Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ACTIVIDAD LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE METABOLITOS AISLADOS DE *Aphelandra scabra* Y *Dorstenia contrajerva*

Tesis que presenta

ANA GUADALUPE CARRILLO AKÉ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2022

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 Ana Guadalupe Carrillo Aké titulado **"Actividad leishmanicida *in vitro* de metabolitos aislados de *Aphelandra scabra* y *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. bajo la dirección del Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y la Dra. Blanca Marina Vera Ku, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

_____
Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 28 de marzo de 2022.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Ana Guadalupe Carrillo Aké

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto de Ciencia Básica Conacyt 2015 # 257920 titulado “Aislamiento y síntesis de metabolitos de plantas medicinales de la península de Yucatán y evaluación *in vitro* e *in vivo* de su actividad leishmanicida”, bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y la Dra. Marina Vera Ku.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca con número de apoyo (288435) para la realización de este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por el apoyo y uso de las instalaciones y equipos del Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología.

Al Hospital General de México, Dr. Eduardo Liceaga, por el permiso para realizar una estancia de investigación en la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Centro de Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” (CIR-UADY), por permitirme realizar diversos bioensayos en el Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Ciencias Biomédicas.

A mis asesores, el Dr. Sergio R. Peraza Sánchez y la Dra. Marina Vera Ku, por la ayuda, paciencia y conocimientos compartidos durante todo el proceso de mi trabajo de investigación.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser, de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la UNAM, por aceptar mi participación en una estancia de investigación necesaria para concluir mi proyecto de tesis.

A las investigadoras, la Dra. Elsy Nalleli Loría Cervera y la M. en C. Erika Ivett Sosa Bibiano del Laboratorio de Inmunología del CIR-UADY, por enseñarme y aconsejarme sobre el adecuado manejo de las diferentes técnicas de bioensayos aplicadas en mi proyecto de investigación.

Al M. en C. Luis W. Torres Tapia, del Laboratorio de Química de Productos Naturales del CICY, por el apoyo y guía en cada una de las técnicas empleadas en el laboratorio necesarias para la parte experimental de mi tesis.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez, de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental de la UNAM, por su asesoría y enseñanzas sobre diferentes técnicas de bioensayos empleados en mi estancia doctoral.

A la Dra. Marcela Gamboa Angulo del CICY, por sus consejos y sugerencias en cada examen tutorial.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez del CICY, por sus correcciones, sugerencias y aportaciones en la tesis y en el predoctoral.

A la Dra. Bertha Irene Juárez Flores del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), por ayudarme con el proyecto de tesis y sus recomendaciones en cada tutorial.

Al Dr. Felipe Vázquez Flota del CICY, por ayudarme a mejorar mi trabajo de tesis.

A mis compañeros y amigos de laboratorio.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

Artículo: Antileishmanial activity of *Dorstenia contrajerva* against amastigotes of *Leishmania mexicana*. Publicado en la *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Autores: Ana G. Carrillo-Aké, Luis W. Torres-Tapia, José Delgado-Domínguez, Rocely B. Cervantes-Sarabia, Ingeborg Becker, Marina Vera-Ku, Sergio R. Peraza-Sánchez. Publicado en línea: 3/Septiembre/2021.

DEDICATORIAS

A mi esposo Antonio Chablé y mi hija Elizabeth, por todo su apoyo, cariño y paciencia durante la preparación de este documento y a lo largo de todo el posgrado.

A mis padres, Elvira Aké y José Carrillo†, por darme siempre todo su amor y ayuda incondicional.

A mis suegros y cuñados, por siempre estar pendientes y cuidar de mi hija cada vez que tenía que ausentarme de casa.

A Dios por tener vida y salud.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN……1

CAPÍTULO I……3

ANTECEDENTES…….....3

1.1. Leishmaniasis…….....3

1.2. Leishmaniasis en México…….....5

1.3. Agente etiológico……...……...6

1.4. Ciclo de transmisión de la leishmaniasis…….....8

1.5. Distribución geográfica de la leishmaniasis……9

1.6. Tratamiento contra la leishmaniasis…….....10

1.7. Plantas empleadas en la medicina tradicional contra la leishmaniasis…….....12

1.8. Metabolitos secundarios de plantas con actividad leishmanicida……...13

1.9. *Aphelandra scabra* (Vahl) Sm……..15

1.9.1. Actividad biológica de *Aphelandra scabra*……..16

1.10. *Dorstenia contrajerva* L……..17

1.10.1. Actividad biológica de *Dorstenia contrajerva*……...18

JUSTIFICACIÓN…….....20

OBJETIVO GENERAL……20

OBJETIVOS ESPECIFICOS EN *Aphelandra scabra*……..21

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL EN *Aphelandra scabra*…….....21

OBJETIVOS ESPECIFICOS EN *Dorstenia contrajerva*…….....22

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL EN *Dorstenia contrajerva*……..22

CAPÍTULO II……23

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Aphelandra scabra*……23

2.1. INTRODUCCIÓN……..……..23

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS……..23

2.2.1. Materiales y equipos en general……23

2.2.2. Material vegetal…….....25

2.2.3. Obtención del extracto metanólico (ASH-1a)……..25

2.2.4. Partición líquido-líquido de ASH-1a……...25

2.2.5. Cromatografía líquida al vacío (CLV) de fracciones activas…….....26

2.2.6. Aislamiento de metabolitos secundarios de fracciones activas……28

2.2.6.1. Aislamiento del compuesto 1 (cirsimarina)……..28

2.2.6.2. Aislamiento del compuesto 2 (sorbifolín)……29

2.2.6.3. Aislamiento del compuesto 3 (cirsimaritina)…….....30

2.2.6.4. Aislamiento del compuesto 4 (tirosol)……...31

2.2.6.5. Aislamiento del compuesto 5 (hidroxitirosol)……33

2.2.6.6. Aislamiento de los compuestos 6 y 7 (ASH-28P1, ASH-28P3)…….....35

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..36

2.3.1. Identificación del compuesto 1 (cirsimarina)……..36

2.3.2. Identificación del compuesto 2 (sorbifolín)……37

2.3.3. Identificación del compuesto 3 (cirsimaritina)…….…….....37

2.3.4. Identificación del compuesto 4 (tirosol)…….....38

2.3.5. Identificación del compuesto 5 (hidroxitirosol)……..43

2.3.6. Identificación del compuesto 6 (ASH-28P1)……...…….47

2.3.7. Identificación del compuesto 7 (ASH-28P3)…….…….....53

CAPÍTULO III…….……...59

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Dorstenia contrajerva*…….....59

3.1. INTRODUCCIÓN……..59

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS……..59

3.2.1. Materiales y equipos en general……59

3.2.2. Material vegetal…….....61

3.2.3. Partición líquido-líquido del extracto metanólico de *Dorstenia contrajerva*……..61

3.2.4. Cromatografía líquida al vacío de la fracción hexánica (DCR-2a)…….……62

3.2.5. Aislamiento de los metabolitos activos de DCR-2a…….……..63

3.2.5.1. Aislamiento del compuesto 8 (cicloartocarpesina)…….……...63

3.2.5.2. Aislamiento del compuesto 9 (1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-d-galactopiranosil glicerol)……..64

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…….....66

3.3.1. Identificación del compuesto 8 (cicloartocarpesina)……..……..66

3.3.2. Identificación del compuesto 9 (1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-d-galactopiranosil glicerol)……..67

CAPITULO IV…….....71

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE METABOLITOS AISLADOS DE *Aphelandra scabra*y*Dorstenia contrajerva* CONTRA PROMASTIGOTES Y AMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana*…..71

4.1. INTRODUCCIÓN……71

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS……72

4.2.1. Actividad *in vitro* de extractos, fracciones y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra promastigotes de *L. mexicana*…….....72

4.2.1.1. Material biológico…….72

4.2.1.2. Preparación de extractos, fracciones y metabolitos de *A. scabra* y *D. contrajerva*…….....73

4.2.1.3. Bioensayo *in vitro* de extractos metanólicos, fracciones y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra promastigotes de *L. mexicana*…….73

4.2.2. Actividad *in vitro* de extractos metanólicos y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*……...74

4.2.2.1. Material biológico……..…….....74

4.2.2.2. Preparación de extractos metanólicos y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva*……..75

4.2.2.3. Bioensayo *in vitro* de extractos metanólicos y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*…….75

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…….....77

4.3.1. Actividad *in vitro* del extracto metanólico y fracciones de *Aphelandra* contra promastigotes de *L. mexicana*…….....77

4.3.2. Actividad *in vitro* de metabolitos secundarios de *A. scabra*contra promastigotes de *L. mexicana*……..79

4.3.3. Actividad *in vitro* del extracto metanólico y metabolitos secundarios de *A. scabra* contra amastigotes de *L. mexicana*…….79

4.3.4. Actividad *in vitro* del extracto metanólico de *D. contrajerva* contrapromastigotes de *L. mexicana*……..82

4.3.5. Actividad *in vitro* del extracto metanólico y metabolitos secundario de *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*.……...82

CAPITULO V…….87

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERPECTIVAS…….87

3.1. DISCUSIÓN…….....87

3.2. CONCLUSIONES GENERALES…….....89

3.3. PERPECTIVAS…….90

BIBLIOGRAFÍA…….91

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. *Lutzomyia longipalpis*……..……..….3

Figura 1.2. Leishmaniasis cutánea localizada……..……...4

Figura 1.3. Leishmaniasis mucocutánea……..…….....4

Figura 1.4. Leishmaniasis cutánea localizada en México…….……...5

Figura 1.5. Promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp…….....6

Figura 1.6. Ciclo de transmisión de la leishmaniasis……...9

Figura 1.7. Metabolitos secundarios aislados de plantas con actividad leishmanicida……14

Figura 1.8. *Aphelandra scabra*…….……15

Figura 1.9. Estructuras químicas de la cirsimaritina y el sorbifolín.……16

Figura 1.10. *Dorstenia contrajerva* L. A) planta completa. B) inflorescencia……17

Figura 1.11. Metabolitos secundarios con actividad leishmanicida de *D. contrajerva*.....19

Figura 2.1. Placa cromatográfica de las fracciones reunidas de la CLV de ASH-2c……...27

Figura 2.2. Placa cromatográfica de las fracciones reunidas de la CLV de ASH-2b ……..28

Figura 2.3. Diagrama de aislamiento del compuesto **1** (cirsimarina)……..29

Figura 2.4. Monitoreo en CCD del precipitado (P) obtenido en ASH-2c……29

Figura 2.5. Diagrama de aislamiento del compuesto **2** (sorbifolín)…….30

Figura 2.6. Monitoreo en CCD de los precipitados obtenidos en ASH-3c, d y e. ……30

Figura 2.7. Diagrama de aislamiento del compuesto **3** (cirsimaritina)……31

Figura 2.8. Monitoreo en CCD del precipitado obtenido en ASH-4b……..31

Figura 2.9. Monitoreo en CCD del compuesto **4** (tirosol)……..32

Figura 2.10. Diagrama de aislamiento del compuesto **4** (tirosol)……33

Figura 2.11. Monitoreo en CCD del compuesto **5** (hidroxitirosol)…….....34

Figura 2.12. Diagrama del aislamiento del compuesto **5**……..34

Figura 2.13. Estructura del compuesto **1** (cirsimarina)……..36

Figura 2.14. Estructura del compuesto **2** (Sorbifolín)……...…….37

Figura 2.15. Estructura del compuesto **3** (cirsimaritina)…….....37

Figura 2.16. Espectro de masas del compuesto **4** (tirosol).……39

Figura 2.17. RMN-^{1}H (600 MHz en acetona-d_6) del compuesto **4** (tirosol).……...40

Figura 2.18. RMN-^{13}C (150 MHz en acetona-d_6) del compuesto **4** (tirosol).……..41

Figura 2.19. Estructura del compuesto **4** (tirosol)……..42

Figura 2.20. RMN-^{1}H (600 MHz en CD_3OD) del compuesto **5** (hidroxitirosol).……44

Figura 2.21. RMN-^{13}C (150 MHz en CD_3OD) del compuesto **5** (hidroxitirosol)…….45

Figura 2.22. Estructura del compuesto **5** (hidroxitirosol)……..45

Figura 2.23. RMN-^{1}H (600 MHz en piridina-d_5) del compuesto **6** (ASH-28P1)……48

Figura 2.24. RMN-^{13}C (150 MHz en piridina-d_5) del compuesto **6** (ASH-28P1)……49

Figura 2.25. Ampliación del espectro HSQC (anillo aromático y doble enlace) del compuesto **6** (ASH-28P1)……50

Figura 2.26. Ampliación del espectro HSQC (final de la cadena esterificada) del compuesto **6** (ASH-28P1)……50

Figura 2.27. Ampliación del espectro HMBC (anillo aromático) del compuesto **6** (ASH-28P1)……..51

Figura 2.28. Ampliación del espectro HMBC (final de la cadena alifática) del compuesto **6** (ASH-28P1)……52

Figura 2.29. Estructura del compuesto **6** (ASH-28P1)…….....53

Figura 2.30. RMN-^{1}H (600 MHz en piridina-d_5) del compuesto **7** (ASH-28P3)……54

Figura 2.31. RMN-^{13}C (150 MHz en piridina-d_5) del compuesto **7** (ASH-28P3)……..….55

Figura 2.32. Ampliación del espectro HSQC (anillo aromático) del compuesto **7** (ASH-28P3)..55

Figura 2.33. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **7** (ASH-28P3).……....56

Figura 2.34. Estructura del compuesto **7** (ASH-28P3)……57

Figura 3.1. Monitoreo de las fracciones DCR-2a y DCR-2b. ……..62

Figura 3.2. Placa cromatográfica de las fracciones obtenidas por CLV de DCR-2a. ……..62

Figura 3.3. Diagrama de aislamiento del compuesto **8** (cicloartocarpesina)…….64

Figura 3.4. Monitoreo de los tubos 27 a 32 del experimento **9** de *D. contrajerva*……65

Figura 3.5. Diagrama de aislamiento del compuesto **9** (1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol)……..65

Figura 3.6. Cromatograma de HPLC del compuesto **8** y la cicloartocarpesina.……66

Figura 3.7. RMN-^{1}H (600 MHz en $CDCl_3$) del compuesto **9** (1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol)……..……...68

Figura 3.8. Perfil cromatográfico por HPTLC de DCR-1a, DCR-2a y los compuestos **8** y **9**…..70

Figura 4.1. Curvas de crecimiento de amastigotes de *L. mexicana* incubados con diferentes concentraciones de ASH-1a, tirosol e hidroxitirosol. ……80

Figura 4.2. Curvas de crecimiento de amastigotes de *L. mexicana* incubados con diferentes concentraciones de DCR-1a, cicloartocarpesina y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil……83

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Especies de *Leishmania* patógenas en humanos……..7

Tabla 1.2. Medicamentos más usados para el tratamiento de la leishmaniasis……10

Tabla 1.3. Clasificación taxonómica de *Aphelandra scabra*…….15

Tabla 1.4. Clasificación taxonómica de *Dorstenia contrajerva* L……..17

Tabla 2.1. Peso y rendimiento de las fracciones obtenidas de ASH-1a…….26

Tabla 2.2. Peso de las fracciones reunidas de la CLV procedentes de ASH-2c……...27

Tabla 2.3. Peso de las fracciones reunidas de la CLV procedentes de ASH-2b……..28

Tabla 2.4. Peso de las fracciones reunidas y obtenidas a partir de ASH-3c…….32

Tabla 2.5. Comparación de las señales observadas en RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4** con lo reportado en la literatura para el tirosol……..…….41

Tabla. 2.6. Comparación de las señales observadas en RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5** con lo reportado en la literatura para el hidroxitirosol……..…….45

Tabla. 2.7. Asignación espectroscópica de las señales de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **6** (ASH-28P1)……52

Tabla. 2.8. Asignación espectroscópica de las señales de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **7** (ASH-28P3)……..57

Tabla 3.1. Peso y rendimiento de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido de DCR-1a……61

Tabla 3.2. Peso de las fracciones reunidas de la CLV de DCR-2a…….63

Tabla. 3.3. Comparación de las señales observadas en RMN-^{1}H del compuesto **9** con lo reportado en la literatura para el compuesto 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol……69

Tabla 4.1. Concentraciones empleadas de los extractos y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*.……75

Tabla 4.2. Actividad *in vitro* de ASH-1a y fracciones de la partición líquido-líquido contra promastigotes de *L. mexicana*.…….....77

Tabla 4.3. Actividad *in vitro* de las fracciones obtenidas por CLV de ASH-2c contra promastigotes de *L. mexicana*.……..……..78

Tabla 4.4. Actividad *in vitro* de las fracciones obtenidas por CLV de ASH-2b contra promastigotes de *L. mexicana*.……..……..78

Tabla 4.5. Actividad leishmanicida de metabolitos secundarios de *A. scabra* sobre promastigotes de *L. mexicana*.……..……..79

Tabla 4.6. Actividad leishmanicida del extracto metanólico y metabolitos secundarios de *A. scabra* contra amastigotes de *L. mexicana*.……81

Tabla 4.7. Actividad *in vitro* de DCR-1a contra promastigotes de *L. mexicana*.……82

Tabla 4.8. Actividad leishmanicida del extracto metanólico y metabolitos secundarios de *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*.……84

ABREVIATURAS

ASH	*Aphelandra scabra* hojas
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
COSY	Correlation Spectroscopy
DCR	*Dorstenia contrajerva* rizomas
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy
R_f	Relación de flujo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPMIc	Medio Roswell Park Memorial Institute Complementado
SFB	Suero Fetal Bovino
t_R	Tiempo de Retención

RESUMEN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades tropicales muy desatendidas en el mundo, afectan principalmente a personas de bajo nivel socioeconómico y causan una alta morbilidad. En México, la leishmaniasis cutánea localizada conocida como “úlcera de los chicleros” es ocasionada por la especie *Leishmania mexicana*. En la actualidad, los medicamentos que se utilizan para tratar esta enfermedad son altamente tóxicos, se requieren en un largo tratamiento e inducen resistencia. Esto enfatiza la necesidad de buscar nuevas moléculas con potencial leishmanicida. *Aphelandra scabra* (Vahl) Sm. (Acanthaceae) y *Dorstenia contrajerva* L. (Moraceae) son especies vegetales con estudios previos de actividad antiprotozoaria y son utilizadas en la medicina tradicional para atender infecciones en la piel. En esta investigación, las hojas de *A. scabra* se sometieron a una maceración con metanol, seguido de un fraccionamiento por partición líquido-líquido con disolventes de polaridad ascendente. Posteriormente, por medio de técnicas cromatográficas se llevó a cabo el aislamiento de siete metabolitos (**1**-**7**), cinco fueron evaluados en un bioensayo *in vitro* contra promastigotes y amastigotes axénicos de *L. mexicana*. El extracto metanólico de los rizomas de *D. contrajerva* y los compuestos cicloartocarpesina (**8**) y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**9**) aislados de esta planta, fueron evaluados de manera *in vitro* contra la fase de amastigotes axénicos de *L. mexicana*. Los resultados mostraron que el compuesto **5** (hidroxitirosol) aislado de *A. scabra* presentó buena actividad leishmanicida (CI_{50} = 16.8 y 4.7 µM contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, respectivamente). El extracto metanólico y los compuestos **8** y **9** de *D. contrajerva*, también mostraron actividad *in vitro* contra la fase de amastigotes (CI_{50} = 9.9 µg/mL, 2.0 µM y 0.9 µM, respectivamente). Estos resultados confirman que las hojas de *A. scabra* y los rizomas de *D. contrajerva* tienen metabolitos que podrían servir para el desarrollo de futuros tratamientos contra la leishmaniasis cutánea localizada.

ABSTRACT

The leishmaniases are a group of neglected tropical diseases in the world, mainly affecting people of low socioeconomic status and causing high morbidity. In Mexico, localized cutaneous leishmaniasis known as “chiclero’s ulcer” is caused by the species *Leishmania mexicana*. Currently, drugs used to treat this disease are highly toxic, require long-term treatment and induce resistance. This emphasizes the need to search for new molecules with leishmanicidal potential. *Aphelandra scabra* (Vahl) Sm. (Acanthaceae) and *Dorstenia contrajerva* L. (Moraceae) are plant species with previous studies of antiprotozoal activity and used in traditional medicine to treat skin infections. In this investigation, the leaves of *A. scabra* were subjected to maceration with methanol, followed by a liquid-liquid partition fractionation with solvents of ascending polarity. Subsequently, by means of chromatographic techniques, the isolation of seven metabolites was carried out (**1**-**7**), and five were evaluated in an *in vitro* bioassay against promastigotes and axenic amastigotes of *L. mexicana*. Methanol extract of the rhizomes of *D. contrajerva* and compounds cycloartocarpesin (**8**) and 1-*O*-linolenoyl-2-*O*-stearoyl-3-*O*-β-D-galactopyranosyl glycerol (**9**) isolated from this plant were also evaluated *in vitro* against the axenic amastigotes phase of *L. mexicana*. Results showed that compound **5** (hydroxytyrosol) isolated from *A. scabra* presented good leishmanicidal activity (IC_{50} = 16.8 and 4.7 μM against promastigotes and amastigotes of *L. mexicana*, respectively). Methanol extract and compounds **8** and **9** of *D. contrajerva* also showed *in vitro* activity against the amastigotes phase of *L. mexicana* (IC_{50} = 9.9 μg/mL, 2.0 μM and 0.9 μM, respectively). These results confirm that the leaves of *A. scabra* and the rhizomes of *D. contrajerva* have metabolites that could be used for the development of future treatments against localized cutaneous leishmaniasis.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades zoonóticas causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. La infección es transmitida a los humanos a través de la picadura de flebótomos hembra infectados con el parásito. Actualmente, estas enfermedades afectan principalmente a personas de escasos recursos económicos en más de 102 países y se estima que cada año se originan 1.3 millones de casos nuevos y entre 20,000 a 30,000 defunciones (PAHO/WHO, 2019).

Dependiendo de la especie de *Leishmania* y de la respuesta inmune del hospedero, la enfermedad puede afectar la piel, las mucosas y algunos órganos internos. En México, la manifestación clínica más común es la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) también conocida como “úlcera de los chicleros”, causada por la especie *Leishmania (Leishmania) mexicana*. Esta patología afecta principalmente a los pobladores de los estados de Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Andrade-Narváez *et al*., 2017).

Los medicamentos de primera elección para el tratamiento de la leishmaniasis son los antimoniales pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®). El isetionato de pentamidina, la anfotericina B y la miltefosina constituyen otras opciones terapéuticas. Sin embargo, todos estos medicamentos presentan un alto grado de toxicidad, se requieren por un largo período, son de difícil acceso y costo elevado (Perrone *et al*., 2015).

Además de estos problemas, la industria farmacéutica tiene poco interés en buscar nuevas terapias para esta enfermedad ya que no lo consideran un negocio rentable. Ante esta situación, surge la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con alto índice terapéutico, es decir, con poco o nulo efecto tóxico para el paciente y de bajo costo (Flores *et al*., 2017). Los compuestos de origen natural, en especial los que provienen de plantas medicinales pueden ayudar a este objetivo. Los remedios a base de plantas se han utilizado durante años en la medicina tradicional con el fin de atender problemas de salud y su popularidad se mantiene por razones históricas y culturales (Sáenz, 2004).

En México, las hojas de *Aphelandra scabra* Vahl (Sm.) y los rizomas de *Dorstenia contrajerva* L. son utilizados para el tratamiento de infecciones en la piel y para la cicatrización de heridas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Treyvaud *et al*., 2005). Además,

los extractos metanólicos de ambas especies han mostrado actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* (Peraza-Sánchez *et al*., 2007).

Con base en lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo aislar e identificar metabolitos secundarios procedentes de las hojas de *A. scabra* y los rizomas de *D. contrajerva* y evaluar su actividad *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Leishmaniasis

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades que afectan principalmente a personas de zonas rurales y son ocasionadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. La infección se transmite a los humanos y otros mamíferos por la picadura de flebótomos hembra infectados con el parásito. Los flebotomíneos son pequeños dípteros hematófagos de la familia Psychodidae, en el Viejo Mundo estos vectores pertenecen al género *Phlebotomus* y en América al género *Lutzomyia* (Figura 1.1). Estos insectos habitan en áreas tropicales y subtropicales de todo el mundo y en México son conocidos como papalotillas, jején, manta blanca o mosca chiclera (PAHO/WHO, 2019).

Figura 1.1. *Lutzomyia longipalpis*. Fuente: Vectores artrópodos de enfermedades humanas. Moscas de arena flebótomos [internet].

Las principales manifestaciones clínicas de la enfermedad son: leishmaniasis cutánea localizada (LCL), difusa (LCD), mucocutánea (LMC) y visceral (LV o Kala-azar). La LCL se caracteriza por pequeñas lesiones en la piel que evolucionan hasta generar úlceras con bordes bien definidos e indurados, las cuales se desarrollan en pocas semanas después de la picadura del vector; en algunos casos, las heridas pueden aparecer años más tarde. Por lo general, las lesiones aparecen en el rostro, el cuello y las extremidades que suelen estar expuestos a la picadura del vector. Algunas veces las lesiones curan espontáneamente y cuando lo hacen con o sin tratamiento dejan cicatrices para siempre (Figura 1.2) (Pace, 2014).

La LCD es una manifestación poco frecuente (menos del 1% de los casos) y se caracteriza por numerosos nódulos y placas no ulceradas en casi toda la piel que contienen un gran número de

parásitos. Las lesiones son resistentes a la quimioterapia y en algunos casos ocurre una recaída después de presentar una mejora transitoria o curación aparente. Esta manifestación indudablemente refleja una deficiencia severa de células T específicas de antígeno del huésped infectado (Convit *et al*., 1993).

Figura 1.2. Leishmaniasis cutánea localizada. Fuente: Programa Nacional de Control de las Leishmaniosis [internet].

La LMC ocurre por diseminación hematógena o linfática de los parásitos desde la piel hasta las mucosas nasofaríngeas. En esta manifestación se puede presentar un desfiguramiento total o parcial de toda esta área, causando graves problemas de alimentación y respiración que pueden llevar a la muerte (Figura 1.3). Más del 90% de los casos de LMC se producen en Brasil, Bolivia, Etiopía y Perú. Esta manifestación no se cura espontáneamente y es difícil de tratar (WHO, 2019; Pace, 2014).

Figura 1.3. Leishmaniasis mucocutánea. Fuente: Complicación mucosa de la leishmaniasis cutánea [artículo de internet].

1.2. Leishmaniasis en México

Diego López de Cogolludo relata en su libro “Historia de Yucatán” (1688) que los primeros franciscanos encontraron un gran número de indígenas con “orejas podridas”, evidenciando que la leishmaniasis existía en México desde la época precolombina. En 1912, el médico y químico Seidelin observó que los trabajadores que extraían chicle del árbol *Manilkara zapota* (chicozapote) tenían lesiones ulcerosas predominantemente en las orejas, por lo cual denominó a este padecimiento como “úlcera de los chicleros” (Vargas-Martínez *et al*., 2011).

En México el 99.7% de los casos reportados de esta enfermedad corresponde a la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), también conocida como úlcera de los chicleros, cuyo agente responsable es la especie *Leishmania (L.) mexicana* (Andrade-Narváez *et al*., 2017). Los estados que reportan más casos de esta enfermedad son: Quintana Roo, Tabasco, Campeche, Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Yucatán (Figura 1.4). Entre 2017-2021 se registraron 3,068 casos, de los cuales 36 se dieron en el Estado de Yucatán, principalmente en las aldeas ubicadas en el cono sur, cerca de las zonas endémicas de Quinta Roo y Campeche (SINAVE, 2017-2021).

Figura 1.4. Leishmaniasis cutánea localizada en México. Fuente: Organización Panamericana de la Salud. Sistema de información regional de leishmaniasis (SisLeish) [Internet].

1.3. Agente etiológico

Los parásitos del género *Leishmania* pertenecen a la familia Trypanosomatidae y al orden Kinetoplastida. Durante su ciclo de vida estos parásitos presentan dos formas o estadios, promastigotes y amastigotes (Figura 1.5).

Los promastigotes son células flageladas y alargadas que miden aproximadamente de 5-15 µm de longitud, las cuales se desarrollan y multiplican en el tracto digestivo del vector. Los amastigotes son células de forma redonda u oval de 3-5 µm de largo, con un flagelo muy corto que no sobresale de la bolsa flagelar, se transforman y multiplican en los macrófagos del huésped y son los responsables de generar la enfermedad (Bate, 2008).

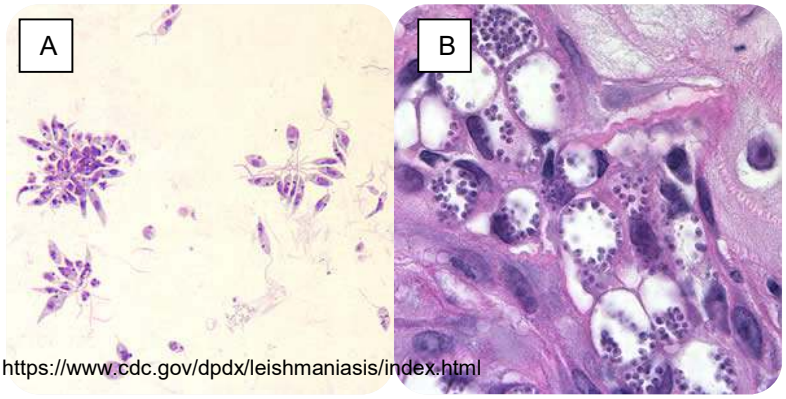


Figura 1.5. A) promastigotes de *Leishmania* spp. B) amastigotes de *Leishmania* spp. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis, Image Gallery [internet].

Actualmente, se han descubierto y descrito más de 20 especies patógenas de *Leishmania* para el ser humano (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Especies de *Leishmania* patógenas en humanos (Nagle *et al*., 2014).

Especie	Manifestación	Epidemiologia	Síntomas
L. donovani	LV	India, Bangladesh, Nepal y Este de África	Fiebre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progresiva, pérdida de peso y oscurecimiento de la piel.
L. infantum	LV	Región del mediterráneo, Centro y Sur de América	Fiebre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progresiva, pérdida de peso y oscurecimiento de la piel.
L. siamensis	LV	Tailandia	Fiebre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progresiva, pérdida de peso y oscurecimiento de la piel.
L. aethiopica *L. killicki* *L. major* *L. tropica* *L. turanica*	LC (Viejo Mundo)	Sureste de Europa y Sureste de Asia y África	Pápulas eritematosas en el sitio de la picadura, con eventuales cicatrices.
L. amazonensis *L. aristedesi* *L. braziliensis* *L. colombiensis* *L. garnhami* *L. guyanensis* *L. lainsoni* *L. mexicana* *L. naiffi* *L. peruviana* *L. pifanoi* *L. shawi* *L. venezuelensis*	LC (Nuevo Mundo)	Centro y Sur de América principalmente Brasil, Colombia, Costa Rica y Perú	Pápulas eritematosas en el sitio de la picadura (*L. mexicana*). LMC (*L. aethiopica, braziliensis, guyanensis* y *panamensis*) y LCD (*L. amazonensis*).

1.4. Ciclo de transmisión de la leishmaniasis

El principal mecanismo de transmisión empieza cuando la mosquita pica a un hospedero infectado y la sangre que ingiere contiene macrófagos con amastigotes, provocando que el insecto adquiera los parásitos. En el intestino del vector, las células hospederas se desintegran y liberan a los amastigotes que rápidamente se transforman en promastigotes móviles. En las siguientes 24 a 48 horas comienza la primera división de los parásitos, los cuales se transforman en promastigotes procíclicos. Después migran hacia la parte anterior del intestino donde continúan su replicación y finalmente se transforman en promastigotes metacíclicos (infectivos). Cuando el vector infectado vuelve a picar, regurgita e inocula aproximadamente 100 promastigotes. Estos parásitos no migran activamente hacia los macrófagos si no que permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía alternativa, que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Estos últimos fagocitan y confinan a los promastigotes en compartimentos denominados vacuolas parasitóforas en donde se fusionan con los lisosomas para formar fagolisosomas donde los parásitos se transforman en amastigotes en un periodo de 3 a 4 horas (Sánchez-Saldaña *et al*., 2004).

La adhesión entre el parásito y los macrófagos es una etapa fundamental para la invasión de las células del huésped. Hasta ahora se han identificado numerosos receptores sobre la superficie de los promastigotes, entre los más importantes están el lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína 63 (gp63), que son usados por los parásitos para adherirse, entrar y sobrevivir dentro de los macrófagos (Oliver *et al*., 2003). La multiplicación de los amastigotes ocurre igual por fisión binaria, provocando un aumento en la carga parasitaria que conlleva a una lisis celular y a la liberación de los mismos, infectando a otros macrófagos y dañando a diversos tejidos. Dependiendo de la especie de *Leishmania* y del sistema inmune de la persona, las manifestaciones de la enfermedad se hacen presentes.

La activación del sistema inmune está mediada por las glándulas salivales de la mosquita ya que, al momento de picar, secretan moléculas que modulan diferentes procesos inflamatorios que actúan en favor del protozoario. Además, algunas especies de *Lutzomyia* poseen anticoagulantes y vasodilatadores que hacen que las células endoteliales se separen, permitiendo la salida de células inflamatorias que incorporan al parásito. La vasodilatación también permite la salida de la linfa de los vasos sanguíneos para entrar al sistema linfático y durante este proceso algunos parásitos son arrastrados provocando la diseminación de éstos a diferentes zonas del cuerpo (Becker, 2011).

Otros mecanismos de transmisión se pueden dar por autoinoculación y en el caso de la LV se puede presentar por trasplante de órganos, transfusión sanguínea y a través de la placenta (CENAVECE, 2015). En la Figura 1.6 se ilustra de manera resumida el ciclo de transmisión de la leishmaniasis.

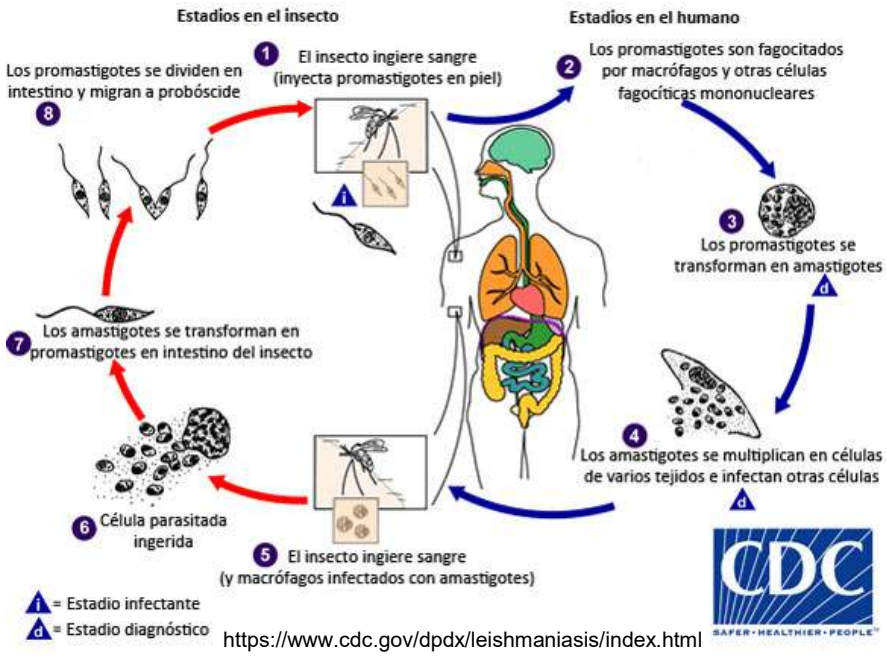


Figura 1.6. Ciclo de transmisión de la leishmaniasis. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis, Life cycle [internet].

1.5. Distribución geográfica de la leishmaniasis

Se han reportado casos de leishmaniasis en los cinco continentes y la enfermedad es endémica en las regiones tropicales y subtropicales. Se estima que cerca de 350 millones de personas viven en zonas donde pueden adquirir la infección. En el Viejo Mundo la leishmaniasis se encuentra en algunas partes de Asia, Medio Oriente, la región tropical y norte de África y el sur de Europa. En las Américas se han registrado casos desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, con excepción de Chile ya que Uruguay presentó su primer caso de LV en diciembre de 2018. La mayoría de las personas infectadas suele vivir en lugares donde hay una amplia vegetación que favorece la supervivencia del vector. El clima y otros factores ambientales tienden a expandir el área geográfica de los vectores (PAOH/WHO, 2019).

1.6. Tratamientos contra la leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad que se puede tratar y controlar siempre y cuando el paciente tenga un sistema inmunológico competente, ya que los medicamentos por sí solos muchas veces no son capaces de eliminar al parásito. En algunos casos es necesario un proceso de apoyo antes de iniciar un tratamiento específico. Por ejemplo, administrar hidratación o suplementos alimenticios bajo supervisión médica. En la actualidad, los medicamentos contra la leishmaniasis presentan alta toxicidad, dificultades para su administración y alto costo (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Medicamentos usados para el tratamiento de la leishmaniasis (Perrone *et al*., 2015).

Medicamento	Dosis y vía de administración	Eficacia	Efectos secundarios y toxicidad
Antimoniales pentavalentes (antimoniato de meglumina, Glucantime® y estibogluconato de sodio, Pentostam®)	20 mg/Kg/día (20-30 días) I.M. o I.V. En el caso de LC se pueden administrar directamente en las lesiones.	35-95%	Vómitos, anorexia, dolor abdominal, letargo, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad (en la mayoría de los casos), pancreatitis, nefrotoxicidad.
Anfotericina B (Fungizone®)	0.75-1 mg/Kg/día (15 a 20 días, diario o alternado) I.V.	>90%	Fiebre alta, tromboflebitis de la vena inyectada, severa nefrotoxicidad, hipopotasemia y miocarditis.
Formulaciones lipídicas de la anfotericina B	Dosis total de 10-30 mg/Kg/día (dosis única 3-5 mg/Kg/dosis) I.V.	>97%	Fiebre leve, dolor de espalda, nefrotoxicidad o trombocitopenia.
Paromomicina	15-20 mg/Kg/día en forma de sulfato o 11-15 mg/Kg/día en forma de base I.M. (LV) o tópica (LC).	94% (India) 46-85% (África)	Ototoxicidad reversible, hepatotoxicidad, tetania, en algunos casos nefrotoxicidad.
Isetianato de pentamidina (Pentacarinat®)	3 mg/Kg/día (cada dos días, máximo 4 inyecciones) I.M	35-96% (según la especie de *Leishmania*)	Diabetes mellitus, hipoglucemia grave, choque, miocarditis y nefrotoxicidad.
Miltefosina	100-150 mg/día. Oral	94% Asia, 60-93% en África	Anorexia, vómitos, diarrea, insuficiencia renal, alta teratogenicidad (no se debe usar en embarazadas ni en edad reproductiva).

I.M: intramuscular. I.V: intravenoso.

Otros medicamentos probados para el tratamiento de la leishmaniasis son:

Tamoxifeno: Es un antagonista del receptor de estrógeno que se utiliza para el tratamiento del cáncer de mama. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado buena actividad contra *L. braziliensis*, *L. infantum* y *L. major* disminuyendo de manera general la carga parasitaria y mejorando las lesiones cutáneas en ratones. Sin embargo, todos los ratones machos tratados con el medicamento presentaron hinchazón escrotal comprometiendo seriamente la fertilidad de los mismos (Eissa *et al*., 2011).

Inhibidores de PI3K quinasa: El estudio se basó en la premisa de que tanto los parásitos de leishmania como los humanos expresan enzimas cinasas (también llamadas quinasas) similares. En el descubrimiento de inhibidores del crecimiento y la proliferación celular, los compuestos desarrollados como agentes anticancerígenos humanos también deberían tener efecto inhibiendo el crecimiento y la proliferación de los parásitos. Con eso en mente, se seleccionaron ocho inhibidores de PI3K, encontrando que NVP-BEZ235 tenía una potente actividad leishmanicida en cultivos de parásitos de *L. donovani*, sin embargo, no se observó lo mismo en ensayos *in vivo* en ratones empleando dosis toleradas (Diaz-Gonzales *et al*., 2011).

Nelfinavir: Es utilizado en pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1); demostró ser capaz de reducir el crecimiento *in vitro* de *L. donovani.* Se sugiere que el mecanismo de acción de este medicamento es a través de la inducción de estrés oxidativo en los amastigotes, conduciendo a la apoptosis en la que el ADN se degrada por endonucleasas G. También, se ha examinado el efecto de este medicamento contra *L. infantum* en ratones BALB/c y los resultados han confirmado su efecto leishmanicida. Igual se observó un mayor efecto al combinarse con miltefosina en comparación cuando se administran solos (Valdivieso *et al*., 2018; Kumar *et al*., 2010).

Ketoconazol: Es un imidazol de amplio espectro utilizado para el tratamiento de infecciones micóticas. Algunos ensayos clínicos, publicados entre 1990-1992, han utilizado este medicamento de manera oral para el tratamiento de LCL por *L. mexicana*, *L panamensis* y *L. braziliensis* en los cuales se ha observado una eficacia del 76, 89 y 30%, respectivamente. Sin embargo, desde 2013 la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) ha restringido su uso oral debido a que este medicamento conlleva al riesgo de daño hepático grave, problemas en las glándulas suprarrenales e interacciones dañinas con otros medicamentos (FDA, 2017; Navin *et al*., 1992; Saenz *et al*., 1990).

Otras terapias utilizadas para el tratamiento de la LCL incluyen métodos físicos utilizando criógenos como el nitrógeno líquido o la terapia fotodinámica (TFD). Esta última emplea un fotosensibilizador que al ser activado a una longitud específica en presencia de oxígeno puede generar especies reactivas de oxígeno produciendo un efecto citotóxico. Un estudio realizado para evaluar la eficacia de este método, empleando ftalocianina de aluminio clorado (PcAlCl) como fotosensibilizador, reveló buena actividad *in vitro* e *in vivo* en promastigotes y amastigotes de diferentes especies de *Leishmania* y utilizada tópicamente mostró actividad contra *L. amazonensis*. Sin embargo, en estudios para determinar la difusión y retención de la PcAlCl en piel humana sana, los resultados no fueron los esperados (Ospina *et al*., 2014).

A pesar de los esfuerzos por encontrar nuevas terapias para el tratamiento de la leishmaniasis, hoy en día no se cuenta con una que sea totalmente eficaz y segura. De manera específica, para los casos de LCL se hace hincapié en el uso de los tratamientos tópicos ya que éstos van directamente sobre la lesión, disminuyendo así el efecto tóxico por vía sistémica, facilitando su administración y reduciendo los costos. Por lo anterior, diversos investigadores continúan buscando nuevas alternativas para solucionar este problema. Una buena alternativa es emplear lo que ofrece la naturaleza, específicamente las plantas medicinales, en busca de metabolitos con potencial leishmanicida.

1.7. Plantas empleadas en la medicina tradicional contra la leishmaniasis

Desde que el hombre apareció en la tierra ha utilizado las plantas para su alimentación y para el alivio de diversas dolencias; su empleo ha sido documentado desde la antigüedad y su popularidad se mantiene por razones históricas y culturales. La OMS hace referencia que la medicina tradicional emplea remedios a base de hierbas porque las plantas contienen múltiples compuestos activos contra parásitos, bacterias, virus y más (Sáenz, 2004).

La mayoría de los compuestos activos en las plantas son conocidos como metabolitos secundarios. Estos compuestos no tienen una relación directa en los procesos fotosintéticos, respiratorios, de asimilación de nutrientes o transporte de solutos, sin embargo, se ha demostrado que poseen varios efectos biológicos como: antibióticos, antifúngicos, antiprozoarios, etc. Lo anterior proporciona la base científica para el uso de plantas en la medicina tradicional (Hussein y El-Anssary, 2018).

En general, para la creación de un medicamento o fitomedicamento primero se debe aislar e identificar el principio activo y luego conocer si este mismo tiene el potencial de causar daño

grave, es decir, evaluar su toxicidad. Para lograr esta primera etapa es necesario utilizar diversas técnicas cromatográficas y realizar estudios *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente, si los resultados de las pruebas anteriores son favorables, se podrá continuar con ensayos clínicos en humanos para determinar la dosis terapéutica efectiva y comprobar si habrá o no efectos secundarios en el paciente. Dependiendo de los resultados obtenidos en cada etapa, las diversas agencias de salud determinarán si se aprueba o no el producto (FDA, 2018).

En Latinoamérica existe una gran variedad de plantas que son usadas en la medicina tradicional para curarla LCL. En Colombia emplean de manera tópica, en decocción o ingestión directa, las hojas y los tallos de *Acalypha diversifolia* Jacq. (Euphorbiaceae), *Trema micrantha* (L.) Blume (Ulmaceae), *Copaifera officinalis* (Jacq.) L. (Fabaceae) y *Psichotria* sp. (Rubiaceae) (Bernal*et al*., 2014).

En Perú se utiliza una serie de plantas como: *Tabebuia serratifolia* (Bignoniaceae) cuya corteza se aplica en forma de emplastos; *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), se aplica en polvo previamente tostado sobre las heridas; *Brunfelsia grandiflora* (Solanaceae), se emplea la corteza sobre las lesiones; y *Carica candicans* (Caricaceae), cuyo jugo de la planta se aplica sobre la zona afectada (Muñoz y Pareja, 2003).

En México, algunas de las especies vegetales empleadas contra LCL incluyen a *Pentalinon andrieuxii (*Apocynaceae), de la cual se utiliza la raíz; *Bixa orellana* (Bixaceae), de la que se utilizan las hojas; *Psidium guajava* (Myrtaceae), se aplica el jugo con la pulpa; *Ficus dendrocida* (Moraceae), de la que se usa la savia (Chan-Bacab *et al*., 2003; Chan-Bacab y Peña-Rodríguez, 2001).

1.8. Metabolitos secundarios de plantas con actividad leishmanicida

Algunos metabolitos de origen vegetal reportados con actividad leishmanicida se presentan en la Figura 1.7. El primero es la xylopina (**A**) un alcaloide aislado de *Guatteria amplifolia* (Annonaceae) que mostró una CI_{50} = 3.0 y 6.0 µM contra promastigotes de *L. mexicana* y *L. panamensis*, respectivamente (Mishra *et al*., 2009). La CI_{50} se refiere a la concentración de un extracto, fracción o compuesto necesaria para reducir un 50% el crecimiento *in vitro* de un cultivo celular en comparación con el cultivo sin tratamiento (Sebaugh, 2011). Otro metabolito reportado con buena actividad fue la licochalcona A (**B**), aislada de *Glycyrrhiza* sp., la cual mostró una CI_{50} = 2.7 µM contra amastigotes de *L. donovani* y una CI_{50} = 21.0 µM contra promastigotes de *L. major* (Chen *et al*., 1993). La plumbagina (**C**), una naftoquinona aislada de la corteza de *Pera*

benensis (Euphorbiaceae), resultó activa contra promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonesis* y *L. donovani*, mostrando valores de CI_{90} = 26.5 µM (Fournet *et al*., 1992). De las raíces de *Lonchocarpus xuul* (Leguminosae), se aisló la isocordoína (**D**), una chalcona que mostró una CI_{50} = 7.7 µM contra promastigotes de *L. mexicana* (Borges-Argáez *et al*., 2009).

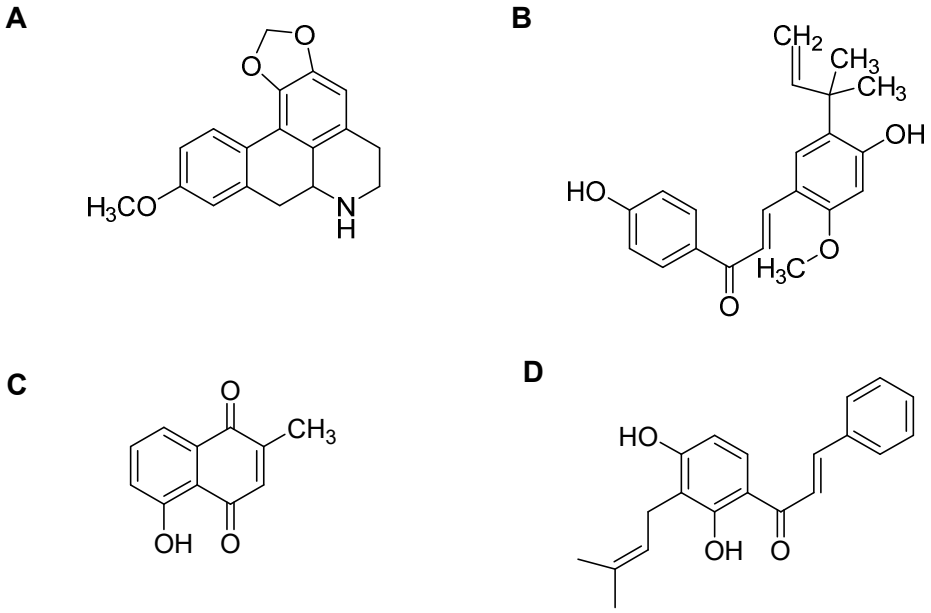


Figura 1.7. Metabolitos secundarios aislados de plantas con actividad leishmanicida. Xylopina (**A**). Licochalcona A (**B**). Plumbagina (**C**). Isocordoína (**D**).

A pesar de que estos y otros compuestos de origen vegetal tienen actividad leishmanicida *in vitro*, todavía no se tienen nuevos tratamientos para combatir la leishmaniasis, debido principalmente a problemas de citotoxicidad contra macrófagos y otras células sanas o por no tener efecto positivo en modelos *in vivo*. Por lo tanto, es necesario continuar con la búsqueda de moléculas activas y menos tóxicas que puedan ayudar en el tratamiento de estas enfermedades.

En México, *Aphelandra scabra* (Vahl) Sm. y *Dorstenia contrajerva* L. son especies vegetales que han mostrado actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* (Peraza-Sánchez *et al*., 2007), por lo que el proyecto estará enfocado en la obtención de metabolitos secundarios activos de estas especies.

1.9. *Aphelandra scabra* (Vahl) Sm.

Es un arbusto erecto y ramificado de aproximadamente 1-3.5 m de alto. Su tallo y ramas son de color ocre, muy pupilosos (con muchos pelos) cuando es joven. Sus hojas son elípticas y pueden llegar a medir hasta 25 cm de largo y 8 cm de ancho, con márgenes enteros y peciolos de 0.5 cm de largo o ausentes, acuminadas, minutamente escabrosas en el haz y con pelitos suaves en el envés. Presenta inflorescencia con espigas de hasta 19 cm de largo. Sus flores miden aproximadamente 8 mm, con pelos simples, cortos y una corola de hasta 40 mm, rosadas, rojas purpúreas o escarlatas. Los frutos tienen forma de cápsulas y pueden medir hasta 14 mm con 4 semillas cada una (Figura 1.8). Sinónimos: *A. cristata* H.B.K., *A. pectinata* Willd., *A. haenkeana* Ness in DC. La clasificación taxonómica se muestra en la Tabla 1.3 (Conabio, 2011).

Figura 1.8. *Aphelandra scabra*. Fuente: Dr. Sergio R. Peraza Sánchez.

Tabla 1.3. Clasificación taxonómica de *Aphelandra scabra* (CONABIO, 2011).

Aphelandra scabra	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Acanthaceae
Género	*Aphelandra*
Especie	*Aphelandra scabra* (Vahl) Sm.

Es conocida comúnmente como: añilillo, añil cimarrón u hoja de espanto en Tabasco; chamoltaco en Nicaragua; oreja de coyote, cordoncillo, palo de golpe, cola de camarón en El Salvador; flor de San Julián en Guatemala; cola de gallo, flor de coyilillo en Veracruz, palo blanco, vara blanca,

y vara de San José en Guerrero. En maya se le conoce con los nombres de *chakanal* y *chak-kank'il-xiu* (Conabio, 2011).

En México se distribuye en los estados de Campeche, Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. De manera general, habita en Centroamérica y el norte de Sudamérica (Daniel, 1991).

En cuanto a los usos medicinales de *A. scabra*, algunos escritos mencionan que en Honduras se emplea como carminativo a través de beber una infusión a base de raíces y hojas (Lentz, 1998). La cultura Maya la utiliza como remedio en padecimientos del sistema circulatorio, enfermedades mentales, del sistema nervioso e infecciones de la piel (Treyvaud *et al*., 2005).

1.9.1. Actividad biológica de *Aphelandra scabra*

Existen muy pocos estudios sobre la actividad biológica de *A. scabra*. Uno de ellos reporta actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* empleando el extracto de hojas, tallo y raíz (Meurer-Grimes *et al*., 1996). Lentz *et al*. (1998) reportaron actividad antimicrobiana del extracto etanólico de tallo y hojas contra *Bacillus subtilis*. Otro estudio realizado con el extracto metanólico de las hojas mostró actividad inhibitoria contra promastigotes de *L. mexicana* con CI_{50} = 15 µg/mL, siendo considerada como buen prospecto para el aislamiento de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida (Peraza-Sánchez *et al*., 2007).

El último reporte que se tiene de *A. scabra* es sobre la actividad giardicida del extracto metanólico de las hojas, de donde se aislaron dos compuestos activos: cirsimaritina (**E**) y sorbifolín (**F**) (Figura 1.9). La cirsimaritina mostró en los bioensayos contra *Giardia lamblia* una CI_{50} = 3.8 µM, mientras que sorbifolín mostró una CI_{50} de 75.6 µM, por lo que el primero fue considerado muy activo (Hernández-Bolio *et al.,* 2015).

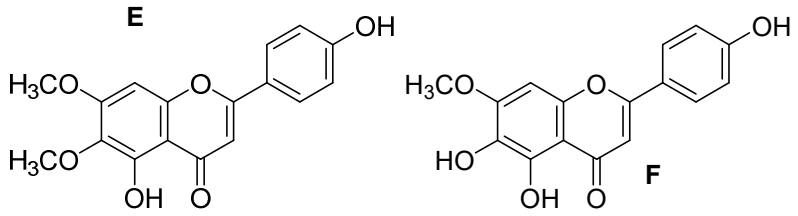


Figura 1.9. Estructuras químicas de la cirsimaritina (**E**) y el sorbifolín (**F**).

1.10. *Dorstenia contrajerva* L.

Es una hierba pequeña y ligeramente aromática. Posee un rizoma grueso (camote), nudoso, tubiforme-oval, de color amarillo-marrón. Tallo corto o nulo y se caracteriza por tener un zumo lechoso blanco o incoloro y hojas con formas desgarradas o con cuernitos. Las flores son aplanadas y verdes. Los frutos son pequeños y están contenidos en un recipiente cuadrangular y florecen de mayo a noviembre (Figura 1.10). Los principales nombres comunes con los que se conoce esta planta son: contrahierba, tursilla, contraveneno, mano de león, corroncho, raíz de resfriado, serpentaria, cresta de gallo, hierba del sapo y en idioma maya *yana*, *ixkambalhaw*, *kambahau*, *kambajan*, *kanbalhau*, *xkambahau*, *xkampahaw*, *xkampalhau* (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; Delascio, 1998).

Habita en lugares cálidos, húmedos y sombreados, generalmente a las orillas de los ríos y en cañadas en el bosque tropical caducifolio, subcaducifolio y el mesófilo de la montaña. Está distribuida principalmente en México, Guatemala, Panamá, Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador y Perú. En México, los estados donde suele encontrarse son Aguascalientes, San Luis Potosí, Querétaro, Nayarit, Jalisco, Colima, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas y la Península de Yucatán (Carvajal, 2007). En la Tabla 1.4 se presenta su taxonomía.

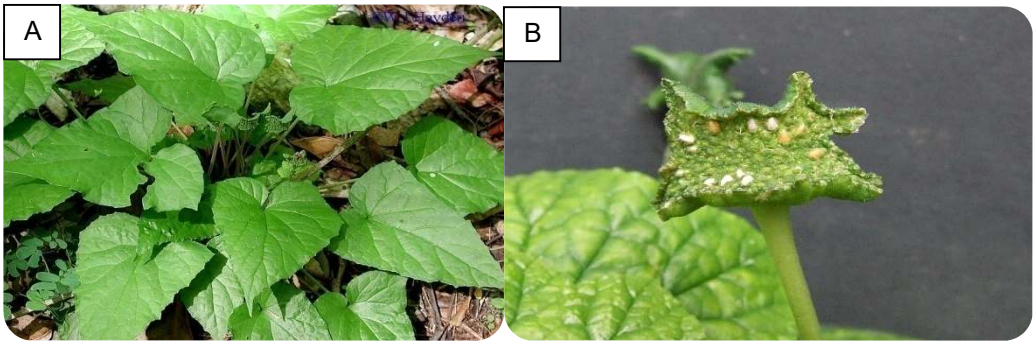


Figura 1.10. *Dorstenia contrajerva* L. A) Planta completa. B) Inflorescencia.

Tabla 1.4. Clasificación taxonómica de *Dorstenia contrajerva* L. (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

***Dorstenia contrajerva* L.**	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rosales
Familia	Moraceae
Género	*Dorstenia* L.
Especie	*Dorstenia contrajerva* L.

En nuestro país, el principal uso de esta planta es para contrarrestar el veneno de la mordedura de serpiente, de perro con rabia o cualquier intoxicación alimenticia. También se emplea para calmar el dolor de muelas, la disentería, el dolor de estómago, la mala digestión, el vómito, la hemorragia vaginal, así como para estimular el parto, cicatrizar heridas, tratar la tos, la diabetes y el paludismo. Este conocimiento se tiene desde finales del siglo XVI, cuando Francisco Hernández señaló: "cura los salpullidos, los lamparones, los forúnculos y el llamado mal gálico, resuelve además tumores y alivia otras enfermedades" (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

1.10.1. Actividad biológica de *Dorstenia contrajerva* L.

El extracto diclorometánico de *D. contrajerva* mostró leve actividad larvicida contra *Aedes aegypti* y actividad antimicrobiana frente a *Bacilus subtilis* (Terreaux *et al*., 1995). También el extracto metanólico de las partes aéreas mostró tener buena actividad *in vitro* contra *Giardia lamblia* con un CI_{50} = 23.3 µg/mL (Calzada *et al*., 2006). Además, también se ha reportado que el extracto metanólico de la planta entera tiene actividad contra *G. lamblia* con CI_{50} = 34.3 µg/mL (Peraza-Sánchez *et al.,* 2005). Lo anterior hace referencia que para el aislamiento de metabolitos secundarios activos contra este protozoario lo mejor es emplear de manera directa el tallo y las hojas.

Un estudio del extracto metanólico de los rizomas reportó una CI_{50} < 36 µg/mL, contra promastigotes de *L. tropica* y *L. aethiopica*, además de una DL_{50} = 27.1 µg/mL contra la forma de amastigotes (Getti *et al.,* 2009). Por otro lado, el extracto metanólico de toda la planta mostró tener actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* con una CI_{50} = 23.0 µg/mL (Peraza-Sánchez e*t al.,* 2007). En otro estudio igual se demostró la inhibición de crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* pero ahora usando el extracto metanólico de los rizomas obteniendo una CI_{50} = 30.29 µg/mL (Peniche-Pavía *et al*., 2016).

En cuanto a los metabolitos secundarios aislados de *D. contrajerva,* el primer compuesto reportado en la especie fue el cardenólido siriogenina, un tipo de esteroide obtenido de las raíces (Casagrande *et al.,* 1974). De manera general, los metabolitos comúnmente aislados en *D. contrajerva L.* son furanocumarinas. Las primeras en obtenerse del extracto metanólico de toda la planta fueron el bergapteno y la dorstenina (Terreaux *et al*., 1995). Del extracto de cloroformo de los rizomas se obtuvo el dorsteniol (Tovar-Miranda *et al*., 1998). Del extracto metanólico de

las partes aéreas se aislaron la furanocumarina glicosilada llamada L-ramnopiranosil-1,6-D-glucopiranosil-bergaptenol, bergaptol, catequina y epicatequina (Caceres *et al.,* 2001).

Peniche-Pavía *et al*. (2016) reportaron el aislamiento de dos nuevos compuestos: dorsjevin A y dorsjevin B, además de otros nueve compuestos, de los cuales la cicloartocarpesina (**C**) y el 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**G**), presentaron actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* con una CI_{50} = 2.9 y 4.9 μM, respectivamente (Figura 1.11).

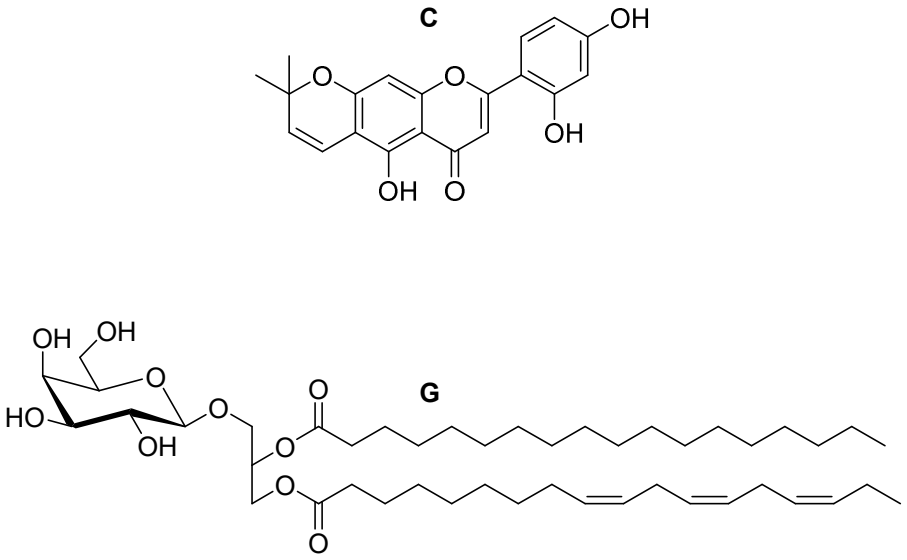


Figura 1.11. Metabolitos secundarios con actividad leishmanicida de *D. contrajerva*.

JUSTIFICACIÓN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades que afectan a millones de personas en países tropicales y subtropicales, incluyendo a México. Los actuales tratamientos son escasos y en su mayoría dolorosos, prolongados, tóxicos y costosos. Además, al ser consideradas enfermedades que afectan principalmente a poblaciones de bajo nivel socioeconómico, las empresas farmacéuticas muestran poco interés en el desarrollo de nuevos medicamentos leishmanicidas.

Debido a estas complicaciones, la búsqueda de nuevos compuestos leishmanicidas es necesaria y el uso de plantas medicinales ofrece una valiosa alternativa para lograr este objetivo. *Aphelandra scabra* y *Dorstenia contrajerva* son especies vegetales que se utilizan en la medicina tradicional para tratar problemas relacionados con la piel; además, existen estudios que demuestran que el extracto metanólico de las hojas de *A. scabra* tiene actividad *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania mexicana*. Por otro lado, del extracto metanólico de los rizomas de *D. contrajerva* se han aislado dos metabolitos de interés, la cicloartocarpesina y el 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol, los cuales han mostrado tener actividad leishmanicida contra promastigotes de *L. mexicana.*

Por lo anterior, en este trabajo se planteó aislar metabolitos secundarios de ambas especies vegetales y evaluar su efecto *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana.*

OBJETIVO GENERAL

Obtener metabolitos secundarios de las hojas de *Aphelandra scabra* y rizomas de *Dorstenia contrajerva* con actividad leishmanicida *in vitro* sobre promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*.

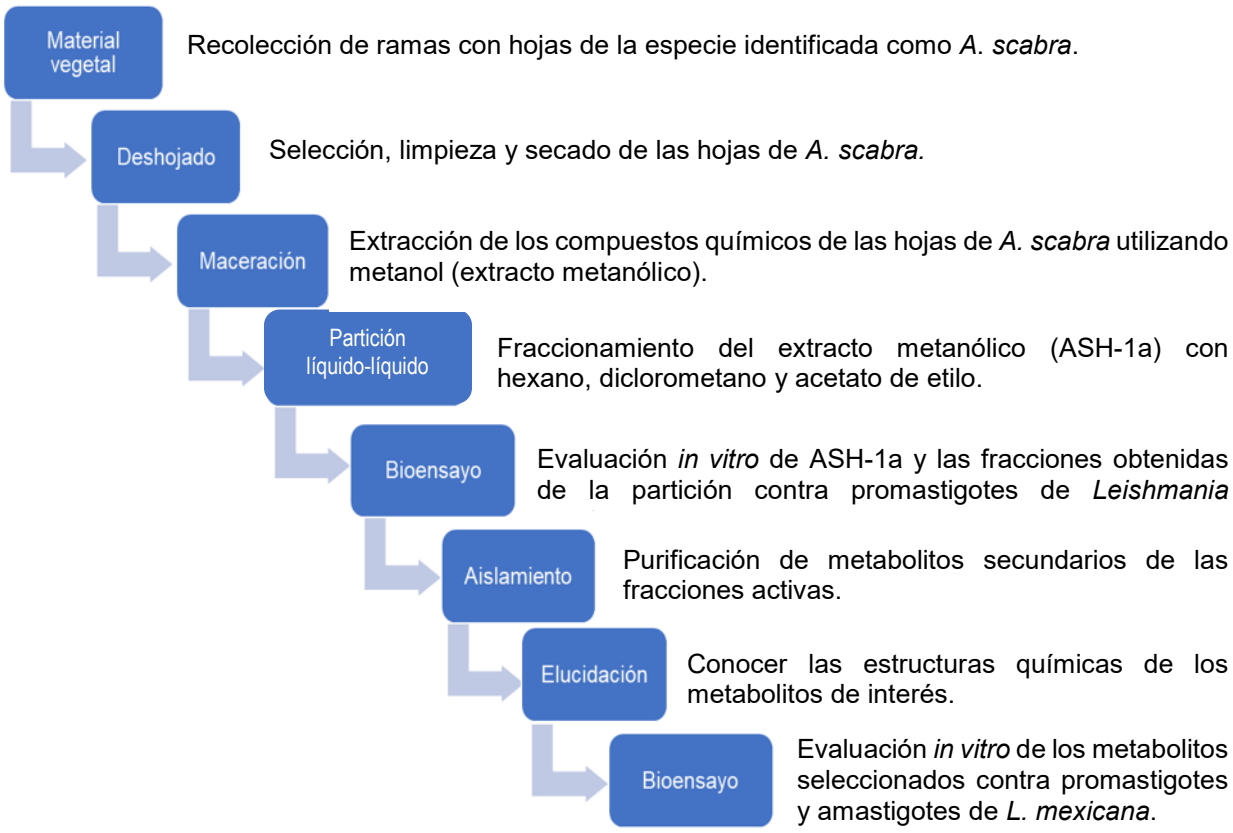
OBJETIVOS ESPECÍFICOS EN *APHELANDRA SCABRA*

1. Purificar metabolitos secundarios del extracto metanólico de hojas de *Aphelandra scabra* de manera biodirigida mediante diversas técnicas cromatográficas.

2. Establecer las estructuras químicas de los metabolitos seleccionados, utilizando diferentes métodos espectroscópicos.

3. Determinar la actividad leishmanicida de los metabolitos seleccionados por medio de bioensayos *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana.*

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL EN *APHELANDRA SCABRA*

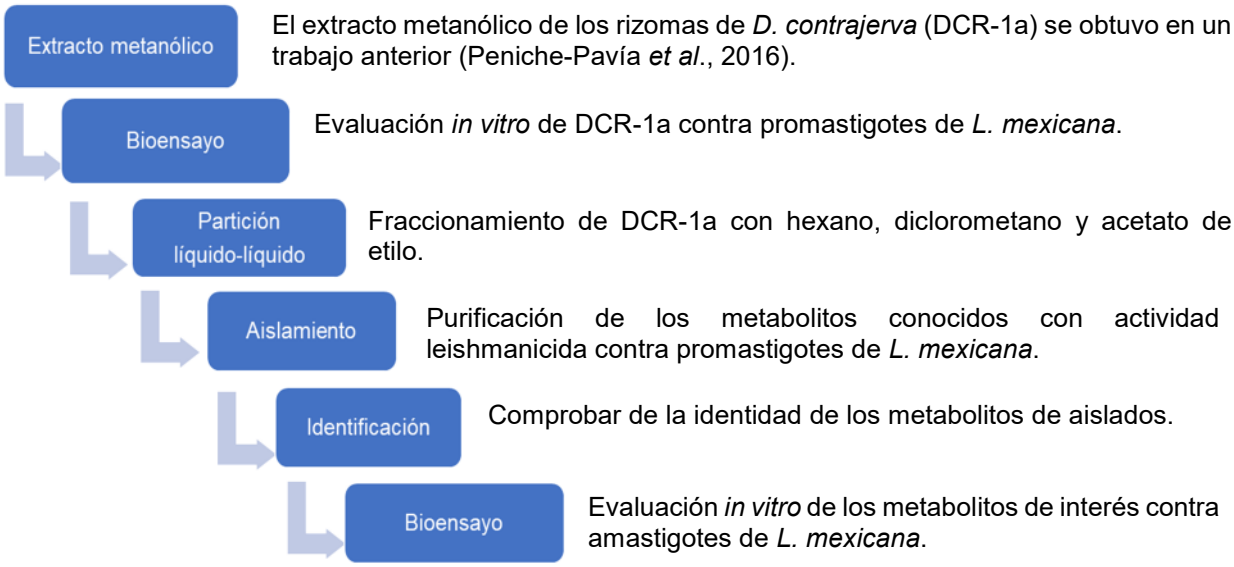


OBJETIVOS ESPECÍFICOS EN *DORSTENIA CONTRAJERVA*

1. Aislar los metabolitos secundarios cicloartocarpesina (**C**) y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**G**), a partir del extracto metanólico de rizomas de *Dorstenia contrajerva* mediante diversas técnicas cromatográficas.

2. Determinar la actividad leishmanicida de los metabolitos **C** y **G** mediante bioensayos *in vitro* contra amastigotes de *L. mexicana*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL EN *Dorstenia contrajerva*



CAPÍTULO II

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Aphelandra scabra*

2.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describe el estudio fitoquímico realizado en las hojas de *Aphelandra scabra*. El análisis fitoquímico consiste en el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar. Para la obtención de estos metabolitos se requiere realizar una serie de procesos como son: la obtención del material vegetal, secado, molienda, extracción, aislamiento y elucidación estructural, utilizando diversas técnicas cromatográficas y métodos espectroscópicos (UV, IR, RMN, EM).

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Materiales y equipos en general

Los disolventes utilizados para la extracción y fraccionamiento fueron de grado industrial y de distinta polaridad, destilados en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY. El proceso de secado del extracto metanólico se llevó a cabo utilizando un evaporador rotatorio semi-industrial Büchi® (R-220) y para el secado de las fracciones se empleó un evaporador rotatorio Büchi (R-300), ambos con baño maría a 40 °C.

Para el aislamiento de compuestos se emplearon diferentes técnicas cromatográficas: cromatografía líquida al vacío (CLV), cromatografía de columna por gravedad (CCG), cromatografía por sistema flash (Sepacore®), cromatografía de exclusión molecular y cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE o HPLC por sus siglas en inglés). El monitoreo de los compuestos se llevó a cabo por cromatografía de capa delgada (CCD) de gel de sílice 60 WF_{254}, de la marca Merck.

Las fases estacionarias empleadas en las diversas columnas fueron las siguientes: gel de sílice 60Å GF_{254} (2-25 µm, Merck), gel de sílice 60Å de 70-230 mallas (Sigma-Aldrich), gel de sílice 60Å de 230-400 mallas (Sigma-Aldrich), Sephadex LH-20, C-18 (5 µm, Grace).

Para la visualización y detección de algunos compuestos con grupos cromóforos se utilizó un gabinete de luz ultravioleta (UV) de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm). Seguidamente, las placas se revelaron impregnándolas con una disolución de ácido fosfomolíbdico (20 g de

ácido fosfomolíbdico y 2.5 g de sulfato cérico en 500 mL de H_2SO_4 al 5%) y posterior calentamiento.

Cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE o HPLC)

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 empezó con H_2O/MeOH/ACN (90:5:5) y una rampa de 7 min hasta llegar a 72:14:14, luego se mantuvo durante 9 min, posteriormente otra rampa de 9 min para llegar a 50:25:25, la cual se mantuvo durante 5 min, a continuación, siguió una rampa de 8 min hasta lograr la mezcla 10:45:45 que duró 3 min y finalmente una rampa de 3 min que sirvió para alcanzar las condiciones iniciales (90:5:5). El tiempo total de la corrida fue de 44 min. Todos los disolventes fueron grado HPLC, previamente filtrados (Millipore 0.22 µm, Merck) y desgasificados durante 40 min antes de ser usados.

El agua se colocó en la bomba A, el MeOH en la B y el ACN en la C. Se empleó un flujo de 2.8 mL/min, registrando un promedio de 136 bares entre corridas. Se inyectó un máximo de 120 mg de muestra disuelta previamente en MeOH, cada inyección manual fue de 40 µL con una concentración de 2 mg de muestra.

La identificación y elucidación estructural de los metabolitos aislados se llevó a cabo por medio de los siguientes 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 la marca Agilent Technologies, con una columna Ultra 1 y con las condiciones de corrida: 150 °C durante 3 min, una rampa de 2 °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

Algunos compuestos no se volatizaron a la temperatura empleada en el CG-EM, por lo tanto, se decidió sililarlos, es decir, derivatizar sus grupos hidroxilo a éteres de sililo para obtener compuestos con menor punto de ebullición y así poder obtener sus espectros de masas. La

sililación se realizó usando 50 µL de reactivo BSTFA + TMCS, 99:1 (Sigma-Aldrich) más 50 µL de piridina añadidos a 1 mg de la muestra y calentando durante 10 min a 100 °C.

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^{1}H-RMN), de carbono 13 (^{13}C-RMN) y bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC) se obtuvieron en un equipo de 600 MHz del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Mérida.

2.2.2. Material vegetal

La especie *Aphelandra scabra* (Vahl) Sm. (Acanthaceae) fue colectada el 1 de septiembre de 2016 en el municipio de Yaxcabá, Yucatán, México. La especie fue identificada por el técnico Paulino Simá Polanco de la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Un ejemplar de la especie fue depositado en el Herbario Regional *U Najil Tikin Xiw* (La Casa de la Hierba Seca) del CICY con el número de voucher Psimá 2304.

De las ramas colectadas únicamente se seleccionaron las hojas, las cuales se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y después se colocaron en una cámara de secado con lámparas incandescentes a 40 °C durante 48 h. Posteriormente, las hojas se molieron y pesaron, obteniéndose un total de 12 Kg de hojas secas.

2.2.3. Obtención del extracto metanólico (ASH-1a)

El extracto metanólico de las hojas de *A. scabra* se obtuvo al macerar 12 Kg del material vegetal seco. Este material se depositó en un contenedor de acero inoxidable y se agregó 80 L de metanol (MeOH). El contenido fue agitado regularmente y después de 24 h se realizó la primera extracción, recuperando y evaporando la mayor cantidad del disolvente empleado con ayuda de un evaporador rotatorio semi-industrial con baño maría a 40 ºC. Todo este proceso se realizó dos veces. Finalmente, el extracto crudo se colocó en recipientes de vidrio para lograr un secado completo a temperatura ambiente. El peso total de ASH-1a fue de 2.1 Kg.

2.2.4. Partición líquido-líquido de ASH-1a

El extracto metanólico fue fraccionado por partición líquido-líquido empleando disolventes de polaridad ascendente: hexano (Hx), diclorometano (CH_2Cl_2) y acetato de etilo (AcOEt). Para

iniciar se tomó 210 g del extracto crudo y se disolvió con 220 mL de MeOH, después éste se colocó en un embudo de separación y se agregó agua en una relación 1:3 ($MeOH/H_2O$), obteniéndose una fase acuosa (FA), luego se añadió Hx en una relación 1:2 (FA/Hx), se agitó y se dejó reposar por 2 h. Posteriormente, la fase orgánica (Hx) se recuperó y el disolvente se evaporó a presión reducida con ayuda de un evaporador rotatorio con baño maría a 40 ºC. Esta metodología se repitió dos veces más en una proporción 1:1 (FA/Hx). Acto seguido, el proceso de partición se repitió utilizando CH_2Cl_2 y AcOEt bajo las mismas condiciones (1:2, 1:1, 1:1) hasta procesar todo el extracto metanólico. Observaciones: después de recuperar la fase orgánica de AcOEt se formó un precipitado el cual se decantó y separó para su posterior análisis.

En total se obtuvieron cuatro fracciones: hexánica (ASH-2a), diclorometánica (ASH-2b), de acetato de etilo (ASH-2c) y acuosa (ASH-2d). Los pesos y rendimientos de cada uno se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Peso y rendimiento de las fracciones obtenidas de ASH-1a.

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
ASH-2a	340	16.1
ASH-2b	140	6.6
ASH-2c	110	5.2
ASH-2d	N/D	N/D

*El rendimiento es con base en el extracto metanólico obtenido (12 Kg).
N/D: no determinado.

2.2.5. Cromatografía líquida al vacío (CLV) de fracciones activas

Para lograr el aislamiento de metabolitos con actividad leishmanicida, las fracciones obtenidas en la partición se sometieron a un bioensayo de inhibición de crecimiento contra promastigotes de *L. mexicana*. Los resultados mostraron que las fracciones de diclorometano (ASH-2b) y acetato de etilo (ASH-2c) eran las indicadas para continuar trabajando. Se utilizó 50 g de la fracción ASH-2c y se sometió a un fraccionamiento por CLV. Se empleó una columna de 10 cm de Ø y 23.5 cm de largo, la cual se empacó con gel de sílice grado TLC hasta una altura de 6 cm. En total, se aplicaron 15 sistemas de disolventes de menor a mayor polaridad: Hex/An (80:20, 2×), Hex/An (70:30), Hex/An (60:40, 2×), Hex/An (70:30), Hex/An (65:35), Hex/An (60:40), Hex/An (50:50), Hex/An (40:60), An (100), An/MeOH (50/50), MeOH (100, 2×). El volumen empleado para cada sistema fue de 700 mL. Posteriormente, los 15 sistemas recuperados se monitorearon por cromatografía de capa delgada (CCD) y se reunieron de acuerdo a su similitud

en el perfil cromatográfico, dando como resultado siete fracciones marcadas como ASH-3a hasta ASH-3g (Figura 2.1).El peso de cada fracción se muestra en la Tabla 2.2.

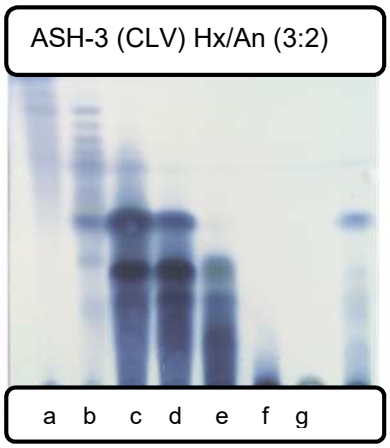


Figura 2.1. Placa cromatográfica de las fracciones reunidas de la CLV de ASH-2c.

Tabla 2.2. Peso de las fracciones reunidas de la CLV procedentes de ASH-2c.

Fracción	Peso (g)
ASH-3a	0.056
ASH-3b	0.473
ASH-3c	4.8
ASH-3d	1.2
ASH-3e	3.9
ASH-3f	34.5
ASH-3g	3.5
Total	48.4

Después de procesar la fracción ASH-2c, se procedió a trabajar con 50 g de la fracción ASH-2b. Las condiciones de la columna y volumen de los eluyentes fueron las mismas que se utilizaron con la fracción ASH-2c. En total se usaron 11 sistemas de disolventes de polaridad ascendente: Hex/An (90:10), Hex/An (85:15, 2×), Hex/An (80:20, 2×), Hex/An (70:30), Hex/An (60:40), Hex/An (50:45), Hex/An (50:50), Hex/An (100), An (100), An/MeOH (50:50). Seguidamente, las 11 fracciones recuperadas se monitorearon por CDC y se reunieron de acuerdo a su perfil cromatográfico en siete fracciones etiquetadas como ASH-4a hasta ASH-4g (Figura 2.2). En la fracción ASH-4d se observó otro precipitado, el cual se decantó, limpió y separó para su posterior análisis. El peso de las fracciones reunidas en la CLV procedentes de ASH-2b se muestra en la Tabla 2.3.

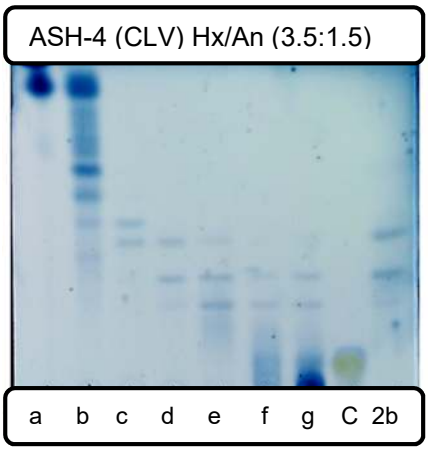


Figura 2.2. Placa cromatográfica de las fracciones reunidas de la CLV de ASH-2b. Cirsimaritina (C).

Tabla 2.3. Peso de las fracciones reunidas de la CLV procedentes de ASH-2c.

Fracción	Peso (g)
ASH-4a	0.74
ASH-4b	4.6
ASH-4c	3.5
ASH-4d	4.1
ASH-4e	10.6
ASH-4f	25.5
ASH-4g	---
Total	49.0

2.2.6. Aislamiento de metabolitos secundarios de fracciones activas

En este trabajo se lograron aislar siete metabolitos: compuesto **1** (ASH-2c1), compuesto **2** (ASH-3c, ASH-3d y ASH-3e), compuesto **3** (ASH-4d), compuesto **4** (ASH-7b1 y ASH-10c1), compuesto **5** (ASH-9b1), compuesto **6** (ASH-28p1) y compuesto **7** (ASH-28p3).

2.2.6.1. Aislamiento del compuesto 1 (cirsimarina)

Anteriormente se mencionó que en la fracción ASH-2c se formó un precipitado, por este motivo esta muestra se filtró al vacío en un embudo Büchner de porcelana y se limpió por medio de varios lavados usando diclorometano y metanol (Figura 2.3). Debido a su gran abundancia y parecido físico a un metabolito previamente aislado de las hojas de *A. scabra*, el precipitado se monitoreó en CCD con los siguientes compuestos: cirsimaritina y cirsimarina (Figura 2.4). En la placa cromatográfica se pudo observar la presencia de al menos dos compuestos en el

precipitado, uno de ellos presentó un R_f = 0.25 con el sistema CH_2Cl_2/MeOH (4.5:0.5), resultando muy similar al que mostró la cirsimarina, por esta razón se sospechó que uno de los compuestos aislados en el precipitado corresponde a la cirsimarina.

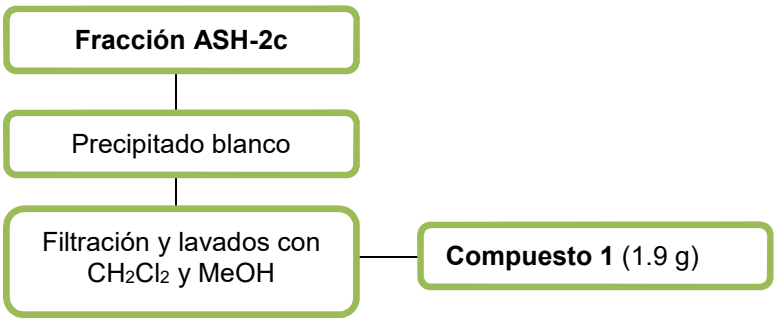


Figura 2.3. Diagrama de aislamiento del compuesto **1** (cirsimarina).

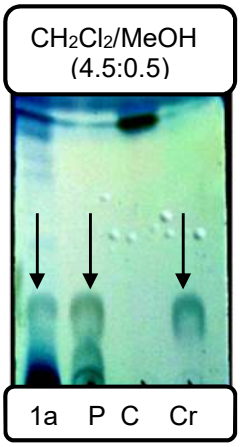


Figura 2.4. Monitoreo en CCD del precipitado (P) obtenido en ASH-2c. Extracto metanólico (1a), cirsimaritina (C), cirsimarina (Cr).

Compuesto 1 (ASH-2c1, cirsimarina): $C_{23}H_{24}O_{11}$. Sólido blanco en forma de polvo. R_f = 0.25 en el sistema CH_2Cl_2/MeOH (4.5:0.5).

2.2.6.2. Aislamiento del compuesto 2 (sorbifolín)

En las fracciones ASH-3c, ASH-3d y ASH-3e obtenidas por CLV de la fracción ASH-2c se formaron precipitados sólidos de color amarillo, los cuales se decantaron y lavaron con diclorometano y acetona (Figura 2.5). Después, se monitorearon en CCD junto con otros compuestos aislados de las hojas de *A. scabra*: cirsimarina, cirsimaritina y sorbifolín (Figura 2.6). Se pudo observar que todos los precipitados corresponden a un flavonoide ya reportado como sorbifolín, con un R_f = 0.4 en el sistema Hx/An (1:1).

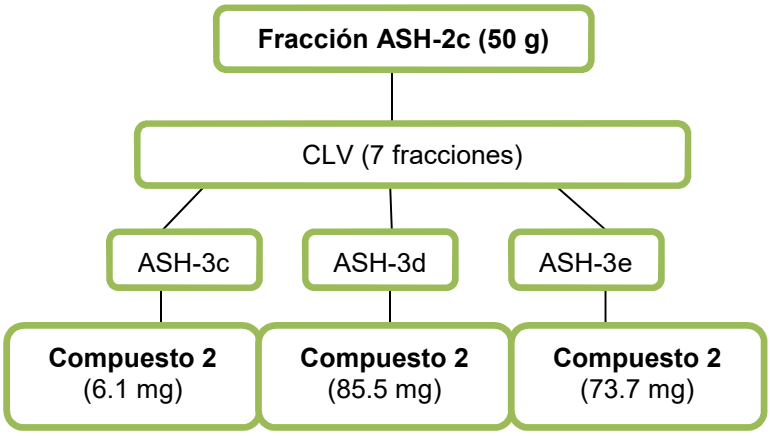


Figura 2.5. Diagrama de aislamiento del compuesto **2** (sorbifolín).

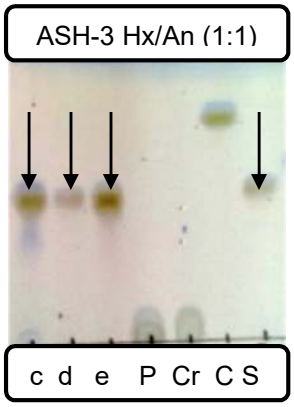


Figura 2.6. Monitoreo en CCD de los precipitados obtenidos en ASH-3c, d y e. Precipitado de ASH-2c (P), cirsimarina (Cr), cirsimaritina (C), sorbifolín (S).

Compuesto 2 (ASH-3c, ASH-3d y ASH-3e, sorbifolín): $C_{16}H_{12}O_6$. Sólido amarillo en forma de cristales. R_f = 0.4 en el sistema Hx/An (1:1).

2.2.6.3. Aislamiento del compuesto 3 (cirsimaritina)

En la fracción ASH-4d obtenida por CLV de la fracción ASH-2b, se formó un precipitado sólido de color amarillo, el cual se decantó y lavó con diclorometano y acetona (Figura 2.7). Después por CCD se monitoreó junto con otros flavonoides previamente aislados de las hojas de *A. scabra*, mostrando un R_f = 0.6 en el sistema CH_2Cl_2/An/MeOH (4:0.5:0.5) igual que el flavonoide conocido como cirsimaritina (Figura 2.8).

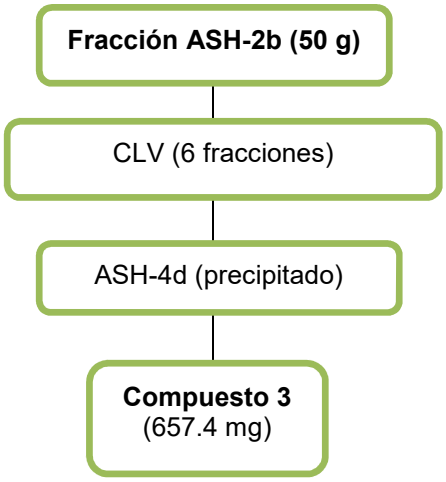


Figura 2.7. Diagrama de aislamiento del compuesto **3** (cirsimaritina).

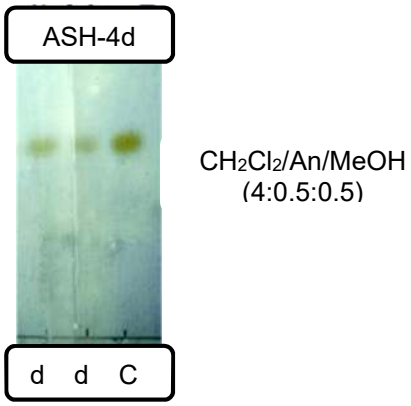


Figura 2.8. Monitoreo en CCD del precipitado obtenido en ASH-4d (d) y cirsimaritina (C).

Compuesto 3 (ASH-4d, cirsimaritina): $C_{17}H_{14}O_6$. Sólido amarillo en forma de cristales. R_f = 0.6 en el sistema CH_2Cl_2/An/MeOH (4:0.5:0.5).

2.2.6.4. Aislamiento del compuesto 4 (ASH-7b1, ASH-10c1, tirosol)

El compuesto **4** se aisló a partir de la fracción ASH-3c, del cual se tomó 1 g y se sometió a una columna tipo flash (Sepacore®) de 3 cm de Ø, empacada con gel de sílice flash hasta una altura de 35 cm. La elución de compuestos se realizó por gradiente empezando con el sistema Hx/An (9:1), Hx/An (8:2), Hx (7:3), Hx/An (1:1), An (100%) y finalmente An/MeOH (1:1). Se recolectaron 85 tubos de ensayo de aproximadamente 10 mL de volumen. Finalmente, se agruparon en seis fracciones según su perfil cromatográfico, nombradas como ASH-5a hasta ASH-5f. Los pesos de cada fracción se reportan en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Peso de las fracciones reunidas y obtenidas a partir de ASH-3c.

Fracción	Peso (mg)
ASH-5a	65.0
ASH-5b	150.0
ASH-5c	232.5
ASH-5d	293.0
ASH-5e	107.4
ASH-5f	79.0
Total	926.5

La fracción ASH-5d presentó la menor cantidad de metabolitos, por lo tanto, se trabajó 100 mg de esta muestra en una columna por gravedad de 1.5 cm de Ø, empacada con gel de sílice 70-230 mallas hasta una altura de 30 cm. La elución de compuestos se realizó por gradiente usando los siguientes sistemas: CH_2Cl_2/AcOEt (8.5:1.5), CH_2Cl_2/AcOEt (8:2), CH_2Cl_2/AcOEt (7.5:2.5), CH_2Cl_2/AcOEt (1:1), An (100%) y An/MeOH (1:1). Se recolectaron 65 tubos de ensayo de aproximadamente 5 mL de volumen. Al final, se reunieron en cinco fracciones de acuerdo a su parecido en el perfil cromatográfico por CCD (ASH-7a hasta ASH-7e).

La fracción ASH-7b mostró en CCD una sola mancha intensa con los sistemas: CH_2Cl_2/AcOEt (1:1), Hx/An (6.5:3.5) y tolueno/An (1:1). Por lo tanto, se nombró a esta fracción como ASH-7b1 o compuesto **4** (Figura 2.9). Este mismo compuesto se aisló en el experimento 10 cuando se sometió 268 g de la fracción ASH-6e a una columna tipo flash (Sepacore®), utilizando gel de sílice tipo TLC. Se colectaron 55 fracciones en tubos de ensayo, finalmente se reunieron cinco fracciones según su patrón de manchas nombrándolas como ASH-10a hasta ASH-10e. La ASH-10c mostró por CCD la presencia de una única mancha, la cual se comparó con el compuesto ASH-7b1 y se concluyó que eran los mismos compuestos (Figura 2.10).

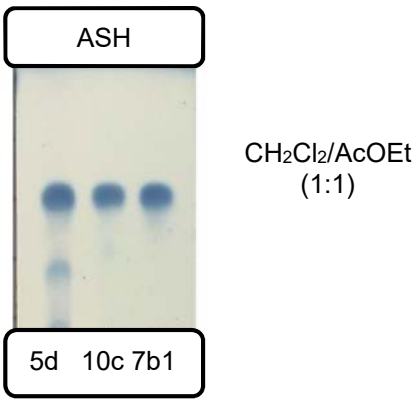


Figura 2.9. Monitoreo en CCD del compuesto **4** (tirosol).

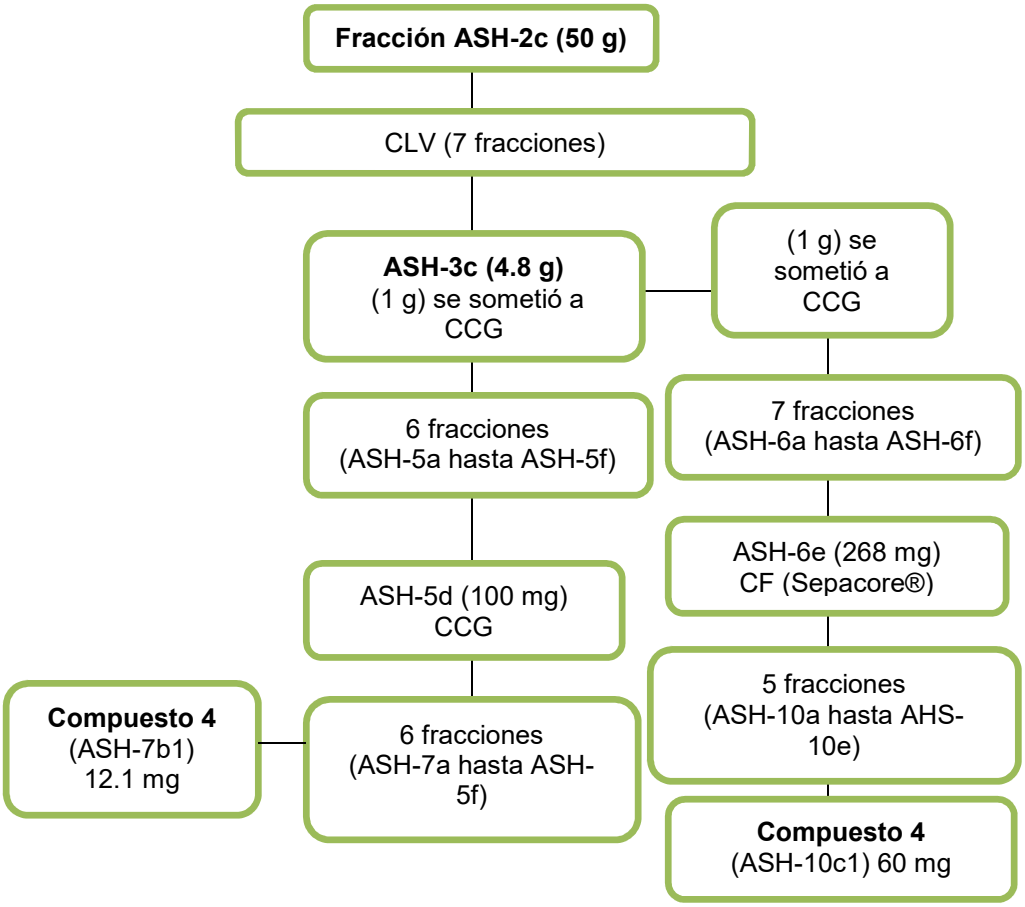


Figura 2.10. Diagrama de aislamiento del compuesto **4** (tirosol).

Compuesto 4 (ASH-7b1 y ASH-10c1, tirosol): $C_8H_{10}O_2$.Sólido blanco, soluble en acetona. R_f = 0.48 en el sistema CH_2Cl_2/AcOEt (1:1). **RMN-^{1}H** (600 MHz, acetona-d_6). δ: 2.70 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-7), 3.68 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-8), 6.74 (2H, dt, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H-3 y H-5), 7.05 (2H, dt, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H-2 y H-6). **RMN-^{13}C** (150 MHz, acetona-d_6) δ: 38.6 (t, C-7), 63.4 (t, C-8), 115.0 (d, C-3, C-5), 129.8 (d, C-2, C-6), 130.1 (s, C-1), 155.6 (s, C-4). **CG-EM** (*m/z*): 138 ([M^+], 31), 107 (16), 91 (14), 77 (12), 65 (14), 51.

2.2.6.5. Aislamiento del compuesto 5 (ASH-9b1, hidroxitirosol)

El compuesto **5** proviene de la fracción ASH-6e de la cual se tomó 120 mg y se sometió a una columna de gravedad de 1 cm de Ø, empacada con gel de sílice 70-230 mallas. Como eluyentes se utilizaron los siguientes sistemas: CH_2Cl_2/An (9:1), CH_2Cl_2/An (8:2), CH_2Cl_2/An (7:3) y An 100%. En total, se recolectaron 42 tubos de ensayo de aproximadamente 5 mL. Posteriormente, se reunieron en cuatro fracciones finales nombradas como ASH-8a hasta ASH-8d. La fracción ASH-8c (25 mg) se sometió a una columna de exclusión molecular utilizando Sephadex LH-20.

Como eluyente se utilizó acetona 100%. Se colectaron 35 fracciones y se agruparon en tres fracciones finales. La fracción ASH-9b mostró la presencia de una sola mancha en CCD utilizando los sistemas: Hx/An (1:1), tolueno/An/MeOH (7:2.5:0.5) y CH_2Cl_2/MeOH (9.5:0.5), por lo tanto, se nombró a esta fracción como ASH-9b1 o compuesto **5** (Figura 2.11). El diagrama de aislamiento se muestra en la Figura 2.12.

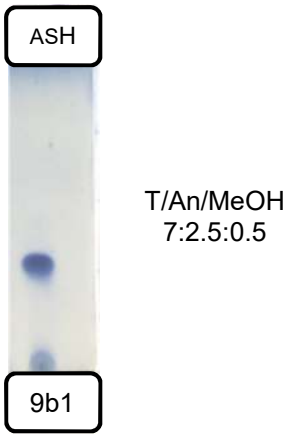


Figura 2.11. Monitoreo en CCD del compuesto **5** (hidroxitirosol).

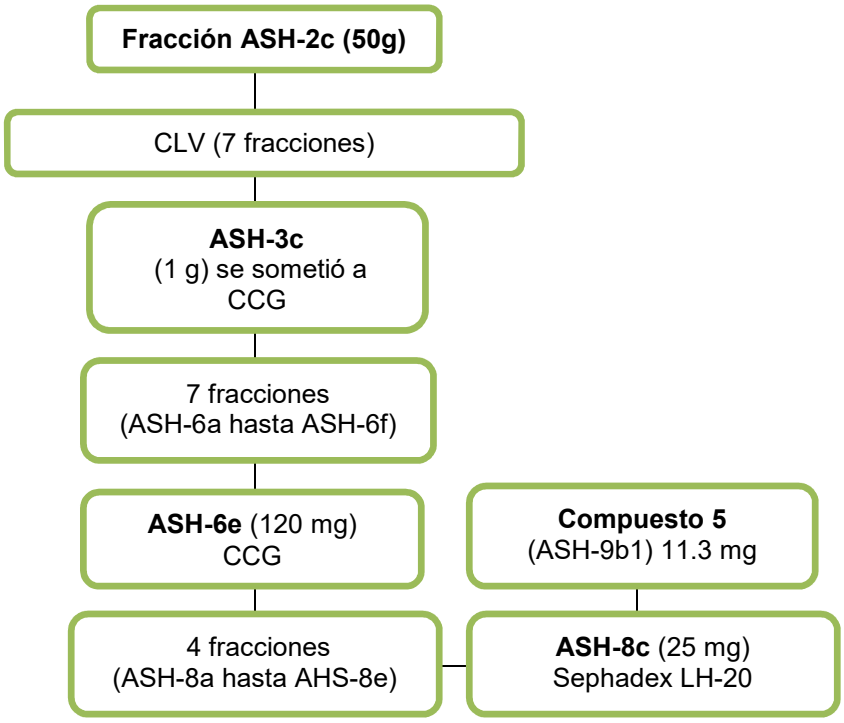


Figura 2.12. Diagrama del aislamiento del compuesto **5** (hidroxitirosol).

Compuesto 5 (ASH-9b1, hidroxitirosol): $C_8H_{10}O_3$. Sólido viscoso, soluble en metanol, R_f = 0.3 en el sistema T/An/MeOH (7:2.5:0.5). **RMN-^{1}H** (600 MHz, CD_3OD). δ: 2.65 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-7), 3.67 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-8), 6.66 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 6.64 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2), 6.52 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H-6). **RMN-^{13}C** (150 MHz, metanol-d_4) δ: 38.2 (t, C-7), 63.1 (t, C-8), 114.8 (d, C-5), 115.6 (d, C-2), 119.7 (d, C-6), 130.3 (s, C-1), 143.1 (s, C-4), 144.7 (s, C-3).

2.2.6.6. Aislamiento de los compuestos 6 y 7 (ASH-28P1, ASH-28P3)

La fracción ASH-28h (130 mg) mostró en CCD de fase reversa la presencia de compuestos diferentes a los aislados anteriormente en las hojas de *A. scabra*, sin embargo, debido a su alta polaridad se decidió separarlos por HPLC semi-preparativa con la metodología previamente descrita en Materiales y Métodos. Al finalizar las corridas se concentraron cuatro picos mayoritarios: ASH-28P1 (6.5 mg), ASH-28P2 (4 mg), ASH-28P3 (15 mg) y ASH-P4 (4.5 mg). Debido a la cantidad obtenida solamente se continuó trabajando con las fracciones P1 y P3.

Compuesto 6 (ASH-28P1): Sólido de consistencia acaramelada. **RMN-^{1}H** (600 MHz, piridina-d_5): δ 1.08 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-13), 1.77 (2H, q, *J* = 7.3 Hz, H-12), 4.52 (1H, m, H-11), 6.72 (1H, dd, *J* = 1.9, 15.5 Hz, H-9), 7.38 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3), 7.51 (1H, dd, *J* = 4.7, 15.5 Hz, H-10), 8.12 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.2 Hz, H-4), 8.41 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6). **RMN-^{13}C** (150 MHz, piridina-d_5): δ 10.6 (c, C-13), 30.9 (t, C-12), 72.2 (d, C-11), 116.6 (d, C-3), 118.7 (d, C-6), 122.2 (d, C-9), 123.7 (d, C-4), 124.3 (s, C-1), 147.5 (s, C-5), 152.5 (d, C-10), 152.6 (s, C-2), 169.7 (s, C-8), 169.8 (s, C-7).

Compuesto 7 (ASH-28P3): Sólido amorfo de color café. **RMN-^{1}H** (600 MHz, piridina-d_5): δ 3.83 (3H, s, OCH_3), 7.32 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-6), 7.92 (1H, s, H-8), 8.10 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-3), 8.18 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz, H-5). **RMN-^{13}C** (150 MHz, piridina-d_5): δ 56.8 (c, C-7), 108.9 (d, C-8), 114.3 (d, C-3), 116.7 (d, C-6), 122.6 (s, C-1), 125.4 (d, C-5), 142.8 (s, C-9), 149.2 (s, C-2), 153.2 (s, C-4), 169.7 (s, C-10).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Identificación del compuesto 1 (ASH-2c1, cirsimarina)

Este compuesto se aisló de un precipitado formado en la fracción de AcOEt, es un sólido blanco soluble en DMSO. Su identificación se basó en la similitud de cómo revela en CCD usando los sistemas CH_2Cl_2/MeOH (4.5:0.5) y (4.5:0.5, 3×) con un R_f = 0.25 y 0.4, respectivamente, dato similar que presenta una flavona glucosilada ya reportada para esta especie llamada cirsimarina (Figura 2.13). Dada la similitud en la apariencia de este compuesto con la cirsimarina (Hernández-Bolio, 2015), su gran abundancia al ser aislada y los patrones similares en CCD se pudo determinar la estructura del compuesto **1**.

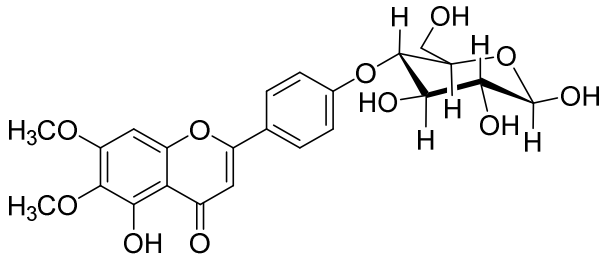


Figura 2.13. Estructura del compuesto **1** (cirsimarina).

Según la literatura este compuesto es uno de los metabolitos mayoritarios en las hojas de la especie *Aphelandra scabra*. Además, la cirsimarina también ha sido aislada en otras especies de la familia Acanthaceae como *Ruellia tuberosa* (Hernández-Bolio, 2015; Lin *et al*., 2006).

Un estudio reciente menciona que la cirsimarina aislada de *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* mostró una buena actividad inhibitoria en la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandina E2 (PGE2) inducida por LPS. La cirsimarina inhibió de forma dependiente la concentración de NO sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) inducida por LPS en los niveles de proteína y ARNm en macrófagos. También suprimió la producción y la expresión de ARNm del factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y la interleucina (IL)-6 en macrófagos derivados de la médula ósea y RAW 264.7 estimulados con LPS. Por lo tanto, la cirsimarina puede ser un compuesto activo prometedor para el tratamiento contra las enfermedades inflamatorias al suprimir la vía de señalización JAK/STAT e IRF-3 (Han *et al*., 2018). Hasta el momento no hay reportes de actividad leishmanicida.

2.3.2. Identificación del compuesto 2 (ASH-3c1, ASH-3d1 y ASH-3e1, sorbifolín)

Es un sólido amarillo en forma de polvo que absorbe bajo luz UV a 365 nm y 254 nm, muy característico en compuestos como los flavonoides. Presenta un R_f = 0.4 en el sistema Hx/An (1:1). Debido a sus características físicas y la forma en que se aisló, se decidió comparar con otros flavonoides reportados en las hojas de *A. scabra*. El resultado de esta comparación permitió determinar que el compuesto **2** es el sorbifolín (Figura 2.14).

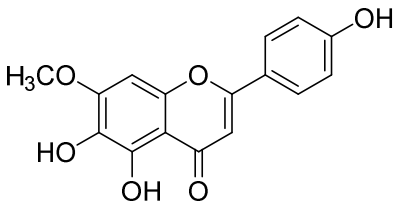


Figura 2.14. Estructura del compuesto **2** (sorbifolín).

El sorbifolín fue aislado por primera vez cuando realizaban un estudio de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Sorbaria sorbifolia* (L.) A. Br. (*Ural falsespirea*) (Zaitsev *et al*., 1969). Este compuesto también ha sido aislado en las hojas de *Cirsium setosum* (Asteraceae) (Ma *et al*., 2016). En cuanto a su actividad biológica, un estudio reciente tuvo como objetivo evaluar su efecto antivírico en el ciclo de la replicación de virus de la hepatitis C (VHC). Los resultaron mostraron que este flavonoide inhibió un 45% la entrada de este virus en los genotipos 2a JFH-1, además no fue tóxico (Shimizu *et al*., 2017). Aún no hay reportes de que este compuesto tenga actividad leishmanicida.

2.3.3. Identificación del compuesto 3 (ASH-4d1, cirsimaritina)

Es un polvo de color amarillo, absorbe bajo luz UV a 365 nm y 254 nm y es soluble en MeOH. Tiene un R_f = 0.6 con el sistema CH_2Cl_2/An/MeOH (4:0.5:0.5). Su monitoreo en CCD junto a otros flavonoides aislados de *A. scabra* permitió identificarlo como cirsimaritina (Figura 2.15).

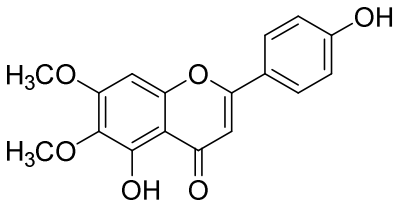


Figura 2.15. Estructura del compuesto **3** (cirsimaritina).

La cirsimaritina ha sido aislada en otras especies como: *Origanum majorana* (Lamiaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), *Lippia graveolens* (Verbenaceae), *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), *Ruellia tuberosa* (Acanthaceae) (Bower *et al*., 2014; Pattanayak *et al.,* 2010; Lin *et al*., 2006). Según la literatura, además de su efecto antioxidante, esta molécula tiene la capacidad de mejorar la viabilidad celular y proteger las células INS-1 contra el daño inducido por estreptozotocina (STZ). Además, la cirsimaritina redujo el estrés oxidativo intracelular inducido por STZ y suprimió efectivamente la apoptosis de las células β pancreáticas al disminuir la activación de la caspasa 8 y caspasa 3, BID y la proteína reparadora de ADN poli (ADP ribosa) polimerasa (PARP) y aumentando la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2. Estos resultados le confieren el potencial terapéutico para ayudar en la prevención y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 (Lee *et al*., 2017).

Otro estudio donde se evaluó este compuesto aislado de *Centaurea kilaea* Boiss (Asteraceae), menciona que tuvo una buena actividad contra células PC3 (cáncer de próstata) con una CI_{50} = 4.3 µg/mL. Este resultado indica que la cirsimaritina podría ser un posible candidato a fármaco contra el cáncer de próstata (Sen *et al*., 2016).

También existen reportes que demuestran la actividad antiinflamatoria que posee la cirsimaritina, por ejemplo: Shin *et al*. (2017) evaluaron el efecto antiinflamatorio de este compuesto aislado de las partes aéreas de *Cirsium japonicum* var. *maackii* utilizando células RAW264.7. El resultado mostró que inhibió la producción de IL-6, el factor de necrosis tumoral alfa y de óxido nítrico de una manera dependiente de la concentración de células RAW264.7 estimuladas con lipopolisacáridos (LPS). También se ha reportado que la cirsimaritina posee actividad *in vitro* contra *Giardia lamblia* con una CI_{50} = 3.8 µM (Hernández-Bolio *et al.,* 2015).

2.3.4. Identificación del compuesto 4 (ASH-7b1, ASH-10c1, tirosol)

El compuesto **4** es un sólido blanco soluble en acetona. Tiene un R_f = 0.48 en el sistema CH_2Cl_2/AcOEt (1:1). El compuesto ASH-7b1 se sometió a un análisis por CG-EM de baja resolución (Figura 2.16). El espectro de masas mostró un peso molecular de 138 *m/z* y un pico base de 107 *m/z.* Según la base de datos NIST el peso y patrón de fragmentación corresponden al compuesto 4-hidroxifeniletanol también conocido como tirosol cuya fórmula molecular corresponde a $C_8H_{10}O_2$.

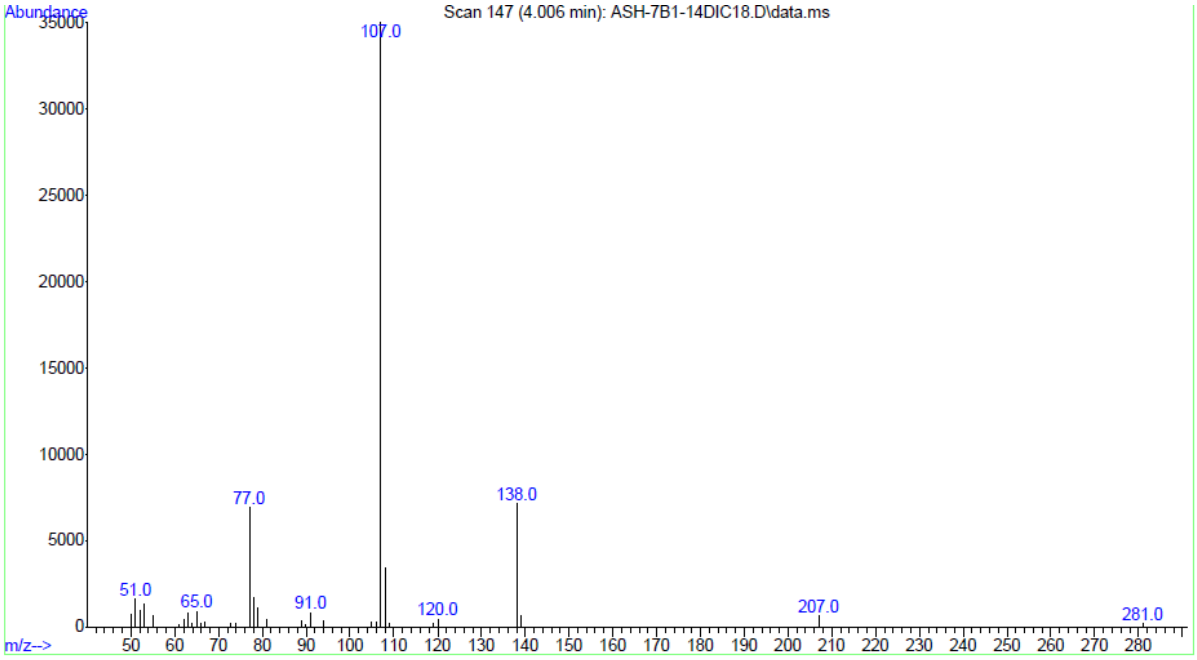


Figura 2.16. Espectro de masas del compuesto **4** (tirosol).

Para confirmar la identidad de este compuesto se realizó un análisis por espectroscopía de RMN-^{1}H (600 MHz, acetona-d_6, Figura 2.17). En el espectro se observa la presencia de dos señales dentro de la región de compuestos aromáticos. La primera señal a δ 7.05 (2H, dt, J = 8.5, 2.1 Hz, H-2 y H-6) y la segunda a δ 6.74 (2H, dt, J = 8.5, 2.1 Hz, H-3 y H-5), esto indica acoplamientos en posición *orto* y *meta*, formando un sistema AA'BB'. También hay señales a δ 3.68 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-8) y δ 2.70 (2H, t, J = 7.2 Hz, H-7) que corresponden a protones alifáticos.

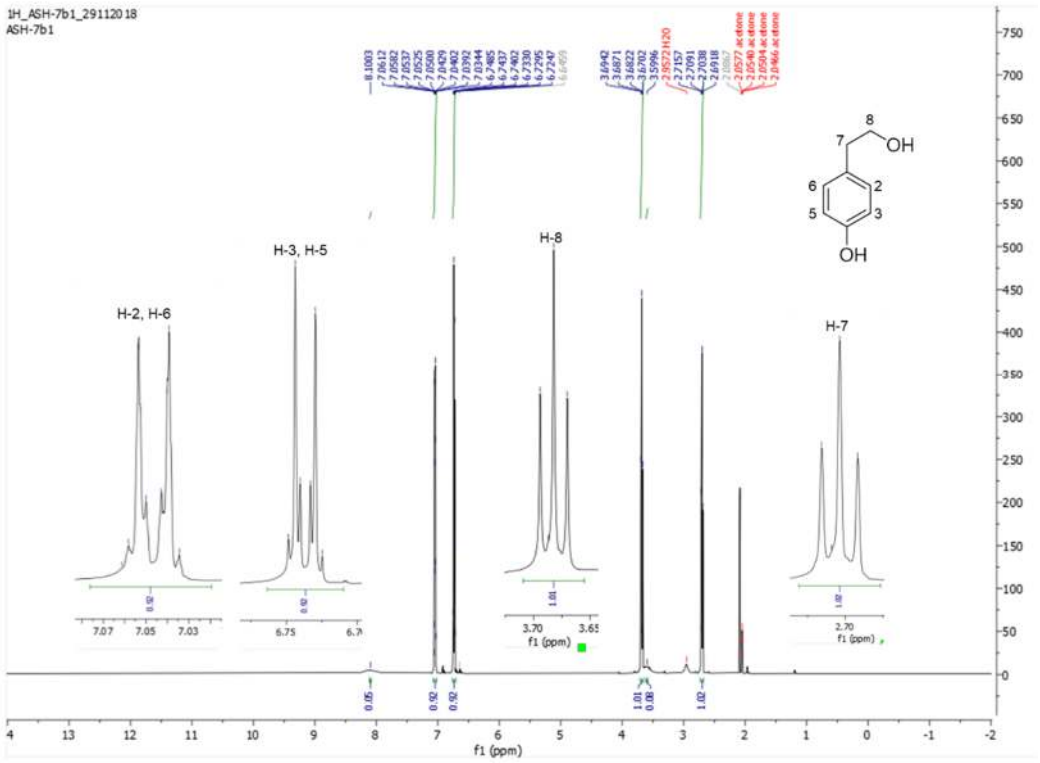


Figura 2.17. RMN-^{1}H (600 MHz en acetona-d_6) del compuesto **4** (tirosol).

En el espectro de RMN-^{13}C (150 MHz, acetona-d_6, Figura 2.18) se observan seis señales, cuatro de éstas dentro de la región de carbonos aromáticos. Las señales que aparecen con gran intensidad a δ 129.8 y 115.0 pertenecen a dos carbonos cada una, por lo tanto, el análisis nos permitió identificar la presencia de ocho carbonos en la estructura. La señal a δ 155.6 corresponde a un carbono aromático oxigenado (C-4). La señal a δ 130.1 pertenece a un carbono cuaternario no oxigenado (C-1). Las señales a δ 129.8 y 115.0 corresponden a metinos aromáticos (C-2 y C-6), (C-3 y C-5), respectivamente. La señal a δ 63.4 es de un carbono alifático enlazado a un oxígeno (C-8). Y la última señal a δ 38.6 pertenece a un carbono alifático unido al anillo aromático (C-7).

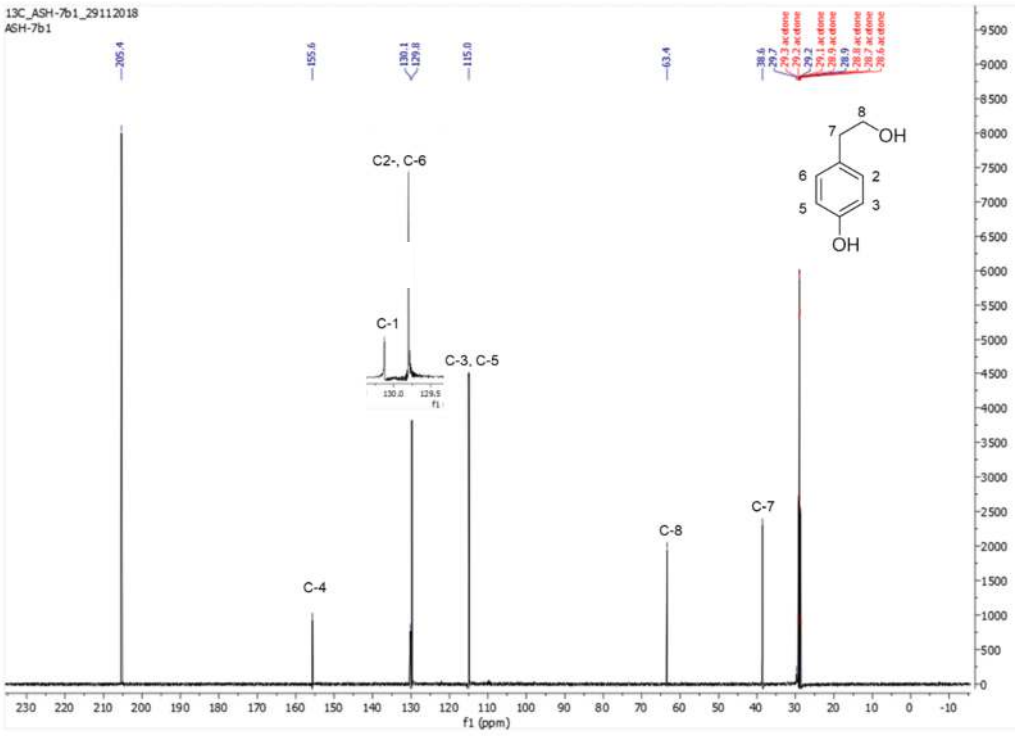


Figura 2.18.RMN-^{13}C (150 MHz en acetona-d_6) del compuesto **4** (tirosol).

Con los experimentos de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C y una comparación con los datos reportados en la literatura, se confirmó que el compuesto **4** (ASH-7b1) es un alcohol fenólico conocido como 4-hidroxibencenoetanol o tirosol (Tabla 2.5, Figura 2.19).

Tabla 2.5. Comparación de las señales observadas en RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **4** con lo reportado en la literatura para el tirosol.

N°	RMN-^{1}H acetona-d_6 ASH-7b1 *J* (Hz)	RMN-^{13}C acetona-d_6 ASH-7b1	RMN-^{1}H CD_3OD Owen *et al*. (2000)	RMN-^{13}C CD_3OD Owen *et al*. (2000)	RMN-^{1}H DMSO-d_6 Specian *et al*. (2012)	RMN-^{13}C DMSO-d_6 Specian *et al*. (2012)
1		130.1		131.0		
2	7.05 (dt, 8.5, 2.1, 1H)	129.8	7.01 (dt)	130.8	7.23 (d, 8.4)	129.8
3	6.74 (dt, 8.5, 2.1, 1H)	115.0	6.69 (d)	116.1	6.91 (d, 8.4)	115.1
4		155.6		156.7		
5	6.74 (dt, 8.5, 2.1, 1H)	115.0	6.69 (d)	116.1	6.91 (d, 8.4)	115.1
6	7.05 (dt, 8.5, 2.1, 1H)	129.8	7.01 (dt)	130.8	7.23 (d, 8.4)	129.8
7	2.70 (t, 7.2, 2H)	38.6	2.70 (tt,)	39.4	2.83 (t, 6.7)	
8	3.68 (t, 7.2, 2H)	63.4	3.67 (t,)	64.5	3.84 (t, 6.7)	

d = doblete, t = triplete, dt = doble triplete, tt = triple triplete.

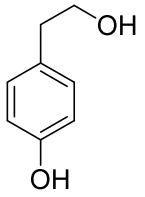


Figura 2.19. Estructura del compuesto **4** (tirosol).

El tirosol es un alcohol fenólico presente en dos de los componentes tradicionales de la dieta mediterránea: el vino y el aceite de oliva virgen y extra virgen. El tirosol también se puede encontrar en otras bebidas alcohólicas como la cerveza y el vermut. Este compuesto se ha aislado en otras especies vegetales como: *Rhodiola rosea* y *R. quadrifida* (Crassulaceae). También ha sido aislado en algunos hongos fitopatógenos como: *Ceratocystis adiposa* y *Alternaria tagetica* (Servili *et al*., 2014; Guzmán-López *et al*., 2007; Gamboa-Angulo *et al*., 2001; Troshchenko y Kutikova, 1967). En nuestro caso este es el primer reporte de aislamiento del tirosol en las hojas de *A. scabra*.

Se sabe que este compuesto posee actividad antioxidante debido a su naturaleza química que le confiere la propiedad de proteger a las células contra el daño oxidativo; aunque no es tan potente como otros antioxidantes, su consumo habitual puede contribuir a tener una vida más saludable, por ejemplo: un estudio reporta que el tirosol posee buena actividad antioxidante debido a su capacidad de captación de radicales libres frente a 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) con CI_{50} = 8.10 µM (Chen *et al*., 2012; Miro-Casas *et al*., 2003).

También hay reportes de trabajos *in vivo* que demuestran que puede ayudar a la prevención de enfermedades cardiovasculares. Además, el tirosol también indujo la expresión de la proteína de la longevidad nuclear (SIRT1) en el corazón después de un infarto de miocardio en ratas. Este trabajo sugiere que el tirosol induce una protección contra el estrés miocárdico por isquemia, mediante la inhibición de la actividad proapoptótica de FOXO3a y aumento de SIRT1, por lo que se puede considerar para el desarrollo de un nuevo fármaco para combatir las enfermedades isquémicas (Samson *et al*., 2008).

En cuanto a su actividad leishmanicida, Aissa *et al*. (2012) realizaron la evaluación antimicrobiana y leishmanicida frente a cepas de *L. major* y *L. infantum* de una gran serie de ésteres de ácidos grasos derivados del tirosol por esterificación directa de éste. Los resultados mencionan que los derivados de tirosol TyC8, TyC10 y TyC12 (cadena media) tuvieron actividad contra ambas

especies (CI_{50} = 38.0, 19.2 y 60.3 µg/mL y CI_{50} = 62.8, 38.7 y 157.6 µg/mL, respectivamente), mientras que el tirosol y los derivados de cadena corta y larga no tuvieron actividad leishmanicida.

Otro trabajo basado en la síntesis de ésteres de ácidos grasos derivados del tirosol menciona que ningún derivado tuvo más actividad que el tirosol, el cual presentó un 50% de inhibición de amastigotes axénicos a una concentración de 20 µM y una CI_{50} > 10 µM contra amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Además, se evaluó su actividad citotóxica frente a células sanas de pulmón humano (MRC-5) presentando una CI_{50} > 500 µM (Belmonte-Reche *et al*., 2016).

2.3.5. Identificación del compuesto 5 (ASH-9b1, hidroxitirosol)

El compuesto **5** es un sólido de color marrón y es soluble en metanol. Tiene un R_f = 0.3 en el sistema T/An/MeOH (7:2.5:0.5). En el espectro de RMN-^{1}H (600 MHz, CD_3OD, Figura 2.20) se observa la presencia de tres señales dentro de la región de compuestos aromáticos, cada una de estas señales integra para un protón. Las señales a δ 6.66 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 6.64 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-2) y 6.52 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz, H-6) corresponden a protones de un anillo aromático. La posición de los desplazamientos y multiplicidad permiten señalar que el compuesto posee un anillo aromático trisustituido por dos hidroxilos en posición *orto* y una cadena alifática. También se observaron dos señales de protones alifáticos, el primero a δ 3.67 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-8), que pertenece a un metileno unido a un grupo hidroxilo y otra a δ 2.65 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-7) de un segundo metileno unido al anillo aromático. Estos datos comparados con la literatura permiten inferir que ASH-9b1 es el compuesto 3,4-dihidroxifeniletanol o hidroxitirosol (Owen *et al*., 2000).

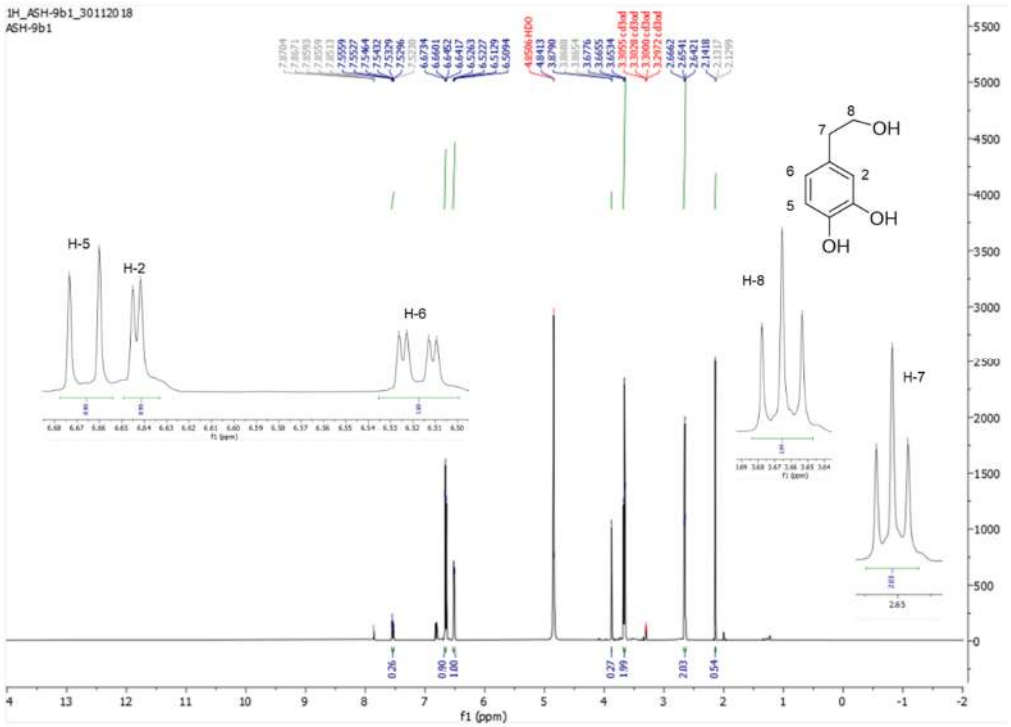


Figura 2.20. RMN-^{1}H (600 MHz en CD_3OD) del compuesto **5** (hidroxitirosol).

En el espectro de RMN-^{13}C (150 MHz, CD_3OD, Figura 2.21) se observan ocho señales, de las cuales seis están dentro de la región de carbonos aromáticos. Las primeras dos señales corresponden a carbonos cuaternarios unidos a hidroxilos a δ 144.7 y 143.1 asignados a los C-3 y C-4, respectivamente. La señal a δ 130.3 corresponde a otro carbono cuaternario unido a una cadena alifática y pertenece al C-1. Hay una señal a δ 119.7 que pertenece al C-6 y finalmente dos señales a δ 115.6 y 114.8 que corresponden a los carbonos C-2 y C-5, respectivamente. Las últimas dos señales a δ 63.1 y 38.2 son de los carbonos de la cadena alifática C-8 y C-7 (etanol). Con ambos espectros (RMN-^{1}H y RMN-^{13}C) comparados con la literatura se puede concluir que el compuesto **5** (ASH-9b1) es el polifenol conocido como hidroxitirosol (Tabla 2.6, Figura 2.22).

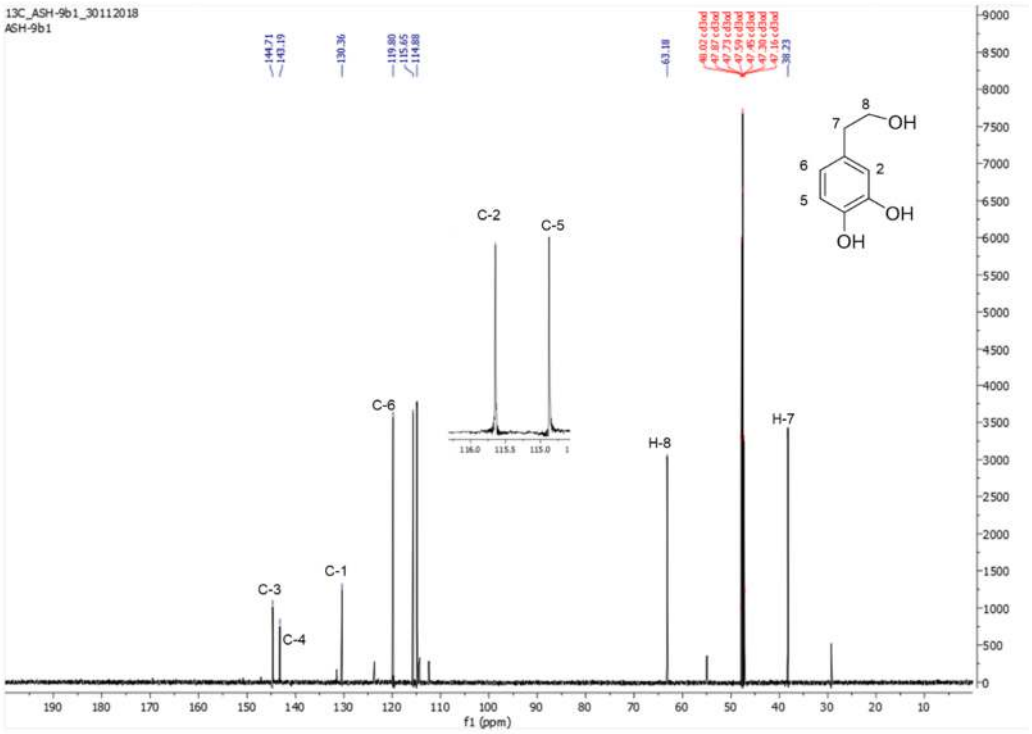


Figura 2.21. RMN-^{13}C (150 MHz en CD_3OD) del compuesto **5** (hidroxitirosol).

Tabla. 2.6. Comparación de las señales observadas en RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **5** con lo reportado en la literatura para el hidroxitirosol.

N°	RMN-^{1}H CD_3OD ASH-9b1 *J* (Hz)	RMN-^{13}C CD_3OD ASH-9b1	RMN-^{1}H CD_3OD Owen *et al.* (2000)	RMN-^{13}C CD_3OD Owen *et al.* (2000)
1		130.3		131.8
2	6.64 (d, 2.1, 1H)	115.6	6.64 (dt, 1H)	117.0
3		144.7		146.1
4		143.1		144.6
5	6.66 (d, 2.1, 1H)	114.8	6.66 (d, 1H)	116.3
6	6.52 (dd, 8.5, 2.1, 1H)	119.7	6.51 (ddt, 1H)	121.2
7	2.65 (t, 7.2, 2H)	38.2	2.65 (ddt, 2H)	39.6
8	3.67 (t, 7.2, 2H)	63.1	3.66 (dd, 2H)	64.5

d = doblete, dd = doble-doblete, t = triplete, dt = doble-triplete, ddt = doble-doble-triplete.

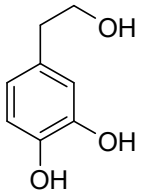


Figura 2.22. Estructura del compuesto **5** (hidroxitirosol).

El hidroxitirosol al igual que el tirosol, es un compuesto fenólico simple que se aisló por primera vez del árbol del olivo (*Olea europea*), se concentra principalmente en las hojas, pero también se puede encontrar en el fruto (oliva o aceituna), por lo tanto, el hidroxitirosol se encuentra en el aceite de oliva virgen y extra virgen (no en el resto de los aceites porque se elimina con el refinado). Este compuesto, tanto en su forma libre como en su forma esterificada (oleuropeína), es responsable del sabor amargo, astringente y picante del fruto crudo y del aceite de oliva virgen y extra virgen (Visioli, 2011). De manera general, el hidroxitirosol, tirosol y la oleuropeína son fenoles hidrofílicos exclusivos del aceite de oliva virgen y extra virgen, es decir, representan una clase de metabolitos secundarios inusuales ya que sus propiedades sensoriales y saludables a diferencia de los fenoles lipofílicos (tocoferoles y tocotrienoles) no se encuentran en otros aceites y grasas (Servili *et al*., 2014).

Sin embargo, a pesar de estar presente solamente en un tipo de aceite, este compuesto ha sido aislado en otras especies vegetales de diferentes familias, principalmente de las hojas, por ejemplo: *Alternanthera littoralis* (Amaranthaceae) y *Brachylaena discolor* (Asteraceae). La primera es una planta herbácea distribuida en África a lo largo de la costa atlántica desde Senegal hasta Angola y en América del sur principalmente en Brasil y sus hojas son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades infecciosas e inflamatorias. La segunda es un arbusto o árbol pequeño que se encuentra distribuido principalmente en la parte sur de África; sus raíces y hojas se utilizan para el tratamiento del dolor de estómago, la tuberculosis y la diabetes (Monjane *et al*., 2018; Koolen *et al*., 2017). En cuanto al estudio de la especie *Aphelandra scabra*, este es el primer reporte de la presencia del hidroxitirosol en la planta.

Tanto el hidroxitirosol como el tirosol se sintetizan endógenamente en el cuerpo humano como subproductos del metabolismo de la dopamina y la tiramina, respectivamente. El hidroxitirosol también se puede obtener por hidrólisis progresiva de la oleuropeína después de ser absorbida en el tracto gastrointestinal (Rodríguez-Morató *et al*., 2016). El hidroxitirosol es un compuesto que destaca por sus múltiples efectos biológicos principalmente por su gran propiedad antioxidante, siendo incluso superior a la de la vitamina E, ayuda a la prevención de enfermedades cardiovasculares, metabólicas y en algunos tipos de cáncer (mama, colon y piel), también posee propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias. Por lo tanto, el consumo de alimentos como el aceite de oliva extra virgen y el vino puede ayudar a tener una mejor calidad de vida (Bulotta *et al*., 2014; Servili *et al*., 2014; Bouallagui *et al*., 2011).

También se han realizado algunos estudios para conocer su actividad frente a algunas especies de *Leishmania*, por ejemplo: Kyriazis *et al*. (2013) publicaron un artículo donde evaluaron la actividad del hidroxitirosol aislado de las aguas residuales resultantes de la producción del aceite de oliva contra promastigotes y amastigotes de *L. infantum*, *L. donovani* y *L. major*. Los resultados mostraron que este compuesto fue medianamente activo contra la especie *L. infantum* con un CI_{50} = 32.9 µg/mL, también tuvo actividad contra los amastigotes intracelulares de la misma especie con un CI_{50} = 38.7 µg/mL y una CC_{50} = 180 µg/mL contra macrófagos J774A.1 con un índice de selectividad (IS) = 4.65.

Otro trabajo menciona la evaluación de 20 derivados a partir de hidroxitirosol, entre los cuales el compuesto nombrado como decanoato de hidroxitirosol resultó ser el más activo, mostrando un 54% de inhibición contra amastigotes axénicos a una concentración de 20 µM, una CI_{50} = 8.44 µM y un IS = 8.4 contra amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Parece que la adición de un grupo éster de ácido graso al hidroxitirosol mejora su actividad y que la longitud óptima de la cadena alquilo debe ser entre 10 y 12 átomos de carbono, ya que actúan como detergentes que destruyen la membrana del parásito, al menos contra la especie de *Leishmania* mencionada (Belmonte-Reche *et al*., 2016).

2.3.6. Identificación del compuesto 6 (ASH-28P1)

El compuesto **6** (6 mg) tiene una textura acaramelada y es soluble en piridina. Tiene un R_f = 0.6 en CCD de fase reversa con el sistema H_2O/ACN (7:3). En el análisis por HPLC descrito previamente en Materiales y Métodos este compuesto presentó un t_R = 8.7 min.

En el espectro de RMN-^{1}H (600 MHz, piridina-d_5, Figura 2.23) nuevamente se observa la presencia de tres protones aromáticos con señales a δ 8.41 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 8.12 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.2 Hz, H-4) y 7.38 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-3). La primera señal se asignó al protón unido al C-6 debido a su desplazamiento a campo bajo por su proximidad a un grupo carboxilo, además, presenta una constante de acoplamiento en posición *meta* con el protón H-4. El desplazamiento a δ 7.38 se asignó al H-3, basado en el hecho de que es un doblete y está acoplado en posición *orto* con el protón H-4, el cual a su vez presenta un acoplamiento en posición *orto* y *meta* con los protones H-3 y H-6. Las señales a δ 7.51 (dd, *J* = 4.7, 15.5, H-10) y 6.72 (dd, *J* = 1.9, 15.5, H-9) corresponden a protones en posición *trans* de un doble enlace perteneciente a una cadena alifática esterificada. La señal a δ 4.52 (1H, m, H-11) es de un protón unido a un grupo hidroxilo en el mismo carbono. Finalmente, las señales a δ 1.77 (2H, q, *J* = 7.3

Hz, H-12) y 1.08 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, H-13) corresponden a un grupo metileno (-CH_2) y un grupo metilo terminal (-CH_3), respectivamente. La correlación entre los protones (H-3/H-4), (H-9/H-10), (H-10/H-11) y (H-12/H-13) se pudo comprobar usando el experimento gCOSY.

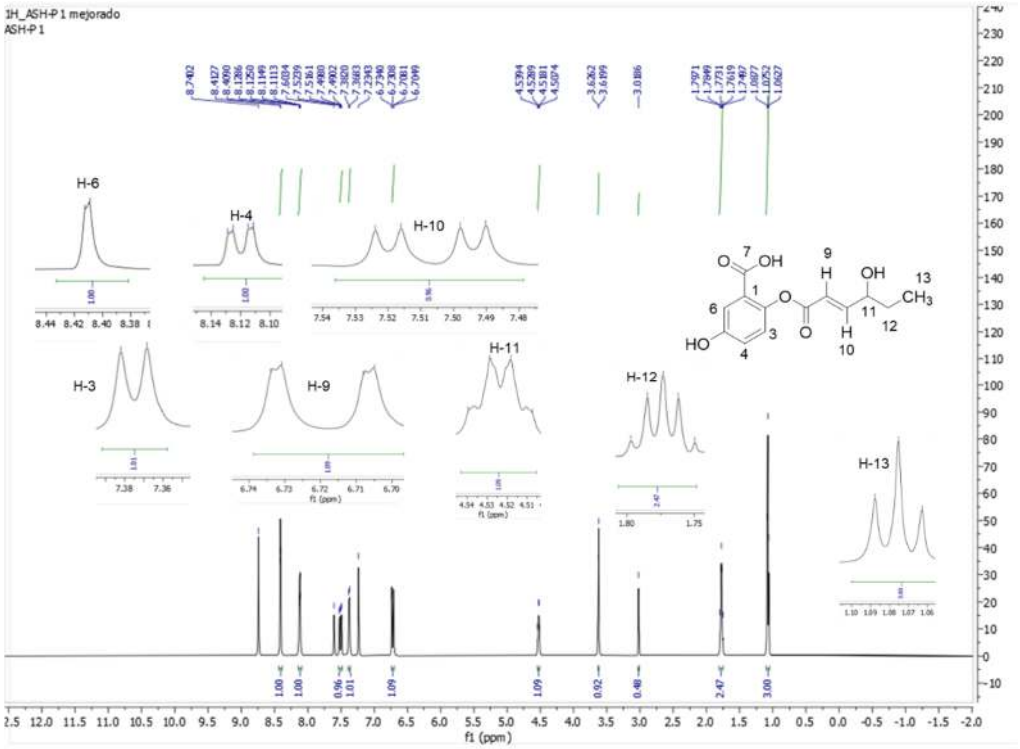


Figura 2.23. RMN-^{1}H (600 MHz en piridina-d_5) del compuesto **6** (ASH-28P1).

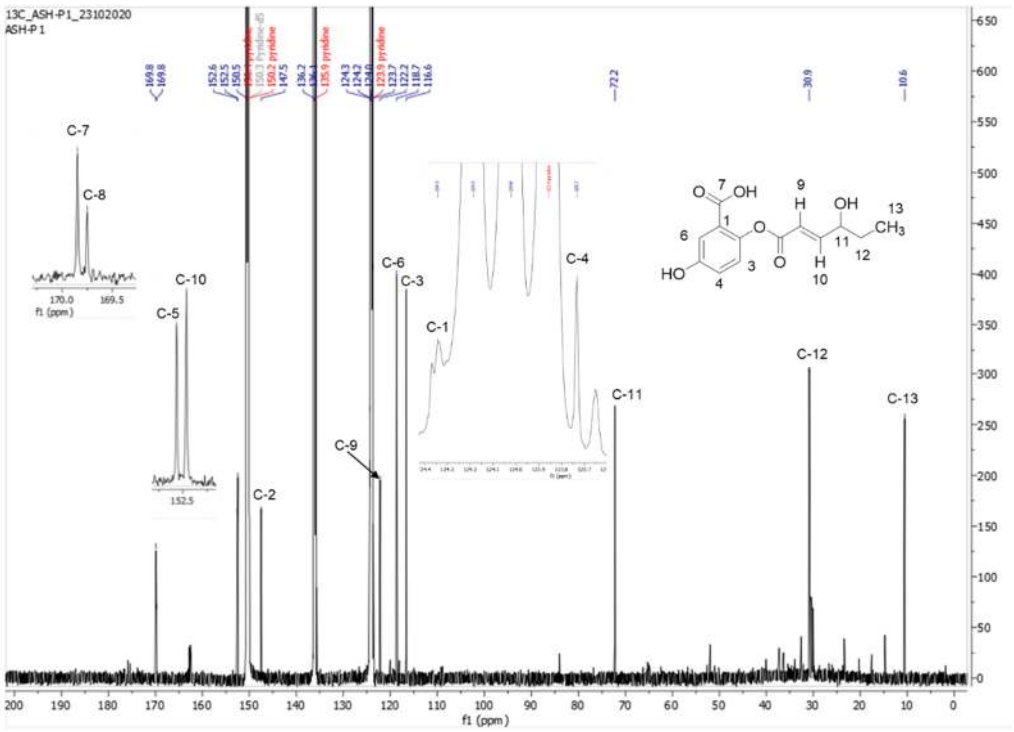


Figura 2.24. RMN-^{13}C (150 MHz en piridina-d_5) del compuesto **6** (ASH-28P1).

En el espectro de RMN-^{13}C (150 MHz en piridina-$d_{5)}$ Figura 2.24) se aprecian 13 señales. La primera señal a δ 10.6 (C-13) confirma la presencia de un grupo metilo terminal (-CH_3). La siguiente señal a δ 30.9 (C-12) fue asignada a un grupo metileno (-CH_2), el cual se confirmó con ayuda del experimento DEPT-135. La señal a δ 72.2 (C-11) corresponde a un carbono alifático unido a oxígeno. También se observan tres señales de carbonos aromáticos cuaternarios a δ 122.2, 147.5 y 152.6 (los dos últimos enlazados a oxígeno). Además, se observó tres señales de metinos aromáticos a δ 116.6, 123.7 y 118.7 (C-3, C-4 y C-6, respectivamente). Así mismo, destacan dos señales a δ 122.2 y 152.5 que confirman la presencia de un doble enlace (C-9 y C-10) en la cadena alifática. Las señales a δ 169.8 y 169.7 pertenecen a un grupo carboxilo y a un grupo éster, respectivamente. Estas asignaciones quedaron finalmente establecidas por las correlaciones mutuas directas entre H-C observadas en el espectro gHSQC (Figuras 2.25 y 2.26).

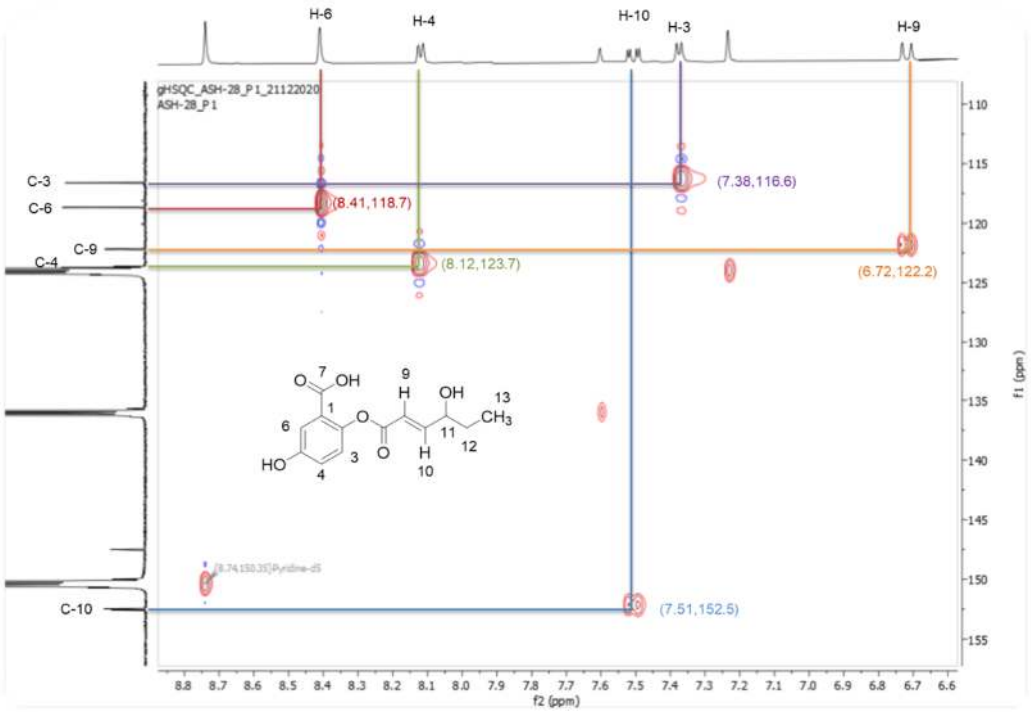


Figura 2.25. Ampliación del espectro gHSQC (anillo aromático y doble enlace) del compuesto **6** (ASH-28P1).

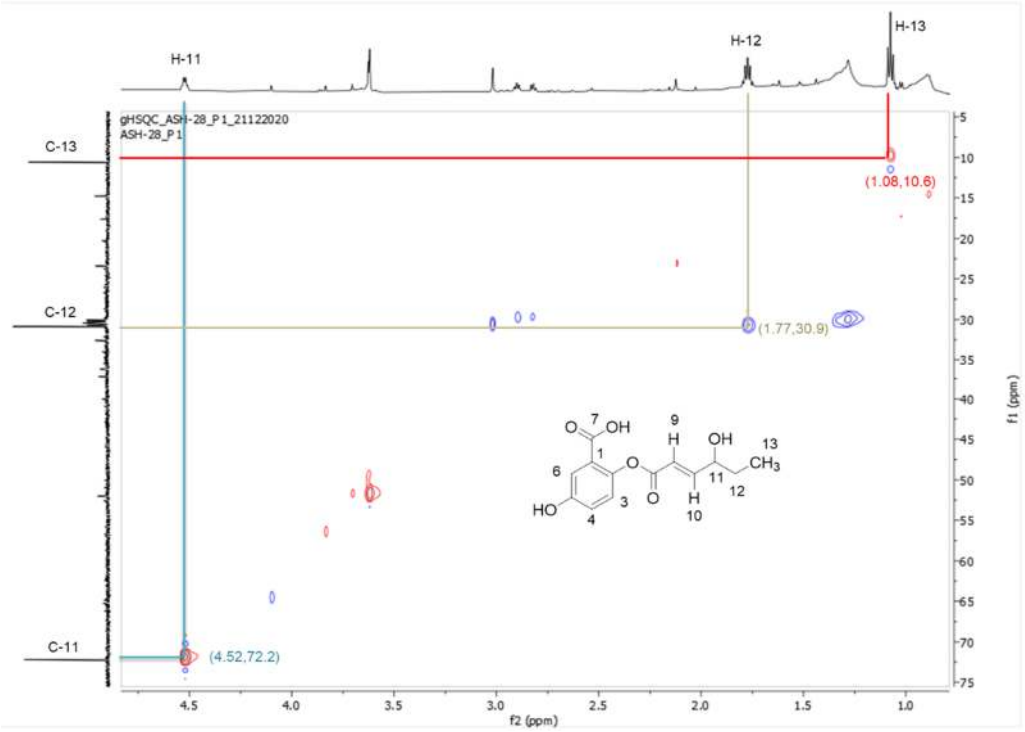


Figura 2.26. Ampliación del espectro gHSQC (final de la cadena esterificada) del compuesto **6** (ASH-28P1).

.

Los datos anteriores nos permiten sospechar que el compuesto ASH-28P1 se trata de un derivado del ácido benzoico con una cadena alifática esterificada (C-2) y un sustituyente hidroxilo (C-5). Para corroborar la estructura se analizaron las correlaciones a dos o tres enlaces H-C del espectro bidimensional gHMBC. En el anillo aromático se puede observar que H-6 correlaciona a dos enlaces con C-5 y a tres enlaces con C-2, C-4 y C-7. El protón H-4 correlaciona a dos y tres enlaces con C-5 y C-6, respectivamente, y H-3 correlaciona a dos enlaces con C-2 y a tres con C-1 y C-5 (Figura 2.27). En la parte final de la cadena alifática el protón H-12 correlaciona a dos enlaces con C-11 y C-13. Finalmente, H-13 correlaciona a dos y tres enlaces con C-12 y C-11, respectivamente (Figura 2.28). La asignación espectroscópica total del compuesto **6** se muestra en la Tabla 2.7 y la estructura propuesta del compuesto **6** en la Figura 2.29.

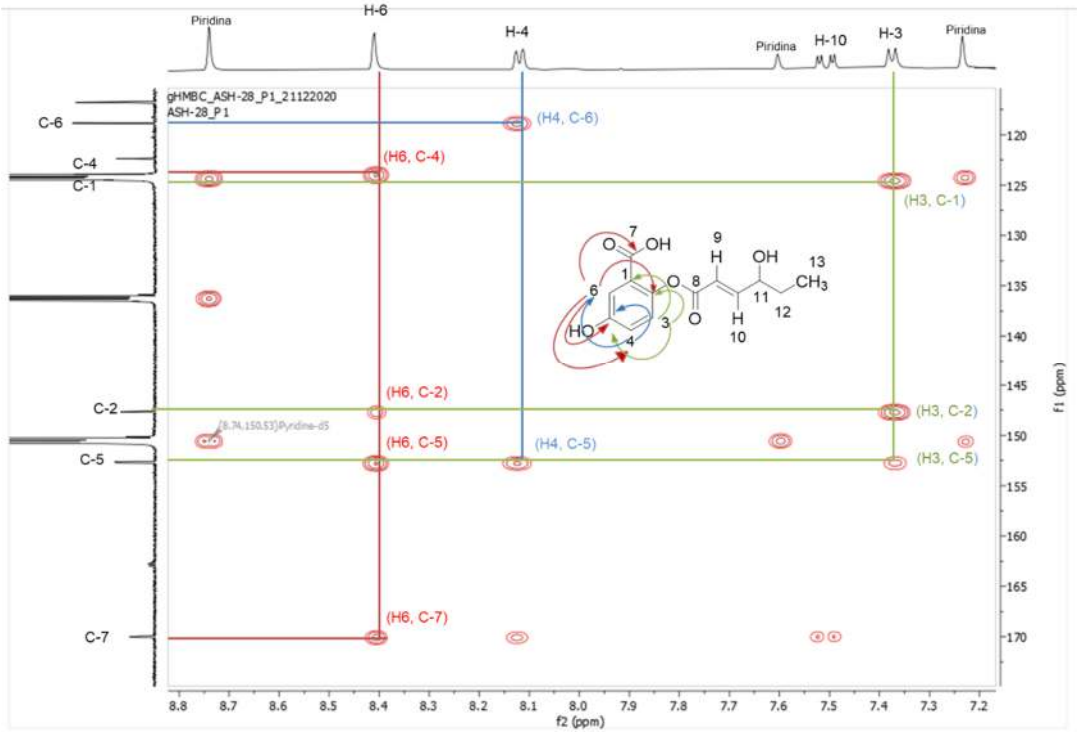


Figura 2.27. Ampliación del espectro gHMBC (anillo aromático) del compuesto **6** (ASH-28P1).

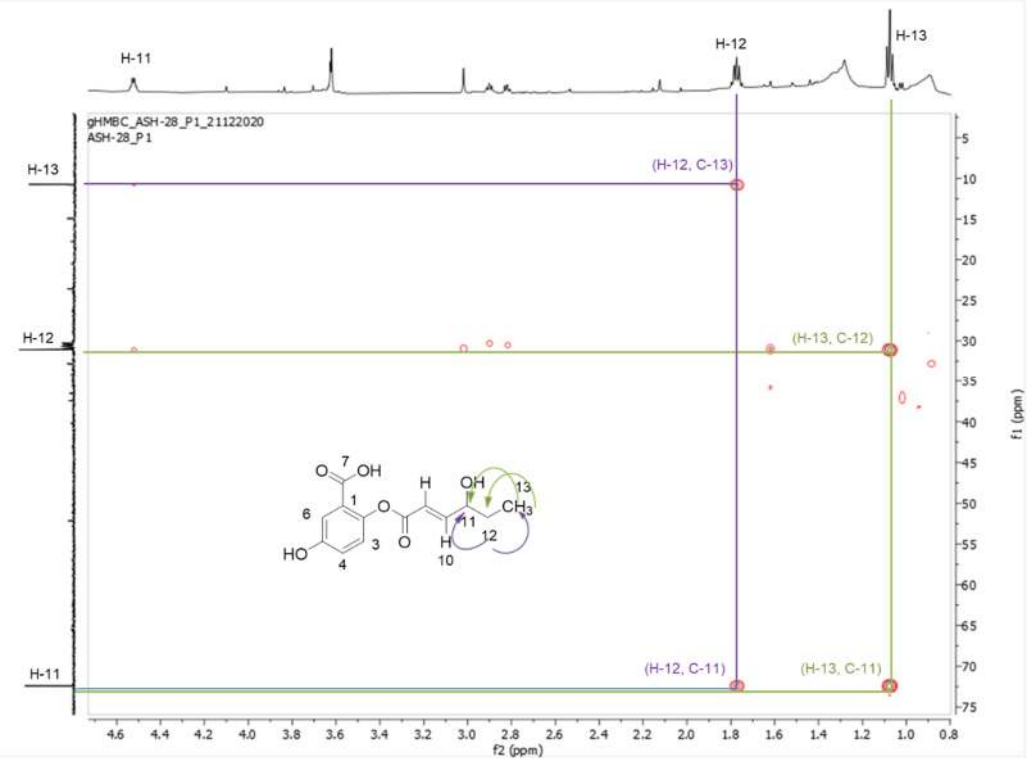


Figura 2.28. Ampliación del espectro gHMBC (final de la cadena alifática) del compuesto **6** (ASH-28P1).

Tabla. 2.7. Asignación espectroscópica de las señales de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **6** (ASH-28P1).

N°	RMN-^{1}H piridina-d_5 ASH-28P1 *J* (Hz)	RMN-^{13}C piridina-d_5 ASH-28P1	HMBC piridina-d_5 (600 MHz)
1	-	124.3	-
2	-	152.6	-
3	7.38 (d, 8.2 Hz, 1H)	116.6	C-1, C-5, C-2
4	8.12 (dd, 2.2, 8.2 Hz, 1H)	123.7	C-6, C-2, C7
5	-	147.5	-
6	8.41 (d, 2.2 Hz, 1H)	118.7	C-4, C-5, C-2, C-7
7	-	169.8	-
8	-	169.7	-
9	6.72 (dd, 1.9, 15.5 Hz, 1H)	122.2	C-11, C-8
10	7.51 (dd, 4.7, 15.5 Hz, 1H)	152.5	C-8, C-11
11	4.52 (m, 1H)	72.2	C-13, C-12, C-9, C-10
12	1.77 (q, 7.3 Hz, 2H)	30.9	C-13, C-11, C-10
13	1.08 (t, 7.5 Hz, 3H)	10.6	C-12, C-11

d = doblete, dd = doble-doblete, t = triplete, q = quintuplete, m = multiplete.

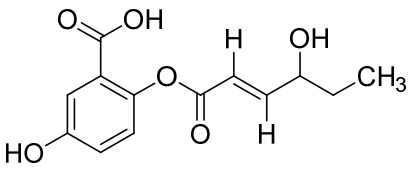


Figura 2.29. Estructura del compuesto **6** (ASH-P1).

Una búsqueda por SciFinder mostró que no existen datos en la literatura que confirmen la estructura y tampoco de su actividad biológica. Por lo tanto, se plantea que el compuesto **6** es un nuevo metabolito descubierto en las hojas de *A. scabra*. Falta realizar más estudios que confirmen esta teoría.

2.3.7. Identificación del compuesto 7 (ASH-28P3)

El compuesto **7** (15 mg) es un sólido de color café y es soluble en piridina. Tiene un R_f = 0.5 en CCD de fase reversa con el sistema H_2O/ACN (7:3).

En el análisis por HPLC descrito previamente en la sección de Materiales y Métodos, este compuesto presentó un t_R = 12.6 min. En el espectro de RMN-^{1}H (600 MHz, piridina-d_5, Figura 2.30) se observaron cinco señales a δ 8.18 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz, H-5), 8.10 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-3), 7.92 (1H, s, H-8), 7.32 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-6) y 3.83 (3H, s, H-7). La primera, segunda y cuarta señales corresponden a protones aromáticos debido a su desplazamiento y constantes de acoplamiento. El primer protón asignado fue H-5, el cual mostró acoplamientos en posición *orto* con H-6 y *meta* con H-3, lo que sugiere que hay sustituyentes en los carbonos C-1 y C-4. La señal a δ 7.92 (H-8) se asignó al protón de un doble enlace de una cadena alifática, en donde el carbono contiguo (C-9) está unido a un grupo carboxilo y un grupo hidroxilo. La última señal a δ 3.83 corresponde a protones de un grupo metoxilo. La correlación entre los protones (H-6/H-5) se comprobó con el experimento gCOSY.

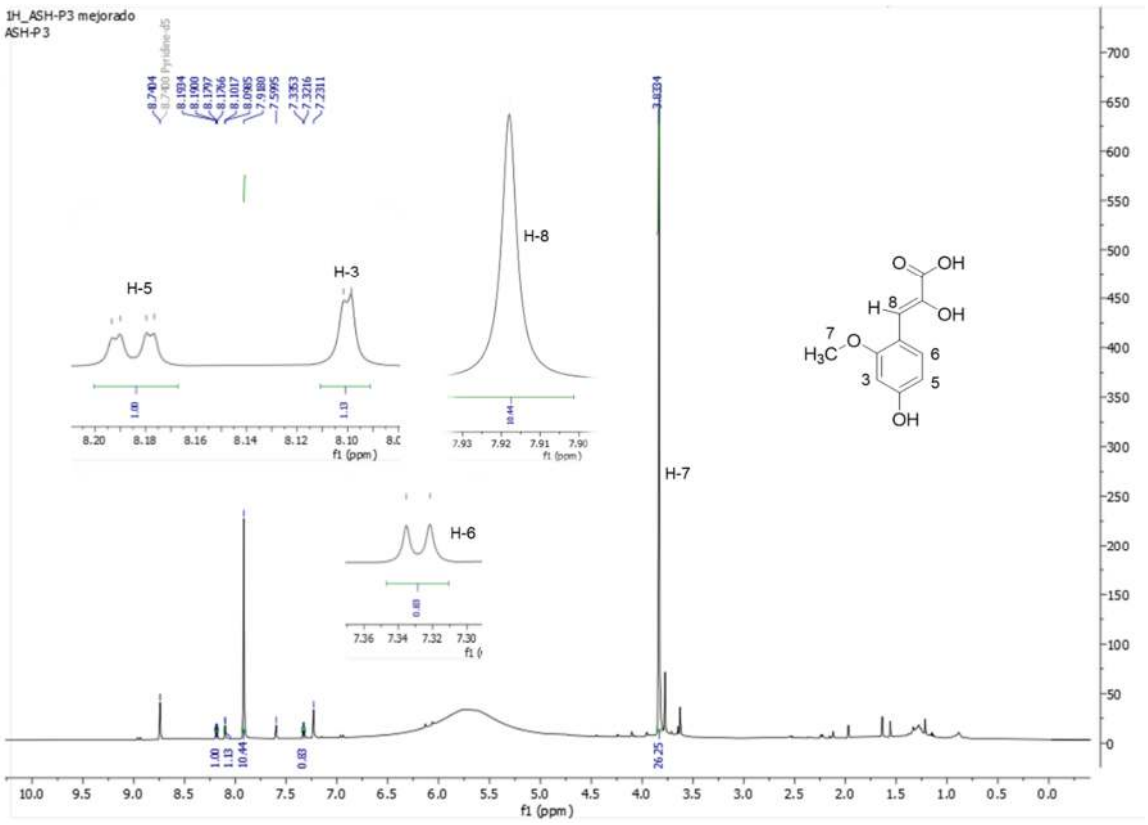


Figura 2.30. RMN-^{1}H (600 MHz en piridina-d_5) del compuesto **7** (ASH-28P3).

En el espectro de RMN-^{13}C (150 MHz en piridina-$d_{5)}$ Figura 2.31) se observaron 10 señales sobresalientes. La señal a δ 56.8 (C-7) pertenece a un grupo metoxilo (-OCH_3) unido al carbono C-2 del anillo aromático. Las señales a δ 108.9 (C-8) y 142.8 (C-9) corresponden a carbonos de un doble enlace de una cadena alifática unida al anillo aromático. También se pudo apreciar señales de metinos aromáticos a δ 114.3 (C-3), 116.7 (C-6) y 125.4 (C-5). Así mismo, se observaron tres señales de carbonos aromáticos cuaternarios a δ 122.6 (C-1), 149.2 (C-2) y 153.2 (C-4). La última señal a δ 169.7 se asignó a C-10 (-COOH). Estas asignaciones se establecieron por las correlaciones mutuas directas entre H-C observadas en el espectro gHSQC (Figura 2.32).

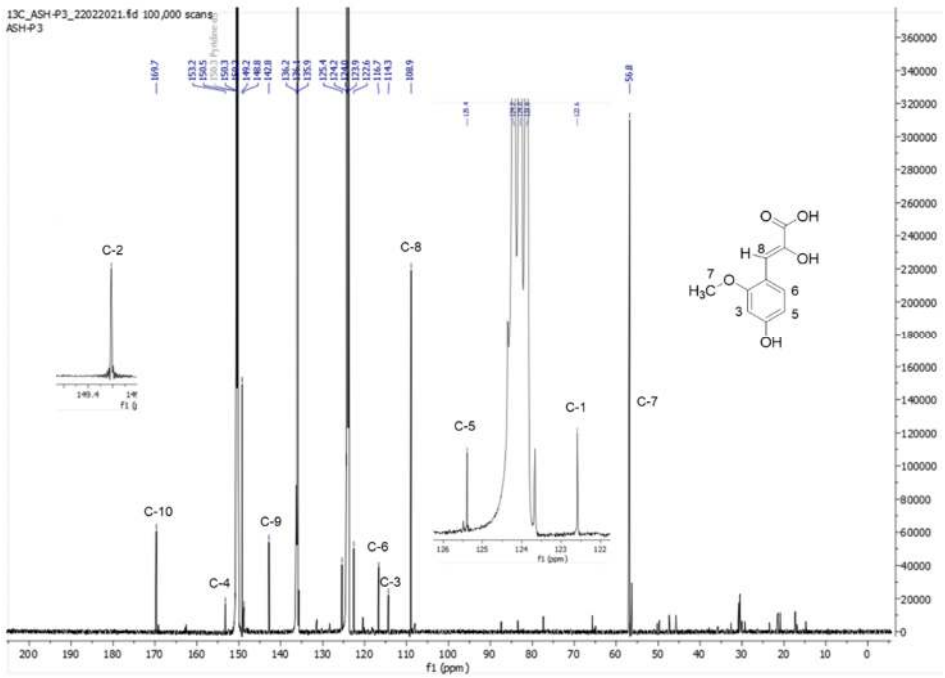


Figura 2.31. RMN-^{13}C (150 MHz en piridina-d_5) del compuesto **7** (ASH-28P3).

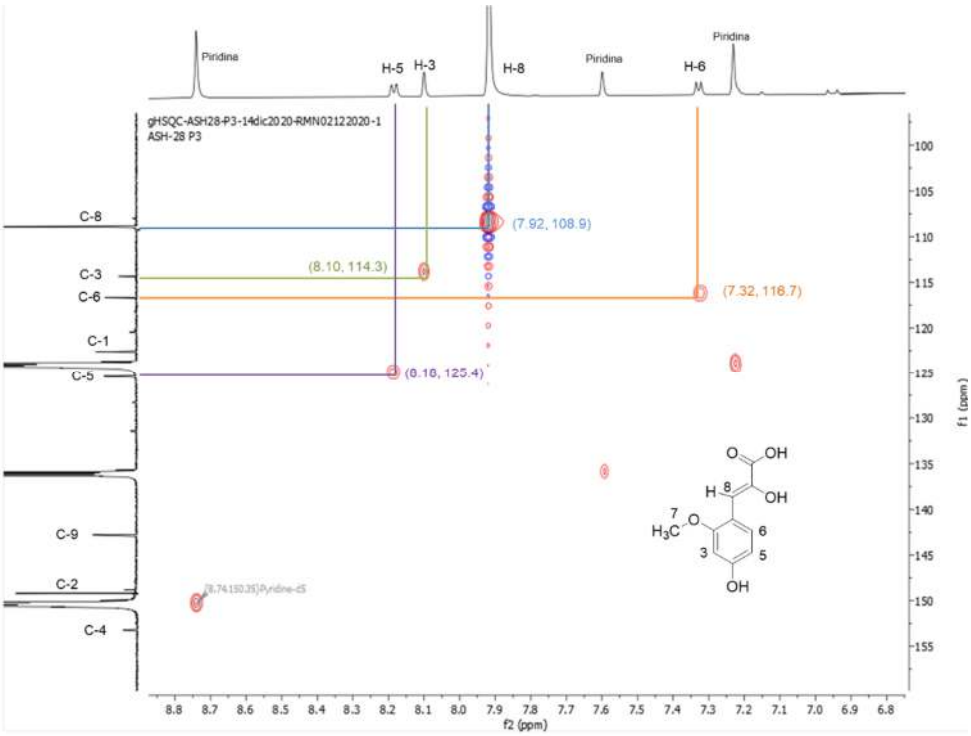


Figura 2.32. Ampliación del espectro gHSQC (anillo aromático) del compuesto **7** (ASH-28P3).

Después de analizar los datos espectroscópicos, el compuesto **7** (ASH-28P3) resultó ser un derivado del ácido cinámico con un grupo metoxilo (C-2) y dos grupos hidroxilo (C-4 y C-9). Para confirmar la estructura de este compuesto se analizaron las correlaciones a dos o tres enlaces H-C del espectro bidimensional gHMBC. En el anillo aromático se puede observar que H-3 correlaciona a dos y tres enlaces con C-4 y C-5 y el protón H-5 correlaciona a dos y tres enlaces con C-4 y C-3, respectivamente. El protón H-6 correlaciona a tres enlaces con C-2. Finalmente, H-8 correlaciona a dos enlaces con C-1 y C-9 y a tres enlaces con C-2 y C-10 (Figura 2.33). La asignación espectroscópica total del compuesto **7** (ASH-28P3) se muestra en la Tabla 2.10 y la estructura propuesta para este compuesto se muestra en la Figura 2.34.

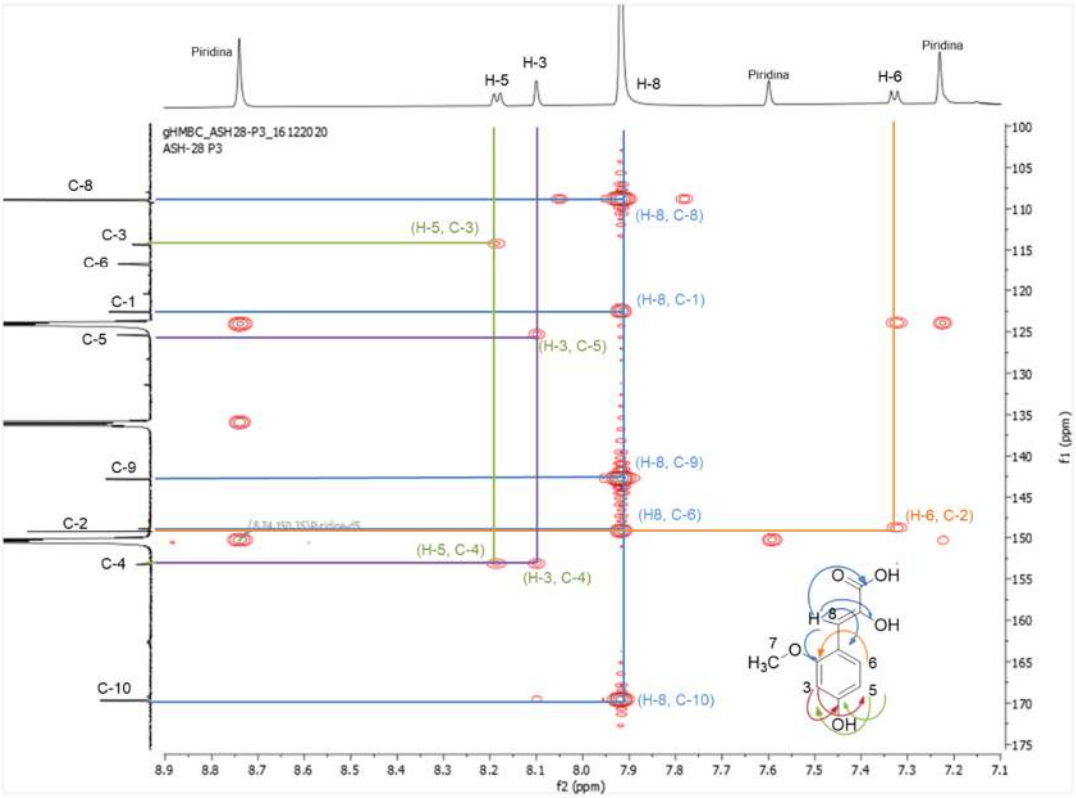


Figura 2.33. Ampliación del espectro gHMBC del compuesto **7** (ASH-28P3).

Tabla. 2.8. Asignación espectroscópica de las señales de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C del compuesto **7** (ASH-28P3).

N°	^{1}H-RMN piridina-d_5 ASH-28P1 *J* (Hz)	^{13}C-RMN piridina-d_5 ASH-28P1	HMBC piridina-d_5 (600 MHz)
1	-	122.6	-
2	-	149.2	-
3	8.10 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H)	114.3	C-4, C-5
4		153.2	
5	8.18 (dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz, 1H)	125.4	C-4, C-5
6	7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H)	116.7	C-2
7	3.83 (s, 3H)	56.8	C-2
8	7.92 (s, 1H)	108.9	C-1, C-2, C-9, C-10
9	-	142.8	-
10	-	169.7	-

d = doblete, dd = doble-doblete, s = singulete.

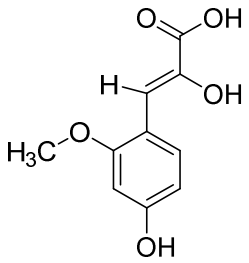


Figura 2.34. Estructura del compuesto **7** (ASH-28P3).

No existen datos en la literatura que confirmen la estructura y tampoco de su actividad biológica. Por lo tanto, se propone que el compuesto **7** también es un metabolito nuevo descubierto en las hojas de *A. scabra*. Falta realizar más estudios que confirmen esta teoría.

CAPÍTULO III

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Dorstenia contrajerva*

3.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describe el aislamiento y la identificación de los metabolitos secundarios conocidos como cicloartocarpesina (**C**) y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**G**), previamente aislados de los rizomas de *Dorstenia contrajerva* con actividad *in vitro* contra promastigotes de *Leishmania mexicana*. Para la obtención de estos compuestos se realizó un fraccionamiento y purificación del extracto metanólico de los rizomas de la especie vegetal en estudio, aplicando diversas técnicas cromatográficas. La identificación de los metabolitos se llevó a cabo por medio de HPLC, HPTLC y RMN.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Materiales y equipos en general

Los disolventes utilizados para el fraccionamiento del extracto crudo fueron de grado industrial y de distinta polaridad, destilados en el Laboratorio de Química Orgánica de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY. Para el secado de las fracciones se empleó un evaporador rotatorio Büchi (R-300) con baño maría a 40 °C.

Para el aislamiento de los compuestos de interés se utilizó cromatografía líquida al vacío (CLV), cromatografía de columna por gravedad (CCG), cromatografía flash (Sepacore®) y cromatografía de exclusión molecular. Las fases estacionarias empleadas en las diversas columnas fueron las siguientes: gel de sílice 60Å de 70-230 mallas (Sigma-Aldrich), gel de sílice 60Å de 230-400 mallas (Sigma-Aldrich) y Sephadex LH-20.

*El contenido de este capítulo fue publicado en el artículo "*Antileishmanial activity of Dorstenia contrajerva against amastigotes of Leishmania mexicana*". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2021**, *31*, 481-485. Autores: Ana G. Carrillo-Aké, Luis W. Torres-Tapia, José Delgado-Domínguez, Rocely B. Cervantes-Sarabia, Ingeborg Becker, Marina Vera-Ku, Sergio R. Peraza-Sánchez. Enviado: *18 de febrero de 2021.* Aceptado: *19 de Julio de 2021*. Publicado en línea: 3 de noviembre de 2021.

El monitoreo de los compuestos se llevó a cabo por CCD de gel de sílice 60Å GF_{254} (2-25 µm, Merck) y placas de HPTLC 60 PF_{254} (Merck). Para la visualización y detección de los compuestos se utilizó un gabinete de luz ultravioleta (UV) de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm). Seguidamente, las placas se revelaron impregnándolas con una disolución de ácido fosfomolíbdico (20 g de ácido fosfomolíbdico y 2.5 g de sulfato cérico en 500 mL de H_2SO_4 al 5%) y posterior calentamiento. También se utilizó una disolución de óleum (20 mL de H_2SO_4 y 80 mL de agua en 400 mL de ácido acético glacial + 100 mg de vainilla).

La identificación de los metabolitos se llevó a cabo por medio de los siguientes instrumentos:

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se empleó un equipo de Agilent Technologies 1260 con una columna analítica C-18 (Grace, Altima, 25 cm × 4.5 mm × 5 µm). Una mezcla de MeOH:ACN se utilizó para trabajar en el equipo empezando con MeOH (100%) durante 2 min, luego una rampa de 3 min hasta llegar a 80:20 durante 10 min, posteriormente otra rampa de 3 min para llegar a 60:40, la cual se mantuvo durante 5 min, a continuación, siguió otra rampa de 2 min para llegar a 40:60 por 5 min, después continuó una rampa de 2 min hasta llegar a 20:80 y se mantuvo por 5 min; finalmente, se agregó una rampa de 3 min para alcanzar 100% de ACN, la cual duró 5 min y se alcanzaron las condiciones iniciales en otros 5 min. El tiempo final de la corrida fue de 50 min y se empleó un flujo de 1 mL/min. Los disolventes utilizados fueron de grado HPLC, previamente filtrados (Millipore 0.22 µm, Merck) y desgasificados por 40 min antes de ser usados.

Cromatografía de capa delgada de alta resolución (HPTLC)

Se utilizó un aplicador (CAMAG, Linomat 5) para aplicar las muestras en las placas de HPTLC. Una cámara de revelado automático (CAMAG, ADC 2) fue usada para correr las muestras. Las placas de HPTLC se sumergieron en disoluciones de ácido fosfomolíbdico y óleum con ayuda de un equipo (CAMAG, Chromatogram Immersion Device III). Se usó un dispositivo (CAMAG, calentador TLC III) para calentar las placas de HPTLC. Para registrar los diferentes metabolitos se utilizó un visualizador (CAMAG, TLC Visualizer 2).

Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-^{1}H) fueron obtenidos en un espectrómetro Varian® Direct Drive de 600 MHz (Palo Alto, California, Estados Unidos) del

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Unidad Mérida.

3.2.2. Material vegetal

La obtención del extracto metanólico de los rizomas de *D. contrajerva* se realizó en un estudio anterior en la Unidad de Biotecnología del CICY (Peniche-Pavía, 2016). Por lo tanto, se trabajó directamente con parte de este material para el aislamiento de los compuestos de interés.

3.2.3. Partición líquido-líquido del extracto metanólico de *D. contrajerva*

Se fraccionaron 500 g del extracto metanólico de los rizomas de *D. contrajerva* (DCR-1a) por partición líquido-líquido, empleando disolventes de polaridad ascendente: hexano (Hx), diclorometano (CH_2Cl_2) y acetato de etilo (AcOEt). El proceso realizado fue similar al efectuado con el extracto crudo de las hojas de *A. scabra*. En total se obtuvieron cuatro fracciones: fracción hexánica (DCR-2a), diclorometánica (DCR-2b), de acetato de etilo (DCR-2c) y acuosa (DCR-2d); el peso de cada fracción se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Peso y rendimiento de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido de DCR-1a.

Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
DCR-2a	28.3	5.6
DCR-2b	44.0	8.8
DCR-2c	19.0	3.8
DCR-2d	N/D	N/D

El rendimiento es con base en el extracto metanólico (512 g).
N/D: no determinado.

Posteriormente, cada una de las fracciones de la Tabla 3.1se monitorearon por CCD junto con los estándares de referencia de la cicloartocarpesina y el 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol. En la fracción hexánica (DCR-2a) se observó la presencia de los compuestos de interés, por lo tanto, se continuó trabajando con esta fracción (Figura 3.1).

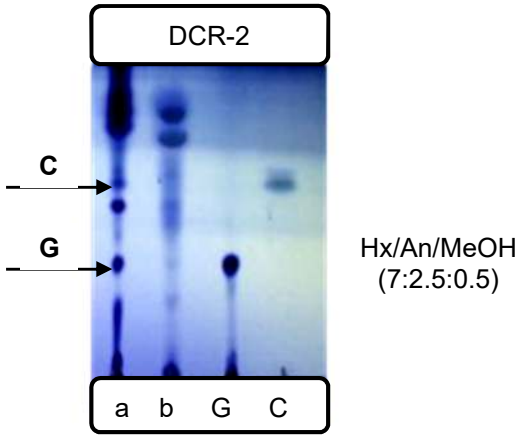


Figura 3.1. Monitoreo de las fracciones DCR-2a y DCR-2b.cicloartocarpesina (**C**) y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**G**).

3.2.4. Cromatografía líquida al vacío de la fracción hexánica (DCR-2a)

Se utilizaron 25.5 g de DCR-2a y se procesaron en una columna de 6 cm de Ø y 16 cm de largo, empacada con gel de sílice de 230-400 mallas hasta una altura de 6 cm. El volumen empleado para cada sistema fue de 250 mL. En total se aplicaron 10 sistemas de disolventes: 1) Hx/CH_2Cl_2 (30:70), 2) CH_2Cl_2 (100), 3) Hx/An (70:30), 4) Hx/An (50:50), 5) CH_2Cl_2/An (70:30), 6) Hx/An/MeOH (70:25:05), 7-8) An (100) 2×, 9-10) An/MeOH (50:50) 2×. Después cada una de estas fracciones se monitoreó en CCD junto con los estándares de referencia de los compuestos de interés (Figura 3.2). Al final se reunieron en seis fracciones de acuerdo al parecido en su perfil cromatográfico, etiquetadas como DCR-3a hasta DCR-3f. El peso de cada fracción se muestra en la Tabla 3.2.

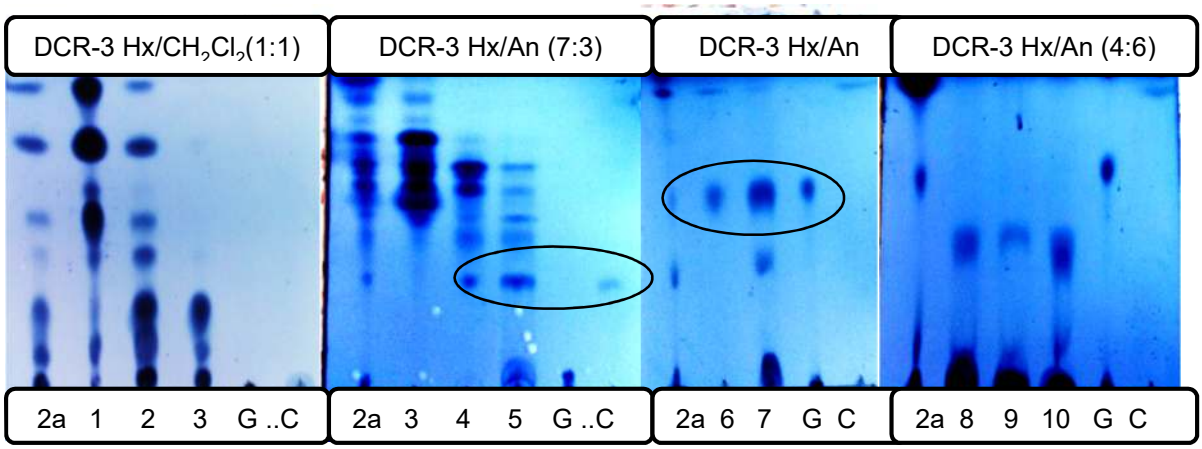


Figura 3.2. Placa cromatográfica de las fracciones obtenidas por CLV de DCR-2a. Galactolípido (**G**), cicloartocarpesina (**C**).

Tabla 3.2. Peso de las fracciones reunidas de la CLV de DCR-2a.

Fracción	Peso (g)
DCR-3a (1-2)	10.8
DCR-3b (3)	2.5
DCR-3c (4-5)	6.1
DCR-3d (6)	0.8
DCR-3e (7)	1.1
DCR-3f(8-9-10)	2.6
Total	23.9

Las fracciones seleccionadas para continuar trabajando fueron DCR-3c, DCR-3d y DCR-3e, debido a que mostraron en CCD la presencia de los metabolitos que se desean aislar.

3.2.5. Aislamiento de los metabolitos activos de DCR-2a

Los metabolitos reportados con actividad leishmanicida *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* son: la cicloartocarpesina (**C**) y el galactolípido 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**G**). Por lo tanto, sólo se describe el proceso de aislamiento e identificación de estos compuestos.

3.2.5.1. Aislamiento del compuesto 8 (DCR-6e1, cicloartocarpesina)

La fracción DCR-3c (6.0 g) fue sometida a una columna flash usando un equipo Sepacore®, gel de sílice (230-400 mallas) y una mezcla de disolventes: Hx/An (9:1), Hx/An (8:2), Hx/An (7:3), Hx/An (1:1) y An/MeOH (1:1). En total, se reunieron nueve fracciones de DCR-4a hasta DCR-4i.

Posteriormente, las fracciones DCR-4f (320 mg) y DCR-4h (190 mg) se reunieron y se procesaron nuevamente en la columna flash (Sepacore®), empacada con gel de sílice grado TLC. La elución se realizó en gradiente empezando con una mezcla de Hx/AcOEt (8:2), Hx/AcOEt (7.5:2.5), Hx/AcOEt (7:3), Hx/AcOEt (6:4) y lavados con An/MeOH (8:2). Al final, se reunieron cinco fracciones de acuerdo a su perfil cromatográfico etiquetadas como DCR-5a hasta DCR-5e.

La fracción DCR-5b (23.5 mg) se sometió a una cromatografía en columna por exclusión molecular empacada con Sephadex LH-20 y como eluyente se usó MeOH 100%. La fracción DCR-6e (6.7 mg) mostró la presencia de una sola mancha con un R_f = 0.21 en el sistema CH_2Cl_2/An (9:1, 2×) y un R_f = 0.37 en el sistema CH_2Cl_2/An (8:2) al igual que el estándar de la cicloartocarpesina. El diagrama de aislamiento se muestra en la Figura 3.3.

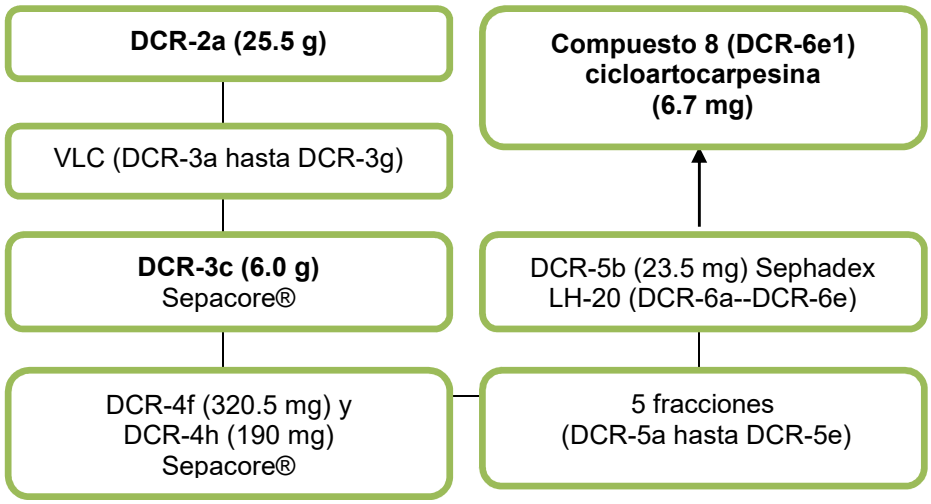


Figura 3.3. Diagrama de aislamiento del compuesto **8** (cicloartocarpesina).

Compuesto 8 (DCR-6e1, cicloartocarpesina): $C_{20}H_{16}O_6$. Sólido amarillo en forma de agujas. R_f = 0.21 en el sistema CH_2Cl_2/An (9:1, 2×) y 0.37 en el sistema CH_2Cl_2/An (8:2).

3.2.5.2. Aislamiento del compuesto 9 (DCR-9c1, 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol)

La fracción DCR-3e (1.4 g) se sometió a una CCG empacada con gel de sílice (70-230 mallas) y la elución fue de manera isocrática utilizando acetona 100%. En total se reunieron seis fracciones de acuerdo al patrón de manchas observadas en CCD etiquetadas como DCR-7a hasta DCR-7e.

La fracción DCR-7c (554 mg) mostró en CCD la presencia del compuesto 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol, por lo tanto, esta fracción se sometió a una CCG utilizando gel de sílice de 70-230 mallas y una mezcla de disolventes empezando con Hx/An (1:1), Hx/An (3:7), An 100% y lavados con An/MeOH (8:2). Al final, se reunieron cinco fracciones etiquetadas como DCR-8a hasta DCR-8e.

En las fracciones DCR-8b y DCR-8d (155 mg) se observó la presencia del galactolípido con algunas impurezas, por lo que se decidió limpiarlo por medio de una CCG empacada con gel de sílice flash (230-400 mallas) y una elución de manera isocrática con el sistema Hx/An (6:4). Los tubos 27 a 32 se reunieron para formar la fracción DCR-9c (52.2 mg) donde se obtuvo el compuesto **9**, esto se determinó al compararlo con el estándar de referencia (**G**) (Figura 3.4). El diagrama de aislamiento se presenta en la Figura 3.5.

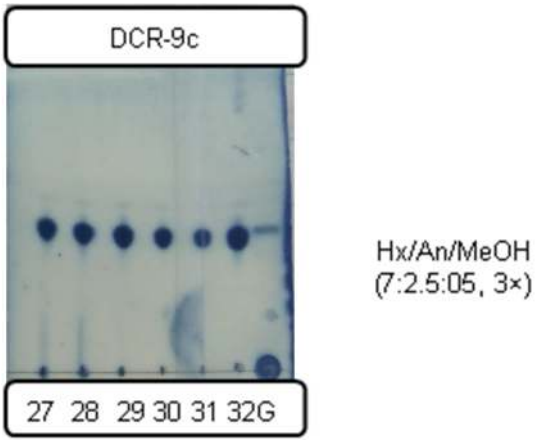


Figura 3.4. Monitoreo de los tubos 27 a 32 del experimento 9 de *D. contrajerva*. 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**G**).

.

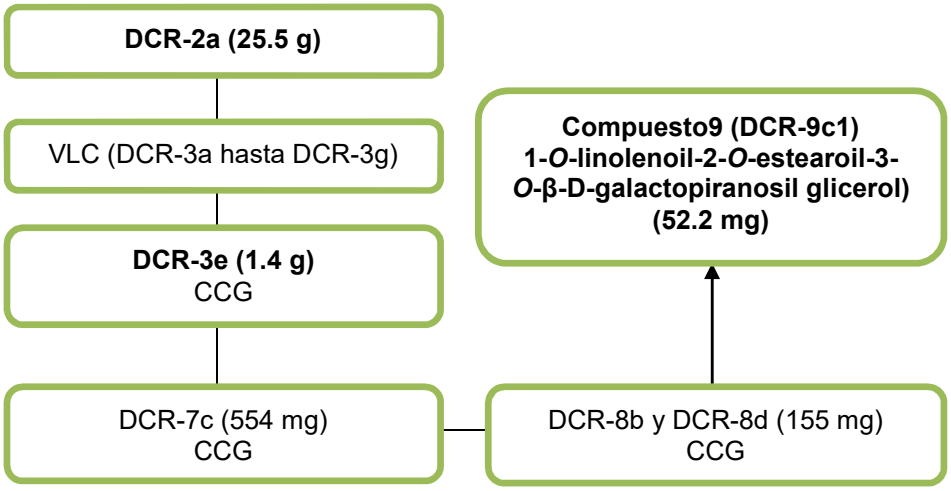


Figura 3.5. Diagrama de aislamiento del compuesto **9** (1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol).

Compuesto 9 (DCR-9c1, 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol): $C_{45}H_{80}O_{10.}$ Sólido de color blanco. R_f = 0.3 en el sistema Hx:An (3:2) y 0.4 en el sistema Hx/An/MeOH (7:2.5:0.5, 3×).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Identificación del compuesto 8 (DCR-6e1, cicloartocarpesina)

El compuesto **8** es un sólido amarillo en forma de agujas y es soluble en acetona y metanol. Tiene un R_f = 0.21 en el sistema CH_2Cl_2/An (9:1, 2×) y 0.37 en el sistema CH_2Cl_2/An (8:2). Es visible bajo luz UV a 254 y 365 nm. La identificación de este metabolito se realizó mediante un análisis de HPLC, inyectando el compuesto **8** bajo las condiciones descritas en la sección de Materiales y Métodos junto con el estándar de referencia cicloartocarpesina (**C**) que se tiene en el laboratorio y que fue obtenido de un trabajo anterior. El tiempo de retención registrado para ambos metabolitos fue t_R = 3.780 min (Figura 3.6).

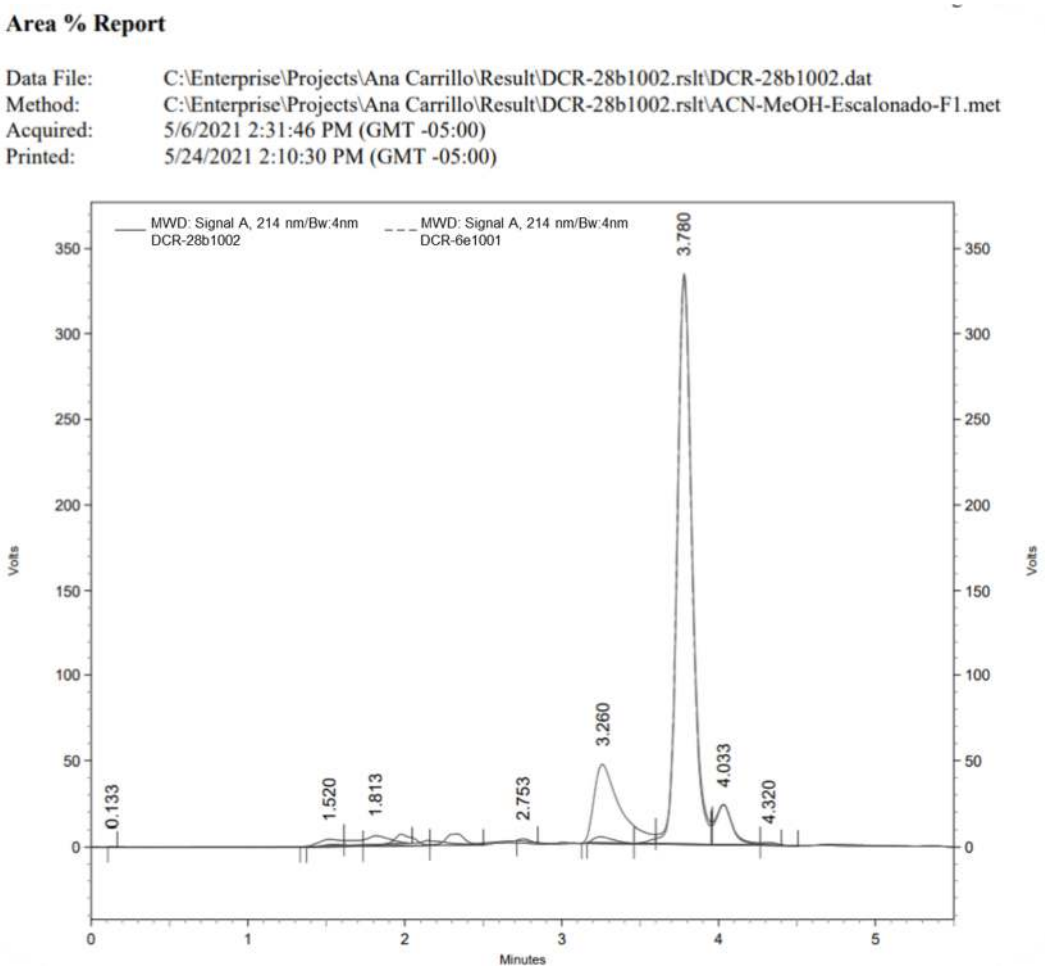


Figura 3.6. Cromatograma de HPLC del compuesto **8** y la cicloartocarpesina. — DCR-28b1 (referencia de la cicloartocarpesina), --- DCR-6e1 (compuesto **8**), ambos con un t_R = 3.780 min.

El resultado anterior nos permitió confirmar que el compuesto **8** (DCR-6e1), efectivamente es la cicloartocarpesina previamente aislada e identificada de los rizomas de *D. contrajerva* con actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* (Peniche-Pavía *et al*., 2016).

3.3.2. Identificación del compuesto 9 (DCR-9c1, 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol)

El compuesto **9** es un sólido blanco parecido a una cera y es soluble en CH_2Cl_2. Tiene un R_f = 0.46 en el sistema Hx/An/MeOH (7:2.5:0.5). No es visible bajo luz UV de onda corta ni larga. La identificación de este metabolito se llevó por RMN-^{1}H comparando las señales y datos espectroscópicos con lo reportado en la literatura.

En el espectro de RMN-^{1}H (600 MHz, $CDCl_3$, Figura 3.7) se observaron 19 señales, empezando con un triplete terminal a δ 0.88 (6H, t, *J* = 6.3 Hz, H-18''/18'''), comprobando la presencia de dos cadenas de ácidos grasos. Otra señal característica fue a δ 5.35 (6H, m, 9'''-10'''/12'''-13'''/15'''-16''') que corresponde a protones de una cadena de ácido graso insaturado. También se pudo identificar la señal del protón anomérico de la galactosa a δ 4.26 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1'). Así mismo, resaltan las señales de la fracción del glicerol a δ 4.39 (1H, dd, *J* = 3.2, 12.1 Hz, H-1a), 4.20 (1H, dd, *J* = 6.7, 12.1 Hz, H-1b), 5.29 (1H, m, H-2), 3.92 (1H, d, *J* = 5.3 Hz, H-3a), 3.71 (1H, dd, *J* = 6.6, 11.3 Hz, H-3b). La asignación espectroscópica total se muestra en la Tabla 3.3. Con la comparación de las señales reportadas en la literatura y las señales observadas en el espectro de RMN-^{1}H se pudo concluir que el compuesto **9** (DCR-9c1) corresponde al galactolípido conocido como 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol, previamente aislado de los rizomas de *D. contrajerva* con actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* (Peniche-Pavía *et al*., 2016).

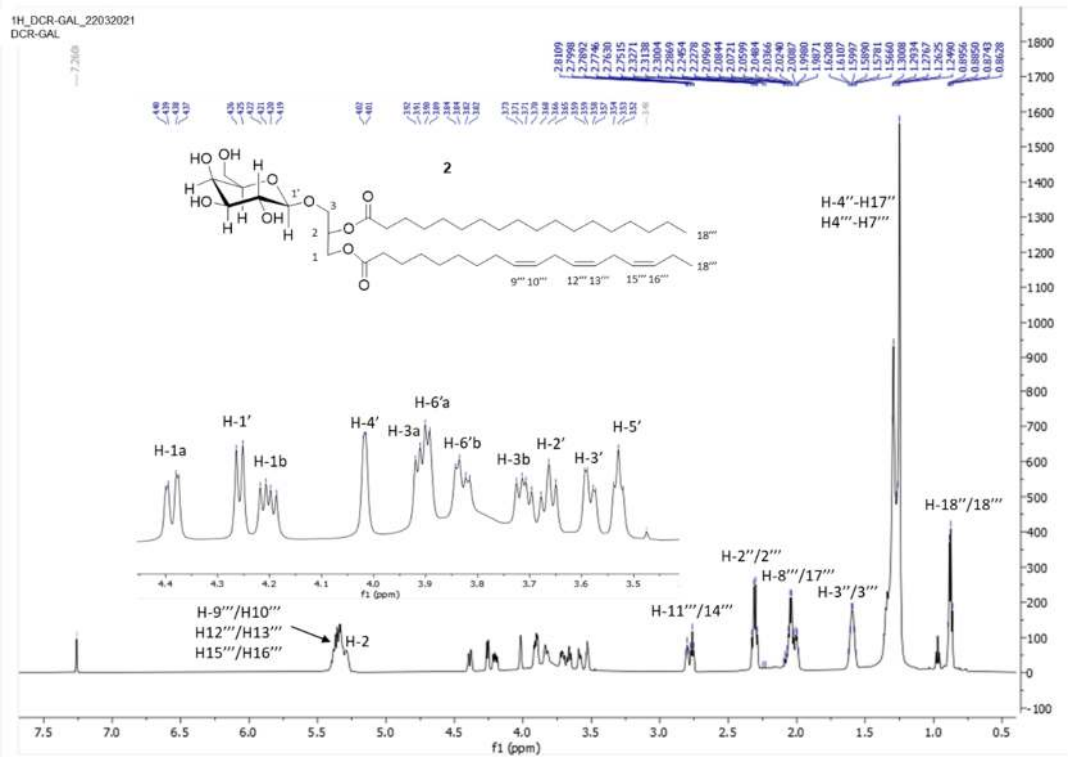


Figura 3.7. RMN-^{1}H (600 MHz en $CDCl_3$) del compuesto **9** (1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol).

Tabla. 3.3. Comparación de las señales observadas en RMN-^{1}H del compuesto **9** (DCR-9c1) con lo reportado en la literatura para el compuesto 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol.

N°	RMN-^{1}H $CDCl_3$ DCR-9c1 *J* (Hz)	RMN-^{1}H $CDCl_3$ (Manzo *et al.*, 2000)	RMN-^{1}H $CDCl_3$ (Jayaprakasam *et al.*, 2004)
1a	4.39 (dd, *J* = 2.4, 11.9, 1H)	4.39 (bd, *J* = 12.1, 1H)	4.30 (dd, *J* = 2.5, 12.0, 1H)
1b	4.20 (dd, *J* = 6.5, 11.9, 1H)	4.19 (dd, *J* = 4.3, 12.1, 1H)	4.11 (dd, *J* = 7.5, 11.0, 1H)
2	5.29 (m, 1H)	5.29 (m, 1H)	5.15 (m, 1H)
3a	3.92 (d, *J* = 5.0, 1H)	3.91 (m, 1H)	3.88 (dd, *J* = 5.5, 11.0, 1H)
3b	3.71 (dd, *J* = 6.4, 11.0, 1H)	3.71 (m, 1H)	3.64 (dd, *J* = 6.0, 11.0, 1H)
1’	4.26 (d, *J* = 7.4, 1H)	4.26 (d, *J* = 7.6, 1H)	4.10 (d, *J* = 7.0, 1H)
2’	3.66 (t, *J* = 9.1, 1H)	3.64 (m, 1H)	3.39 (d, *J* = 7.0, 10.0, 1H)
3’	3.58 (d, *J* = 8.8, 1H)	3.59 (m, 1H)	3.45 (dd, *J* = 7.5, 9.5, 1H)
4’	4.01 (s, 1H)	4.01 (bs, 1H)	3.77 (d, *J* = 2.5, 1H)
5’	3.53 (t, *J* = 4.7, 1H)	3.53 (m, 1H)	3.39 (d, *J* = 7.0, 10.0, 1H)
6’a	3.90 (d, *J* = 5.2, 1H)	3.86 (m, 1H)	3.71 (dd, *J* = 6.5, 12.0, 1H)
6’b	3.82 (d, *J* = 13.3, 1H)	3.86 (m, 1H)	3.66 (dd, *J* = 5.5, 13.0, 1H)
2’’/2’’’	2.31 (q, *J* = 7.9, 4H)	2.31 (m, 4H)	2.23 (t, *J* = 7.5, 4H)
3’’/3’’’	1.59 (m, 4H)	1.59 (m, 4H)	-
8’’’, 17’’’	2.03 (m, 4H)	2.07 (m, 4H)	1.97 (m, 4H)
(9’’’-10’’’) (12’’’-13’’’) (15’’’-16’’’)	5.32 (m, 6H)	5.41-5.30 (m, 6H)	5.24 (m, 6H)
11’’’, 14’’’	2.76 (t, *J* = 6.7, 4H)	2.81 (m, 4H)	2.70 (t, *J* = 6.0, 4H)
(4’’-17’’/ 4’’’-7’’’)	1.25-1.29 (m, 36H) protones alifáticos	1.33-1.25 (m, 36H) protones alifáticos	1.22-1.17 (m, 40H) (3’’/3’’’) protones alifáticos
18’’, 18’’’	0.87 (t, *J* = 6.6, 6H)	0.93-0.90 (t, *J* = 7.2, 6H)	0.88 (t, *J* = 8.0, 6H)

d = doblete, dd = doble-doblete, t = triplete, m = multiplete, q = quintuplete.

Finalmente, para corroborar la presencia de estos metabolitos en la fracción hexánica (DCR-2a) del extracto metanólico de rizomas de *D. contrajerva* (DCR-1a), se realizó un perfil cromatográfico por HPTLC en donde se aplicó los estándares de referencia y los compuestos **8** (R_f = 0.30) y **9** (R_f = 0.23). El sistema de disolventes utilizado fue Hx/An/MeOH (7:2.5:0.5). El reactivo revelador fue óleum (Figura 3.8).

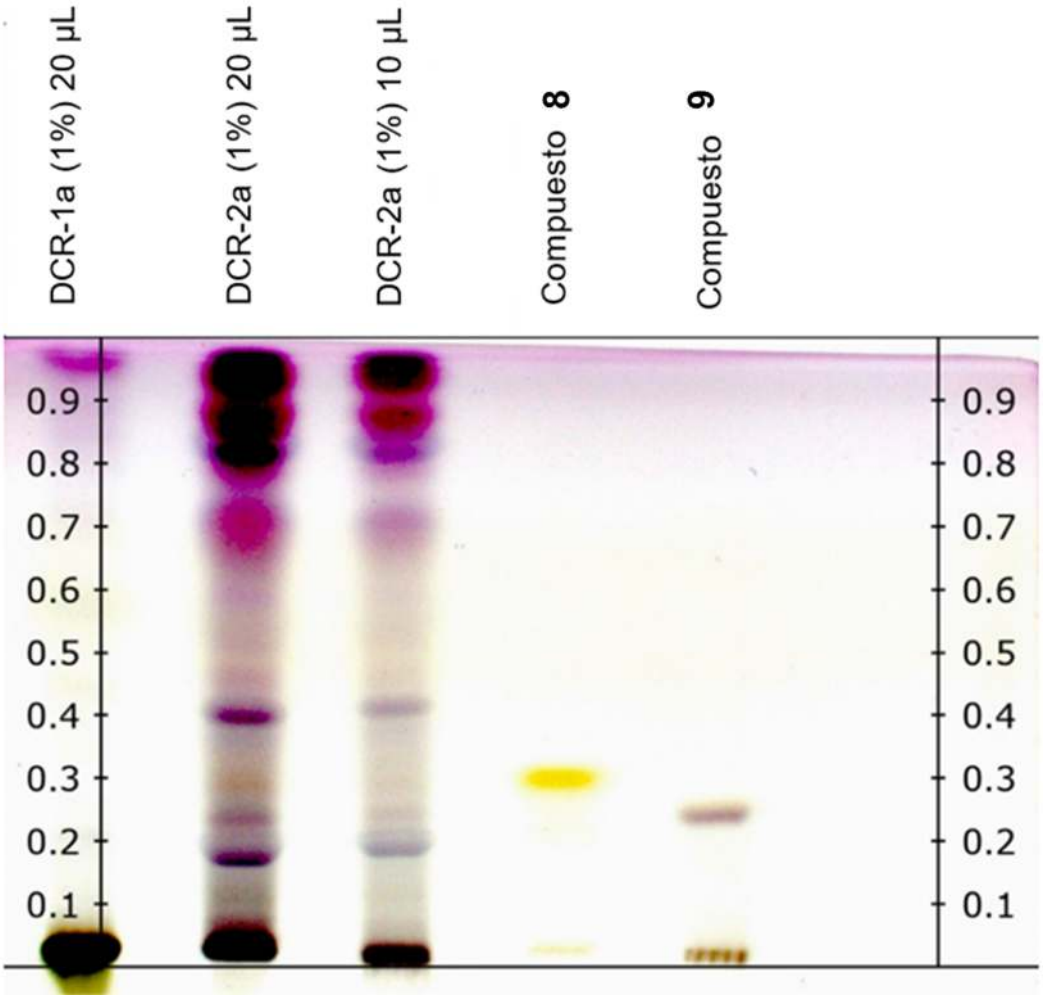


Figura 3.8. Perfil cromatográfico por HPTLC de DCR-1a, DCR-2a y los compuestos **8** y **9**.

CAPÍTULO IV

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE METABOLITOS AISLADOS DE *Aphelandra scabra* y *Dorstenia contrajerva* CONTRA PROMASTIGOTES Y AMASTIGOTES DE *Leishmania mexicana*

4.1. INTRODUCCIÓN

Los bioensayos son fundamentales para obtener de manera más rápida y segura compuestos con actividad biológica, ya que permiten descartar fracciones poco relevantes para el estudio que se realiza. Lo anterior es necesario para ahorrar tiempo y gastar menos recursos.

Los bioensayos de actividad leishmanicida *in vitro* generalmente consisten en agregar una concentración conocida de un extracto, fracción o compuesto, a un número conocido de promastigotes metacíclicos o amastigotes en este caso de *L. mexicana*. Para evaluar el efecto inhibitorio de las muestras se realiza una comparación con el cultivo de parásitos sin tratamiento. Por lo tanto, el bioensayo *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* es útil para biodirigir la búsqueda de metabolitos activos en distintas fracciones, seleccionando aquellas que poseen mejor actividad con el fin de aislar los metabolitos responsables de dicha actividad.

Sin embargo, los ensayos clásicos de elección primaria como el método de conteo óptico toman bastante tiempo para medir la actividad antiparasitaria de un elevado número de muestras. Los métodos colorimétricos como el XTT, o su análogo MTT, permiten evaluar un gran número de muestras en un menor tiempo. Ambos procedimientos tienen como base la reducción de sales de tetrazolio a cristales de formazán por acción de las deshidrogenasas mitocondriales, reacción que es acelerada por un acoplador de electrones como el metosulfato de fenazina (PMS, por sus siglas en inglés). No obstante, el formazán obtenido por MTT es insoluble en agua, por lo que se requieren disolventes orgánicos para solubilizarlo, haciendo más largo el tiempo del bioensayo (Cornelly *et al*., 2003).

*Parte del contenido de este capítulo fue publicado en el artículo "*Antileishmanial activity of Dorstenia contrajerva against amastigotes of Leishmania mexicana*". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2021**, *31*, 481-485. Autores: Ana G. Carrillo-Aké, Luis W. Torres-Tapia, José Delgado-Domínguez, Rocely B. Cervantes-Sarabia, Ingeborg Becker, Marina Vera-Ku, Sergio R. Peraza-Sánchez. Enviado: *18 de febrero de 2021.* Aceptado: *19 de Julio de 2021*.Publicado en línea: 3 de noviembre de 2021.

Los criterios más adecuados para seleccionar cuáles fracciones o compuestos poseen buena actividad leishmanicida son: el porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC), la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) y el índice de selectividad (IS). La CI_{50} se define como la concentración de un extracto, fracción o compuesto necesaria para reducir a un 50% el crecimiento *in vitro* de un cultivo celular en comparación con el cultivo sin tratamiento (Sebaugh, 2011). El índice de selectividad es un parámetro ampliamente aceptado que se utiliza para expresar la eficacia *in vitro* de un compuesto en la inhibición de algún agente patógeno, es decir, mide la relación entre la citotoxicidad y la actividad que se busca, ya sea antiprozoaria, antiviral, anticancerígena, etc.

En este trabajo las fracciones utilizadas para el aislamiento de compuestos activos fueron las que presentaron mejor %IC y mejor CI_{50}.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Actividad *in vitro* de extractos, fracciones y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra promastigotes de *L. mexicana*

4.2.1.1. Material biológico

Se utilizó la cepa (LV4) MNYC/B2/62/M379 de promastigotes de *L. mexicana*, los cuales se cultivaron en medio 199 suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, durante seis días a 23.5 °C para obtener una adecuada fase estacionaria de los parásitos (Martín-Quintal, 2010; Peraza-Sánchez *et al.,* 2007).

Transcurridos los seis días de incubación se observaron los parásitos con ayuda de un microscopio Motic® (BA310E), la presencia de rosetas o promastigotes en forma redonda se eliminó por medio de una centrifugación a 600 rpm × 10 min a 4 ºC. El sobrenadante se transfirió a un tubo de 14 mL y el botón de parásitos no deseados se desechó. El sobrenadante se lavó dos veces empleando buffer fosfato salino (PBS) y una posterior centrifugación a 3,000 rpm × 10 min a 4 ºC. El botón de parásitos se resuspendió en 1 mL de medio RPMI-1640 con SFB al 10% (medio RPMIc).

Finalmente, se realizó una dilución 1:100 usando formaldehído al 2% para inmovilizar a los parásitos y se llevó a cabo un conteo en la zona de glóbulos blancos con ayuda de una cámara de Neubauer, seguidamente se realizó un ajuste de 1×10^5 parásitos/mL en medio RPMIc.

4.2.1.2. Preparación de extractos, fracciones y metabolitos de *A. scabra* y *D. contrajerva*

El extracto metanólico de las hojas de *A. scabra* (ASH-1a), al igual que las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido (ASH-2a, ASH-2b y ASH-2c), se evaluaron utilizando seis concentraciones (1,000, 500, 100, 10, 1 y 0.1 µg/mL). Posteriormente, las fracciones obtenidas por CLV de ASH-2b y ASH-2c se evaluaron a 100, 50, 25, 10 y 1 µg/mL. Finalmente, los compuestos puros de *A. scabra* se evaluaron usando cinco concentraciones (20, 10, 5, 2.5, 1 µg/mL). En el caso de *D. contrajerva* solamente el extracto metanólico de los rizomas (DCR-1a) se evaluó contra la fase de promastigotes a 1,000, 500, 100, 10, 1 y 0.1 µg/mL.

Cada muestra fue diluida con DMSO puro, sin embargo, las concentraciones finales de este disolvente en cada pozo no excedieron el 0.05%, para no afectar negativamente el crecimiento de los parásitos.

Se utilizaron dos controles positivos: la oxilipina (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol (1 µg/mL de concentración final en el pozo) y anfotericina B (1 µg/mL de concentración final en el pozo). También se empleó un control negativo (RPMIc más DMSO al 0.05%) y un control de crecimiento (RPMIc con promastigotes sin tratamiento).

4.2.1.3. Bioensayo *in vitro* de extractos metanólicos, fracciones y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra promastigotes de *L. mexicana*

Los bioensayos se realizaron de la siguiente manera: se colocaron 100 µL de medio con promastigotes a 1×10^5 parásitos/mL en placas de 96 pozos, después se adicionó 100 µL de cada muestra y control evaluado, respectivamente. Adicionalmente, se realizó un blanco para cada muestra y control utilizando medio RPMIc (100 µL) y las diferentes muestras evaluadas (100 µL). Las placas se incubaron a 23.5 °C durante seis días. Cada concentración se evaluó por triplicado y se repitió tres veces (Martin-Quintal, 2010; Salamanca *et al*., 2008).

Trascurrido el tiempo de incubación, se midió la actividad *in vitro* de los extractos, fracciones y compuestos utilizando el método colorimétrico XTT. Esta prueba consistió en adicionar 50 µL del reactivo XTT/PMS (1 mg/mL y 0.06 mg/mL, respectivamente) en los blancos y en las diferentes muestras evaluadas. A continuación, las placas se incubaron por cuatro horas a 37 °C. Finalmente, se midió las absorbancias de todas las muestras a 450 nm.

Posteriormente, se realizó el conteo óptico de los parásitos en ASH-1a, DCR-1a y las fracciones ASH-2a, ASH-2b y ASH-2c, con la finalidad de verificar si se había implementado de forma correcta el método colorimétrico XTT.

El porcentaje de inhibición por el método colorimétrico XTT se determinó de la siguiente manera:

A: Cálculo del valor promedio de las absorbancias de las tres réplicas de la muestra y sus controles.
B: Sustracción del valor de las absorbancias de los blancos, tanto al control positivo como a las diferentes concentraciones frente a los promastigotes.
C: Conversión de las diferentes absorbancias a porcentaje de viabilidad de los parásitos, donde el 100% representa la absorbancia del control sin extracto.

Para el método por conteo óptico, el porcentaje de inhibición se determinó usando la siguiente fórmula:

% de inhibición de crecimiento = 100 – (promedio de promastigotes vivos en las disoluciones / promedio de promastigotes vivos en el control negativo) × 100.

La CI_{50} de cada muestra se obtuvo mediante el programa estadístico GraphPad Prism 7. Los resultados finales para los extractos y fracciones se reportaron como CI_{50} (µg/mL) y para los metabolitos secundarios (µg/mL y µM).

4.2.2. Actividad *in vitro* de los extractos metanólicos y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*

4.2.2.1. Material biológico

Se utilizó la cepa LAC de amastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron aislados de ratones BALB/c previamente infectados en la almohadilla de la pata con 1×10^7 parásitos/mL de promastigotes de *L. mexicana*. Los ratones fueron eutanizados y los amastigotes fueron aspirados de la almohadilla de la pata con ayuda de una jeringa de 1 mL. El aspirado fue inoculado en cajas con medio de cultivo de insectos Schneider's Drosophila modificado (Sigma-Aldrich) con 20% de suero fetal bovino inactivado, pH 5 y cultivado durante 6 días a una temperatura de 33 °C para tener una adecuada fase estacionaria de los parásitos (Bates, 1994).

Transcurridos los seis días de incubación, se observaron los parásitos con ayuda de un microscopio invertido Zeiss® (modelo Axiovert 100). Posteriormente, se tomaron 3 mL y se transfirieron a un tubo de 14 mL, seguidamente se agregó 3 mL de PBS y se realizó un lavado a 4,000 rpm × 10 min. El botón de parásitos se recuperó y se lavó una vez más bajo las mismas condiciones. El botón restante se resuspendió en 1 mL de medio Schneider's con SFB al 20% y con ayuda de una jeringa de 1 mL se logró una adecuada disgregación de los amastigotes.

Finalmente, se realizó una dilución 1:100 usando eritrosina B y se llevó a cabo un conteo en la zona de glóbulos blancos con ayuda de una cámara de Neubauer y se realizó un ajuste de 1 × 10^6 parásitos/mL en medio Schneider's con SFB al 20%.

4.2.2.2. Preparación de los extractos metanólicos y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva*

ASH-1a, DCR-1a y los metabolitos secundarios de ambas especies vegetales se evaluaron a seis concentraciones diferentes, tomando como referencia la CI_{50} obtenida en el bioensayo *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana*. Se utilizó DMSO puro para solubilizar las muestras, cuidando que la concentración final de este disolvente en el bioensayo no excediera el 0.05%. Las concentraciones empleadas para cada muestra se presentan en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Concentraciones empleadas de los extractos y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*.

Muestra	Concentraciones (µg/mL)
ASH-1a	32.0, 16.0, 8.0, 4.0, 2.0, 1.0
DCR-1a	54.0, 27.0, 13.5, 6.7, 3.3, 1.6
Tirosol	25, 12.5, 6.33, 3.15, 1.57, 0.75
Hidroxitirosol	5.2, 2.6, 1.3, 0.65, 0.32, 0.16
Cicloartocarpesina	3.4,1.7, 0.85, 0.42, 0.21, 0.10
Galactolípido	4.6, 2.3, 1.15, 0.57, 0.28, 0.14

4.2.2.3. Bioensayo *in vitro* de los extractos metanólicos y metabolitos secundarios de *A. scabra* y *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*

El efecto leishmanicida de los extractos y metabolitos secundarios de las hojas de *A. scabra* y rizomas de *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana* se determinó mediante la incubación de los parásitos con las diferentes concentraciones de las muestras durante cinco días.

El bioensayo consistió en realizar diluciones seriadas en tubos de ensayo con tapa de empuje estériles que contenían medio Schneider's y las diferentes muestras a evaluar, con la finalidad de obtener las concentraciones deseadas. Posteriormente, se agregó una concentración de 1×10^6 parásitos/mL de amastigotes de *L. mexicana*. Como control positivo se utilizó Glucantime® a una concentración de 2.3 µg/mL. El control de crecimiento fue medio Schneider's con amastigotes de *L. mexicana* sin tratamiento y como control de vehículo se utilizó DMSO al 0.05%.

La viabilidad de los amastigotes se determinó por conteo diario durante cinco días usando eritrosina B (Sigma-Aldrich) y una cámara de Neubauer. La CI_{50} de cada muestra se obtuvo con ayuda del programa GraphPad Prism 7.0. Los resultados se expresan como la media ± DS de tres experimentos independientes. Además, se realizó la prueba de Mann-Whitney para comparar los resultados del control del crecimiento y las concentraciones. Se consideró estadísticamente un valor significativo de $p \leq 0.05$.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Actividad *in vitro* del extracto metanólico y fracciones de *Aphelandra scabra* contra promastigotes de *L. mexicana*

El efecto leishmanicida *in vitro* del extracto metanólico (ASH-1a) y las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido (ASH-2a, ASH-2b, ASH-2c) de las hojas de *A. scabra* se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Actividad *in vitro* de ASH-1a y fracciones de la partición líquido-líquido contra promastigotes de *L. mexicana*.

Muestra	Método XTT CI_{50} µg/mL	Método de conteo CI_{50} µg/mL
ASH-1a	13.6	13.5
ASH-2a	103.5	106.4
ASH-2b	16.2	18.2
ASH-2c	14.6	17.6
Oxilipina*	1	1
Anfotericina B	1	1

* Oxilipina: (3*S*)-16,17-dideshidrofalcarinol, compuesto activo aislado de *Tridax procumbens*.

Los resultados muestran que el extracto metanólico de las hojas de *A. scabra* resultó activo en ambos métodos de evaluación. Así mismo, las fracciones de diclorometano y acetato de etilo (ASH-2b y ASH-2c) presentaron buena actividad leishmanicida con una CI_{50} por debajo de 20 µg/mL en ambos bioensayos de inhibición de crecimiento contra promastigotes de *L. mexicana*. Por lo tanto, ambas fracciones se decidieron utilizar para el aislamiento de compuestos activos.

En cuanto a la comparación de ambos métodos de evaluación se determinó que existe una relación similar entre el método colorimétrico XTT y el método por conteo óptico. Por esta razón, el método XTT se puede seguir utilizando para evaluar futuras muestras contra promastigotes de *L. mexicana*. Es importante mencionar que los ensayos colorimétricos a diferencia de otros tipos de ensayo, como las técnicas antiparasitarias de incorporación de timidina (H^3) dentro del ADN, no requieren de reactivos y/o equipos sofisticados. Por otro lado, la prueba con XTT es rápida y de bajo costo, por lo que se puede evaluar de manera rápida y segura una gran cantidad de muestras (Salamanca *et al*., 2008). Para continuar con el aislamiento de metabolitos activos de *A. scabra*, las fracciones ASH-2b y ASH-2c se sometieron a un sub-fraccionamiento por CLV. Las fracciones obtenidas se evaluaron utilizando el método colorimétrico XTT y los resultados se muestran en las Tablas 4.3 y 4.4.

Tabla 4.3. Actividad *in vitro* de las fracciones obtenidas por CLV de ASH-2c contra promastigotes de *L. mexicana*.

Fracción	CI_{50} µg/mL
ASH-3a	80.8
ASH-3b	78.6
ASH-3c	10
ASH-3d	7.7
ASH-3e	13.8
ASH-3f	20.7
ASH-3g	38.5
Oxilipina	1
Anfotericina B	1

Las fracciones ASH-3c, ASH-3d y ASH-3e procedentes de ASH-2c mostraron buena actividad leishmanicida *in vitro* con una CI_{50} < 15 µg/mL. Por lo tanto, se continuó trabajando con estas fracciones para el aislamiento de metabolitos leishmanicidas.

Tabla 4.4. Actividad *in vitro* de las fracciones obtenidas por CLV de ASH-2b contra promastigotes de *L. mexicana*.

Fracción	CI_{50} µg/mL
ASH-4a	N/D
ASH-4b	91.0
ASH-4c	49.1
ASH-4d	13.8
ASH-4e	8.4
ASH-4f	21.6
Oxilipina	1
Anfotericina B	1

N/D: No determinado.

En el caso de las fracciones provenientes de ASH-2b, dos de ellas (ASH-4d y ASH-4e) presentaron una CI_{50} < 15 µg/mL contra promastigotes de *L. mexicana*. Por lo tanto, estas dos fracciones fueron seleccionadas para continuar con el aislamiento de metabolitos con actividad leishmanicida. La fracción ASH-3a no pudo ser evaluada por motivos de solubilidad durante el bioensayo y quedó pendiente para su posterior evaluación empleando otro disolvente diferente al DMSO.

4.3.2. Actividad *in vitro* de metabolitos secundarios de *A. scabra* contra promastigotes de *L. mexicana*

Hasta el momento se han aislado siete metabolitos secundarios de las hojas de *A. scabra*, sin embargo, por falta de tiempo sólo se pudieron evaluar cinco. El efecto de la actividad leishmanicida *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* se reporta en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Actividad leishmanicida de metabolitos secundarios de *A. scabra* contra promastigotes de *L. mexicana*.

Compuesto	CI_{50} µg/mL	CI_{50} µM
Cirsimarina (**1**)	N/A	--
Cirsimaritina (**2**)	N/A	--
Sorbifolín (**3**)	N/A	--
Tirosol (**4**)	12.2 ± 2.1	88.3
Hidroxitirosol (**5**)	2.6 ± 1.4	16.8
Oxilipina	1	--
Anfotericina B	1	--

N/A: No activo (>20 µg/mL). ±: Desviación estándar.

Los resultados muestran que únicamente los compuestos **4** y **5** presentaron actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana,* siendo más activo el hidroxitirosol con una CI_{50} = 2.6 µg/mL (16.8 µM). Con estos resultados se determinó que el extracto metanólico de *A. scabra* y los compuestos tirosol e hidroxitirosol serán evaluados contra la forma de amastigotes de *L. mexicana*.

4.3.3. Actividad *in vitro* del extracto metanólico y metabolitos secundarios de *A. scabra* contra amastigotes de *L. mexicana*

El efecto leishmanicida del extracto metanólico y de los compuestos tirosol e hidroxitirosol de *A. scabra*, se determinó comparando la viabilidad de los amastigotes de *L. mexicana* en el control del crecimiento y las diferentes curvas de crecimiento en cada muestra evaluada durante cinco días de incubación (Figura 4.1).

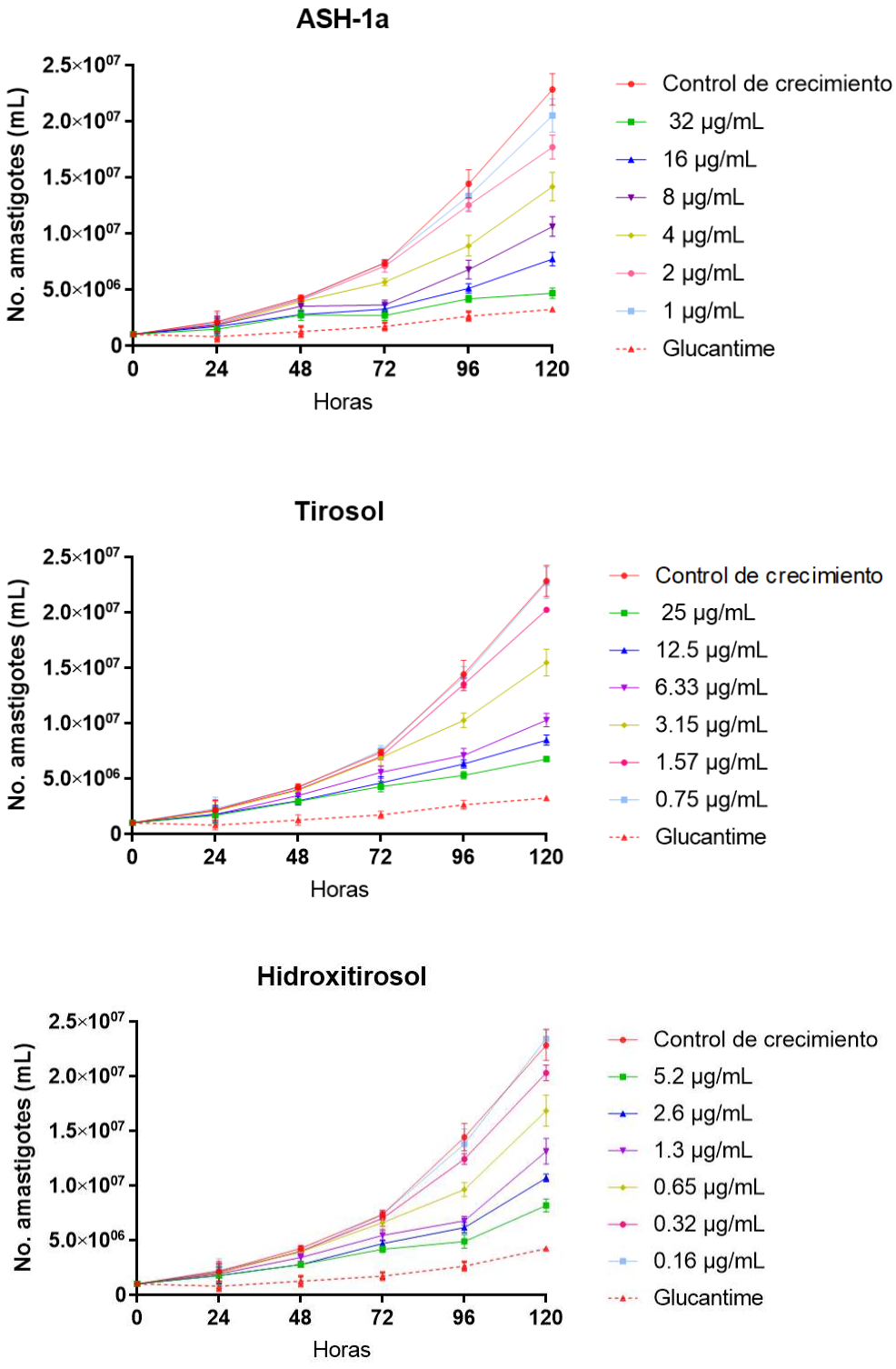


Figura 4.1. Curvas de crecimiento de amastigotes de *L. mexicana* incubados con diferentes concentraciones de ASH-1a, tirosol e hidroxitirosol. Control positivo = Glucantime (2.3 µg/mL). Los datos se presentan como la media ± SD de tres experimentos independientes, utilizando valores de $p \leq 0.05$.

En la Figura 4.1 se puede observar un efecto de inhibición dosis-dependiente en la proliferación de amastigotes de *L. mexicana*, producida por el extracto metanólico (ASH-1a) y los metabolitos secundarios tirosol (**4**) e hidroxitirosol (**5**) de *A. scabra*. La concentración más elevada de ASH-1a (32 µg/mL) provocó una reducción significativa del 73.4% de los amastigotes a partir de las 72 h en comparación con el control de crecimiento ($p \leq 0.05$). La concentración inhibitoria media del extracto metanólico a las 72 h fue de 6.6 ± 1.0 µg/mL. En el caso de los metabolitos secundarios la CI_{50} se estableció a partir de las 96 h, tiempo en donde se apreció un mejor efecto de la actividad leishmanicida, los resultados se expresan en la Tabla 4.6. El control de vehículo no tuvo algún efecto negativo sobre la viabilidad de los amastigotes.

Tabla 4.6. Actividad leishmanicida del extracto metanólico y metabolitos secundarios de *A. scabra* contra amastigotes de *L. mexicana*.

Muestra	CI_{50} (µg/mL)	Hora	CI_{50} (µM)
ASH-1a	6.6 ± 1.0	96	N/A
Tirosol (**4**)	5.2 ± 1.1	72	37.6
Hidroxitirosol (**5**)	0.73 ± 0.15	72	4.7

N/A: No aplica. (±): Desviación estándar.

De los cinco compuestos evaluados de *A. scabra* solamente el hidroxitirosol (**5**) mostró buena actividad *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* con una CI_{50} = 16.8 y 4.7 µM, respectivamente.

Este es el primer reporte del hidroxitirosol en las hojas de la especie vegetal *A. scabra* y además con actividad leishmanicida contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*. Según la literatura ya se han realizado algunos estudios para conocer su actividad frente a otras especies de *Leishmania*, por ejemplo: Kyriazis *et al*. (2013) publicaron un artículo donde evaluaron la actividad del hidroxitirosol aislado de las aguas residuales resultantes de la producción del aceite de oliva de los frutos de *Olea europaea* var. *koroneiki* contra promastigotes y amastigotes de *L. infantum*, *L. donovani* y *L. major*; los resultados mostraron que el hidroxitirosol fue medianamente activo contra los promastigotes de *L. infantum* con un CI_{50} de 32.9 µg/mL, también tuvo actividad contra los amastigotes intracelulares de *L. donovani* con un CI_{50} = 38.7 µg/mL, una CC_{50} = 180 µg/mL contra macrófagos J774A.1 y un IS = 4.6.

Otro trabajo menciona la evaluación de 20 derivados a partir de hidroxitirosol, entre los cuales el compuesto nombrado como decanoato de hidroxitirosol resultó ser el más activo, mostrando un 54% de inhibición contra amastigotes axénicos a una concentración de 20 µM, una CI_{50} = 8.44 µM y un IS = 8.4 contra amastigotes intracelulares de *L donovani*.

Parece que la adición de un grupo éster de ácido graso al hidroxitirosol mejora su actividad y que la longitud óptima de la cadena alquilo debe ser entre 10 y 12 átomos de carbono, ya que actúan como detergentes inespecíficos que interrumpen la membrana del parásito, al menos contra la especie de *Leishmania* mencionada (Belmonte-Reche *et al*., 2016).

4.3.4. Actividad *in vitro* del extracto metanólico de *D. contrajerva* contra promastigotes de *L. mexicana*

El efecto de la actividad leishmanicida del extracto metanólico de rizomas de *D. contrajerva* (DCR-1a) evaluado por el método colorimétrico XTT y conteo óptico sobre promastigotes de *L. mexicana* se muestra en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Actividad *in vitro* de DCR-1a contra promastigotes de *L. mexicana*.

Muestra	CI_{50} (µg/mL) Método óptico	CI_{50} (µg/mL) Método XTT
DCR-1a	30.3	27.6
Oxilipina	1	1
Anfotericina B	1	1

Los resultados mostraron que DCR-1a fue activo tanto en el método óptico como en el método colorimétrico XTT. Esta evidencia permitió que se continuara trabajando con el extracto metanólico para obtener la fracción hexánica (DCR-2a), donde se observó la presencia de los compuestos activos de interés. Finalmente, después de aislar la cicloartocarpesina (**8**) y el galactolípido 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil (**9**), se procedió a evaluarlos de manera *in vitro* junto con el extracto metanólico contra la forma de amastigotes de *L. mexicana*.

4.3.5. Actividad *in vitro* del extracto metanólico y metabolitos secundarios de *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*

La actividad leishmanicida que ejercen las diferentes concentraciones de DCR-1a y los metabolitos secundarios de *D. contrajera* se determinó comparando la viabilidad de los amastigotes de *L. mexicana* en el control del crecimiento, y en las diferentes curvas de crecimiento de las muestras evaluadas durante cinco días de incubación, los resultados se muestran en la Figura 4.2.

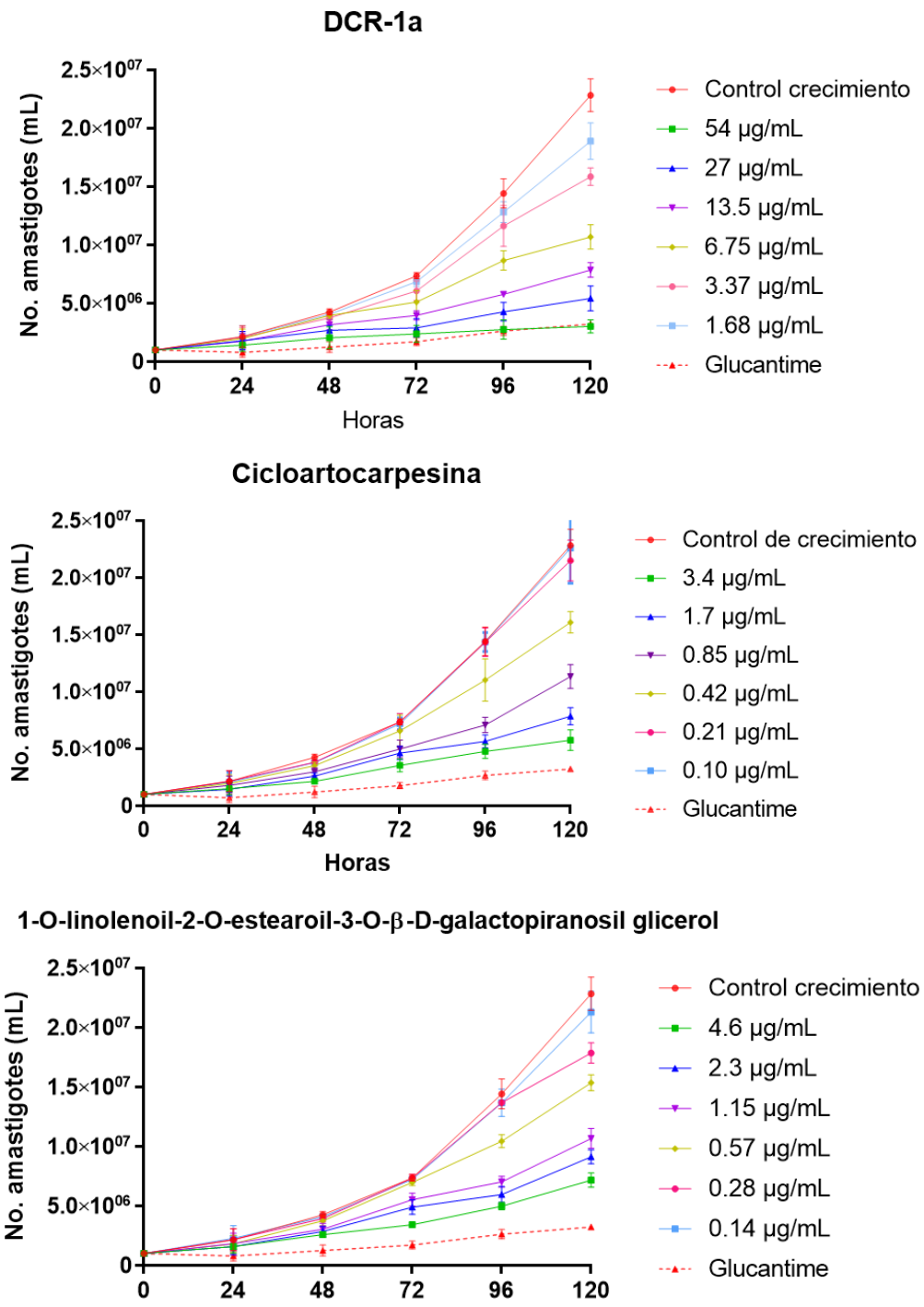


Figura 4.2. Curvas de crecimiento de amastigotes de *L. mexicana* incubados con diferentes concentraciones de DCR-1a, cicloartocarpesina y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil. Control positivo = Glucantime (2.3 µg/mL). Los datos se presentan como la media ± SD de tres experimentos independientes, utilizando valores de $p \leq 0.05$.

El extracto metanólico (DCR-1a) de los rizomas de *D. contrajerva* y los compuestos cicloartocarpesina (**8**) y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**9**) mostraron una inhibición dependiente de la dosis en la proliferación de amastigotes de *L. mexicana*. Se obtuvo una reducción significativa del 80.8 y 70.4% con las concentraciones más altas de DCR-1a (54 y 27 µg/mL, respectivamente), con una $p \leq 0.05$ en comparación con el control de crecimiento a partir de las 96 h. El control de vehículo no presentó algún efecto negativo sobre la viabilidad de los amastigotes.

Posteriormente, se calculó la CI_{50} de DCR-1a y de los metabolitos **8** y **9** tomando en cuenta el mejor tiempo de la actividad leishmanicida observada en las curvas de crecimiento del parásito. Los resultados se presentan en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Actividad leishmanicida del extracto metanólico y metabolitos secundarios de *D. contrajerva* contra amastigotes de *L. mexicana*.

Muestra	CI_{50} (µg/mL) 96 horas	CI_{50} (µM) 96 horas
DCR-1a	9.9 ± 2.3	N/A
Cicloartocarpesina	0.71 ± 0.14	2.0
1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol	0.78 ± 0.10	0.9

N/A: No aplica. (±): Desviación estándar.

Los resultados revelaron que el extracto metanólico y los metabolitos **8** y **9** aislados de *D. contrajerva* tienen actividad *in vitro* contra la fase de amastigotes de *Leishmania mexicana*.

La cicloartocarpesina (**8**) es una flavona prenilada que presenta un sustituyente de isopreno C5 y fue aislada por primera vez de *Artocarpus heterophyllus* (Moraceae) (Parthasarathy *et al*., 1969). Esta subclase de compuestos se encuentra principalmente en las familias Leguminosae y Moraceae y se produce en respuesta a un daño o ataque a la planta. La sustitución del sistema de anillos en los flavonoides con grupos prenilo aumenta la lipofilicidad y le da a la molécula una fuerte afinidad por las membranas biológicas, mejorando la actividad biológica (Botta *et al*., 2005). Este compuesto ha mostrado moderada actividad citotóxica (CI_{50} = 15.5 a 21.3 µM) contra algunas líneas celulares de cáncer como: leucemia (CCRF-CEM), leucemia resistente a múltiples fármacos (CEM/ADR5000), glioblastoma (U87MG), hepatocarcinoma (HepG2) y una baja citotoxicidad contra células normales de hepatocitos AML12 (Kuete *et al*., 2015). También hay reportes de moderada actividad contra bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y

Pseudomonas aeruginosa) y bacterias Gram-positivas como *Klebsiella pneumoniae* (Kuete *et al*., 2009).

Sin embargo, hasta la fecha sólo hay reportes de su actividad *in vitro* contra la forma de promastigotes de *L. mexicana* (Peniche-Pavia *et al*., 2016). Por lo tanto, este trabajo sería el primero en describir su efecto leishmanicida contra la forma de amastigotes de *L. mexicana*.

Por otro lado, el compuesto 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**9**) es un galactolípido cuya estructura general es un monosacárido de galactosa unido a un diacilglicerol por un enlace glicosídico y pertenece al grupo monogalactosil diacilglicerol (MGDG) (Boudière *et al*., 2013). Los MGDG son lípidos de membrana predominantes en plantas y algas; constituyen más del 50% de los lípidos totales en la membrana del cloroplasto y se consideran los lípidos polares más abundantes de la tierra. Los galactolípidos se descubrieron en la harina de trigo y se convirtieron en un foco de investigación a finales de la década de 1950 y su completa elucidación estructural se obtuvo hasta finales de 1961. Estos compuestos son esenciales para la función fotosintética, están involucrados en la síntesis y funciones de homeostasis de las membranas, en los procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas (Bruno *et al*., 2005).

Se ha informado diversas actividades biológicas de los galactolípidos como: antialgas, antivirales, agentes anticancerígenos y antitumorales. Además, el grupo MGDG muestra una importante actividad antiinflamatoria según su grado de insaturación (Hoyo *et al*., 2016). Adicionalmente, los ácidos grasos insaturados aportan más fluidez a la membrana y se ha reportado en la literatura que existe una relación importante entre la hidrofilicidad lipofílica y la actividad anti-parasitaria de los fármacos. También se ha descrito que el aumento de solubilidad en el agua tiende aumentar la actividad antileishmanial y antimalaria (Sousa *et al*., 2011). Esta característica podría ser una razón para la buena actividad antileishmanial mostrada por el compuesto **9** en nuestro estudio. Finalmente, los galactolípidos tienen un efecto emulsionante como los fosfolípidos, sin embargo, los galactolípidos no poseen carga y se consideran seguros para uso a largo plazo (Boudière *et al*., 2013).

CAPÍTULO V
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

3.1. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se estudió la actividad antileishmanial *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de dos especies vegetales, *Aphelandra scabra* y *Dorstenia contrajerva,* contra promastigotes y amastigotes axénicos de *L. mexicana*.

El extracto metanólico obtenido de las hojas de *A. scabra* resultó activo contra la fase de promastigotes con una CI_{50} = 13.6 µg/mL. Este dato permitió corroborar lo reportado por Peraza-Sánchez *et al*. (2007). También presentó actividad *in vitro* contra la fase de amastigotes con una CI_{50} = 6.6 µg/mL. Posteriormente, este extracto fue fraccionado por partición líquido-líquido con hexano (ASH-2a), diclorometano (ASH-2b) y acetato de etilo (ASH-2c). Cada una de las fracciones obtenidas fue sometida a un bioensayo de inhibición contra promastigotes de *L. mexicana*, con la finalidad de ubicar las fracciones con mejor actividad biológica y continuar con el aislamiento de metabolitos secundarios con actividad antileishmanial.

Las fracciones ASH-2b y ASH-2c presentaron la mejor actividad *in vitro* con una CI_{50} = 16.2 y 14.6 µg/mL, respectivamente. A continuación, se realizó un sub-fraccionamiento por CLV de ambas fracciones y una evaluación biológica contra promastigotes de *L. mexicana* a todas las fracciones obtenidas. Los resultados mostraron que las sub-fracciones ASH-3c, ASH-3d, ASH-3e obtenidas de la fracción de acetato de etilo y ASH-4d, ASH-4e procedentes de la fracción de diclorometano tuvieron la mejor actividad leishmanicida con una $CI_{50} \leq 15$ µg/mL. De las fracciones activas procedentes de ASH-2c se aislaron seis compuestos (cirsimarina, sorbifolín, tirosol, hidroxitirosol y dos nuevos compuestos). De la fracción ASH-2b se aisló un compuesto reportado como cirsimaritina. Sin embargo, por la restricción de tiempo causada por la pandemia COVID-19 en este trabajo sólo se pudieron evaluar cinco de los siete metabolitos aislados de *A. scabra* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*.

La cirsimarina (**1**), sorbifolín (**2**) y cirsimaritina (**3**) fueron identificados por medio del R_f observado en CCD junto con algunos estándares de referencia reportados en *A. scabra* (Hernández-Bolio *et al*., 2015). Ninguno de estos compuestos resultó activo contra ambas fases de los parásitos de *L. mexicana*. El compuesto **4** fue identificado como tirosol al analizar su patrón de fragmentación con la base de datos NIST y se confirmó al comparar las señales observadas en los espectros de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C con lo reportado en la literatura (Specian *et al*., 2012; Owen

et al., 2000). Este compuesto presentó una actividad moderada contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* con una IC_{50} = 12.2 µg/mL (88.3 µM) y 5.2 µg/mL (37.6 µM), respectivamente.

El compuesto **5** fue identificado como hidroxitirosol al comparar las señales observadas en sus espectros de RMN-^{1}H y RMN-^{13}C con lo reportado en la literatura (Owen *et al*., 2000). De los cinco compuestos evaluados de *A. scabra*, el hidroxitirosol presentó la mejor actividad *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, mostrando una CI_{50} = 2.6 µg/mL (16.8 µM) y 0.7 µg/mL (4.5 µM), respectivamente. Este metabolito a diferencia del tirosol, posee un grupo OH de más en el C-3, provocando que la molécula sea más hidrofílica y mejorando así su actividad. Este resultado nos confirma que las hojas de *A. scabra* contienen metabolitos con actividad leishmanicida y se puede considerar seguir trabajando con esta especie vegetal.

Los compuestos ASH-28P1 (**6**) y ASH-28P3 (**7**) parecen ser nuevos metabolitos no reportados hasta el momento. Según los análisis por RMN de una y dos dimensiones el primer metabolito se trata de un derivado del ácido benzoico con una cadena alifática esterificada y un sustituyente hidroxilo. El segundo es un derivado del ácido cinámico con un grupo metoxilo y dos grupos hidroxilo en su estructura. Hasta el momento no se han evaluado contra los parásitos de *L. mexicana.*

El extracto metanólico (DCR-1a) de los rizomas de *D. contrajerva* resultó nuevamente activo contra la fase de promastigotes de *L. mexicana*, presentando una CI_{50} = 27.6 µg/mL, lo cual permitió confirmar lo reportado por Peniche-Pavía *et al*. (2016). DCR-1a también mostró actividad leishmanicida contra la fase de amastigotes axénicos de *L. mexicana* con una CI_{50} = 9.9 µg/mL.

La cicloartocarpesina (**8**) y el galactolípido (**9**), reportados con actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. mexicana* (Peniche-Pavía *et al*., 2016), también presentaron actividad leishmanicida contra la fase de amastigotes con una CI_{50} = 0.71 µg/mL (2.0 µM) y 0.78 µg/mL (0.9 µM), respectivamente.

3.2. CONCLUSIONES GENERALES

Este es el primer informe del efecto antiprotozoario del extracto metanólico de las hojas de *Aphelandra scabra* contra promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania mexicana*.

Como resultado de una serie de fraccionamientos con diferentes técnicas cromatográficas se logró aislar siete compuestos provenientes de las fracciones activas de diclorometano y acetato de etilo provenientes del extracto metanólico de *A. scabra*. Los compuestos **1** (cirsimarina), **2** (sorbifolín) y **3** (cirsimaritina) ya han sido previamente reportados en las hojas de *A. scabra*, sin embargo, no habían sido evaluados de manera *in vitro* contra parásitos de *L. mexicana*. No obstante, en este trabajo ninguno de los tres compuestos presentó actividad leishmanicida. Los compuestos **4** (tirosol) y **5** (hidroxitirosol) se reportan por primera vez en el género *Aphelandra* y en la especie *A. scabra*. Así mismo, el compuesto **4** mostró buena actividad *in vitro* contra ambos estadios de los parásitos de *L. mexicana*. Además, el hidroxitirosol es conocido por ser un potente antioxidante consumido de manera regular en la dieta mediterránea, por lo tanto, se considera un compuesto seguro para la salud. Los compuestos **6** (ASH-28P1) y **7** (ASH-28P3) se consideran como nuevos metabolitos no reportados en ninguna especie y aún no se ha evaluado su actividad biológica.

En el caso del extracto metanólico de los rizomas de *D. contrajerva,* este es el primer reporte de su actividad *in vitro* contra amastigotes axénicos de *L. mexicana*. Además, también se pudo comprobar que los compuestos conocidos como cicloartocarpesina (**8**) y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol (**9**) también poseen un efecto leishmanicida contra la fase de amastigotes de *L. mexicana*. Este proceso permite concluir un paso más en la evaluación *in vitro* de los compuestos reportados con actividad biológica contra promastigotes de *L. mexicana*.

Finalmente, los extractos metanólicos de las hojas de *A. scabra* y los rizomas de *D. contrajerva,* así como los metabolitos conocidos como hidroxitirosol, cicloartocarpesina y 1-*O*-linolenoil-2-*O*-estearoil-3-*O*-β-D-galactopiranosil glicerol resultan interesantes para incluirse en futuros bioensayos *in vitro* e *in vivo* para la búsqueda de nuevos tratamientos contra la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) causada por parásitos de *L. mexicana*.

Con todo lo anterior, se puede concluir que sí se cumplió con el objetivo general planteado en la tesis.

3.3. PERSPECTIVAS

Obtener por espectrometría de masas de baja y alta resolución el peso molecular de los compuestos novedosos **6** y **7**.

Evaluar los compuestos **6** y **7** aislados de las hojas de *A. scabra* en un bioensayo *in vitro* contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*.

Llevar a cabo estudios de citotoxicidad con los extractos metanólicos y compuestos activos de las hojas de *A. scabra* y rizomas de *D. contrajerva*.

Establecer estudios de relación estructura-actividad que permitan conocer el mecanismo de acción de los compuestos activos.

Continuar con el aislamiento de metabolitos en la especie *A. scabra* con el fin de encontrar otros posibles compuestos activos y continuar enriqueciendo la fitoquímica de la especie.

BIBLIOGRAFÍA

Aissa, I., Sghair, R.M., Bouaziz, M., Laouini, D., Sayadi, S., Gargouri, Y. (2012). Synthesis of lipophilic tyrosyl esters derivatives and assessment of their antimicrobial and antileishmanial activities. *Lipids in Health and Disease*, 11, 1-8.

Andrade-Narvaez, F.J., Van Wynsberghe, N.R., Sosa-Bibiano, E.I, Loria-Cervera, E.N. (2017). Eco-Epidemiological and Immunological Features of Localized Cutaneous Leishmaniasis in Southeastern Mexico, in: The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis, Claborn, D. (Ed.). IntechOpen, London, pp. 137-152.

Bates, P.A. (1994). Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*, 108, 1-9.

Bates, P.A. (2008). *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 340-344.

Becker, I. (2011). Los mecanismos de defensa al servicio de un parásito. Boletín UNAM-DGCS-581. https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2011_581.html [Acceso 5 mayo 2020].

Belmonte-Reche, E., Martínez-García, M., Peñalver, P., Gómez-Pérez, V., Lucas, R., Gamarro, F., Pérez-Victoria, J.M., Morales, J.C. (2016). Tyrosol and hydroxytyrosol derivatives as antitrypanosomal and antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 119,132-140.

Bernal, J.M., López, A.F., Murillo, E., Jairo, J. (2014). Flora silvestre medicinal utilizada por los Kofan colombianos en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19, 407-420.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2009). *Dorstenia contrajerva* L. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=dorstenia-contrajerva [Acceso 3 agosto 2021].

Borges-Argáez, R., Vela-Catzín, T., Yam-Puc, A., Chan-Bacab, M.J., Moo-Puc, R.E., Cáceres-Farfán, M. (2009). Antiprotozoal and cytotoxic studies on some isocordoin derivatives. *Planta Medica*, 75, 1336-1338.

Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D., Delle, G. (2005). Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 713-739.

Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S. (2011). Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 179-184.

Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., Bastien, O., Roy, S., Finazzi, G., Rolland, N., Jouhet, J., Block, M.A., Maréchal, E. (2013). Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis, and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1837, 470-480.

Bower, A.M., Real Hernandez, L.M., Berhow, M.A., De Mejia, E.G. (2014). Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6147-6158.

Bruno, A., Rossi, C., Marcolongo, G., Di Lena, A., Venzo, A., Berrie, C.P., Corda, D. (2005). Selective *in vivo* anti-inflammatory action of the galactolipid monogalactosyldiacylglycerol. *European Journal of Pharmacology,* 524,159-168.

Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S.M., Montalcini, T., Pujia, A., Russo, D. (2014). Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine*, 12, 1-9.

Caceres, A., Rastrelli, L., De Simone, F., De Martino, G., Saturnino, C., Saturnino, P., Aquino, R. (2001). Furanocoumarins from the aerial parts of *Dorstenia contrajerva*. *Fitoterapia*, 72, 376-381.

Calzada, F., Yépez-Mulia, L., Aguilar, A. (2006). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 367-370.

Carvajal, S. (2007). Flora del Bajío y de regiones adyacentes, Moraceae. Instituto de Botánica, Fascículo, 147, 7-11.

Casagrande, C., Ronchetti, F., Russo, G. (1974). The structure of syriogenin. *Tetrahedron*, 30, 3587-3589.

Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. (2015). Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las Leishmaniasis. https://www.gob.mx/salud%7Ccenaprece/documentos/manual-para-el-diagnostico-tratamiento-y-control-de-las-leishmaniasis-156615 [Acceso 18 agosto 2018].

Chan-Bacab, M.J., Balanza, E., Deharo, E., Muñoz, V., Durán García, R., Peña-Rodríguez, L.M. (2003). Variation of leishmanicidal activity in four populations of *Urechites andrieuxii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 243-247.

Chan-Bacab, M.J. y Peña-Rodríguez, L.M. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, 18, 674-688.

Chen, D., Fan, J., Wang, P., Zhu, L., Jin, Y., Peng, Y., Du, S. (2012). Isolation, identification and antioxidative capacity of water-soluble phenylpropanoid compounds from *Rhodiola crenulata*. *Food Chemistry*, 134, 2126-2133.

Chen, M., Christensen, S.B, Blom, J., Lemmich, E., Nadelmann, L., Fich, K., Theander, T.G, Kharazmi, A. (1993). Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, 2550-2256.

Conabio (2011). *Aphelandra scabra*. Ficha técnica. http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/acanthaceae/aphelandra scabra/fichas/ficha.htm[Acceso mayo 2017].

Convit, J., Ulrich, M., Fernández, C.T., Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Castés, M., Rondón, A.J. (1993). The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 444-448.

Cornelly, W., Espinosa, O.A., Montenegro, H., Cubilla, L., Capson, T.L., Ortega-Barría, E., Romero, L.I. (2003). Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbological Methods*, 55, 813-816.

Daniel, T.F. (1991). A revision of *Aphelandra scabra* (Acanthaceae) in Mexico. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 47, 235-274.

Delascio, F. (1998). El género *Dorstenia* (Moraceae) en el estado Cojedes, Venezuela. *Acta Botanica Venezuelica*, 21, 105-109.

Diaz-Gonzalez, R., Kuhlmann, F.M., Galan-Rodriguez, C., Madeira da Silva, L., Saldivia, M., Karver, C.E., Rodriguez, A., Beverley, S.M., Navarro, M., Pollastri, M.P. (2011). The susceptibility of tripanosomatid pathogens to PI3/mTOR kinase inhibitors affords a new opportunity for drug repurposing. *Neglected Tropical Diseases*, 5, 1-11.

Eissa, M.M., Amer, E.I., El Sawi, S.M.F. (2011). *Leishmania major*: activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 128, 382-390.

Flora de la Península de Yucatán. (2010). *Aphelandra scabra*. https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=2294 [Acceso mayo 2017].

Flores, N., Marrero, Y., Louvina, J., Tocto, D.S. (2017). Identificación de compuestos líderes con potencial actividad antileishmaniásica: una contribución a la farmacéutica médica. *Medicent Electrón*, 21, 39-45.

Food and Drug Administration (2017). FDA Drug Safety Communication: FDA limits usage of Nizoral (ketoconazole) oral tablets due to potentially fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems. https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-fda-limits-usage-nizoral-ketoconazole-oral-tablets-due-potentially [Access 22 September 2019).

Food and Drug Administration (2018). The Drug Development Process. https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process [Acceso 16 de julio 2020].

Fournet, A., Angelo, A., Muñoz, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A. (1992). Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 37, 159-164.

Gamboa-Angulo, M., García-Sosa, K., Alejos-González, F., Escalante-Erosa, F., Delgado-Lamas, G., Peña-Rodríguez, L.M. (2001). Tagetolone and tagetenolone: two phytotoxic polyketides from *Alternaria tagetica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1228-1232.

Getti, G., Durgadoss, P., Domínguez-Carmona, D., Martín-Quintal, Peraza-Sánchez, S., Peña-Rodríguez, L.M., Humber, D. (2009). Leishmanicidal activity of Yucatecan medicinal plants on *Leishmania* species responsible for cutaneus leishmaniasis. *The Journal of Parasitology*, 95, 456-460.

Guzmán-López, O., Trigos, A., Fernández, F.J., Yáñez-Morales, M. de J., Saucedo-Castañeda, G. (2007). Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 1473-1477.

Han, H.-S., Shin, J.-S., Lee, S.-B., Park, J.C., Lee, K.-T. (2018). Cirsimarin, a flavone glucoside from the aerial part of *Cirsium japonicum* var. *ussuriense* (Regel) Kitam. ex Ohwi, suppresses the JAK/STAT and IRF-3 signaling pathway in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Chemico-Biological Interactions*, 293, 38-47.

Hernández-Bolio, G.I., Torres-Tapia, L.W., Moo-Puc, R., Peraza-Sánchez, S.R. (2015). Antigiardial activity of flavonoids from leaves of *Aphelandra scabra*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 233-237.

Hoyo, J., Guaus, E., Torrent-Burgués, J. (2016). Monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol role, physical states, applications, and biomimetic monolayer films. *European Physical Journal E*, 39, 39.

Hussein, R.A. y El-Anssary, A.A. (2018). Plant Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants, en: Herbal Medicine, Builders, P.F. (Ed.). Intech Open, London, pp.11-30.

Jayaprakasam, B., Zhang, Y., Nair, M.G. (2004). Tumor cell proliferation and cyclooxygenase enzyme inhibitory compounds in *Amaranthus tricolor*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6939-6943.

Koolen, H.H.F., Pral, E.M.F., Alfieri, S.C., Marinho, J.V.N., Serain, A.F., Hernández-Tasco, A.J., Andreazza, N.L., Salvador, M.J. (2017). Antiprotozoal and antioxidant alkaloids from *Alternanthera littoralis*. *Phytochemistry*, 134, 106-113.

Kuete, V., Fozing, D.C., Kapche, W.F.G.D., Mbaveng, A.T., Kuiate, J.R., Ngadjui, B.T., Abegaz, B.M. (2009). Antimicrobial activity of the methanolic extract compounds from *Morus mesozygia* stem bark. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 551-555.

Kuete, V., Mbaveng, A.T., Zeino, M., Fozing, C.D., Ngameni, B., Kapche, W.F.G.D., Ngadjui, B.T., Efferth, T. (2015). Cytotoxicity of three naturally occurring flavonoid derived compounds (artocarpesin, cycloartocarpesin and isobavachalcone) towards multi-factorial drug-resistant cancer cells. *Phytomedicine*, 22, 1096-1102.

Kumar, P., Lodge, R., Trudel, N., Ouellet, M., Ouellette, M., Tremblay, M.J. (2010). Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated, caspase-independent apoptosis in *Leishmania* amastigotes. *Neglected Tropical Diseases*, 4, 1-11.

Kyriazis, J.D., Aligiannis, N., Polychronopoulos, P., Skaltsounis, A.L., Dotsika, E. (2013). Leishmanicidal activity assessment of olive tree extracts. *Phytomedicine*, 20, 275-281.

Lee, D., Kim, K.H., Lee, J., Hwang, G.S., Lee, H.L., Hahm, D.H., Huh, C.K., Lee, S.C., Lee, S., Kang, K.S. (2017). Protective effect of cirsimaritin against streptozotocin-induced apoptosis in pancreatic beta cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69, 875-883.

Lentz, D.L., Clark, A.M., Hufford, C.D., Meurer-Grimes, B., Passreiter, C.M., Cordero, J., Ibrahimi, O., Okunade, A.L. (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 63,253-263.

Lin, C.-F., Huang, Y.-L., Cheng, L.-Y., Sheu, S.-J., Chen, C.-C. (2006). Bioactive flavonoids from *Ruellia tuberosa*. *Journal of Chinese Medicine*, 17,103-109.

Ma, Q.-G., Wen, R.-R., Liu, W.-M., Sang, Z.-P., Zhang, S., Wang, Q.-Q., Feng, Z.-W., Li, L.-J., Li, Y.-P. (2016). Studies on flavonoids from *Cirsium setosum*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 41, 868-873. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28875641/

Manzo, E., Ciavatta, M.L., Pagano, D., Fontana, A. (2012). An efficient and versatile chemical synthesis of bioactive glyco-glycerolipids. *Tetrahedron Letters,* 53,879-881.

Martín-Quintal, Z., García-Miss, M. del R., Mut-Martín, M., Matus-Moo, A., Torres-Tapia, L., Peraza-Sánchez, S.R. (2010). The leishmanicidal effect of (3*S*)-16,17-didehydrofalcarinol, an oxylipin isolated from *Tridax procumbens*, is independent of NO production. *Phytotherapy Research*, 24, 1004-1008.

Meurer-Grimes, B., McBeth, D.L., Hallihan, B., Delph, S. (1996). Antimicrobial activity in medicinal plants of the Scrophulariaceae and Acanthaceae. *International Journal of Pharmacognosy*, 34, 243-248.

Miró-Casas, E., Covas, M.I., Fitó, M., Farré-Albadelejo, M., Marrugat, J., De la Torre, R. (2003). Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 186-190.

Mishra, B.B., Kale, R.R., Singh, R.K., Tiwari, V.K. (2009). Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, 80, 81-90.

Monjane, J.A., Capusiri, D., Giménez, A., Sterner, O. (2018). Leishmanicidal activity of onopordopicrin isolated from the leaves of *Brachylaena discolor*. *Tropical Journal of Natural Product Research*, 2, 328-331.

Muñoz, A.M., Pareja, B. (2003). Plantas medicinales empleadas en el tratamiento de la leishmaniasis. *Folia Dermatológica Peruana*, 14, 10-14. Revista digital https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/folia/vol14_n3/dermofar.htm [Acceso 10 mayo 2018].

Nagle, A.S., Khare, S., Kumar, A.B., Supek, F., Buchynskyy, A., Mathison, C.J.N., Chennamaneni, N.K., Pendem, N., Buckner, F.S., Gelb, M.H., Molteni, V. (2014). Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chemical Reviews*, 114, 11305-11347.

Navin, T.R., Arana, B.A., Arana, F.E., Berman, J.D., Chajón, J.F. (1992). Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Journal of Infectious Diseases*, 165, 528-534.

Oliver, M., Badaró, R., Medrano, F.J., Moreno, J. (2003). The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 97, S79-S98.

Ospina, V.E, Mantilla, J.C., Conde, C.A., Escobar, P. (2014). Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. *Revista Ciencias de la Salud*, 12, 195-211.

Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46, 976-988.

Pace, D. (2014). Leishmaniasis. *Journal of Infection*, 69, S10-S18.

Pan American Health Organization/World Health Organization (2019). Manual of procedures for leishmaniases surveillance and control in the Americas. https://iris.paho.org/handle/10665.2/51838 [Acceso 1 agosto 2021].

Pattanayak, P., Behera, P., Das, D., Panda, S.K. (2010). *Ocimum sanctum* Linn. A reservoir plant for therapeutic applications: an overview. *Pharmacognosy Reviews*, 4, 95-105.

Peniche-Pavía, H., Medrano-Náhuat, D., Torres-Tapia, L.W., Mut-Martín, M., García-Miss, R., Peraza-Sánchez, S.R. (2016). Metabolites isolated from the rhizomes of *Dorstenia contrajerva* with anti-leishmanial activity. *Phytochemistry Letters*, 18, 140-143.

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.

Peraza-Sánchez, S.R., Poot-Kantún, S., Torres-Tapia, L.W., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Cedillo-Rivera, R. (2005). Screening of native plants from Yucatan for anti-*Giardia lamblia* activity. *Pharmaceutical Biology*, 43, 594-598.

Perrone, J., Sampaio, C.E., De Oliveira, A.L., Bittencourt, D., Sampaio, P. (2015). Advances in development of new treatment for leishmaniasis. *BioMed Research International*, 2015, 1-11.

Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., Kotronoulas, A., Pujadas, M., Pastor, A., Olesti, E., Pérez-Mañá, C., Khymenets O., Fitó, M., Ferré, M., De la Torre, R. (2016). Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metabolism Reviews*, 48, 1-19.

Sáenz, D. (2004). Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales. *Fármacos*, 16, 13-20.

Saenz, R.E., Paz, H., Berman, J.D. (1990). Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *The American Journal of Medicine*, 89, 147-155.

Salamanca, E., Ruiz, G., Ticona, J.C., Giménez, A. (2008). Método colorimétrico-XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *Biofarbo*, 16, 21-27.

Samuel, S.M., Thirunavukkarasu, M., Penumathsa, S.V., Paul, D., Maulik, N. (2008). Akt/FOXO3a/SIRT1 mediated cardioprotection by n-tyrosol against ischemic stress in rat *in vivo* model of myocardial infarction: switching gears towards survival and longevity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9692-9698.

Sánchez-Saldaña, L., Sáenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., Zegarra-Del-Carpio, R., Garcés-Velasco, N., Regis-Roggero, A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*, 14, 82-98.

Sebaugh, J. (2011). Guidelines for accurate EC_{50}/IC_{50} estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10, 128-134.

Sen, A. Turan, S.O., Bitis, L. (2016). Bioactivity-guided isolation of anti-proliferative compounds from endemic *Centaurea kilaea*. *Pharmaceutical Biology*, 55, 541-546.

Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G, Maio I, Selvaggini R., Taticchi, A. (2014). Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*, 3, 1-23.

Shimizu, J.F., Lima, C.S., Pereira, C.M., Bittar, C., Batista, M.N., Nazaré, A.C., Polaquini C.R., Zothner, C., Harris, M., Rahal, P., Regasini, L.O., Jardim, A.C. (2017). Flavonoids from *Pterogyne nitens* inhibit hepatitis C virus entry. *Scientific Reports*, 7, 1-9.

Shin, M.-S., Park, J.Y., Lee, J., Yoo, H.H., Hahm, D.-H., Lee, S.C., Lee, S., Hwang, G.S., Jung, K., Kang, K.S. (2017). Anti-inflammatory effects and corresponding mechanisms of

cirsimaritin extracted from *Cirsium japonicum* var. *maackii* Maxim. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 3076-3080.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2017-2019). Histórico Boletín Epidemiológico. https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/historico-boletin-epidemiologico [Acceso 15 Julio 2021].

Sousa, S.C.O., Junior, C.G.L., Silva, F.P.L., Andrade, N.G., Barbosa, T.P., Vasconcellos, M.L.A.A. (2011). Microwave-promoted Morita-Baylis-Hillman reactions: efficient synthesis of new monoacylglycerols (MAGs) as potential anti-parasitic compounds. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 1634-1643.

Specian, V., Sarragiotto, M.H., Pamphile, J.A., Clemente, E. (2012). Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1174-1182.

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

Tovar-Miranda, R., Cortés-García, R., Santos-Sánchez, N.F., Joseph-Nathan, P. (1998). *Journal of Natural Products*, 61, 1216-1220.

Treyvaud, V., Arnason, J.T., Maquin, P., Cal, V., Sanchez, P., Poveda, L. (2005). A consensus ethnobotany of the Q'eqchi' maya of southern Belize. *Economic Botany*, 59, 29-42.

Troshchenko, A.T., Kutikova, G.A. (1967). Rhodioloside from *Rhodiola rosea* and Rh. quadrifida. I. *Chemistry of Natural Compounds*, 3, 204-207.

Valdivieso, E., Mejías, F., Carrillo, E., Sánchez, C., Moreno, J. (2018). Potentiation of the leishmanicidal activity of nelfinavir in combination with miltefosine or amphotericin B. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52, 682-687.

Vargas-Martínez, F., Torres-Guerrero, E., Arenas, R., Quintanilla-Cedillo, M.R. (2011). Leishmaniasis en México. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 39, 163-183.

Visioli, F., Bernardini, E. (2011). Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 786-804.

World Health Organization (2019). Leishmaniasis. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis [Acceso: 1 agosto 2021].

Zaitsev, V.G., Makarova, G.V., Komissarenko, N.F. (1969). Sorbifolin a new flavone glycoside from *Sorbaria sorbifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 5, 423-426.