



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS
CON ACTIVIDAD LEISHMANICIDA AISLADOS DE LA
CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia***

Tesis que presenta

JOSÉ LISANDRO MENDOZA MUNGUÍA

En opción al título de

MAESTRO 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 **José Lisandro Mendoza Munguía** titulado "Elucidación estructural de metabolitos con actividad leishmanicida aislados de la corteza de *Byrsonima crassifolia*" fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez** dentro de la opción de **Biotecnología**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro y en el Laboratorio de Inmunología del **Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi"** de la **Universidad Autónoma de Yucatán** bajo la co-dirección de la **M. en C. Erika Ivett Sosa Bibiano**.

Atentamente.

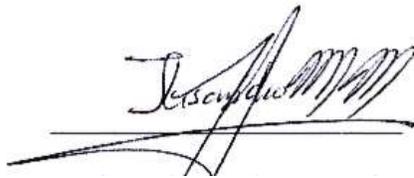


Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de abril de 2022.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



José Lisandro Mendoza Munguía

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán bajo la dirección del Dr. Sergio R. Peraza Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con número 1020732 para poder llevar a cabo mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por la formación académica y las facilidades brindadas en el Laboratorio de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología.

Al Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigaciones Regionales (CIR) “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), por el espacio brindado en sus instalaciones para el desarrollo del proyecto.

A mis directores de tesis Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez y M. en C. Erika Ivett Sosa Bibiano, por la confianza brindada al permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por sus valiosos aportes de carácter científico y moral para la culminación exitosa del posgrado.

A las integrantes del comité tutorial, Dra. Elsy Nalleli Loría Cervera y Dra. Blanca Marina Vera Ku, por sus conocimientos, opiniones y valiosos consejos brindados durante el desarrollo del proceso de investigación.

A la Dra. Marcela Gamboa Angulo del CICY, por sus consejos y sugerencias en la revisión del manuscrito de tesis.

Al M. en C. Luis Wiliunfo Torres Tapia, por el tiempo dedicado a la enseñanza de los métodos cromatográficos en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del CICY para el cumplimiento de los objetivos planteados.

A la Q.F.B. Karina Beatriz López Ávila, del CIR-UADY, por todos los conocimientos impartidos en el desarrollo de los ensayos biológicos.

A mis amigos: Carlos Castillo, Diana Soto, Karla Castro, Ana Carrillo, Grecia Sumano, Roger Sulub, Ángel Rivas, Neptis Estrada, Mario Noh, Ashanty Calderón, José Ojeda, Carlos Castañeda, Andrés Mauricio, Gerardo Parra, por su constante apoyo y gratificantes consejos que han hecho tan amena mi estancia en este maravilloso país.

DEDICATORIAS

Al creador de todas las cosas, que me ha dado la vida, salud, amor, familia y fortaleza para seguir adelante; por ello con todo el agradecimiento que mi corazón pueda emanar quiero dedicar este trabajo primeramente a Dios.

De igual forma, dedico esta tesis a mis amados padres Argentina y Lisandro que han sabido formarme con valores y buenos hábitos para ser un hombre de bien; fuentes inagotables de consejos cuando los he necesitado. A mis hermanos Carlos, Sergio y Nohelia, cuyo apoyo fue incondicional durante mis años de estudio.

Diego Andrés, mi amado campeón, posiblemente ahora no entiendas mis palabras, pero para cuando seas capaz, quiero que sepas lo importante que eres en mi vida; enano fuiste mi motivación más grande para concluir este proyecto.

Agradezco a la vida por darme los mejores amigos que pude haber tenido: Gabriela Cáliz, Esly Euceda, Bryan Ortiz, Héctor Ventura, Carlos López, Kimberly García, Josselyn Duarte, Gloria Argueta, Kateryn Aguilar, Isis Figueroa, Gustavo Fontecha, Carolina Portillo, Izaac Ordoñez; gracias hermanos por siempre estar para mí.

A mis docentes universitarios, familiares, amigos, colegas y compañeros.

A todos, gracias.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

- Participación en el I Simposio virtual “Fortaleciendo el Conocimiento Científico de las Ciencias Farmacéuticas” y I Jornada Virtual de Investigación Científica, organizado por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras. 16 de marzo de 2021.
 - Escritura del artículo de revisión “*Byrsonima crassifolia*. Una revisión fitoquímica y etnofarmacológica”. Estado: Proceso de escritura.
-

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
JUSTIFICACIÓN	26
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
CAPÍTULO II	30
AISLAMIENTO DE METABOLITOS Y MEZCLAS DE LA CORTEZA DE <i>Byrsonima crassifolia</i>	30
2.1 Introducción	30
2.2 Materiales y métodos	30
2.3 Resultados.....	32
2.4 Discusión	43
CAPÍTULO III	46
ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA PROMASTIGOTES DE <i>Leishmania (L.) mexicana</i> DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES DE LA CORTEZA DE <i>Byrsonima crassifolia</i>	46
3.1 Introducción	46
3.2 Materiales y métodos	47
3.3 Resultados.....	52
3.4 Discusión	55
CAPÍTULO IV.....	60

IDENTIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS Y MEZCLAS AISLADOS DE <i>Byrsonima crassifolia</i>	60
4.1 Introducción	60
4.2 Materiales y métodos	60
4.3 Resultados	62
4.4 Discusión	74
CAPÍTULO V	76
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	76
REFERENCIAS	79
ANEXOS	88

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
An	Acetona
BcC	<i>Byrsonima crassifolia</i> corteza
CG-EM	Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas
CLV	Cromatografía líquida al vacío
CCG	Cromatografía de columna por gravedad
CET	Cromatografía por exclusión de tamaño con Sephadex LH-20
CCF	Cromatografía de columna flash
CCD	Cromatografía de capa delgada
CPP	Cromatografía en placa preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50 / Concentración inhibitoria media
COSY	Correlation spectroscopy
DCM	Diclorometano
DEPT-135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ETD	Enfermedad tropical desatendida
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
Hx	Hexano
IR	Espectrofotometría de infrarrojo
LC	Leishmaniasis cutánea
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
OMS	Organización Mundial de la Salud

OPS	Organización Panamericana de la Salud
ppm	Partes por millón
PBS	Phosphate buffered saline/tampón fosfato salino
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)
SFB	Suero fetal bovino
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
t_R	Tiempo de retención

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Huaco mochica que muestra la mutilación de la nariz y el labio superior sugestiva de leishmaniasis mucocutánea.	4
Figura 1.2 Número de casos de LC/LM en México y Centroamérica 2012-2018.	5
Figura 1.3 Ciclo biológico de leishmaniasis.....	10
Figura 1.4 Mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes.	14
Figura 1.5 Estructuras químicas de los metabolitos secundarios aislados de <i>Byrsonima crassifolia</i>	25
Figura 2.1 Procesamiento de <i>B. crassifolia</i> . A/B. Descortezado de tallos y ramas. C. Secado de la corteza. D. Extracción metanólica. E. Concentrado del extracto. F. Extracto metanólico.....	33
Figura 2.2 Fraccionamiento del extracto metanólico de corteza <i>B. crassifolia</i> . A. Partición líquido-líquido. B. Fracciones obtenidas.	33
Figura 2.3 Placas CCD corridas con las fracciones del extracto BcC-1a de la corteza de <i>B. crassifolia</i> obtenidas por partición líquido-líquido. A la izquierda revelado bajo luz UV a 365 nm. A la derecha revelado con ácido fosfomolibdico (sistema: hexano/acetona (7:3). 1a: Extracto metanólico, 2a: Fracción hexánica, 2b: Fracción diclorometano, 2c: Fracción acetato de etilo, 2d: Fracción acuosa.	34
Figura 2.4 Fracciones obtenidas a partir de BcC-2b.....	35
Figura 2.5 Análisis cromatográfico de las fracciones BcC-3a - BcC-3l. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.	36
Figura 2.6 Fracciones obtenidas a partir de BcC-3f.....	37
Figura 2.7 Análisis cromatográfico de las fracciones BcC-4a - BcC-4l. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.	38
Figura 2.8 Análisis cromatográfico de las fracciones BcC-6a - BcC-6h. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.	39
Figura 2.9 Análisis cromatográfico del compuesto 1 (BcC-6b1). Placa revelada con ácido fosfomolibdico.	40
Figura 2.10 Análisis cromatográfico del compuesto 2 (BcC-6g1) y la mezcla 5 (BcC-6g5). Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.	40
Figura 2.11 Análisis cromatográfico de las fracciones BcC-3a - BcC-3f. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.	42
Figura 2.12 Análisis cromatográfico de los compuestos 3 BcC-3c1, 4 BcC-3c2 y la mezcla 6 BcC-3c3. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.	42
Figura 2.13 Flujoograma de trabajo del proceso de aislamiento cromatográfico de metabolitos con actividad leishmanicida aislados de la corteza de <i>Byrsonima crassifolia</i>	43
Figura 3.1 Esquema de la cámara de Neubauer.	48
Figura 3.2 Esquema de la distribución de las muestras en la microplaca.	49

Figura 3.3 Reducción del 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfopenil)-2-H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) a formazán.....	50
Figura 4.1 Cromatograma de gases y CCD de la muestra BcC-6b1 (1).....	62
Figura 4.2 Cromatograma de gases y CCD de BcC-6g1 (2).....	72
Figura 4.3 RMN- ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) del compuesto 2 (BcC-6g1).	64
Figura 4.4 RMN- ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) del compuesto 2 (BcC-6g1).	65
Figura 4.5 Análisis de correlaciones del experimento HMBC del compuesto 2 (BcC-6g1).	66
Figura 4.6 Estructura y principales correlaciones en HMBC de crassifolín (2 , BcC-6g1).	67
Figura 4.7 Cromatograma en CG y CCD de la muestra BcC-3c1 (3).	68
Figura 4.8 Espectro de masas obtenidos por CG-EM mostrando el patrón de fragmentación del compuesto 3 (BcC-3c1).	69
Figura 4.9 Estructura del compuesto 3 (3β-friedelanol, BcC-3c1).	69
Figura 4.10 Cromatograma de gases y CCD del compuesto 4 (BcC-3c2).	71
Figura 4.11 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la friedelina (4 , BcC-3c2).	72
Figura 4.12 Cromatograma de gases y CCD de la mezcla de compuestos de la mezcla 5 (BcC-6g3). ...	72
Figura 4.13 Cromatograma obtenido por CG-EM y CCD de la mezcla 6 (BcC-3c3).	73
Figura 4.14 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la α-amirina.	74
Figura 4.15 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la β-amirina.	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Especies de <i>Leishmania</i> aisladas en humanos en América.	8
Tabla 1.2 Fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis.	12
Tabla 1.3 Metabolitos importantes provenientes de plantas medicinales.	16
Tabla 1.4 Perfil fitoquímico de <i>Byrsonima crassifolia</i> y sus propiedades farmacológicas.	20
Tabla 2.1 Pesos y rendimientos de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido del extracto metanólico (BcC-1a).*	33
Tabla 2.2 Pesos y rendimientos de las fracciones de la BcC-2b obtenidas por CLV.	35
Tabla 2.3 Pesos y rendimientos de las fracciones de BcC-3f obtenidos por CCF.	37
Tabla 2.4 Pesos de las fracciones obtenidas por columna Sephadex de la fracción BcC-4e.	39
Tabla 3.1 Resultado del bioensayo del extracto metanólico (BcC-1a).	52
Tabla 3.2 Resultado del bioensayo de las fracciones BcC-2a - BcC-2d.	53
Tabla 3.3 Resultados de la actividad leishmanicida de metabolitos aislados de la corteza de <i>B. crassifolia</i>	54
Tabla 4.1 Datos de los experimentos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C y sus correlaciones en HMBC del compuesto 2 (BcC-6g1).*	66
Tabla 4.2 Análisis comparativo del desplazamiento químico en RMN- ¹³ C del 3β-friedelanol y el compuesto 3 (BcC-3c1).....	69

RESUMEN

Los protozoarios del género *Leishmania* son responsables del complejo de enfermedades zoonóticas conocidas como leishmaniasis; éstos son transmitidos a los humanos por la picadura de un vector hematófago de la subfamilia Phlebotominae. La enfermedad puede producir lesiones mutilantes en el paciente y se presenta en tres formas principales: cutánea (localizada y difusa), mucocutánea y visceral. La OMS señala que ocurren entre 700,000 y un millón de casos nuevos al año. El control y la erradicación de esta enfermedad se obstaculizan debido a diversos factores socioeconómicos en las áreas de prevalencia; sumado a eso, la farmacoterapia actualmente utilizada ocasiona diversos efectos secundarios. En el Centro de Investigación Científica de Yucatán se han investigado plantas medicinales contra enfermedades parasitarias. Los resultados obtenidos han mostrado que el extracto metanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Malpighiaceae) tiene buena actividad leishmanicida, lo que se ha demostrado a través de bioensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania (Leishmania) mexicana*. En este trabajo, el extracto metanólico vegetal fue sometido a separación líquido-líquido por polaridad ascendente obteniéndose las fracciones: hexánica, diclorometano, acetato de etilo y acuosa. Estas fracciones fueron evaluadas en un bioensayo y se observó mayor actividad antiparasitaria en la fracción diclorometánica. El aislamiento de metabolitos de la fracción más activa fue guiado mediante bioensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento de promastigotes de *L. (L.) mexicana*. Producto de la separación cromatográfica fue posible el aislamiento de cuatro compuestos: **1** (BcC-6b1), **2** (BcC-6g1), **3** (3 β -friedelanol), **4** (friedelina) y dos mezclas: **5** (BcC-6g3) y **6** (α -amirina/ β -amirina). Las estructuras de estos compuestos se elucidaron con el uso de métodos espectroscópicos y espectrométricos y se compararon con los datos publicados en la literatura científica. La actividad leishmanicida de las mezclas y metabolitos aislados del extracto metanólico de la corteza de *B. crassifolia* fue variable. En los compuestos puros la concentración media inhibitoria (CI₅₀) varió entre 3.5-4.4 μ g/mL. Se reporta por primera vez la estructura del compuesto **2** (crassifolín), el cual presentó buena actividad antiparasitaria. Se evaluó por primera vez la actividad *in vitro* de los compuestos **3** y **4** y la mezcla **6** contra promastigotes de *L. (L.) mexicana*. Asimismo, se demuestra la presencia de los triterpenos pentacíclicos 3 β -friedelanol (**3**) y friedelina (**4**) en la corteza de *B. crassifolia*.

ABSTRACT

The protozoa of the genus *Leishmania* are responsible for the complex of zoonotic diseases known as leishmaniasis; these are transmitted to humans by the bite of a hematophagous vector of the Phlebotominae subfamily. The disease can produce mutilating lesions in the patient and occurs in three main forms: cutaneous (localized and diffuse), mucocutaneous, and visceral. WHO notes that between 700,000 and one million new cases occur annually. The control and eradication of this disease are hampered due to various socioeconomic factors in the prevalence areas; in addition to this, the pharmacotherapy currently used causes various side effects. Medicinal plants against parasitic diseases have been investigated at the Yucatan Scientific Research Center. The results obtained have shown that the methanolic extract of the bark of *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth (Malpighiaceae) has good leishmanicidal activity, which has been demonstrated through *in vitro* bioassays to inhibit the growth of promastigotes of *Leishmania (Leishmania) mexicana*. In this work, the plant methanolic extract was subjected to liquid-liquid separation by ascending polarity, obtaining the fractions: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and aqueous. These fractions were evaluated in a bioassay and greater antiparasitic activity was observed in the dichloromethane fraction. The isolation of metabolites from the most active fraction was guided by *in vitro* growth inhibition bioassays of *L. (L.) mexicana* promastigotes. As a result of the chromatographic separation, it was possible to isolate four compounds: **1** (BcC-6b1), **2** (BcC-6g1), **3** (3 β -friedelanol), **4** (friedelin) and two mixtures: **5** (BcC-6g3) and **6** (α -amyrin/ β -amyrin). The structures of these compounds were elucidated with the use of spectroscopic and spectrometric methods and compared with the data published in the scientific literature. The leishmanicidal activity of the mixtures and metabolites isolated from the methanolic extract of the bark of *B. crassifolia* was variable. In the pure compounds, the mean inhibitory concentration (IC₅₀) ranged between 3.5-4.4 μ g/mL. The structure of compound **2** (crassifolin) is reported for the first time, which presented good antiparasitic activity. The *in vitro* activity of compounds **3** and **4** and mixture **6** against promastigotes of *L. (L.) mexicana* was evaluated for the first time. Likewise, the presence of the pentacyclic triterpenes 3 β -friedelanol (**3**) and friedelin (**4**) is demonstrated in the bark of *B. crassifolia*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas de origen parasitario constituyen un problema socioeconómico y de salud, que causan un impacto negativo porque afecta la actividad productiva y aumenta la pobreza. La leishmaniasis es un complejo de enfermedades consecutivas a la infección producida por protozoos del género *Leishmania*, que parasitan las células del sistema reticuloendotelial. De las especies pertenecientes al género, al menos 20 son patógenas para el ser humano. Los parásitos son transmitidos por la picadura de las hembras de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. El reservorio lo constituyen generalmente mamíferos salvajes o domésticos, aunque también puede ser considerada una infección antropozoonótica.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó esta parasitosis como una enfermedad tropical desatendida (ETD), entendiéndose éstas como un conjunto de enfermedades infecciosas, que afectan principalmente a las poblaciones más pobres y con limitado acceso a los servicios de salud, especialmente aquellos que viven en áreas rurales remotas y en barrios marginales, asociada a la malnutrición, desplazamientos de población, malas condiciones de vivienda y debilidad del sistema inmunitario. La leishmaniasis afecta a alrededor de 98 países y aproximadamente 350 millones de personas corren el riesgo de contraer la enfermedad y se estima que cada año se producen entre 0.9-1.6 millones de casos nuevos con un promedio de 20,000 a 30,000 defunciones (OMS, 2019).

La quimioterapia que se usa en el tratamiento de estas enfermedades presenta fallas y limitaciones. Actualmente, el fracaso del tratamiento se relaciona con la resistencia del parásito, la toxicidad que presenta la droga y el difícil acceso por parte de las comunidades rurales. Esto ha llevado a la OMS a enfatizar en la necesidad de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis (Chawla y Madhubala, 2010).

La información respecto al uso de plantas en la medicina tradicional ha sido de un interés considerable para la adquisición de nuevos y mejores productos farmacéuticos. Se estima que cerca del 90% de todas las especies de plantas todavía no se ha estudiado para determinar su potencial como agentes leishmanicidas. México es reconocido por poseer una biodiversidad muy rica, que incluye más de 20,000 especies de plantas, de éstas, 7,000 son de uso común en la práctica de la medicina tradicional, con 800 de ellas reconocidas como plantas medicinales en la península de Yucatán. Sin embargo, menos del 2% de las especies de plantas

clasificadas como medicinales ha sido examinado desde una perspectiva fitoquímica o farmacológica (Getti *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Peraza-Sánchez *et al.* (2007) se reportó que el extracto metanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* mostró buena actividad *in vitro* (CI₅₀ = 14 µg/mL) contra promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*. *Byrsonima crassifolia* es un árbol tropical de la familia Malpighiaceae encontrado desde México hasta América del Sur. Por sus propiedades curativas, desde tiempos remotos las hojas y corteza son utilizadas en medicina tradicional para tratar la tos, trastornos gastrointestinales, infecciones ginecológicas y de la piel; asimismo, existen reportes de efectividad contra las mordeduras de serpiente (Herrera-Ruiz *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta las propiedades evaluadas de *B. crassifolia* y su potencial como un agente quimioterapéutico, en esta investigación se efectuó el estudio de la corteza de esta especie, purificando los metabolitos secundarios de manera biodirigida con el objetivo de aislar y elucidar aquellos compuestos con actividad leishmanicida.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Leishmaniasis

La leishmaniasis es un complejo de enfermedades causadas por protozoarios del género *Leishmania* del cual cerca de 22 especies son patógenas para el hombre. Estos parásitos son transmitidos por la picadura de moscas hembra hematófagas, pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae. En América, los principales vectores son especies del género *Lutzomyia*, en tanto que en África, Asia y Europa prevalece el género *Phlebotomus* (CDC, 2018). La leishmaniasis incluye un amplio rango de manifestaciones clínicas, entre ellas, se encuentran la leishmaniasis visceral (LV), también conocida como Kala-azar, la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y la mucocutánea (LMC) (OMS, 2019).

El parásito debe su nombre al investigador escocés William Boog Leishman (1865-1926), quien en 1903 lo describió en un frotis de tejido de bazo, que pertenecía a un soldado inglés fallecido a causa de enfermedades que habría contraído en la India (Steverding, 2017).

Los primeros reportes de lesiones que hacen referencia a la leishmaniasis cutánea humana se remontan al año 2500 a.C., cuya descripción fue encontrada en antiguas escrituras del Viejo Mundo. En el continente americano, la leishmaniasis tampoco es algo nuevo, los hallazgos más antiguos datan de 2000 a.C. en una momia de una niña de aproximadamente seis años en Perú (Akhoundi *et al.*, 2016; Altamirano-Enciso *et al.*, 2003). También existen diseños de lesiones desfigurativas reminiscentes a leishmaniasis mucocutánea en cerámicas precolombinas del siglo V d.C. (Figura 1.1) (Tuon *et al.*, 2008). Asimismo, durante la colonización de América, tanto los conquistadores como los misioneros, detallaron lesiones similares a LMC en trabajadores de plantaciones de coca en los Andes peruanos (Armúa-Fernández y Venzal, 2019).



Figura 1.1 Huaco mochica que muestra la mutilación de la nariz y el labio superior sugestiva de leishmaniasis mucocutánea.

La LCL es una enfermedad endémica del sur de México, y su agente causal es *Leishmania* (L.) *mexicana*. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en la península de Yucatán en el año 1912 por el investigador danés Harald Seidelin. En 1953, Biagi reconoce al género *Leishmania* como agente causal de la enfermedad, nombrándolo como *Leishmania tropica mexicana*. Años más tarde, en 1962, Garnham la renombró como *Leishmania mexicana*, nombre con el que es conocida la especie hasta la fecha (Andrade-Narváez *et al.*, 2001).

1.2 Epidemiología de la leishmaniasis

La OMS clasificó esta parasitosis como una enfermedad tropical desatendida (ETD), entendiéndose éstas como un conjunto de enfermedades infecciosas, muchas de ellas parasitarias que afectan principalmente a las poblaciones más pobres y con limitado acceso a los servicios de salud, especialmente aquellos que viven en áreas rurales remotas y en barrios marginales, asociada a la malnutrición, los desplazamientos de población, las malas condiciones de vivienda y la debilidad del sistema inmunitario (OMS, 2019). Aproximadamente, 350 millones de personas corren el riesgo de contraer la enfermedad y se estima que cada año se producen entre 0.9-1.6 millones de casos nuevos con un promedio de 20,000 a 30,000 defunciones (OMS, 2019).

La leishmaniasis se encuentra presente aproximadamente en 98 países de todos los continentes, excepto Oceanía y la Antártida (CDC, 2018). En el Viejo Mundo (hemisferio

oriental), la leishmaniasis se encuentra en algunas partes de Asia, Medio Oriente, África (particularmente en la región tropical y el norte), además se reportan casos en el sur de Europa (Riera *et al.*, 2016; Katakura, 2009; Lysenko, 1971). El 95% de los casos de LC ocurre entre las Américas, el Mediterráneo y el Centro/Medio Este de Asia.

La leishmaniasis se registra en 18 países del continente americano (Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Guyana Francesa, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam y Venezuela), siendo la forma cutánea la más reportada. Se registra un promedio de 56,000 casos de LC y LMC, por su parte se reportan 3,800 casos de LV anualmente (OMS, 2019).

En el área comprendida desde México hasta Panamá se observó una leve tendencia a la disminución de casos en 2018 (con respecto al año anterior), lo que se evidencia en la reducción de casos reportados en la mayoría de los países, con excepción de El Salvador y Guatemala. La tendencia desde 2012 hasta 2018 en dichos países presenta un patrón estable en el número de casos, exceptuando a lo ocurrido en Nicaragua en 2016 (Figura 1.2) (OMS, 2019).

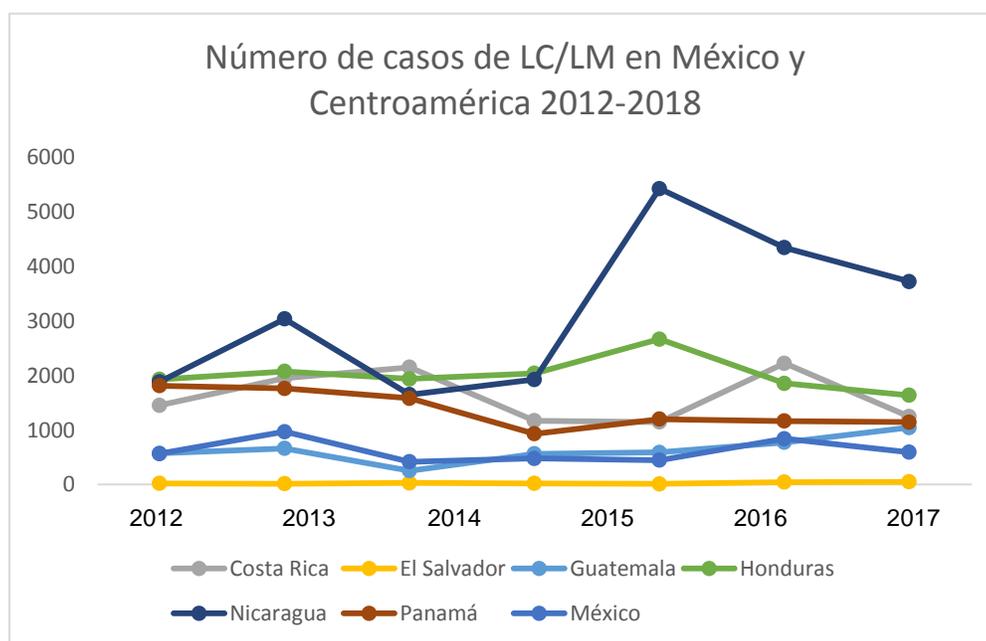


Figura 1.2 Número de casos de LC/LM en México y Centroamérica 2012-2018.

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Secretaría de Salud de México reportó 1,234 casos nuevos de leishmaniasis cutánea en 2019. El 97.4% de estos casos fue diagnosticado en la región sureste del país, siendo los estados de Campeche, Chiapas, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán los que presentan los mayores índices de incidencia (SINAVE, 2020). En esta misma región geográfica, en el periodo comprendido entre los meses de noviembre a marzo se reporta el aumento del riesgo de infección de la enfermedad, lo que coincidía con la época en que los “chicleros” o los trabajadores del campo que recolectaban la savia/chicle de *Manilkara zapota*, conocido en la región como chapote, chicozapote o zapote de abejas.

Los vectores con mayor relevancia epidemiológica en la península de Yucatán son *Bichromomyia olmeca olmeca* (antes conocida como *Lutzomyia olmeca olmeca*), *Lu. cruciata*, *Lu. panamensis*, *Lu. shannoni* y *Lu. Ylephiletor* (Pech-May *et al.*, 2016). Se considera que la especie *B. olmeca olmeca* es el principal vector de la parasitosis en la región debido a sus hábitos antropofílicos, coexistiendo con reservorios tales como *Otodylomys phyllotys* y *Peromyscus yucatanicus* (Loría-Cervera *et al.*, 2018).

A nivel nacional hasta la semana epidemiológica número 53 de 2020 se han reportado 304 casos de leishmaniasis cutánea (SINAVE, 2020). Es posible que los casos sean superiores a los reportados por las autoridades en la materia, ya que la leishmaniasis es una enfermedad que ocurre principalmente en comunidades marginadas y de bajos recursos, lo que dificulta el acceso a los servicios de salud y por lo tanto el correcto diagnóstico y adecuado tratamiento.

1.3 Determinantes sociales de la leishmaniasis

El aumento en el número de casos de leishmaniasis observados durante los últimos 25 años en todo el mundo se debe a varios factores culturales, ambientales y socioeconómicos, los cuales juegan un papel importante en la diseminación de la enfermedad. La deforestación y la penetración de los bosques por los humanos pueden conducir a la adaptación de los vectores para alimentarse de las personas y/o de animales domésticos cerca de asentamientos humanos (Armúa-Fernández y Venzal, 2019; Hotez *et al.*, 2020).

Las poblaciones indígenas corren un alto riesgo de padecer las ETD debido a la falta de atención médica, la pobreza extrema y el hecho de que sus tierras nativas a menudo se explotan para la minería, agricultura migratoria y otras causas de degradación del medio

ambiente. La globalización y el cambio climático son dos factores que contribuyen a la propagación de la leishmaniasis a zonas no endémicas. El calentamiento global podría conducir a una extensión de la distribución de los vectores más hacia el norte, lo que podría provocar la transmisión de leishmaniasis en regiones hasta ahora no endémicas en el futuro (Hotez *et al.*, 2020).

1.4 Clasificación taxonómica

El agente etiológico de la leishmaniasis es un protozooario dimórfico del género *Leishmania* que pertenece al reino Protista, subreino Protozoa, Phylum Euglenozoa, orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae.

La difícil clasificación de las múltiples especies y subespecies de *Leishmania* se realiza en función de su: 1) Biología: desarrollo en el flebótomo, crecimiento en medios de cultivo, desarrollo en los hospederos vertebrados; 2) Bioquímica: patrones isoenzimáticos, secuenciación de múltiples loci (multilocus enzyme typing); 3) Inmunología: análisis parasitario con anticuerpos monoclonales; 4) Filogenia molecular, entre otros (Fraga *et al.*, 2010).

El género *Leishmania* contempla más de 20 especies y con base en los criterios de clasificación anteriormente mencionados se han agrupado en cuatro subgéneros: *Leishmania*, que se reproduce en el intestino medio o anterior del vector, *Viannia* en el intestino posterior, medio y anterior de los flebótomos, *Sauroleishmania* (parasita a reptiles) y recientemente se reporta la existencia de un nuevo subgénero *Mundinia* (Espinosa *et al.*, 2018). Las especies y subespecies se agrupan dentro de complejos, siendo estas categorías taxonómicas que los agrupan basadas en similitudes genéticas. Algo característico del género *Leishmania* es que la manifestación clínica que desarrolle el hospedero infectado dependerá de la especie del parásito involucrado y además puede presentarse gran variabilidad entre individuos e incluso llegar a ser asintomática (Tabla 1.1) (Fraga *et al.*, 2010; Schönian *et al.*, 2010).

Tabla 1.1 Especies de *Leishmania* aisladas en humanos en América.

Subgénero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Especies	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoi</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhami</i>	<i>L. naiffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
	<i>L. colombiensis</i>			
Tropismo	Visceral	Cutáneo	Cutáneo	Mucocutánea

1.5 Biología de *Leishmania*

Las especies de *Leishmania* son protozoarios intracelulares dimórficos que en los hospederos mamíferos se localizan principalmente en macrófagos y células dendríticas (células de Langerhans en la piel).

El promastigote metacíclico, que es la forma infectiva, mide de 10 a 20 μm sin contar la longitud del flagelo que suele medir entre 15 y 25 μm . Los promastigotes son estructuras piriformes o fusiformes que presentan la extremidad posterior más delgada que la anterior, su cuerpo es flexible y se mueve por la acción de un flagelo libre situado en la parte posterior que es casi de igual tamaño que el cuerpo. El núcleo se localiza en el centro de la célula y el cinetoplasto en la porción anterior. Estas formas se encuentran en el intestino del insecto vector, se multiplican y migran a la parte anterior de su tracto digestivo y están allí hasta ser inoculadas en el hospedero (Sánchez-Saldaña, *et al.*, 2004; Bonfante y Barruela, 2002).

La otra forma es el amastigote, el cual está provisto de un núcleo central y un cinetoplasto de forma redondeada u ovoide, mide 2.5 a 5.0 por 1.5 a 2.0 μm , es un parásito intracelular de los macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial del hospedero vertebrado, carece de flagelo y de membrana ondulante, por lo tanto, es inmóvil (Figura 1.3) (Bonfante y Barruela, 2002).

Todas las especies del género *Leishmania* presentan un ciclo de vida similar, necesitando de dos hospederos para poder llevar a cabo su desarrollo, uno invertebrado que cumple su función como vector en donde se desarrollarán los promastigotes y otro mamífero el cual desarrollará la

entidad clínica mediante la proliferación de los amastigotes. Según el ambiente y el tipo de hospederos podemos encontrar tres tipos de ciclos: el primero, que es principalmente silvestre, en el que el parásito circula entre los reservorios naturales y mantiene el ciclo con la participación de los vectores propios de la zona endémica. En un segundo ciclo, los vectores infectados pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peridomésticos. Se puede producir un tercer ciclo, en el que el propio enfermo con leishmaniasis puede actuar como reservorio (Sánchez-Saldaña, *et al.*, 2004; Vannier-Santos *et al.*, 2002).

El ciclo empieza cuando el vector toma sangre de un vertebrado infectado para alimentarse e ingiere macrófagos con amastigotes, la transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 h (Figura 1.3) (OMS, 2019). Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared por hemidesmosomas. La localización del parásito en el intestino varía de acuerdo con cada especie de vector y de *Leishmania*. Después de la replicación en el intestino migran hacia la parte anterior del tracto digestivo, ubicándose a la altura de la probóscide; en los vectores excesivamente infectados, la probóscide está congestionada, lo que hace difícil alimentarse, por lo que la mosca realiza múltiples picaduras e inoculaciones (Bonfante y Barruela, 2002; Muskus *et al.*, 2002).

Además de los cambios morfológicos, el proceso de metaciclologénesis está relacionado con la síntesis de moléculas expresadas exclusiva o diferencialmente en el promastigote infectivo. Las moléculas mejor estudiadas, caracterizadas y asociadas con la metaciclologénesis son los lipofosfoglicanos (LPG) y la glicoproteína GP63, expresados abundantemente en la superficie de los promastigotes, los cuales sufren una notable disminución en el estadio de amastigote (Muskus *et al.*, 2002).

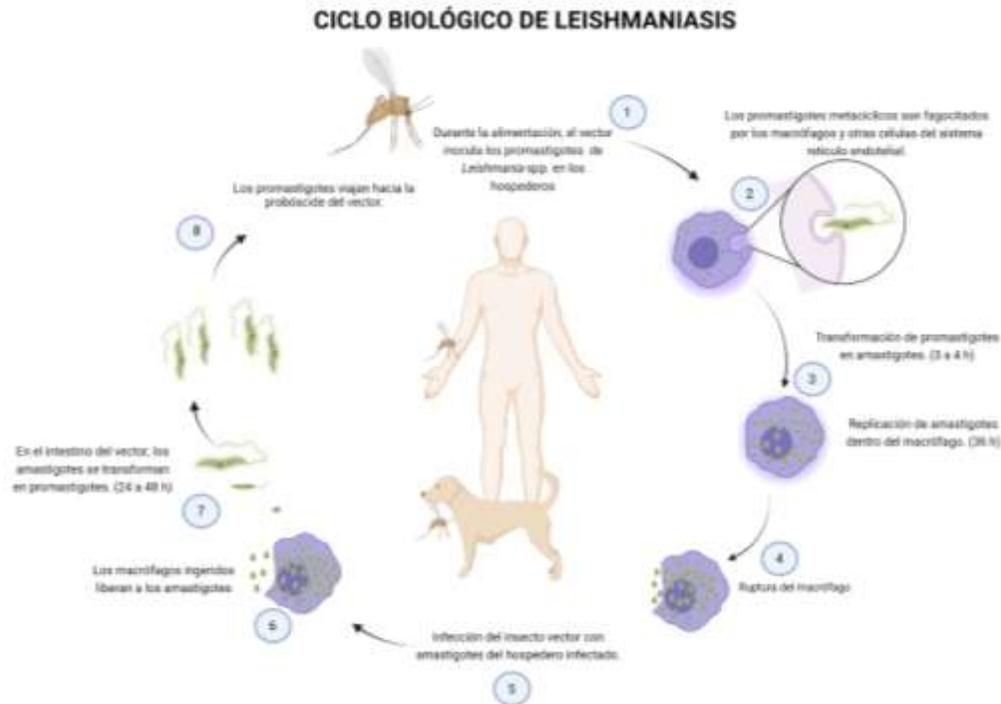


Figura 1.3 Ciclo biológico de leishmaniasis.

La saliva del mosquito tiene un papel en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados (Hall y Titus, 1995). Los promastigotes no migran activamente hacia los macrófagos, permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por la vía alternativa, que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, unos pocos se transforman en amastigotes en las células del sistema reticuloendotelial en un periodo de 3 a 4 h en promedio, permanecen en estadio estacionario por 36 h aproximadamente y luego empiezan a reproducirse (Sánchez-Saldaña *et al.*, 2004).

1.6 Tratamiento

El desarrollo de fármacos con acción leishmanicida se origina en 1909 cuando Gaspar Vianna, utilizando tártaro emético, logra la cura de pacientes con leishmaniasis cutánea y/o mucocutánea a pesar de que este medicamento causaba severos efectos secundarios en los pacientes. Posteriormente, Bramachari en 1920 sintetiza el primer antimonial pentavalente que producía menor toxicidad cardíaca, hepática y reducida afectación del sistema nervioso central. En la década de 1940 entran en el mercado farmacéutico los antimoniales pentavalentes, el

estibogluconato de sodio (Repodral®/Pentostam®) y la *N*-metilglucamina (Glucantime®) (Tabla 1.2) (Goodwin, 1995).

El tratamiento de la infección por *Leishmania* persigue varios objetivos: eliminar al parásito, disminuir la duración, intensidad y magnitud de la enfermedad, prevenir las manifestaciones mucosas tardías y la gravedad de la afección visceral e interrumpir el ciclo de transmisión vectorial (Vásquez de Ricciardi, 2009; Oliveira-Neto *et al.*, 1997). Existen dos modalidades para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, denominados tratamiento local y sistémico. El tratamiento local incluye métodos físicos tales como el uso de rayos infrarrojos, láser de dióxido de carbono, diatermocoagulación, criodisrupción, electroterapia y el curetaje o remoción quirúrgica, la administración intra o perilesional de drogas tales como los antimoniales pentavalentes, la disolución hipertónica de cloruro de sodio y los anestésicos locales del tipo lidocaína y el sulfato de zinc que han sido empleados en modelos experimentales con buena respuesta. Del mismo modo, se ha utilizado con éxito controversial la aplicación tópica de fármacos como ungüento de paramomicina o aminosidina, el ungüento de artesunato (Plasmotrim®) y otros preparados de aplicación local no convencionales (Vásquez de Ricciardi, 2009; Babajev *et al.*, 1991). Estas modalidades locales pueden ser empleadas sólo cuando existen pocas lesiones cutáneas (Najim *et al.*, 1998). El empleo de la terapia intralesional reduce la cantidad de droga requerida, el costo de la terapia y la aparición de efectos adversos (Oliveira-Neto *et al.*, 1997).

En muchos países de Latinoamérica (incluido México) el tratamiento utilizado para poder controlar la leishmaniasis es el Glucantime® el cual es administrado según lo descrito en la Tabla 1.2. Debido a los efectos secundarios causados por los medicamentos actuales y a las limitaciones en cuanto a su disponibilidad se genera la necesidad urgente de buscar nuevas drogas con acción leishmanicida. En esta búsqueda se deben encontrar nuevos fármacos que presenten menor riesgo de reacciones adversas en el paciente, reducción en el tiempo del tratamiento y mayor accesibilidad, ya que estos factores caracterizan los tratamientos actuales y evitan que éstos sean exitosos (Bezerra de Menezes *et al.*, 2015; Getti *et al.*, 2009).

Tabla 1.2 Fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis.

Fármaco	Composición química	Vía de administración*	Régimen terapéutico	Eficacia	Toxicidad
Antimoniales pentavalentes Glucantime® Pentostam®	Están constituidos por diferentes formas moleculares. En América Latina el antimonio de meglumina (Glucantime®) es producido por la reacción del antimonio pentavalente con <i>N</i> -metil-D-glucamina, que con el tiempo establece complejos de coordinación entre ambos, así cada átomo de antimonio está coordinado con al menos cuatro <i>N</i> -metil-D-glucamina hidroxilada	IV, IM	Antimonio de meglumina (Glucantime®) 20 mg/Kg/día/20 días.	35-95%	Cardiotoxicidad Pancreatitis Nefrotoxicidad Hepatotoxicidad Pancitopenia Fiebre Vómitos Hipopotasemia Teratogénesis Hiperglucemia Hipotensión Taquicardia
		IL	Aplicar con lidocaína en proporción 1:2/1 vez por semana/6-8 semanas.		
Anfotericina B Amphocil® AmBisome®	Es un macrólido heptaénico que contiene siete dobles enlaces conjugados en la posición <i>trans</i> y una amino-3,6-didesoximanosa (micosamina) unida al anillo principal por un enlace glucosídico.	IV	0.75-1 mg/Kg/día/15-20 días.	>90%	
Miltefosina	Es un fosfolípido sintético, análogo de alquilfosfolina, químicamente similar a los fosfolípidos naturales.	Oral	100-150 mg/día/28 días.	Asia 94% África 60-93%	
Paramomicina	Es un aminoglucósido de la familia de la neomicina/kanamicina que ha mostrado eficacia en el tratamiento de la leishmaniasis y de otras infecciones causadas por protozoos. Consiste en tres amino azúcares unidos por enlaces glucosídicos a un núcleo de 2 desoxiestreptamina central.	IM, Tópico	16-18 mg/Kg/día/21 días. 20 mg/día/Kg/17 días.	68-89%	
Pentamidina Pentan 300® Nebupent®	Compuesto que pertenece a la familia de las diamidinas aromáticas con carga positiva, en la forma de sal de di-isetionato.	IM	3 mg/Kg/día/12-15 días.	35-96%	

* Administración: IV: intravenoso, IM: intramuscular, IL: intralesional.

En Campeche, México, Vargas Gonzalez *et al.* (1999) evaluaron la respuesta de la úlcera del chiclero al tratamiento con antimonio de meglumina, en donde se evaluaron a 105 pacientes con el fármaco a una dosis diaria de una ampolla por día (425 mg de Sb^{5+}) administrada por vía intramuscular. Se logró la cicatrización de las úlceras en todos los pacientes del estudio, después de una media de 25 días (rango 5-60 días) de tratamiento. Los pacientes no manifestaron efectos secundarios y fueron seguidos durante al menos 12 meses después de la curación y ninguno mostró una recaída. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento empleado es eficaz para controlar la infección por *L. (L.) mexicana*.

Los antimoniales pentavalentes relativamente atóxicos actúan como pro-fármacos que son reducidos a la especie trivalente que es más tóxica y eficaz pues destruye los amastigotes dentro de los fagolisosomas macrofágicos. En fecha reciente se identificó una enzima, la reductasa de As^{5+} con capacidad de reducir Sb^{5+} a la forma Sb^{3+} (Vásquez de Ricciardi, 2009; Zhou *et al.*, 2004). Estudios adicionales sugieren que los antimoniales actúan interfiriendo en el sistema redox de la tripanotona. En líneas de parásitos fármacosensibles, el Sb^{3+} induce una salida rápida de la tripanotona y glutatión desde las células e inhibe la reductasa de tripanotona, con lo que causa una pérdida notable del potencial de reducción de tiol en los parásitos (Wyllie *et al.*, 2004). La hipótesis anterior ha recibido nuevo apoyo a partir de la observación de que la resistencia generada contra los antimoniales en el laboratorio causa hiperexpresión de las enzimas biosintéticas del glutatión y poliamidas, con lo cual aumentan los niveles de tripanotona, la cual se conjuga con el fármaco. Otro mecanismo que además podría estar involucrado es la unión no específica del antimonial con los grupos sulfhidrilos de las proteínas del amastigote (Figura 1.4) (Vásquez de Ricciardi, 2009).

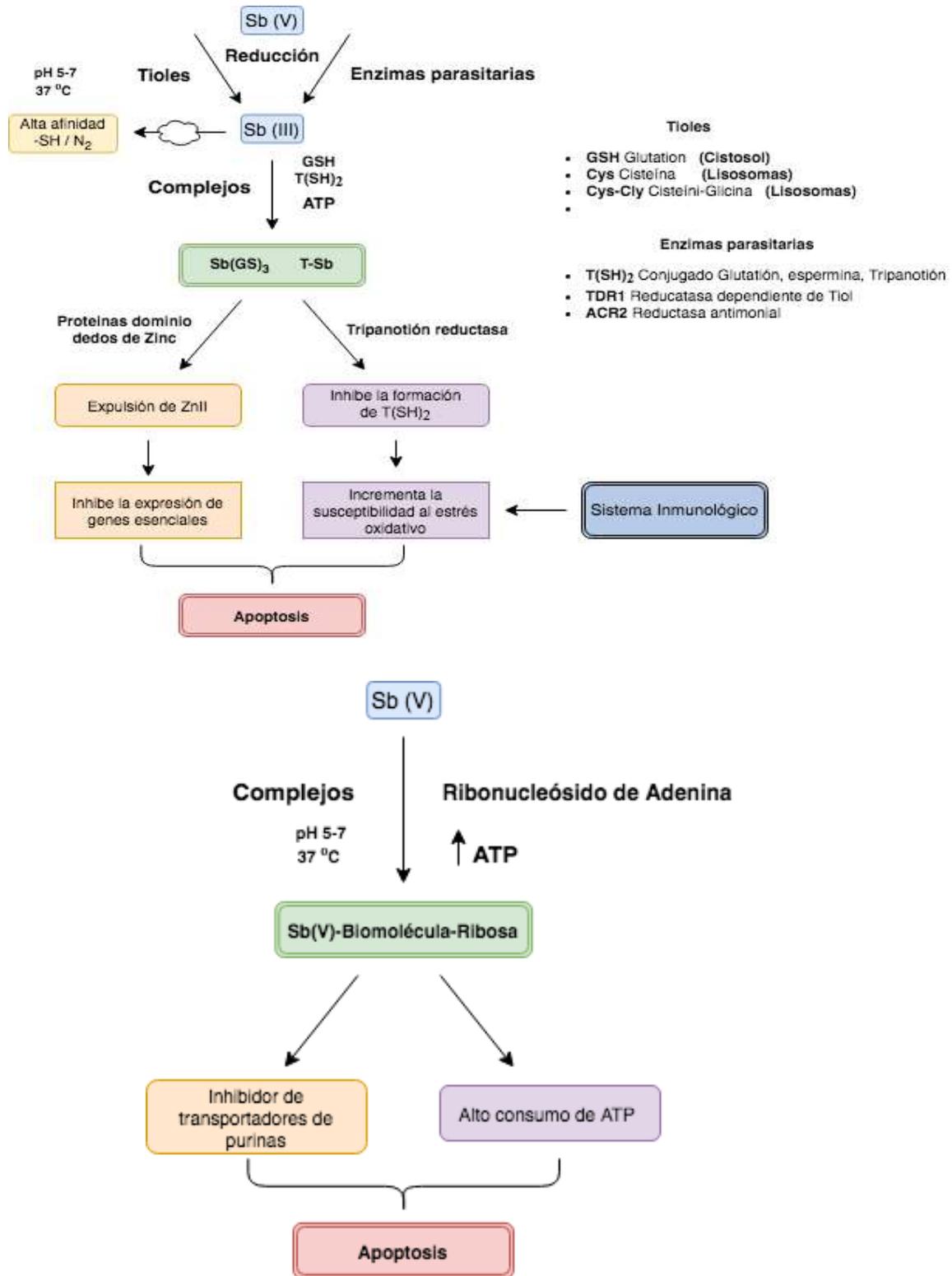


Figura 1.4 Mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes.

1.7 Bioprospección de metabolitos activos

Durante mucho tiempo, la humanidad ha hecho uso de las propiedades curativas de las plantas. Cada asentamiento humano, a través de la historia, ha empleado un sistema tradicional de medicina herbolaria, en donde es común encontrar la figura de un curandero o chamán que conserva los conocimientos de una población sobre las distintas enfermedades que los afectan (Heinrich, 2000). A pesar de que siempre se ha atribuido cierto misticismo religioso a los tratamientos, no se discute la capacidad que existe en muchos de los remedios herbales, ya que de éstos se han obtenido múltiples compuestos activos para la fabricación de diversos fármacos (Tabla 1.3) (Fabricant y Farnsworth, 2001). Un alto porcentaje de la población en todo el mundo, en especial en países en desarrollo, emplea la medicina herbolaria como su principal método de curación para sus afecciones. Además de los medicamentos recetados a nivel mundial, se estima que el 49% de los fármacos más vendidos son productos naturales o algún derivado (Newman y Cragg, 2016).

Existen más de 300,000 especies de plantas, de las cuales sólo del 15% ha sido estudiado su potencial farmacológico. Por lo tanto, la bioprospección en búsqueda de productos naturales bioactivos es cada vez más importante para el beneficio de la sociedad. Cada año desaparece una gran diversidad de especies sin estudiar debido a factores que incluyen al cambio climático y la deforestación, disminuyendo así la posibilidad de encontrar nuevas curas a partir de metabolitos secundarios (Palhares *et al.*, 2015).

Las plantas son depósitos de compuestos bioactivos, que se sabe son químicamente equilibrados, efectivos y menos dañinos en comparación con las medicinas sintéticas. La resistencia actual y los efectos tóxicos de los medicamentos disponibles han llevado a evaluar el efecto leishmanicida de varios extractos de plantas y sus compuestos purificados. Una revisión bibliográfica realizada por Ullah *et al.* (2016) compiló la información publicada entre el año 2000 y 2016 sobre metabolitos con actividad antiparasitaria aislados de plantas, específicamente sobre especies de *Leishmania*, en el cual concluyen que con base en sus criterios de inclusión existen al menos 150 publicaciones de productos naturales que son una fuente potencial de agentes nuevos y selectivos que podrían contribuir significativamente a la atención primaria de la enfermedad. Entre los grupos de compuestos que han presentado alguna actividad leishmanicida se encuentran: alcaloides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, diferentes tipos de lactonas, quinoides, flavonoides, esteroides, diversos

lípidos, iridoides, heterociclos con oxígeno, bencenoides, carbohidratos, lignanos, péptidos, cumarinas, fenilpropanoides, compuestos con sulfuro (Rocha *et al.*, 2005; Carvalho y Ferreira, 2001).

Se han realizado estudios en más de 100 especies de plantas alrededor del mundo, no sólo con el fin de comprobar su eficacia en medicina tradicional, sino con el objetivo de aislar los metabolitos responsables de la actividad (Ullah *et al.*, 2016).

Tabla 1.3 Metabolitos importantes provenientes de plantas medicinales.

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

1.7.1 Obtención de metabolitos activos a partir de muestras biológicas

En la actualidad existen diversas formas de obtener compuestos activos de productos naturales, compuestos sintéticos o semisintéticos. Asimismo, existe una gran cantidad de formas de realizar una evaluación de su actividad biológica, empleando desde ensayos enzimáticos, microorganismos e incluso hasta mamíferos o tejidos y cultivos celulares provenientes de éstos (Reguera *et al.*, 2014; Tempone *et al.*, 2011).

El enfoque biodirigido es una estrategia de aislamiento de metabolitos que combina el trabajo fitoquímico y la experimentación biológica. Se utiliza frecuentemente en investigaciones cuyo fin es la búsqueda de moléculas activas para el desarrollo de nuevos fármacos. El objetivo es utilizar sólo las fracciones con mejores resultados en los ensayos biológicos, para continuar con su fraccionamiento por procedimientos cromatográficos y así guiar el trabajo fitoquímico de aislamiento de metabolitos bioactivos.

En cuanto a los bioensayos, es común separarlos en cuatro ramas posibles: estudios *in vitro*, *in silico*, *ex vivo* e *in vivo*. Los estudios *in vitro* son realizados principalmente en placas de 96 pozos y se manejan líneas celulares, microorganismos, complejos enzimáticos o proteínas aisladas, ya sean enzimas, receptores o de canal. En los ensayos *in vitro* es común analizar los compuestos a través de estudios de bioensayo libres de dianas específicas; es decir, una prueba de tipo fenotípico. En este tipo de pruebas se emplea todo el microorganismo, suele realizarse conteo directo bajo microscopio o técnicas colorimétricas como sales de tetrazolio o azul alamar, con un lector de pruebas de ELISA, en placas de 96 o más pozos (Tempone *et al.*, 2011).

Dentro de los estudios por sitios de acción *in silico* e *in vitro*, uno de los rasgos característicos en el proceso de desarrollo de drogas antiparasitarias es la identificación del objetivo de una manera biológica. En teoría, durante la identificación de una diana farmacológica, es importante que el objetivo putativo esté ausente en el anfitrión o sea sustancialmente diferente del anfitrión homólogo para que pueda ser explotado como objetivo de un fármaco. Además, el objetivo seleccionado debe ser absolutamente necesario para la supervivencia del patógeno. También

es importante considerar la etapa del ciclo de vida del patógeno en el que se expresa el gen diana. Es crucial observar las propiedades bioquímicas de la proteína, de modo que se pueden diseñar inhibidores específicos y si la proteína diana es una enzima, su inhibición debería conducir a la pérdida de la viabilidad celular. Algunos de los sitios blancos de interés son las cisteín proteasas (en especial la cisteín proteasa B), las enzimas involucradas en la biosíntesis de ergosterol, la enzima 14 α -desmetilasa que participa en el metabolismo redox del protozoario, siendo la tripanotona reductasa la más empleada. Otros blancos terapéuticos en este tipo de estudio son la dihidrofolato reductasa y las topoisomerasas pertenecientes al metabolismo de las purinas y del ADN, respectivamente; éstas al ser distintas estructuralmente a las del hospedero aseguran su selectividad (Chawla y Madhuala, 2010).

El enfoque fenotípico tiene la ventaja de que no depende de la inactivación de una enzima u otra proteína específica para que cumpla con su objetivo primordial, la eliminación del protozoario. Esto permite asegurar que, a pesar de la complejidad de las vías metabólicas del microorganismo, es posible que una simple molécula sea capaz de eliminar al patógeno, lo cual constituye una ventaja sobre los dirigidos por diana (Reguera *et al.*, 2014).

Un ejemplo de aislamiento siguiendo un enfoque biodirigido es la obtención de la oxilipina (3S)-16,17-dideshidrofalcarinol. Este producto natural se obtuvo a partir del extracto metanólico de *Tridax procumbens*, especie recolectada en Yucatán, México. En este proceso, las fracciones obtenidas después de cada proceso cromatográfico fueron sometidas a un ensayo *in vitro* contra promastigotes de *L. (L.) mexicana* para encontrar la fracción más activa hasta que se llegó a la obtención de la oxilipina, la cual demostró un CI₅₀ de 0.478 μ g/mL (Martín-Quintal *et al.*, 2009).

1.8 El género *Byrsonima*

Byrsonima es uno de los 75 géneros de la familia Malpighiaceae, del orden Malpighiales. El género *Byrsonima* comprende 255 especies descritas y de éstas sólo 158 son aceptadas. Comprende un grupo de árboles, arbustos y subarbustos encontrados en los trópicos del Nuevo Mundo, desde el sur de México, sureste de Florida, y la región Caribe al sureste de Brasil. El género fue descrito por Rich. ex Kunth y publicado en *Nova Genera et Species Plantarum* (Tropicos, 2020).

1.8.1 *Byrsonima crassifolia*

Byrsonima crassifolia (L.) Kunth es un árbol tropical de la familia Malpighiaceae encontrado desde México hasta América del Sur. Su amplia distribución se debe a su tolerancia a un amplio rango de condiciones ambientales. La especie se distribuye en altitudes comprendidas entre los 0-1,600 m, pero preferentemente hasta los 500 m (Duarte, 2011).

Es un arbusto o pequeño árbol de 2 a 10 m de altura, con el tronco tortuoso, muy ramificado, con las ramas tocando el suelo o creciendo casi horizontalmente, corteza gruesa y superficie escamosa. De inflorescencia en racimos, flores hermafroditas pentámeras. El fruto es una pequeña drupa globosa, de 1 a 2 cm de diámetro, epicarpio o cáscara delgada, color verde (inmaduro) y amarillo (maduro); la parte comestible constituida por el mesocarpio de color amarillo, suave y pastoso, con cerca de 0.5 cm de espesor de olor y sabor característicos; endocarpio ovalado, leñoso, conteniendo una, dos o tres semillas viables (Guzmán-Pozos *et al.*, 2013).

1.8.2 Estudios fitoquímicos en *Byrsonima*

La importancia de los conocimientos etnobotánicos y de la medicina tradicional se confirma cuando se descubren nuevos fármacos como resultado de estudios químicos (Olórtegui-Rios, 2016). Se han realizado estudios en diversas especies del género *Byrsonima* donde se demuestra la presencia de ácidos galoilquínicos, flavonoides, ácidos grasos, triterpenos, esteroides, sulfoglicolípidos, ésteres aromáticos, proantocianidinas y catequinas (Irías-Mata *et al.*, 2018; Maldini *et al.*, 2018; Sannomiya *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2001; Rastrelli *et al.*, 1997; Béjar *et al.*, 1995; Geiss *et al.*, 1995).

En *Byrsonima crassifolia* se han reportado metabolitos secundarios como fenoles totales, flavonoides, antocianinas y taninos. Dentro del grupo de los fenoles, los flavonoides y las antocianinas muestran gran capacidad de capturar radicales libres que causan el estrés oxidativo, atribuyéndoles, a su vez, un efecto benéfico en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas (Irías-Mata *et al.*, 2018). En la Tabla 1.4 se enumeran las moléculas que han sido aisladas de distintas partes de *B. crassifolia* y su respectiva actividad demostrada en experimentos *in vivo* e *in vitro* y en la Figura 1.5 se dan sus estructuras conformacionales (Irías-Mata *et al.*, 2018; Maldini *et al.*, 2018; Sannomiya *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2001; Rastrelli *et al.*, 1997; Béjar *et al.*, 1995; Geiss *et al.*, 1995).

Tabla 1.4 Perfil fitoquímico de *Byrsonima crassifolia* y sus propiedades farmacológicas.

Tipo de molécula	Nombre (No. de estructura)	Origen (Parte de la planta)				Propiedad
		Raíz	Corteza	Hoja	Fruto	
Flavonoides	Guaijaverina (1)			X		
	Quercetina (2)	X	X	X	X	Antidepresiva, espasmogénica, antiulcerogénica, antiinflamatoria, astringente, citotóxica, amebicida
	Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosido (3)			X		
	Quercetina-3-O-β-D-6"-galoilgalactopiranosido (4)			X		
	Isoquercetina (5)		X	X		
	3-O-Galoil-(+)-epicatequina (6)					
	(+)-Epicatequina (7)	X	X	X		Antimicrobiana, inhibe glucosiltransferasas
	Catequina (8)					Antioxidante
	Hiperina (9)	X		X		Espasmogénica, antagonista de la 5-HT
	Rutina (10)		X			Antidepresiva
	Hesperidina (11)		X			Antidepresiva
Terpenos	α-Amirina (12)		X	X		Antiinflamatoria, antiparasitaria, antiagregante
	β-Amirina (13)		X	X		Antiinflamatoria, antiparasitaria, antifúngica, antimicrobiana
	Ursenaldehído (14)	X		X		Espasmogénica
	Ácido oleanólico (15)	X	X	X		Antimicrobiana, antiinflamatoria, antitumoral, antiviral, hepatoprotectora, antidiabética, inhibe glucosiltransferasas
	Ácido 2α-hidroxi-oleanólico (16)			X		
	Ácido 2β-hidroxi-oleanólico (17)			X		
	Lupeol (18)	X		X		
	2β-OH-Lupeol (19)					
	Ácido betulínico (20)		X	X		Espasmogénica
	Betulina (21)	X	X	X		Espasmogénica
	Betulinaldehído (22)			X		Antiinflamatoria, antioxidante

	Daucosterol (23)			X	
	β -Sitosterol (24)	X	X	X	
	Luteína (25)				X Antioxidante
	Labda-17-acetoxi-13E-en-15-palmitato (26)				X Antimicrobiana
	Labda-8(17), 13R-dien-19-carboxi-15yl palmitato (27)				X Antimicrobiana
Proantocianidinas	3-O-Galoil-(+)-epicatequina-[4 α →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina (28)		X		
	3-O-Galoil-(+)-epicatequina-[4 α →8]-(+)-epicatequina (29)		X		
	(+)-Epicatequina-[4 α →8]-(+)-epicatequina (30)		X		
	(+)-Epicatequina-[4 α →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina (31)		X		

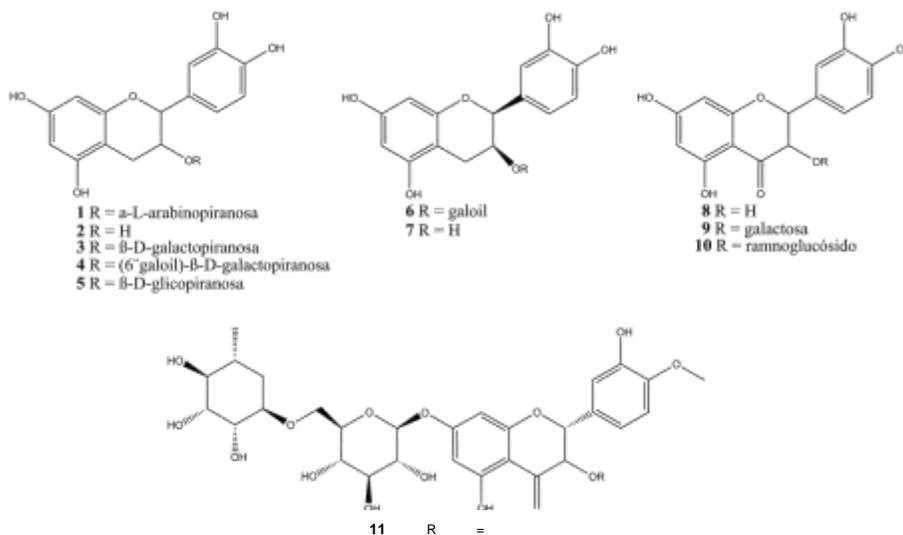
Tabla 1.4 Continuación...

Tipo de molécula	Nombre	Origen (Parte de la planta)				Propiedad
		Raíz	Corteza	Hoja	Fruto	
Proantocianidinas	3-O-Galoil-(+)-epicatequina-[4 α →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4 α →8]-(+)-epicatequina (32)		X			
	3-O-Galoil(-)-epicatequina-[4 β →8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4 α →8]-(+)-epicatequina (33)		X			
Ácido gálico y derivados	(+)-Epicatequina-[4 α →6]-(+)-epicatequina (34)		X			
	1,2-di-O-(8-Hexadecenoil)-3-O-(6-sulfo- α -D-quinovopiranosil)-glicerol (37)				X	
Otros compuestos	1,2-di-O-Tetradecanoil-3-O-(6-sulfo- α -D-quinovopiranosil)-glicerol (38)				X	
	1,2-di-O-Hexadecanoil-3-O-(6-sulfo- α -D-quinovopiranosil)-glicerol (39)				X	
	1,2-di-O-(8-Hexadecenoil)-3-O-(β -D-glicopiranosil)-glicerol (40)				X	
	1,2-di-O-Hexadecanoil-3-O-(β -D-glicopiranosil)-glicerol (41)				X	
	Ácido 5-hidroxipípecólico (42)	X		X		Antagonista de la 5-HT
Aminoácidos	Ácido pípecólico (43)	X		X		Antagonista de la 5-HT
	Prolina (44)	X		X		

Ácido aspártico (45)		X
D-Alanina (46)		X
Valina (47)	X	X

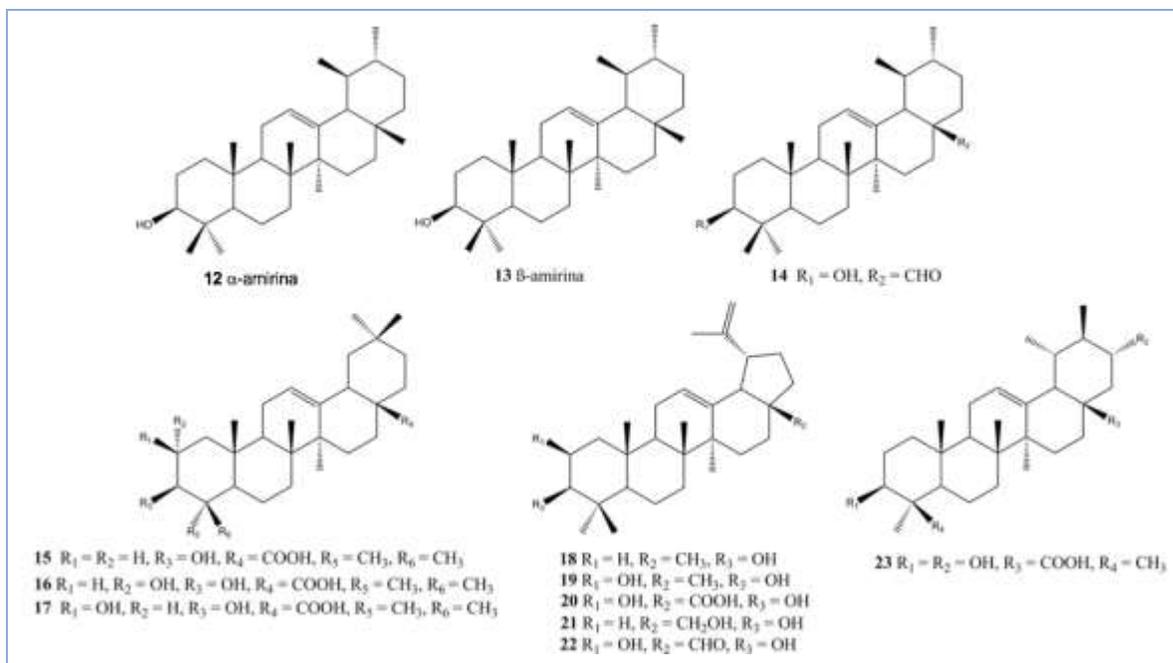
Metabolitos secundarios aislados de *Byrsonima crassifolia*

Flavonoides



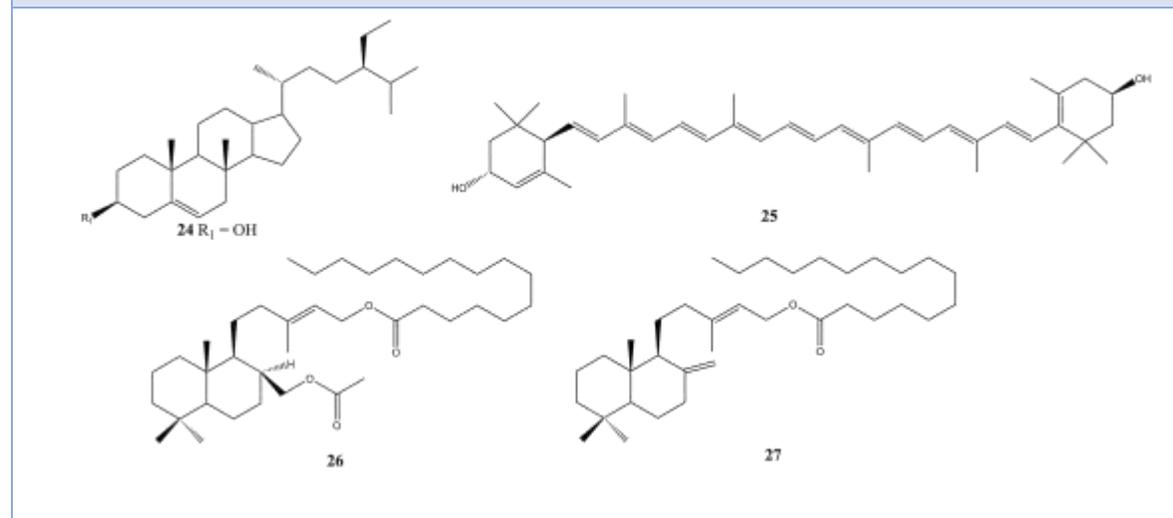
Metabolitos secundarios aislados de *Byrsonima crassifolia*

Terpenos



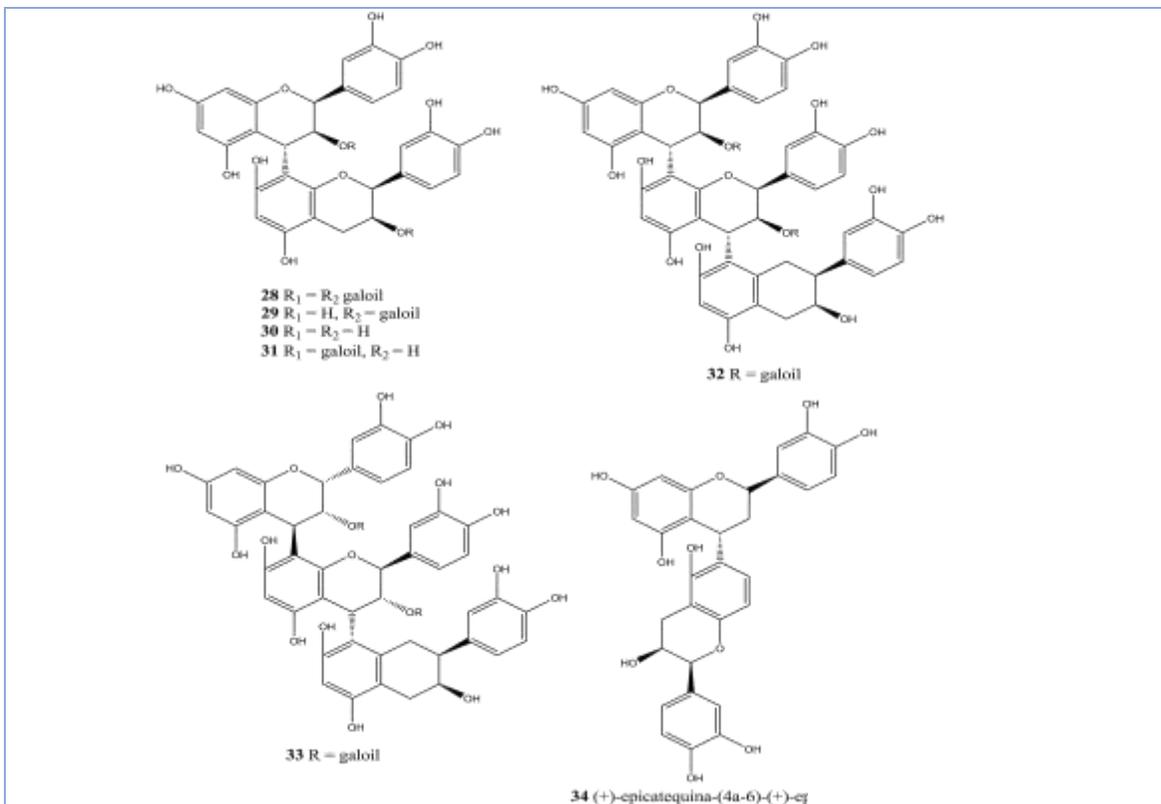
Metabolitos secundarios aislados de *Byrsonima crassifolia*

Terpenos



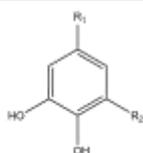
Metabolitos secundarios aislados de *Byrsonima crassifolia*

Proantocianidinas



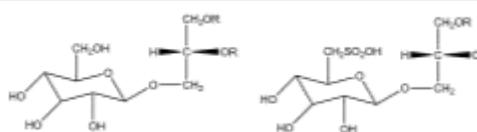
Metabolitos secundarios aislados de *Byrsonima crassifolia*

Ácido gálico y derivados



35 R₁ = COOH, R₂ = OH
36 R₁ = COOCH₃, R₂ = OH

Otros compuestos



37 R = 8-hexadecanoil
38 R = tetradecanoil
39 R = hexadecanoil

40 R = 8-hexadecanoil
41 R = hexadecanoil

Metabolitos secundarios aislados de *Byrsonima crassifolia*

Aminoácidos

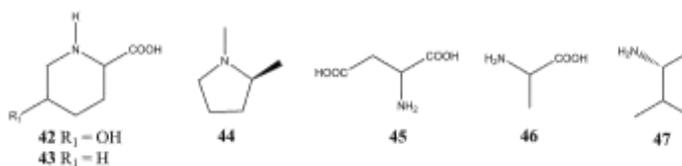


Figura 1.5 Estructuras químicas de los metabolitos secundarios aislados de *Byrsonima crassifolia*.

1.8.3 Propiedades biológicas de *Byrsonima crassifolia*

Por sus propiedades curativas, desde tiempos remotos las hojas y corteza de *B. crassifolia* son utilizadas en medicina tradicional para tratar la tos, trastornos gastrointestinales, infecciones ginecológicas y de la piel; asimismo, existen reportes de efectividad contra las mordeduras de serpiente (Heinrich *et al.*, 1992). Los estudios experimentales con las hojas y la corteza de esta especie mostraron una alta capacidad antioxidante, efectos antiespasmogénicos, antidepresivos, actividad antiprotozoaria y antiinflamatoria (Herrera-Ruiz *et al.*, 2011). Además, existen reportes de actividad moduladora sobre el sistema nervioso central del extracto acuoso de las hojas y corteza de *B. crassifolia* (Morales *et al.*, 2001).

Estudios farmacológicos demuestran que la decocción de la corteza tiene actividad contra *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*, cuya concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 200 µg/mL. La corteza resultó ser la parte de la planta más activa contra *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* y *Streptococcus pyogenes* y el metanol es el mejor disolvente en el proceso de extracción. El extracto etanólico de la planta completa tiene buena actividad contra nemátodos, pero baja capacidad insecticida. Otros estudios demuestran que el extracto de hojas y corteza tienen efectos antiespasmogénicos dosis dependiente (Cáceres *et al.*, 1991).

En el año 2007 en el Centro de Investigación Científica de Yucatán se realizó un estudio con el extracto metanólico de 18 plantas nativas mexicanas para evaluar su capacidad *in vitro* contra promastigotes de *L. (L.) mexicana*, demostrando diversidad de comportamientos en los índices de concentración inhibitoria. Los diez extractos de plantas más potentes ($CI_{50} < 50$ µg/mL) fueron las hojas de *Aphelandra scabra*, corteza de *Byrsonima bucidaefolia*, corteza de *Byrsonima crassifolia*, hojas de *Clusia flava*, corteza de *Cupania dentata*, hojas de *Diphysa carthagenensis*, planta entera de *Dorstenia contraejerva*, raíces de *Milleria quinqueflora*, planta entera de *Tridax procumbens* y corteza de *Vitex gaumeri* (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007). Basado en estos resultados, en donde se reporta una concentración inhibitoria $CI_{50} = 14$ µg/mL del extracto metanólico de la corteza de *B. crassifolia* contra promastigotes de *L. (L.) mexicana*, se ha decidido continuar con el proceso de investigación con el fin de aislar las moléculas que posean dicha actividad biológica.

JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis es un complejo de enfermedades con diversas manifestaciones clínicas. Alrededor del mundo, aproximadamente 350 millones de personas corren el riesgo de contraer la enfermedad y la OMS estima que cada año se originan entre 0.9-1.6 millones de casos nuevos, produciéndose múltiples complicaciones, desde úlceras y mutilaciones de apéndices, con un promedio de 20,000 a 30,000 defunciones. Esta parasitosis es endémica en países tropicales, siendo la mayoría de ellos considerados como naciones en vías de desarrollo, en los cuales el índice de desarrollo humano es poco favorable, caracterizado por presentar poblaciones en situación de pobreza y/o extrema pobreza, tanto en zonas urbanas como rurales.

La ecología y la epidemiología de la leishmaniasis son afectadas por el hospedero, el reservorio, el vector y el medio ambiente. Los impulsores importantes para la aparición y propagación de la leishmaniasis incluyen factores ambientales, como alteraciones en la temperatura y el almacenamiento de agua, hábitos de riego, deforestación, cambios climáticos,

inmunosupresión por VIH o trasplante de órganos, desarrollo de resistencia a los medicamentos y el aumento de viajes a regiones endémicas. La protección total durante la temporada de transmisión, el uso de mosquiteros e insecticidas y el control de los reservorios son algunas de las estrategias que se están utilizando actualmente para el control de la diseminación de la enfermedad.

El tratamiento actual contra la leishmaniasis presenta una serie de problemas, entre éstos están que algunos medicamentos pueden resultar altamente ineficientes por patógenos resistentes, dosis terapéuticas muy prolongadas, difícil acceso y/o de administración y esquemas económicamente costosos. El problema más grave y común es la multiplicidad de reacciones adversas y la toxicidad del tratamiento. Por ello, la búsqueda de nuevos agentes leishmanicidas es una necesidad imperante. La búsqueda de metabolitos activos en plantas medicinales es una vía importante para el desarrollo de nuevas líneas terapéuticas. En México, la principal manifestación de la leishmaniasis es la presentación cutánea causada por *L. (L.) mexicana*, por lo cual se evaluaron las fracciones y los metabolitos aislados de la corteza de *B. crassifolia* contra cepas de referencia de *L. (L.) mexicana* en un ensayo *in vitro*.

HIPÓTESIS

El extracto metanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* posee metabolitos con actividad leishmanicida.

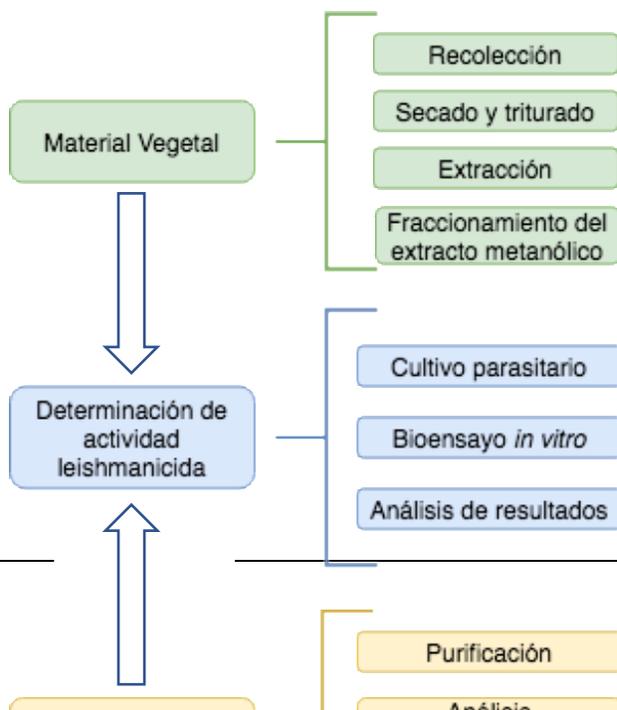
OBJETIVO GENERAL

Aislar moléculas con actividad inhibitoria del crecimiento de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana* a partir del extracto metanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* a través de un ensayo biodirigido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar compuestos puros provenientes de las fracciones del extracto metanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* empleando distintas técnicas cromatográficas.
2. Evaluar la actividad de las fracciones y compuestos puros aislados de la corteza de *B. crassifolia* mediante bioensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*.
3. Identificar las estructuras de las moléculas presentes en mezclas con actividad leishmanicida obtenidas de la corteza de *B. crassifolia* mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
4. Elucidar las estructuras de las moléculas con actividad leishmanicida aisladas de la corteza de *B. crassifolia* mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

AISLAMIENTO DE METABOLITOS Y MEZCLAS DE LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia*

2.1 Introducción

La investigación fitoquímica consiste en el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de un extracto o fracción de una especie vegetal biológicamente activa. Los métodos para realizar estos estudios consisten tradicionalmente en la obtención de la muestra vegetal, preparación adecuada de la muestra para su extracción que incluirá pasos como el secado y la molienda, la extracción *per se*, técnicas cromatográficas cuyo fin es obtener fracciones de polaridad creciente, purificación de los metabolitos secundarios obtenidos de los procesos cromatográficos y, finalmente, aplicar métodos espectroscópicos y espectrométricos para la elucidación estructural e identificación de los metabolitos secundarios aislados.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Recolección de material vegetal

La muestra de corteza de *Byrsonima crassifolia* fue recolectada el 15 agosto de 2019 en el Km 67 carretera al municipio de Kantunil, Yucatán, México bajo las coordenadas: 20.799058–89.043593, registrado en el herbario del CICY *U Najil Tikin Xiu* (La Casa de la Hierba Seca) bajo el voucher No. PS-2588.

2.2.2 Preparación del material vegetal

Una vez recolectada, la muestra fue tratada en una cámara de secado con temperatura controlada (50 °C) durante tres días en la Unidad de Recursos Naturales del CICY. Posteriormente, una vez que la corteza estuvo completamente seca, fue triturada en un molino de cuchillas industrial (marca Pagani, modelo 1520) con malla metálica de 2 mm de diámetro de la Unidad de Materiales del CICY.

2.2.3 Extracción del material vegetal

La extracción de los metabolitos de la corteza de *B. crassifolia* se llevó a cabo mediante un proceso estacionario utilizando metanol grado reactivo hasta cubrir todo el material vegetal. El contenido fue agitado regularmente y después de 24 h se realizó la primera extracción y se concentró a presión reducida en un evaporador rotatorio (Büchi, Re-111) con baño maría a 40 °C. Este procedimiento se realizó dos veces más, se unieron los tres extractos obtenidos y se secaron a temperatura ambiente hasta obtener el extracto metanólico (BcC-1a).

2.2.4 Aislamiento de metabolitos de la corteza de *Byrsonima crassifolia*

Inicialmente, se disolvió 20 g de BcC-1a en un volumen mínimo de MeOH y se le agregó agua en una relación 1:3 (MeOH/H₂O); esta suspensión fue sometida a una extracción líquido-líquido empleando disolventes de menor a mayor polaridad: hexano (Hx), diclorometano (DCM) y acetato de etilo (AcOEt), obteniéndose las fracciones hexánica, diclorometánica, de acetato de etilo y acuosa, (BcC-2a, BcC-2b, BcC-2c y BcC-2d), respectivamente.

En el subfraccionamiento se emplearon diferentes técnicas cromatográficas: cromatografía líquida al vacío (CLV), cromatografía de columna por gravedad (CCG), cromatografía por gravedad de exclusión de tamaño con Sephadex LH-20 (CET), cromatografía de columna flash (CCF), cromatografía en placa preparativa (CPP) y el monitoreo de la purificación se hizo mediante cromatografía de capa delgada (CCD) de gel de sílice 60F₂₅₄ de la marca Merck. Para la visualización y detección de bandas de algunos de los compuestos fluorescentes se utilizó luz ultravioleta (UV) de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm) y las placas se revelaron impregnándolas con una disolución de ácido fosfomolibdico (4% de ácido fosfomolibdico y trazas de sulfato cérico en H₂SO₄ al 5%) y posterior calentamiento. Las fases estacionarias empleadas fueron: gel de sílice 60 (GF₂₅₄, tamaño de partícula de 0.015-0.040 mm, Merck), gel de sílice 60Å de 70-230 mallas (Sigma-Aldrich), gel de sílice 60Å de 230-400 mallas (Sigma-Aldrich) y Sephadex LH-20.

Todo lo anterior fue realizado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la orientación del M. en C. Luis W. Torres Tapia.

2.3 Resultados

2.3.1 Procesamiento del material vegetal

El material vegetal de la corteza de *B. crassifolia* fue tratado como se mencionó anteriormente, obteniéndose 3.97 Kg, y posteriormente triturado. El producto se sometió a extracción metanólica y luego fue concentrado a presión reducida obteniéndose 943.0 gramos de extracto metanólico (BcC-1a), lo que representa un rendimiento de 23.75% (Figura 2.1).



Figura 2.1 Procesamiento de *Byrsonima crassifolia*. A/B. Descortezado de tallos y ramas. C. Secado de la corteza. D. Extracción metanólica. E. Concentrado del extracto. F. Extracto metanólico.

2.3.2 Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de corteza *B. crassifolia*

Los procesos cromatográficos para el aislamiento de metabolitos de la corteza de *B. crassifolia* se hicieron bajo un enfoque biodirigido, con base en los resultados de aquellas fracciones que presentaron mejores efectos en los ensayos biológicos de inhibición de crecimiento de promastigotes de *L. (L.) mexicana*.

El extracto metanólico fue sometido a fraccionamiento mediante una partición líquido-líquido obteniendo fracciones de distintas polaridades (hexánica, diclorometánica, acetato de etilo y fracción acuosa) (Figura 2.2). Los pesos y rendimientos se observan en la Tabla 2.1.



Figura 2.2 Fraccionamiento del extracto metanólico de corteza *Byrsonima crassifolia*. A. Partición líquido-líquido. B. Fracciones obtenidas.

Tabla 2.1 Pesos y rendimientos de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido del extracto metanólico (BcC-1a).*

No.	Fracción	Peso (g)	Rendimiento (%)
1	Hexánica (BcC-2a)	63.4	6.72
2	Diclorometánica (BcC-2b)	5.5	0.58
3	Acetato de etilo (BcC-2c)	203.3	21.56
4	Acuosa (BcC-2d)	562.4	59.64
	Total	834.6	88.50

* Material empleado: 933.0 g de BcC-1a.

Se realizaron análisis mediante cromatografía en capa delgada (CCD) buscando el mejor sistema de disolventes que fuera capaz de separar las manchas presentes en cada fracción para poder observarlas mejor (Figura 2.3).

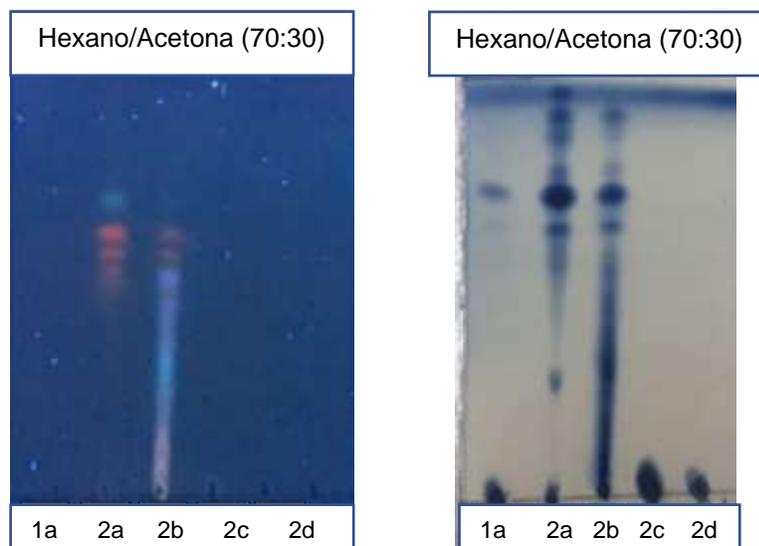


Figura 2.3 Placas CCD corridas con las fracciones del extracto BcC-1a de la corteza de *B. crassifolia* obtenidas por partición líquido-líquido. A la izquierda revelado bajo luz UV a 365 nm. A la derecha revelado con ácido fosfomolibdico; 1a: Extracto metanólico, 2a: Fracción hexánica, 2b: Fracción diclorometano, 2c: Fracción acetato de etilo, 2d: Fracción acuosa.

2.3.2.1 CLV de la fracción diclorometánica (BcC-2b)

Mediante bioensayo de inhibición parasitaria donde se evaluó la actividad del extracto metanólico y de las fracciones BcC-2a - BcC-2d se determinó que la fracción BcC-2b presentaba mayor actividad de inhibición parasitaria. Se utilizó 5 g de esta fracción para separar por medio de CLV; se utilizó esta técnica debido a que permite fraccionar una mayor cantidad de muestra en un menor número de fracciones, empleando una fase móvil de gradiente con polaridad ascendente.

Se utilizaron 15 sistemas de disolventes: Hex/DCM (90:10), Hex/DCM (80:20) 2x, Hex/DCM (70:30), Hex/DCM (60:40), Hex/DCM (50:50), DCM (100%), DCM/MeOH (97:3) 2x, DCM/MeOH (95:5), DCM/MeOH (93:7), DCM/MeOH (90:10), DCM/MeOH (80:20), DCM/MeOH (50:50),

MeOH (100%). Al final, se reunieron en 12 fracciones por su perfil cromatográfico, nombrándolas como BcC-3a - BcC-3l (Figura 2.4).



Figura 2.4 Fracciones obtenidas a partir de la subfracción BcC-2b.

A partir de la fracción BcC-3a y hasta la fracción BcC-3d se observó la formación de un precipitado blanco, en tanto que de la fracción BcC-3e a la BcC-3l se observó la presencia de precipitados de color café-verdoso. Cada fracción se concentró en un evaporador rotatorio a baja presión y todos fueron puestos en cámara de secado al vacío, reportándose su peso en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Pesos y rendimientos de las fracciones de la BcC-2b obtenidas por CLV.

Fracción	Peso (mg)	Rendimiento (%)
BcC-3a	12.6	0.25
BcC-3b	15.0	0.30
BcC-3c	38.9	0.78
BcC-3d	42.5	0.85
BcC-3e	36.9	0.74
BcC-3f	1,360.0	26.12
BcC-3g	538.2	10.76
BcC-3h	593.9	11.88
BcC-3i	715.6	14.31
BcC-3j	758.7	15.17
BcC-3k	733.9	14.68
BcC-3l	209.0	4.18

En el análisis cromatográfico mediante CCD de las fracciones BcC-3a - BcC-3l se pueden observar los distintos patrones obtenidos (Figura 2.5).

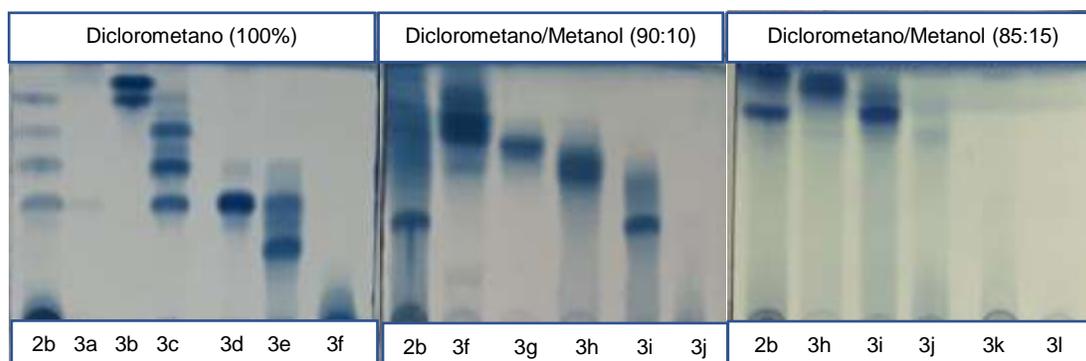


Figura 2.5 Análisis cromatográfico de las fracciones BcC-3a - BcC-3l. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.

2.3.2.2 Cromatografía de columna flash (CCF) de la fracción BcC-3f

Mediante el bioensayo de inhibición parasitaria de las fracciones BcC-3a – BcC-3k se determinó que la fracción más activa fue la BcC-3f, de la cual se utilizó 1.35 g para separar por medio de CCF; se utilizó esta técnica debido a que permite fraccionar pequeñas cantidades de muestra en un menor número de fracciones, empleando una fase móvil de gradiente con polaridad ascendente. Se utilizaron cuatro sistemas de disolventes: Hex/DCM/MeOH (5:94:1), Hex/DCM/MeOH (5:93:2), Hex/DCM/MeOH (5:92:3), Hex/DCM/MeOH (5:91:4). Al final, se reunieron en 12 fracciones por su perfil cromatográfico, nombrándolas como BcC-4a - BcC-4l (Figura 2.6).

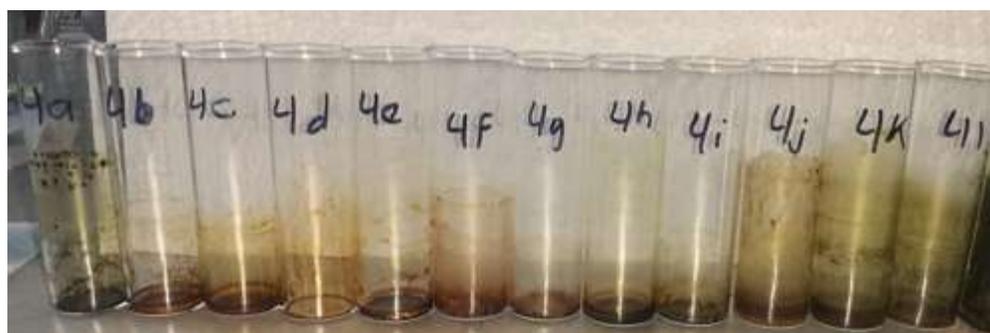


Figura 2.6 Fracciones obtenidas a partir de BcC-3f.

A partir de la fracción BcC-4a y hasta la fracción BcC-4f se observó la presencia de un material rojizo, de la fracción BcC-4g a la BcC-4j se observó la presencia de precipitados de color café y de la fracción BcC-4k a la BcC-4l se observa precipitado de color verde. Cada fracción se concentró en un evaporador rotatorio a baja presión y el contenido de cada fracción fue puesto en cámara de secado al vacío, reportándose su peso en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Pesos y rendimientos de las fracciones de BcC-3f obtenidos por CCF.

Fracción	Peso (mg)	Rendimiento (%)
BcC-4a	100.3	7.43
BcC-4b	211.1	15.64
BcC-4c	26.4	1.21
BcC-4d	200.0	14.81
BcC-4e	93.9	6.96
BcC-4f	71.7	5.31
BcC-4g	229.3	16.99
BcC-4h	105.0	7.78
BcC-4i	86.6	6.41
BcC-4j	9.2	0.68
BcC-4k	9.6	0.71
BcC-4l	131.3	9.73

Material empleado: 1.35 g BcC-3f. Peso total recuperado: 1,264.4 mg.

En el análisis cromatográfico mediante CCD de las fracciones BcC-4a - BcC-4l se pueden observar los distintos patrones obtenidos (Figura 2.7).

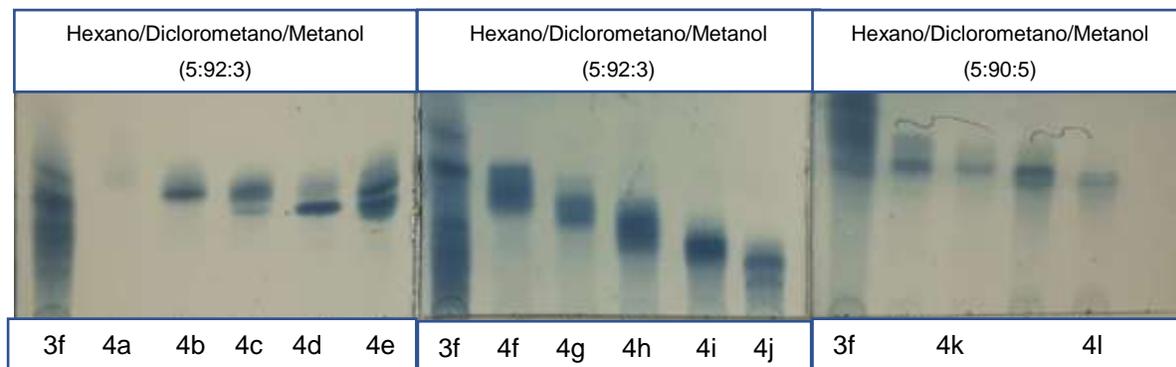


Figura 2.7 Análisis cromatográfico de las fracciones BcC-4a - BcC-4l. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.

2.3.2.3 Cromatografía por gravedad de exclusión de tamaño con Sephadex LH-20 de la fracción BcC-4e

Mediante bioensayo de inhibición parasitaria de las fracciones BcC-4a - BcC-4l se determinó que la fracción más activa es la BcC-4e, de la cual 93.0 g se tomaron para separar las moléculas basados en su tamaño molecular, para este fin se utilizó una columna cromatográfica de tipo Sephadex LH-20.

Se empleó como fase móvil el sistema DCM/MeOH (3:7). Al final, se reunieron en 8 fracciones por su perfil cromatográfico, nombrándolas como BcC-6a - BcC-6h (Figura 2.8).

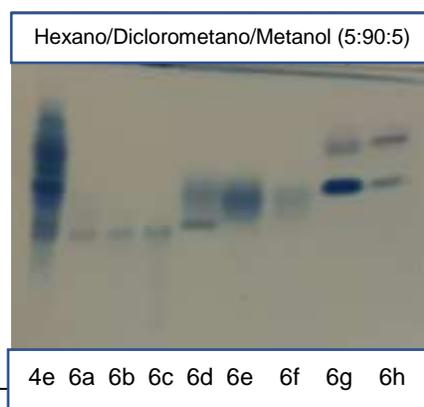


Figura 2. 8 Análisis cromatográfico de las fracciones BcC-6a - BcC-6h. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.

Desde la fracción BcC-6a a la fracción BcC-6h se observó la presencia de un material rojizo, el cual se guardó para su posterior análisis. Cada fracción se concentró en un evaporador rotatorio a baja presión y todos fueron puestos en cámara de secado al vacío, reportándose su peso en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4 Pesos de las fracciones obtenidas por columna Sephadex de la fracción BcC-4e.

Fracción	Peso (mg)
BcC-6a	1.7
BcC-6b	9.7
BcC-6c	1.2
BcC-6d	30.2
BcC-6e	12.5
BcC-6f	10.0
BcC-6g	12.1
BcC-6h	10.8
Rendimiento total	91.2

2.3.3 Aislamiento de metabolitos de la fracción BcC-2b

De la fracción más activa BcC-2b se aislaron un total de dos metabolitos: compuesto **1** (BcC-6b1), compuesto **2** (BcC-6g1) y una mezcla de compuestos: **5** (BcC-6g3).

2.3.3.1 Aislamiento del compuesto 1 (BcC-6b1)

Se observó por CCD que el precipitado de la fracción BcC-6b presentaba dos bandas al ser revelado con ácido fosfomolibdico (una de mayor intensidad y otra tenue). Debido a la cantidad de material (9.7 mg) se procedió a realizar una placa CPP (cromatografía en placa preparativa), empleando un sistema de disolventes Hx/DCM/MeOH (5:90:5). Una vez procesada la muestra, se obtuvieron 4.0 mg de un compuesto puro (**1**, BcC-6b1) cuyo rendimiento a partir del peso

seco de la corteza representa el 0.0806%. La muestra fue analizada mediante cromatografía de gases, en donde se obtuvo que el 91.6% pertenecía al metabolito más abundante, con un t_R de 7.723 min (Figura 2.9).

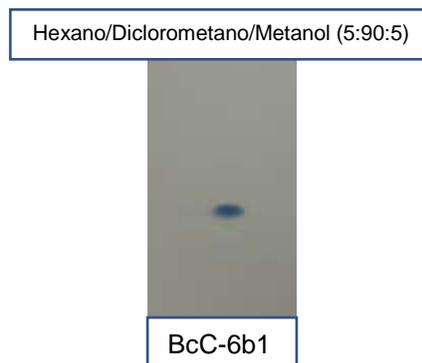


Figura 2.9 Análisis cromatográfico del compuesto **1** (BcC-6b1). Placa revelada con ácido fosfomolibdico.

2.3.3.2 Aislamiento del compuesto **2** (BcC-6g1) y la mezcla **5** (BcC-6g3)

Se observó por CCD que el precipitado de la fracción BcC-6g presentaba varias manchas al ser revelado con ácido fosfomolibdico. Debido a la cantidad de material (12.1 mg), se procedió a purificarlo mediante una placa CPP empleando un sistema de disolventes Hx/DCM/MeOH (8:90:2). Una vez procesada la muestra, se obtuvo el compuesto: **2** BcC-6g1 (4.0 mg) y la mezcla **5** BcC-6g3 (3.2 mg) (Figura 2.10).

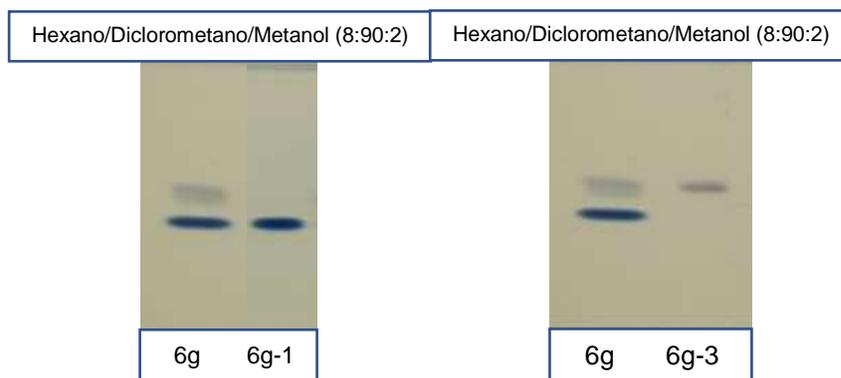


Figura 2.10 Análisis cromatográfico del compuesto **2** (BcC-6g1) y la mezcla **5** (BcC-6g5). Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.

2.3.4 Aislamiento de metabolitos de otras fracciones con menor actividad biológica

Como producto del proceso de aislamiento de metabolitos con actividad leishmanicida, se observó la presencia de ciertos compuestos en otras fracciones que provenían de la fracción BcC-2b, que a pesar de no mostrar alta actividad inhibitoria parasitaria era factible su aislamiento con el fin de fortalecer el perfil fitoquímico de la corteza de *B. crassifolia*. Es así como se logró el aislamiento de los compuestos **3** (BcC-3c1), compuesto **4** (BcC-3c2) y la mezcla de compuestos **6** (BcC-3c3).

2.3.4.1 Aislamiento de los compuestos **3** (BcC-3c1) y **4** (BcC-3c2) y la mezcla **6** (BcC-3c3)

En el perfil cromatográfico en CCD de las fracciones BcC-3c y BcC-3d se puede apreciar que ambos presentan bandas con factores de retención que permiten el poder separarlos. Se tomaron 38.0 mg de dichas fracciones y fueron procesados en columna de gravedad con un sistema de disolventes Hx/DCM (1:1) (Figura 2.11). Como resultado del proceso anterior se obtuvieron los compuestos **3** (5.5 mg), compuesto **4** (8.0 mg) y la mezcla de compuestos **6** (14.0 mg) (Figura 2.12).

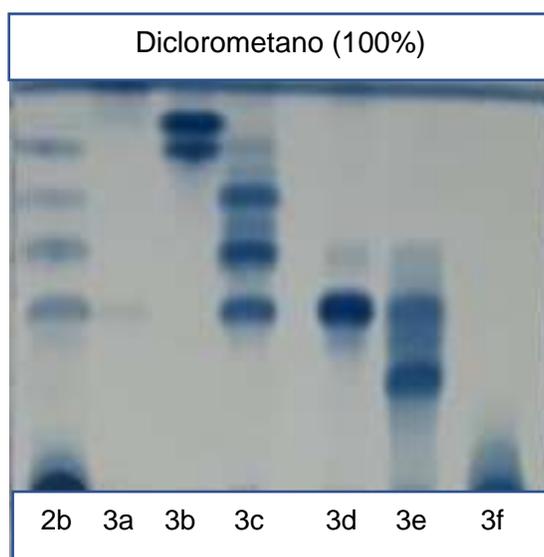


Figura 2.11 Análisis cromatográfico de las fracciones BcC-3a - BcC-3f. Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.



Figura 2.12 Análisis cromatográfico de los compuestos **3** (BcC-3c1), **4** (BcC-3c2) y la mezcla **6** (BcC-3c3). Placas reveladas con ácido fosfomolibdico.

En la Figura 2.13 se muestra un resumen del proceso de purificación de los metabolitos puros y mezclas obtenidas.

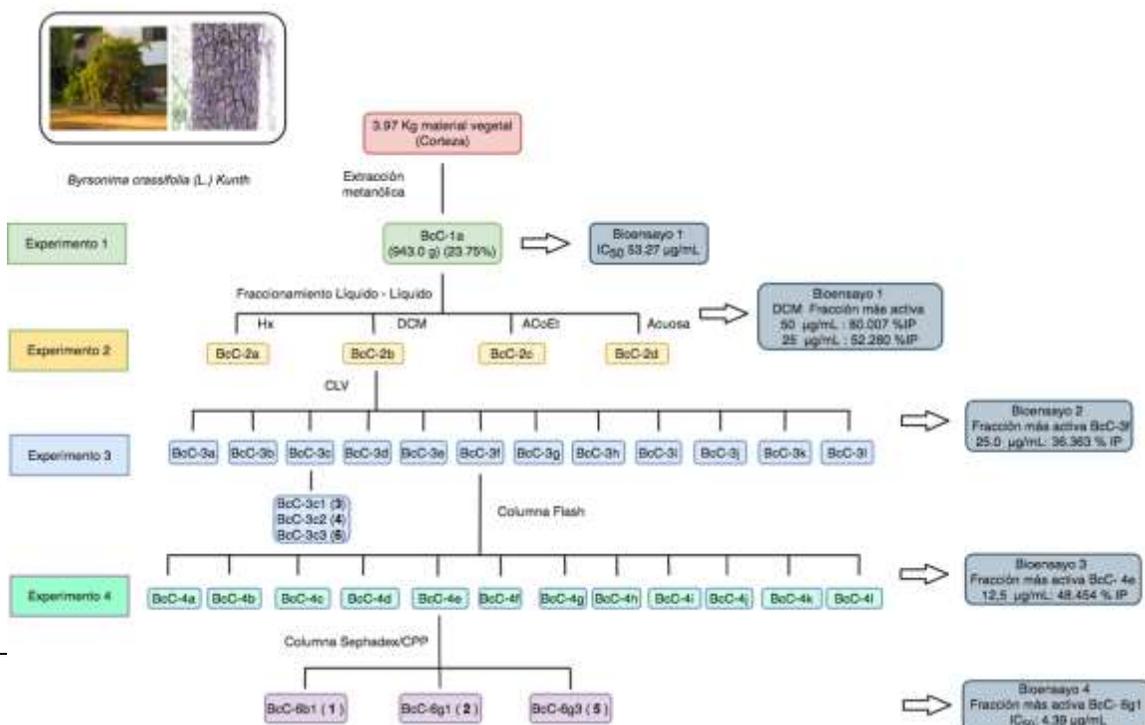


Figura 2.13 Flujograma de trabajo del proceso de aislamiento cromatográfico de metabolitos con actividad leishmanicida aislados de la corteza de *Byrsonima crassifolia*.

2.4 Discusión

A partir de *B. crassifolia* se han aislado diferentes tipos de metabolitos secundarios: triterpenos (betulinaldehído, betulina, ácido betulínico, lupeol, ácido oleanólico, ácido 2 β -hidroxioleanólico, ácido 2 α -hidroxioleanólico y ursenaldehído), esteroides (β -sitosterol y su glucósido, daucosterol), flavonoides (guaijaverina, quercetina, catequina, hiperina, rutina, hesperidina), un éster aromático (galato de metilo), cuatro aminoácidos comunes (alanina, ácido aspártico, prolina y valina), dos aminoácidos no proteicos (ácido pipercolico y ácido 5-hidroxipipercolico) y numerosos sulfonoglicolípidos y glicolípidos (Béjar *et al.*, 1995; Cáceres *et al.*, 1991).

En este trabajo se aislaron cuatro metabolitos y dos mezclas del extracto metanólico de la corteza de *B. crassifolia* utilizando diversas técnicas cromatográficas (CCD, CLV, columna de exclusión con Sephadex y columna flash). Este aislamiento fue guiado mediante bioensayos de inhibición del crecimiento *in vitro* de promastigotes de *L. (L.) mexicana*. Los compuestos aislados fueron: **1** (BcC-6b1), **2** (crassifolín, BcC-6g1), **3** (BcC-3c1), **4** (BcC-3c2). Además, se aislaron dos mezclas: **5** (BcC-6g3) y **6** (BcC-3c3).

Dos de los metabolitos aislados (BcC-3c1 y BcC-3c2) y los metabolitos de la mezcla binaria BcC-3c3 se lograron identificar mediante CG-EM como los terpenos: 3 β -friedelanol (**3**), friedelina (**4**) y α -amirina/ β -amirina (**6**). En la naturaleza, los terpenos juegan un papel importante en la comunicación química, representan la clase más grande de productos naturales con variadas aplicaciones en agricultura, medicina, fragancias y saborizantes. El 3 β -friedelanol (**3**) y la friedelina (**4**) han sido reportados en *Byrsonima verbascifolia* (corteza), *B. crassa* (corteza), *B. duckeana* (hojas) y *B. gardneriana* (partes aéreas) (Oliveira-Almeida *et al.*, 2011; Guilhon-Simplicio y Pereira, 2011; Sannomiya *et al.*, 2005). Sin embargo, hasta el momento no han sido reportados en *B. crassifolia*, su hallazgo representa un importante aporte al perfil fitoquímico de la especie.

La mezcla de triterpenos α -amirina/ β -amirina (**6**) ya ha sido reportada en trabajos previos en la corteza de *B. crassifolia*. Nuestros resultados concuerdan con los de Béjar *et al.* (2000) en donde se reporta el aislamiento de estos triterpenos pentacíclicos junto con varias

proantocianidinas conteniendo unidades de (+)-epicatequina y (+) epigalocatequina, las cuales son moléculas poco abundantes en la naturaleza. Asimismo, concuerdan con los de Rivero-Cruz *et al.* (2009), quienes mediante procesos cromatográficos lograron el aislamiento de varios triterpenos: β -amirina, ácido betulínico, ácido oleanólico, β -sitosterol; flavonoides del tipo quercetina; y compuestos fenólicos como el ácido gálico. La β -amirina ha sido aislada en otras especies del género, tales como: *B. crassa* (corteza), *B. intermedia* (raíz), *B. microphylla* (tallo), *B. verbascifolia* (corteza), *B. gardneriana* (partes aéreas). Por su parte, el isómero α -amirina ha sido reportado en las hojas de *B. fagifolia* y *B. verbascifolia* (Oliveira-Almeida *et al.*, 2011; Guilhon-Simplicio y Pereira, 2011).

CAPÍTULO III

ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA PROMASTIGOTES DE *Leishmania (L.) mexicana* DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES DE LA CORTEZA DE *Byrsonima crassifolia*

3.1 Introducción

Parte fundamental en la búsqueda de nuevas terapias contra infecciones causadas por patógenos del género *Leishmania* es la bioprospección en especies de plantas medicinales, que permita acercarnos a compuestos con actividad leishmanicida a través de ensayos de laboratorio *in vitro* y/o *in vivo*. Los bioensayos de actividad leishmanicida *in vitro* generalmente consisten en agregar una concentración conocida de una muestra, ya sea un extracto, una fracción o un compuesto puro, a un número conocido de promastigotes metacíclicos de *L. (L.) mexicana* en pozos de una microplaca de cultivo. Para evaluar el efecto inhibitorio se compara con el cultivo de parásitos en ausencia de la muestra (Ankli *et al.*, 2002). Por lo tanto, el bioensayo *in vitro* con promastigotes de *L. (L.) mexicana* es útil para dirigir la búsqueda y el aislamiento de metabolitos activos entre distintas fracciones, seleccionando sólo aquellas que posean mejor actividad leishmanicida con el fin de aislar los metabolitos responsables de la actividad.

El criterio de selección para elegir de un grupo de fracciones la más activa, consiste en determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) y la concentración media inhibitoria (CI_{50}). El %IC permite comparar la actividad biocida entre un grupo de fracciones a distinta concentración. El CI_{50} se define como la concentración de un compuesto o mezcla con la cual se inhibe la mitad del crecimiento *in vitro* de un cultivo celular. Los extractos de un material vegetal se pueden clasificar basándose en el resultado de sus CI_{50} y son clasificados como: altamente activos ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), activos ($CI_{50} > 10$ y $< \sim 50-60 \mu\text{g/mL}$), moderadamente activos ($CI_{50} > 60$ y $< 100 \mu\text{g/mL}$) y no activos ($CI_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (De Lima *et al.*, 2012; Mesia *et al.*, 2008; Camacho *et al.*, 2003).

3.2 Materiales y métodos

Todos los procedimientos ejecutados en este capítulo se realizaron en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la Universidad Autónoma de Yucatán (CIR-UADY) bajo la dirección de la M. en C. Erika Sosa Bibiano y la Q.F.B. Karina López Ávila.

3.2.1 Material biológico

La determinación de la actividad leishmanicida se obtuvo mediante un bioensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes según lo descrito por Martín-Quintal *et al.* (2009) y Peraza-Sánchez *et al.* (2007). Para la realización del ensayo se utilizó la cepa MNYC/BZ/62/M379 de *L. (L.) mexicana* (Biagi) Garnham, aislada de *Nyctomys sumichrasti*, Cayo District, Belice, en 1962 (ATCC® 50156TM, n.d.).

3.2.2 Cultivo de promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*

Inicialmente, los parásitos fueron extraídos asépticamente de un hámster infectado experimentalmente y cultivados en medio 199 a 23 °C. Este cultivo se evaluó periódicamente hasta que los promastigotes alcanzaron la morfología adecuada y no se observó presencia de bacterias. Posteriormente, los promastigotes se cultivaron en medio TC suplementado [medio 199, suero fetal bovino (15%), L-glutamina (20 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL), piruvato (10 mM) y β-mercaptoetanol (50 µM)] y se incubaron a 23 °C durante 5-7 días. Transcurrido este tiempo, se prosiguió a lavar los parásitos con PBS pH 7.4 y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante, quedando un botón de parásitos como sedimento. Para ajustar la cantidad de parásitos requerida para los bioensayos, se resuspendió en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado [medio RPMI-1640, suero fetal bovino (10%), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/mL)]. De esta suspensión se tomaron 10 µL y se transfirieron a un tubo Eppendorf al cual se le agregaron 90 µL de disolución fijadora (formaldehído 40%, PBS); finalmente, se tomaron 10 µL y se contaron en la cámara de Neubauer en la zona de glóbulos blancos con el objetivo 40x. En la Figura 3.1 se señala las secciones donde se debe realizar el conteo de los promastigotes de *L. (L.) mexicana*.

Posteriormente, el número de parásitos se ajustó a 1×10^6 parásitos/mL con medio RPMI-1640 suplementado. Ver Anexo I para más detalles del procedimiento.

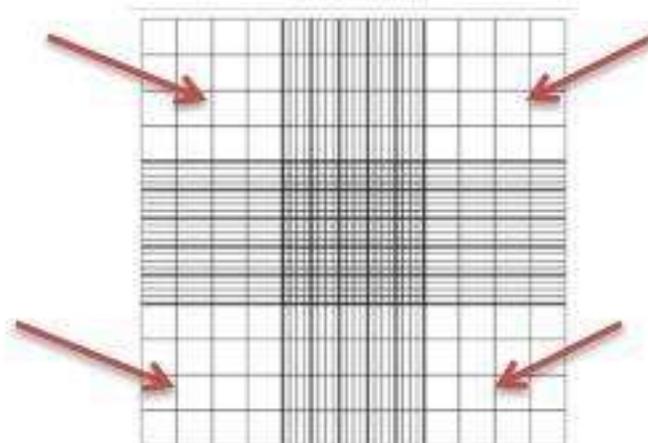


Figura 3.1 Esquema de la cámara de Neubauer.

3.2.3 Bioensayo *in vitro* con promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*

Las concentraciones para poder evaluar la actividad leishmanicida del extracto metanólico de la corteza de *B. crassifolia* fueron determinadas basándose en resultados previos del grupo de investigación, donde se reportó que el extracto metanólico de la corteza posee un $CI_{50} = 14 \mu\text{g/mL}$ (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007). Por lo tanto, se realizó una curva que incluyera a este valor, fue así como se decidió utilizar las siguientes concentraciones: 200, 100, 50, 25, 10 y $1 \mu\text{g/mL}$. La preparación de los extractos se llevó a cabo en una relación de $20 \mu\text{L}$ de DMSO por cada 2 mg de material vegetal y se prepararon diluciones consecutivas.

El bioensayo se realizó en una microplaca de 96 pocillos. En cada pocillo de reacción se agregó $100 \mu\text{L}$ del extracto/fracción a evaluar y $100 \mu\text{L}$ de parásitos a una concentración de 1×10^6 parásitos/mL, por triplicado. Asimismo, se usó una placa blanco que contenía $100 \mu\text{L}$ del extracto vegetal y $100 \mu\text{L}$ del medio de cultivo. Las placas fueron incubadas durante 6 días a 23°C (Figura 3.2). Ver Anexo II para más detalles del procedimiento.

3.2.4 Controles empleados

Para poder validar los resultados del bioensayo se emplearon tres controles:

1. Control positivo de anfotericina B

También conocido como control de inhibición, es donde se espera que haya el máximo porcentaje de muerte del parásito, puesto que se emplea un fármaco cuyas propiedades leishmanicidas están bien documentadas. La concentración final es de 1 $\mu\text{g/mL}$.

2. Control negativo de RPMI-1640 suplementado con DMSO (0.5% concentración final)

Llamado también control de crecimiento, en el cual al medio de cultivo se le adicionó DMSO al 1%, para medir el efecto de este disolvente sobre la supervivencia del parásito. De acuerdo con la literatura la concentración final de DMSO no debe exceder el 0.5% en el medio, ya que a mayores concentraciones afecta el crecimiento de los parásitos y podría generar falsos positivos (Tempone *et al.*, 2011).

3. Control de crecimiento (medio RPMI-1640 suplementado)

En él se proporcionan las condiciones óptimas para el crecimiento del parásito.

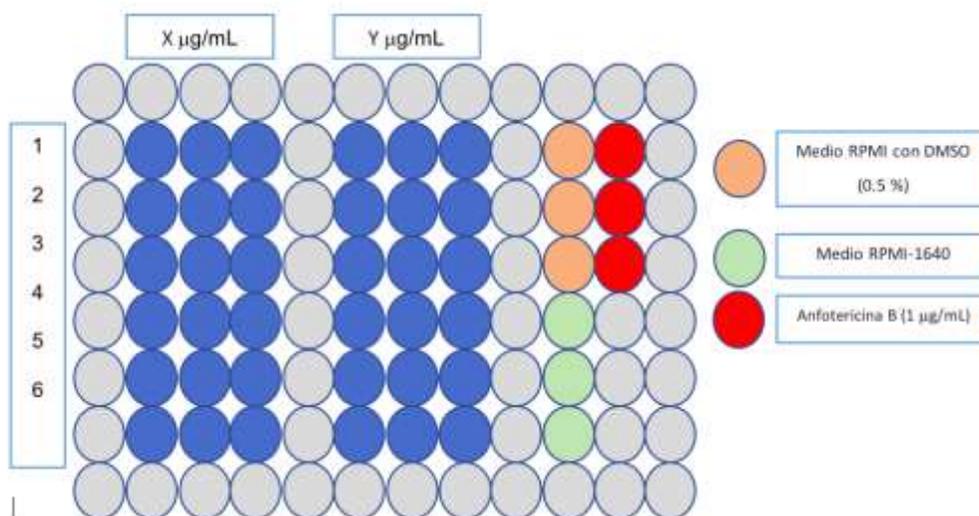


Figura 3.2 Esquema de la distribución de las muestras en la microplaca.

3.2.5 Lectura del bioensayo

Para determinar la actividad antiparasitaria o leishmanicida de un producto natural se utilizan los métodos colorimétricos, los cuales están basados en la reducción de la sal bromuro de 3-(4,5-dimetiltiasol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables a cristales de formazán, lo que indica de forma indirecta la cuantificación de las células viables en un medio de cultivo. Estos métodos son muy utilizados, sin embargo, el producto final, el formazán, es un compuesto insoluble en agua, por lo cual se utilizan disolventes orgánicos para solubilizarlo, lo que conlleva a aumentar el tiempo para la determinación de la viabilidad. En la actualidad existen análogos a esta sal (MTT) como es la sal de sodio de 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) empleada para ensayos *in vitro*, ya que tiene una diferencia en su forma reducida (formazán) la cual es soluble en agua, lo que reduce al ensayo a un solo paso. Aunado a esto se utiliza un agente acoplador de electrones que funciona como catalizador de la reacción, el metosulfato de fenasina (PMS), el cual reduce el tiempo de incubación con XTT (Salamanca-Capusiri *et al.*, 2008). En la Figura 3.3 se puede observar el proceso de reducción del XTT.

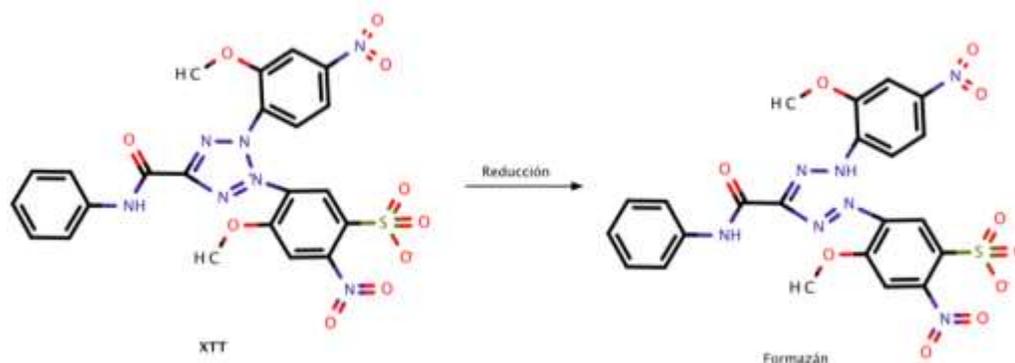


Figura 3.3 Reducción del 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) a formazán.

Se agregaron a cada pocillo experimental y a los blancos 50 μ L de XTT (1 μ g/mL de XTT y 0.06 mg/mL de PMS) y se incubaron durante 4 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se leyó la microplaca en un espectrofotómetro XMark TM (BioRad) a una longitud de onda de 450 nm.

3.2.6 Interpretación de resultados

Para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento de los parásitos (%IC) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[\frac{A_p - A_b}{A_c - A_{b'}} \cdot 100 \right]$$

Siendo:

A_p: Absorbancia de la muestra

A_b: Absorbancia del blanco de la muestra.

A_c: Absorbancia del control negativo (DMSO)

A_{b'}: Absorbancia del blanco del control negativo

3.2.7 Análisis de datos

Luego de la lectura de absorbancia de los extractos vegetales se calculó el promedio de todos los datos obtenidos del extracto y de su respectivo blanco. Al tener los promedios del extracto y el blanco se restaron sus absorbancias para tener el valor real teórico de la absorbancia de cada concentración. Se realizó el mismo procedimiento con las absorbancias de los controles. El CI_{50} se obtuvo a través del programa GraphPad Prism 8 con los promedios de los datos de % ICP de cada concentración. Ver Anexo III para más detalles del procedimiento.

3.3 Resultados

Los resultados de los bioensayos de la actividad leishmanicida del extracto metanólico de la corteza y de sus fracciones de *Byrsonima crassifolia* son el promedio de tres experimentos independientes en los cuales en cada uno el ensayo se hizo por triplicado.

3.3.1 Evaluación del extracto metanólico (BcC-1a) de la corteza de *Byrsonima crassifolia*

En la curva del porcentaje de inhibición se observa una disminución de la actividad biocida contra *L. (L.) mexicana* a medida que disminuye la concentración del extracto, exceptuando para el valor a 25 µg/mL en donde, en una de las réplicas, los valores se desvían de la media y eso hace que el promedio sufra algunos cambios (Tabla 3.1). El valor del CI₅₀ de la corteza de *B. crassifolia* fue de 53.2 µg/mL, resultado que sugiere que el extracto metanólico sí posee actividad biocida *in vitro* contra promastigotes de *L. (L.) mexicana* (De Lima *et al.*, 2012).

Tabla 3.1 Resultado del bioensayo del extracto metanólico (BcC-1a).

BcC-1a (µg/mL)	% de inhibición
200	73.6
100	46.1
50	50.7
25	31.2
10	32.9
1	32.2

3.3.2 Evaluación de las fracciones del extracto metanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia*

Al analizar los resultados se observó que la fracción que presentó mayor porcentaje de inhibición del crecimiento *in vitro* de promastigotes de *L. (L.) mexicana* fue la de polaridad intermedia, es decir, los metabolitos presentes en la fracción diclorometánica (BcC-2b) (Tabla

3.2). Para poder analizar las fracciones de la corteza de *Byrsonima crassifolia* se determinó dos puntos de concentración (50 y 25 µg/mL).

Tabla 3.2 Resultado del bioensayo de las fracciones BcC-2a - BcC-2d.

Fracción	% de inhibición	
	25 µg/mL	50 µg/mL
Hexánica (BcC-2a)	42.2	64.9
Diclorometano (BcC-2b)	52.2	80.0
Acetato de Etilo (BcC-2c)	32.3	60.3
Acuosa (BcC-2d)	28.2	21.5

Con base en los resultados anteriores, la fracción BcC-2b fue sometida a separación cromatográfica mediante CLV, de la cual se obtuvieron 12 fracciones (BcC-3a - BcC-3l). Estas fracciones fueron evaluadas mediante bioensayo de inhibición del crecimiento de promastigotes de *L. (L.) mexicana*, siendo la fracción BcC-3f la que presentó mayor actividad, obteniendo 36.4% de inhibición parasitaria a una concentración de 25 µg/mL.

La fracción BcC-3f al ser la más activa se tomó como base para continuar con el proceso de aislamiento mediante cromatografía en columna flash, de la cual se obtuvieron 12 fracciones (BcC-4a - BcC-4l). Estas fracciones fueron evaluadas mediante bioensayo a dos puntos de concentración (25.0 y 12.5 µg/mL), resultando la fracción BcC-4e la que presentó 48.5% de inhibición parasitaria a una concentración de 12.5 µg/mL. Esta última fracción fue procesada mediante cromatografías CET y CPP.

De la fracción más activa (BcC-2b) de la corteza de *B. crassifolia* se aislaron en total cuatro metabolitos y dos mezclas. La actividad de los metabolitos aislados fue evaluada en cinco puntos de concentración (20.0, 10.0, 5.0, 1.0 y 0.5 µg/mL). Los resultados del bioensayo *in vitro* de BcC-1a, BcC-2b, metabolitos aislados y mezclas se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Resultados de la actividad leishmanicida de metabolitos aislados de la corteza de *Byrsonima crassifolia*.

No. de compuesto/mezcla	Fracción/Compuesto	CI ₅₀ (µg/mL)
BcC-1a	Extracto metanólico	53.27
BcC-2b	Fracción DCM	1.06
1	BcC-6b1	3.56
2	BcC-6g1	4.39
3	BcC-3c1 (3β-friedelanol)	31.23
4	BcC-3c2 (friedelina)	28.40
5	BcC-6g3	3.36
6	BcC-3c3 (α-amirina/β-amirina)	28.16
	Anfotericina B	0.31

3.4 Discusión

Actualmente nos enfrentamos ante la imperiosa necesidad de la búsqueda y desarrollo de compuestos que se sumen al arsenal farmacológico para poder tratar/erradicar las enfermedades que aquejan a la sociedad. Diversos grupos de investigación que se dedican al estudio de ETD se ven confrontados para lograr sus objetivos, debido a la falta de interés en el sector público y privado por buscar una solución para controlar dichas enfermedades, lo que resulta en una falta de financiamiento para la investigación. Esto se refleja claramente en la escasa oferta farmacológica para combatir la leishmaniasis.

Existen diversas publicaciones en las bases de datos científicos cuyo objetivo es la evaluación de extractos vegetales que posean metabolitos con actividad leishmanicida. Estos estudios varían en las metodologías, pero a grandes rasgos lo más importante a conocer es: 1) tipo de ensayo (*in vitro*, *in vivo*, *in silico*); 2) estadio parasitario evaluado (promastigotes o amastigotes); 3) material vegetal (planta, parte utilizada, condiciones del aislamiento); y 4) informe de resultados (CI_{50} , CC_{50} , IS) (Delgado-Altamirano *et al.*, 2017).

Entre los estudios *in vitro* que han evaluado extractos con actividad biocida contra *L. (L.) mexicana* encontramos los siguientes: a) raíz de *Pentalinon andrieuxii*, $CI_{50} = 4.1 \mu\text{g/mL}$ contra amastigotes y $43.04 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes (Lezama-Dávila *et al.*, 2014); tronco de *Platymiscium floribundum* con un $CI_{50} = 9.11 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes (Vila-Nova *et al.*, 2013); partes aéreas de *Piper auritum*, con un $CI_{50} = 12.8 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes (Monzote *et al.*, 2010); planta entera de *Tridax procumbens*, $CI_{50} = 3.0 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes (Martín-Quintal *et al.*, 2009); partes aéreas de *Eupatorium buniifolium*, $CI_{50} = 32.5 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes (Guilhon-Simplicio y Pereira, 2011); corteza de *Byrsonima bucidifolia*, $CI_{50} = 36.0 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes; raíz de *Milleria quinqueflora*, $CI_{50} = 49.0 \mu\text{g/mL}$ contra promastigotes; raíz de *Diphysa carthagenensis*, $CI_{50} = 49.0 \mu\text{g/mL}$ en promastigotes; corteza de

Vitex gaumeri, $CI_{50} = 31.0 \mu\text{g/mL}$ en promastigotes (Peraza-Sánchez *et al.*, 2007); corteza de *Oxandra espintana*, $CI_{90} = 25.0 \mu\text{g/mL}$ en promastigotes (Hocquemiller *et al.*, 1991).

Por otra parte, en otros estudios *in vivo* se reporta que el extracto hexánico de la raíz de *Pentalinon andrieuxii* induce la reducción del tamaño de las lesiones en orejas de roedores (Lezama-Dávila *et al.*, 2014).

En el estudio realizado por Peraza-Sánchez *et al.* (2007) se evaluaron 26 extractos metanólicos de plantas recolectadas en diversas regiones de la península de Yucatán, México. Los autores reportaron que la corteza de *B. crassifolia* presenta un $CI_{50} = 14.0 \mu\text{g/mL}$, valor que difiere con lo reportado en nuestro trabajo $CI_{50} = 53.2 \mu\text{g/mL}$. Las diferencias entre los resultados podrían deberse a diferencias metodológicas en el desarrollo de los experimentos: el proceso de incubación del bioensayo en el estudio anterior se realizó a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 h, la concentración de parásitos utilizada fue de $2\text{-}3 \times 10^6$ promastigotes/mL y no se reportó la estación de recolección de las especies vegetales, lo que sería un factor importante a analizar, ya que se ha demostrado que los factores ambientales y fisiológicos pueden interferir no sólo con el contenido sino también con la concentración de los metabolitos producidos (Giménez *et al.*, 2020; Moreno-Pizani *et al.*, 2020). Asimismo, la medición de la inhibición parasitaria hecha en este estudio se realizó mediante conteo microscópico en cámara de Neubauer, lo que no debe producir una variación en los resultados, ya que un estudio realizado por Salamanca-Capusiri *et al.* (2008) demuestra que la lectura de los resultados de inhibición parasitaria empleando metodologías distintas (microscópico-colorimétrico) ofrecen resultados con una buena correlación ($R^2 = 0.951$).

La actividad leishmanicida de las mezclas y metabolitos aislados del extracto metanólico de la corteza de *B. crassifolia* es variable, tal como se muestra en la Tabla 3.3, apreciándose mayor actividad en los metabolitos **1**, **2** y en la mezcla **5**. El metabolito **1** mostró una interesante actividad antiparasitaria con $CI_{50} = 3.56 \mu\text{g/mL}$. Hasta el momento desconocemos la estructura de este compuesto, debido a la presencia de impurezas en la muestra que han dificultado la elucidación estructural.

El metabolito **2** (crassifolín) proveniente de la fracción más activa presenta muy buena actividad *in vitro* ($CI_{50} = 4.39 \mu\text{g/mL}$) contra promastigotes de *L. (L.) mexicana*. Este compuesto al no

estar reportado en las bases de datos SciFinder se considera nuevo, por lo cual, no existe en la literatura información sobre su actividad biológica. La mezcla BcC-6g3 (**5**) muestra buena actividad biocida ($CI_{50} = 3.36 \mu\text{g/mL}$), y ésta se podría deber a que los metabolitos que la componen ejercen acción sobre los parásitos en distintos sitios dianas causando la muerte de éstos. Lastimosamente, debido al poco material recuperado no ha sido posible continuar con el proceso de identificación.

Dentro de los metabolitos con actividad leishmanicida aislados se logró identificar los dos triperpenos 3β -friedelanol (**3**) y friedelina (**4**) y la mezcla de α -amirina/ β -amirina (**6**). En general, los triterpenos muestran importantes propiedades farmacológicas para la salud humana, por lo que son de gran interés para la industria farmacéutica. Numerosos informes sobre los efectos quimiopreventivos de los triterpenos, en su mayoría triterpenos pentacíclicos, han mostrado efectos biológicos relacionados con la posible actividad anticancerígena. Se han descrito varias actividades biológicas para los triterpenos: antiinflamatorios, antidiabéticos, antioxidantes, antiinfecciosos, antivirales, antibacterianos, inmunomoduladores, entre otros (Ramesh *et al.*, 2001; Lü *et al.*, 2009). A pesar de los mecanismos de acción potenciales y atractivos, la disponibilidad obstaculiza la realización de nuevos estudios sobre el desarrollo de fármacos, ya que la extracción de las plantas suele permitir cantidades limitadas (Oliveira-Neto *et al.*, 1997).

Se han realizado estudios de actividad biológica del 3β -friedelanol (**3**) en donde se ha demostrado la capacidad antibacteriana contra *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, asimismo su nula actividad antimicótica (Tamokou *et al.*, 2009). Chang *et al.* (2012) evaluaron la actividad antiviral de una serie de triterpenos en donde el 3β -friedelanol exhibió una actividad antiviral más potente que el control positivo, actinomicina D, lo que implica la importancia del esqueleto de 3β -friedelanol como un andamio potencial para desarrollar nuevos fármacos anti-HCoV-229E. Además, es un compuesto con actividad antitumoral y es útil en la preparación de suplementos dietéticos o cosméticos que modulan las enfermedades asociadas al envejecimiento (Yang *et al.*, 2011; Kundu *et al.*, 2000).

Por otra parte, la friedelina (**4**) tiene diversas actividades biológicas, lo que también justifica el estudio de los mecanismos relacionados con su biosíntesis. Entre las actividades importantes se destaca: antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y algunas micobacterias incluyendo a *Mycobacterium tuberculosis*, además de poder afectar el

crecimiento de *Candida* sp., propiedades analgésicas, antipiréticas, antihistamínicas, gastroprotectoras y antiinflamatorias (Antonisamy *et al.*, 2015; 2011; Kuete *et al.*, 2007). La evaluación *in vitro* de ambos triterpenos (friedelina y 3 β -friedelanol) realizada en este trabajo contra promastigotes de *L. (L.) mexicana* resultaron en una baja actividad inhibitoria (28.4 y 31.2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo reportado con otros estudios donde se ha evaluado la actividad *in vitro* de ambas moléculas contra promastigotes de *Leishmania (L.) donovani* y *L. (V.) guyanensis*; en ambos casos ninguno mostró actividad (Oliveira-Almeida *et al.*, 2011; Camacho *et al.*, 2000).

Las amirinas exhiben diversas actividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* contra diversas afecciones relacionadas con la salud, tales como inflamación, infecciones microbianas, fúngicas y virales y células cancerosas (Rivero-Cruz *et al.*, 2009; Jabeen *et al.*, 2011; Ramesh *et al.*, 2001). Mwangi *et al.* (2010) reportaron que mediante bioensayos *in vitro* la α -amirina aislada de las hojas de *Teclea trichocarpa* poseía interesantes actividades antiparasitarias, siendo los valores reportados $\text{CI}_{50} = 7.9 \mu\text{g/mL}$ contra amastigotes de *L. (L.) donovani*, 0.96 $\mu\text{g/mL}$ contra estadios celulares sanguíneos de *Plasmodium falciparum*, 11.2 $\mu\text{g/mL}$ contra tripomastigotes de *Trypanosoma brucei rhodesiense* y una baja actividad contra amastigotes de *Trypanosoma cruzi* de $> 30.0 \mu\text{g/mL}$ (Mwangi *et al.*, 2010). El isómero β -amirina muestra actividad biológica *in vitro* contra amastigotes de *L. (L.) amazonensis* con un $\text{CI}_{50} = 14.0 \mu\text{g/mL}$; por su parte, cuando fue evaluado con tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* no mostró actividad, puesto que su $\text{CI}_{50} > 100.0 \mu\text{g/mL}$. Las evaluaciones antes mencionadas se realizaron con los metabolitos puros, lo cual difiere de nuestras mediciones en donde se evaluó la mezcla de ambos isómeros de la amirina, hecho que pudiera afectar los resultados del bioensayo.

Hasta el momento, no existen publicaciones en la literatura científica de actividad biológica *in vitro* de la friedelina, 3 β -friedelanol y la mezcla de α -amirina/ β -amirina contra promastigotes de *L. (L.) mexicana*.

CAPÍTULO IV

IDENTIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS Y MEZCLAS AISLADOS DE *Byrsonima crassifolia*

4.1 Introducción

En la elucidación estructural o identificación de metabolitos se utilizan diversas técnicas, en las que se incluyen métodos espectroscópicos y espectrométricos. Los primeros se basan en la interacción energía-materia, basándose en la absorción de la radiación electromagnética por parte de la molécula, provocando en la misma ciertos fenómenos que nos proporcionará información sobre su estructura y/o composición. Las técnicas espectroscópicas más utilizadas son la espectroscopía de ultravioleta (UV), la espectroscopía de infrarrojo (IR) y la resonancia magnética nuclear (RMN). Por su parte, las técnicas espectrométricas se utilizan para estudiar las masas de los átomos o moléculas de una muestra. Está basada en la obtención de iones a partir de moléculas en fase gaseosa, estos iones se separan en función de su relación masa/carga (m/z), posteriormente son detectados y registrados, lo que nos proporcionará información sobre la masa molecular y su estructura química. En este proyecto se utilizaron tanto métodos espectroscópicos como espectrométricos para la identificación y elucidación estructural de las moléculas y mezclas aisladas, las cuales fueron: espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) que incluye métodos unidimensionales (^1H , ^{13}C , DEPT-135), bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC) y espectrometría de masas (EM), así como algunas de sus propiedades físicas, dependiendo de su naturaleza molecular: color, estado físico.

4.2 Materiales y métodos

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

4.2.1 Cromatógrafo de gases

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria se encuentra en una columna y la fase móvil es un gas inerte (He o N_2). La elución de los metabolitos se produce por el flujo del gas a través de la columna a una presión alta. En este tipo de cromatografía la muestra debe ser capaz de

volatilizarse. El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases (CG), marca Agilent Technologies, modelo 7890A.

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

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica dedicada a la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semi-volátiles. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias estudiadas entre las fases móvil y estacionaria que conforman el sistema. Una vez separadas las sustancias son fragmentadas y analizadas en función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar. Los espectros de masas de baja resolución fueron obtenidos en un cromatógrafo de gases (modelo 7890A) acoplado a un detector selectivo de masas (modelo 5975C), ambos de marca Agilent Technologies, con una columna HP-5MS, marca Agilent J&W (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) compuesta de 5% de fenil metilpolisiloxano, la cual es considerada una columna de baja polaridad. Las condiciones de corrida fueron: 180 °C durante 3 min, una rampa de 10 °C/min hasta 300 °C durante 30 min, velocidad de flujo de 1.0 mL/min; como gas acarreador se empleó helio; la temperatura del inyector fue 300 °C.

4.2.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquellos que poseen *spin* nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles degenerados de energía del *spin* nuclear, de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada. La disposición de los niveles de energía es una propiedad tanto de los núcleos de una molécula como de su entorno electrónico y de las interacciones entre ambos. Así, la intensidad, forma y posición de las señales en el espectro de un núcleo determinado están íntimamente relacionadas con su estructura molecular, por lo que un análisis detallado del espectro proporciona valiosa información acerca de la estructura del compuesto que lo origina. Por ello, esta técnica resulta ser de las más eficientes y útiles para el estudio de la estructura y dinámica de moléculas en disolución.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de

protón (RMN-¹H), de carbono 13 (RMN-¹³C) y bidimensionales (COSY, DEPT-135, HSQC y HMBC) se obtuvieron en un equipo Varian de 600 MHz en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Mérida.

4.3 Resultados

4.3.1 Elucidación estructural del compuesto 1 (BcC-6b1)

Del compuesto 1 se aisló 4 mg con una apariencia de un polvo café, en cromatografía de gases presenta un t_R de 7.723 min con un porcentaje de pureza de 91.61% (Figura 4.1).

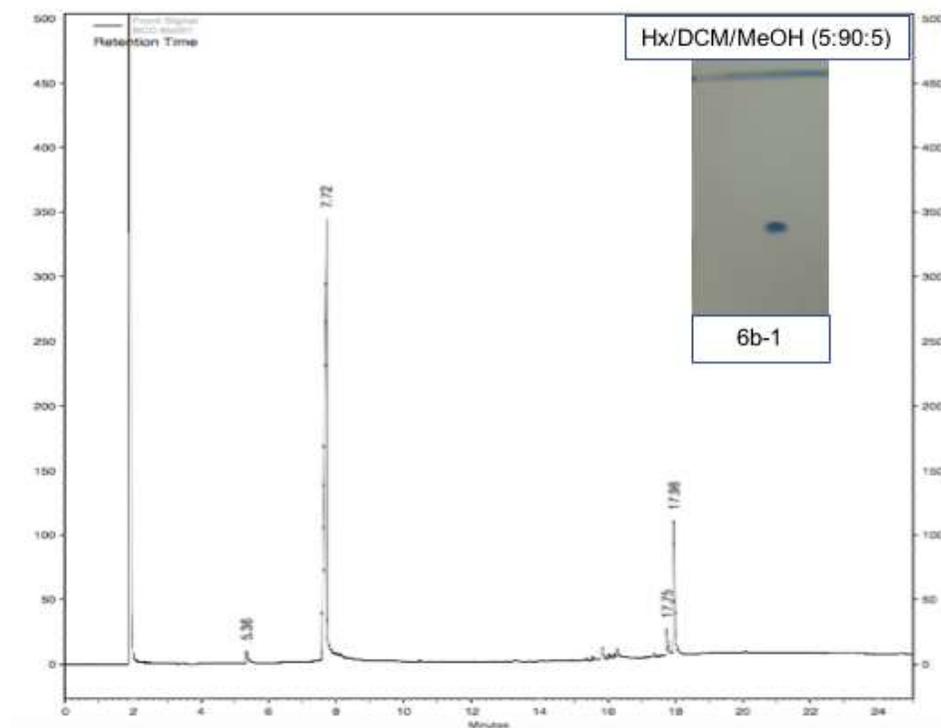


Figura 4.1 Cromatograma de gases y CCD de BcC-6b1 (1).

La estructura del compuesto BcC-6b1 aún se encuentran en proceso de elucidación estructural.

4.2.2 Elucidación estructural del compuesto 2 (BcC-6g1) (crassifolín)

Del compuesto **2** (BcC-6g1) se aisló 4.0 mg; tiene una apariencia de un polvo café. En cromatografía de gases (Figura 4.2) presenta un t_R de 5.967 min con un porcentaje de pureza de 100%. En el espectrómetro de masas obtenido por CG-EM presenta un ion molecular a 352 m/z . En el espectro de RMN- ^1H (600 MHz, CD_3OD , Figura 4.3) se observa la presencia de tres señales dentro de la región de protones aromáticos a δ 6.80 (d, $J = 2.0$ Hz), δ 6.71 (d, $J = 8.0$ Hz) y δ 6.65 (dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz), cada una integrando para un protón; también se observa una señal correspondiente a un grupo metoxilo a δ 3.84, la cual integra para tres protones y aparece como un singulete, es decir, no acopla con ningún otro protón en la molécula. Las señales a δ 2.73 ($J = 7.1$ Hz) y δ 3.71 ($J = 7.1$ Hz) integran cada una para dos protones. Finalmente, aparece una señal a δ 1.29 que integra para dos protones y que corresponde a un grupo metileno.

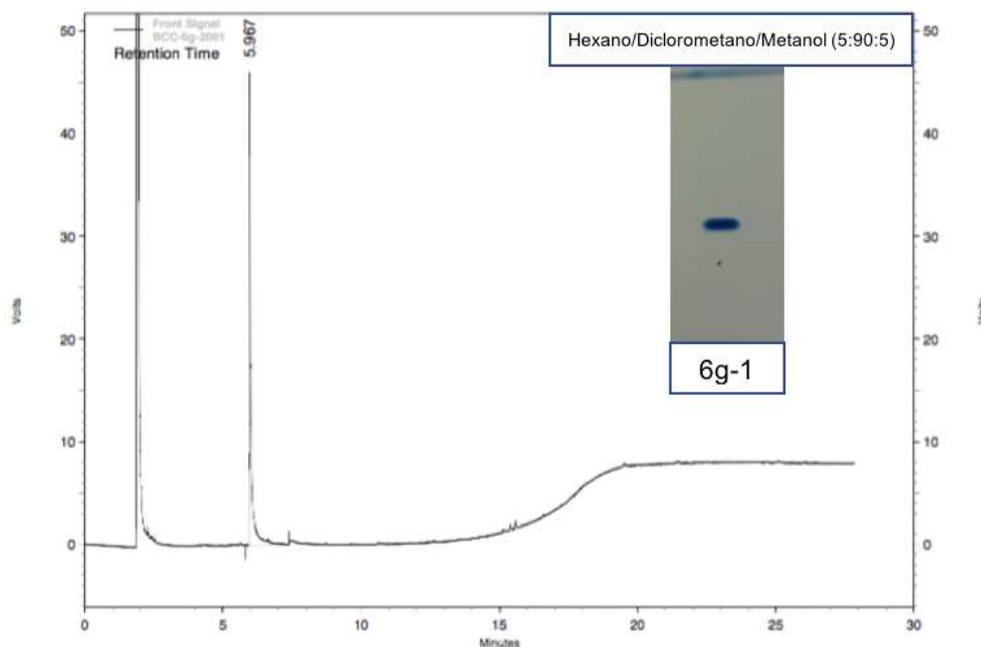


Figura 4.2 Cromatograma de gases y CCD de BcC-6g1 (2).

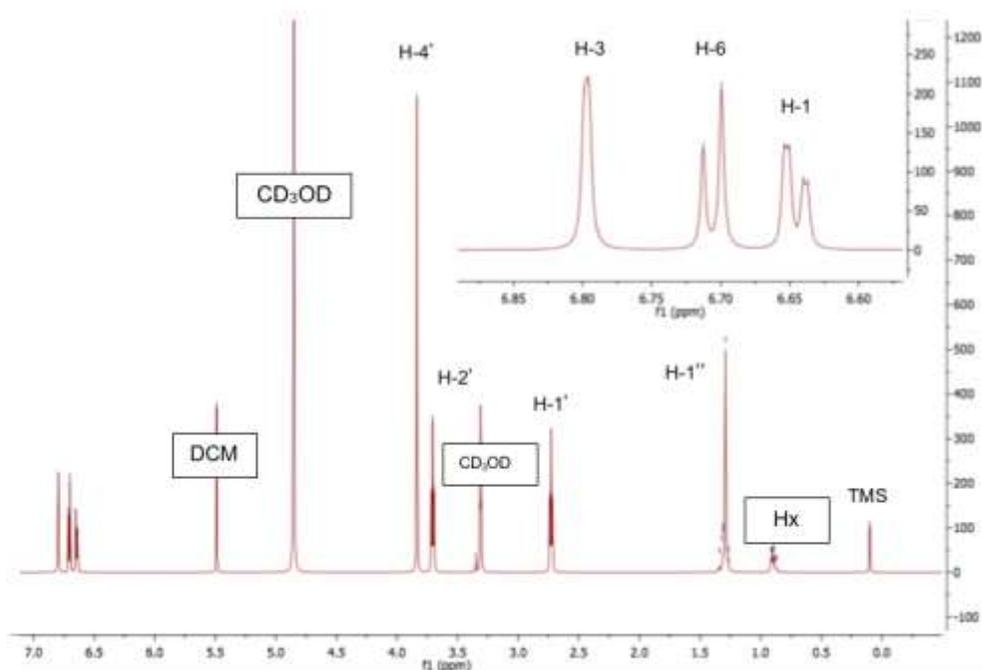


Figura 4.3 RMN-¹H (600 MHz, CD₃OD) del compuesto **2** (BcC-6g1).

En el espectro de RMN-¹³C (150 MHz, CD₃OD, Figura 4.4) se observan 11 señales. Una de estas se observa a δ 170.6, la cual es característica de un grupo carbonilo. El análisis del espectro HSQC permitió asignar posición a tres de los seis carbonos pertenecientes al anillo aromático en la estructura a δ 149.1, 146.2, 132.1, 122.7 (H-1), 116.4 (H-6), 114.0 (H-3). Se observa la presencia de una señal característica de un grupo metoxilo a δ 56.6 (H-4') y dos señales desplazadas a δ 64.8 y 40.1, unidas al grupo carbonilo. Finalmente, una señal está presente a δ 31.0, la cual, basados en el experimento HSQC, correspondería a un grupo metileno (H-1''). Los datos de los experimentos de RMN-¹H y ¹³C y sus correlaciones HMBC están detallados en las Figura 4.5 y en la Tabla 4.1.

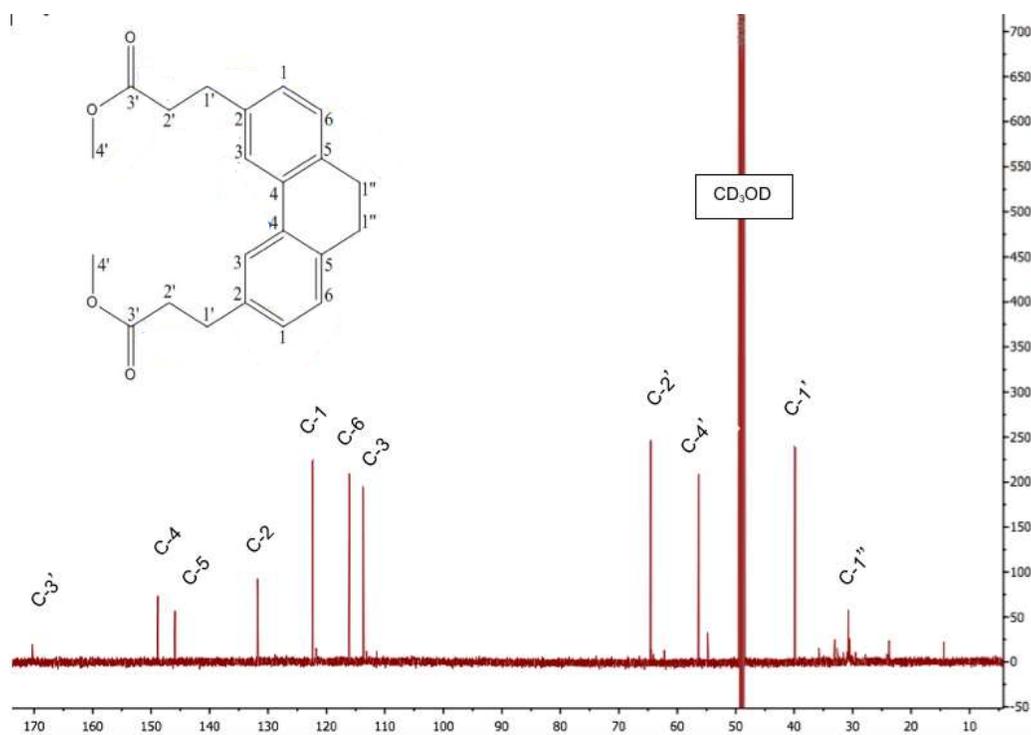
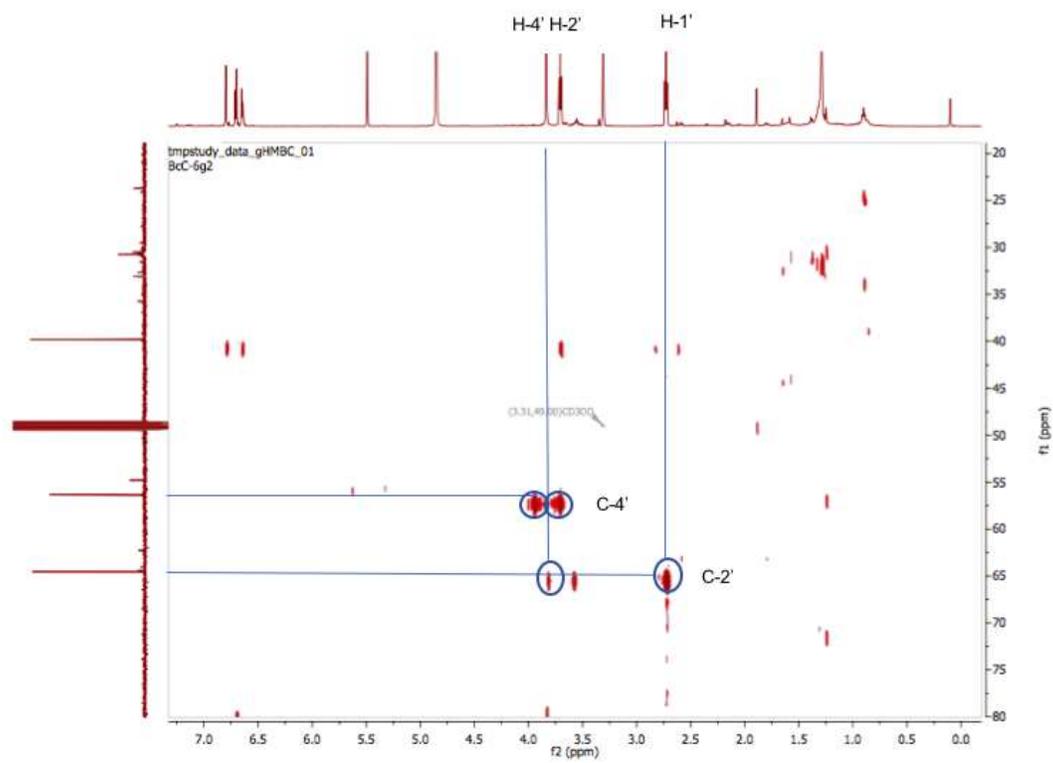


Figura 4.4 RMN- ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) del compuesto 2 (BcC-6g1).



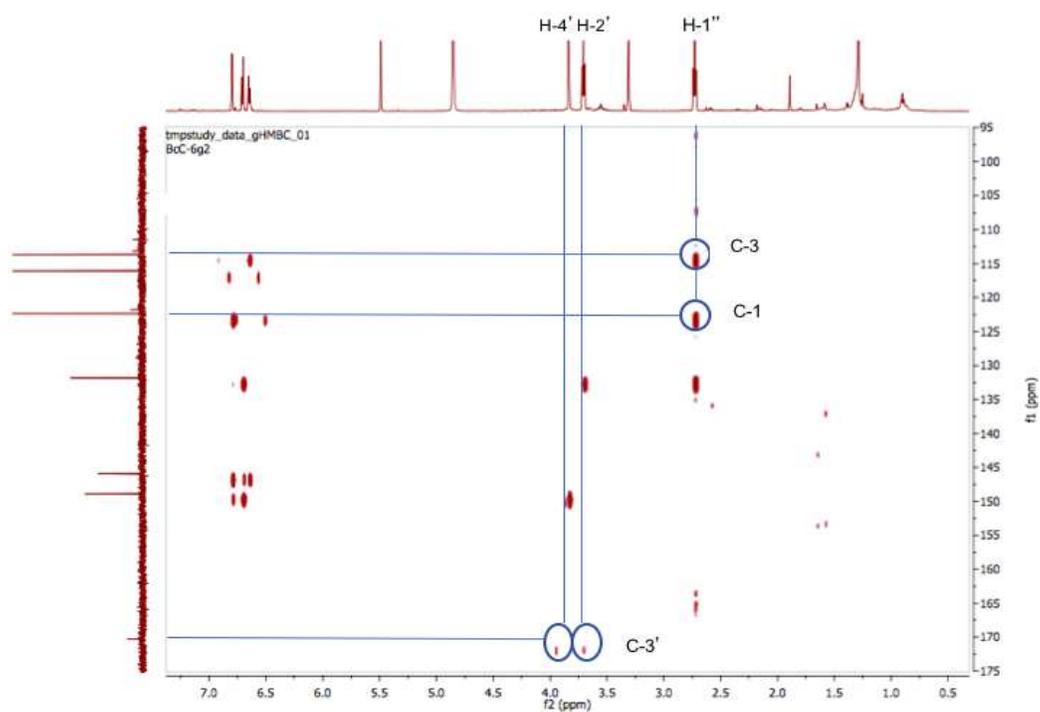


Figura 4.5 Análisis de correlaciones del experimento HMBC del compuesto **2** (BcC-6g1).

Tabla 4.1 Datos de los experimentos de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C y sus correlaciones en HMBC del compuesto **2** (BcC-6g1).*

Numeración	RMN ^{13}C (δ)	RMN ^1H (δ)	HMBC
1	122.7	6.65 (1H, d, $J = 8.0, 2.0$)	C-1', C-3, C-5
2	132.1		
3	114.0	6.80 (1H, d, $J = 2.0$)	C-1, C-5, C-4
4	149.1		

5	146.2		
6	116.4	6.71 (1H, d, $J = 8.0$)	C-2, C-5, C-4
1'	40.1	2.73 (2H, t, $J = 7.1$)	C-2', C-3, C-1, C-2, C-3'
2'	64.8	3.71 (2H, t, $J = 7.1$)	C-1', C-2, C-3'
3'	170.6		
4'	56.6	3.84 (3H, s)	C-2', C-3'
1''	31.0	1.29 (2H, s)	C-4, C-5

* RMN- ^1H a 600 MHz, RMN- ^{13}C a 150 MHz, CD_3OD .

Las principales correlaciones de HMBC y la estructura propuesta para el compuesto **2** (BcC-6g1) se observan en la Figura 4.6. Inicialmente, en el espectro de RMN- ^{13}C se detectaron 11 carbonos en el compuesto, pero el espectro de masas revela que la molécula posee una masa de 352 m/z lo cual, junto con el análisis de su espectro de RMN- ^1H , indica que la molécula es un dímero con fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_4$. La estructura propuesta posee una estructura básica C6-C3 dimerizada. Al realizar una búsqueda en Scifinder no se encontraron estructuras relacionadas. El nombre que proporciona el programa ChemDraw es éster metílico del ácido 3-[6-(2-metoxicarbonil-etil)-9,10-dihidrofenantren-3-il]-propiónico, y al ser una estructura novedosa se le dio el nombre común de crassifolín.

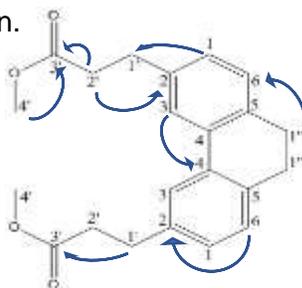


Figura 4.6 Estructura y principales correlaciones en HMBC de crassifolín (**2**, BcC-6g1).

4.2.4 Elucidación estructural del compuesto **3** (3β -friedelanol, BcC-3c1)

Del compuesto **3** se obtuvo 5.5 mg, tiene una apariencia de agujas de color blanquecino. En cromatografía de gases presenta un pico con t_R de 23.373 min con un porcentaje de pureza de 97.81% (Figura 4.7).

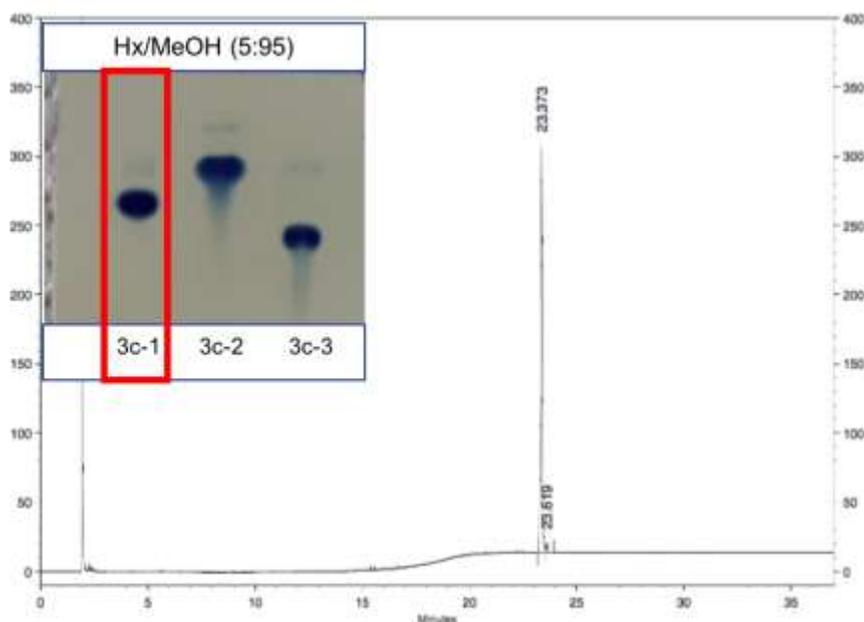


Figura 4.7

Cromatograma en CG y CCD de la muestra BcC-3c1 (3).

En el análisis de su espectro de masas obtenido por CG-EM, el compuesto **4** presentó un patrón de fragmentación característico de un triterpeno y cuya comparación con la base de datos NIST del equipo tiene un porcentaje de similitud de 74.7% con el 3β -friedelanol (Figura 4.8).

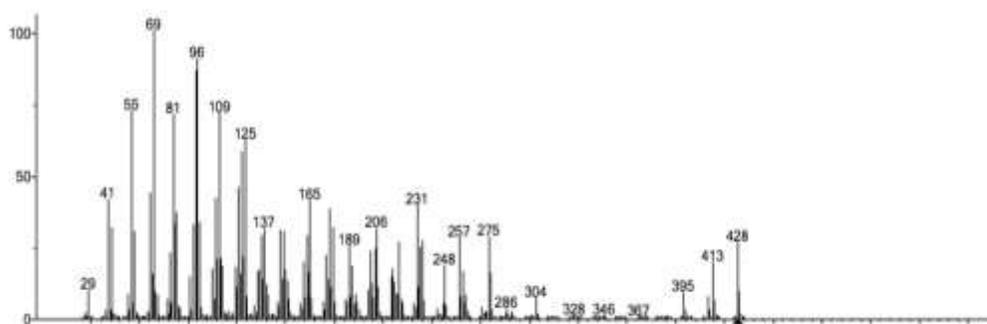


Figura 4.8 Espectro de masas obtenidos por CG-EM mostrando el patrón de fragmentación del compuesto **3** (BcC-3c1).

Para poder confirmar los resultados anteriores, se obtuvieron los espectros de RMN- ^1H y de ^{13}C . Los espectros obtenidos fueron comparados con los reportados por Kiem *et al.* (2004) quienes aislaron al 3β -friedelanol de las hojas de *Mallotus apelta*. La descripción física y la masa molecular reportada concuerdan con nuestros resultados. Con base en la comparación de los espectros de RMN- ^{13}C de 3β -friedelanol y los del compuesto **3** se observó que se trataban del mismo compuesto (Figura 4.9, Tabla 4.2).

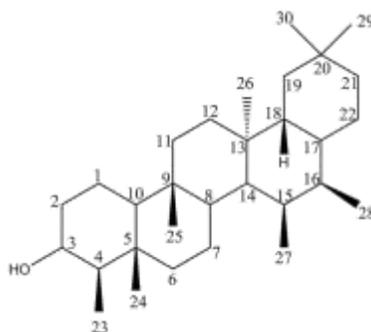


Figura 4.9 Estructura del compuesto **3** (3β -friedelanol, BcC-3c1).

Tabla 4.2 Análisis comparativo del desplazamiento químico en RMN- ^{13}C del 3β -friedelanol y el compuesto **3** (BcC-3c1).

C	3 β -friedelanol	BcC-3c1
1	19.6	18.8
2	36.7	36.2
3	72.2	72.9
4	53.2	53.3
5	37.4	37.2
6	41.4	41.8
7	17.8	17.7
8	53.0	49.3
9	38.7	38.5
10	60.1	61.5
11	35.3	35.3
12	30.6	30.7
13	39.7	39.8
14	38.3	37.9
15	32.8	32.9
16	36.1	35.7
17	30.1	30.1
18	42.9	42.9
19	36.1	35.4
20	28.1	28.3
21	32.4	32.4
22	39.3	39.4
23	9.9	11.7
24	14.6	15.9
25	18.1	16.5
26	20.1	20.2
27	18.6	18.4
28	31.8	31.9
29	32.1	32.2
30	35.1	35.1

4.2.5 Identificación estructural del compuesto 4 (friedelina, BcC-3c2)

Del compuesto **4** se aislaron 8.0 mg, tiene una apariencia de un sólido en forma de agujas de color blanquecino. En cromatografía de gases presenta un pico con t_R de 23.742 min con un porcentaje de pureza de 95.69% (Figura 4.10). En el espectro de masas obtenido por CG-EM se logró identificar el ión molecular de este metabolito a 426 m/z y comparando su patrón de fragmentación con espectros de la base NIST del equipo se logró identificar como friedelina (Figura 4.11).

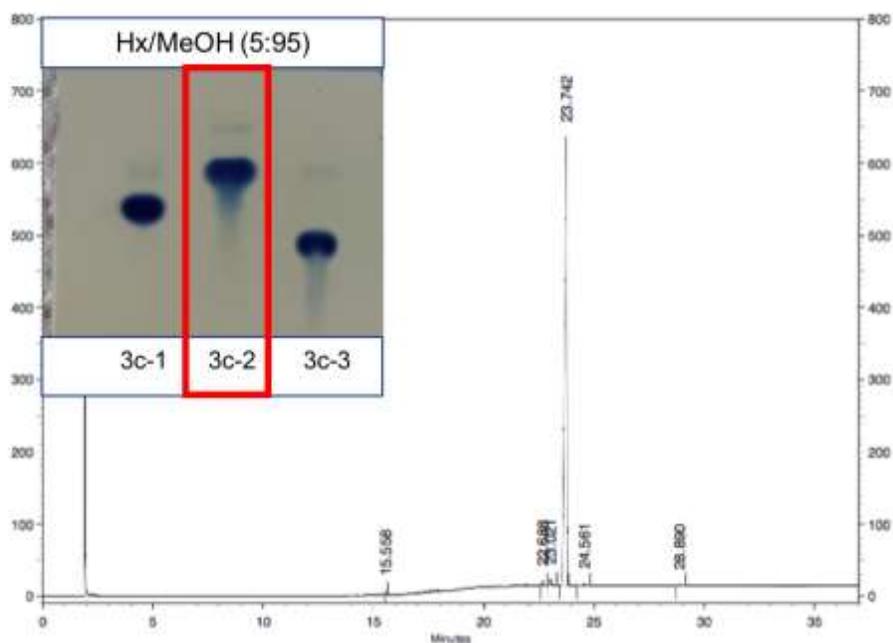


Figura 4.10 Cromatograma de gases y CCD del compuesto **4** (BcC-3c2).

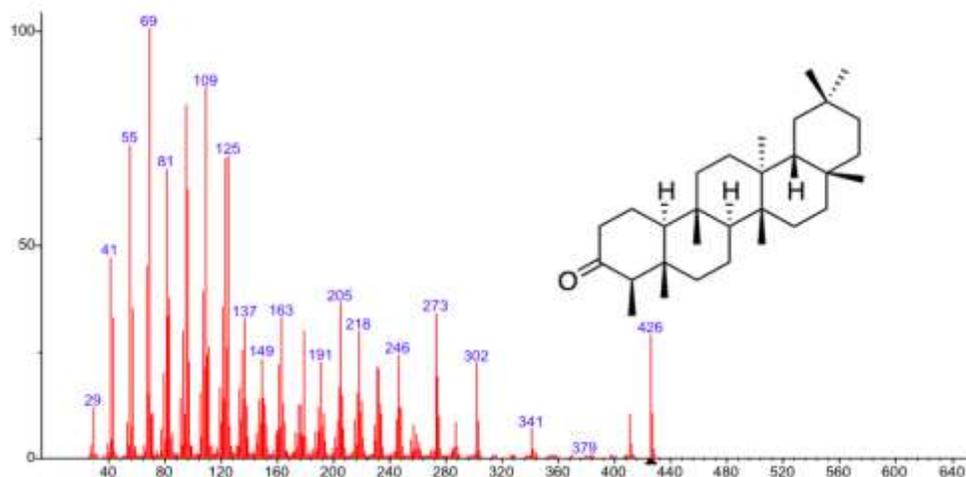


Figura 4.11 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la friedelina (**4**, BcC-3c2).

4.2.6 Identificación estructural de la mezcla **5** (BcC-6g3)

De esta mezcla se obtuvo 3.2 mg, tiene una apariencia de un polvo blanquecino. En cromatografía de gases presenta dos picos con t_R de 18.198 min y de 18.449 min, respectivamente, con un porcentaje de abundancia en la muestra de 47.5% y 52.5%, respectivamente (Figura 4.12).

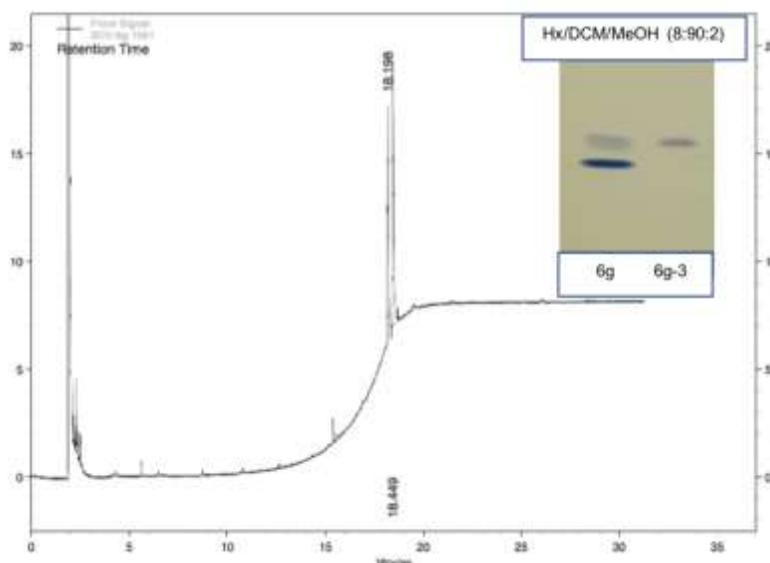


Figura 4.12 Cromatograma de gases y CCD de la mezcla de compuestos de la mezcla **5** (BcC-6g3).

Debido a la complejidad de realizar análisis en una mezcla de compuestos, las moléculas de la mezcla **5** (BcC-6g3) aún se encuentran en proceso de elucidación estructural.

4.2.7 Identificación estructural de la mezcla **6** (BcC-3c3)

De la mezcla **6** (BcC-3c3) se obtuvo 14 mg, tiene una apariencia de agujas de color blanquecino. En cromatografía de gases presenta dos picos con t_R a 21.769 y 22.188 min, con un porcentaje de abundancia de 67.46 y 26.80%, respectivamente (Figura 4.13). En el cromatograma obtenido por CG-EM se logró identificar que cada uno de los compuestos presenta un ión molecular a 426 m/z , pero con un patrón de fragmentación distinto.

Comparando su patrón de fragmentación con la base NIST del equipo se logró identificar como una mezcla de α -amirina y β -amirina, siendo β -amirina el compuesto con mayor abundancia con t_R de 21.769 (Figuras 4.14 y 4.15).

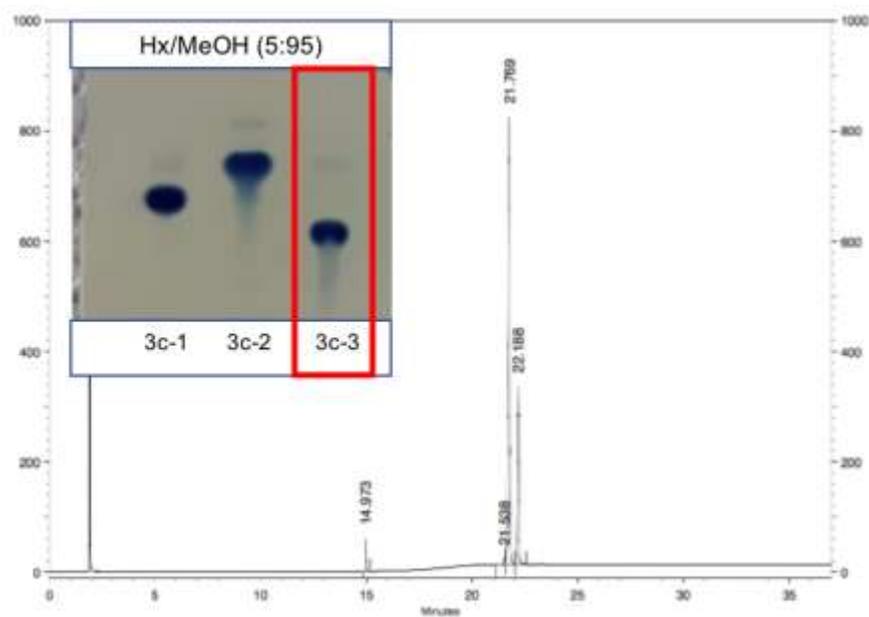


Figura 4.13 Cromatograma obtenido por CG-EM y CCD de la mezcla **6** (BcC-3c3).

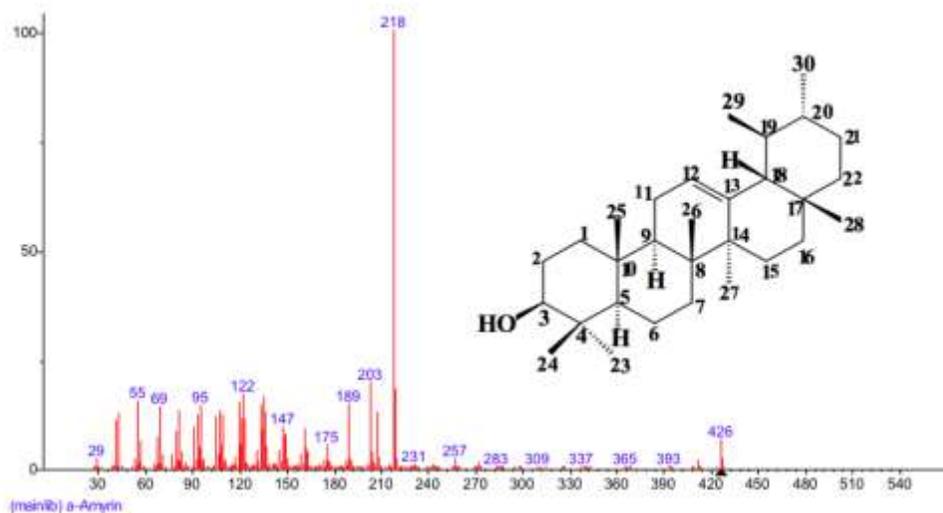


Figura 4.14 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la α -amirina.

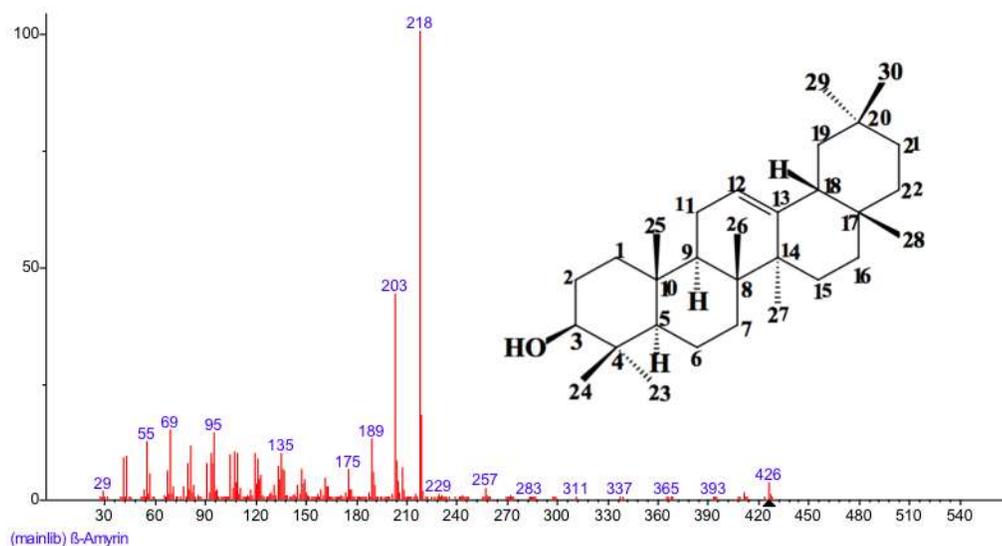


Figura 4.15 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la β -amirina.

4.4 Discusión

Mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos se logró la identificación y/o elucidación de las estructuras de algunas de las moléculas aisladas descritas en el capítulo II. Para este fin se empleó: espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), que incluyó métodos unidimensionales (^1H , ^{13}C , DEPT-135), bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Las plantas son depósitos de compuestos bioactivos, que se sabe son químicamente equilibrados, efectivos y menos dañinos en comparación con las medicinas sintéticas. La resistencia actual y los efectos tóxicos de los medicamentos disponibles han llevado a evaluar el efecto leishmanicida de varios extractos de plantas y sus compuestos purificados. Hasta el momento, nuestros resultados indican que el compuesto **2** (BcC-6g1) proveniente de la fracción más activa (BcC-4e) no ha sido publicado antes en la literatura científica, por lo que el reporte de éste es sumamente importante para fortalecer el perfil fitoquímico de *B. crassifolia*. De los metabolitos aislados de la fracción menos activa (BcC-3c), se logró identificar mediante CG-EM cuatro triterpenos: 3 β -friedelanol (**3**), friedelina (**4**), y la mezcla α -amirina y β -amirina (**6**).

A pesar de la amplia variedad de compuestos (alrededor de 30,000), las enzimas responsables llevan a cabo transformaciones sólo en unos pocos sustratos. Las terpeno-sintetasas son enzimas importantes en el proceso, responsables de ciclaciones y varios reordenamientos que conducen a diferentes núcleos y configuraciones a partir de una estructura base. Después de que el terpeno se activa, los carbocationes están presentes en todas partes y permiten la formación de múltiples compuestos (De Oliveira, 2019). La friedelina contiene una diversidad de transformaciones: ciclaciones, expansiones de anillo y cambios de hidruro/alquilo en diversos entornos químicos. Aunque se compone principalmente de carbocationes terciarios, hay un par de carbocationes secundarios en los pasos iniciales. Además, representa el triterpeno pentacíclico más reordenado producido por una oxidoescualeno ciclasa (De Oliveira, 2019). Como producto de la diversidad de reacciones en la friedelina, uno de sus productos es el 3 β -friedelanol (**3**, BcC-3c1), el cual difiere de la primera en que en el carbono C-3 existe un grupo hidroxilo en lugar de una cetona.

Para el caso de la mezcla BcC-3c3 (**7**) se demostró mediante CG-EM el patrón característico para la mezcla de los isómeros de la amirina (α y β). Estos difieren estructuralmente en la posición del grupo metilo en C-29; en el primer caso (α -amirina), este metilo se encuentra unido al carbono C-19, en cambio en su isómero (β -amirina) dicho metilo está acoplado al carbono cuaternario C-20. Estas leves diferencias estructurales les confiere características químicas y por lo tanto biológicas distintas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

1. La fracción más activa de *Byrsonima crassifolia* correspondió a la diclorometánica BcC-2b, con una $CI_{50} = 1.06 \mu\text{g/mL}$ contra *promastigotes* de *L. (L.) mexicana* a nivel *in vitro*.
2. Los dos compuestos aislados de la fracción más activa (BcC-6b1, **1**; BcC-6g1, **2**) presentan una alta actividad *in vitro* contra *promastigotes L. (L.) mexicana* ($CI_{50} = 3.56$ y $4.39 \mu\text{g/mL}$, respectivamente).
3. La estructura del compuesto **2** (BcC-6g1) es nueva, pues no ha sido reportada con anterioridad en la literatura, de acuerdo con la búsqueda realizada en la base de datos SciFinder[®], por lo cual este compuesto fue nombrado como crassifolín.
4. De los compuestos aislados, se lograron identificar mediante CG-EM cuatro triterpenos: 3β -friedelanol (**3**), friedelina (**4**) y la mezcla de α -amirina y β -amirina (**6**) y se reporta por primera vez su actividad biológica *in vitro* contra *promastigotes* de *L. (L.) mexicana*.
5. Los compuestos 3β -friedelanol (**3**) y friedelina (**4**) se reportan por primera vez en la corteza de *Byrsonima crassifolia*, ya que una búsqueda en la literatura no arrojó publicaciones previas.

5.2 PERSPECTIVAS

1. Evaluar mediante ensayos *in vitro* con amastigotes intracelulares la actividad biológica de los metabolitos que presentaron mayor actividad contra promastigotes.
2. Evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados.
3. Considerando que el desarrollo de las lesiones en LCL suele ser polimicrobiana, evaluar la actividad biológica de los compuestos aislados contra microorganismos comúnmente reportados en dichas lesiones.
4. Realizar modificaciones químicas de los compuestos aislados que puedan potenciar la actividad biológica.
5. Debido a la evidencia reportada de actividad biocida de los isómeros de la amirina contra especies de *Leishmania* distintas a la evaluada en este proyecto, separar mediante técnicas cromatográficas la mezcla BcC-3c3 (**6**) y evaluar nuevamente los metabolitos por separado.
6. En vista de que la mezcla BcC-6g3 (**5**) presentó buena actividad inhibitoria, reaislar esta fracción y separar los metabolitos que le confieren la actividad.
7. Investigar la presencia de los metabolitos aislados en otras partes de la planta (hojas, raíz, frutos).
8. Investigar la presencia de los metabolitos aislados en otras fracciones del extracto metanólico (hexánico, diclorometánico, acuoso).
9. Realizar estudios de la variación temporal de la producción de los metabolitos activos.
10. En el desarrollo de los bioensayos, las fracciones y los metabolitos se disuelven en DMSO, y debido a las características de este disolvente se presentan problemas en las diluciones de compuestos de baja polaridad. Estandarizar bioensayos donde se evalúen otros disolventes.
11. Una vez elucidadas las estructuras de los compuestos activos, realizar estudios de acoplamiento molecular para predecir posibles mecanismos de acción.

REFERENCIAS

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votypka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D. (2016). A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10, e0004349.
- Altamirano-Enciso, A., Marzochi, M., Moreira, J., Schubach, A., Marzochi, K. (2003). Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 10, 853-882.
- Andrade-Narváez, F.J., Vargas-González, A., Canto-Lara, S.B., Damián-Centeno, A.G. (2001). Clinical picture of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, México. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96, 163-167.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Schmid, C., Weiss, C., Bruggisser, R., Gertsch, J., Wasescha, M, Sticher, O. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 43-52.
- Antonisamy, P., Duraipandiyan V., Valan-Arasu, M., Aravinthan, A., Al-Dhabi, N.A., Ignacimuthu, S., Choi, K.C., Jong-Hoon, K. (2015). Protective effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. against ethanol-induced gastric ulcer in rats and possible underlying mechanisms. *European Journal of Pharmacology*, 750, 167-175.
- Antonisamy, P., Duraipandiyan, V., Ignacimuthu, S. (2011). Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraantha* Lam. in mouse and rat models. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63, 1070-1077.
- Armúa-Fernández, M.T., Venzal, J.M. (2019). Leishmaniosis: brief update. *Veterinaria*, 55, 29-36.
- Babajev, K.B., Babajev, O.G., Korepanov, V.I. (1991). Treatment of cutaneous leishmaniasis using a carbon dioxide laser. *Bulletin of the World Health Organization*, 69, 103-106.
- Béjar, E., Amarquaye, A., Che, C., Malone, M.H., Fong, H.S.F. (1995). Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. *International Journal of Pharmacognosy*, 33, 25-32.
- Béjar, E., Reyes-Chilpa, R. Jiménez-Estrada, M. (2000). Bioactive compounds from selected plants used in the XVI century Mexican traditional medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*, 24, 799-844.

-
- Bezerra de Menezes, J.P., Sampaio-Guedes, C.E., Almeida-Petersen, A.L.O., Mothé-Fraga, D.B., Tavares-Veras., P.S. (2015). Advances in development of new treatment for leishmaniasis. *BioMed Research International*, 1, 1-11.
- Bonfante, R., Barruela, S. (2002). Leishmanias y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Barquisimeto: Editorial Lara, pp. 270.
- Cáceres, A., López, B.R., Girón, M.A., Logeman, H. (1991). Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. Screening for antimycotic activity of 44 plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 38, 31-38.
- Camacho, M.d.R., Mata, R., Castaneda, P., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Croft, S.L., Phillipson, J.D. (2000). Bioactive compounds from *Celaenodendron mexicanum*. *Planta Medica*, 66, 463-468.
- Camacho, M.d.R., Phillipson, J.D., Croft, S.L., Solis, P.N., Marshall, S.J., Ghazanfar, S.A. (2003). Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 89, 185-191.
- Carvalho, P.B., Ferreira, E.I. (2001). Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, 72, 599-618.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention) (2018). Parasites-Leishmaniasis. <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html> [Acceso Julio 2021].
- Chang, F.-R., Yen C.-T., Ei-Shazly, M., Lin, W.-H., Yen, M.-H., Lin, K.-H., Wu, Y.-C. (2012). Anti-human coronavirus (anti-HCoV) triterpenoids from the leaves of *Euphorbia neriifolia*. *Natural Product Communications*, 7, 1415-1417.
- Chawla, B., Madhubala, R. (2010). Drug targets in *Leishmania*. *Journal of Parasitic Diseases*, 34, 1-13.
- De Lima, J.P.S., Pinheiro, M.L.B., Santos, A.M.G., Pereira, J.L.S., Santos, D.M.F., Barison, A., Silva-Jardim, I., Costa, E.V. (2012). *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). *Revista Virtual de Química*, 4, 692-702.
- De Oliveira, M.T. (2019). Quantum chemical explorations into the biosynthesis of pentacyclic triterpene friedelin. Tesis de Doctorado. Universidade De São Paulo, Instituto De Química De São Paulo, Química Orgânica E Biológica., Brasil, pp. 28.

-
- Delgado-Altamirano, R., Monzote, L., Piñón-Tápanes, A., Vibrans, H., Rivero-Cruz, J.F., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A. (2017). *In vitro* antileishmanial activity of Mexican medicinal plants. *Heliyon*, 3, e00394.
- Duarte, O. (2011). Nance (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), en: Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits, Yahia, E.M. (Editor). Woodhead Publishing, Cambridge, U.K., Vol. 4, Capítulo 3, pp. 44-50.
- Espinosa, O.A., Serrano, M.G., Camargo, E.P., Teixeira, M.M.G., Shaw, J.J. (2018). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology*, 145, 430-442.
- Fabricant, D. S., Farnsworth, N.R. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109 (Suppl. 1), 69-75.
- Fraga, J., Montalvo, A.M., De Doncker, S., Dujardin, J.C., Auwera, G.V. (2010). Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 238-245.
- Geiss, F., Heinrich, M., Hunkler, D., Rimpler, H. (1995). Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. *Phytochemistry*, 39, 635-643.
- Getti, G., Durgados, P., Dominguez-Carmona, D., Martín-Quintal, Z., Peraza-Sánchez, S., Peña-Rodríguez, L., Humber, D. (2009). Leishmanicidal activity of yucatecan medicinal plants on *Leishmania* species responsible for cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology*, 95, 456-460.
- Giménez, V.M.M., Silva, M.L.A., Cunha, W.R., Januario, A.H., Costa, E.J.X., Pauletti, P.M. (2020). Influence of environmental, geographic, and seasonal variations in the chemical composition of *Miconia* species from Cerrado. *Biochemical Systematics and Ecology*, 91, 104049.
- Goodwin, L.G. (1995). Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 89, 339-341.
- Guilhon-Simplicio, F., Pereira, M.M. (2011). Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). *Química Nova*, 34, 1032-1041.

-
- Guzmán-Pozos, A.M., Cruz-Cruz, E., Miranda-Cordova, C.A. (2013). Germinación de semillas de *Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 4, 82-89.
- Hall, L.R., Titus, R.G. (1995). Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *Journal of Immunology*, 155, 3501-3506.
- Heinrich, M. (2000). Ethnobotany and its role in drug development. *Phytotherapy Research*, 14, 479-488.
- Heinrich, M., Rimpler, H., Barrera, A. (1992). Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): ethnopharmacologic evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 36, 63-80.
- Herrera-Ruiz, M., Zamilpa, A., Gonzáles-Cortazar, M., Reyes-Chilpa, R., León, E., García, M.P., Tortoriello, J., Huerta-Reyes, M. (2011). Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine*, 18, 1255-1261.
- Hocquemiller, R., Cortes, D., Arango, G.J., Myint, S.H., Cavé, A. (1991). Isolement et synthese de l'espintanol, nouveau monoterpene antiparasitaire. *Journal of Natural Products*, 54, 445-452.
- Hotez, P.J., Damania, A., Bottazzi, M.E. (2020). Central Latin America: two decades of challenges in neglected tropical disease control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14, e0007962.
- Irías-Mata, A., Jiménez, V.M., Steingassd, C.B., Schweiggertd, R.M., Carled, R., Esquivel, P. (2018). Carotenoids and xanthophyll esters of yellow and red nance fruits (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth) from Costa Rica. *Food Research International*, 111, 708-714.
- Jabeen, K., Javid, A., Ahmad, E., Athar, M. (2011). Antifungal compounds from *Melia azedarach* leaves for management of *Ascochyta rabiei*, the cause of chickpea blight. *Natural Product Research*, 25, 264-276.
- Katakura, K. (2009). Molecular epidemiology of Leishmaniasis in Asia (focus on cutaneous infections). *Current Opinion in Infectious Diseases*, 22, 126-130.

-
- Kiem, P.V., Minh, C.V., Huong, H.T., Nam, N.H., Lee, J.J., Kim, Y.H. (2004). Pentacyclic triterpenoids from *Mallotus apelta*. *Archives of Pharmacal Research*, 27, 1109-1113.
- Kuete, V., Nguemeving, J.R., Beng, V.P., Blaise, A.A.G., Etoa, F.X., Meyer, M., Bodo, B., Nkengfack, A.E. (2007). Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* de Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 372-379.
- Kundu, J.K., Rouf, A.S.S., Hossain, N., Hasan, C.M., Rashid, M.A. (2000). Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. *Fitoterapia*, 71, 577-579.
- Lezama-Dávila, C.M., Pan, L., Isaac-Márquez, A.P., Terrazas, C., Oghumu, S., Isaac-Márquez, R., Pech-Dzib, M.Y., Barbi, J., Calomeni, E., Parinandi, N., Kinghorn, A.D., Satoskar, A.R. (2014). *Pentalinon andrieuxii* root extract is effective in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. *Phytotherapy Research*, 28, 909-916.
- Loría-Cervera, E.N., Sosa-Bibiano, E.I., Van Wynsberghe, N.R., Andrade-Narváez, F.J. (2018). Finding a model for the study of *Leishmania (Leishmania) mexicana* infection: The Yucatan deer mouse (*Peromyscus yucatanicus*) as a suitable option. *Acta Tropica*, 187, 158-164.
- Lü, A., Chen, J., Li, W.L., Ren, B.R., Wu, J.L., Kang, H.Y., Zhang, H.Q., Adams, A., De Kimpe, N. (2009). Hypoglycemic and hypolipidemic effects of the total triterpene acid fraction from *Folium eriobotryae*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 486-491.
- Lysenko, A.J. (1971). Distribution of leishmaniasis in the old world. *Bulletin of the World Health Organization*, 44, 515-520.
- Maldini, M., Montoro, P., Pizza, C. (2018). Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 1-6.
- Martín-Quintal, Z., Moo-Puc, R., González-Salazar, F., Chan-Bacab, M.J., Torres-Tapia, L.W., Peraza-Sánchez, S.R. (2009). In vitro activity of *Tridax procumbens* against promastigotes of *Leishmania mexicana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 463-467.

-
- Mesia, G.K., Tona, G.L., Nanga, T.H., Cimanga, R.K., Apers, S., Cos, P., Maes, L., Pieters, L., Vlietinck, A.J. (2008). Antiprotozoal and cytotoxic screening of 45 plant extracts from Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 115, 409-415.
- Monzote, L., García, M., Montalvo, A.M., Scull, R., Miranda, M. (2010). Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 168-173.
- Morales, C., Gómez-Serranillos, M.P., Iglesias, I., Villar, A.M., Cáceres, A. (2001). Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala. *Il Farmaco*, 56, 523-26.
- Moreno-Pizani, M.A., Paredes-Trejo, F.J., Farias-Ramirez, A.J., Dos Santos, H.T., Massarioli, A.P., Marin, F.R., Takeyoshi, B.Y., Alves-Marques, P.A., De Stefano-Piedade, S.M., De Alencar, S.M. (2020). Essential oil content of *Baccharis crispa* Spreng. Regulated by water stress and seasonal variation. *AgriEngineering*, 2, 458-470.
- Muskus, C.E., Villa, M.M. (2002). Metacicllogénesis: un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*. *Biomédica, Revista del Instituto Nacional de Salud*, 22, 167-177.
- Mwangi, E.S.K., Keriko, J.M., Machocho, A.K., Wanyonyi, A.W., Malebo, H.M., Chhabra, S.C. Tarus, P.K. (2010). Antiprotozoal activity and cytotoxicity of metabolites from leaves of *Teclea trichocarpa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 726-731.
- Najim, R.A., Sharquie, K.E., Farjou, I.B. (1998). Zinc sulphate in the treatment of cutaneous leishmaniasis: an *in vitro* and animal study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93, 831-837.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79, 629-661.
- Oliveira-Almeida, M.F., Rodrigues de Melo, A.C., Belém Pinheiro, M.L., Andrade-Silva, L.R., Leão de Souza. A.D. (2011). Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Quimica Nova*, 34, 1182-1187.
- Oliveira-Neto, M.P., Schubach, A., Mattos, M., Gocalves da Costa, S.C., Pirmez, C. (1997). Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil - an area of *Leishmania* (V.) *braziliensis* transmission. *International Journal of Dermatology*, 36, 463-468.

-
- Olórtegui-Rios, V. (2016). Evaluación de antioxidantes fenólicos presentes en la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano). Tesis de grado. Universidad Nacional de La Amazonía Peruana, Perú, pp. 77.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2019). Informe epidemiológico de las Américas <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51739> [Acceso abril 2021].
- Palhares, R.M., Gonçalves-Drummond, M., Figueiredo-Brasil, A.B.S., Pereira-Cosenza, G., Lins-Brandão, M.G., Oliveira, G. (2015). Medicinal plants recommended by the World Health Organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees. Their quality. *PLoS ONE*, 10, e0127866.
- Pech-May, A., Peraza-Herrera G., Moo-Llanes D., Escobedo-Ortegón J., Berzunza-Cruz M., Becker-Fauser I., Montes de Oca-Aguilar A., Rebollar-Téllez E. (2016). Assessing the importance of four sandfly species (Diptera: Psychodidae) as vectors of *Leishmania mexicana* in Campeche, México. *Medical and Veterinary Entomology*, 30, 310-320.
- 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 Yucatán Península. *Fitoterapia*, 78, 315-318.
- Ramesh, N., Viswanathana, M.B., Saraswathy, A., Balakrishnac, K., Brindhab., Lakshmanaperumalsamy, P. (2001). Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*. *Fitoterapia*, 72, 934-936.
- Rastrelli, L., De Tommasi, N., Berger, I., Cáceres, A., Saravia, A., De Simonet, F. (1997). Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytochemistry*, 45, 647-650.
- Reguera, R.M., Calvo-Álvarez, E., Álvarez-Velilla, R., Balaña-Fouce, R. (2014). Target-based vs. phenotypic screenings in *Leishmania* drug discovery: a marriage of convenience or a dialogue of the deaf? *International Journal for Parasitology, Drugs and Drug Resistance*, 4, 355-357.
- Riera, C., Napp, S., Manzanares, S. (2016). Epidemiología de la leishmaniasis humana en la ciudad de Barcelona (1997-2014). *Revista de Enfermedades Emergentes*, 15, 68-76.
- Rivero-Cruz, J.F., Sánchez-Nieto, S., Benítez, G., Casimiro, X., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Rivero-Cruz, B. (2009). Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. *Revista Latinoamericana de Química*, 37, 155-163.

-
- Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macedo, R.O., Barbosa-Filho, J.M. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, 12, 514-535.
- Salamanca-Capusiri, E., Ruiz-Pinell, G., Ticona-Huallpara, J.C., Giménez-Turba, A. (2008). Método colorimétrico - XTT: como evaluación de alto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *Biofarbo*, 16, 21-27.
- 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.
- Sannomiya, M., Michelin, D.C., Rodrigues, C.M., Santos, L.C., Salgado, H.R.N., Hiruma-Lima, C.A., Brito, A.R.S.M., Vilegas, W. (2005). *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 26, 71-75.
- Schönian, G., Mauricio, I., Cupolillo, E. (2010). Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends in Parasitology*, 26, 466-469.
- SINAVE (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica). (2020). Boletín Epidemiológico, semana 49.
- Steverding, D. (2017). Review: The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 10, 1-10.
- Tamokou, J.D.D., Tala, M.F., Wabo, H.K., Kuate, J.R., Tane, P. (2009). Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 571-575.
- Tempone, A.G., Martins De Oliveira, C., Berlinck, G.S.R. (2011). Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Medica*, 77, 572-585.
- Tropicos. 2020. "*Byrsonima* Rich. Ex Kunth." Missouri Botanical Garden. <http://legacy.tropicos.org/Name/19500795>. [Acceso enero 2020].
- Tuon, F., Amato, V., Sabbaga, V. (2008). *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunology Medical Microbiology*, 54, 158-166.
- Ullah, N., Nadhman, A., Siddiq, S., Mehwish, S., Islam, A., Jafri, L., Hamayun, M. (2016). Plants as antileishmanial agents: current scenario. *Phytotherapy Research*, 30, 1905-1925.
- Vannier-Santos, M.A., Martiny, A., De Souza, W. (2002). Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8, 297-318.

-
- Vargas-Gonzalez, A., Canto-Lara, S.B., Damian-Centeno, A.G., Andrade-Narváez, F.J. (1999). Response of cutaneous Leishmaniasis (chiclero's ulcer) to treatment with meglumine antimoniate in southeast México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61, 960-963.
- Vásquez de Ricciardi, L. (2009). Terapéutica antileishmania: revisando el pasado el presente y el futuro. *Gaceta Médica de Caracas*, 117.
- Vila-Nova, N.S., De Morais, S.M., Cajazeiras-Falcão, M.J., Negreiros-Alcantara, T.T., Travassos-Ferreira, P.A., Barreira-Cavalcanti, E.S., Pinto-Vieira, I.G., Cabral-Campello, C., Wilson, M. (2013). Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corossolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Experimental Parasitology*, 133, 334-338.
- Wyllie, S., Cunningham, M.L., Fairlamb, A.H. (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 39925-39932.
- Yang, H.H., Jong-Keun, S., Bochan, J., MingShan, Z., Jae-Ryong, K. (2011). Epifriedelanol from the root bark of *Ulmus davidiana* inhibits cellular senescence in human primary cells. *Planta Medica*, 77, 441-449.
- Zhou, Y., Messier, N., Ouellete, M., Rosen, B.P., Mukhopadhyay, R. (2004). *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 37445-37451.

ANEXOS

ANEXO I. CULTIVO DE PROMASTIGOTES DE *L. (L.) mexicana*

OBJETIVO

Obtener mediante cultivo *in vitro* promastigotes de *L. (L.) mexicana* que serán utilizados para evaluar la actividad leishmanicida de metabolitos vegetales mediante bioensayos.

DESARROLLADOR

Erika Ivett Sosa Bibiano, José Lisandro Mendoza Munguía.

PARÁSITO

Cepa MNYC/BZ/6Z/M379 *L. (L.) mexicana* (Biagi) Garnham, aislado de *Nyctomys sumichrasti*, Cayo District, Belize, 1962.

MATERIALES, EQUIPOS

1. Incubadora
2. Cabina de bioseguridad nivel II
3. Centrífuga refrigerada
4. Microscopio óptico
5. Micropipeta de 1,000 μ L
6. Micropipeta de 100 μ L
7. Micropipeta de 10 μ L
8. Puntas para micropipeta
9. Tubos cónicos Falcon de 50 mL
10. Tubos cónicos Falcon de 15 mL
11. Frascos para cultivo celular
12. Tubo Eppendorf 1.5 mL
13. Cámara de Neubauer
14. Gradillas
15. Láminas portaobjetos

REACTIVOS

1. Medio de cultivo 199 (10X)
2. Medio RPMI
3. Solución fijadora
4. Tampón Fosfato Salino (PBS)
5. Suero Fetal Bovino 10% (SFB)
6. Penicilina-Estreptomicina
7. L-Glutamina
8. Piruvato
9. β -Mercaptoetanol

PROCEDIMIENTO

Aspirado de muestra

1. Tomar 500 μ L de medio 199 en una jeringa de insulina.
2. Una vez que el animal haya sido eutanizado se deberá lavar exhaustivamente la pata infectada.
3. Localizar la región más inflamada de la pata infectada.
4. Introducir la aguja realizando movimientos circulares con el fin de romper tejidos a la vez que se introduce y aspira el medio 199.
5. Repetir hasta que el medio en la jeringa se torne turbio.
6. En un tubo cónico Falcon de 15 mL agregar 500 μ L de medio 199, 50 μ L de orina filtrada y 50 μ L de penicilina-estreptomicina, incubar a 23 °C y evaluar periódicamente hasta que la morfología de los promastigotes sea la adecuada y la cantidad de bacterias mínimas.

Cultivo

1. En un tubo cónico Falcon de 15 mL transferir un volumen de promastigotes de *L. (L.) mexicana* proveniente del paso anterior.
2. Agregar un volumen de medio TC suplementado.
3. Agregar 50 μ L de antibiótico (penicilina-estreptomicina).
4. Agregar 50 μ L de orina filtrada.

5. Incubar a 23 °C durante cinco a siete días.
6. Evaluar periódicamente bajo lente microscópico en lente objetivo de 40x.

Lavado

Al término del tiempo de incubación realizar lavado de los parásitos.

1. Aforar los tubos cónicos de cultivos a 10 mL con tampón fosfato salino pH 7.4.
2. Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C.
3. Decantar el sobrenadante.
4. Repetir los pasos anteriores dos veces más.
5. Eliminar todo el PBS posible y resuspender el botón parasitario resultante en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado.

Conteo parasitario

1. En un tubo Eppendorf agregar 90.0 μ L de disolución fijadora.
2. Agregar 10 μ L de la suspensión parasitaria para poder fijarlos.
3. Homogeneizar la mezcla y realizar diluciones 1:100 y 1:1000 con disolución fijadora.
4. Agregar 10 μ L en la cámara de Neubauer y leer en la zona de conteo de glóbulos blancos (4 cuadrantes) (Figura A1.1).
5. Estimar un promedio de parásitos de los cuadrantes y multiplicar el resultado por 10,000 (constante) y luego por el factor de dilución empleado.

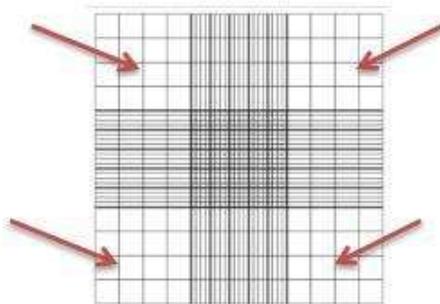


Figura A1.1 Esquema de la cámara de Neubauer, señalando las secciones donde se debe realizar el conteo de los promastigotes de *L. (L.) mexicana*.

Cálculo

Número de parásitos/mL = (promedio de parásitos contados) (factor de dilución) (10,000)

Ajuste

El conteo anterior debe ajustarse a una concentración final de 1×10^6 parásitos/mL.

ANEXO II. BIOENSAYO *IN VITRO*

OBJETIVO

Evaluar la actividad leishmanicida de compuestos vegetales mediante bioensayos *in vitro* utilizando promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*.

DESARROLLADOR

Erika Ivett Sosa Bibiano, José Lisandro Mendoza Munguía.

MATERIALES, EQUIPOS

1. Incubadora
2. Cabina de bioseguridad nivel II
3. Vórtex
4. Micropipeta de 1,000 μL
5. Micropipeta de 100 μL
6. Micropipeta de 10 μL
7. Puntas para micropipeta
8. Microplaca de placa de 96 pocillos
9. Gradillas
10. Láminas portaobjetos

MATERIALES BIOLÓGICOS

1. Promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana* (1×10^6 parásitos/mL)
2. Extractos o fracciones vegetales.

REACTIVOS

1. Medio RPMI-1640 suplementado
2. Dimetilsulfóxido al 1%
3. Tampón fosfato salino (PBS)
4. Anfotericina B (1 $\mu\text{g/mL}$)

-
5. Sal de sodio tetrazolium (XTT)
 6. Metosulfato de fenasina (PMS)

PROCEDIMIENTO

Dilución de extractos

1. La dilución se lleva a cabo en tubo Eppendorf en una relación de 20 μ L de DMSO por cada 2 mg de extracto.
2. Homogeneizar la muestra mediante agitación en vórtex hasta que esté totalmente uniforme.
3. Aforar a 1 mL con medio RPMI-1640 sin antibiótico.
4. Preparar las diluciones consecutivas para realizar el bioensayo *in vitro*.

Bioensayo: placa experimento

1. Rotular la microplaca donde se realizará los bioensayos, señalando tres pocillos por cada concentración del extracto a evaluar (pocillos de reacción) (Figura A2.1).
2. Rotular los tres pocillos designados para cada control.
3. Agregar en cada pocillo 100 μ L de medio RPMI-1640 suplementado con promastigotes de *L. (L.) mexicana* (1×10^6 parásitos/mL).
4. Agregar 100 μ L de la dilución del extracto en los pocillos asignados a cada concentración.
5. Agregar 100 μ L de cada control en la zona designada.
6. Agregar 250 μ L de PBS en todos los pocillos vacíos.
7. Incubar a 23 °C durante 6 días.

Bioensayo: placa blanco

1. Rotular la microplaca donde se realizará los bioensayos, señalando tres pocillos por cada concentración del extracto a evaluar (pocillos de reacción).
2. Rotular los tres pocillos designados para cada control.
3. Agregar en cada pocillo 100 μ L de medio RPMI-1640 suplementado.
4. Agregar 100 μ L de la dilución del extracto en los pocillos asignados a cada concentración.
5. Agregar 100 μ L de cada control en la zona designada.

6. Incubar a 23.5 °C durante 6 días.

Controles empleados

Control positivo de anfotericina B

También conocido como control de inhibición, es donde se espera que haya el máximo porcentaje de muerte del parásito puesto que se emplea un fármaco que posee propiedades leishmanicidas.

Preparación para 1 mL: diluir 8 μ L de anfotericina B (250 μ g/mL) en 992 μ L de medio RPMI-1640 suplementado. La concentración final de este control es de 1 μ g/mL.

Control negativo de RPMI-1640 suplementado con DMSO (0.5% concentración final)

Llamado también control de crecimiento, en el cual al medio de cultivo se le ha agregado DMSO al 1% para poder medir el efecto de este disolvente sobre el parásito. Con este control se puede descartar/confirmar que en el ensayo la muerte parasitaria es debida al extracto y no al DMSO en el que se encuentran disueltos los metabolitos.

Preparación para 1 mL: diluir 10 μ L de DMSO en 990 μ L de medio RPMI suplementado. La concentración final del DMSO es de 0.5%.

Control de experimento de RPMI 1640 suplementado.

En él se proporcionan las condiciones óptimas para el crecimiento del parásito.

En la Figura A2.1 se muestra la distribución de las muestras y los controles en la microplaca de 96 pocillos.

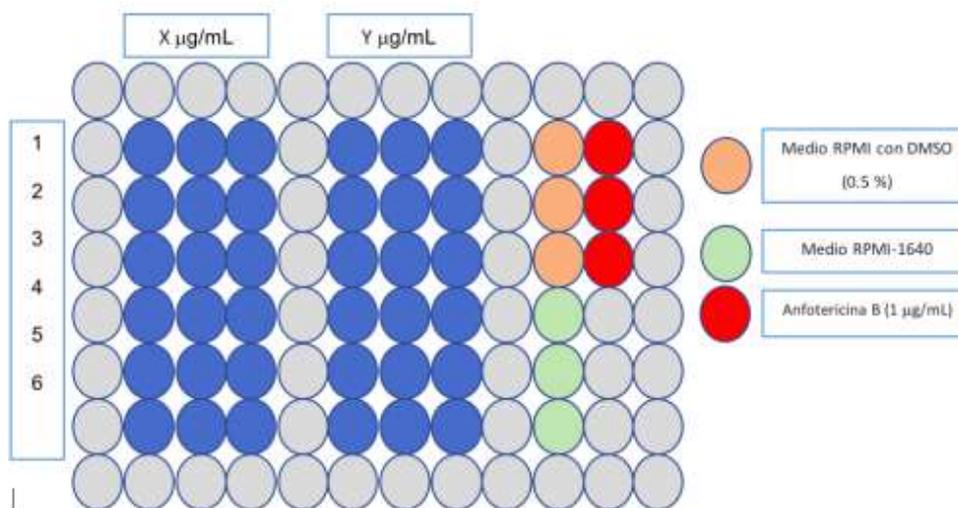


Figura A2.1 Esquema de la distribución de las muestras en la microplaca.

Lectura del bioensayo

Procedimiento

1. Agregar a cada pocillo de reacción 50 µL de XTT (1 µg/mL de XTT y 0.06 mg/mL de PMS).
2. Incubar durante 4 h a 37 °C, protegiendo la microplaca de la luz.
3. Transcurrido el tiempo de incubación leer la microplaca en un espectrofotómetro XMark TM (BioRad) a una longitud de onda de 450 nm.

Interpretación de resultados

Para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento de los parásitos (ICP) se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[\frac{A_p - A_b}{A_c - A_b} \cdot 100 \right]$$

Siendo:**Ap:** Absorbancia de la muestra.**Ab:** Absorbancia del blanco de la muestra.**Ac:** Absorbancia del control negativo (DMSO)**Ab':** Absorbancia del blanco del control negativo**Análisis de datos**

Luego de la lectura de absorbancia de los extractos vegetales se deberá calcular el promedio de todos los datos obtenidos y de su respectivo blanco. Al tener los promedios del extracto y el blanco se restan las absorbancias para tener el valor real teórico de la absorbancia de cada concentración. Se deberá realizar lo mismo con las absorbancias de los controles.

El CI_{50} se obtiene a través del programa GraphPad Prism 8 con los promedios de los datos de % ICP de cada concentración.

ANEXO III. ANÁLISIS DE DATOS MEDIANTE GRAPHPAD PRISM 8

OBJETIVO

Analizar los datos de la actividad leishmanicida de compuestos vegetales mediante bioensayos *in vitro* utilizando promastigotes de *Leishmania (L.) mexicana*.

DESARROLLADOR

José Lisandro Mendoza Munguía

MATERIALES, EQUIPOS

1. Computadora/Laptop
2. Acceso a servicio de internet

Prism de GraphPad Prism es una aplicación de bioestadística poderosa y eficiente que es útil para analizar y evaluar grandes conjuntos de datos. A diferencia de las hojas de cálculo, GraphPad Prism 8.0 proporciona ocho tipos diferentes de tablas de datos que están especialmente diseñadas para diferentes análisis. Además, tiene la capacidad de organizar datos de manera efectiva. Una de las diversas aplicaciones que posee el software es el análisis estadístico de resultados de experimentos dosis-respuesta en donde se evalúa la respuesta de un sistema biológico ante la presencia de un fármaco generalmente a distintas concentraciones y/o condiciones.

A continuación, se enumeran los pasos para el uso del programa, analizando los resultados de inhibición *in vitro* de promastigotes de *L. (L.) mexicana* ante metabolitos y mezclas aislados del extracto metanólico de la corteza de *B. crassifolia*.

PROCEDIMIENTO

Instalación del software

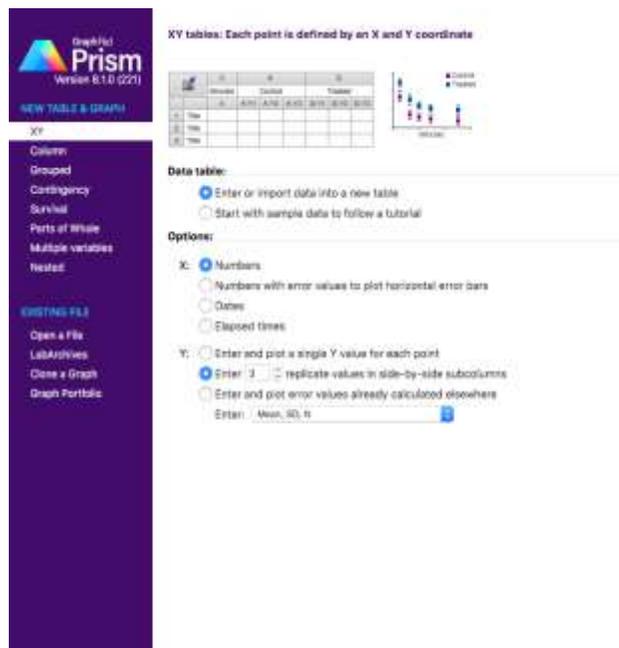
1. Descargar el programa GraphPad Prism 8.0 versión 8.1.0 for OS X desde el servidor <https://www.graphpad.com>
2. Una vez descargado, instalar el programa en el equipo (PC o Laptop)

Análisis previos

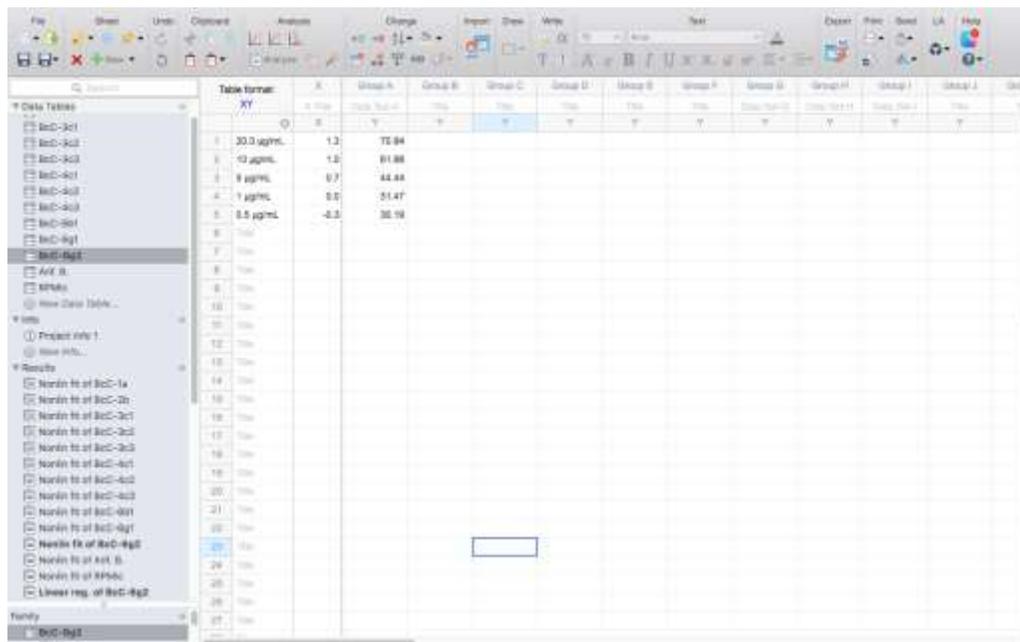
Antes de comenzar a usar GraphPad Prism 8.0, será necesario tener los resultados del % de inhibición parasitaria y los puntos de concentración de cada extracto evaluado expresados en versión logarítmica. Para este fin se podrá utilizar la hoja de cálculo de Microsoft Excel®.

Uso de GraphPad Prism 8.0

1. Abrir software GraphPad Prism 8.0
2. Seleccionar el tipo de gráfica & tabla XY, en las opciones para el eje X seleccionar el ítem “numbers” y en el eje Y “replicate values in side by-side subcolumns”, anotando el número de réplicas que se realizaron.



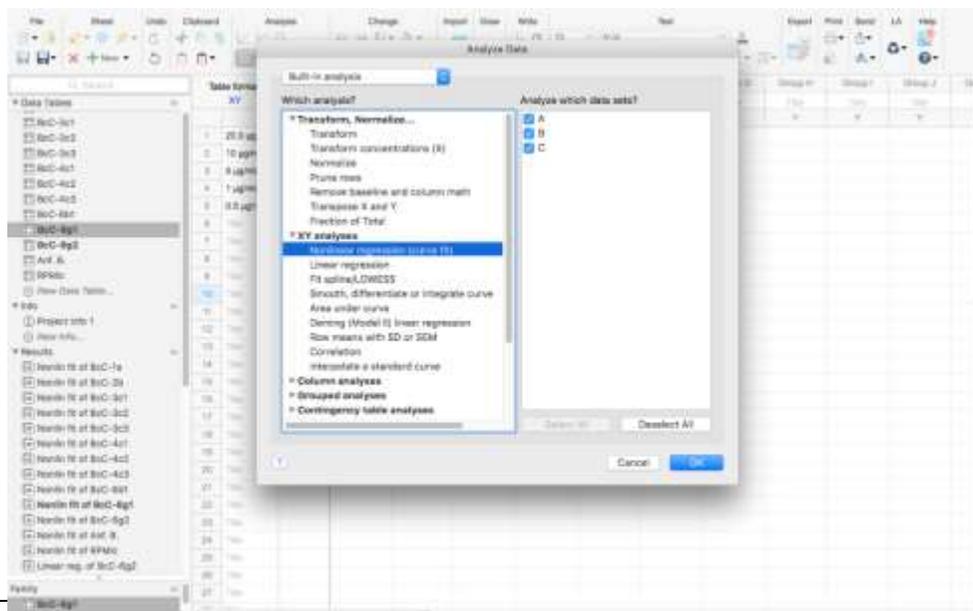
3. En la columna para el eje X colocar los puntos de concentración de cada extracto evaluado expresados en versión logarítmica y en el eje Y los porcentajes de inhibición de cada réplica.



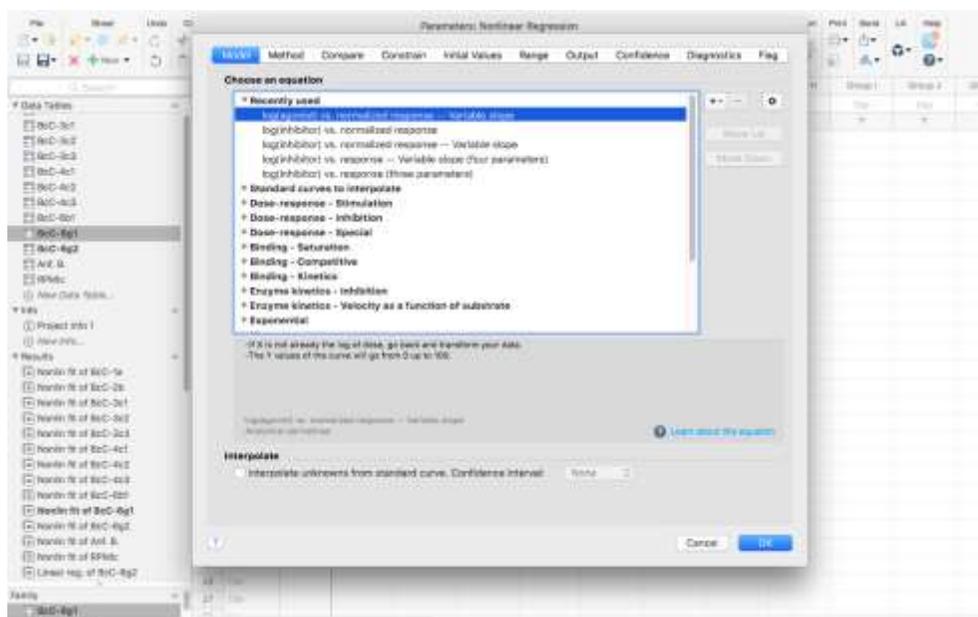
The screenshot shows a software interface with a data table. The table has columns for concentration (log scale) and inhibition percentage. The data is as follows:

Concentration (log scale)	Inhibition (%)
30.0 ug/ml	13
10 ug/ml	81.88
8 ug/ml	44.44
7 ug/ml	51.47
0.5 ug/ml	-0.5

4. Una vez ingresados los datos, click en la opción “Analyse” y seleccionar la opción “Nonlinear regression (curve fit)” en la sección “XY analyses”



5. A continuación, seleccionar la opción “log (agonist) vs. Normalized response – variable slope”



6. Los resultados del análisis se muestran en una tabla. El valor de EC_{50} corresponde a la concentración del compuesto a la cual se inhibe el 50% de la población celular en estudio. R squared determina la calidad del modelo para replicar los resultados, y la proporción de variación de los resultados que puede explicarse por el modelo.

Table of results		A	B	C	D	E	F
		Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Aggregated vs. normalized response - Variable slope						
2	Best fit values						
3	LogEC50	3.9427					
4	HillSlope	0.4638					
5	EC50	4.389					
6	95% CI (profile likelihood)						
7	LogEC50	3.3132 to 0.9869					
8	HillSlope	0.2368 to 0.7632					
9	EC50	2.087 to 9.076					
10	Goodness of fit						
11	Degrees of Freedom	9					
12	R squared	0.8036					
13	Sum of Squares	37.87					
14	Sxx	5.462					
15	Number of points						
16	# of X values	5					
17	# Y values analyzed	5					
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28							
29							
30							
31							
32							
33							
34							
35							
36							
37							
38							
39							
40							
41							
42							
43							
44							
45							
46							
47							
48							
49							
50							

ANEXO IV. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Tabla A4.1. Medio RPMI-1640 suplementado.

No.	Volumen	Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final
1	45 mL	Medio RPMI-1640	Disolución stock	90%
2	5 mL	Suero Fetal Bovino		10%
3	50 μ L	Penicilina-Estreptomicina	10,000 U/mL	100 U/mL
			10,000 μ g/mL	100 μ g/mL
Volumen final			50.00 mL	

Tabla A4.2. Medio TC suplementado.

No.	Volumen	Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final
1	35.95 mL	Medio 199	Disolución stock	
2	7.5 mL	Suero Fetal Bovino		15 %
3	5.0 mL	L-Glutamina	200 mM	20 mM
4	1.0 mL	Penicilina-Estreptomicina	10,000 U/mL	100 U/mL
			10,000 μ g/mL	100 μ g/mL
5	500 μ L	Piruvato	100 mM	10 mM
6	50 μ L	β -Mercaptoetanol	50 mM	50 μ M
Volumen final			50.0 mL	

Tabla A4.3 Disolución fijadora.

No.	Volumen	Reactivo	Concentración
1	9,987.5 μ L	Tampón fosfato salino	1x
2	12.5 μ L	Formaldehído	40%
Volumen final			10.0 mL

Tabla A4.4. Tampón fosfato salino.

No.	Cantidad	Reactivo	Concentración (mM)
1	8.0 g	NaCl	137
2	0.2 g	KCl	2.7
3	1.44 g	Na ₂ HPO ₄	10
4	0.24 g	KH ₂ PO ₄	2
5	1,000 mL	H ₂ O Destilada	
Volumen final			1,000.0 mL

