7 (s, C-1'), 125.4 (s, C-3a), 122.0 (d, C-2''), 119.5 (s, C-5), 119.3 (d, C-6'), 115.9 (d, C-2'), 115.5 (d, C-5'), 101.7 (d, C-7), 96.4 (d, C-3), 60.2 (c, 4-OCH₃), 33.3 (t, C-2¹), 26.0 (c, C-4''), 25.4 (t, C-1'') y 17.7 (c, C-5''). **EM** (IE, 70 eV, m/z): 410 (10), 354 (100), 338 (10), 323 (30), 123 (66), 298 (7), 269 (7), 179 (9) y 69 (5). **EM-AR** (IE, m/z): 354.1466 ([M]⁺) (calculado para C₂₁H₂₂O₅, m/z 354.1467).

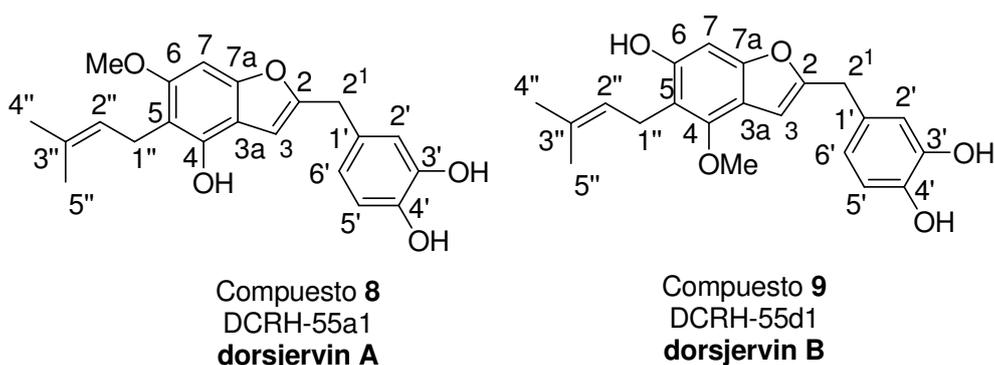


Figura 2.8. Estructura de los compuestos DCRH-55a1 y DCRH-55d1.

2.2.5.2.4 Aislamiento de la mezcla del compuesto 10 (DCR-29c1) y compuesto 11 (DCRH-29c2)

Se utilizaron los 105 mg de la fracción DCRH-4h en un experimento de cromatografía de gravedad en columna, empleando Sephadex LH-20 en un sistema de Hx/DCM/MeOH (2:1:1), y juntando las fracciones en un total de cinco fracciones en total.

Se tomó todos los 26 mg de la fracción DCRH-24c, y se realizó una columna de gravedad con gel de sílice como fase estacionaria, con una fase móvil de gradiente iniciando con DCM/An (9:1) hasta An/MeOH (8:2).

Las reacciones obtenidas se reunieron en cinco fracciones finales por su perfil cromatográfico, de las cuales la fracción DCRH-26c se pasó a columna de cromatografía Sephadex LH-20 con fase móvil de MeOH, obteniéndose al final tres fracciones, donde la fracción DCRH-29c se observó pura en CCD, con un total de 7 mg de peso (Figura 2.9). Sin embargo, análisis por espectroscopía de RMN se observó dos compuestos estructuralmente similares en proporción 55:45.

Compuesto 10 (DCRH-29c1, Figura 2.10): sólido rojo. **Rf**: 0.2 en Hx/DCM/AcOEt (6.5:2.5:1.5, 4x). **IR** (ν , cm^{-1}): 3352, 2977, 2925, 1637, 1628, 1459, 1375, 1309, 1158 y 1114. **RMN-¹H** (600 MHz, metanol- d_4) δ : 5.61 (1H, s, H-3), 5.90 (1H, s, H-8), 6.32 (1H, m, H-3'), 6.36 (1H, m, H-5'), 7.25 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6'), 6.57 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-1''), 5.56 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-3''), 1.71-1.69 (m, 3H, H-4'') y 1.71-1.69 (m, 3H, H-5''). **RMN-¹³C** (150 MHz, metanol- d_4) δ : 164.7 (s, C-2), 76.0 (d, C-3), 198.9 (s, C-4), 159.1 (s, C-5), 103.8 (s, C-6), 163.1 (s, C-7), 96.8 (d, C-8), 103.7 (s, C-4a), 164.7 (s, C-8a), 117.6 (s, C-1'), 159.8 (s, C-2'), 103.4 (d, C-3'), 156.8 (s, C-4'), 107.7 (d, C-5'), 128.8 (d, C-6'), 116.1 (d, C-1''), 127.3 (d, C-2''), 79.1 (s, C-3''), 28.6 (c, C-4'') y 28.5 (c, C-5''). **EM-AR** (ESI): m/z 354.1094 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$.

Compuesto 11 (DCRH-29c2, Figura 2.10): sólido rojo. **Rf**: 0.2 en Hx/DCM/AcOEt (6.5:2.5:1.5, x4). **IR** (ν , cm^{-1}): 3352, 2977, 2925, 1637, 1628, 1459, 1375, 1309, 1158 y 1114. **RMN-¹H** (600 MHz, metanol- d_4) δ : 5.63 (1H, s, H-3), 5.86 (1H, s, H-8), 6.32 (1H, m, H-3'), 6.36 (1H, m, H-5'), 7.23 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6'), 6.51 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-1''), 5.53 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-2''), 1.71-1.69 (m, 3H, H-4'') y 1.71-1.69 (m, 3H, H-5''). **RMN-¹³C** (150 MHz, metanol- d_4) δ : 164.8 (s, C-2), 76.1 (d, C-3), 199.9 (s, C-4), 159.4 (s, C-5), 103.7 (s, C-6), 162.9 (s, C-7), 97.9 (d, C-8), 103.1 (s, C-4a), 164.8 (s, C-8a),

117.6 (s, C-1'), 156.8 (s, C-2'), 103.4 (d, C-3'), 159.8 (s, C-4'), 107.7 (d, C-5'), 128.7 (d, C-6'), 116.1 (d, C-1''), 127.4 (d, C-2''), 79.1 (s, C-3''), 27.2 (c, C-4''), 26.9 (c, C-4''). **EM-AR** (ESI); m/z 354.1094, $C_{20}H_{18}O_6$.

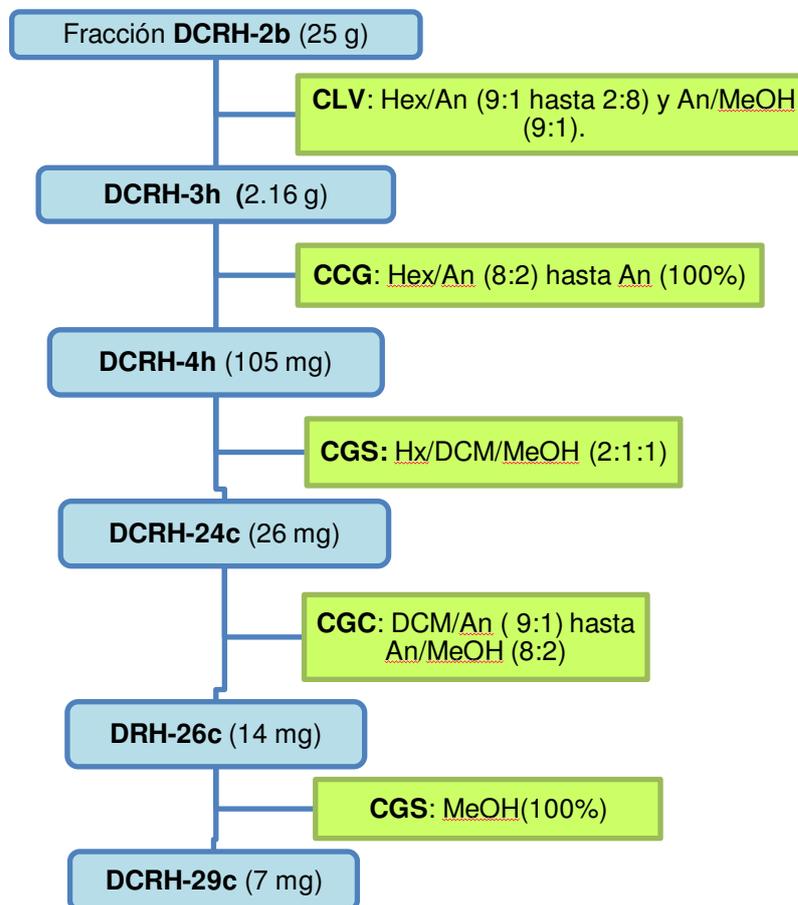


Figura 2.9. Diagrama del aislamiento de la fracción DCRH-29c.

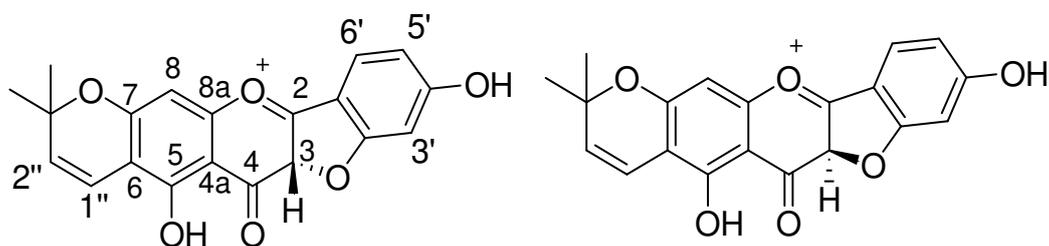


Figura 2.10. Estructuras propuestas de los flavonoides DCRH-29c1 y DCRH-29c2.

2.2.5.3 Aislamiento de compuestos en la fracción DCRH-3c

2.2.5.3.1. Aislamiento del compuesto 4 (DCRH-22b1, γ -sitosterol)

Se utilizó 410 mg de la fracción DCRH-3c en una columna de gravedad de gel de sílice con una fase móvil isocrática de Hx/AcOEt (8:2). Se recolectaron un total de 76 fracciones de 4 mL, las cuales se reunieron por su perfil cromatográfico en un total de seis fracciones: DCRH-19a (36.2 mg), DCRH-19b (20.5 mg), DCRH-19c (13 mg), DCRH-19d (64 mg), DCRH-19e (40 mg) y DCRH-19f (50 mg). Estas fracciones de DCRH-3c son bastantes complejas como se puede apreciar en la Figura 2.11.



Figura 2.11. CCD de las fracciones DCRH-19a a DCRH-19f en un sistema de Hx/AcOEt (8.5:1.5) de izquierda a derecha, en el último carril se aplicó la referencia (R). Revelada con óleum.

Con la fracción DCRH-19d (64 mg) se continuó el proceso de aislamiento empleando una cromatografía de gravedad empleando Sephadex LH-20 en Hx/DCM/MeOH (2:1:1) de 35 cm de alto y 1 cm de ancho, posteriormente reuniendo en una misma fracción aquellas que tienen un perfil cromatográfico similar, dando a origen a DCRH-22b1 (compuesto 4) (Figura 2.12). El rendimiento a partir del rizoma seco es de 0.0013%.

Compuesto 4 (DCRH-22b1, γ -sitosterol, Figura 2.13): Sólido blanco. **Rf:** 0.35, en Hx/AcOEt (8.5:1.5). **IR** (ν , cm^{-1}): 3414, 2957, 2853, 1736, 1467, 1378, 1240, 1175 y 1057. **EM** (m/z): 414 (100), 361 (55), 354 (13), 329 (65), 303 (56), 255 (50), 213 (55), 145 (56), 105 (56), 81(51) y 55 (53).

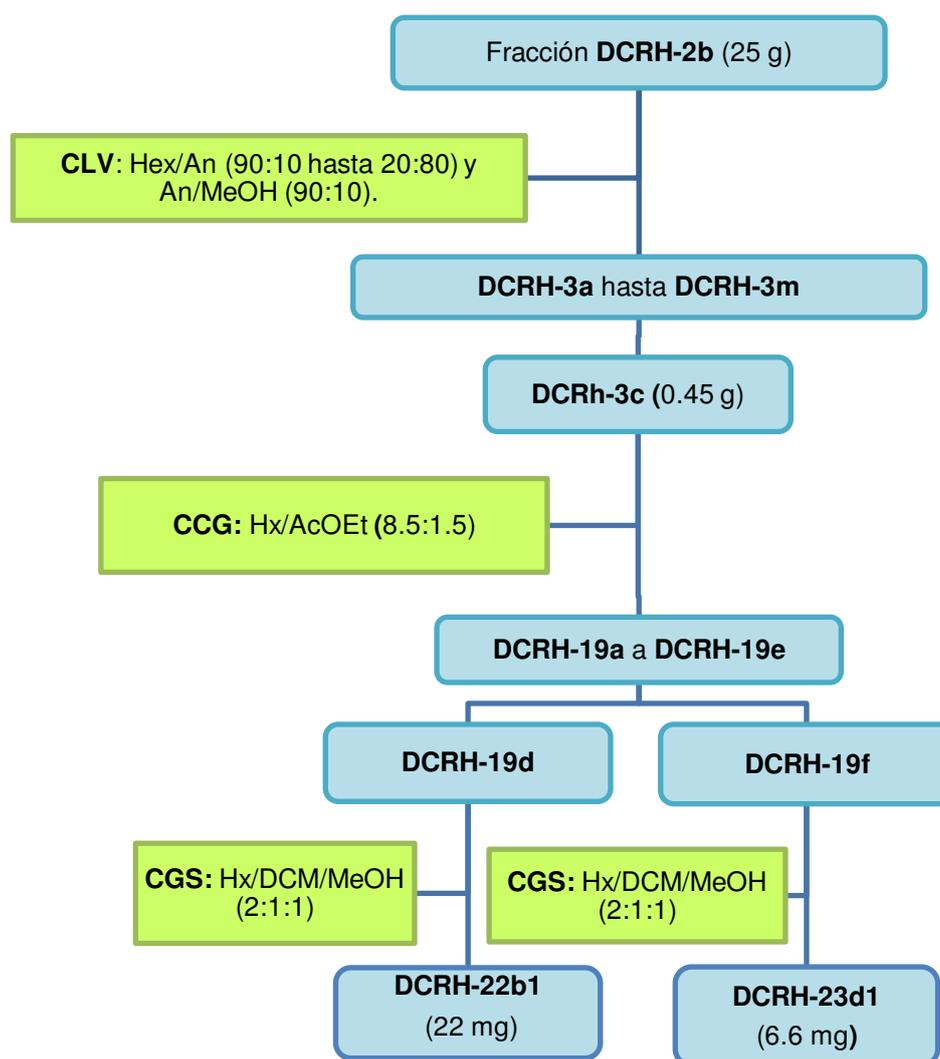


Figura 2.12. Aislamiento de metabolitos de la fracción DCRH-3c.

2.2.5.3.2 Aislamiento del compuesto 5 (DCRH-23d1, psoraleno)

El compuesto 5 (DCRH-23d1) se aisló primero a partir de la fracción DCRH-19f (50 mg) empleando las mismas condiciones reportadas en el párrafo anterior, obteniéndose 6.6 mg con un rendimiento de 0.0004% a partir del rizoma seco. Sin embargo, es importante aclarar que este mismo compuesto se ha detectado en otras fracciones como DCRH-3d y DCRH-3e y caracterizado dentro de los mayoritarios de la partición metanólica.

Compuesto 5 (DCRH-23d1, psoraleno, Figura 2.13): Sólido en forma de agujas incoloras. **Rf:** 0.3 en Hx/AcOEt/MeOH (8:1.3:0.2). **IR** (ν , cm^{-1}): 3157, 3120, 2962, 2922,

1721, 1581, 1284, 1133. EM (m/z): 186 (100), 158 (78), 130 (11), 120(28), 76(9), 51(25).

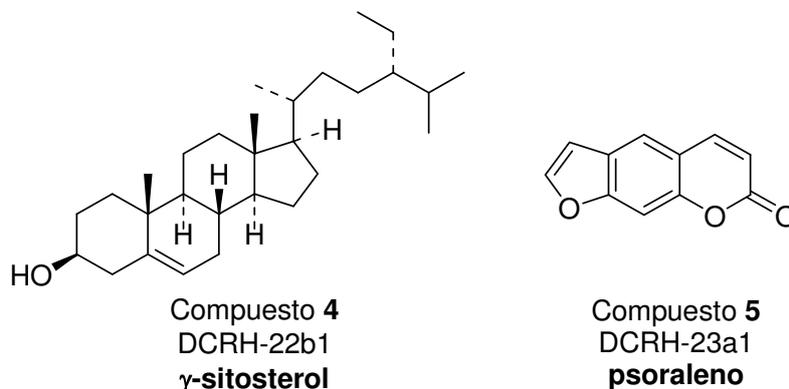


Figura 2.13. Estructura de los compuestos de DCRH-22b1 y DCRH-23a1.

2.2.5.4. Aislamiento a partir de la fracción DCRH-3k

2.2.5.4.1. Aislamiento del compuesto 6 (DCRH-53a1, dorsteniol)

De la fracción DCRH-3k se empleó 1.7 g que se pasó por una columna de gravedad en gel de sílice, de 30 cm de largo y 4 cm de diámetro, con una polaridad ascendente a partir de Hx/An (9:1 a 2:8) y se lavó con acetona al 100%. Se recolectó al final seis fracciones nombradas DCRH-43a – DCRH-43f.

La fracción DCRH-43d (300 mg) se pasó por una columna de Sephadex LH-20 en 100% MeOH, obteniéndose cuatro fracciones: DCRH-45a – DCRH-45d. La fracción DCRH-45b (58 mg) se sometió a una columna de Sephadex LH-20 en 100% MeOH, de 30 cm de largo por 1 cm de diámetro y se recolectó un total de tres fracciones: DCRH-50a, 50b y 50c.

La fracción DCRH-50a se pasó a través de cromatografía de columna tipo flash, en soporte de fase reversa, con una fase móvil de H₂O/EtOH en gradiente (8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 0:1). De la columna se obtuvieron tres fracciones, donde la primera es el compuesto puro en CCD, el cual se nombró DCRH-53a1 (Figura 2.14). El peso total del metabolito fue 10.1 mg con un rendimiento a partir del rizoma seco de 0.00061%.

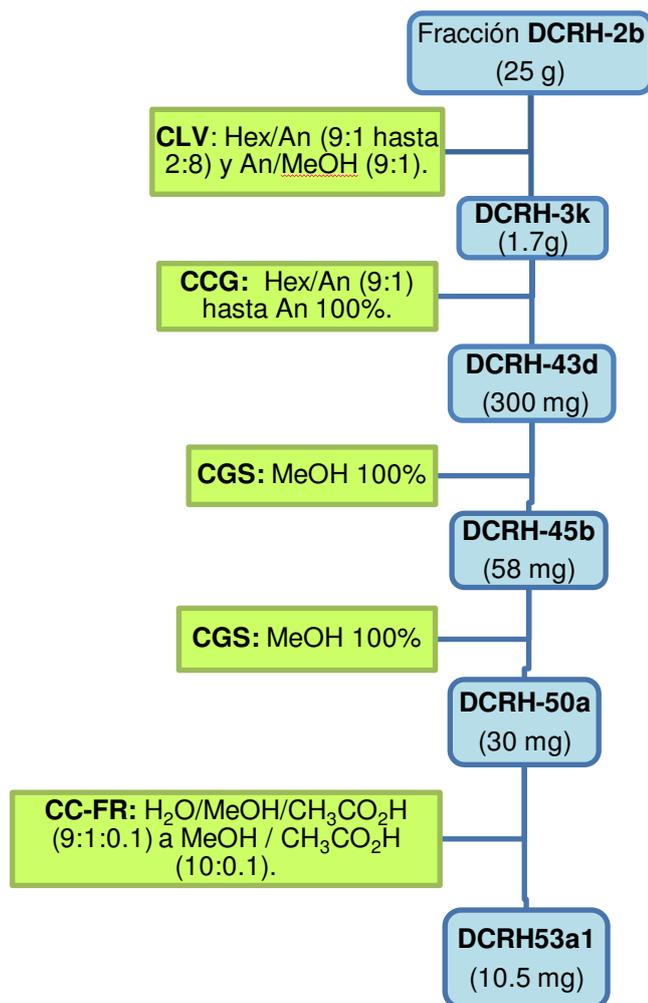
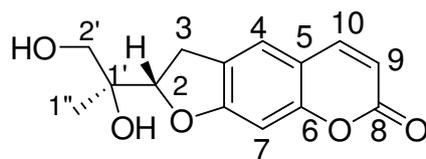


Figura 2.14. Aislamiento de metabolitos de la fracción DCRH-3k.

Compuesto 6 (DCRH-53a1, dorsteniol, Figura 2.15): sólido incoloro en forma de agujas. **Rf:** 0.28 en Hx/An (3:1, 3×). **IR** ($\nu_{\text{máx}}$, cm^{-1}): 3384, 2967, 1707, 1625, 1566, 1484, 1267, 1136, 1042. **RMN-¹H** (600 MHz, metanol- d_4) δ : 7.60 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-10), 7.40 (1H, s, H-4), 6.71 (1H, s, H-7), 6.18 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-9), 4.97 (1H, t, $J = 8.9$ Hz, H-2), 3.72 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, H-2'), 3.52 (1H, d, $J = 10.9$ Hz, H-2'), 3.34 (1H, dd, $J = 15.7, 9.4$, Hz, H-3a), 3.23 (1H, dd, $J = 15.7, 9.4$ Hz, H-3b), 1.18 (3H, s, H-1''). **RMN-¹³C** (150 MHz, metanol- d_4) δ : 165.2 (s, C-7a), 163.7 (s, C-8), 156.8 (s, C-6), 146.2 (d, C-10), 127.3 (s, C-3a), 124.9 (d, C-4), 114.0 (s, C-5), 112.1 (d, C-9), 98.2 (d, C-7), 89.1 (d, C-2), 74.5 (s, C-1'), 67.6 (t, C-2'), 29.6 (t, C-3), 20.3 (c, C-1''). **EM** (sililado, IE, 70 eV, m/z): 406 (10), 361 (5), 303 (13), 260 (72), 213 (60), 187 (15), 159 (10), 147 (23), 131 (40) y 73 (100). $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_5$.



Compuesto 6
DCRH-53a1
dorsteniol

Figura 2.15. Estructura del compuesto DCRH-53a1.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1 Identificación del compuesto 1 (DCRH-9a1, bergapteno)

Este compuesto revela de color azul bajo luz UV a 365 nm, lo cual es característico de compuestos como las cumarinas. Para apoyar su identificación se corrió una CCD en un sistema de tolueno/AcOEt (8:2) utilizado para la identificación de cumarinas, teniendo este compuesto un R_f de 0.5 (Figura 2.16), que según lo reportado en la literatura (Wagner *et al.*, 2011) le corresponde al bergapteno.

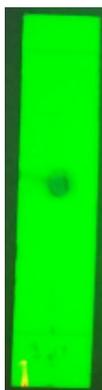


Figura 2.16. Metabolito DCRH-3d1 en una placa bajo luz UV a 254 nm, con un R_f de 0.5 en un sistema de tolueno/AcOEt (8:2).

Un análisis de CG-EM demostró su pureza y se identificó la estructura de DCRH-9a1 al comparar su espectro de masas (Figura 2.17) con el del compuesto bergapteno de la base de datos NIST, siendo su similitud de un 98%.

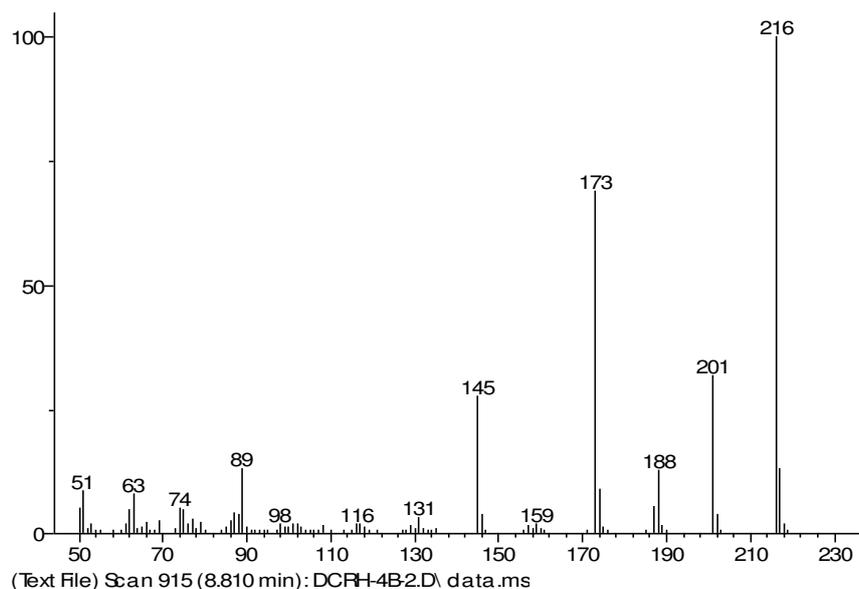


Figura 2.17. Espectro de masas del compuesto 1, identificado como bergapteno.

Las señales observadas en la Figura 2.18 corresponden a las fragmentaciones características de las furanocumarinas (Xu *et al.*, 2011); estos fragmentos principales son: el ión molecular y pico base de 216 m/z , la pérdida del grupo metilo con 201 m/z , y la pérdida de CO de los grupos funcionales carbonilo que produce los fragmentos de 173 y 145 m/z (Dugrand *et al.*, 2013).

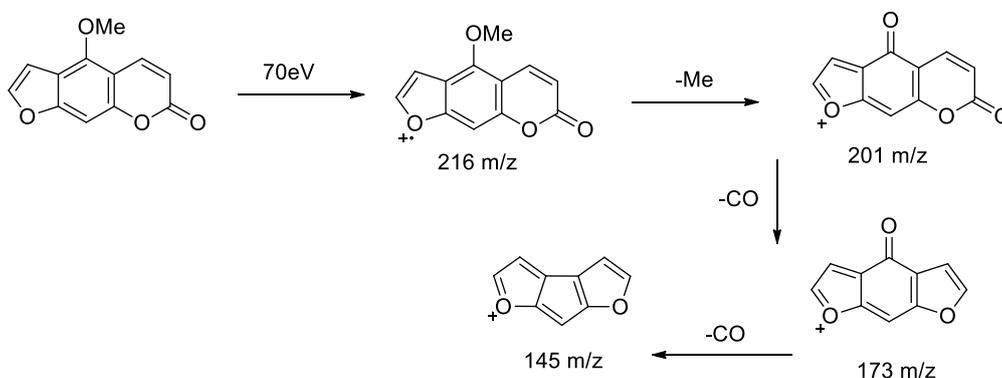


Figura 2.18. Fragmentación propuesta para el bergapteno por el método de IE.

También se realizó su identificación por espectro de infrarrojo (Figura 2.19), que presentó las bandas características de C-H aromáticos arriba de 3000 cm^{-1} , la banda de 1721 cm^{-1} para el carbonilo de la lactona y las bandas de C-C aromáticos (1632 , 1576 , 1452 cm^{-1}), al igual que una banda para grupos C-OCH₃ a 1138 cm^{-1} (Silverstein *et al.*, 2005).

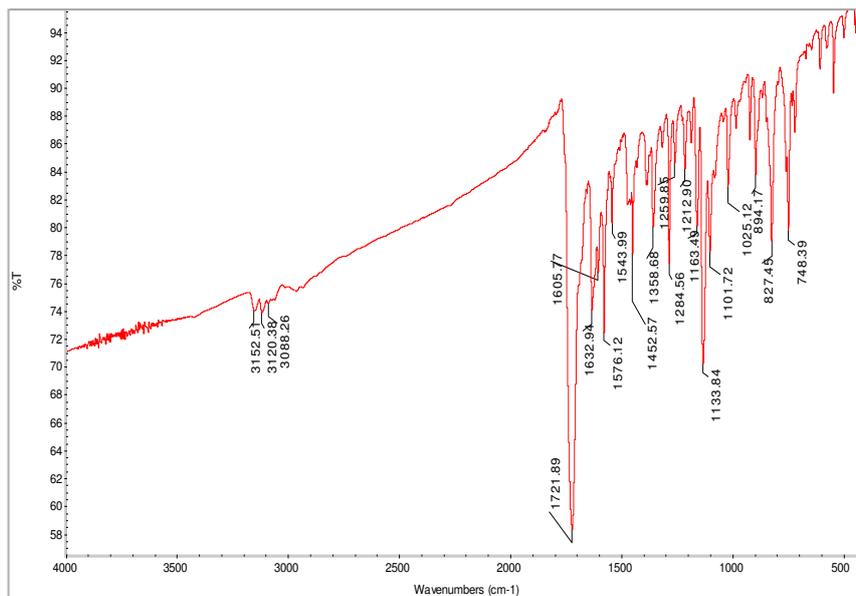


Figura 2.19. Espectro de infrarrojo del compuesto 1, identificado como bergapteno.

De acuerdo con una revisión en la literatura, este metabolito es uno de los mayoritarios en el rizoma de esta especie (Terreaux *et al.*, 1995); se encuentra presente en la mayoría de las fracciones obtenidas en la CLV de la fracción diclorometánica, detectando previamente su presencia en este trabajo por CCD en la mayoría de las fracciones. Es importante considerar la planta como una fuente de furanocumarinas, entre las cuales se encuentra el bergapteno.

2.3.2. Identificación del compuesto 2 (DCRH-9b1, dorstenina)

El R_f del compuesto DCRH-9b1 se comparó por CCD (Figura 2.20) con el de la dorstenina (Pires-Quevedo, 2011; Medrano-Nahuat, 2014), confirmando que ambos coinciden con un R_f de 0.35 en un sistema Hx/DCM/MeOH (7:1.7:0.3).

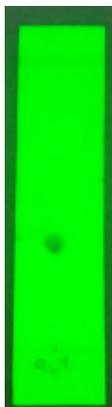


Figura 2.20. CCD de dorstenina en UV a 254 nm, con un R_f de 0.35 en Hx/DCM/MeOH (7:1.7:0.3).

El compuesto DCRH-9b1 se sometió a un análisis en el equipo de CG-EM, demostrando su pureza y obteniendo su espectro de masas de baja resolución (Figura 2.21).

Con el espectro de masas por IE se pudo hacer una revisión en la literatura de las fragmentaciones propuestas con los principales iones para este metabolito (Terreaux *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2011), lo cual se describe en la Figura 2.16. Se observó una serie de fragmentaciones pertenecientes a la cadena derivada de geranilo, con dos pérdidas de etileno, que corresponden al fragmento de 139 m/z , siendo éste el pico base y el ion 111 m/z , seguido de una pérdida de isopropilo del furanilo, correspondiente al ion de 69 m/z . Por otro lado, las fragmentaciones en el heterociclo nos da el fragmento 202 m/z , una pérdida de CO nos da el fragmento de 174 m/z y la pérdida CHO nos da el fragmento de 145 m/z (Dugrand *et al.*, 2013).

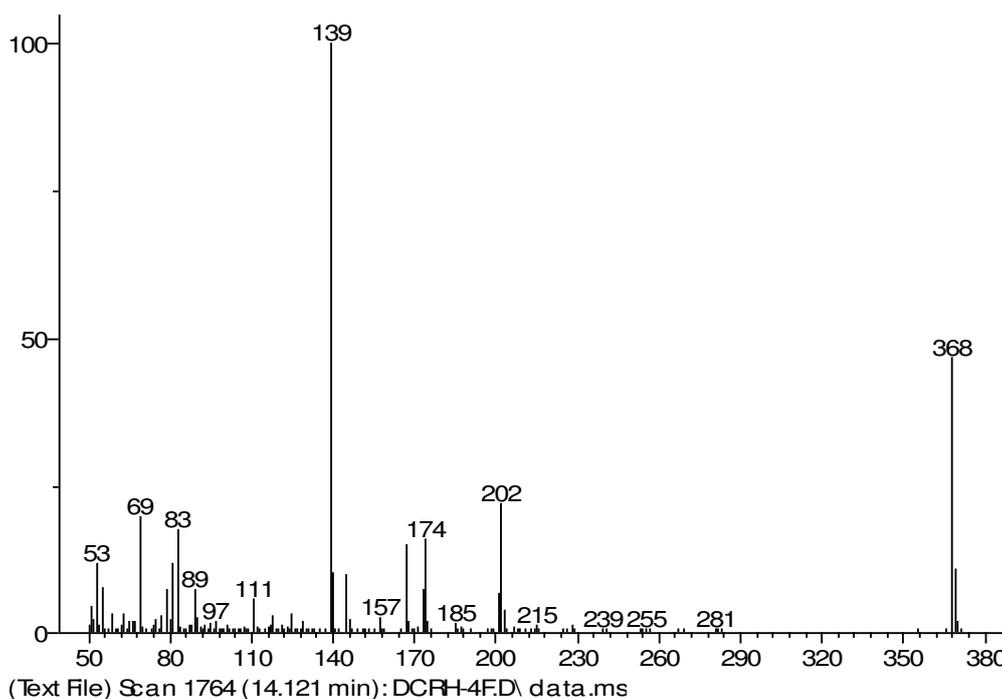


Figura 2.21. Espectro de masas del compuesto 2, identificado como dorstenina.

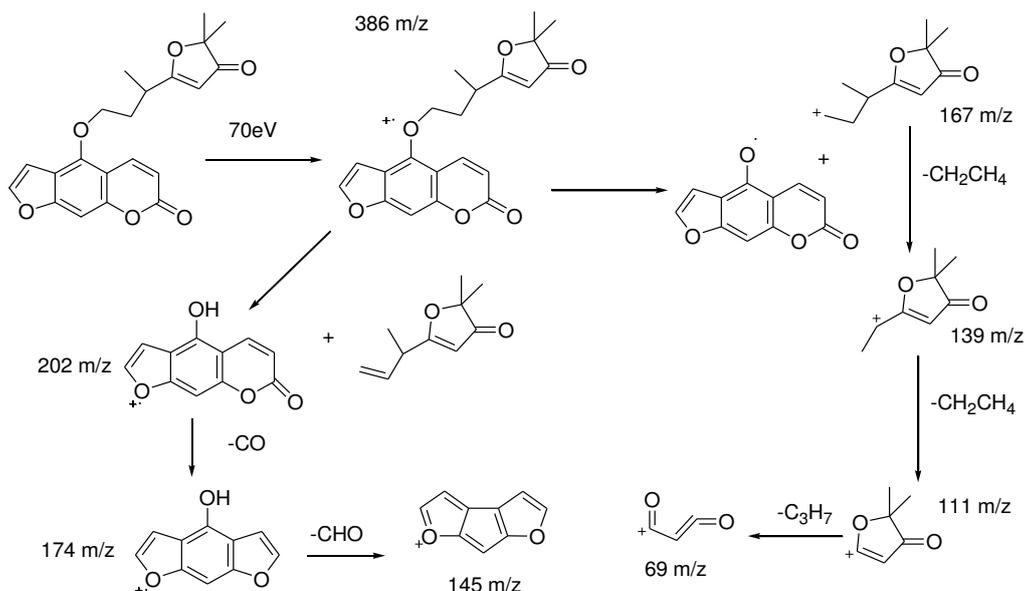


Figura 2.22. Fragmentación propuesta para dorstenina por el método de IE.

Su espectro de infrarrojo (Figura 2.17) presentó señales similares a otras furanocumarinas: la señal de C-H aromáticos arriba de 3000 cm^{-1} , las bandas de 1729 y 1706 cm^{-1} pertenecientes a los carbonilos, de la lactona y de la cadena monoterpénica. También la presencia de bandas de C-C aromáticos a $1625, 1588, 1452\text{ cm}^{-1}$, las cuales son de intensidad fuerte en el espectro y también estiramientos C-O a 1163 y 1131 cm^{-1} , provenientes de la cadena monoterpénica y de la sustitución -OR en el C-5 en la estructura básica de tipo psoraleno.

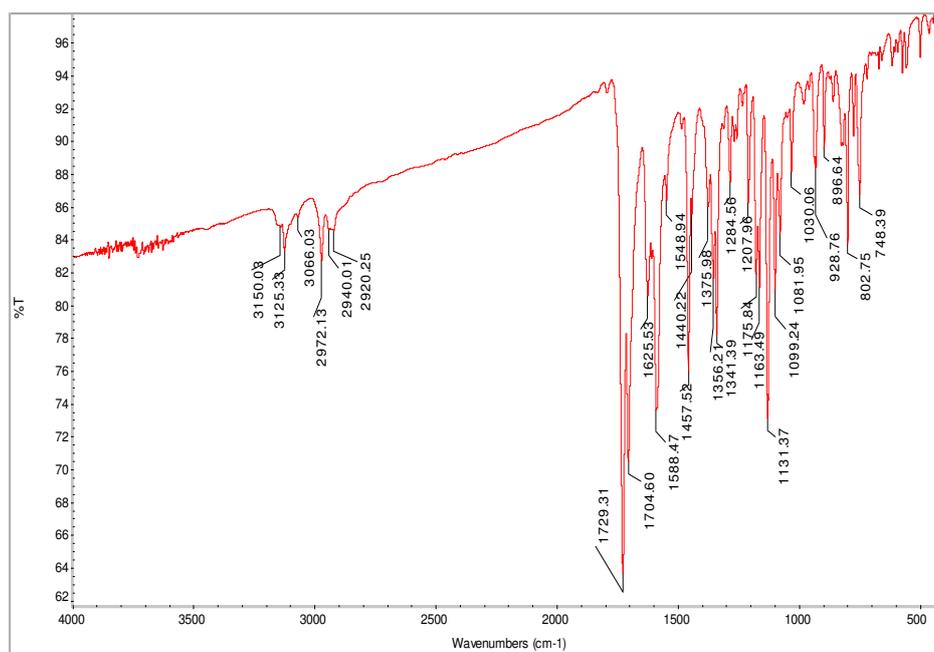


Figura 2.23. Espectro de infrarrojo del compuesto 2, dorstenina.

2.3.3. Identificación del compuesto 3 (DCRH-12c1, cicloartocarpesina)

Tiene un $R_f = 0.3$ en el sistema Hx/DCM/MeOH (3:1.2:0.3), viéndose que posee el mismo R_f que un flavonoide aislado de *D. contrajerva* en un trabajo anterior (Medrano-Nahuat, 2014), por lo cual se utilizó como referencia (Figura 2.24).

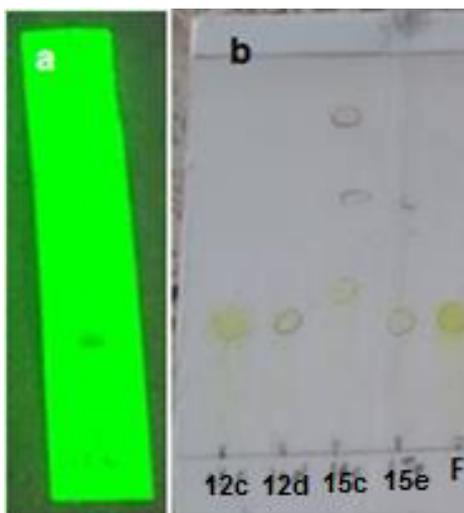


Figura 2.24. a) CCD de DCRH-12c1 en UV a 254 nm, con un R_f de 3.0 en Hx/DCM/MeOH (3:1.2:0.3) b) Fracciones DCRH-12c, 12d, 15c y 15e demostrando la presencia de cicloartocarpesina (mancha amarilla) revelada en óleum, comparando su R_f con el flavonoide aislado en el trabajo de Medrano, 2014 (F).

El espectro de infrarrojo (Figura 2.25) presenta señales características de flavonoide: señales de estiramiento de OH de 3500 a 3100 cm^{-1} , las bandas fuertes pertenecientes a C=O con un puente de hidrógeno se observan a 1652 y 1608 cm^{-1} , las bandas medianas correspondientes a los C=C del anillo aromático aparecen a 1556 y 1477 cm^{-1} y se ven las bandas de 1165 y 1135 cm^{-1} pertenecientes a C-OH.

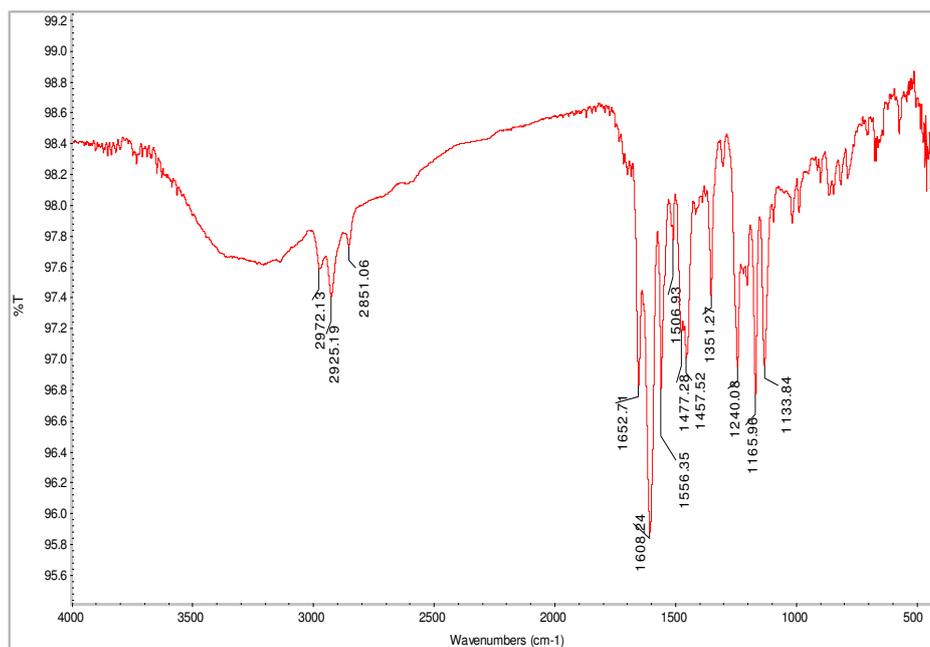


Figura 2.25. Espectro de infrarrojo de DCRH-12c1 (compuesto 3).

Su masa de alta resolución corresponde a una fórmula molecular de $C_{20}H_{16}O_6$ y peso molecular de 352.0949 (Figura 2.26).

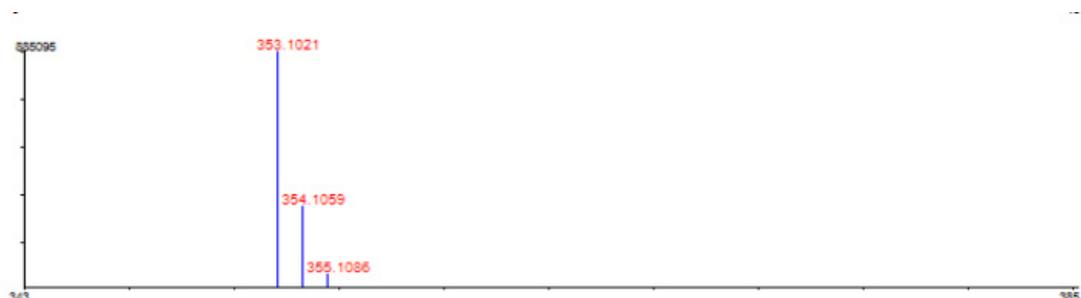


Figura. 2.26. Masas de alta resolución de DCRH-12c1, por ionización electro spray.

Todo los datos anteriores nos permite inferir que se trata de una flavona prenilada que se encontró en *D. contrajerva* en un trabajo anterior en el cual no se pudo elucidar su estructura en su totalidad (Medrano Nahuat, 2014).

En el espectro de RMN- 1H (400 MHz, acetona- d_6 , Figura 2.27) de DCRH-12c1 se observa la presencia de siete señales dentro de la región de compuestos aromáticos y dobles enlaces (δ 7.86 - 5.75), cada una de estas señales integra para un protón; también se observan dos metilos correspondientes a una misma señal a δ 1.30. Los protones a δ 7.86 (d, $J = 8.8$ Hz, H-6'), 6.62 (d, $J = 2.2$ Hz, H-5') y 6.55 (dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, H-3') conforman un sistema de espines tipo ABX, con desplazamientos y

multiplicidad característicos de un fenilo disustituido por hidroxilo y con los sustituyentes en *meta* entre sí. Los protones H-1'' (δ 6.66) y H-2'' (δ 5.75) son característicos de un doble enlace Z. Los dos protones restantes a δ 7.14 y 6.45 aparecen como singuletes, es decir, no están acoplados con ningún otro protón en la molécula. Hay que destacar el protón con puente intramolecular (δ 13.44) característico de flavonoides.

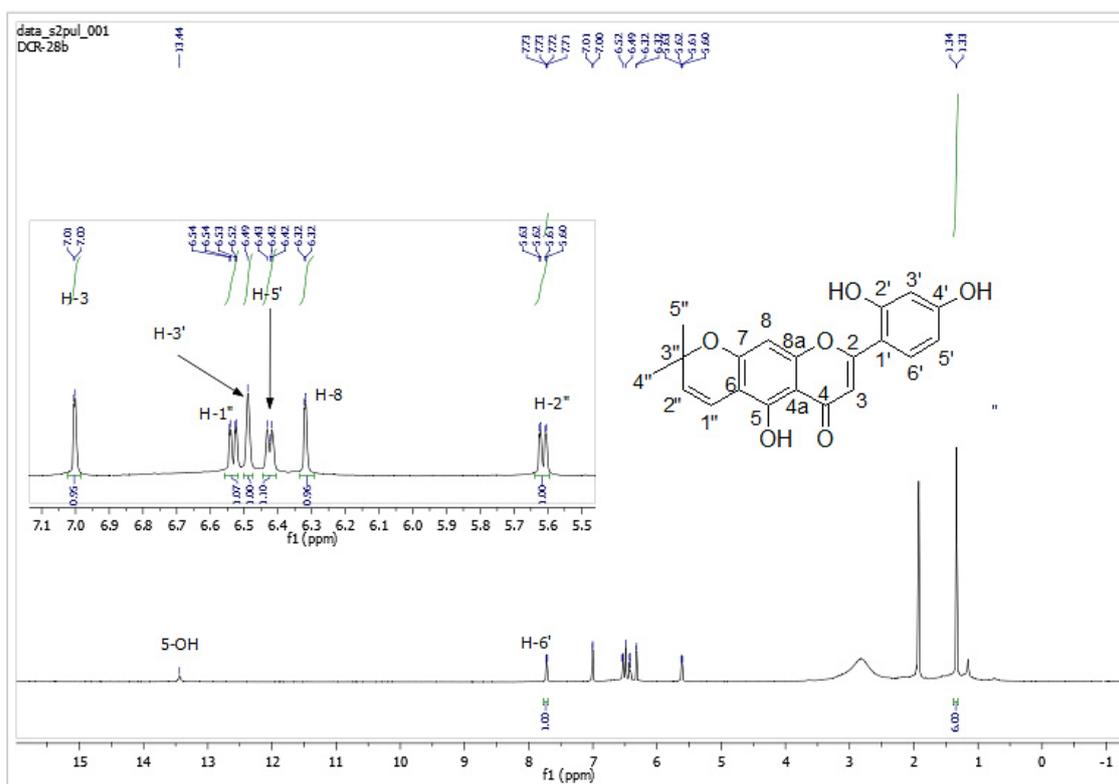


Figura 2.27. RMN-¹H (600 MHz en acetona-*d*₆) de DCRH-12c1.

En el espectro de RMN-¹³C (Figura 2.28) se observan 18 señales. Una de estas señales se observa con gran intensidad (δ 27.5), la cual se asignó a dos metilos. Un análisis simple nos permitió identificar la presencia de 20 carbonos en la estructura, en particular, un carbonilo a δ 182.7, asignado al C-4. Hay cinco carbonos aromáticos enlazados a oxígeno a δ 156.7, 159.0, 157.0, 161.8 y 158.7, un carbono vinílico unido a oxígeno a δ 162.4 y un carbono cuaternario oxigenado a δ 77.7. También destacan los carbonos de cinco metinos aromáticos a δ 108.4, 95.4, 104.3, 109.0, 130.9 (H-3, H-8, H-3', H-5' y H-6', respectivamente). Los carbonos restantes son carbonos aromáticos cuaternarios no enlazados a oxígeno. La señal a δ 110.5 se asignó a C-1' y la señal a δ 104.8 al C-6 y C-4a.

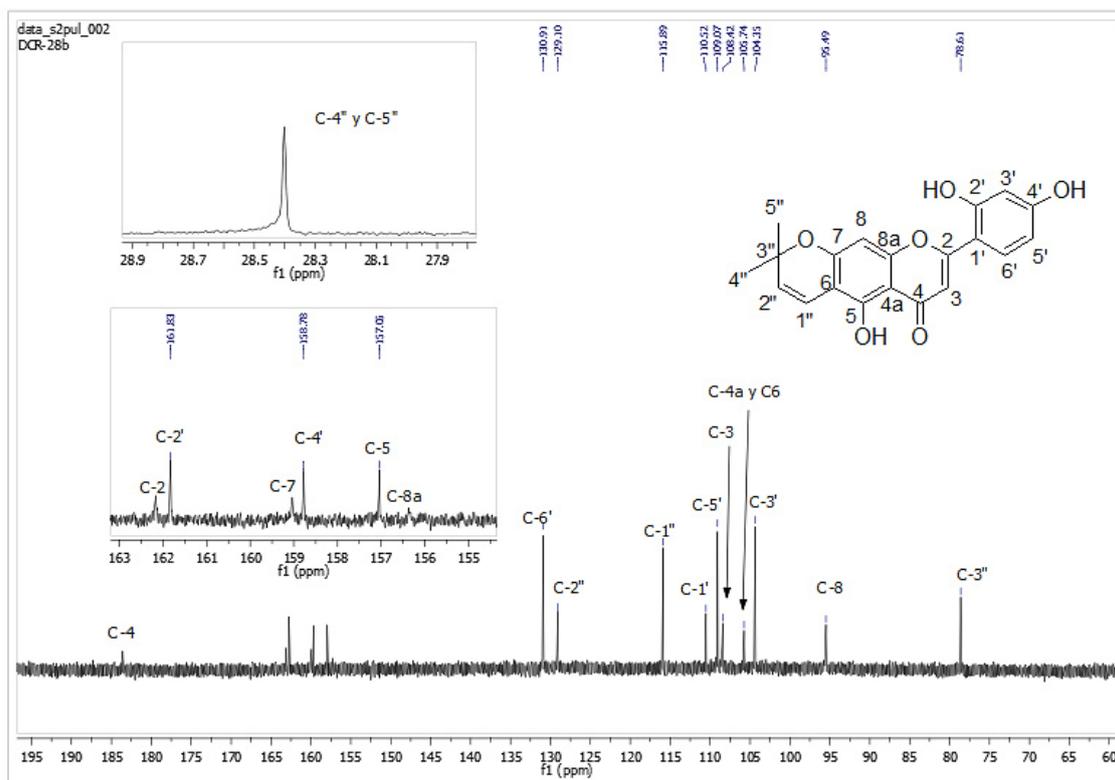


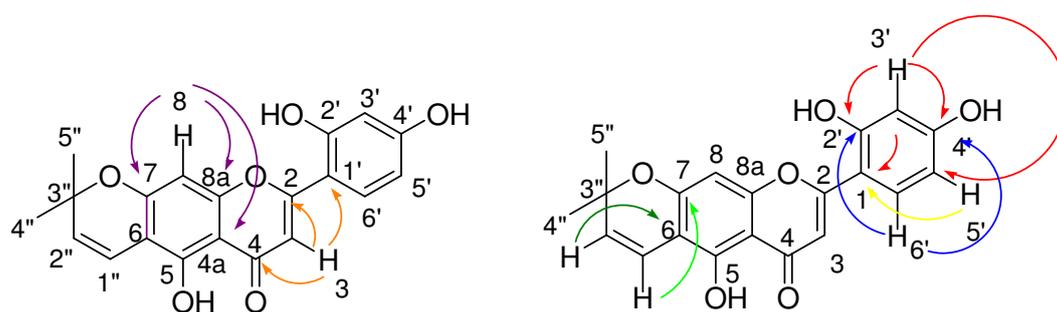
Figura 2.28. RMN- ^{13}C (150 MHz en acetona- d_6) de DCRH-12c1.

Con los experimentos de RMN- ^1H y ^{13}C , cuyos datos están detallados en la Tabla 2.3, se confirmó una estructura de tipo flavona con un grupo isoprenilo enlazado en el anillo A de la flavona, formando un heterociclo más de tipo pirona. Se continuó con el experimento HSQC, con el cual se obtuvo la correlación entre los protones con sus respectivos carbonos; estas correlaciones y las del HMBC permitieron conocer las interacciones de un protón con carbonos vecinos a dos o más enlaces. Estas correlaciones son reportadas en la Tabla 2.3.

Sin embargo, se necesitaron los experimentos de HMBC, para alcanzar esta conclusión, las principales correlaciones se observan en la Figura 2.29. Primero tenemos las correlaciones del sistema de protones del anillo B dihidroxi-sustituido (Figura 2.30): H-3' se correlaciona con C-1', C-4' y C-2'; H-5' se correlaciona con C-3' y C-1'; mientras el H-6' presenta una correlación con C-4' y C-2'. Por lo tanto, se comprueba la presencia de un oxhidrilo más en la estructura básica de los flavonoides en la posición C-2'.

Tabla 2.3. Asignación total espectroscópica de DCRH-12c1, cicloartocarpesina.

Numeración	RMN ¹³ C (150 MHz)	RMN- ¹ H (600 MHz, acetona- <i>d</i> ₆)	HMBC (600 MHz)
2	162.4, s	-	-
3	108.4, d	7.00 (1H, d, <i>J</i> = 2.7 Hz)	C-4a, C-1', C-2, C-4
4	182.7, s	-	-
5	156.7, s	13.44 (1H, s)	-
6	105.8, s	-	-
7	159.0, s	-	-
8	95.5, d	6.32 (1H, d, <i>J</i> = 2.4 Hz)	C-8a, C-10, C-7
4a	105.8, s	-	-
8a	157.0, s	-	-
1'	110.5, s	-	-
2'	161.6, s	-	-
3'	104.3, d	6.49 (1H, s)	C-1', C-5', C-4' y C-2'
4'	158.7, s	-	-
5'	109.0, d	6.42 (1H, dd, <i>J</i> = 8.7, 2.3 Hz)	C-3', C-1'
6'	130.9, d	7.72 (1H, dd, <i>J</i> = 8.7, 2.9 Hz)	C-4', C-2'
1''	115.8, d	6.53 (1H, dd, <i>J</i> = 10, 2.6 Hz)	C-3', C-5, C-7
2''	129.1, d	5.61 (1H, dd, <i>J</i> = 10, 2.8 Hz)	C-4''C-5'', C-3'' y C-6
3''	77.7, s	-	-
4''	27.5, q	1.34 (3H, s)	C3'' y C-2''
5''	27.5, q	1.34 (3H, s)	C-3'' y C-2''

**Figura 2.29.** Correlaciones principales de la cicloartocarpesina (**3**), que se observan en las Figuras 2.30 y 2.31.

El grupo isopreno se pudo fijar al anillo A en forma lineal con base en las correlaciones observadas en el espectro de HMBC (Figura 2.30); así, el protón H-1'' muestra

correlaciones con C-3'' y C-7, que junto con la correlación de H-2'' con C-6, y las observadas con los carbonos C-3'', C4'' y C5'' del grupo isopreno, permite asegurar que hay un heterociclo de tipo pirano, donde el isopreno está enlazado al C-6, y que C-3'' está enlazado al oxígeno del C-7, formando el heterociclo de tipo pirano con tres átomos del anillo A (C-6, C-7 y el O en C-7) de origen policétido.

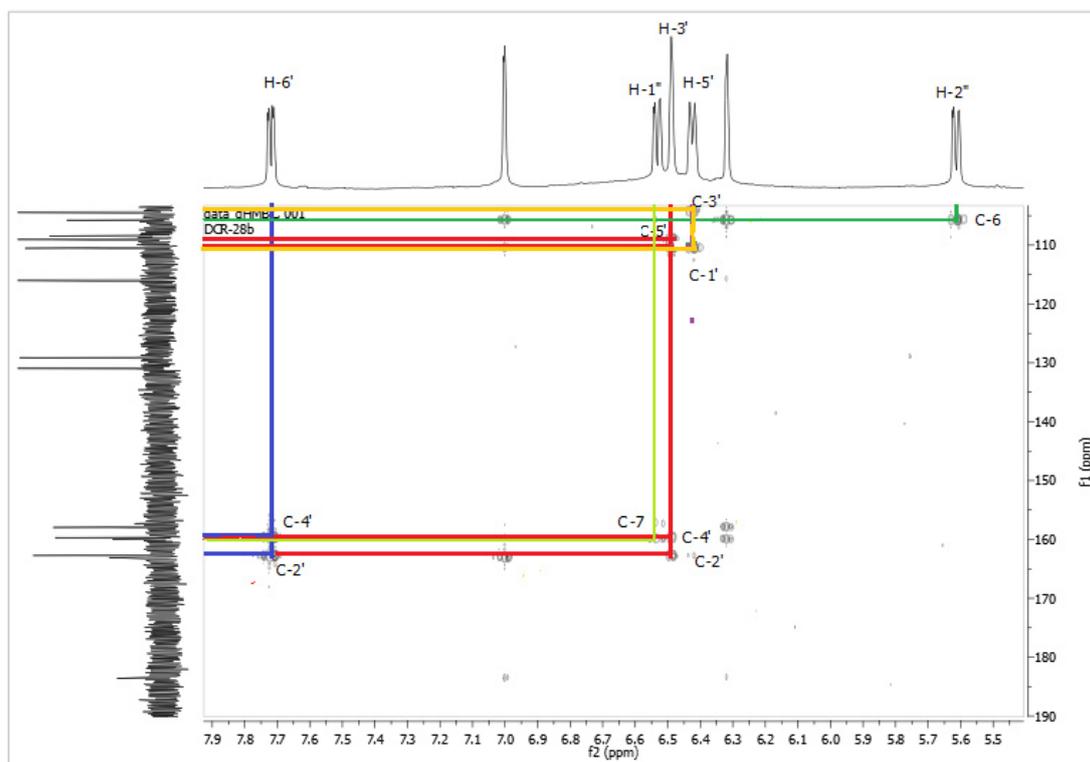


Figura 2.30. Ampliación del HMBC con las correlaciones del pirano de origen isopreno y del anillo B.

Con respecto a las correlaciones del anillo A (Figura 2.31) de la flavona tenemos al H-8 que correlaciona con los carbonos C-7, C-4a y C-8a, por lo tanto el H-8 tiene los acoplamientos esperados, es decir, con los carbonos aromáticos del anillo A, que al provenir de la ruta de los policétidos se espera sustituyentes oxhidrilos que están *meta* entre sí. Por otro lado, el H-3 tiene correlación con C-1', C-4a, C-2 y C-4. Estas correlaciones son importantes porque demuestran que el C-2 está sustituido por el C-1' del anillo B de la flavona. Si tomamos en cuenta que el H-8 del anillo A muestra una correlación con el C-6, C-7, C-4a y C-8a, y también se observa la correlación de H-3 del anillo B con los C-1' y C-2'', y así se comprueba la estructura tipo flavona del metabolito DCRH-12c1.

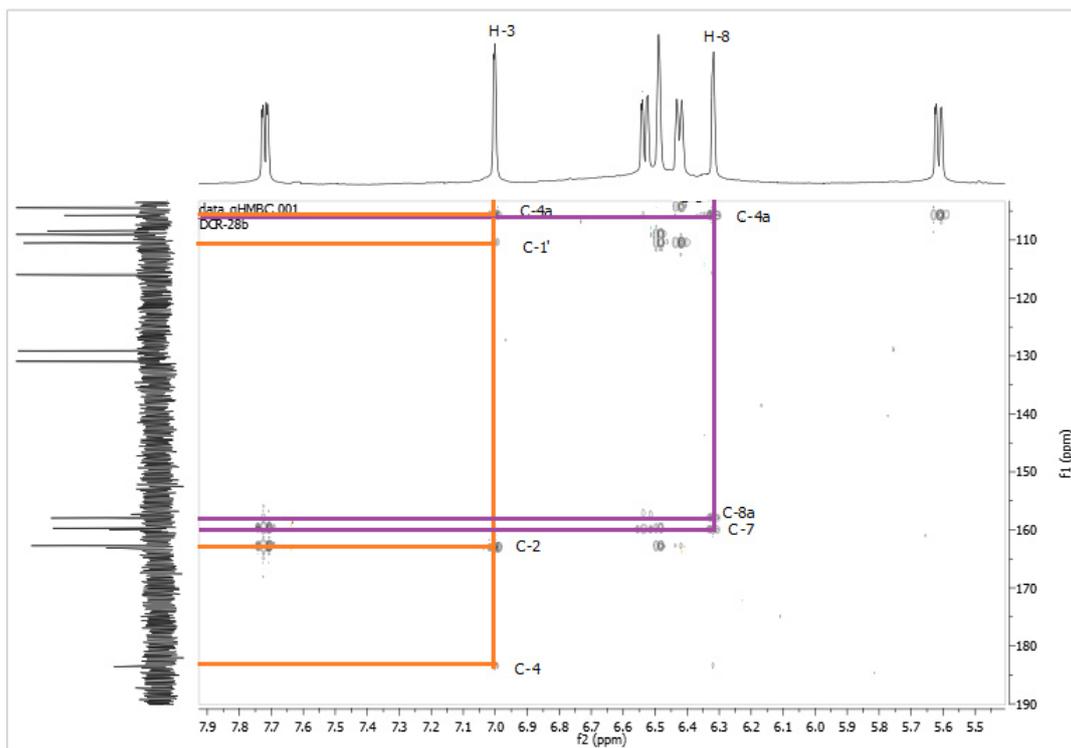


Figura 2.31. Ampliación del espectro de HMBC con las correlaciones entre los protones H-3 y H-8 de la cicloartocarpesina.

Al final, la estructura propuesta se compara con una reportada previamente, identificándola inequívocamente como cicloartocarpesina (Zheng *et al.*, 2008), descrita previamente en la familia Moraceae, mas no en el género *Dorstenia*. Es la primera vez que se investiga su actividad leishmanicida y también es la primera vez que se reporta un flavonoide prenilado en una especie de *Dorstenia* en el continente americano, ya que estos reportes previos provienen en su totalidad de especies africanas (Abegaz *et al.*, 2000; Gruber-Dall' Stella, 2008).

En la Tabla 2.4 se comparan las señales obtenidas en RMN-¹H de DCHR-12c1 con lo reportado para cicloartocarpesina por Zheng *et al.* (2008), con lo que confirmamos la identificación de este compuesto.

Tabla 2.4. Comparación de señales de RMN-¹H y ¹³C de DCRH-12c1 y cicloartocarpesina.

#	DCRH-12c1 (acetona- <i>d</i> ₆)		cicloartocarpesina (acetona- <i>d</i> ₆) ¹	
	¹³ C 150 MHz	¹ H 600 MHz	¹³ C 100 MHz	¹ H 400 MHz
2	162.4, s	-	162.2 (s)	-
3	108.4, d	7.00 (1H, d, <i>J</i> = 2.7 Hz)	107.7 (d)	7.03 (s, 1H),
4	182.7, s	-	182.6 (s)	-
5	156.7, s	13.44 (1H, s)	157.1 (s)	13.55
6	105.8, s	-	104.9 (s)	-
7	159.0, s	-	159.0 (s)	-
8	95.5, d	6.32 (1H, d, <i>J</i> = 2.4 Hz)	94.7 (d)	6.51 (s, 1H),
4a	105.8 (s)	-	104.8 (s)	-
8a	157.0, s	-	156.4 (s)	-
1'	110.5, s	-	108.4 (s)	-
2'	161.6, s	-	161.8 (s)	-
3'	104.3, d	6.49 (1H, s)	103.4 (d)	6.48 (d, <i>J</i> = 2.7 Hz, 1H)
4'	158.7, s	-	158.6 (s)	-
5'	109.0, d	6.42 (1H, dd, <i>J</i> = 8.7, 2.3 Hz)	108.4 (d)	6.43 (dd, <i>J</i> = 8.7, 2.7 Hz, 1H).
6'	130.9, d	7.72 (1H, dd, <i>J</i> = 8.7, 2.9 Hz)	130.1 (d)	7.76 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 1H').
1''	115.8, d	6.53 (1H, dd, <i>J</i> = 10, 2.6 Hz)	115.1 (d)	6.57 (d, <i>J</i> = 9.9 Hz, 1H).
2''	129.1, d	5.61 (1H, dd, <i>J</i> = 10, 2.8 Hz)	128.8 (d)	5.75 (d, <i>J</i> = 9.9 Hz, 1H)
3''	77.7, s	-	77.7 (s)	-
4''	27.5, q	1.34 (3H, s)	27.5 (q)	1.51 (3H, s)
5''	27.5, q	1.34 (3H, s)		1.51 (3H, s)

¹(Ramli *et al.*, 2013)

2.3.4 Identificación del compuesto 4 (DCRH-22b1, γ -sitosterol)

Se observó sólo una mancha en la fracción DCRH-22b1 con un R_f de 0.35 de Hx/AcOEt (8.5:1.5) en CCD (Figura 2.32).



Figura 2.32. CCD del compuesto 4, identificado como γ -sitosterol, con un R_f de 0.35 en Hx/AcOEt (8.5:1.5).

El metabolito DCRH-22b1 se analizó con éxito por cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM) y fue identificado por la base de datos del NIST como γ -sitosterol (DCRH-22b1, Figura 2.33) con un 99% de similitud. Este compuesto se ha obtenido previamente en la fracción hexánica (DCR-2a) del rizoma de *D. contrajerva* en un trabajo anterior (Medrano Nahuat, 2014). Es uno de los compuestos mayoritarios de la especie.

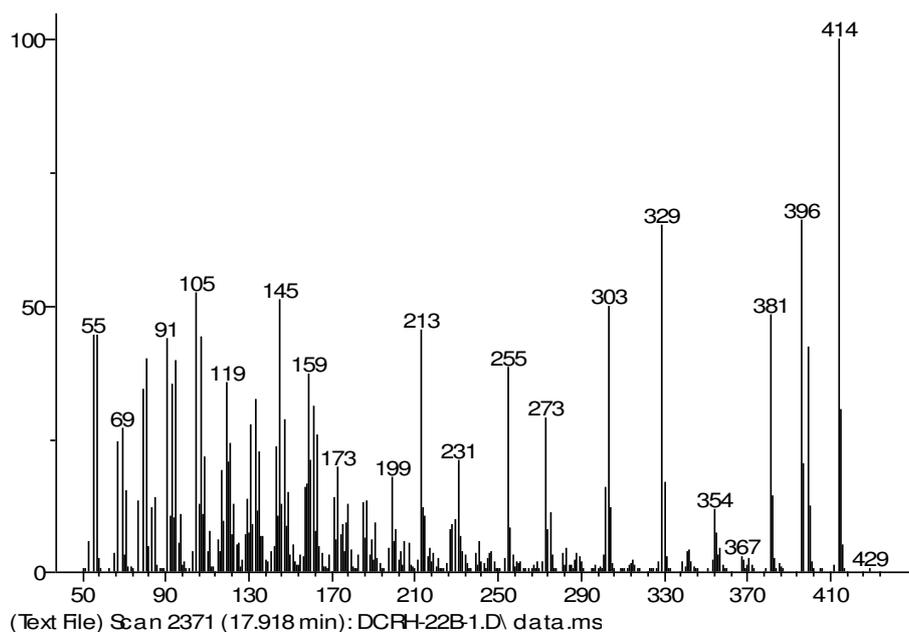


Figura 2.33. Espectro de masas de compuesto 4, identificado como γ -sitosterol.

En el espectro de masas de DCRH-22b1 (Figura 2.34) se observa la fragmentación típica de un fitoesterol con una insaturación $\Delta 5$, en particular, los fragmentos $329\ m/z$ y $303\ m/z$, además de la pérdida de metilos, el $-OH$ de la posición C-3 y carbonos de la cadena lateral (Uddin-Ahmad *et al.*, 1980; Mehta *et al.*, 2006; Sparkman *et al.*, 2011; Hisham *et al.*, 2012). La propuesta de fragmentación con información basada en la literatura concuerda con que, a partir de la formación del ion molecular ($414\ m/z$), se generan los fragmentos $329\ m/z$, $273\ m/z$ y $255\ m/z$ que provienen de la cadena lateral.

También es conocida la fragmentación de tipo retro-Diels-Alder en los fitoesteroles que originan un fragmento de $276\ m/z$. Otra posible ruta de fragmentación es la pérdida de un metilo y el $-OH$ en C-3 responsables de la formación del fragmento de $381\ m/z$ y de éste se forman los fragmentos $329\ m/z$ y $303\ m/z$ a través de pérdidas consecutivas de etino (C_2H_2).

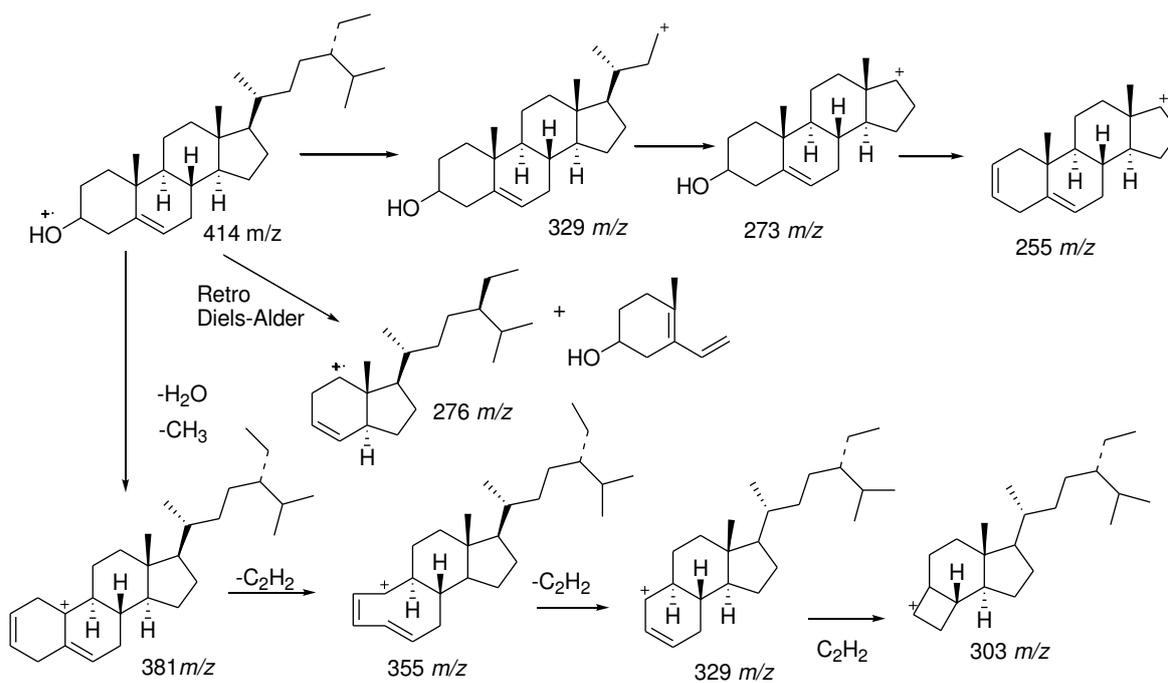


Figura 2.34. Fragmentación propuesta para el γ -sitosterol por el método de IE.

También se confirmó por espectroscopía de infrarrojo (Figura 2.35), en la que se observan las bandas esperadas de un fitoesterol, la banda de estiramiento O-H a $3414\ cm^{-1}$ del hidroxilo en el C-3, mientras que la banda fuerte a $2957\ cm^{-1}$ pertenece a los estiramientos C-H, la banda de $1467\ cm^{-1}$ y $1378\ cm^{-1}$ son debidas a flexiones dentro del plano por metilenos la primera, y la segunda por metilos. La banda débil a $1057\ cm^{-1}$ pertenece al C-O.

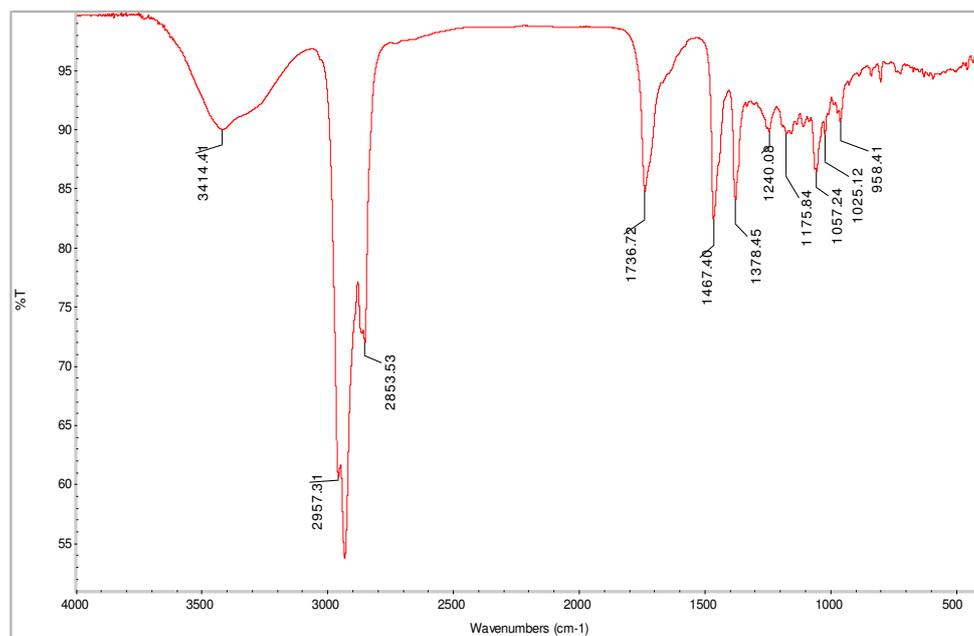


Figura 2.35. Espectro de infrarrojo del compuesto 4, identificado como γ -sitosterol.

2.3.4 Identificación del compuesto 5 (DCRH-23d1, psoraleno)

Se observó sólo una mancha en la fracción DCRH-23d1 con un R_f de 0.35 de Hx/AcOEt (8.5:1.5) en CCD (Figura 2.36).

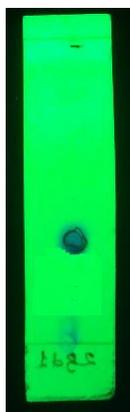


Figura 2.36. CCD del compuesto 5, identificado como psoraleno, con un R_f de 0.35 en Hx/AcOEt (8.5:1.5).

El metabolito DCRH-23d1 también se analizó con éxito por cromatografía de gases acoplada a masas y fue identificado por la base de datos del NIST, con una similitud de 98% como psoraleno (Figura 2.37). Este compuesto se ha obtenido previamente en la fracción hexánica (DCR-2a) del rizoma de *D. contrajerva* en un trabajo anterior (Medrano Nahuat, 2014), y se utilizó como referencia en CCD.

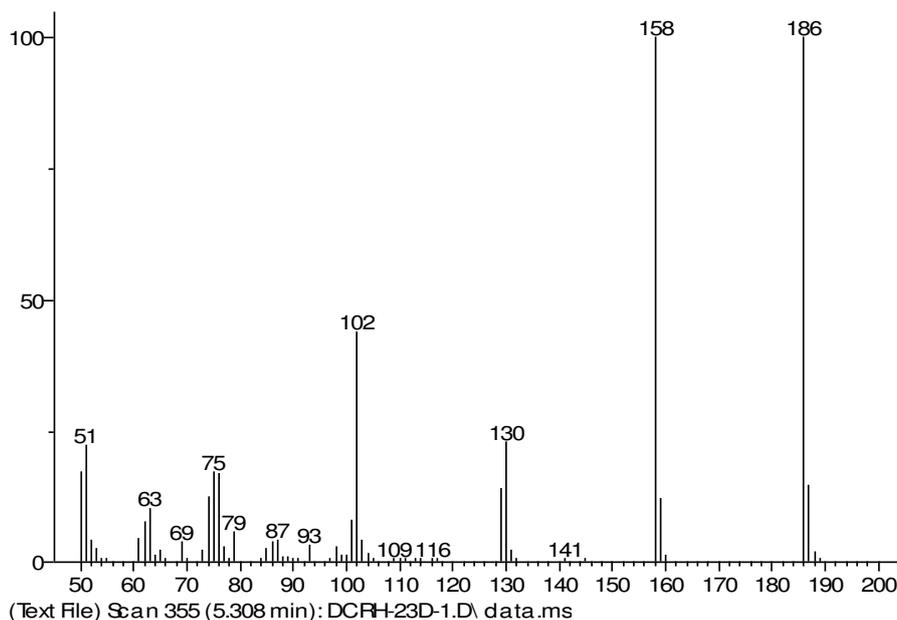


Figura 2.37. Espectro de masas del compuesto 5, identificado como psoraleno.

La fragmentación observada en su espectro de masas comprueba la identidad de DCRH-23d1 como psoraleno; esta fragmentación incluye la pérdida de CO (Xu *et al.*, 2011), responsable de la formación de los tres principales fragmentos (158 m/z , 130 m/z y 102 m/z), además del ión molecular de 216 m/z (Figura 2.38).

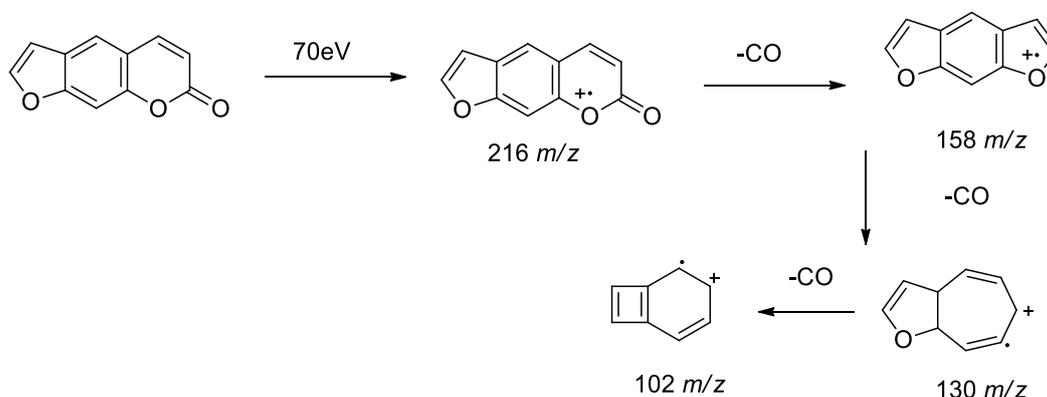


Figura 2.38. Fragmentación propuesta para el psoraleno por el método de IE.

Su espectro de infrarrojo (Figura 2.39) presentó señales similares a otras furanocumarinas: bandas de estiramiento de C-H aromáticos arriba de 3000 cm^{-1} , las bandas de C=O de 1729 y 1706 cm^{-1} pertenecientes al carbonilo de la lactona. También la presencia de bandas de C-C aromáticos (1625 , 1588 y 1452 cm^{-1}) las cuales son de intensidad fuerte en el espectro y también flexiones dentro del plano de

C-H del anillo aromático a $3100-3000\text{ cm}^{-1}$ y bandas de flexiones fuera del plano $900-675\text{ cm}^{-1}$, las cuales abundan en moléculas aromáticas (Silverstein *et al.*, 2005).

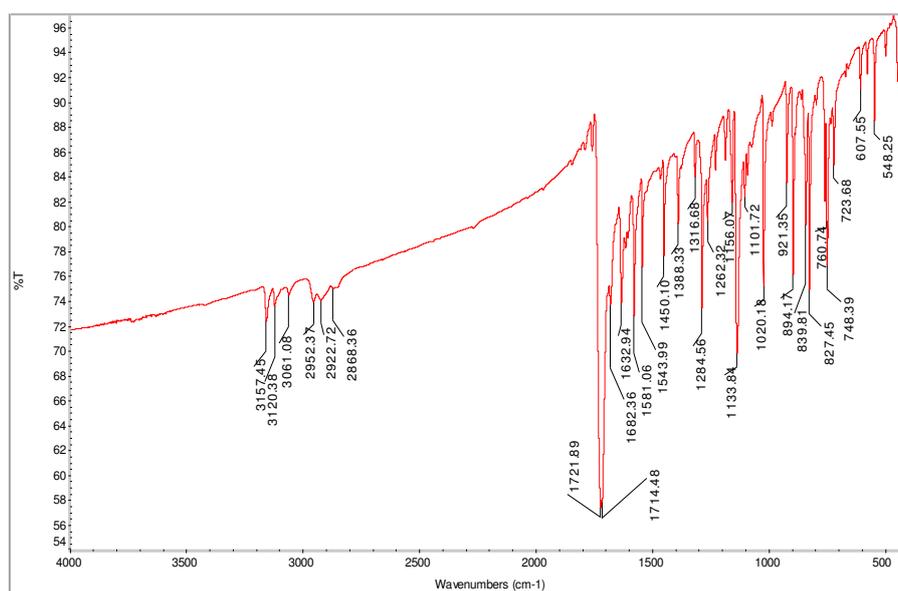


Figura 2.39. Espectro de infrarrojo del compuesto 5, identificado como psoraleno.

2.3.6 Identificación de la fracción DCRH-29c

Se observó sólo una mancha en la fracción que tiene un R_f de 0.20 en un sistema de Hx/DCM/An (5:3:2), con referencia de cicloartocarpesina (Figura 2.40).



Figura 2.40. CCD de la fracción DCRH-29c revelada en óleum, con un R_f de 0.2 en Hx/DCM/AcOEt (6.5:2.5:1.5) corrida cuatro veces, en el carril izquierdo se usó de referencia la cicloartocarpesina.

Respecto a los resultados de infrarrojo (Figura 2.41), se observó una banda ancha perteneciente al estiramiento de O-H a 3362 cm^{-1} , las bandas fuertes de 1637 y 1628 cm^{-1} pertenecientes al estiramiento de un carbonilo, C=O, conformando un puente de

hidrógeno intramolecular, la banda débil de C=C aromáticos a 1459 cm^{-1} , las bandas débiles a 1373 y 1309 cm^{-1} debido a las flexiones en el plano tipo C-H de un anillo aromático y la banda de mediana intensidad a 1158 cm^{-1} para C-O.

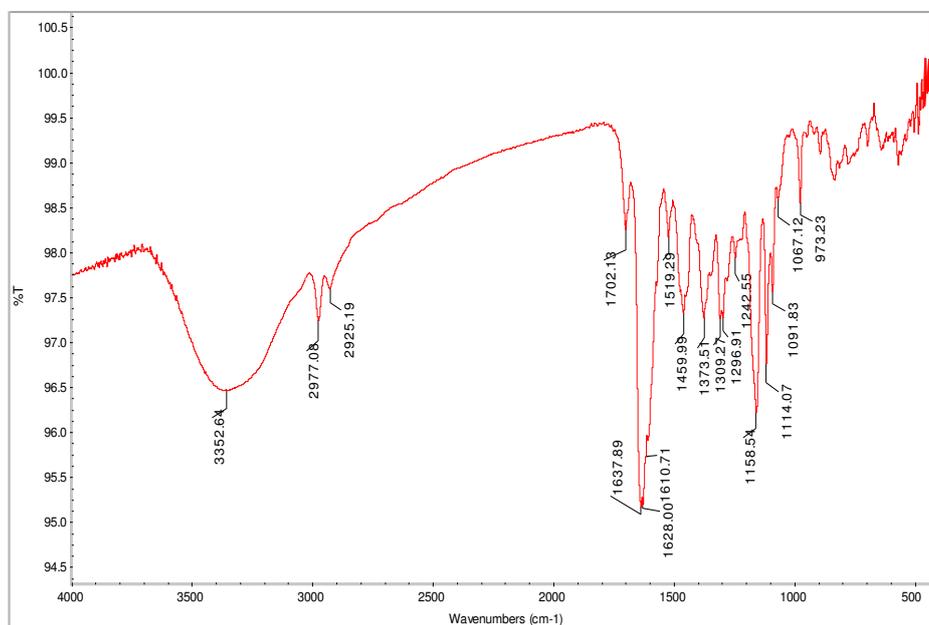


Figura 2.41. Espectro de infrarrojo de la fracción DCRH-29c.

En el análisis por cromatografía de líquidos en fase reversa, descrita previamente en materiales y métodos, se comprobó un solo pico para la fracción DCRH-29c, con un tiempo de retención de 4.54 minutos (Figura 2.42).

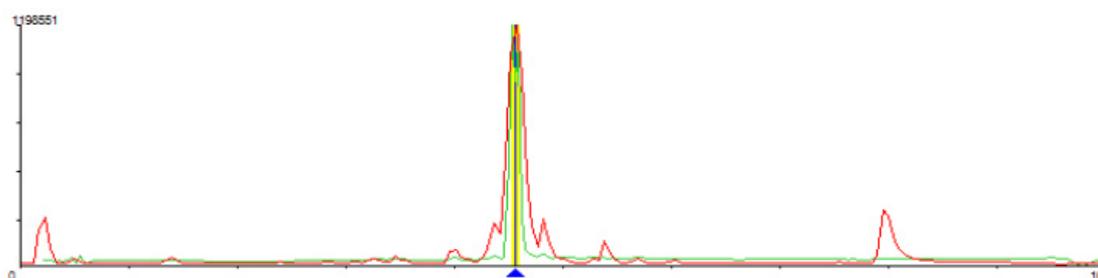


Figura 2.42. Cromatograma de líquidos de la fracción DCRH-29c.

El análisis de masas de alta resolución (Figura 2.43) permitió conocer el peso molecular sugerido para DCRH-29c, que es de 354.1102 g/mol , correspondiente a la fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$.

Los experimentos de RMN- ^1H (Figura 2.4) y ^{13}C (Figura 2.45) revelaron la presencia de dos moléculas similares en la fracción DCRH-29c y empleando experimentos de RMN bidimensionales se llegó a la conclusión de la presencia de dos flavonoides en la

fracción en proporción 54:46, donde el mayoritario se nombró DCRH-29c1 y el minoritario DCRH-29c2.

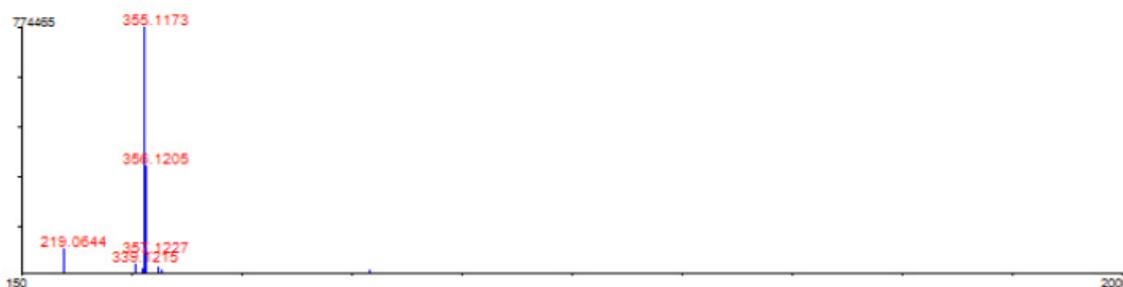


Figura 2.43. Espectro de masas de alta resolución de la fracción DCRH-29c por ionización electrospray.

En el experimento de RMN-¹H (Figura 2.44) se observan siete protones pertenecientes a carbonos sp², los tres protones del anillo B: H-6', H-5' y H-3', donde el H-6' es una señal doble y la más desplazada debido al efecto de los OH en posición *meta* y una región donde se solapan las señales de H-5' y H-2'. También se observa la pareja de protones del anillo pirano, H-1'' y H-2'' con su acoplamiento característico de 10.1 Hz. Y por último dos señales simples correspondientes al H-3 y H-7.

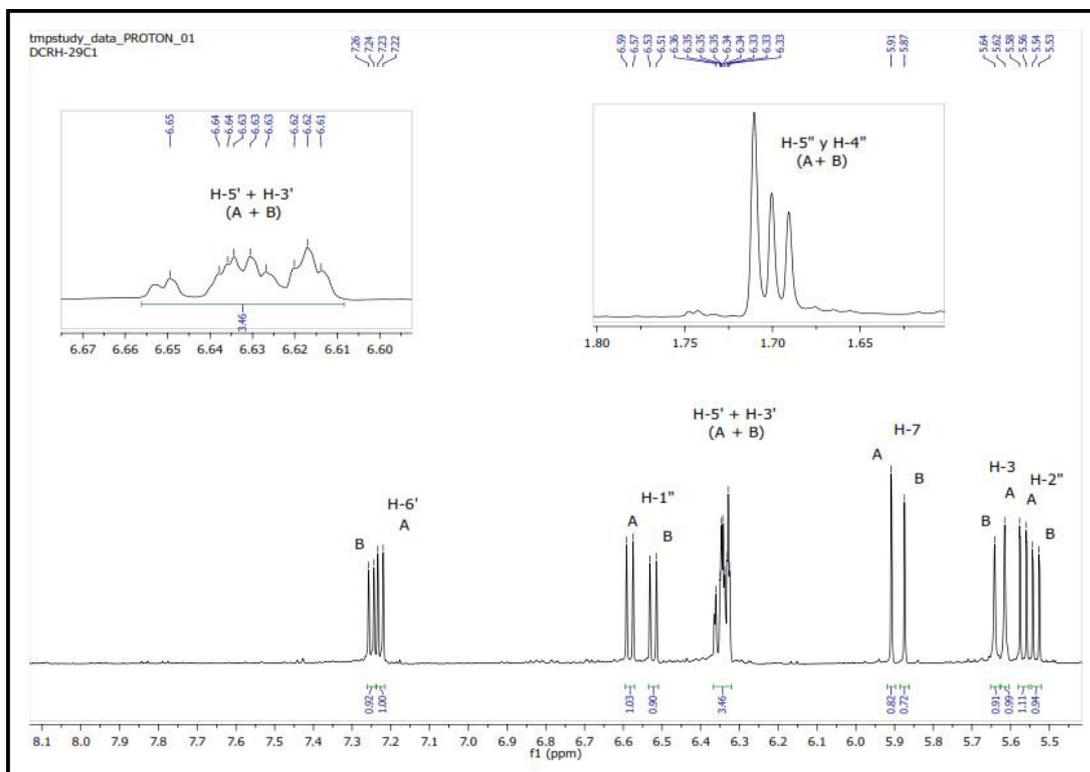


Figura 2.44. Espectro de RMN-¹H donde DCRH-29c1 y DCRH-29c2 son A y B, respectivamente.

En el espectro de RMN- ^{13}C (Figura 2.45) se observaron 19 señales para 20 carbonos para cada una de las dos moléculas en la fracción, estas señales sorprendentemente similares permitieron confirmar la naturaleza de origen flavonoide, con una señal de carbonilo, cuatro para carbonos alifáticos: dos metinos enlazados a oxígenos y dos de metilo, cinco de carbonos aromáticos enlazados a oxígeno, cuatro metinos aromáticos, tres carbonos aromáticos cuaternarios y un par de carbonos del doble enlace Z del grupo pirano.

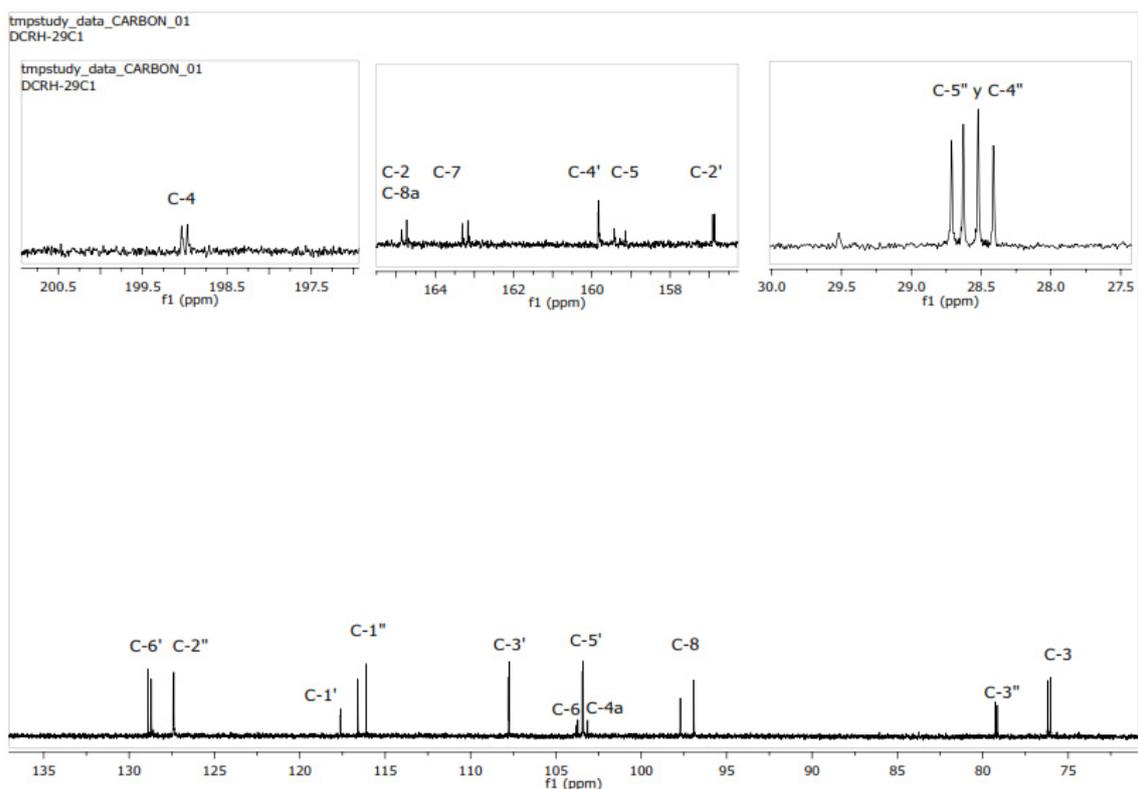


Figura 2.45. Espectro de RMN- ^{13}C de la fracción DCRH-29c.

El análisis de los espectros parecía informar de sólo nueve carbonos enlazados a H, de los cuales había un total de 13 hidrógenos, más los tres pertenecientes a hidroxilos fenólicos, conocidos gracias al experimento de masas de alta resolución; y pruebas de siliación de la muestra nos permitieron conocer tres sitios de siliación, dando un total de 16 átomos de hidrógeno en la estructura. Esto contradice la información obtenida por los experimentos de masas de alta resolución realizados a esta fracción, sobre 18 átomos de hidrogeno en la estructura. Se continuó la elucidación a través de la espectroscopia de RMN bidimensional y experimentos tipo DEPT con los cuales se propusieron las estructuras para los dos compuestos de la fracción DCRH-29c.

La propuesta de estructura para los compuestos de la fracción DCRH-29c (Figura 2.14) es la posible mezcla de estereoisómeros, donde el protón del carbono 3 cumple con lo observado en los experimentos de RMN; es decir un metino enlazado a oxígeno.

Los experimentos de HMBC ayudaron a darle un mejor sentido a las estructuras de la fracción DCRH-29c. La primera ampliación a destacar es la Figura 2.47, en donde se observa las correlaciones del H-8 con el anillo A, y del H-3 con el anillo B y C.

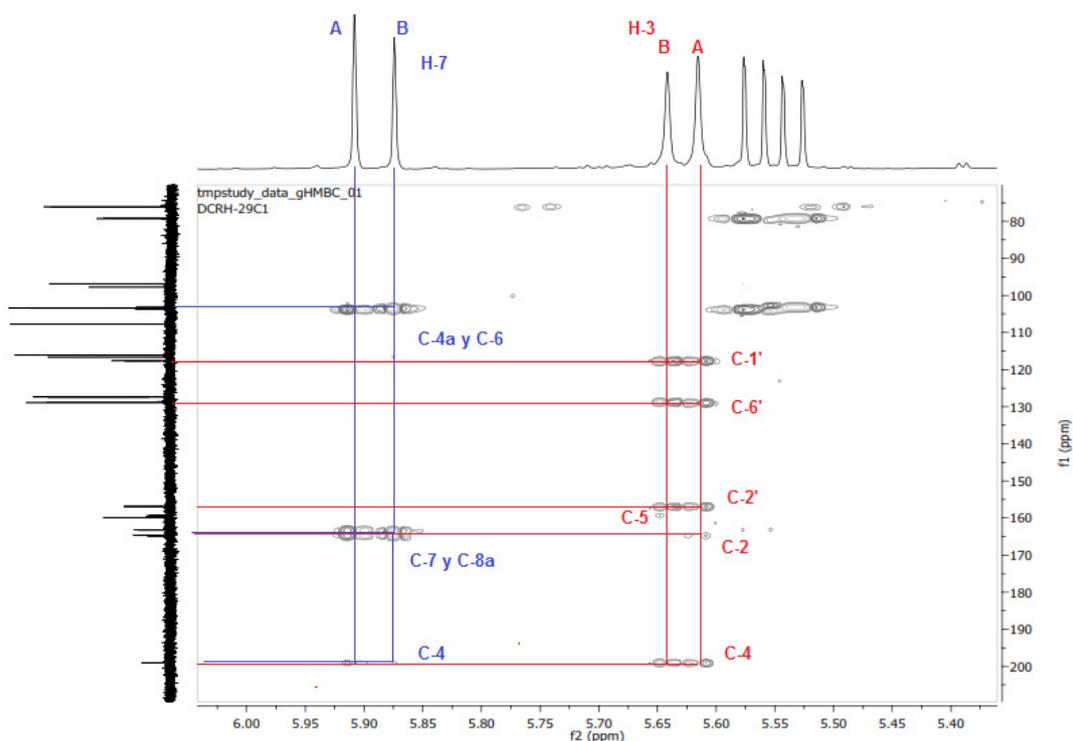


Figura 2.47. Ampliación del HMBC en las correlaciones de H-3 y H-7.

Otra ampliación del HMBC (Figura 2.48) revela las correlaciones del H-3', H-5' y H-6' con los carbonos del anillo B y el C-3 del anillo C.

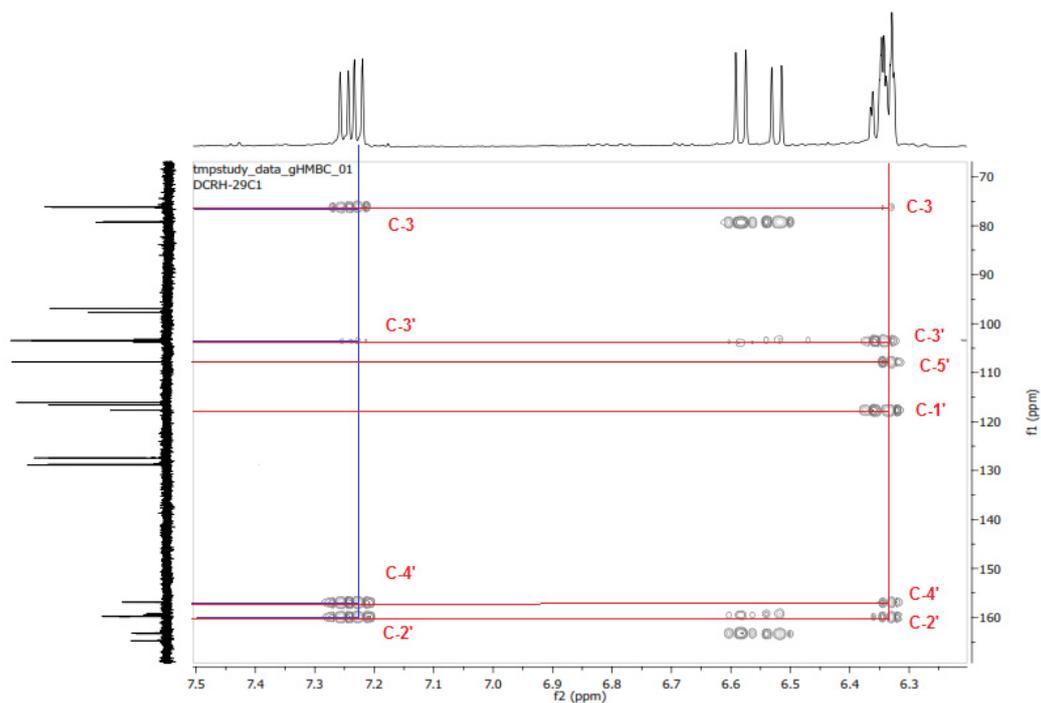


Figura 2.48. Ampliación del HMBC enfocando a las correlaciones de los protones del anillo B.

Para finalizar, en las Tablas 2.5 y 2.6, se enlistan las señales, con base en las estructuras propuestas para DCRH-29c1 y DCRH-29c2, respectivamente.

Tabla 2.5. Señales de RMN de DCRH-29c1.

#	^{13}C (150 MHz)	^1H (600 MHz)	HMBC
2	164.74 (s)		
3	76.04 (d)	5.61 (1H, s)	C1', C6', C2', C2 y C4
4	198.98 (s)		
5	159.12 (s)		
6	103.80 (s)		
7	163.14 (s)		
8	96.84 (d)	5.90 (1H, s)	C7, C6, C8a, C4a y C4
4a	103.72 (s)		
8a	164.74 (s)		
1'	117.64 (s)		
2'	159.80 (s)		
3'	103.40 (d)	6.32 (1H, <i>m</i>)	C3, C-1', C-2', C-4' y C-5'
4'	156.84 (s)		
5'	107.74 (d)	6.36 (1H, <i>m</i>)	C-1', C-2' y C-5'

Tabla 2.5 continuación. Señales de RMN de DCRH-29c1.

6'	128.89 (d)	7.25 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	C3, C2', C3' y C4'
1''	116.12 (d)	6.57 (1H, d, $J = 10.1$ Hz)	C-5, C-6, C-7 y C 3''
2''	127.38 (d)	5.56 (1H, d, $J = 10.1$ Hz)	C-6, C3 "", C4 "" y C 5''
3''	79.15 (s)		
4''	28.60 (c)	1.71-1.69 (m, 3H)	C7, C5'', C 3'', C 1'', C 2''
5''	28.50 (c)	1.71-1.69 (m, 3H)	C7, C4'', C 3'', C 1'', C 2''

Tabla 2.6. Señales de RMN de DCRH-29c2.

#	¹³ C (150 MHz)	¹ H (600 MHz)	HMBC
2	164.80 (s)		
3	76.19 (d)	5.63 (1H, s)	C 1'', C 6'', C 2'', C5 y C4
4	199.94 (s)		
5	159.40 (s)		
6	103.74 (s)		
7	162.98 (s)		
8	97.92 (d)	5.86 (1H, s)	C7, C6, C8a, C4a y C4
4a	103.15 (s)		
8^a	164.80 (s)		
1'	117.61 (s)		
2'	156.88 (s)		
3'	103.44 (d)	6.32 (1H, m)	C3, C-1', C-2', C-4' y C-5'
4'	159.82 (s)		
5'	107.77 (d)	6.36 (1H, m)	C-1', C-2' y C-5'
6'	128.71 (d)	7.23 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	C3, C2', C3' y C4'
1''	116.11 (d)	6.51 (1H, d, $J = 10.1$ Hz)	C 3'', C6, C5 y C7
2''	127.42 (d)	5.53 (1H, d, $J = 10.1$ Hz)	C4 "", C5 "", C 3'' y C 4a
3''	79.11 (s)		
4''	27.29 (c)	1.71-1.69 (m, 3H)	C7, C5'', C 3'', C 1'', C 2''
5''	26.98 (c)	1.71-1.69 (m, 3H)	C7, C4'', C 3'', C 1'', C 2''

Es importante aclarar que una búsqueda exhaustiva en la base de datos SciFinder[®] reveló que la mayoría de los flavonoides prenilados de tipo pirano que presentan la fórmula $C_{20}H_{18}O_6$ son chalconas y flavononas (Figura 2.49), y ninguna de las dos concuerda con lo presentado en los espectros de RMN.

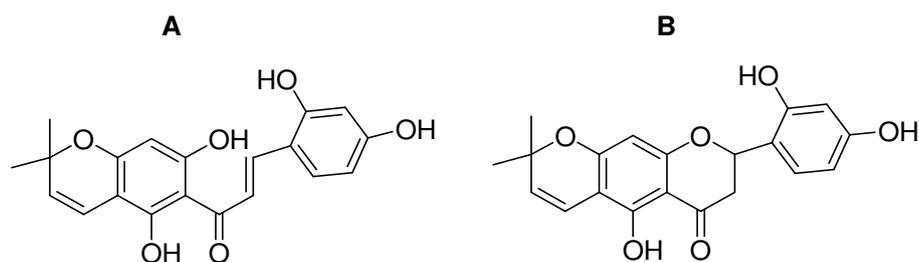


Figura 2.49. Estructuras de flavonoides prenilados con fórmula molecular $C_{20}H_{16}O_6$: chalconas (A) y flavanonas (B).

La orientación del anillo pirano, enlazado al C-6 y OH-7 del anillo A se observó similar a la cicloartocarpesina (compuesto 3), compuestos 8 y 9, es decir, con un origen biosintético similar a los compuestos aislados de la especie *D. contrajerva*. Al examinar la literatura, se observó que la mayoría de las prenilaciones de flavonoides aislados de especies del género *Dorstenia* es en la posición 6.

Se tendrá que separar las moléculas de la fracción para obtener la información espectroscópica de RMN de 1H , ^{13}C y los experimentos bidimensionales de RMN, para cada una de las dos moléculas. Una vez aisladas, existe la posibilidad de que cristalicen los compuestos y entonces realizar un análisis de su cristalografía por difracción de rayos X, lo cual permitirá comprobar su estructura.

También con las moléculas separadas es importante complementar su información espectroscópica con experimentos de tipo NOESY, para comprobar las interacciones a través del espacio de los núcleos de átomos cercanos (A, en Figura 2.50) y no sólo a través de los enlaces. Otra opción es usar otro disolvente deuterado, como el $DMSO-d_6$, debido a que éste disminuye el intercambio protón-deuterio, para que se pueda observar el H en el OH del carbono 5, formando un puente de hidrógeno con el carbonilo (B y C, Figura 2.50), lo cual es importante para conocer con exactitud la conectividad del anillo pirano al anillo A.

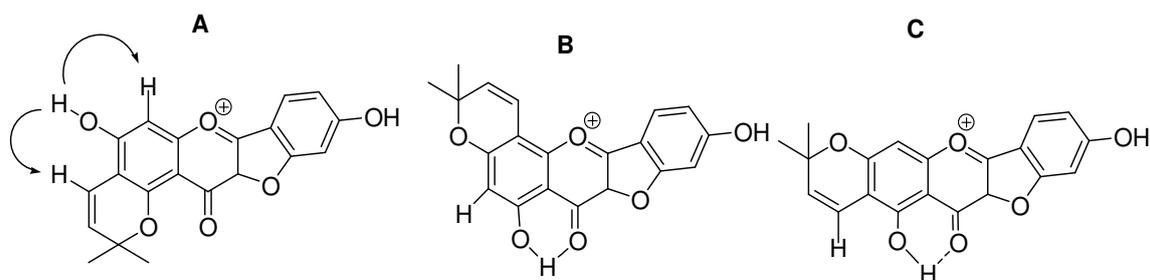


Figura 2. 50. Posible conectividad del anillo pirano en el anillo A.

2.3.7. Identificación del compuesto 6 (DCRH-53a1, dorsteniol)

El compuesto tiene un R_f en CCD Hx/An (7:3, 3 \times), con una fluorescencia característica azul clara bajo luz UV de 254 nm (Figura 2.51).



Figura 2.51. CCD de la fracción DCRH-53a1 bajo UV de 254 nm, con un R_f de 0.29 en Hx/An (7:3) corrida tres veces.

Con el espectro de infrarrojo (Figura 2.52) se comprobó que la estructura base del compuesto corresponde al de una furanocumarina con al menos un grupo hidroxilo, debido a la presencia de la banda de 3384 cm^{-1} por estiramiento O-H, la banda 1707 cm^{-1} correspondiente de C=O de tipo lactona, las bandas de 1625 cm^{-1} y 1566 cm^{-1} por estiramiento C=C y la banda de 1136 cm^{-1} por estiramiento de C-O.

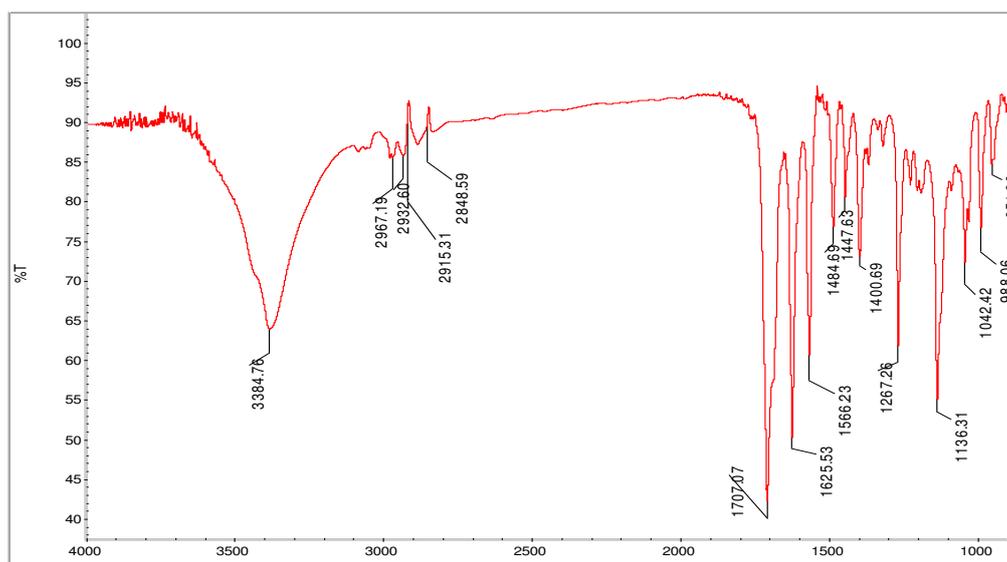


Figura 2.52. Espectro de infrarrojo de la fracción DCRH-53a1.

El espectro de masas (Figura 2.53), el cual se obtuvo por medio de una siliación, reveló que la estructura posee dos grupos OH, y tanto su fragmentación como su peso

concuerdan con una dihidrofuranocumarina previamente reportada (Tovar-Miranda *et al.*, 1998).

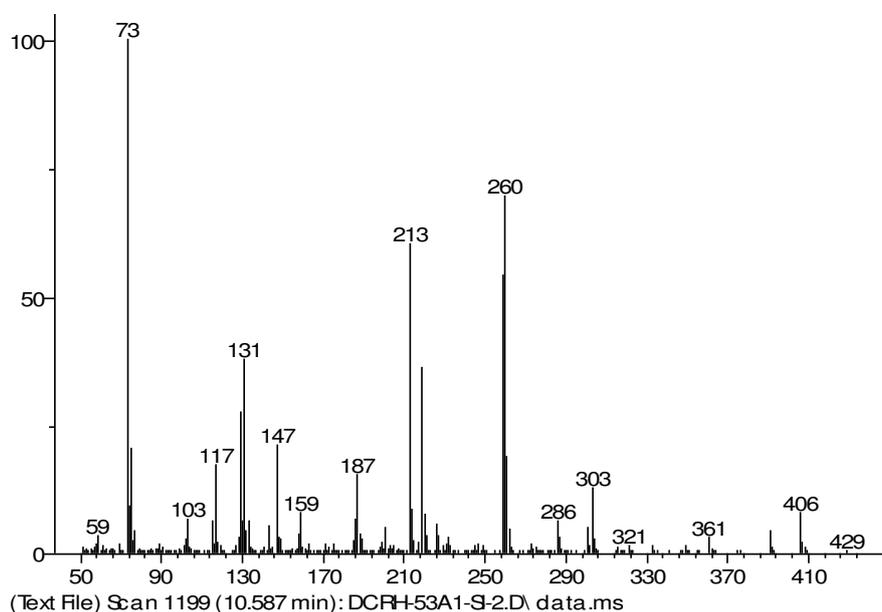


Figura 2.53. Espectro de masas del compuesto DCRH-53a1 sililado.

En cuanto a su fragmentación (Figura 2.54), se observa un ion de 260 m/z que corresponde al ion molecular 406 m/z después de la pérdida de los dos grupos silanos. La pérdida de C=O más OH en la parte del isoprenilo, genera el fragmento de 213 m/z . El ion de 213 m/z pierde un fragmento de H₂C=CH generando al de 187 m/z y éste a su vez se fragmenta consecutivamente con pérdidas de CO características del heterociclo furanocumarina.

En el espectro de RMN-¹H del compuesto 6 (Figura 2.55) se observan las señales del anillo de la lactona; ahí se encuentran los protones H-10 y H-9, cada uno como una señal doble con una constante de acoplamiento de 9.5 Hz. Las otras dos señales aromáticas son simples y pertenecen a los protones de H-4 y H-7.

Las señales de los protones H-3a y H-3b presentan un acoplamiento con el protón H-2 de aproximadamente 9 Hz, que corresponde con la saturación en las posiciones 2 y 3 de una dihidrofuranocumarina y que se conoce por ruta biogenética estar enlazada al carbono 2 un segmento del grupo isopreno, del cual se observan las señales del H-2'a y H-2'b, señales de tipo doble de dobles, con un desplazamiento de 3.72 y 3.52 ppm que corresponden a los protones de un metileno enlazado a OH. El metilo C-1'' está

enlazado a un carbono cuaternario del grupo isopreno, apareciendo como señal simple.

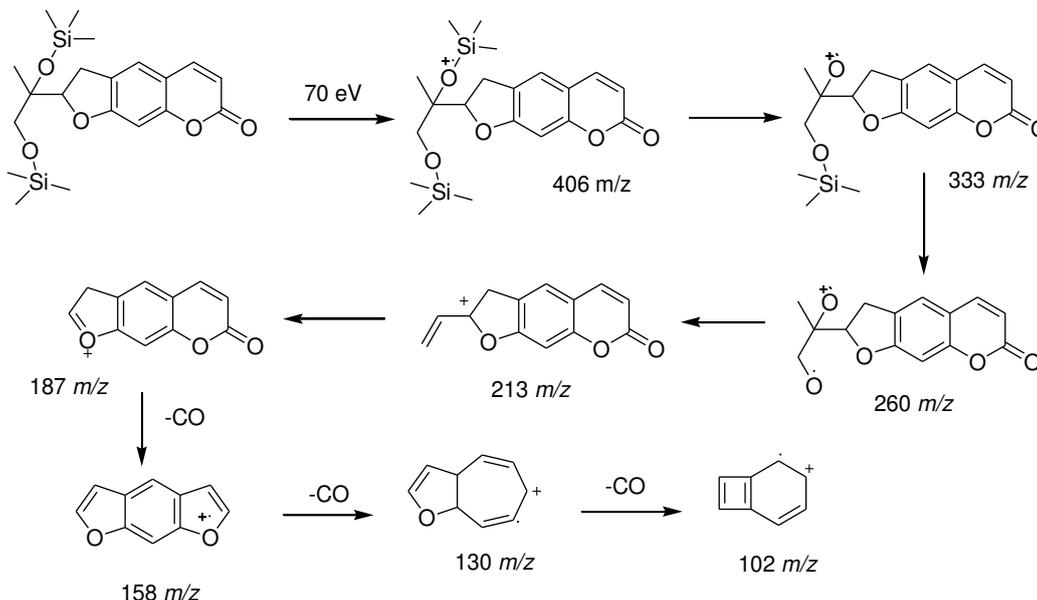


Figura 2.54. Fragmentación propuesta del compuesto DCRH-53a1 sililado.

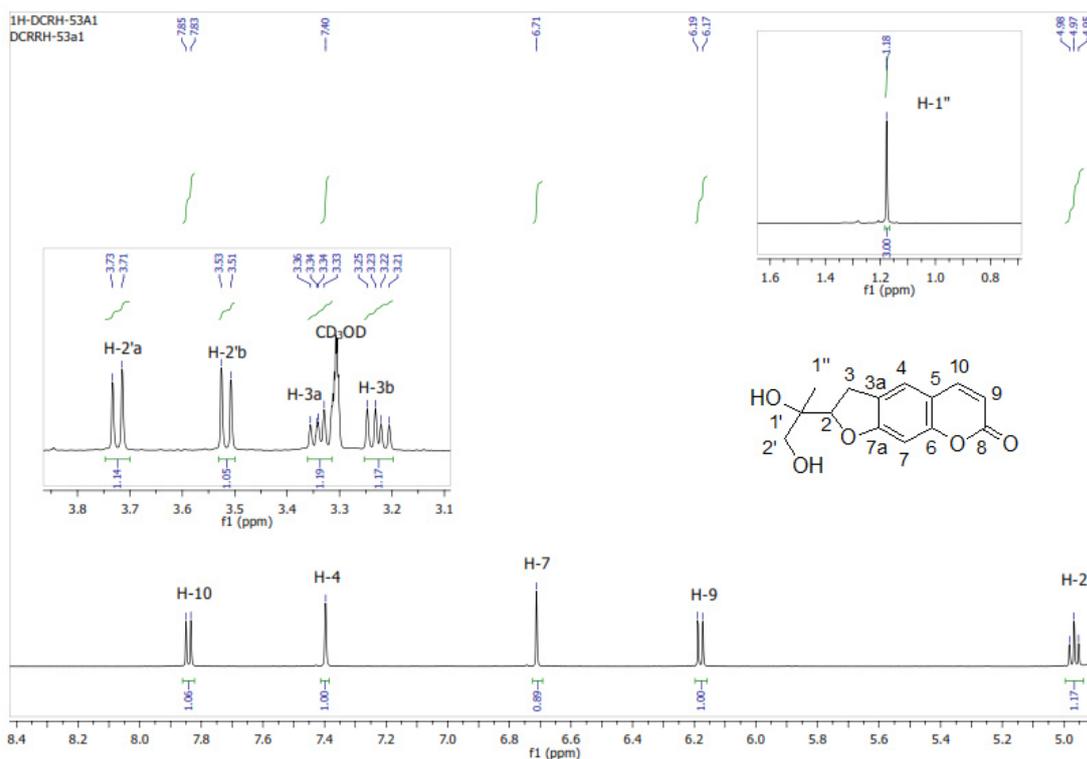


Figura 2.55. Espectro de RMN-¹H del compuesto 6, dorsteniol (600 MHz, CD₃OD).

En el espectro de RMN-¹³C (Figura 2.56) aparecieron 14 señales de carbonos que corresponden a nueve carbonos del anillo cumarina, más cinco señales de carbonos

alifáticos que provienen del grupo isopreno que forma el anillo furano, sustituido en la posición 2 por un grupo.

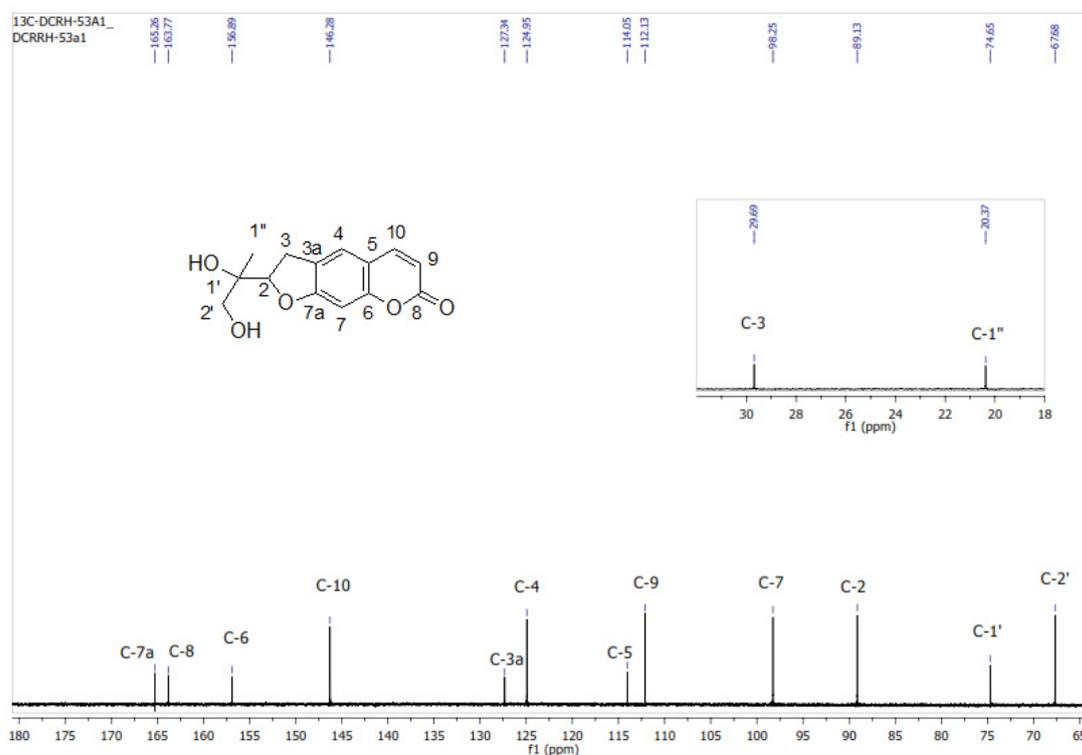


Figura 2.56. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 6, dorsteniol (150 MHz, CD_3OD).

Las señales anteriormente descritas en los espectros de RMN- ^1H y ^{13}C indican que su estructura es la misma que la hidrofuranocumarina dorsteniol (Tovar-Miranda *et al.*, 1998). En la Tabla 2.7 se compara la información espectroscópica de RMN de ^1H y ^{13}C de la molécula DCRH-53a1 y el dorsteniol.

Tabla 2.7. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C del compuesto DCRH-53a1 y dorsteniol.

#	DCRH-53a1 (metanol- <i>d</i> ₄)		Dorsteniol (CDCl ₃)	
	¹ H (600 MHz)	¹³ C (150MHz)	¹ H (300 MHz)	¹³ C (75MHz)
2	4.97 (1H, t, <i>J</i> = 8.9 Hz)	89.1 (d)	4.89 (1H, t, <i>J</i> = 9.0 Hz)	87.7 (d)
	H-3a, 3.34 (1H, dd, <i>J</i> = 15.7, 9.4, Hz)		H-3a, 3.36 (1H, ddd, <i>J</i> = 16.0, 9.0, 1.4 Hz)	
3	H-3b, 3.23 (1H, dd, <i>J</i> = 15.7, 9.4 Hz)	29.6 (t)	H-3b, 3.20 (1H, ddd, <i>J</i> = 16.0, 9.0, 1.4 Hz)	29.0 (t)
3a	-	127.3 (s)	-	124.6 (s)
4	7.40 (1H, s)	124.9 (d)	7.24 (1H, s)	123.4 (d)
5	-	114.0 (s)	-	112.9 (s)
6	-	156.8 (s)	-	155.5 (s)
7	6.71 (1H, s)	98.2 (d)	6.75 (1H,s)	98.1 (d)
7a	-	165.2 (s)	-	162.9 (s)
8	-	163.7 (s)	-	161.3 (s)
9	6.18 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz)	112.1 (d)	6.23 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz)	112.3 (d)
10	7.60 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz)	146.2 (d)	7.60 (1H, d, <i>J</i> = 9.5 Hz)	143.6 (d)
1'	-	74.5 (s)	-	72.6 (s)
	H-2'a, 3.72 (1H, d, <i>J</i> = 10.9 Hz)		H-2'a, 4.34 (1H, dd, 4.16, <i>J</i> = 11.4 Hz)	
2'	H-2'b, 3.52 (1H, d, <i>J</i> = 10.9 Hz)	67.6 (t)	H-2'b, 4.12 (1H, dd, 4.16, <i>J</i> = 11.4 Hz)	68.3 (t)
1''	1.18 (3H,s)	20.3 (q)	1.25 (3H, s)	20.2 (q)

2.3.8. Identificación del compuesto 7 (DCRH-54a1, xanthoarnol)

El compuesto DCRH-54a1 tiene un R_f de 0.48 en CCD Hx/An (3:1, 3 \times), con una fluorescencia característica azul clara bajo luz UV de 365 nm (Figura 2.57).



Figura 2.57. CCD de la fracción DCRH-54a1 bajo UV de 365 nm con el compuesto dorsteniol de referencia en el carril izquierdo.

Se realizó una análisis de espectrometría de masas (Figura 2.58) de la muestra sililada y reveló un espectro muy similar al dorsteniol, por lo cual se infiere que estamos ante un isómero del dorsteniol.

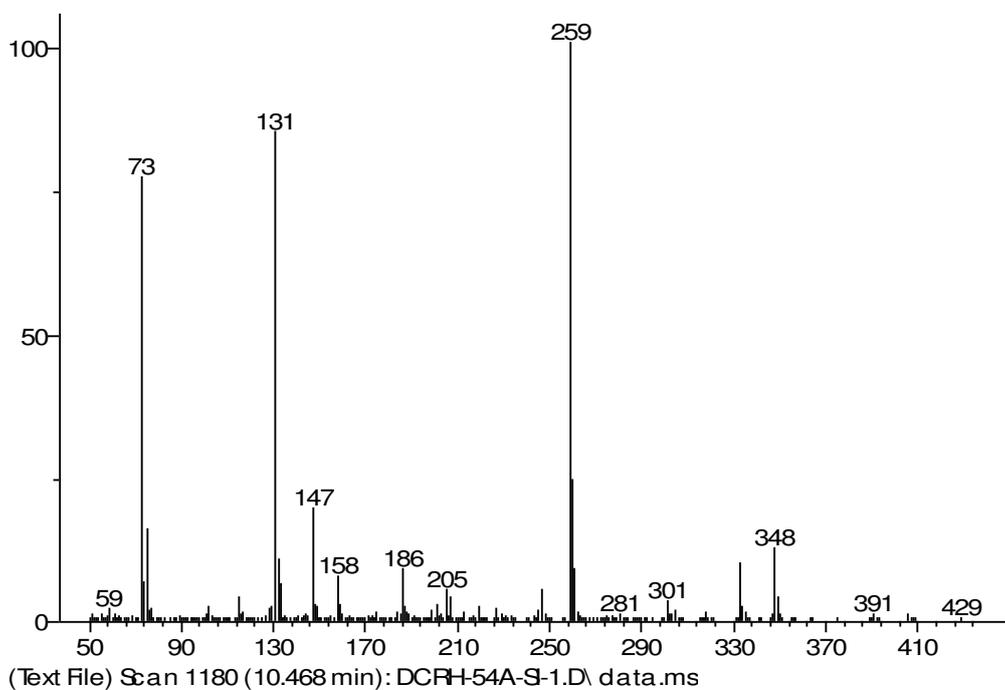


Figura. 2.58. Espectro de masas de la muestra DCRH-54a1 sililada.

El ion molecular correspondiente no se logra observar, pero aparecen iones secundarios por la fragmentación de uno de los dos grupos silano, luego se genera un ion análogo al ion molecular sin sililar del dorsteniol (259 m/z) y finalmente se genera el fragmento de 186 m/z característico de las furanocumarinas (Figura 2.59).

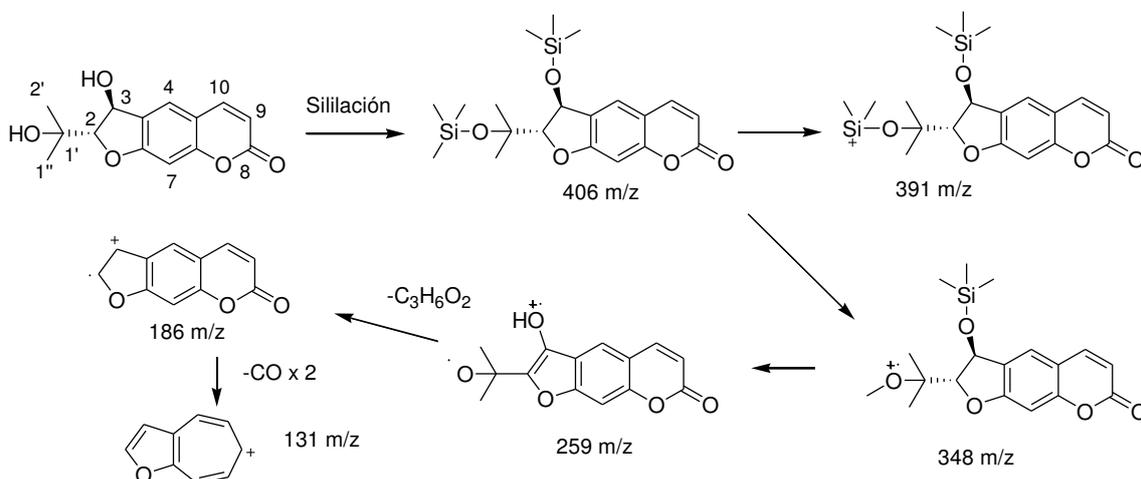


Figura 2.59. Propuesta de fragmentación del compuesto DCRH-54a1 sililado.

Con los espectros de RMN de protón y carbono se logró identificar el compuesto DCRH-54a1 como xanthoarnol. El espectro de protón (Figura 2.60) muestra las diferencias entre el xanthoarnol y el dorsteniol: el espectro de xanthoarnol presenta dos metilos, H-1'' y H-2'', y no presenta metilenos, pero sí dos metinos enlazados a un átomo de oxígeno, H-2 (δ 5.40) y H-3 (δ 4.00). Además, la J de 4.1 Hz de los protones H-2 y H-3 es característica para este diastereoisómero, en comparación de la J de 6.5 Hz del smyrindiol (Zou *et al.*, 2007).

Por otro lado, con el espectro de carbono se confirmó los 14 carbonos (Figura 2.55) correspondientes al isómero de dorsteniol, el xanthoarnol, nueve carbonos sp^2 provenientes de la parte cumarina, tres carbonos sp^3 enlazados a un átomo de oxígeno y dos metilos. La asignación total y su comparación con la literatura se presentan en la Tabla 2.8.

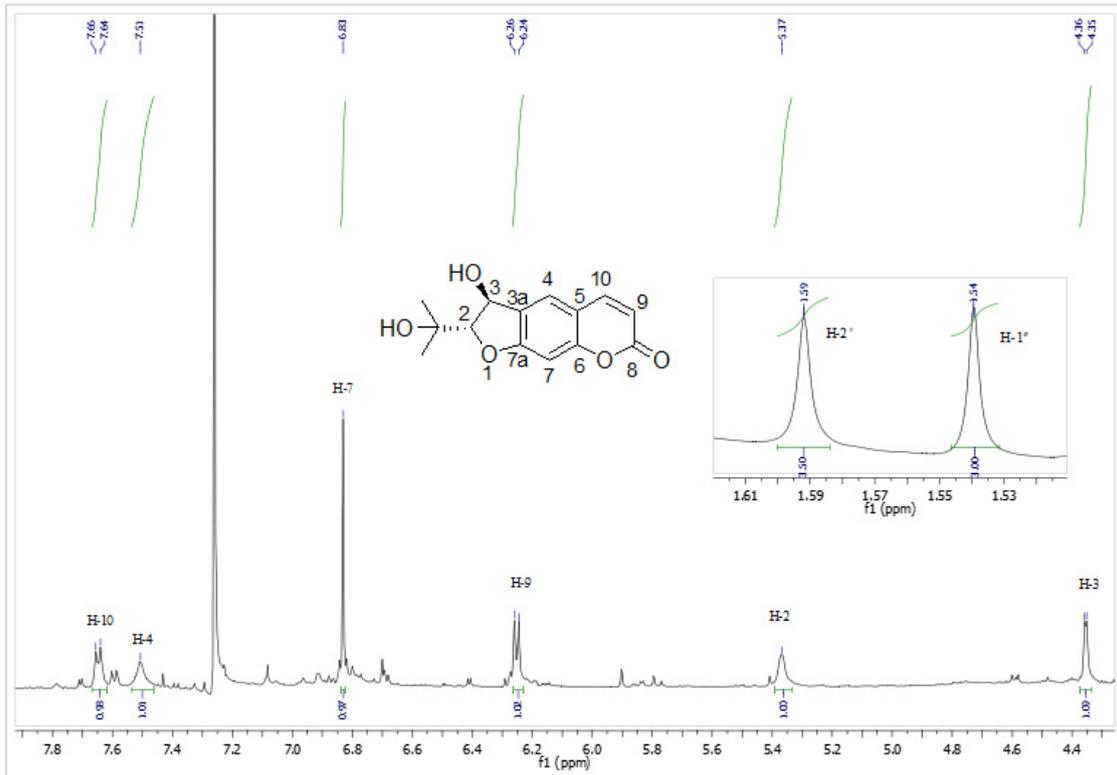


Figura 2.60. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 7, xanthoarnol (600 MHz, CDCl_3).

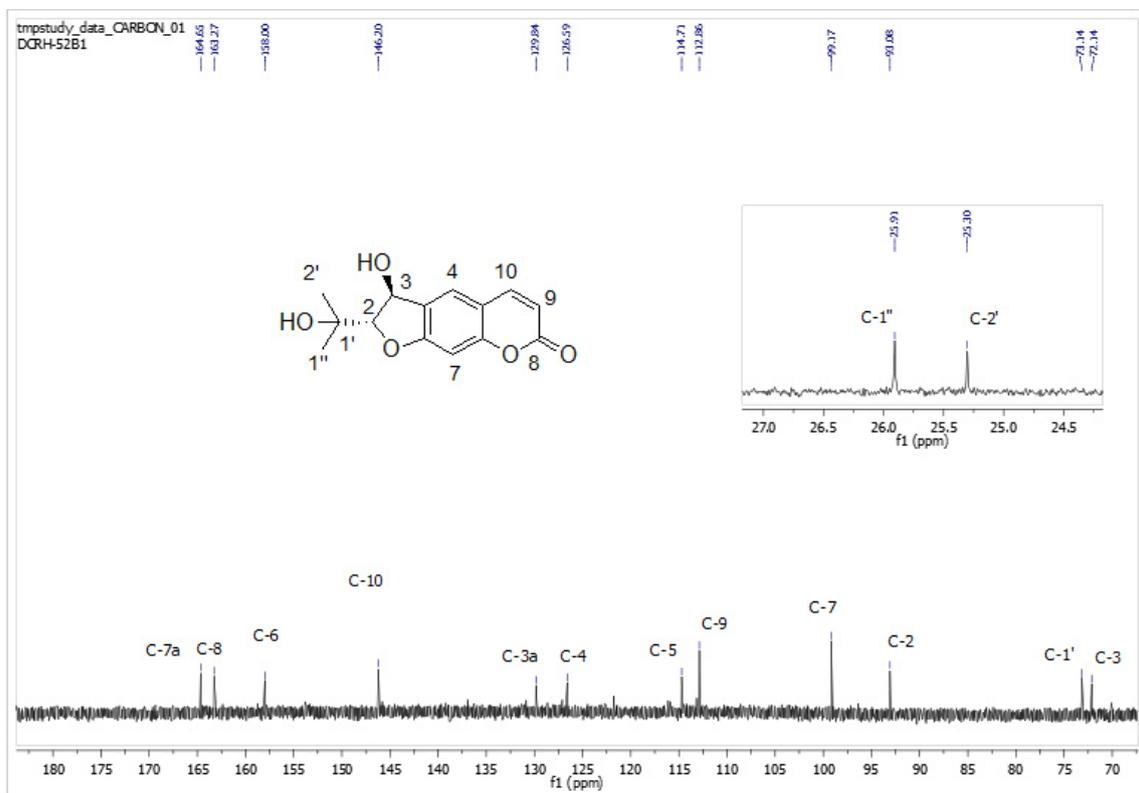


Figura 2.61. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 7, xanthoarnol (150 MHz, CD_3OD).

Tabla 2.8 Comparación de señales de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto 7 y xanthoarnol.

#	DCRH-54a1		Xanthoarnol (acetona- d_6) ¹	
	^1H (CDCl_3) (600 MHz)	^{13}C (CD_3OD) (150MHz)	^1H (300 MHz)	^{13}C (75 MHz)
2	5.37 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)	93.3 (d)	5.46 (1H, d, $J = 4.3$ Hz)	90.0 (d)
3	4.36 (1H, d, $J = 4.1$ Hz)	72.1 (t)	4.41 (1H, d, $J = 4.3$ Hz)	70.3 (t)
3 ^a	-	129.8 (s)	-	128.4 (s)
4	7.51 (1H, s)	126.6 (d)	7.62 (1H, s)	125.1 (d)
5	-	114.7 (s)	-	112.9 (s)
6	-	156.8 (s)	-	156.7 (s)
7	6.83 (1H, s)	99.1 (d)	6.71 (1H, s)	98.9 (d)
7 ^a	-	164.6 (s)	-	163.7 (s)
8	-	163.2 (s)	-	160.1 (s)
9	6.25 (1H, d, $J = 9.1$ Hz)	112.8 (d)	6.18 (1H, d, $J = 9.1$ Hz)	112.9 (d)
10	7.65 (1H, d, $J = 9.3$ Hz)	146.2 (d)	7.62 (1H, d, $J = 9.1$ Hz)	144.2 (d)
1'	-	73.1 (s)	-	71.3 (s)
2'	1.59 (3H, s)	25.9 (t)	1.60 (3H, s)	25.0 (t)
1''	1.54 (3H, s)	25.3 (q)	1.55 (3H, s)	25.0 (q)

2.3.9 Identificación del compuesto 8 (DCRH-55a1, dorsjervin A)

El compuesto tiene apariencia aceitosa y es de color rojo oscuro. Este metabolito posee un R_f de 0.3 en Hx/An (3:1, 3 \times) en CCD, como se observa en la Figura 2.62. Este mismo R_f fue reportado por Medrano-Nahuat (2014), para un compuesto obtenido en la especie en un extracto metanólico a partir del rizoma de *D. contrajerva*.

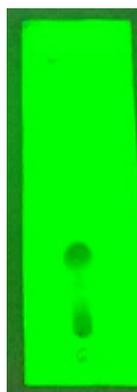


Figura 2.62. CCD de dorsjervin A, bajo UV a 254 nm, con un R_f de 0.3 en Hx/An (7:3, 3 \times).

El análisis del espectro de masas (Figura 2.63) confirmó la identidad del compuesto 8 como contrajervatriol (Medrano Nahuat, 2014), en el cual se observa el ion molecular como pico base a 354 m/z , con un tiempo de retención de 16.88 minutos.

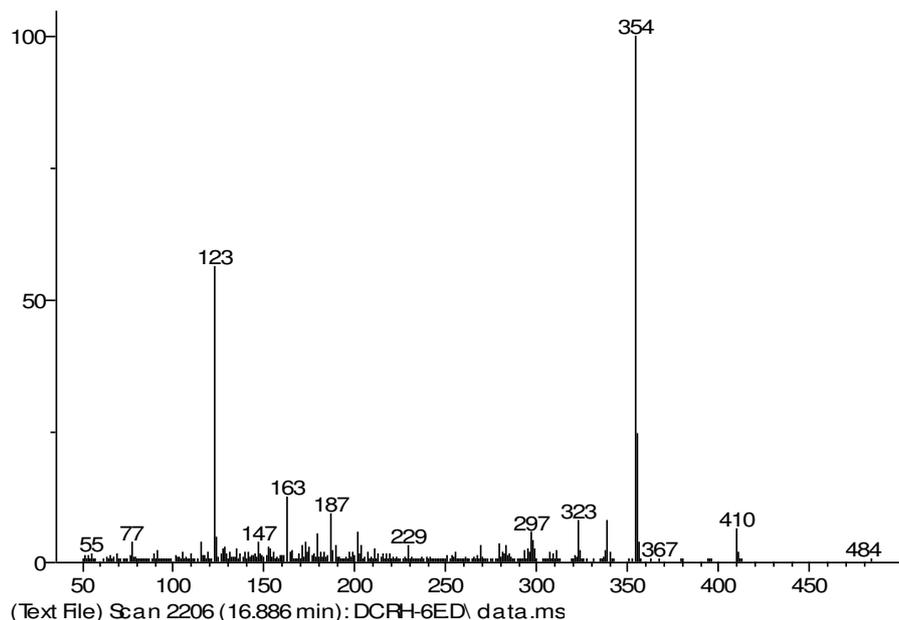


Figura 2.63. Espectro de masas de DCRH-55a1, compuesto 8.

En la propuesta de fragmentación de DCRH-55a1 (Figura 2.64) se encuentra el ion molecular de 354 m/z , y el fragmento de 123 m/z le corresponde a la unidad de 3',4'-dihidroxibencilo. Estos dos grupos OH en posición *orto* generan un aducto con grupos tipo silano de la fase estacionaria, produciendo el ion de 410 m/z . El fragmento de 337 m/z es generado por la pérdida de siloxano, y al perder un metileno se forma el ion de 323 m/z .

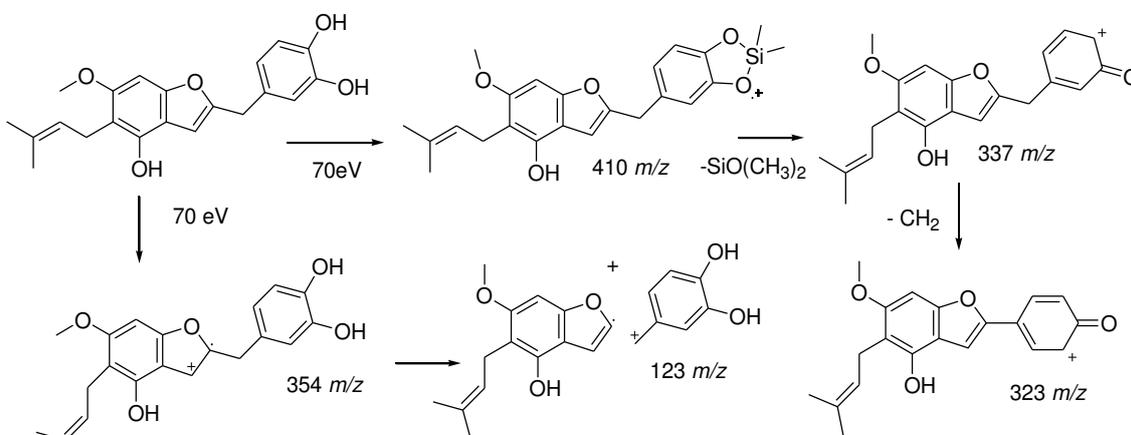


Figura 2.64. Propuesta de fragmentación del compuesto dorsjervin A (DCRH-55a1).

Su análisis de masas de alta resolución por impacto electrónico (Figura 2.65) mostró el ion molecular de 354.1467 m/z , que concuerda con la fórmula molecular de $C_{21}H_{22}O_5$.

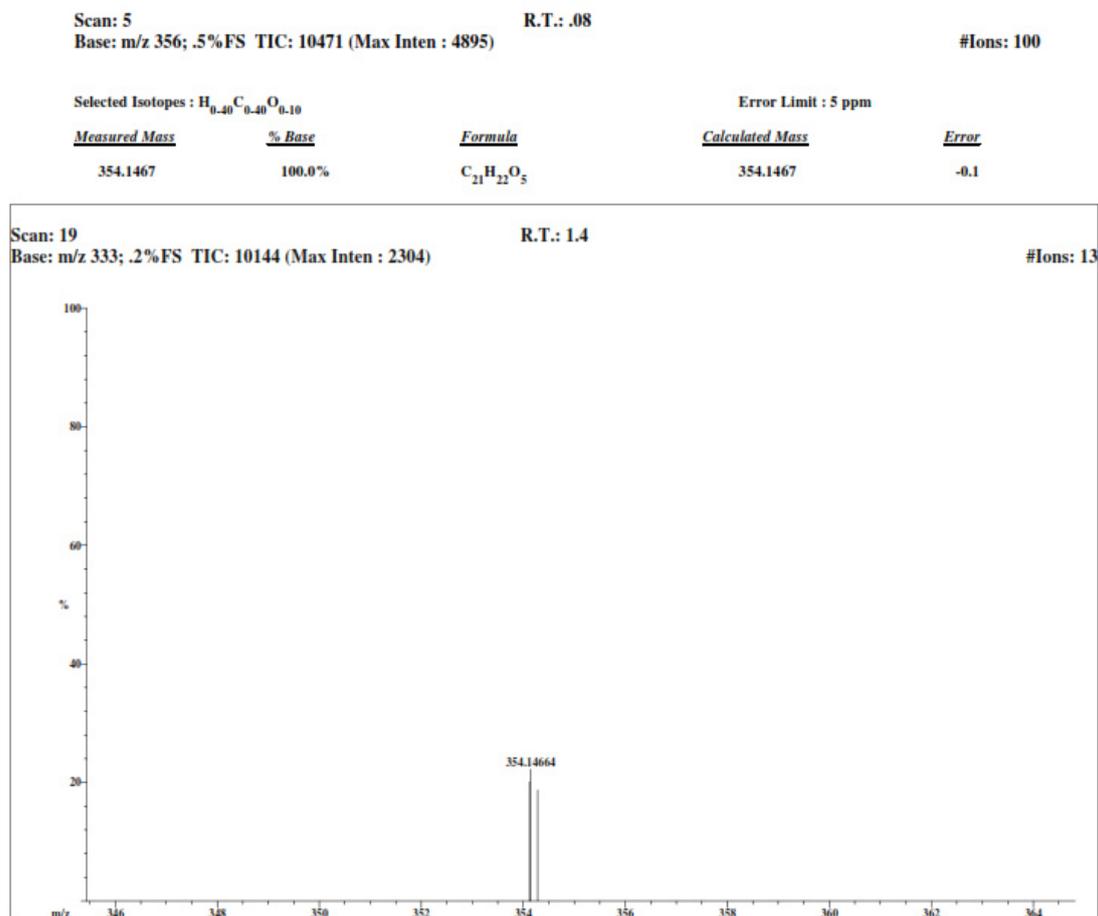


Figura 2.65. Espectro de masas de alta resolución DCRH-55a1.

El espectro de UV en metanol (Figura 2.66) presentó $\lambda_{\text{máx}}$ de: 251, 289 y 356 nm, $\lambda_{\text{mín}}$: 239, 270 y 320 nm. Comparando con la literatura, existe un alto grado de similitud con el 2-bencil-benzofurano (**A**, Figura 2.67; Franke *et al.*, 2001), con un $\lambda_{\text{máx}}$ (metanol): 205, 249 y 287 nm y una $\lambda_{\text{mín}}$ (metanol): 235 y 277 nm. Los espectros de UV de los 2-bencil-benzofuranos son incluso distintos a metabolito similares como los 2-aril-benzofuranos (Kapche *et al.* 2009).

Cabe mencionar que la cresta de 356 nm no se observó en una primera lectura, por lo cual es probable que esta cresta se relaciona a una fotorreacción producida por las radiación UV, probablemente una cicloadición [2+2] del anillo de furano, reacción característica de las furanocumarinas donde se rompe el doble enlace del anillo furano de dos furanocumarinas y se genera dos enlaces covalentes entre estas dos,

formando un ciclobutano entre ambas; por lo tanto una nueva molécula que puede absorber radiación UV (Dewick, 2002).

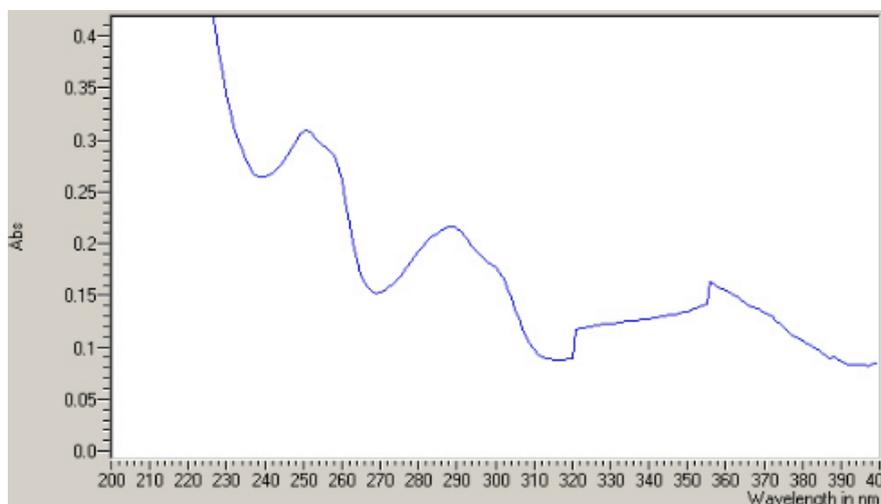


Figura 2.66. Espectro de UV-vis de DCRH-55a1, compuesto 8.

El espectro de infrarrojo (Figura 2.67) muestra las bandas esperadas para un compuesto aromático sustituido por grupos hidroxilos, que concuerda con la estructura propuesta con tres grupos hidroxilo de dorsjervin A; aparece una banda ancha por los estiramientos O-H en la región de 3500 a 3300 cm^{-1} , en la región entre 1608-1427 cm^{-1} se observan bandas características al estiramiento entre los dobles enlaces entre C=C aromáticos, 1608, 1519, 1447 y 1427. La banda por estiramiento C-O está a 1096 cm^{-1} . Las flexiones fuera del plano tipo C-H del anillo aromático en la región dactilar, 968 cm^{-1} y 857 cm^{-1} , revelan una sustitución 3',4' de los grupos OH en el anillo.

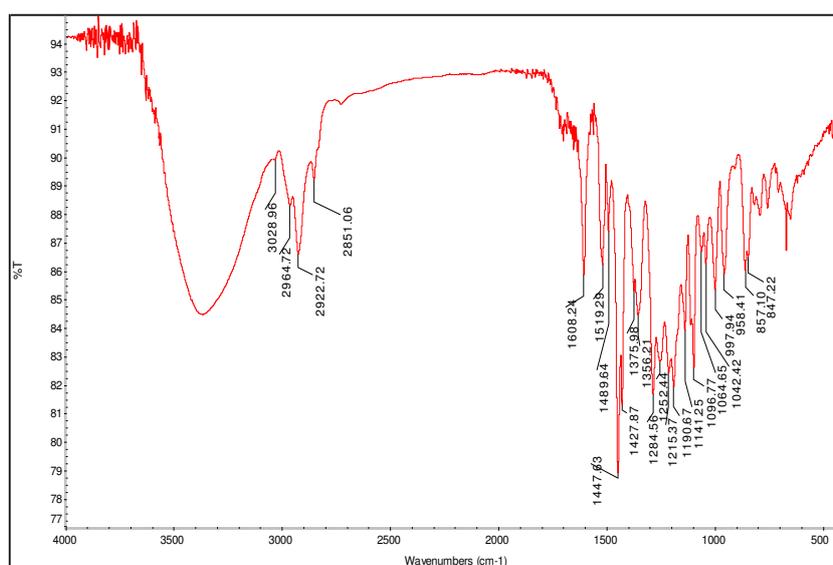


Figura 2.67. Espectro de infrarrojo de DCRH-55a1, compuesto 8.

En el espectro de RMN- ^1H (Figura 2.68) se observa la presencia de dos metilos ambos de la unidad isoprenilo (H-4'', H-5'') y un grupo metoxilo (-OCH₃). Se observan dos metilenos, el primero es el H-1'', una señal doble por su acoplamiento con H-2'' y por lo tanto es parte de la unidad isoprenilo y el segundo, una señal simple perteneciente al H-2¹, un metileno bencílico que hace un puente entre el heterociclo aromático de tipo benzofurano sustituido y un fenilo disustituido por hidroxilos (-OH).

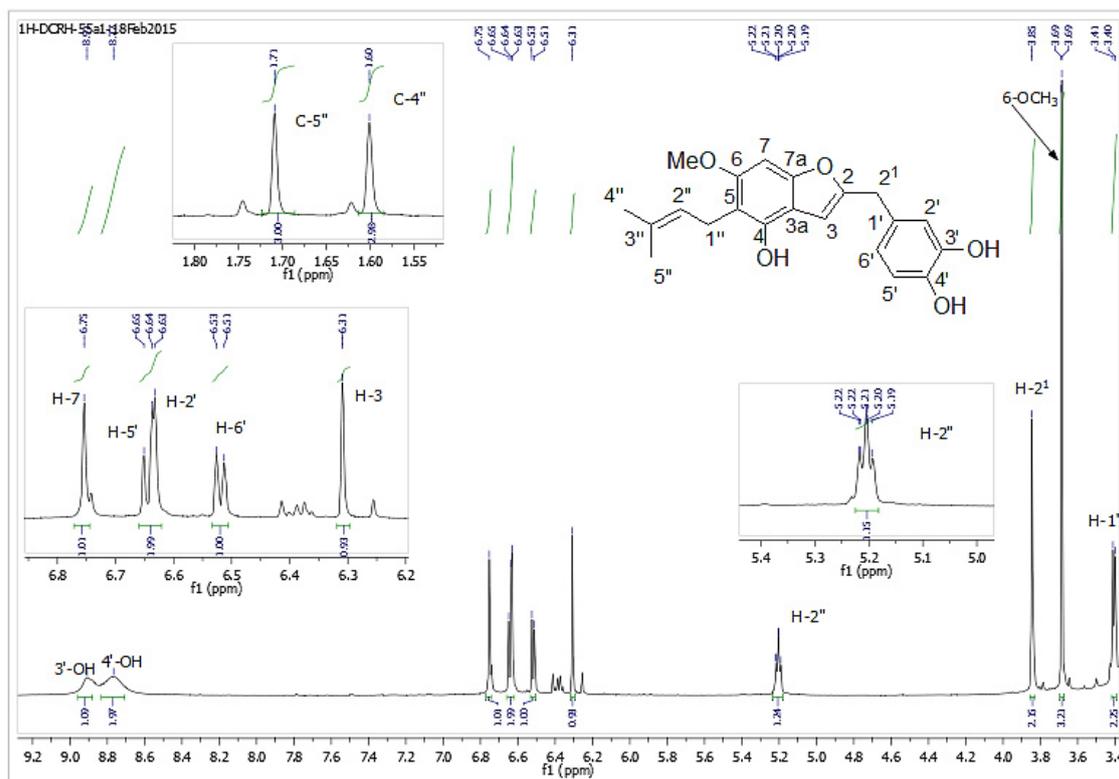


Figura. 2.68. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 8 (600 MHz, DMSO- d_6).

También se observan señales de cinco protones aromáticos, típico de los protones H-2', H-5' y H-6' del grupo 3',4'-dihidroxibencilo (Luo *et al.*, 2014), más dos protones del benzofurano que corresponden a H-3 y H-7.

En el espectro de RMN- ^{13}C se observan las 21 señales de carbono (Figura 2.69), seis pertenecientes a carbonos aromáticos enlazados a oxígeno (C-2, C-7a, C-4, C-6, C-3' y C-4'); cinco metinos aromáticos (C-3, C-7, C-2', C-5' y C-6') y cuatro carbonos cuaternarios aromáticos (C-2, C-5, C-3a y C-1'). También se detectó la señal del carbono alifático del grupo bencilo, C-2, y la de los cinco carbonos característicos de un grupo isoprenilo (C-1'' a C-5''). En el presente trabajo se está proponiendo una estructura distinta a la previamente reportada por Medrano Nahuat (2014) (Figura 2.70), con base en los datos espectroscópicos resumidos en las Tablas 2.9 y 2.10, y

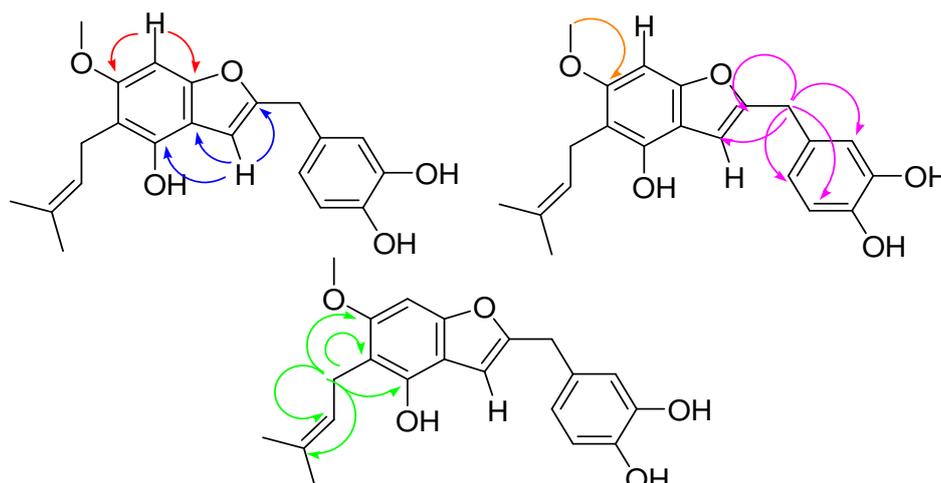


Figura 2.71. Correlaciones principales en el experimento de HMBC.

Tabla 2.9. Resumen de las correlaciones observadas en el experimento HMBC (600 MHz, DMSO- d_6).

Protón	Carbono-13
H-3	C-3a (123.4), C-4 (146.6) y C-2 (158.1)
H-7	C-6 (142.8), C-7a (146.6)
H-2 ¹	C-3 (102.6), C-5' (119.3), C-6' (115.4), C-1' (128.3) y C-2 (158.1)
CH ₃ O-	C-6 (142.8)
H-1''	C-2'' (122.1), C-3'' (131.2), C-4 (146.6), C-5 (117.9) y C-6 (142.8)
H-2' y H-5'	C-6' (119.3), C-1' (128.4), C-4' (143.8) y C-3'(145.1)
H-6'	C-5' (115.4) y C-4' (143.8)

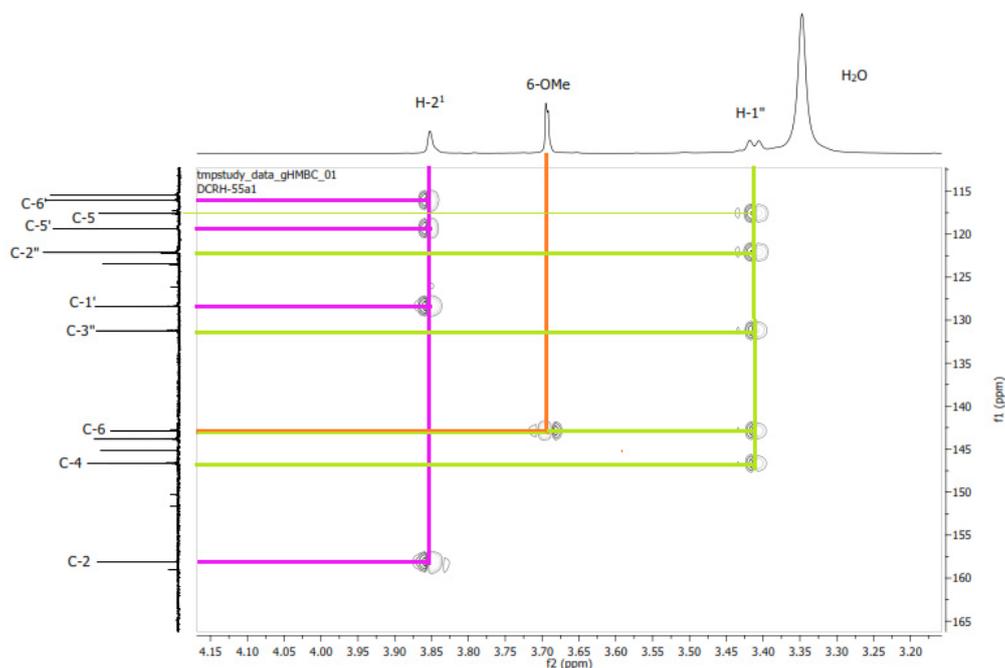


Figura 2.72. Ampliación del HMBC del compuesto 8, de las correlaciones de H-1'', H-2¹ y 6-OMe.

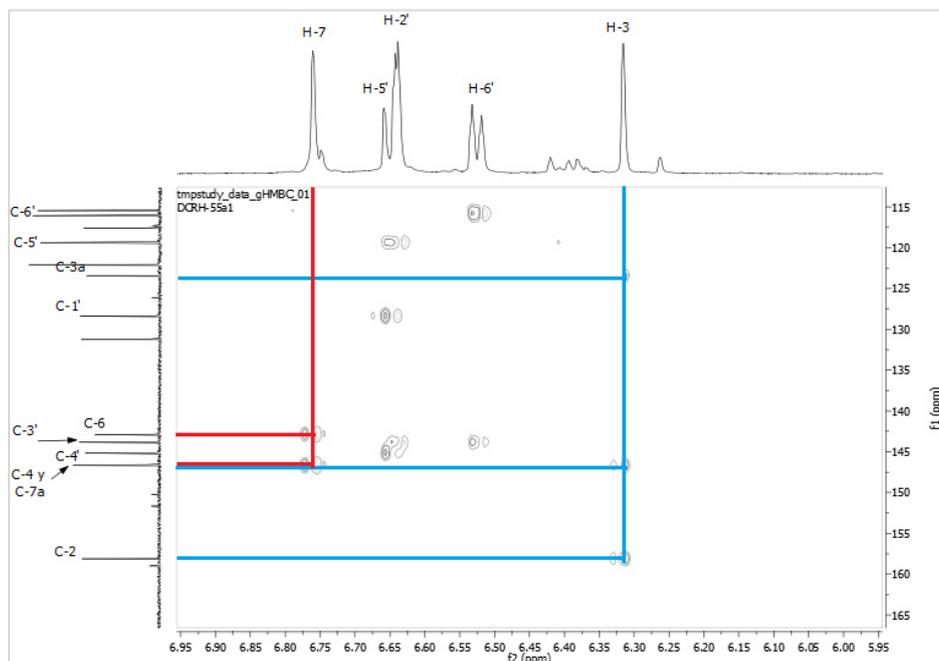


Figura 2.73. Ampliación del HMBC del compuesto 8, de las correlaciones de H-3 y H-7.

Se realizó un experimento de NOESY-1D selectivo para confirmar que el grupo 6-OCH₃ está cercano a H-7, ya que el experimento permitió irradiar un protón (H-7) de dorsjervín A y observar cuál es la señal o señales que recibe parte de la polarización del núcleo irradiado a un núcleo cercano (hasta 5 a 6 Å) en el espacio, lo cual se observa con la señal (6-OCH₃) en el espectro (Figura 2.74).

Tabla 2.10 Señales de RMN-¹H y ¹³C correspondientes al compuesto 8, dorsjervín A.

#	Contraejervatriol (metanol-d ₄) ¹		DCRH-55a1 (DMSO-d ₆)	
	RMN- ¹ H δ (600 MHz)	RMN- ¹³ C δ (150 MHz)	RMN- ¹ H δ (600 MHz)	RMN- ¹³ C δ (150 MHz)
2	-	158.4 (s)	-	158.1 (s)
3	6.19 (1H, s)	102.2 (d)	6.31 (1H, s)	102.6 (d)
4	-	147.6 (d)	-	146.6 (s)
5	-	118.0 (s)	-	117.9 (s)
6	-	142.9 (s)	-	142.8 (s)
7	6.73 (1H, s)	102.9 (d)	6.75 (1H, s)	103.4 (d)
3a	-	124.2 (s)	-	123.4 (s)
7a	-	146.1 (s)	-	146.6 (s)
2¹	3.88 (2H, s)	33.6 (t)	3.85 (2H, s)	33.5 (t)
1¹	-	129.2 (s)	-	128.3 (s)

Tabla 2.10 cont. Señales de RMN-¹H y ¹³C correspondientes al compuesto 8, dorsjervín A.

2'	6.69(1H, s)	115.5 (d)	6.63 (2H, s)	116.0 (d)
3'	-	143.5 (s)	-	143.8 (s)
4'	-	144.8 (s)	-	145.1 (s)
5'	6.70 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	114.8 (d)	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)	115.4 (d)
6'	6.59 (1H, dd, <i>J</i> = 8.1, 2.0 Hz)	119.7 (d)	6.52 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	119.3 (d)
1''	3.50 (2H, d, <i>J</i> = 7.3)	22.9 (t)	3.40 (2H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz)	23.1 (t)
2''	5.26 (1H, tt, <i>J</i> = 7.3, 1.5 Hz)	122.0 (d)	5.20 (1H, td, <i>J</i> = 7.4, 1.5 Hz)	122.1 (s)
3''	-	131.2 (s)	-	131.2 (s)
4''	1.63 (3H, s)	24.4 (c)	1.60 (3H, s)	25.4 (c)
5''	1.75 (3H, s)	16.5 (c)	1.71 (3H, s)	17.9 (c)
OCH₃	3.76 (3H, s)	60.1(c)	3.69 (3H, d, <i>J</i> = 1.3 Hz)	60.3 (c)

¹(Medrano Nahuat, 2014).

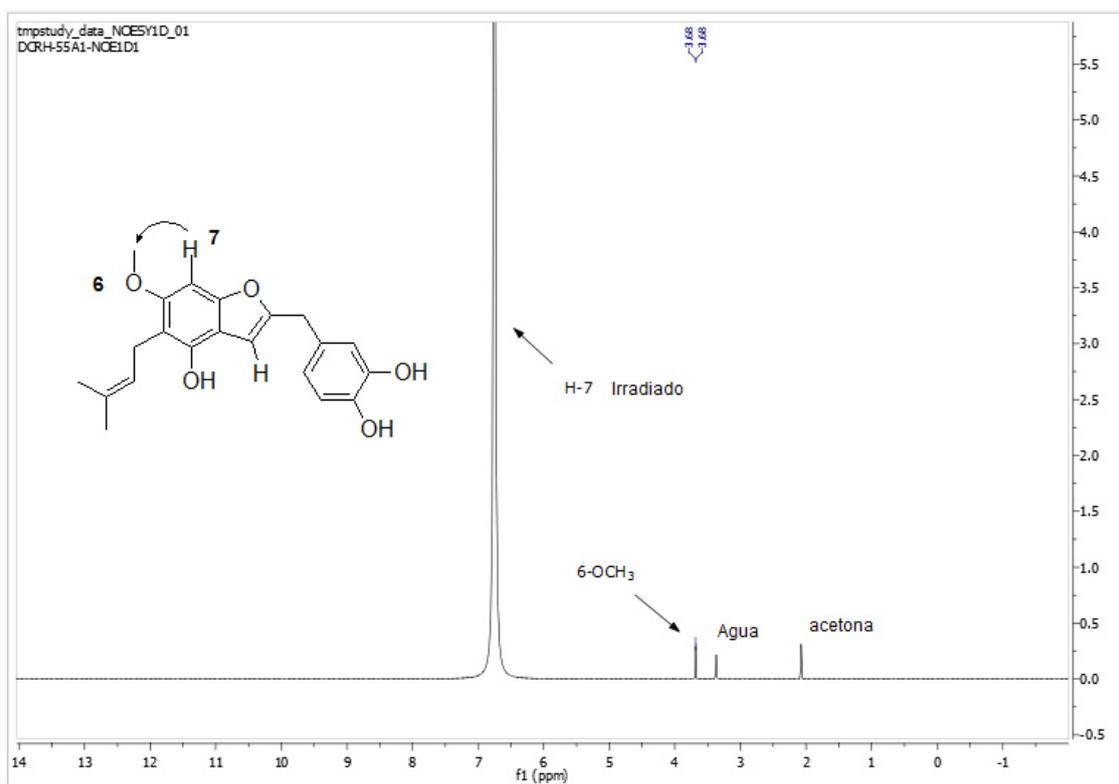


Figura 2.74. Espectro GSD sintético NOESY-1D (128 scans, 100 ms) selectivo del compuesto DCRH-55a1. Se irradió selectivamente al H-7 y se observa su interacción con 6-OCH₃.

Comparando la molécula nueva dorsjervín A con la información disponible en la base de datos SciFinder[®] se encontró sólo a otras dos moléculas que presentan un

heterociclo de tipo benzofurano con un sustituyente bencilo en la posición 2, siendo estas dos estructuras la de los compuestos **A** (Franke *et al.*, 2001) y **B** (Gómez-Garibay *et al.*, 1997) de la Figura 2.75. El compuesto **A** es un metabolito de *Dorstenia gigas*; mientras que **B** es un producto de la reacción de degradación del biflavanol tepicanol A en anhídrido acético. Los compuestos **C** (Sayed *et al.*, 2006) y **D** (McAlpine, *et al.*, 1997) son derivados de aurona y los metabolitos **E** (Demizu *et al.*, 1988) y **F** (Chen *et al.*, 2006) son furanobencenos del tipo estilbenoide prenilado.

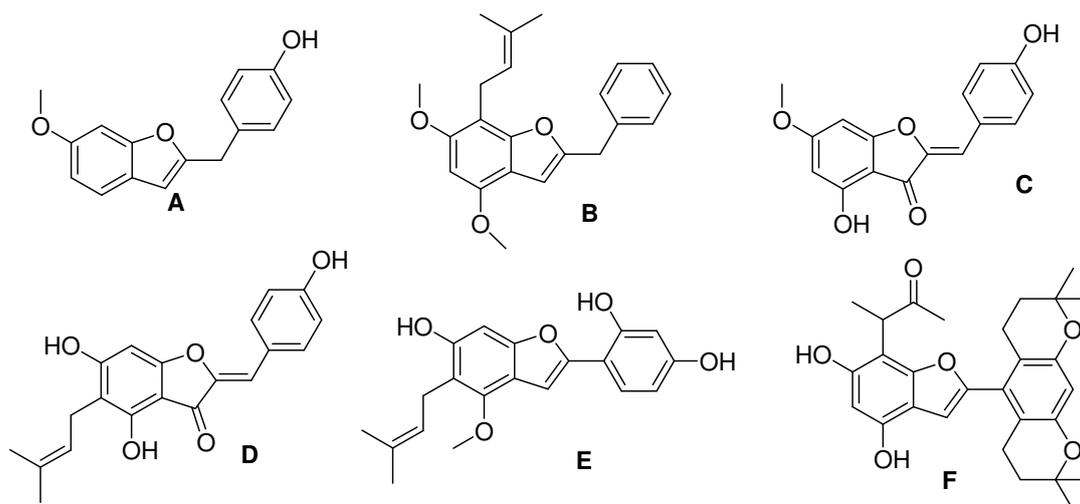


Figura 2.75. Benzofuranos similares a dorsjervín A.

La principal diferencia entre dorsjervín A y el metabolito **A** es el menor grado de sustitución del metabolito **A**. Mientras que **B** presenta una prenilación en C-7 y no presenta sustitución en el C-5 al igual que las moléculas **C** y **F**. Estos tres compuestos presentan desplazamientos químicos en RMN de ^1H y ^{13}C característicos de los C-5 y C-7 (Tabla 2.11) en el benzofurano con sustitución en C-5 y sin sustituir en la posición 7, los cuales no concuerdan con los desplazamientos químicos de las señales de carbono y protón del dorsjervín A.

Los compuestos **D**, **E** y dorsjervín A tienen en común la sustitución en C-5 con prenilo y las posiciones 4 y 6 están sustituidas por oxhidrilo o un grupo OCH_3 y sin sustituir en C-7. Los tres presentan un desplazamiento químico en el H-7 entre 6.5 a 6.8 ppm, a diferencia de **B** y **F**, que presentan un desplazamiento químico de 5.9 a 6.3 ppm para el protón 5. Por lo tanto, se refuerza la estructura propuesta para dorsjervín A.

Tabla 2.11. δ de ^1H y ^{13}C (en ppm) de los compuestos **A-F** de la Figura 2.75.

	A	B	C	D	E	F
H-4	7.32 (d, 8.5)	NP	NP	NP	NP	NP
H-5	6.81 (dd, 8.5, 2.2)	5.95, s	6.14, s	NP	NP	6.23,s
H-7	6.96 (d, 2.2)	NP	6.29,s	6.56,s	6.77,s	NP
C-4	120.4	NR	159.28	156.2	NA	147.4
C-5	112.2	NR	94.66	111.9	112.6	99.1
C-7	95.9	NR	91.30	91.5	92.2	105.0

NP = Átomo no presente, NA = Señal no asignada y NR = Experimento no realizado.

Los benzofuranos como productos naturales tienen un origen biogénico mixto y se dividen en dos grupos por su complejidad (Baxter *et al.*, 1998). Los primeros, estructuralmente más sencillos, son derivados del ácido shikímico y el isopreno, del ácido mevalónico o ruta del metileritrol fosfato, como tremetona y deshidotremetona (Margl *et al.*, 2005) (Figura 2.76). Los segundos son derivados de los estilbenos, y por lo tanto provienen del ácido shikímico y de la ruta de los policétidos; un ejemplo de este último grupo son los metabolitos del género *Morus*, como moracín A (Figura 2.76).

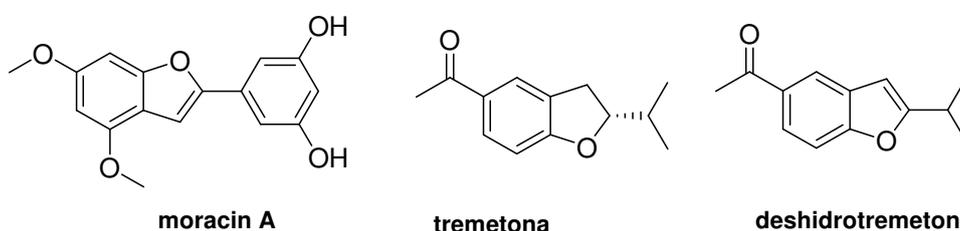


Figura 2.76. Benzofuranos típicos en la literatura, de origen estilbenoide, como moracín A, y derivados del ácido shikímico y el ácido mevalónico, como tremetona y deshidotremetona.

Nuestra propuesta biosintética es que dorsjervín A es un derivado de la aureusidina (Figura 2.77), la cual es conocida en la literatura por ser parte de los pigmentos de las flores en las plantas y su participación en la protección contra patógenos.

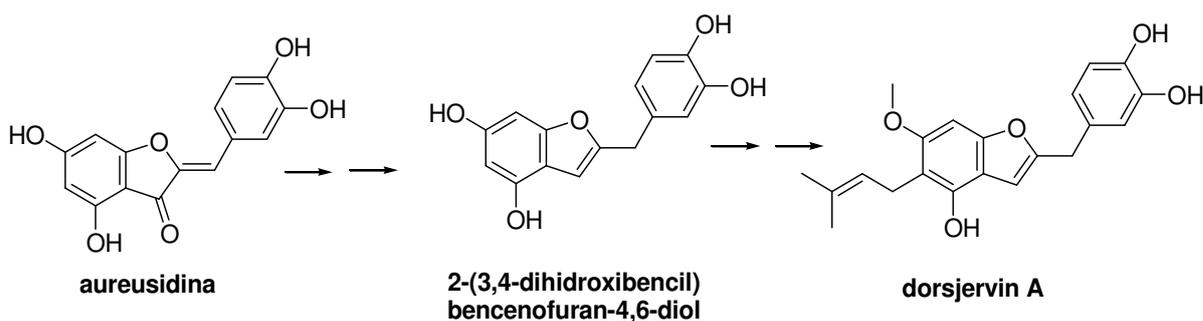


Figura 2.77. Posible ruta biosintética de dorsjervin A.

Por lo tanto, esto presentaría una ruta biosintética distinta a lo reportada para los compuesto benzofuránicos en la literatura, tal como se mencionó previamente en este trabajo. Hasta ahora sólo un metabolito similar (**A** en la Figura 2.75) se ha identificado previamente, el 2-(*p*-hidroxi-bencil)-6-metoxi-benzofurano, el cual se aisló de *Dorstenia gigas*; por lo cual es probable que estos metabolitos sean específicos del género.

2.3.3 Identificación del compuesto 9 (DCRH-55d1, dorsjervin B)

El compuesto tiene apariencia aceitosa y es de color rojo oscuro. A pesar de presentar *R_f* similar al compuesto 8, éste presenta una coloración azul al revelarse con óleum/vainillina en CCD, a diferencia del color gris del compuesto 8 (Figura 2.78).



Figura 2.78. CCD de C-18 revelada con oleum y corrida con el sistema H₂O/ACN/MeOH (4:4:2, 3×). El compuesto 8 es DCRH-55a1 (gris) y el compuesto 9 es DCRH-55d1 (azul), ambos con un *R_f* = 0.64.

Los espectros de masas del compuesto 9 (Figura 2.79 y Figura 2.80) demostraron que es un isómero del compuesto 8, dorsjervin A. Se observó el ion molecular con 354.1466 *m/z* que concuerda con lo calculado para la fórmula molecular C₂₁H₂₂O₅ de dorsjervin A, y que también concuerda con su patrón de fragmentación observado (Figura 2.58), con diferencias mínimas como la intensidad relativa de los picos, características de isómeros constitucionales, también nombrados estructurales.

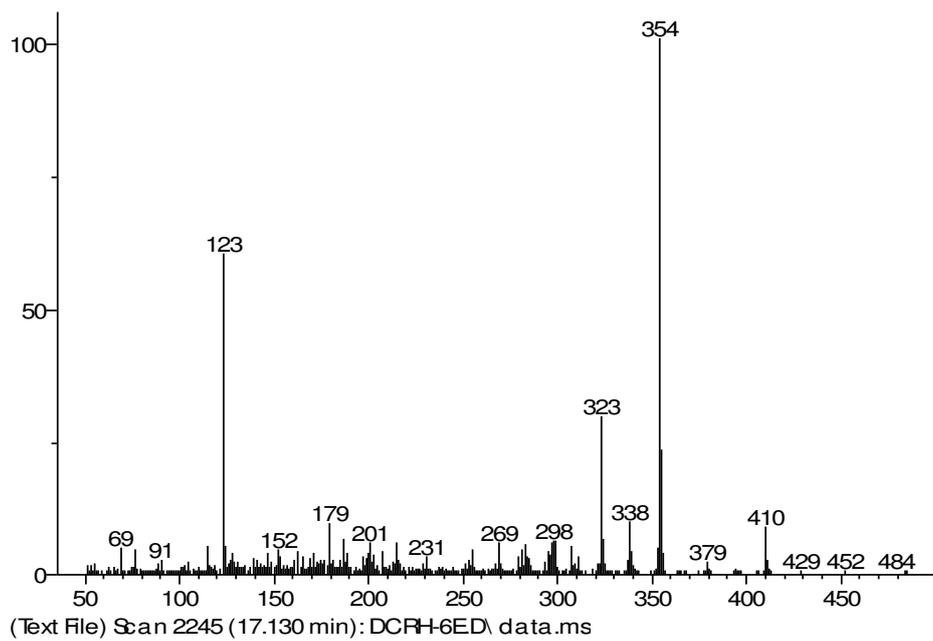


Figura 2.79. Espectro de masas del compuesto 9, DCRH-55d1.

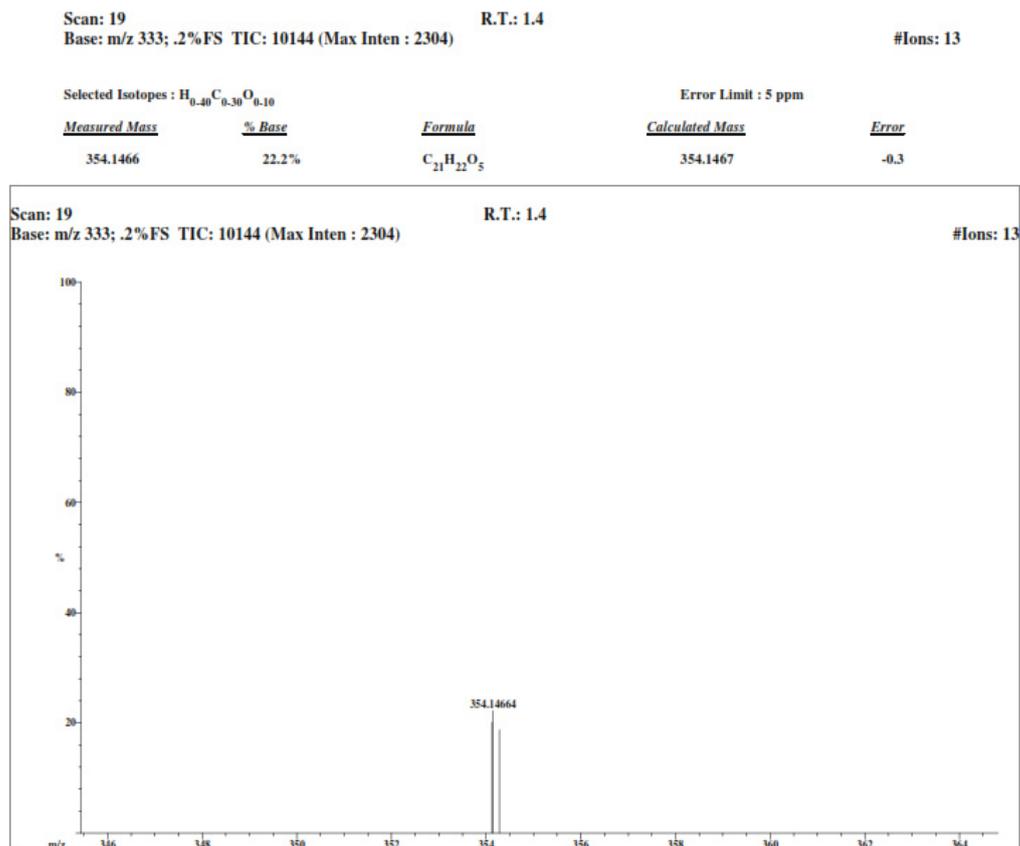


Figura 2.80. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 9.

El espectro de UV (Figura 2.81) demostró el mismo patrón observado que el del espectro del compuesto 8; por lo tanto tiene sus bandas máximas de absorción a 251, 289 y 356 nm, mientras que sus mínimas están a 239, 270 y 320 nm.

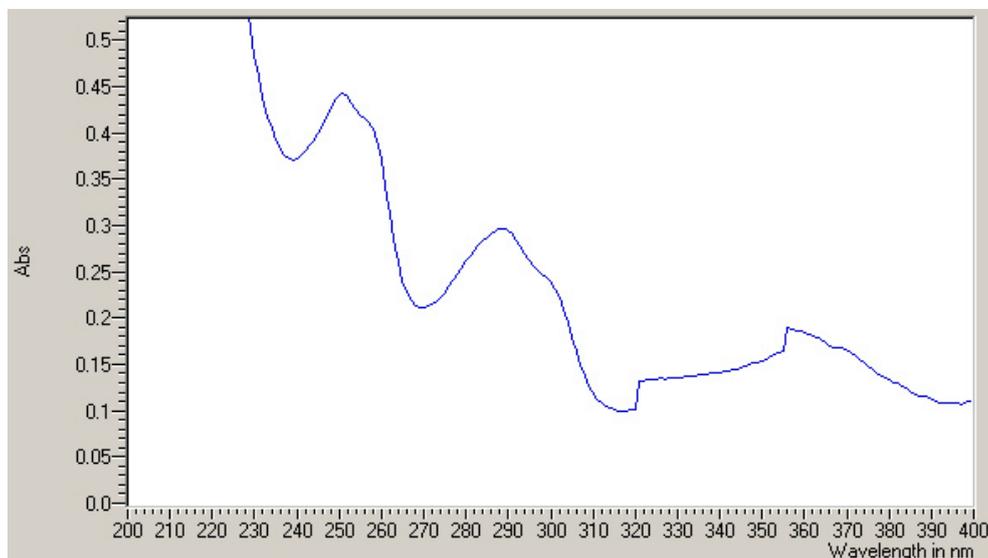


Figura 2.81. Espectro de UV del compuesto 9.

En el espectro de infrarrojo (Figura 2.82) aparece una banda ancha por los estiramientos O-H en la región de 3550 a 3300 cm^{-1} ; así también se observan bandas características al estiramiento entre los dobles enlaces de C=C aromáticos a 1605 , 1492 y 1447 cm^{-1} .

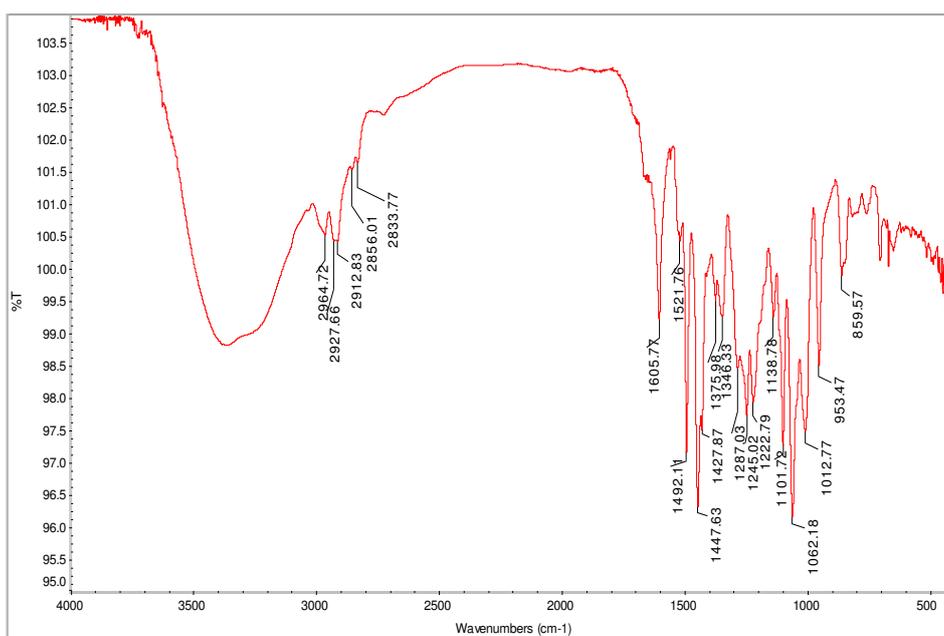


Figura 2.82. Espectro de infrarrojo del compuesto 9.

La banda por estiramiento C-O está a 1062 cm^{-1} . Las flexiones fuera del plano tipo C-H del anillo aromático en la región dactilar, 953 cm^{-1} y 859 cm^{-1} , revelan una sustitución 3',4' de los OH en el anillo. Por lo tanto, el compuesto 9 tiene un espectro de infrarrojo similar al compuesto 8.

El espectro de RMN- ^1H (Figura 2.83) y RMN- ^{13}C (Figura 2.84) mostraron señales similares al compuesto 8; por lo tanto, presenta la estructura 2-bencil-benzofurano del compuesto 8. En la Figura 2.83 se observan cinco protones aromáticos, cuatro protones alifáticos correspondientes a dos metilenos, seis protones correspondientes a dos grupos metilos, el H-4'' y H-5'', y un protón olefínico, el H-2'', del grupo isopreno, más los protones del grupo OH.

Confirmando que los protones del arilo están en las posiciones 3' y 4', destaca que la señal simple del H-2' (δ 6.52) está protegida y desplazada a la derecha (más apantallada) a diferencia de una sustitución 2' y 4'; por ejemplo, en la Figura 2.21, la señal simple correspondiente al H-3' (δ 7.70) de la cicloartocarpesina se desplaza más a la izquierda (menos protegida) por el efecto de los dos sustituyentes OH *meta* al H-2'.

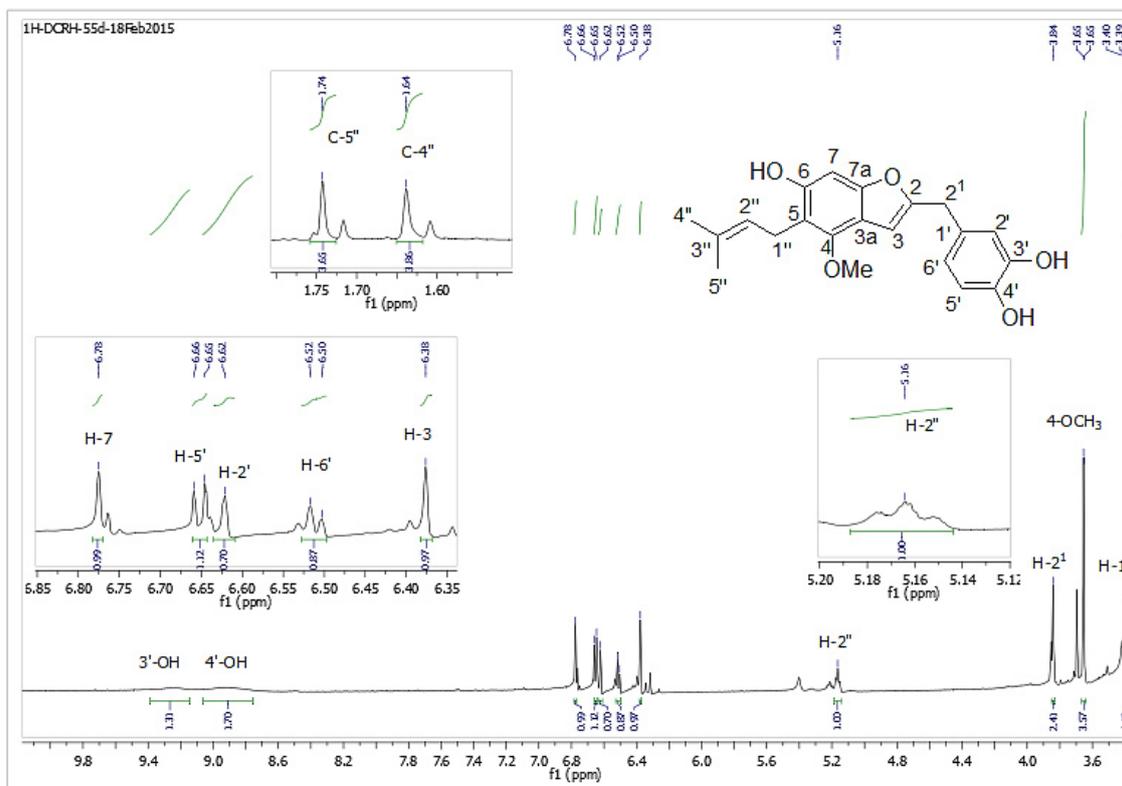


Figura. 2.83. Espectro de RMN- ^1H del compuesto 9 (600 MHz, DMSO- d_6).

El espectro de RMN- ^{13}C (Figura 2.84) reveló las 21 señales del compuesto, confirmando la naturaleza del compuesto 9 como isómero del compuesto 8.

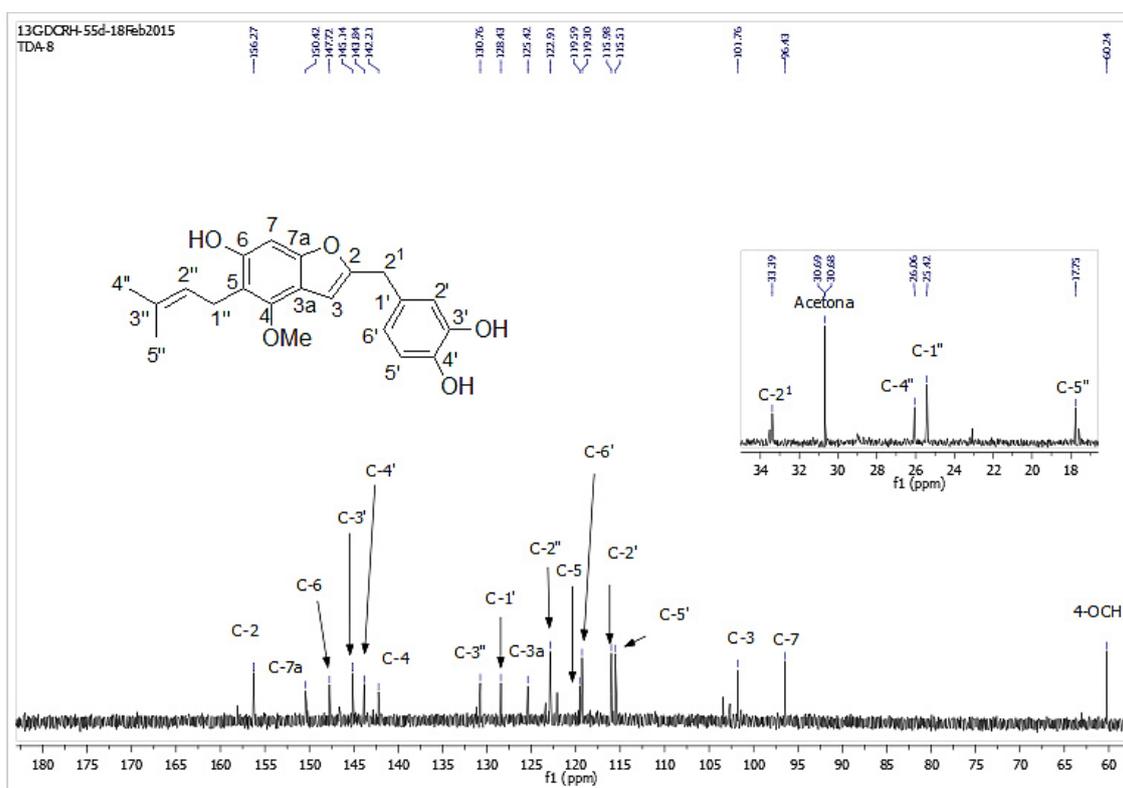


Figura 2.84. Espectro de RMN- ^{13}C del compuesto 9 (150 MHz, DMSO- d_6).

Una interpretación del espectro de protón del compuesto **8** muestra que existen mínimas diferencias con el espectro de protón del compuesto **9**, por lo cual nos llevó a encontrar que la diferencia entre ambos compuestos es la posición del grupo metilo entre los átomos de oxígenos enlazados en la posición 4 y 6 del benzofurano, ya que otras modificaciones en la estructura impactarían en el desplazamiento químico del protón 7.

Lo anterior se confirma al comparar con el benzofurano **B** de la Figura 2.75, cuya prenilación en la posición 5 del benzofurano le da un desplazamiento al H-5 de δ 5.95, mucho menor al desplazamiento a δ 6.77, el cual es el mismo que el benzofurano **E** en la Figura 2.68.

Mientras, en el espectro de RMN- ^{13}C se observó diferencia en la región de los carbonos enlazados a oxígeno entre ambos compuestos, está es la separación del carbono enlazado al OH con respecto a la señal del C-7a y la diferencia en el δ del C-7a del compuesto **8** (146.6 ppm) y del compuesto **9** (150.4 ppm). También la diferencia

en el desplazamiento químico se apreció en el C-7 a δ 103.4 en el compuesto **8** y δ 96.4 en el compuesto **9**; mientras el carbón 5 pasa por lo mismo al comparar las Tablas 2.10 y 2.12, lo que confirma un cambio en la posición entre sí del grupo OH y OMe, en el anillo A.

En la Figura 2.85 se muestran los acoplamientos principales del compuesto **9** y en las ampliaciones del HMBC (Figuras 2.86 y 2.87). El espectro de HMBC muestra las correlaciones del H-7 con el C-3a, C-4, C-6 y C-7a. La correlación del protón 3 con los C-2, C-3a y C-4 y el H-1" con C-3a, C-4 y C-5 muestra, a diferencia del compuesto **8**, acoplamientos de C-3a con los protones H-1" y H-7.

Por lo tanto, este compuesto novedoso fue elucidado como: 2-(3,4-dihydroxibencil)-4-metoxi-5-prenil-benzofuran-6-ol. Al ser este un isómero de dorsjervín A, se nombró como dorsjervín B.

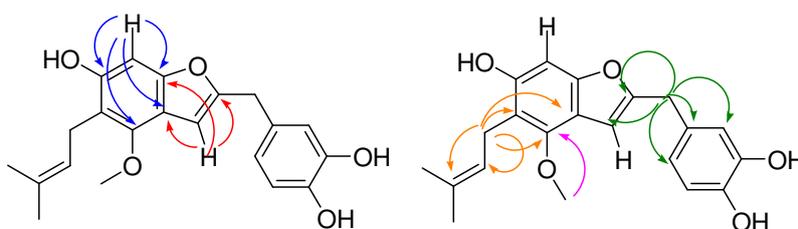


Figura 2.85. Correlaciones del experimento de HMBC del compuesto **9**.

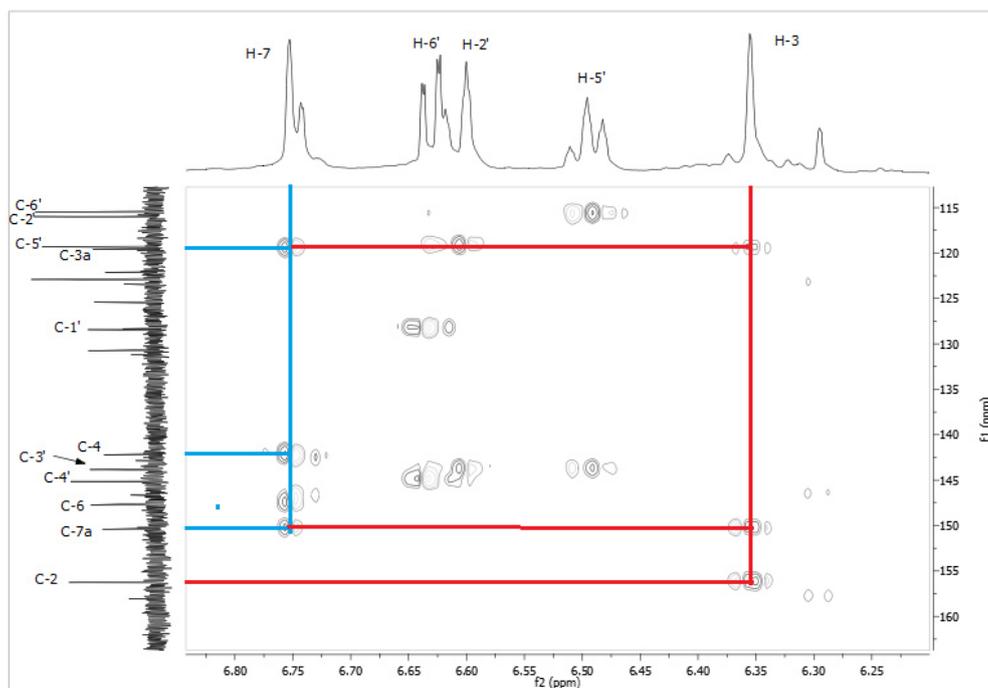


Figura 2.86. Correlaciones de H-3 y H-7 del compuesto **9** en el espectro de HMBC (ampliación).

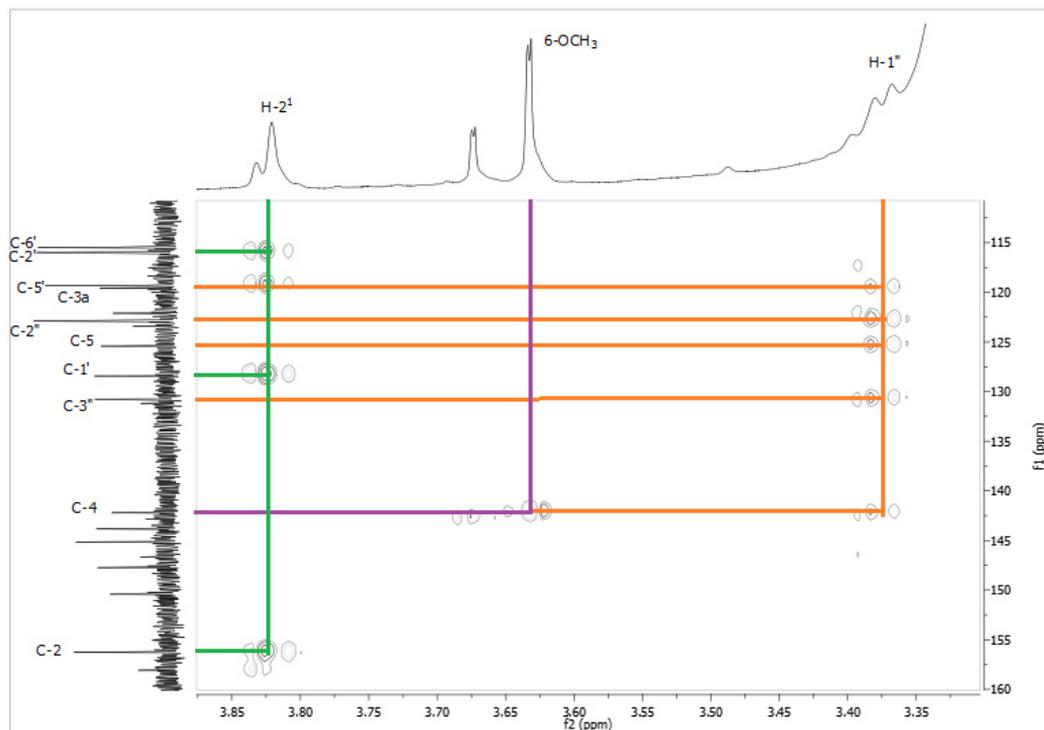


Figura 2.87. Correlaciones de H-1¹, H-2¹ y 6-OMe del compuesto 9 en el espectro de HMBC (ampliación).

La asignación espectroscópica total se realizó con la información proporcionada anteriormente y se resume en la Tabla 2.12.

Tabla 2.12. Asignación espectroscópica de dorsjervín B (compuesto 9, DCRH-55d1).

DCRH-55d1 (DMSO-<i>d</i>₆)			
#	RMN-¹H δ (600 MHz)	RMN-¹³C δ (150 MHz)	HMBC
2	-	156.2 (s)	
3	6.38 (1H, s)	101.7 (d)	C-2, C-3a y C-4
4	-	142.2 (s)	
5	-	125.4 (s)	
6	-	147.7 (s)	
7	6.77 (1H, s)-	96.4 (d)	C-3a, C-4, C-6 y C-7a
3a	-	119.6 (s)	
7a	-	150.4 (s)	
2¹	3.84 (2H, s)	33.3 (t)	C-3, C2, C-1', C-2'y C-6'
1'	-	128.4 (s)	
2'	6.62 (1H, s)	115.9 (d)	C-1' y C-3'
3'	-	143.8 (s)	
4'	-	145.1 (s)	
5'	6.64 (1H, d, <i>J</i> = 8.0, 1.4 Hz)	115.5 (d)	C-1' y C-6'
6'	6.51 (1H, d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	119.3 (d)	C-4' y C-5'
1''	3.39 (2H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz)	25.4 (t)	C-3a, C-4, C-5
2''	5.16 (1H, m)	122.9 (d)	C-2'', C3'', C-4'' y C-5''
3''	-	130.7 (s)	
4''	1.64 (3H, s)	26.0 (c)	C-2'' y C-3''
5''	1.74 (3H, s)	17.7 (c)	C-2'' y C-3''
OCH₃	3.65 (3H, s)	60.2(c)	C-4

CAPITULO III. ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA MEXICANA* DE LA FRACCIÓN DICLOROMETÁNICA Y SUS SUBFRACCIONES

3.1. INTRODUCCIÓN

Los resultados de la actividad inhibitoria contra promastigotes de *Leishmania mexicana* de la fracción diclorometánica y sus subfracciones de *D. contrajerva* se reportan en el artículo *Metabolites isolated from the rhizomes of Dorstenia contrajerva with anti-leishmanial activity* (Anexo 1).

Parte fundamental en la búsqueda de nuevas terapias contra infecciones causadas por patógenos del género *Leishmania* es la bioprospección en especies de plantas medicinales, cuyo fin nos permite acercarnos a los metabolitos responsables de la actividad biológica a través de un ensayo biológico que mida la actividad leishmanicida de los extractos y las fracciones que se obtengan de éstos.

Los bioensayos de actividad leishmanicida *in vitro* generalmente consisten en agregar una concentración conocida de una muestra, ya sea un extracto, una fracción o un compuesto puro a un número conocido de promastigotes metacíclicos de *L. mexicana*, en pozos de una microplaca de cultivo. Para evaluar el efecto inhibitorio se compara con el cultivo de parásitos en ausencia de la muestra.

Por lo tanto, el bioensayo con promastigotes de *L. mexicana* es útil para dirigir la búsqueda y el aislamiento de metabolitos activos entre distintas fracciones, seleccionando sólo aquellas que posean mejor actividad leishmanicida con el fin de aislar los metabolitos responsables de la actividad.

El criterio de selección para elegir de un grupo de fracciones la más activa, consiste en determinar valores como el porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC), la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) e índices de selectividad (IS). Esto se aplica no sólo a extractos, sino también a fracciones y compuestos puros, donde valores menores de CI₅₀ y mayores de IS son criterios óptimos para elegir fracciones con mejor actividad con las cuales trabajar en un proceso de aislamiento químico (Mesia *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2012; Camacho *et al.*, 2003).

Con los %IC se puede comparar entre un grupo de fracciones a una misma concentración, y también se puede calcular la CI_{50} , la cual se define como la concentración de un compuesto o mezcla en la cual se inhibe por la mitad el crecimiento *in vitro* de un cultivo celular. Por otro lado, el IS es el coeficiente del CI_{50} del parásito entre el CI_{50} de una línea celular de células de mamíferos.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Bioensayo de inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*

3.2.2. Material biológico

La determinación de la actividad leishmanicida se obtuvo mediante un bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007; Martín-Quintal, 2009). Se utilizó la cepa (LV4) MNYC/B2/62/M379 de promastigotes de *L. mexicana*. Inicialmente, los promastigotes se cultivaron en medio TC 199 suplementado más suero fetal bovino (SFB) al 10%. El medio suplementando consiste en agregarle al medio en cuestión una disolución de antibióticos y otros suplementos hasta tener una concentración final de 100 $\mu\text{g/mL}$ 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, a un pH de 7.4. En la realización de este estudio, los promastigotes de *L. mexicana* se cultivaron durante seis días a 26 °C, porque al sexto día se termina la fase de crecimiento exponencial y han entrado en fase estacionaria donde el promastigote tiene las características de promastigote metacíclico, su forma infectiva (Ponte-Sucre *et al.*, 2014; Mottram, 2008).

Transcurridos los seis días, se prosiguió a lavar tres veces los promastigotes con medio RPMI-1640 suplementado y se centrifugaron a 850 g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante, quedando un botón de parásitos como sedimento, el cual se resuspendió en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado más SFB al 10%. De este cultivo se tomaron 10 μL y se transfirieron a un tubo Eppendorf, al cual se le agregaron 90 μL de formaldehído al 2% con el fin de inmovilizar a los parásitos; finalmente, se tomaron 10 μL y se contaron en la cámara de Neubauer en la zona de glóbulos blancos con el objetivo 40 \times . Posteriormente, el número de parásitos se ajustó a 1×10^6 parásitos/mL con medio RPMI-1640 suplementado más SFB al 10%.

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

La fracción diclorometánica del extracto metanólico de *D. contrajerva* y los compuestos puros se prepararon con una disolución inicial: se tomó 1 mg de la muestra y se disolvió en 50 μL de sulfóxido de dimetilo (DMSO), 950 μL de RPMI-1640 suplementado y SFB al 10%; luego se diluyó 1/10, se filtró, obteniéndose la disolución **A** (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y con esta se realizó cuatro diluciones seriadas 1/3: 33.3, 11.1, 3.7 y 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (disoluciones **B**, **C**, **D** y **E**, respectivamente), así se obtuvieron cinco concentraciones seriadas para obtener la CI_{50} .

Para las fracciones DCRH-3c a DCRH3m se determinó el porcentaje de inhibición a tres concentraciones: 500, 250 y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, porque a concentraciones menores no se observó inhibición del crecimiento en la mayoría de las fracciones. La concentración final de DMSO no excedió el 0.5% en el medio, ya que a mayores concentraciones afecta el crecimiento de los parásitos (Tempone *et al.*, 2011). Todas las disoluciones madres se esterilizaron con filtros millipore (0.45 μm , previamente esterilizados). Todo el procedimiento se llevó en condiciones de esterilidad, empleando una campana de flujo laminar tipo II. Tres controles fueron utilizados, un control de inhibición de crecimiento, 100 μL de anfotericina B (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración final en el pozo); un control negativo (100 μL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% más DMSO al 0.5%) y un control de crecimiento (100 μL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10%).

Para la preparación del ensayo, se tomaron 100 μL de medio con promastigotes a 1×10^6 parásitos/mL; 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 (Martín-Quintal, 2009; Hocquemiller *et al.*, 1991).

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 determinar el porcentaje de inhibición, el número de parásitos contados en presencia de las diferentes disoluciones de las fracciones y compuestos puros se

comparó con el número de los parásitos presentes en el control negativo, usando la siguiente fórmula:

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

La CI_{50} se obtuvo mediante el programa estadístico GraphPad Prism 6. Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición de crecimiento y como su CI_{50} , según sea el caso. Todos los procedimientos de este capítulo se realizaron en el Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán (CIR-UADY), en Mérida, Yucatán, México, bajo la supervisión y/o responsabilidad de la QFB. Mirza Mut Martín y la Dra. María del Rosario García Miss.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Actividad leishmanicida de la partición diclorometánica del extracto metanólico

La fracción diclorometánica fue inactiva, con CI_{50} mayor a 100 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, se decidió continuar con la investigación de esta fracción a pesar de su baja actividad, debido a que el análisis de esta fracción demostró poseer una gran concentración de furanocumarinas lineales sustituidas (Medrano-Nahuat, 2014), las cuales se conocen por presentar escasa o nula actividad leishmanicida, procediéndose a separar las furanocumarinas del resto de la fracción en la cual podría haber más metabolitos con mayor actividad biológica.

Después de separar la fracción diclorometánica por CLV y al analizar su actividad leishmanicida (Tabla 3.1), se observó que efectivamente la actividad leishmanicida se concentró en tres fracciones, de las once analizadas: DCRH-3c, DCRH-3h y DCRH-3k.

Tabla 3.1. Actividad leishmanicida de las fracciones por CLV de la muestra DCRH-2b.

Fracción 250 $\mu\text{g/mL}$	3c	3d	3e	3f	3g	3h	3i	3j	3k	3l	3m
% de inhibición	95	63	55	28	11	100	60	11	78	49	0

Por lo anterior, en el trabajo fitoquímico se decidió aislar metabolitos de las tres fracciones más activas (DCRH-3c, DCRH-3h y DCRH-3k).

3.3.2. Actividad de los compuestos aislados

En la presente tesis se evaluaron nueve compuestos aislados y sus valores son reportados en la Tabla 3.2, excepto el del γ -sitosterol, el cual se tomó del reportado previamente (Medrano-Nahuat, 2014); para confirmar los valores de psoraleno y cicloartocarpesina se repitió el ensayo, los cuales concordaron con el reporte previo.

Tabla. 3.2. Metabolitos puros aislados de la fracción diclorometánica (DCRH-2b).

Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Anfo B
CI ₅₀ (μM)	NA	NA	4.9	NA	NA	NA	NR	NA	NA	0.3

NA = no activo (CI₅₀ > 100 μM); NR = no realizada.

Respecto a la actividad de las furanocumarinas, se conoce que su potencial biocida y leishmanicida es generado por su actividad fotoactiva ante la luz UV (Montoya *et al.*, 2015). La luz UV genera cicloadición 2 + 2 con el ADN (Dewick, 2002, Figura 3.1), produciendo la muerte del promastigote, al incubar con nulo contacto con luz UV nunca se apreció un efecto en su inhibición del crecimiento.

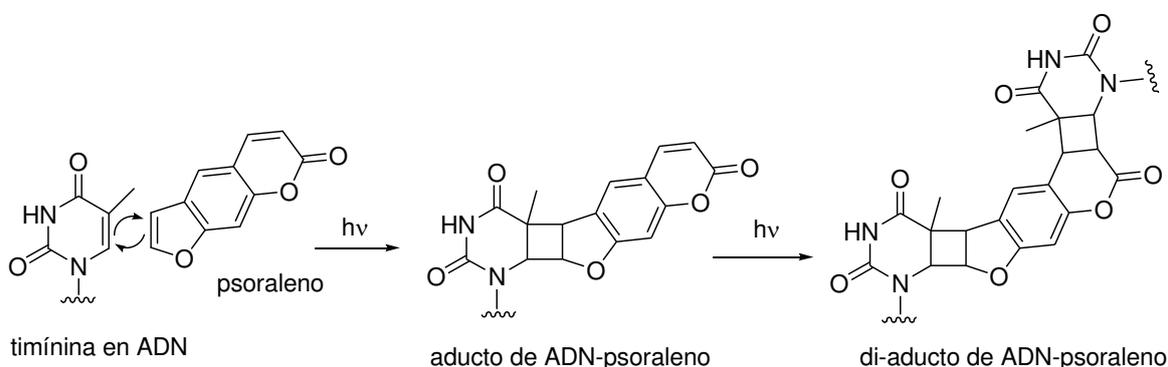


Figura 3.1. Formación de aducto ADN-psoraleno por cicloadición 2+2.

En cuanto a la cicloartocarpesina (compuesto 3), este sería el primer reporte de su actividad leishmanicida, aunque previamente ya se había aislado y analizado su actividad sin haberse elucidado su estructura (Medrano Nahuat, 2014). Ambas veces demostró ser activa; en este estudio tuvo actividad con una CI₅₀ de 4.9 μM (Tabla 3.2), que al ser de menos de 10 μM, es un compuesto activo y candidato para investigar su mecanismo de acción y realizar una optimización estructural con el fin de tener un compuesto líder para el desarrollo de una fármaco leishmanicida (Freitas-Junior *et al.*, 2012; De Muylder *et al.*, 2011).

Empleando el buscador SciFinder[®], se encontró el primer reporte de una flavona prenilada en la literatura científica, la cual fue activa contra parásitos del género *Leishmania*. Lo anterior no incluye a otros metabolitos del grupo de los flavonoides prenilados (Figura 3.2) como la spinoflavonona B, una flavonona (Ganapaty *et al.*, 2009), o chalconas sintéticas, los cuales han sido investigados previamente por su facilidad sintética (Passalacqua *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2014); un ejemplo de esto es la cromenochalcona en la Figura 3.2.

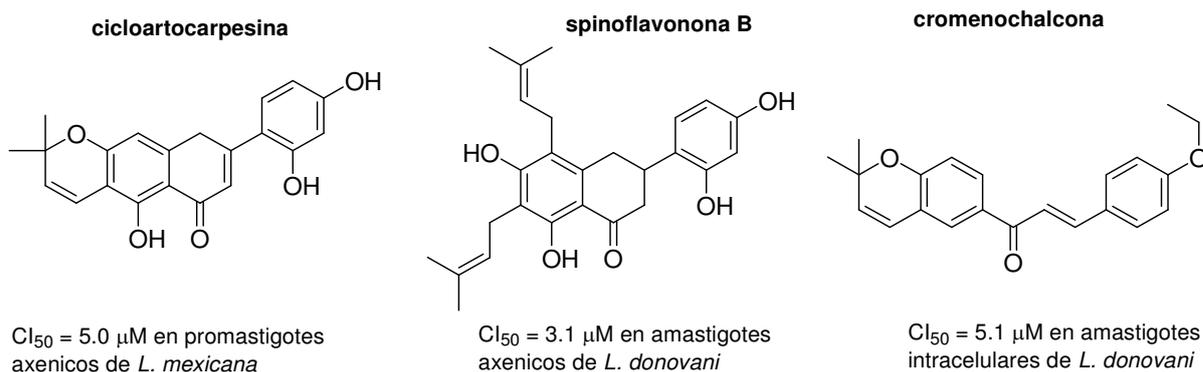


Figura 3.2. Flavonoides prenilados activos contra especies del género *Leishmania*.

Un estudio *in silico* reveló que de una biblioteca de 683 flavonoides, el grupo con mejores resultados contra la enzima piruvato quinasa de *L. mexicana* fue el de las flavonas (Scotti *et al.*, 2015). Por lo cual, esta enzima es un gran candidato como sitio diana de acción del compuesto **3**, cicloartocarpesina, al ser una piranoflavona.

De acuerdo a la literatura científica reciente es importante confirmar la actividad obtenida con los ensayos axénicos de promastigotes con otro ensayo que incluya amastigotes intracelulares. El ensayo con amastigotes intracelulares consiste en infectar células monocíticas con promastigotes metacíclicos, luego éstos se diferencian a amastigotes en el interior de las vacuolas parasitóforas de los macrófagos; una vez realizado este paso, se ponen a incubar los amastigotes intracelulares con los compuestos y se realizan las lecturas de inhibición de crecimiento con las técnicas anteriormente descritas en el capítulo I (Freitas-Junior *et al.*, 2012; Chappuis *et al.*, 2007).

Es común que la capacidad leishmanicida de un compuesto que puede ser sobresaliente en un ensayo con promastigote o amastigote axénico no se correlacione con la actividad en un ensayo *in vitro* contra amastigotes intracelulares. Lo anteriormente mencionado se documentó en diversos ensayos de tipo HTS en grupos

de colaboración internacional del DNDi (la iniciativa de Desarrollo de Fármacos contra Enfermedades Desatendidas, por sus siglas en inglés) que obtuvieron valores de CI_{50} de cuatro o más veces mayor para la forma intracelular que las axénicas para el mismo compuesto, repitiéndose el patrón en la mayoría de los compuestos analizados. Esto resulta en que solamente el 4% de los compuestos son tan activos tanto contra promastigotes axénicos como contra amastigotes intracelulares (Freitas-Junior *et al.*, 2012; De Muylder *et al.*, 2011).

Por lo anteriormente expuesto, es importante someter a la cicloartocarpesina (compuesto 3) a un bioensayo con amastigotes intracelulares, para determinar su potencial como leishmanicida. Sin embargo, dentro de la misma red de grupos de investigación del DNDi, la investigación de un compuesto se continúa siempre y cuando presente una CI_{50} menor a $0.5 \mu\text{M}$ (loset *et al.*, 2009), bajo este criterio no se invertiría más tiempo en averiguar la capacidad leishmanicida de cicloartocarpesina.

CAPÍTULO IV

4.1. DISCUSIÓN GENERAL

Las redes de investigadores cuyos objetivos sean la búsqueda y el desarrollo de compuestos activos con fines de obtener un fármaco tienen una gran responsabilidad con la sociedad que necesita estos tratamientos. Dentro de estos grupos de investigación se estudian enfermedades tropicales desatendidas, pero con una mayor adversidad para lograr el objetivo, debido a la falta de interés en los sectores público y privado por buscar una solución para controlar dichas enfermedades, lo que resulta en una falta de financiamiento para la investigación. Esto se refleja tácitamente en la reducida oferta terapéutica efectiva para combatir la leishmaniosis.

En años recientes se destaca la aparición de grupos interdisciplinarios, cuyo fin es resolver un problema que abarca múltiples áreas de la ciencia para su resolución, y que a su vez trabajan no sólo en redes de trabajo locales, sino también internacionales para compartir información y metodologías y acelerar el proceso de obtención de resultados. Por ejemplo, el “Pan-Asian Network for Drugs for Neglected Diseases” colabora para identificar moléculas con gran potencial como nuevos fármacos (Ioset *et al.*, 2009).

De acuerdo con el resultado del ensayo de inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana*, al que se sometió el extracto metanólico del rizoma de *Dorstenia contrajerva* junto con las fracciones obtenidas en la partición cromatográfica, se pudo observar que la fracción diclorometánica del extracto metanólico posee metabolitos activos.

El extracto metanólico del rizoma ha sido reportado activo ($CI_{50} = 23 \mu\text{g/mL}$) por Peraza-Sánchez *et al.*, (2007), por lo cual, el extracto metanólico se sometió a una partición líquido-líquido de polaridad ascendente, donde las fracciones hexánica y diclorometánica son las que presentaron mayor actividad leishmanicida, siendo la cicloartocarpesina y un galactolípido los metabolitos leishmanicidas del rizoma de *D. contrajerva*, a partir de la fracción hexánica del extracto metanólico (Medrano Nahuat, 2014).

En el presente trabajo se reporta el aislamiento de nueve metabolitos de la fracción diclorometánica (Figura 4.1), incluyendo cicloartocarpesina (compuesto **3**), que ya se

había aislado en un trabajo anterior (Medrano Nahuat, 2014). Asimismo, en dicha fracción se encontraron también otros compuestos que pueden incluirse en el grupo de flavonoides prenilados, los compuestos **8** y **9**, debido a su probable origen biosintético.

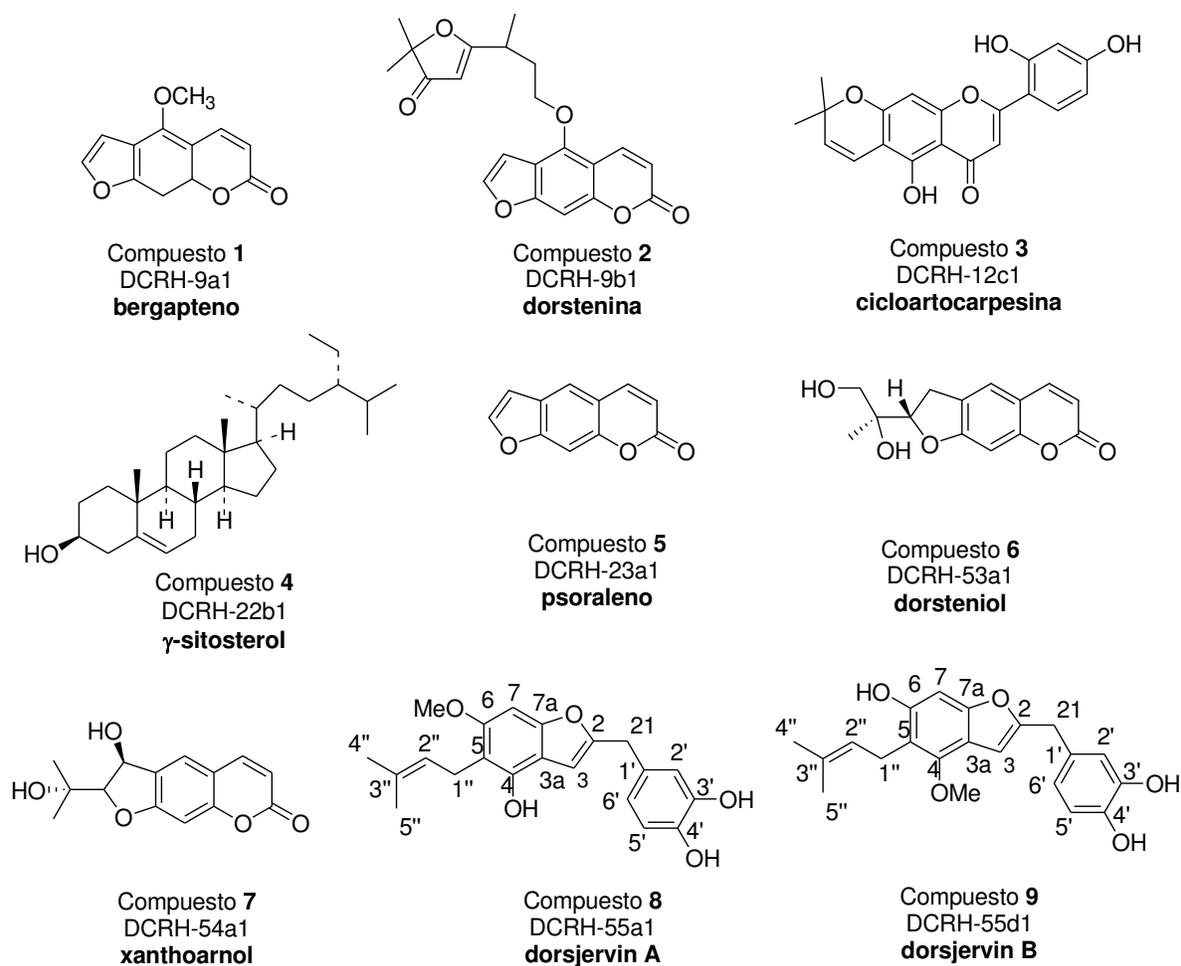


Figura 4.1. Compuestos aislados en el presente trabajo del rizoma de *D. contrajerva*.

Es importante recalcar que la alta concentración de las furanocumarinas psoraleno, bergapteno y dorstenina presentes en la fracción diclorometánica dificulta mucho el aislamiento de metabolitos de mayor relevancia y con actividad leishmanicida, en específico, los flavonoides prenilados como la cicloartocarpesina.

La gran concentración de furanocumarinas complica el uso tradicional de esta planta que en México y Centroamérica se aplica normalmente para problemas menstruales, gastrointestinales, como febrífuga y contra mordeduras de serpientes, entre otros (UNAM,

2009), ya que la presencia de estas furanocumarinas imposibilitaría un uso inocuo, debido a que estas mismas furanocumarinas son responsables de efectos fototóxicos, mutagénicos y fotocarcinogénicos (Bagchi y Preuss, 2004).

En Brasil el uso medicinal de la raíz de *D. contrajerva* y especies similares del mismo género está enfocado a aplicaciones cutáneas para combatir enfermedades de la piel (Vilegas *et al.*, 1997). Lo anterior se relaciona con su aplicación farmacológica con una eficacia terapéutica comprobada en pacientes con psoriasis, la fototerapia nombrada PUVA (psoraleno más radiación UV de tipo A, por sus siglas en inglés), la cual consiste en aplicar psoraleno más una fototerapia de rayos ultravioleta A; el psoraleno, una furanocumarina, al contacto con la luz forma aductos con el ADN (Figura 3.1) y esto lleva a que la célula entre en apoptosis, que es exactamente lo que se busca en la cura de la psoriasis, condición en la que se presenta una acelerada proliferación celular en la piel que forma placas psoriáticas; además, este tratamiento acelera la producción de melanina, por lo cual también se ha usado para tratar el vitíligo. Sin embargo, con este tratamiento existe siempre el riesgo de desarrollar cáncer de células escamosas en la piel, ya que la formación de aductos produce una inestabilidad genómica que favorece la aparición de células cancerosas (Lee *et al.*, 2013; Bagchi y Preuss, 2004).

Existe un campo abierto para investigar la capacidad fototerapéutica de la fracción diclorometánica del extracto metanólico del rizoma de *D. contrajerva*, o de las furanocumarinas aisladas, en aras de desarrollar una aplicación tópica de tipo fototerapéutico para el tratamiento de la leishmaniasis causada por especies de *L. mexicana* en modelos *in vivo*, tomando como ejemplo el desarrollo de la formulación tópica con hypericina, un fotosensibilizador encontrado en *Hypericum perforatum* (Montoya *et al.*, 2015).

Varias especies vegetales tienen furanocumarinas dentro de su arsenal químico, y se conoce que su acumulación está ligada a su efecto alelopático en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos y como disuasorios de la alimentación en artrópodos herbívoros (Diawara y Trumble, 1997). Dentro de este grupo destacan el apio (*Apium graveolens*, Apiaceae), el perejil (*Coriandrum sativum*, Apiaceae), hojas del higo (*Ficus carica*, Moraceae) y el aceite de limón (*Citrus × aurantifolia*, Rutaceae), que al contacto

con la piel, bajo los rayos UV del sol, producen comezón, quemaduras y manchas (McGovern *et al.*, 2003).

Las furanocumarinas de *D. contrajerva* podrían actuar también como fitoalexinas, ya que hay especies como el apio que biosintetizan furanocumarinas en una respuesta a la infección por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum*, conocida como podredumbre blanca; de hecho, si se manipulan sin guantes después de la infección puede ocurrir una fotodermatitis en las manos del recolector (Diawara y Trumble, 1997).

Como se mencionó en el Capítulo 2 de la presente tesis, los flavonoides prenilados aún no se habían reportado previamente en especies del continente americano (Gruber-Dall'Stella, 2008; Abegaz *et al.*, 2000); por lo cual fueron mencionados como un marcador taxonómico. Ahora con la información que disponemos, es posible considerar que los metabolitos con la estructura base de 2-bencil-benzofurano, dorsjervin A y B, como marcadores quimiotaxonómicos del género *Dorstenia*.

Un estudio de filogenética reciente comprobó que algunas especies de *Dorstenia* en África son incluso más cercanas a un grupo de especies del neotrópico, como *D. contrajerva*, que a otros grupos de especies del mismo continente. Consecuentemente, el perfil metabólico de *D. contrajerva* sería similar a estas especies africanas como *D. varifolia*, *D. tayloriana* var. *tayloriana* y *D. cuspidata*, las cuales aún no tienen estudios fitoquímicos (Misiewicz y Zerega, 2012).

Los flavonoides prenilados, como la cicloartocarpesina (compuesto 3), son elaborados por la plantas tanto por su actividad microbicida o en situaciones de estrés abiótico relacionado a su alta actividad antioxidante (Yasaki *et al.*, 2009).

La gama de actividades reportadas para la cicloartocarpesina es amplia, por ejemplo es un buen antioxidante según el ensayo de ABTS con una $CI_{50} < 10 \mu M$ (Park *et al.*, 2006), aunque se ha visto que no inhibe las enzimas fenol-oxidasas responsables del oscurecimiento de algunas frutas, como manzana, mango y plátano, por lo cual su utilidad como antioxidante alimenticio es menor (Zheng *et al.*, 2008). La cicloartocarpesina también es inhibidor no competitivo de la neuromidasa del virus de la gripe, teniendo una actividad de $CI_{50} = 6.01 \mu M$, lo cual es debido a la capacidad inhibitoria de las flavonas

sobre esta enzima; por lo anterior, la estructura química de tipo flavona ha tomado mayor relevancia en el desarrollo de nuevos antigripales (Ryu *et al.*, 2009).

En el rubro de su capacidad citotóxica en líneas celulares cancerígenas, la cicloartocarpesina tiene una CI_{50} desde 15.51 μM en CCRF-CEM (linfoblastos en leucemia humana), 23.15 μM en MDA-MB-231 (células de cáncer de mama en humano), de 22.3 μM en HTC116 p53^{+/+} (cáncer de colon de humano) y 20.94 μM en U87.MG (células de glioblastoma) (Kuefe *et al.*, 2015); el CI_{50} contra la línea celular AML12 (línea celular normal hepática de roedor) fue de 113.65 μM , lo que demuestra una selectividad contra líneas de cáncer en comparación con líneas normales. Sin embargo, según el Instituto Nacional de Cáncer (2015), la cicloartocarpesina requiere tener una $CI_{50} < 10 \mu\text{M}$ para avanzar a las siguientes fases en el desarrollo de fármacos contra el cáncer.

La cicloartocarpesina o el grupo de flavonas preniladas presentan actividades farmacológicas notables que merecen mayor investigación con el fin de desarrollar nuevos fármacos (Alhassan *et al.*, 2014; Yazaki *et al.*, 2009).

Un método de obtención de flavonas preniladas puede ser su síntesis química a partir de sustratos sencillos en vez de su aislamiento fitoquímico. A partir de 2-hidroxiacetofenonas con cloruros de aroilo (un cloruro de ácido aromático, en medio básico, se produce una serie de reacciones conocidas como el rearrreglo de Baker-Vetakaraman, que forma una 1-(2-hidroxiaril)-3-aril-1,3-propanediona, la cual se condensa en el mismo medio de reacción hasta una flavona. Otra alternativa para llegar a la 1-(2-hidroxiaril)-3-aril-1,3-propanediona es por medio de una reacción de anhídridos aromáticos con 2-hidroxiacetofenonas, reacción conocida como de Allan-Robinson (Figura 4.2) (Kabalka y Mereddy, 2005; Chee *et al.*, 2011; Harbone *et al.*, 1975). El paso final es una prenilación, contando con una protección previa de los grupos OH y su desprotección posterior a la reacción de prenilación (Passalacqua *et al.*, 2015).

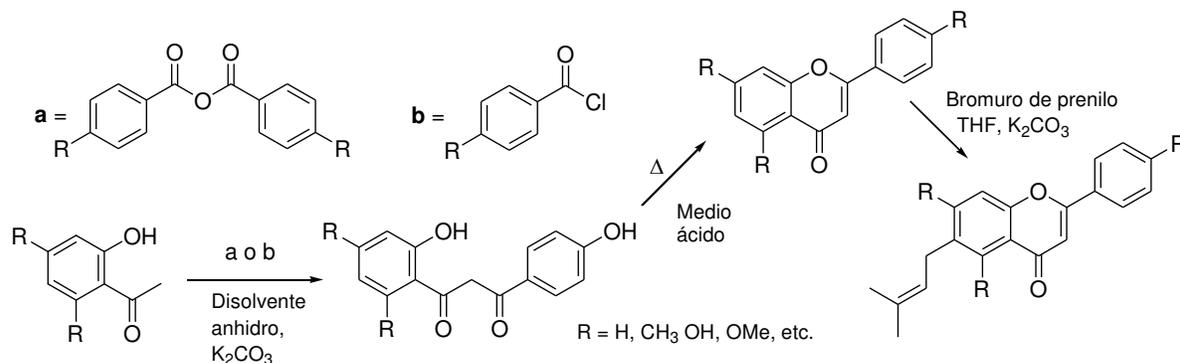


Figura 4.2. Metodología básica para la síntesis de flavonas preniladas.

Los 2-bencil-benzofuranos dorsjervín A y dorsjervín B no presentaron actividad en el ensayo *in vitro* contra promastigotes. Sin embargo, deben presentar algún rol biológico aún desconocido en el rizoma y que es importante para la planta. La propuesta es que tiene un efecto alelopático en el crecimiento de hongos, ya que existen reportes sobre benzofuranos que tienen un rol tipo fitoalexina en respuesta a infecciones fúngicas (Harbone *et al.*, 1999); el único 2-bencil-benzofurano aislado en la naturaleza demostró actividad contra el hongo *Cladosporium cucumerinum* (Franke *et al.*, 2001), por lo cual un ensayo contra hongos fitopatógenos es aconsejable para dorsjervín A y dorsjervín B.

Hasta la fecha, se desconoce la ruta biosintética de dorsjervín A, pero su probable origen biogénico es a partir de auronas, pasando por la auresidina, hasta llegar a la estructura final de dorsjervín A. En 2015, Buckingham y Munasinghe en su libro "Dictionary of Flavonoids", describieron un benzofurano que se descubrió en *D. gigas* (Franke *et al.*, 2001), siendo la primera y única referencia previa de un compuesto similar a un flavonoide en la literatura, antes de esta aportación. Por lo cual, los 2-bencil-benzofuranos pueden ser nombrados como benzofuranos de tipo flavonoide o aurnoide, en analogía a los benzofuranos de tipo estilbenoide.

4.2. CONCLUSIONES

La fracción diclorometánica del extracto metanólico del rizoma de *D. contrajerva* es rica en compuestos de tipo 2-bencil-benzofurano y furanocumarina, entre los cuales se aislaron dos compuestos nuevos, dorsjervín A y dorsjervín B, y siete compuestos conocidos: psoraleno, bergapteno, dorstenina, dorsteniol, xanthoarnol, cicloartocarpesina y γ -sitosterol.

La cicloartocarpesina tiene actividad contra los promastigotes de *L. mexicana*, ya que mostró una CI_{50} de 2.9 μ M en el bioensayo de inhibición de crecimiento; mientras que el resto de los metabolitos fueron inactivos contra el protozooario pues su CI_{50} fue $>100 \mu$ M.

La fracción diclorometánica del extracto metanólico del rizoma de *D. contrajerva* presenta en mayor medida furanocumarinas lineales, como psoraleno, bergapteno y dorstenina, en comparación a otros grupos de metabolitos como los flavonoides prenilados.

Los dos compuestos nuevos, dorsjervín A y B, presentan una estructura 2-bencil-benzofurano; compuestos con esta estructura sólo se han reportado en especies de *Dorstenia* y podrían ser considerados como marcadores quimiotaxonómicos del género.

Los 2-bencil-benzofuranos tienen un posible origen de tipo aurona. Con base en lo anterior, se propone que su nombre en la literatura científica del área sea benzofuranos de tipo auroide o flavonoide.

4.3. PERSPECTIVAS

Realizar el ensayo *in vitro* con amastigotes intracelulares utilizando la cicloartocarpesina.

Evaluar la actividad antifúngica y antibacteriana de dorsjervín A y dorsjervín B.

Comparar la presencia de flavonoides prenilados y los 2-bencil-benzofuranos en otras especies del género *Dorstenia* del Nuevo Mundo.

Separar por HPLC semipreparativo las mezclas de los flavonoides prenilados obtenidos para su adecuada elucidación y análisis de actividad biológica.

BIBLIOGRAFIA

- Abegaz B. M., B. T. Ngadjui, E. Dongo y M. T. Bezabih (2000). Chemistry of the genus *Dorstenia*. *Current Organic Chemistry*, 4, 1079-1090.
- Alhassan, A. M., M. I. Abdullahi, A. Uba y A. Umar (2014). Prenylation of aromatic secondary metabolites: A new frontier for development of novel drugs. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(2), 307-314.
- Andrade-Narváez, F. J., A. Vargas-González, S. B. Canto-Lara y A. G. Damián-Centeno, (2001). Clinical picture of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatán peninsula, México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(2), 163-167.
- Andrade-Narváez, F. J, S. B. Canto-Lara, N. R. Van Wynsberghe, E. A. Rebollar-Tellez, Eduardo A, A. Vargas-Gonzalez y N. E. Albertos-Alpuche, (2003). Seasonal transmission of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the state of Campeche, Yucatán península, México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(8), 995-998.
- Ankli, A. , M., M. Heinrich, P. Bork, L. Wolfram, P. Bauerfeind, R. Brund, C. Schmid, C. Weiss, R. Bruggisser, J. Gertsch, M. Waseschaa y O. Sticher (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1), 43-52.
- Bagchi, D. y H. G. Preuss (2004) *Phytopharmaceuticals in Cancer Chemoprevention*. CRC Press, Boca ratón. pp. 187-189.
- Balunas, M. J. y A. D Kinghorn (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431-441.
- Baxter, H., J. B. Harbone y G. P. Moss (1998). *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. Taylor-Francis. Reino Unido. pág: 374.

- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009), Contrayerba. Disponible:<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7352> [Acceso el 10 de Abril de 2015]
- Bokesch, H. R., R. D. Charan, K. M. Meragelman, J. A. Beutler, R. Gardella, B. R. O'Keefe, T. McKee y J. B. McMahon (2004). Isolation and characterization of anti-HIV peptides from *Dorstenia contrajerva* and *Treculia obovoidea*. FEBS Letters, 567, 287-290.
- Botero, D. y D. Restrepo (2012). *Parasitosis humanas, incluye animales venenosos y ponzoñosos*. Medellín: Corporación para investigaciones Biológicas-CIB. pp. 315-341.
- Boyom, F. F., E. M. Kemgne, R. Tepongning, V. Nguana, W. F. Mbacham, E. Tsamo, P. H. Amvam Zollo, J. Gut y P. J. Rosenthal (2009). Antiplasmodial activity of extracts from seven medicinal plants used in malaria treatment in Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology* 123, 483-488.
- Buckingham, J. y V. R. Munasinghe (2015). *Dictionary of Flavonoids*, CRC Press, Boca Ratón, pág. 395
- Butler, M. (2004). The role of natural product Chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153.
- Cáceres, A., L. Rastrelli, F. De Simone, G. De Martino, G. C. Saturnino, P. Saturnino y R. Aquino (2001). Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*, 72(4), 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(3), 367-370.
- Camacho, M., J. Phillipson, S. Croft, P. Solis, S. Marshall y S. Ghazanfar (2003). Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2-3), 185-191.

- Carvalho, P. B., y E. I. Ferreira (2001). Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, 72(6), 599-618.
- Casagrande, C., F. Ronchetti y G. Russo (1974). The structure of syriogenin. *Tetrahedron*, 30(19), 3587-3589.
- Castillo, C., A. Osorio, A. M. Paz y A. Cáceres (2005). Actividad moduladora del sistema del complemento de diez plantas medicinales nativas de Guatemala. *Revista Científica del Instituto de Ciencias Químicas y Biológicas*, 1, 29-34.
- CDC. (10 de Enero de 2013). *Center of Control Disease and Prevention*. Leishmaniasis disponible en : <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html> [Acceso el 14 de agosto de 2014].
- Chablé-Santos, J. B., Van Wysberghe, N. R., Canto-Lara, S. B. y Andrade-Narvaez, F. J. (1995). Isolation of *Leishmania (L.) mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the state Campeche, Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53(2), 141-145.
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar y M. Boelaer (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* 5(11), 873-882.
- Chawla, B. y R. Madhubala (2010). Drug targets in *Leishmania*. *Journal Parasitology Diseases*, 34(1), 1-13.
- Chee, C. F., M. J. C. Buckle y N. A. Rahman (2011). An efficient one-pot synthesis of flavones. *Tetrahedron letters* 52, 3120-3123.
- Chen, L., W. Jiang, y A. Hou. (2006). Novel 2-Arylbenzofuran Derivatives from *Artocarpus petelotii*. *Helvetica Chimica Acta*, 89, 1000-1007.
- Croat, T. B. (1978). *Flora of Barro Colorado Island*. Florenwerke: Stanford University Press. p. 348.

-
- De Muylder G, K. K. H. Ang, S. Chen, M. R., Arkin y J. C. Engel (2011) A screen against *Leishmania* Intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. *PLoS Neglected Tropical Disaeses* 5(7): e1253.
- Delascio-Chitty, F (1998) El género *Dorstenia* (*Moraceae*) en el estado Cojedes, Venezuela. *Acta Botánica Venezuélica*, 21(1), 105-109.
- Demizu, S., K. Kajiyama, K. Takahashi, Y. Hiraga, S. Yamamoto, Y. Tamura, K. Okada y T. Kinoshita (1988). Antioxidant and antimicrobial constituents of licorice: isolation and structure elucidation of a new benzofuran derivative. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 36(9), 3474-3479.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Segunda ed., Londres, Reino Unido: Wiley. pp. 197-200, 362-364.
- Diawara, M. M. y J. T. Trumble (1997). *Linear Furanocoumarins*, in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Paul Felix D'Mello, (ed.) CRC Press. Boca Ratón, pp. 175-186.
- Dimo, T., A. Rakotonirina, P. V. Tan, E. Dongo, A. B. Dongmo, P. Kamtchouing, J. Azay, B. M. Abegaz, G. Cros y T. B. Ngadjui (2001). Antihypertensive effects of *Dorstenia psilurus* extract in fructose-fed hyperinsulinemic, hypertensive rats. *Phytomedicine* 8(2), 101-106.
- Dostálová, A. y P. Volf (2012). *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites & Vectors*, 5, 276.
- Dugrand, A., A. Olry, T. Duval, A. Hehn, Y. Froelicher y F. Bourgaud (2013). Coumarin and furanocoumarin quantitation in citrus peel via ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 1067-1068.
- Fabricant, D. S. y N. R. Farnsworth (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(1), 69-75.
-

- Fingolo, C. E., Santos, T. S., Vianna-Filho, M. D. M., Kaplan, M. A. C., 2013. Triterpene Esters: Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). *Molecules* 18, 4247-4256.
- Fournet, A., A. Angelo, V. Muñoz, F. Roblot, R. Hocquemiller y A. Cavé (1992). Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 37(2), 159-164.
- Fournet, A., A. Barrios, V. Muñoz, R. Hocquemiller, F. Roblot, A. Cavé, P. Richomme y J. Bruneton (1994a). Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research*, 8(3), 174-178.
- Fournet, A., Barrios, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Roblot, F. y A. Cavé, (1994b). Antileishmanial activity of a tetralone isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian plant used as treatment for cutaneous leishmaniasis. *Planta Medica*, 60(1), 8-12.
- Franke, K., A. Porzel, M. Masaoud, G. Adam y J. Schmidt. (2001). Furanocoumarins from *Dorstenia gigas*. *Phytochemistry*, 56(6), 611-621.
- Freitas-Junior, L. H., E. Chatelain, H. Andrade-Kim y J. L. Siqueira-Neto, J. L. (2012). Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 11-19.
- Fumarola, L., R. Spinelli y O. Brandonisios (2004). In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in Microbiology*, 155(4), 224-230.
- Ganapaty, S., G. V. K. Srilakshmi, P. S. Thomas, N. R. Rajeswari y S. Ramakrishna (2009). Cytotoxicity and antiprotozoal activity of flavonoids from three species. *Journal of Natural Remedies*, 9(2), 202-208.
- Getti, G.; P. Durgadoss, D. Domínguez-Carmona, Z. Martín-Quintal, S. Peraza-Sanchez, L. M. Peña-Rodríguez y D. Humber (2009). Leishmanicidal activity of Yucatecan

- medicinal plants on *Leishmania* species responsible for cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology*, 95(2), 456-460.
- Gibbons, S. y M. Heinrich (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(4), 425-432.
- Gómez-Garibay, F., J. S. Calderón, L. Quijano, O. Téllez, M. del S. Olivares y T. Ríos (1997). An unusual prenyl biflavonol from *Tephrosia tepicana*. *Phytochemistry*, 46, 1285-1287.
- Grijalva-Pineda, A. (2005). Flora Útil Etnobotánica de Nicaragua. Marena, Managua, p. 43.
- Gruber Dall´Stella, D. S. (2008). Estudo fitoquímico aplicado da fração solúvel de extrato etanólico bruto da *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae). Tesis de Doctorado, Universidade Federal do Paraná, 99 p.
- Gupta, S., R. Shivahare, V. Korthikunta, R. Singh, S. Gupta y N. Tadigoppul (2014). Synthesis and biological evaluation of chalcones as potential antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 23, 81, 359-66.
- Harbone, J. B., T. J. Marby y H. Marby. (1975). *The Flavonoids*, Springer, Estados Unidos pp. 135-144.
- Heinrich, M. (2000). Ethnobotany and its role in drug development. *Phytotherapy Research* 14(7), 479-488.
- Heinrich, M., A. Ankli, B. Frei, C. Weimann y O. Sticher (1998). Medicinal Plants in Mexico: Healers' Consensus and Cultural Importance. *Social Science and Medicinal* 47(11), 1859-1871.
- Hisham, D. M. N., J. M. Lip, R. Suri, H. M. Shafit, Z. Kharis, K. Shazlin, A. Normah y M. F. N. Nabilah (2012). Agrowaste: phytosterol from durian seed. *World Academy of Science. Engineering and Technology*, 6, 66-69.

- Hocquemiller, R., D. Cortes, G. J. Arango, S. H. Myint, A. Cave, A. Angelo, V. Muñoz y A. Fournet (1991). Isolement et Synthèse de l'Espintanol, Nouveau Monoterpène Antiparasitaire. *J. Nat. Prod.* 54(2), 445-452.
- House, P., S. Lagos-Witte. y C. Torres, C. (2007). Manual Popular de 50 Plantas Medicinales de Honduras. Guaymuras, Tegucigalpa. pp. 58-59.
- Hussain, H. B. Vouffo, E. Dongo, M. Riaz y K. Krohn. (2011) Dorstenpictanone: a new bicyclic polyprenylated compound from *Dorstenia picta*. *Journal of Asian Natural Products Research* 13 (6), 2011, 547-550.
- IIAP (2015). Plantas medicinales de la amazonia peruana: Estudio de uso y cultivo. Pp: 15-18, 103-106, 161-164, 147-150 y 213-116.
- Ioset JR, Brun R, Wenzler T, Kaiser M y Yardley V. (2009). *DNDi and Pan-Asian Screening Network, Drug screening for kinetoplastids diseases: A training manual for creening in neglected diseases*. 74pp.
- ITIS (2014). *The Integrated Taxonomic Information System*. Disponible en: <http://www.itis.gov> [Acceso el 19 de Septiembre de 2014].
- Jiménez-Arellanes, M. A., L. Alamilla-Fonseca y G. A. Gutiérrez-Rebolledo (2014). Las plantas medicinales de México como fuente de compuestos activos contra la leishmaniasis. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 45(2),19-30.
- Kabalka G. W. y A. R. Mereddy. (2005) Microwave-assisted synthesis of functionalized flavones and chromones. *Tetrahedron Letters*, 46, 6315-6317.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends in Parasitology*, 22(9), 439-445.
- Kapche, G. D. W. F., C. D. Fozing, J. H. Donfack, , G. W. Fotso. D. Amadou, D., A. N. Tchana, M. Bezabih, P. F. Moundipa, B. T. Ngadjui, B. M. Abegaz (2009). Prenylated arylbenzofuran derivatives from *Morus mesozygia* with antioxidant activity. *Phytochemistry*, 70, 216-221.

- Kremer, M. (2002). Pharmaceuticals and the developing world. *The Journal of Economic Perspectives*, 16(4), 67-90.
- Kuete, V., A. T. Mbaveng, M. Zeino, C. D. Fozing, B. Ngameni, G. Deccaux, W.F. Kapche, B. T. Ngadjui y T. Efferth (2015). Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine* 22, 1096-1102.
- Kuete, V., I. K. Simo, B. Ngameni, J. D. Bigoga, J. Watchueng, R. Nzesse Kapgüep, F. X. Etoa, B. T. Ngadjui y V. Penlap Beng (2007). Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and four flavonoids from the twigs of *Dorstenia angusticornis* Engl. (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 112, 271-277.
- Lainson, Ralph. (2010). The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(2), 13-32.
- Lahlou, M. (2013). The success of natural products in drug discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 4, 17-31.
- Lee, C. H., S. B. Wu, C. H. Hong, H. S. Yu e Y. H. Wei (2013). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis and its effects on skin residential cells: the implication in UV-based phototherapy. *International Journal of Molecular Science*, 14, 6414-6435.
- Lima, J. P. S., M. L. B. Pinheiro, A. M. G. Santos, J. L. S. Pereira, D. M. F. Santos, A. Barison, I. Silva-Jardim y E. V. Costa. In Vitro Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae) (2012). *Revista Virtual de Química*, 4 (6), 692-702.
- Lukes, J. (2 de Enero de 2009). Kinetoplastida, en: The Tree of Life Web Project: <http://tolweb.org/Kinetoplastida/9801> [Acceso el 20 de Octubre del 2015].
- Luo, Y., X. Li, J. He, J. Su, L. Peng, X. Wu, R. Du y Q. Zhao (2014). Isolation, characterisation, and antioxidant activities of flavonoids from chufa (*Eleocharis tuberosa*) peels. *Food Chemistry*, 164, 30-35.

-
- Margl, L., C. Ettenhuber, I. Gyurján, M. H. Zenk, A. Bacher y W. Eisenreich (2005). Biosynthesis of benzofuran derivatives in root cultures of *Tagetes patula* via phenylalanine and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate. *Phytochemistry*, 66(8), 887-899.
- Martín-Quintal, Z. (2009). Estudio de *Tridax procumbens* L. para la obtención de metabolitos con actividad leishmanicida con actividad antiprotozoaria. Tesis de Doctorado, Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. 163 p.
- Martín-Quintal, Z., R. Moo-Puc, F. González-Salazar, M. J. Chan-Bacab, L. W. Torres-Tapia y S. R. Peraza-Sánchez (2009). In vitro activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania Mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 463-467.
- Martín-Quintal, Z., M. del R. García-Miss, M. Mut-Martín, A. Matus-Moo, L. W.. Torres-Tapia y S. R. Peraza-Sánchez (2010). The leishmanicidal effect of (3S)-16,17-didehydrofalcarinol, an oxylipin isolated from *Tridax procumbens*, is independent of NO production. *Phytoterapy Research*, 24, 1004-1008.
- Mbaveng, A. T., B. Ngameni, V. Kuete, I. K. Simo, P. Ambassa, R. Roy, M. Bezabih, F. X. Etoa, B. T. Ngadjui, B. M. Abegaz, J. J. Marion Meyere, N. Lalle, V. Penlap Beng (2008). Antimicrobial activity of the crude extracts and five flavonoids from the twigs of *Dorstenia barteri* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 116, 483-489.
- McAlpine, J., W. Chu, S. Ratnayke, J. Jiang, A. Stafford y C. Jackson (1997). Antimicrobial auronos derivatives. WO 97/26873.
- McGovern, T. W. (2003). *Dermatosis Due to Plants, in: Dermatology*. Bologna, J. L., J. L. Jorizzo, R. P. Rapini T. D. Horn, A. J. Mancini, J. M. Mascaró, S. J. Salache, J. H. Saurat y G. Stingl (ed.) Gulf Professional Publishing. España. p. 265-285.
- Medrano Nahuat, D. Y. (2014). Metabolitos con actividad leishmanicida aislados de la raíz de *Dorstenia contrajerua*. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán, 100 p.
- Mehlhorn, H. (2008). *Encyclopedia of Parasitology*. Springer, Munich, pp. 696-711.
-

- Mehta, B. K., M. Gupta y M. Verma (2006). Steroid and aliphatic ester from the seeds of *Nigella sativa*. *Indian Journal of Chemistry*, 44(5), 1567-1571.
- Mesia G. K., G. L. Tona, T. H. Nanga, R. K. Cimanga, S. Apers, P. Cos, L. Maes, L. Pieters y A. J. Vlietinck (2008). Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(3), 409-415.
- Misiewicz, T. M. y N. C. Zerega (2012). Phylogeny, Biogeography and Character Evolution of *Dorstenia* (Moraceae). *Edinburgh Journal of Botany*, 69, 413-440.
- Mittal, N., N. Gupta, S. Saksena, N. Goyal, U. Roy y A. K. Rastogi (1998). Protective effect of picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Science*, 63, 1823-1834.
- Montoya, A., A. Daza, D. Muñoz, K. Ríos, V. Taylor, D. Cedeño, I. D. Véleza, F. Echeverri y S. M. Robledo (2015). Development of a novel formulation with hypericin to treat cutaneous leishmaniasis based on photodynamic therapy in *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 59, 5804-5813.
- Mothana, R. A., N. M. Al-Musayeb, A. Matheussen, P. Cos y L. Maes. (2012). Assessment of the *in vitro* antiprotozoal and cytotoxic potential of 20 selected medicinal plants from the island of Soqatra. *Molecules* 17, 14349-14360.
- Mottram, J. (2008) Mottram laboratory, *Protocols for handling and working with leishmania species*. University of Glasgow, United Kingdom, pp. 3-8.
- National Cancer Institute, Drug therapeutics program NCI-60 screening methodology Disponible https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/methodology.htm [Acceso el 16 de Noviembre de 2015]
- Newman, D. J. y G. M. Cragg (2016). Natural Products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 79(3), 629-661.

-
- Ngameni, B., B. T. Ngadjui, G. N. Folefoc, J. Watchueng y B. M. Abegaz (2004). Diprenylated chalcones and other constituents from the twigs of *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis* Barthelemy. *Phytochemistry*, 65(4), 427-432.
- Ngadjui, B. T., J. Watchueng, F. Keumedjio, B. Ngameni, I. K. Simo, y B. M. Abegaz, (2005). Prenylated chalcones, flavone and other constituents of the twigs of *Dorstenia angusticornis* and *Dorstenia barteri* var. *subtriangularis*. *Phytochemistry* 66(6), 687-692.
- Ngadjui, B. T., E. Dongo, E. N. Happi, M. T. Bezabih y B. M. Abegaz (1998). Prenylated flavones and phenylpropanoid derivatives from roots of *Dorstenia psilurus*. *Phytochemistry* 48(4), 733-737.
- Ngadjui, B. T., T. K. Tabopda, E. Dongo, G. W. F Kapche, P. Sandor y B. M. Abegaz, (1999). Dorsilurins C, D and E, three prenylated flavonoids from the roots of *Dorstenia psilurus*. *Phytochemistry* 52(4), 731-735.
- Ngueguim, T. F., N. Markadiou, R. Crutzen, J. H. Donfack, E. Dongo, P. Kamtchouing, T. Dimo y R. Beauwens (2013). In vivo and in vitro anti-natriuretic activity of twigs fraction from *Dorstenia picta*: a possible mechanism. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science* 26(3), 537-45.
- Ngueguim, T. F., T. Dimo, N. Kouambou, M. C. Tchamadeu, D. Dzeufiet, D. Paul, L. Tédong, B. Renaud y P. Kamtchouing (2006). Antidiabetic activity of *Dorstenia picta* aqueous twigs extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacologyonline* 3, 900-911.
- Oketch-Rabah, H. A., E. Lemmich, S. F. Dossaji, T. G. Theander, C. E. Olsen, C. Cornett, A. Kharazmi y S. B. Christensen (1997). Antiprotozoal compounds from *Asparagus africanus*. *Journal of Natural Products*, 60(10), 1017-1023.
- Omisore, N. O. A., C. O. Adewunmi, E. O. Iwalewa, B. T. Ngadjui, J. Watchueng, B. M. Abegaz y J. A. O. Ojewole (2004). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Dorstenia barteri* (Moraceae) leaf and twig extracts in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 95(1), 7-12.
-

-
- OMS, 2012. *Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis*, Italia, pp.59-70.
- Osorio, Y., B. L. Travi, A.R. Renslo, A. G. Peniche y P. C. Melby (2011). Identification of small molecule lead compounds for visceral leishmaniasis using a novel *ex vivo* splenic explant model system. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e962.
- Paek, S. Y., A. Koriakos, S. Saxton-Daniels y A. G. Pandya (2012). Skin diseases in rural Yucatan, Mexico. *International Journal of Dermatology*, 51(7), 823-828.
- Palhares, R. M., M. Gonçalves Drummond, F. B. B. dos Santos Alves, G. Pereira Cosenza, B. M. das Graças Lins y G. Oliveira (2015) Medicinal plants recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. *PLoS ONE* 10(5): e0127866.
- Park, K. H., B. W. Lee, Y. D. Park, I. Y. Jeong, J. M. Han, T. S. Jeong, K. R. Lm y W. S. Lee (2006). Anti-atherosclerotic and anti-inflammatory activities of catecholic xanthenes and flavonoids isolated from *Cudrania tricuspidata*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 5580-5583.
- Passalacqua, T. G., L. A. Dutrac, L. de Almeidaa, A. M. Arenas Velásquez, F. A. Esteves Torres, P. R. Yamasakic, M. Bastos dos Santos, L. O. Regasinie, P.A.M. Michelsf, V. da Silva Bolzania y M. A. S. Graminha (2015). Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 25(16), 3342-3345.
- Passero, L. F. D., M. D. Laurentia, G. Santos-Gomes, B. Soares Camposa, P. Sartorellic, y J. H. G. Lago (2014). Plants used in traditional medicine: extracts and secondary metabolites exhibiting antileishmanial activity. *Current Clinical Pharmacology*, 9(3), 1-7.
- Pauli, F. R. J. Case, T. Inui, Y. Wang, S. Cho, N. H. Fischer y S. G. Franzblau (2005). New perspectives on natural products in TB drug research. *Life Science*, 78, 485-494.
-

-
- Pech-May, A., F. Escobedo-Ortegón, M. Berzunza-Cruz y E. A. Rebollar-Téllez (2010). Incrimination of four sandfly species previously unrecognized as vectors of *Leishmania* parasites in Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 24(2), 150-161.
- Peniche, A. G., Y. A. Osorio, R. Renslo, E. Frantz, P. C. Melby y B. L. Travi (2014). Development of an ex vivo lymph node explant model for identification of novel molecules active against *Leishmania major*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 527-535.
- Peraza-Flores, L. N. (2012) Hablando y escribiendo: el conocimiento y *Dorstenia contrajerva* L., Desde el Herbario CICY 4: 66–68.
http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/
- Peraza-Sánchez, S. R., S. Poot-Kantún, L. W. Torres-Tapia, F. May-Pat, P. Simá-Polanco y R. Cedillo-Rivera (2005). Screening of native plants from Yucatan for anti-*Giardia lamblia* activity. *Pharmaceutical Biology*, 43(7), 594-598.
- Peraza-Sánchez, S. R., F. Cen-Pacheco, A. Noh-Chimal, F. May-Pat, P. Simá-Polanco, E. Dumonteil, M. R. García-Miss y M. Mut-Martín (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of Yucatan peninsula. *Fitoterapia*, 78(4), 315-318.
- Pires-Quevedo, A. E. (2011). Actividades melanogénica, genotóxica e antiproliferativa de extratos de *Brosimum guadichuadii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA. Tesis de doctorado, Universidade federal de Mato Grosso do sul, 123 p.
- Poumale, H. M. P., D. Amadou, Y. Shiono, G. D. W. F. Kapche y B. T. Ngadjui (2011). Chemical constituents of *Dorstenia convexa* (Moraceae). *Asian of Journal Chemistry* 23(2), 525-527.
- Ramli, F. M. Rahmani, N. K. Kassim, N. M. Hashim, M. A. Sukari, A. Akim y R. Go (2013) New diprenylated dihydrochalcones from leaves of *Artocarpus elasticus*. *Phytochemistry letters*, 6, 582-585.
-

-
- Raynaud-Le, G. S., C. Fourneau, A. Laurens, C. Bories, R. Hocquemiller y P. M. Loiseau (2004). *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomedical, Pharmacotherapy*, 58(6-7), 388-392.
- RBG Kew (2016). *State of World Plant's Report - 2016*. Royal Botanic Garden, Kew, pág. : 3.
- Reguera, R.M., E. Calvo-Álvarez, R. Álvarez-Velilla y R. Balaña-Fouce (2014). Target-based vs. phenotypic screenings in *Leishmania* drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 355-357.
- Ribeiro, J.E.L.S. (2011). Neotropical Moraceae. W. Milliken, B. Klitgård y A. Baracat (2009 onwards), Neotropikey Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. Disponible en: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Moraceae.htm> [Acceso 20 de Octubre del 2015].
- Rocha, L., J. Almeida, R. Macedo y J. Barbosa-Filho (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12(6-7), 514-535.
- Ryu, Y. B., M. J. Curtis-Long, J. W. Lee, H. W. Ryu, W. S. Lee y K. H. Park (2009) Structural characteristics of flavanones and flavones from *Cudrania tricuspidata* for neuraminidase inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 4912-4915.
- Sayed, H. M., R. Ebel, M. H. Mohamed, O. R. M. Omobuwajo, S. F. Farag, G. A. Mohamed y P. Proksch (2006). Phenolics of *Cyperus alopecuroides* Rottb. Inflorescences and their biological activities. *Bulletin Pharmaceutical. Science (Assiut University)*, 29 (1), 9-32.
- Schonian, G., I. M. y E. Cupolli (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, 27(2), 466-469.
- Scotti, L., H. Ishiki, F.J.B. Mendonca, M.S. Da Silva y M.T. Scotti (2015). *In-silico* Analyses of Natural Products on *Leishmania* Enzyme Targets. *Mini-Review in Medicinal Chemistry*, 15(3), 253-269.
-

- SINAVE (2015). Información Epidemiológica de Morbilidad, Anuario Ejecutivo 2014. Disponible en:
<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>
[Acceso 18 de Agosto del 2015].
- Singh, D. y V. Aeri (2013) Phytochemical and pharmacological potential of *Acanthus ilicifolius*. Journal of Pharmacology Bioallied Science, 2013, 5(1), 17-20.
- Siqueira-Neto, J. L., S. Moon, J. Jang, G. Yang, C. Lee, H. K. Moon, E. Chatelain, A. Genovesio, J. Cechetto y L. H. Freitas-Junior (2012). An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. PLoS Neglected Tropical Diseases, 6, e1671.
- Strain, R. (2007). *The Pharmaceutical Paradox: Helping and Harming the Developing World*. Penn libraries, Pennsylvania. pp. 2-11.
- Silverstein, R., F. Webster y D. Kiemle. (2005) *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de América. pp. 82, 142, 188-199, 207 y 209.
- Sparkman, O. D., Z. Penton y F. G. Kitson (2011). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide: A Practical Guide*, Academic Press, San Diego, pp. 404-405.
- Tempone, A. G., C. M. de Oliveira y R. G. S. Berlinck (2011). Approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Medica*, 77, 572-585.
- Terreux, C., M. Maillard, H. Stoeckli-Evans, M. P. Gupta, R. K Downum, J. M. E. Quirke y K. Hosttetman (1995). Structure revision of a furanocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. *Phytochemistry*, 39(3), 645-647.
- The Plant List* (2013) Versión 1.1 *Dorstenia* The Plant List. Disponible en:
www.theplantlist.org/browse/A/Moraceae/Dorstenia/ [Acceso 20 de Octubre del 2015].

-
- Tabopda, T. K., J. Ngoupayo, P. K. Awoussong, A. C. Mitaine-Offer, M. S. Ali, B. T. Ngadjui y M. A. Lacaille-Dubois (2008). Triprenylated flavonoids from *Dorstenia psilurus* and their α -Glucosidase inhibition properties. *Journal of Natural Products* 71, 2068-2071.
- Tovar-Miranda, R., R. Córtes-García, N. F. Santos-Sánchez y P. Joseph-Nathan (1998). Isolation, total synthesis, and relative stereochemistry of a dihydrofurocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. *Journal of Natural Products*, 61(10), 1216-1220.
- Tsopmo, A., M. Tene, P. Kamnaing, J. F. Ayafor y O. Sterner (1999). A new diels-alder-type adduct flavonoid from *Dorstenia barteri*. *Journal of Natural Products* 62 (10), 1432-1434.
- Uddin-Ahmad, V. y S. Bano (1980). Isolation of β -sitosterol and ursolic acid from *Morinda citrifolia* Linn., *Journal of Chemistry Society of Pakistan*, 2(2), 71.
- UNEP (2002). *The third Global Environment Outlook report (GEO-3): Past, present and future*. EARTHSCAN, Reino Unido, pág.: 354.
- Velázquez, C., F. Calzada, J. Torres, F. González y G. Ceballos (2006). Antisecretory activity of plants used to treat gastrointestinal disorders in México. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 66-70.
- Vilegas, J. H. Y., F. M. Lanças, W. Vilegas y G. L. Pozetti (1997) Further triterpenes, steroids and furocoumarins from Brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). *Journal of Brazilian Chemical Society*, 8, 529-535.
- Van den Bogaart, E., G. J. Schoone, P. England, D. Faber, K. M. Orrling, J. C. Dujardin, S, Sundar, H. D. F. H. Schalling y E. R. Adams (2014). Simple colorimetric trypanothione reductase based assay for high throughput screening of drugs against *Leishmania* intracellular amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 527-535.
- Vannier-Santos, M., A. Martiny y W. Souza (2002). Cell biology of *Leishmania* spp. : invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 297-318.
-

-
- Vilegas, J. H. Y., F. M. Lanças, W. Vilegas y G. L. Pozetti. (1997). Further triterpenes, steroids and furocoumarins from Brazilian. Medicinal Plants of *Dorstenia* genus (Moraceae), Journal of Brazilian Chemistry Society, 8(5), 529-535.
- Waechter, A. I., A. Cavé, R. Hocquemiller, C. Bories, V. Muñoz y A. Fournet (1999). Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii*(Annonaceae). Phytotherapy Research, 13(2), 175-177.
- Wagner, H., R. Bauer, D. Melchart, P. G. Xiao, A. Staudinger (2011). *Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines: Thin-layer and High Performance Liquid Chromatography of Chinese Drugs*. Springer Science & Business Media, Berlin, pp. 101-102.
- Weller, M. G. (2012). A unifying review of Bioassay-guided fractionation, effect- directed analysis and related techniques. Sensors, 12, 9181-9209.
- WHO (2011). *The World Traditional Medicines Situation, in Traditional medicines: Global Situation, Issues and Challenges*. Tercera edición, WHO, Geneva, pp.:1-14.
- WHO (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO Report on Neglected Diseases. WHO, Francia. pp. 6, 67-72.
- WHO (2016). Leishmaniasis, Disponible en <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> [Acceso 4 de Octubre del 2016].
- Wolf, D. y K. Siems (2007). Burning the Hay to Find the Needle – Data Mining Strategies in Natural Product Dereplication. Chimia, 61, 339-345.
- Xu, R., Y. Ye y W. Zhao (2011). *Introduction to Natural Products Chemistry*. CRC Press, Boca ratón, pp.208-211.
- Yazaki, K., K. Sasaki y Y. Tsurumaru (2009). Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. Phytochemistry, 70(15-16), 1739-1745.
-

- Yuet-Ping, K., I. Ibdarah, U. K. Yusuf, Y. L. Latha y S. Sasidharan (2012). Standardization of *Euphorbia hirta* with chemical compounds identification (GC-MS). *International Journal of Phytomedicine*, 4(1), 12-21.
- Zapata-Sudo, G., T. C. F. Mendes, M. A. Kartnaller, T. O. Fortes, N. F. B. Freitas, M. A. Coelho Kaplan y R. Takashi Sudo (2010). Sedative and anticonvulsant activities of methanol extract of *Dorstenia arifolia* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 130, 9-12.
- Zheng, Z. P., C. Ka-Wing, J. Tsz-Kin, H. Li y M. Wa (2008). Isolation of tyrosinase inhibitors from *Artocarpus heterophyllus* and use of its extract as antibrowning agent. *Molecular Nutrition in Food Research*, 52, 1530-1538.
- Zou, Y., M. Lobera y B. Snider (2005). Synthesis of 2,3-Dihydro-3-hydroxy-2-hydroxylalkylbenzofurans from Epoxy Aldehydes. One-Step Syntheses of Brosimacutin G, Vaginidiol, Vaginol, Smyrindiol, Xanthoarnol, and Avicenol A. Biomimetic Syntheses of Angelicin and Psoralen. *Journal of Organic Chemistry*, 70 (5), 1761-1770.

Short communication

Metabolites isolated from the rhizomes of *Dorstenia contrajerva* with anti-leishmanial activity

Héctor A. Peniche-Pavía,^{a,1} Deisy Medrano-Nahuat,^{a,1} Luis W. Torres-Tapia,^a Mirza Mut-Martín,^b Rosario García-Miss,^b Sergio R. Peraza-Sánchez^{a,*}

^aCentro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), Calle 43 #130, Col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, México 97205

^bCentro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi”, Universidad Autónoma de Yucatán (CIR-UADY), Av. Itzáes #490, Mérida, Yucatán, México 97000

¹Co-first authors

*Corresponding author: Tel. (+52 999) 942-8330; Fax: (+52 999) 981-3900. E-mail address: speraza@cicy.mx (S.R. Peraza-Sánchez)

ABSTRACT: Two new 2-benzylbenzofurans, dorsjervin A (**1**) and dorsjervin B (**2**), were isolated together with other nine known compounds (**3-11**) from *Dorstenia contrajerva*. Structure elucidation of both compounds was done through UV, IR, 1D- and 2D-NMR experiments, and mass spectrometry. All of the isolated compounds were evaluated for an *in vitro* anti-leishmanial activity; compounds **7** and **8** were active, with IC₅₀'s 4.9 and 2.9 μM, respectively. This is the first report on prenylated flavonoids (**1**, **2**, and **7**) isolated from a species of *Dorstenia* in the Americas.

Keywords: 2-benzylbenzofurans; dorsjervin A; dorsjervin B; *Dorstenia contrajerva*; *Leishmania mexicana*

1. Introduction

Leishmaniasis is a complex zoonosis caused by intracellular species from the genus *Leishmania* (family: Trypanosomatidae, class: Kinetoplastida) transmitted by hematophagous mosquitoes of the genus *Phlebotomus* in Africa and Eurasia or *Lutzomyia* in the Americas. The clinical manifestation of the disease depends on the species of *Leishmania* and the host. There are two main types of leishmaniasis: cutaneous (causing skin ulcers, which also includes mucocutaneous, producing necrosis of mouth and nose tissues) and visceral (hepatosplenomegaly, anemia, and fever, and may result deadly without treatment) (Fraga *et al.*, 2010; Murray *et al.*, 2005; Stockdale *et al.*, 2013).

The most commonly used chemotherapeutic agents for the treatment of leishmaniasis are sodium stibogluconate (Pentostam®), N-methylglucamine antimoniate (Glucantime®), pentamidine (Pentacarinat®), and amphotericin B (Fungizone®, Ambisome®). These treatments always require long periods of application and because of that severe side effects occur, including cardiac and renal toxicity. This has led the World Health Organization (WHO) to emphasize the need to develop new treatments for leishmaniasis (Chappuis *et al.*, 2007, Desjoux *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 20011).

In the Yucatan State of Mexico, cutaneous leishmaniasis, known as “chiclero’s ulcer” in the region, is caused by *Leishmania mexicana*. The methanol extract of the rhizomes of a plant known as *Dorstenia contrajerva* L. (Moraceae) showed good activity against promastigotes of *L. mexicana* (Peraza-Sanchez *et al.*, 2007). This shrub is found in

tropical and subtropical areas and several parts of it have been used in Mayan traditional medicine to reduce fever, treat colds, diarrhea, and snake bites. Few studies have focused on the phytochemical and biological activity of rhizomes of *D. contrajerva*, and this is the first study that describes in detail the chemistry of the constituents as well as the potential anti-leishmanial activity of the isolated compounds (Cáceres *et al.*, 2001; Casagrande *et al.*, 1974; Terreaux *et al.*, 1995; Tovar-Miranda *et al.*, 1998). In the present study, we report on the isolation and structure elucidation of the new dorsjervins A (**1**) and B (**2**) and the known compounds **3-11** from *D. contrajerva*, as well as their biological evaluation against promastigotes of *L. mexicana*.

2. Results and Discussion

As a result of a series of fractionations with various chromatographic techniques, **1-11** were isolated and their structures were elucidated using spectroscopic analyses [UV, IR, and NMR spectra (^1H -, ^{13}C -, 1D-NOESY, including 2D experiments: COSY, HMBC, and HSQC), and mass spectroscopy] and by direct comparison with data published in the literature. This permitted the identification of two new compounds dorsjervin A (**1**) and dorsjervin B (**2**) (Fig.1), plus nine known compounds: squalene (**3**) (Weeks and Francesconi, 1978), dorstenin (**4**) (Terreaux *et al.*, 1995), psoralen (**5**) (Chunyan *et al.*, 2009), γ -sitosterol (**6**) (Raman *et al.*, 2012), cycloartocarpesin (**7**) (Ramli *et al.*, 2013), 1-*O*-linolenoyl-2-*O*-stearoyl-3-*O*- β -D-galactopyranosyl glycerol (**8**) (Manzo *et al.*, 2012), bergapten (**9**) (Chunyan *et al.*, 2009), xanthoarnol (**10**) (Zou *et al.*, 2005), dorsteniol (**11**) (Tovar-Miranda *et al.*, 1998).

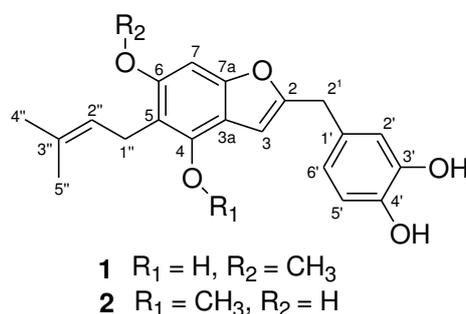


Fig. 1. Structures of compounds **1** and **2** isolated from the rhizomes of *D. contrajerva*.

Compound **1** was isolated as a dark red amorphous solid. The UV showed λ_{max} at 251, 289, and 365 nm. The IR spectrum revealed signals at 3600-3100 cm^{-1} due to an

aromatic hydroxyl, 2922 cm^{-1} due to stretching of C-H bonds, 1608 and 1519 cm^{-1} attributed to an aromatic ring, 1287 cm^{-1} for stretching of C-O bonds, and 958 and 857 cm^{-1} assigned to *ortho* 3',4'-OH substitution in phenyl ring B. The HRESIMS data (m/z 355.1544 $[\text{M} + \text{H}]^+$) indicated a molecular formula $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$. Furthermore, ^1H NMR spectrum of compound **1** showed two singlet aromatic signals at δ 6.75 (H-7) and 6.31 (H-3) allocated at rings A and B, respectively, a signal for a methoxyl group at δ 3.69 (6-OMe), and a signal at δ 3.85 (s, H-2¹) for an isolated methylene generating a bridge between rings B and C. Moreover, a prenyl moiety (3,3-dimethylallyl) was inferred by the presence of a set of signals in the ^1H NMR spectrum, a broad triplet of doublets at δ 5.20 ($J = 7.3, 1.5$ Hz, H-2'') of a vinyl proton coupled (J^3) to methylene protons at δ 3.40 ($J = 7.2$ Hz, H-1''), plus two signals for methyl protons at δ 1.60 (H-4'') and δ 1.71 (H-5''). The aromatic ring B using a booster resolution in the NMR spectra viewer showed us two pairs of doublet of doublets at δ 6.52 ($J = 8.0, 2.1$ Hz, H-6') and δ 6.64 ($J = 8.0, 1.6$ Hz, H-5'), the latter signal being overlapped by a doublet at δ 6.63 (H-2', $J = 2.1$ Hz). Together the ^1H and ^{13}C NMR spectra (Table 1) suggested a structure similar to 2-(*p*-hydroxy-benzyl)-6-methoxy-benzofuran, a compound isolated from *D. gigas* (Franke *et al.*, 2001).

The HMBC spectra (Fig. 2) showed correlations of H-3 to C-2 (158.1), C-3a (123.4), and C-4 (146.6); H-7 to C-7a (146.6) and C-6 (142.8); H-1'' to C-2'' (122.1), C-4 (146.6), C-5 (117.9), and C-6 (142.8); H-2¹ to C-2 (158.1), C-3 (102.6), C-1' (128.3), C-5' (115.4), and C-6' (119.3); and protons of -OCH₃ group to C-6 (142.8). Based on ^1H and ^{13}C NMR signals, the structure of **1** is very similar to that of 5-prenyl-2-arylbenzofurans (Demizu *et al.*, 1988), and alike to compounds such as 7-prenyl-2-benzylbenzofurans (Gomez-Garibay *et al.*, 1997) or 7-prenyl-2-arylbenzofurans (Chen *et al.*, 2006), which have a greater difference in the ^1H and ^{13}C NMR data; but due to the extra methylene C-2¹ (δ_{H} 3.85, δ_{C} 33.5) connected to the phenyl ring, the structure of **1** is closer to 2-(*p*-hydroxy-benzyl)-6-methoxy-benzofuran (Franke *et al.*, 2001). The latter was confirmed by an EIMS spectrum, in which a loss of m/z 123, corresponding to a 3,4-dihydroxy-benzyl moiety, was observed. Also, the 1D selective gradient NOESY experiment confirmed H-7 to be close to 6-OCH₃. Based on the evidence described

before this new compound is 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-6-methoxy-5-prenyl-benzofuran-4-ol and it was named as dorsjervin A.

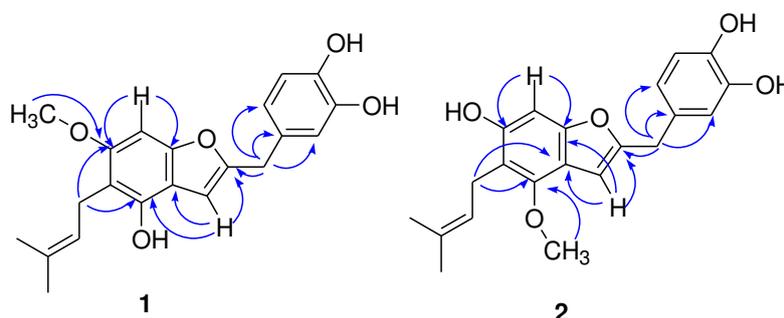


Fig. 2. Key HMBC correlations of compounds **1** and **2**.

Compound **2** was isolated as a dark red amorphous solid. The HREIMS showed a peak at m/z 354.1467 ($[M]^+$), indicating a molecular formula of $C_{21}H_{22}O_5$, being an isomer of **1**. Signals at UV, IR, and 1H and ^{13}C NMR spectra suggested **2** to have a structure similar to **1**. The only difference was the allocation of the methoxyl group to C-4. The HMBC experiment confirmed the connectivity with correlations of H-3 to C-2 (156.2), C-3a (119.6), C-7a (150.4); H-7 to C-3a (119.6), C-6 (147.7), C-7a (150.4); H-1'' to C-2'' (122.9), C-4 (142.2), C-6 (147.7), C-7 (96.4); and $-OCH_3$ to C-4 (142.2) (Fig. 2). Then, the new elucidated structure is 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-4-methoxy-5-prenyl-benzofuran-6-ol, named as dorsjervin B.

Dorsjervins A and B (**1** and **2**) probably have a common pathway to auronones, such as aureusidin or its derivative 5-prenyl-aureusidin, where the difference lies in C ring, which has been transformed into a furan ring in **1** and **2**; then, this new family of benzofurans does not come biosynthetically either from stilbenoids (Pacher *et al.*, 2002) or ketone benzofurans (Stephen *et al.*, 2009). As far as we know, only one benzofuran has previously been isolated from nature, in particular, from *D. gigas* (Franke *et al.*, 2001), hence we suggest that **1** and **2** can be used as chemotaxonomic markers for the genus.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for compounds **1** and **2**.^a

#	1			2		
	^{13}C	^1H	HMBC	^{13}C	^1H	HMBC
2	158.1	-	-	156.2	-	-
3	102.6	6.31 (1H, s)	2, 3a, 4	101.7	6.38 (1H, s)	2, 3a, 7a
3a	123.4	-	-	119.6	-	-
4	146.6	3.34 (OH)	-	142.2	-	-
5	117.9	-	-	125.4	-	-
6	142.8	-	-	147.7	-	-
7	103.4	6.75 (1H, s)	6, 7a	96.4	6.78 (1H, s)	3a, 4, 7a
7a	146.6	-	-	150.4	-	-
2 ¹	33.5	3.85 (2H, s)	2, 3, 1', 5', 6'	33.3	3.84 (2H, s)	2, 3, 1', 2', 6'
1'	128.3	-	-	128.4	-	-
2'	116.0	6.63 (1H, d, $J = 2.1$) ^c	3', 4'	115.9	6.62 (1H, d, $J = 1.6$) ^c	3', 4'
3'	143.8	8.92 (OH) ^b	-	143.8	-	-
4'	145.9	8.74 (OH) ^b	-	145.1	-	-
5'	115.4	6.64 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$) ^c	1', 6'	115.5	6.64 (1H, dd, $J = 8.0, 1.4$) ^c	1', 6'
6'	119.3	6.52 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$) ^c	3', 5'	119.3	6.51 (1H, dd, $J = 8.1, 1.6$) ^c	3', 5'
1''	23.1	3.40 (2H, d, $J = 7.4$)	4, 5, 6, 2'', 3''	25.4	3.39 (2H, d, $J = 7.3$)	3a, 4, 6, 7, 2'', 3''
2''	122.1	5.20 (1H, t, $J = 7.4$)	4'', 5''	122.9	5.16 (1H, t, $J = 7.3$)	4'', 5''
3''	131.2	-	-	130.7	-	-
4''	25.4	1.60 (3H, s)	3'', 5''	26.0	1.64 (3H, s)	2'', 3'', 5''
5''	17.9	1.71 (3H, s)	3'', 4''	17.7	1.74 (3H, s)	2'', 3'', 4''
4-OCH ₃				60.2	3.65 (3H, s)	4
6-OCH ₃	60.3	3.69 (3H, s)	6			

^a ^1H NMR spectra measured at 600 MHz, ^{13}C NMR spectra measured at 150 MHz; obtained in DMSO- d_6 .

^b Interchangeable.

^c Obtained by resolution booster of MestReNova NMR spectra viewer.

Regarding the anti-leishmanial activity, the methanol extract showed a moderate activity with an $IC_{50} = 30.2 \mu\text{g/mL}$, while the hexane fraction, obtained from liquid-liquid partition of this extract along with CH_2Cl_2 , AcOEt, and aqueous fractions, was the only active of the four, with an $IC_{50} = 5.92 \mu\text{g/mL}$. From the aforementioned fraction, compounds **7** and **8** were isolated; these are the only ones that showed anti-leishmanial activity, with IC_{50} 's = 4.9 and 2.9 μM , respectively (Table 2). This activity can be considered good for pure compounds and then they are named as "hit" compounds ($< 10 \mu\text{M}$) (Hughes *et al.*, 2011), thus they can be subjected to further studies.

Table 2. Anti-leishmanial activity of compounds **1-11** isolated from *D. contrajerva*.^a

Compound	IC_{50} (μM)	Compound	IC_{50} (μM)
1	>100	7	4.9 ± 0.24
2	>100	8	2.9 ± 0.84
3	>100	9	>100
4	>100	10	>100
5	>100	11	N.T
6	>100	Amphotericin B	0.31 ± 0.04

^a All results are expressed as mean \pm SD; n = 3 for all groups. NT: not tested.

3. Experimental

3.1 General Experimental Procedures

Aluminum sheet pre-coated with silica gel 60 and C_{18} reversed phase silica gel (Merck) with fluorescent indicator were used for thin layer chromatography, and the spots were visualized under ultraviolet light (254 and 366 nm), and by spraying either phosphomolibdic acid or oleum (with 0.1% vainillin) reagents. Silica gel 60 and C_{18} -reversed phase silica gel were used for preparative chromatography, with a different range of particle size. NMR spectra were recorded on a Varian/Agilent Premium Compact 600 MHz (14.1 T) spectrometer, with chemical shifts reported in ppm (δ) and residual solvent peaks as internal references; deuterated solvents were obtained commercially. Infrared spectra (IR) were determined in KBr films using a Nicolet Protegé 460 spectrophotometer. Mass spectra (GC-MS) were acquired with a 6890N gas chromatographer coupled to a 5975B mass detector from Agilent Technologies. HRESIMS spectra were obtained in a Bruker maXis QTOF at Fundación Medina sited

in Granada, Spain, and HREIMS data were obtained in a Jeol GCmate II at Facultad de Química of Autonomous University of Yucatan (UADY) in Merida, Mexico. Structures of known compounds were obtained by comparing their spectra with those available in the literature and CAS database. Semi-preparative HPLC was performed in an Agilent Technologies 1260 Infinity apparatus, using a C₁₈ column (Grace, 10 × 250 mm, 5 μm); isocratic water/acetonitrile (1:1) was used as mobile phase at a flow rate of 3 mL/min; MWD was employed, four λ's were selected at 219, 265, 289, and 330 nm.

3.2 Plant Material

Dorstenia contrajerva L. (Moraceae) was collected in February 7, 2012 around *Xpujil* Mayan ruins, close to the city of Chetumal, Quintana Roo, Mexico. The plant material was identified by expert taxonomists of the “Roger Orellana” Regional Herbarium at CICY, where a voucher was deposited under the reference code PSima-3065. The plants were washed and the rhizomes separated from the leaves and the inflorescence. The rhizomes were dried in a chamber at 50 °C for three days, then grinded and weighted (6.782 Kg).

3.3. Extraction and isolation

The rhizomes (6.782 Kg) were macerated with 18 L of MeOH at room temperature for 24 h; this process was done by triplicate. The filtrate was evaporated under vacuum to yield a dark crude extract (938.3 g). For the liquid-liquid partition, 300 g of extract were dissolved in MeOH/H₂O (1:3), and fractionated with solvents of ascending polarity, obtaining the corresponding hexane (DCR-2a, 35.1 g), dichloromethane (DCR-2b, 32.8 g), ethyl acetate (DCR-2c, 12.5 g), and aqueous (DCR-2d, 216.4 g) fractions.

Fraction DCR-2a (20 g) was subjected to a VLC with a gradient of hexane (Hx)/acetone (An) to yield a total of nine fractions collected (DCR-3a – DCR-3i). Fraction DCR-3a (173.1 mg) was loaded on a silica gel 60 (70-230 mesh) CC run isocratically with Hx/An (3:1) to yield squalene (**3**) (148.1 mg) as yellow liquid. Fraction DCR-3d was passed through a silica gel 60 (230-400 mesh) flash CC to obtain dorstenin (**4**) (16.9 mg) as white amorphous solid. Fraction DCR-3f was subjected to a Sephadex LH-20 CC run with Hx/An (3:1) to yield psoralen (**5**) (66.1 mg) as colorless needles. Fraction

DCR-3g was introduced first to a silica gel 60 CC run with Hx/CH₂Cl₂/MeOH (3:1.8:0.2), Hx/An/MeOH (3:1.8:0.2), and An/MeOH (1:1), followed by Sephadex LH-20 CC with 100% MeOH, and then silica gel 60 (230-400 mesh) flash CC run with Hx/An (3:1.2) to yield γ -sitosterol (**6**) (6.4 mg) as white cereus solid, cycloartocarpesin (**7**) (5.5 mg) as yellowish needles, and 1-*O*-linolenoyl-2-*O*-stearoyl-3-*O*- β -D-galactopyranosyl (**8**) (126.9 mg) as white amorphous solid.

Fraction DCR-2b (25 g) was separated on a silica gel 60 VLC run with a gradient Hx/An to give 13 fractions (DCRH-3a – DCRH-3m). A white precipitate was filtrated from fractions DCRH-3e and DCRH-3j and was further subjected to a silica gel 60 CC eluted with a gradient system of Hx/An, to yield two compounds as colorless needles, bergapten (**9**) (180 mg) and dorstenin (**4**) (100 mg). Fraction DCRH-3h (2.16 g) was subjected to a silica gel 60 CC eluted with a gradient system of Hx/An, giving a total of 13 fractions (DCRH-4a – DCRH-4m); then DCRH-4j was purified on a Sephadex LH-20 CC using MeOH as solvent, collecting four fractions (DCRH-5a – DCRH-5d). Fraction DCRH-5b was purified on a C₁₈ reversed silica gel CC using mixtures of EtOH/H₂O to yield a dark powder, xanthoarnol (**10**) (2 mg). DCRH-5c was separated through silica gel 60 CC with Hx/CH₂Cl₂/An (5.5:3:1.5) and then by semi-preparative HPLC to yield two red dark solid compounds, dorsjervin A (**1**) (9.4 mg) and dorsjervin B (**2**) (6 mg). Finally, fraction DCRH-3k (1.7 g) was passed through a silica gel 60 CC on elution with gradient Hx/An, then through Sephadex LH-20 CC eluted with MeOH, and on a C₁₈ reversed silica gel CC using MeOH/H₂O/CH₃CO₂H (1:9:0.1) to 9:1:0.1 to yield a colorless crystal, dorsteniol (**11**) (11.1 mg).

3.4. Spectral data

Dorsjervin A (**1**): Dark red amorphous solid; UV (MeOH, λ_{\max} , nm, log ϵ): 251 (4.49), 289 (4.33), 365 (4.21); IR (ν_{\max} , cm⁻¹): 3600-3100, 2922, 1608, 1519, 1447, 1357, 1284, 1190, 1096, 958, 857; ¹H RMN (600 MHz, DMSO-*d*₆): see Table 1; ¹³C RMN (150 MHz, DMSO-*d*₆): see Table 1; EIMS (70 eV, *m/z*): 410 (10), 354 (100), 338 (10), 323 (10), 123 (60), 297 (7), 269 (7), 163 (12), 77 (5); HRESIMS (*m/z*): 355.1544 ([M + H]⁺) (calculated for C₂₁H₂₂O₅, *m/z* 354.1467); HREIMS (*m/z*): 354.1466 ([M]⁺) (calculated for C₂₁H₂₂O₅, *m/z* 354.1467).

Dorsjervin B (**2**): Dark red amorphous solid; UV: (MeOH, λ_{\max} , nm, log ϵ): 251 (4.49), 289 (4.33), 365 (4.21); IR (ν_{\max} , cm^{-1}): 3600-3100, 2922, 1605, 1492, 1447, 1101, 1287, 1062, 1012, 953, 859; ^1H RMN (600 MHz, DMSO- d_6): see Table 1; ^{13}C RMN (150 MHz, DMSO- d_6): see Table 1; EIMS (70 eV, m/z): 410 (10), 354 (100), 338 (10), 323 (30), 123 (66), 298 (7), 269 (7), 179 (9), 69 (5); HREIMS (m/z): 354.1467 ($[\text{M}]^+$) (calculated for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$, m/z 354.1467).

3.5. Growth inhibition of promastigotes in vitro assay

The assay for anti-leishmanial activity was done on promastigotes of *L. mexicana* LV-4 (MNYC/BZ/62/M379) as previously described in the literature (Hocquemiller *et al.*, 1991).

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge to Jesús Martín-Serrano, Fundación Medina in Granada, Spain, for HRESIMS spectra; to Patricia Quintana-Owen and Emanuel Hernandez-Nuñez from the National Laboratory of Nanotechnology and Biomaterials of CINVESTAV-Merida (Mexico), for NMR experiments; to Gonzalo Mena-Rejón and Manlio Graniel-Sabido, Facultad de Química (UADY) for HREIMS spectra; and Paulino Sima-Polanco, from Natural Resources Unit at CICY, for localization and identification of plant material. We thank National Council of Science and Technology of Mexico (Conacyt) for research grant #105346. HAPP thanks Conacyt for scholarship #338183.

References

- Cáceres, A., Rastrelli, L., De Simone, F., De Martino, G., Saturnino, G.C., Saturnino, P., Aquino, R., 2001. Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia* 72, 376–381.
- Casagrande, C., Ronchetti, F., Russo, G., 1974. The structure of syriogenin. *Tetrahedron* 30, 3587–3589.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaer, M., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Micro.* 5, 873–882.

-
- Chen, L., Jiang, W., Hou, A. (2006). Novel 2-arylbenzofuran derivatives from *Artocarpus petelotii*. *Helv. Chim. Acta* 89, 1000–1007.
- Chunyan, C., Bo, S., Ping, L., Jingmei L., Ito Y., 2009. Isolation and purification of psoralen and bergapten from *Ficus carica* L. leaves by high-speed countercurrent chromatography. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 32, 136–143.
- Demizu, S., Kajiyama, K., Takahashi, K., Hiraga, Y., Yamamoto, S., Tamura, Y., Okada, K., 1988. Antioxidant and antimicrobial constituents of licorice: isolation and structure elucidation of a new benzofuran derivative. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 3474–3479.
- Desjeux, P., 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318.
- Fraga, J., Montalvo, A.M., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Van der Auwera, G., 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gen. *Infect. Genet. Evol.* 10, 238–245.
- Franke, K., Porzel, A., Masaoud, M., Adam, G., Schmidt, J., 2001. Furanocoumarins of *Dorstenia gigas*. *Phytochemistry* 56, 611–621.
- Gómez-Garibay, F., Calderón, J.S., Quijano, L., Téllez, O., Olivares, M.S., Ríos, T., 1997. An unusual prenyl biflavonol from *Tephrosia tepicana*. *Phytochemistry*, 46, 1285–1287.
- Hocquemiller, R., Cortes, D., Arango, G.J., Myint, S.H., Cave, A., Angelo, A., Muñoz, V., Fournet, A., 1991. Isolement et synthèse de l'espintanol, nouveau monoterpène antiparasitaire. *J. Nat. Prod.* 54, 445–452.
- Hughes, J.P., Rees, S., Kalindjian, S.B., Philpott, K.L., 2011. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1239–1249.
- Manzo, E., Ciavatta, M.L., Pagano, D., Fontana A., 2012. An efficient and versatile chemical synthesis of bioactive glyco-glycerolipids. *Tetrahedron Lett.* 53, 879–881.
- Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561–1577.
- Oliveira, L.F., Schubach, A.O., Martins, M.M., Passos, S.L., Oliveira, R.V., Marzochi, M.C., Andrade, C.A., 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 118, 87–96.
- Pacher, T., Seger, C., Engelmeier, D., Vajrodaya, S., Hofer, O., Greger, H., 2002. Antifungal stilbenoids from *Stemona collinsae*. *J. Nat. Prod.* 65, 820–827.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M., 2007. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia* 78, 315–318.
-

-
- Stephen, T.L., Davis, T.Z., Gardner, D.R., Stegelmeier, B.L., Evans, T.J., 2009. Quantitative method for the measurement of three benzofuran ketones in Rayless Goldenrod (*Isocoma pluriflora*) and White Snakeroot (*Ageratina altissima*) by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 57, 5639–5643.
- Stockdale L, Newton, R, 2013. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7: e2278.
- Raman, V., La, S., Pardha Saradhi, M., Narashimha Rao, B., Naga Vamsi, K., Sudhakar, M., Radhakrishnan, T., 2012. Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatorium odoratum*. *Asian. J. Pharm. Clin. Res.* 5, 99–106.
- Ramli, F., Rahmani, M., Kassim, N.K., Hashim, N.M., Sukari, M.A., Akim, A.M., Go, R., 2013. New diprenylated dihydrochalcones from leaves of *Artocarpus elasticus*. *Phytochem. Lett.* 6, 582–585.
- Terreux, C., Maillard, M., Stoeckli-Evans, H. Gupta, M.P., Downum, R.K., Quirke, J. M.E., Hosttetman, K., 1995. Structure revision of a furanocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. *Phytochemistry* 39, 645–647.
- Tovar-Miranda, R., Cortes-Garcia, R., Santos-Sanchez, N.F., Joseph-Nathan, P., 1998. Isolation, total synthesis, and relative stereochemistry of a dihydrofurocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. *J. Nat. Prod.* 61, 1216–1220.
- Weeks, O.B., Francesconi, M.D., 1978. Occurrence of squalene and sterols in *Cellulomonas dehydrogenans* (Arnaudi 1942) comb. nov. Hester 1971. *J. Bacteriol.* 136, 614–624.
- Zou, Y., Lobera, M., Snider, B., 2005. Synthesis of 2,3-dihydro-3-hydroxy-2-hydroxylalkylbenzofurans from epoxy aldehydes. One-step syntheses of brosimacutin G, vaginidiol, vaginol, smyrindiol, xanthoarnol, and avicenol A. Biomimetic syntheses of angelicin and psoralen. *J. Org. Chem.* 70, 1761–1770.