
ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. Leishmaniasis.....	3
1.2. Leishmaniasis en México.....	5
1.3. Agente etiológico.....	6
1.4. Ciclo de transmisión de la leishmaniasis.....	8
1.5. Distribución geográfica de la leishmaniasis.....	9
1.6. Tratamiento contra la leishmaniasis.....	10
1.7. Plantas empleadas en la medicina tradicional contra la leishmaniasis.....	12
1.8. Metabolitos secundarios de plantas con actividad leishmanicida.....	13
1.9. <i>Aphelandra scabra</i> (Vahl) Sm.....	15
1.9.1. Actividad biológica de <i>Aphelandra scabra</i>	16
1.10. <i>Dorstenia contrajerva</i> L.....	17
1.10.1. Actividad biológica de <i>Dorstenia contrajerva</i>	18
JUSTIFICACIÓN.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECIFICOS EN <i>Aphelandra scabra</i>	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL EN <i>Aphelandra scabra</i>	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS EN <i>Dorstenia contrajerva</i>	22
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL EN <i>Dorstenia contrajerva</i>	22

CAPÍTULO II.....	23
ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>Aphelandra</i>	
<i>scabra</i>.....	23
2.1. INTRODUCCIÓN.....	23
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.2.1. Materiales y equipos en general.....	23
2.2.2. Material vegetal.....	25
2.2.3. Obtención del extracto metanólico (ASH-1a).....	25
2.2.4. Partición líquido-líquido de ASH-1a.....	25
2.2.5. Cromatografía líquida al vacío (CLV) de fracciones activas.....	26
2.2.6. Aislamiento de metabolitos secundarios de fracciones activas.....	28
2.2.6.1. Aislamiento del compuesto 1 (cirsimarina).....	28
2.2.6.2. Aislamiento del compuesto 2 (sorbifolín).....	29
2.2.6.3. Aislamiento del compuesto 3 (cirsimaritina).....	30
2.2.6.4. Aislamiento del compuesto 4 (tirosol).....	31
2.2.6.5. Aislamiento del compuesto 5 (hidroxitirosol).....	33
2.2.6.6. Aislamiento de los compuestos 6 y 7 (ASH-28P1, ASH-28P3).....	35
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
2.3.1. Identificación del compuesto 1 (cirsimarina).....	36
2.3.2. Identificación del compuesto 2 (sorbifolín).....	37
2.3.3. Identificación del compuesto 3 (cirsimaritina).....	37
2.3.4. Identificación del compuesto 4 (tirosol).....	38
2.3.5. Identificación del compuesto 5 (hidroxitirosol).....	43
2.3.6. Identificación del compuesto 6 (ASH-28P1).....	47
2.3.7. Identificación del compuesto 7 (ASH-28P3).....	53

CAPÍTULO III.....	59
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>Dorstenia</i>	
<i>contrajerva</i>	59
3.1. INTRODUCCIÓN.....	59
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
3.2.1. Materiales y equipos en general.....	59
3.2.2. Material vegetal.....	61
3.2.3. Partición líquido-líquido del extracto metanólico de <i>Dorstenia contrajerva</i>	61
3.2.4. Cromatografía líquida al vacío de la fracción hexánica (DCR-2a).....	62
3.2.5. Aislamiento de los metabolitos activos de DCR-2a.....	63
3.2.5.1. Aislamiento del compuesto 8 (cicloartocarpesina).....	63
3.2.5.2. Aislamiento del compuesto 9 (1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-d- galactopiranosil glicerol).....	64
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
3.3.1. Identificación del compuesto 8 (cicloartocarpesina).....	66
3.3.2. Identificación del compuesto 9 (1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-d- galactopiranosil glicerol).....	67
 CAPITULO IV.....	 71
ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE METABOLITOS AISLADOS DE <i>Aphelandra scabrayDorstenia</i>	
<i>contrajerva</i> CONTRA PROMASTIGOTES Y AMASTIGOTES DE <i>Leishmania mexicana</i>	71
4.1. INTRODUCCIÓN.....	71
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	72
4.2.1. Actividad <i>in vitro</i> de extractos, fracciones y metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> y <i>D. contrajerva</i> contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	72

4.2.1.1. Material biológico.....	72
4.2.1.2. Preparación de extractos, fracciones y metabolitos de <i>A. scabra</i> y <i>D. contrajerva</i>	73
4.2.1.3. Bioensayo <i>in vitro</i> de extractos metanólicos, fracciones y metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> y <i>D. contrajerva</i> contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	73
4.2.2. Actividad <i>in vitro</i> de extractos metanólicos y metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> y <i>D. contrajerva</i> contra amastigotes de <i>L. mexicana</i>	74
4.2.2.1. Material biológico.....	74
4.2.2.2. Preparación de extractos metanólicos y metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> y <i>D. contrajerva</i>	75
4.2.2.3. Bioensayo <i>in vitro</i> de extractos metanólicos y metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> y <i>D. contrajerva</i> contra amastigotes de <i>L. mexicana</i>	75
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
4.3.1. Actividad <i>in vitro</i> del extracto metanólico y fracciones de <i>Aphelandra</i> contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	77
4.3.2. Actividad <i>in vitro</i> de metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	79
4.3.3. Actividad <i>in vitro</i> del extracto metanólico y metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> contra amastigotes de <i>L. mexicana</i>	79
4.3.4. Actividad <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>D. contrajerva</i> contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	82
4.3.5. Actividad <i>in vitro</i> del extracto metanólico y metabolitos secundario de <i>D. contrajerva</i> contra amastigotes de <i>L. mexicana</i>	82

CAPITULO V.....	87
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERPECTIVAS.....	87
3.1. DISCUSIÓN.....	87
3.2. CONCLUSIONES GENERALES.....	89
3.3. PERPECTIVAS.....	90
BIBLIOGRAFÍA.....	91

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. <i>Lutzomyia longipalpis</i>	3
Figura 1.2. Leishmaniasis cutánea localizada.....	4
Figura 1.3. Leishmaniasis mucocutánea.....	4
Figura 1.4. Leishmaniasis cutánea localizada en México.....	5
Figura 1.5. Promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania</i> spp.....	6
Figura 1.6. Ciclo de transmisión de la leishmaniasis.....	9
Figura 1.7. Metabolitos secundarios aislados de plantas con actividad leishmanicida.....	14
Figura 1.8. <i>Aphelandra scabra</i>	15
Figura 1.9. Estructuras químicas de la cirsimarina y el sorbifolín.....	16
Figura 1.10. <i>Dorstenia contrajerva</i> L. A) planta completa. B) inflorescencia.....	17
Figura 1.11. Metabolitos secundarios con actividad leishmanicida de <i>D. contrajerva</i>	19
Figura 2.1. Placa cromatográfica de las fracciones reunidas de la CLV de ASH-2c.....	27
Figura 2.2. Placa cromatográfica de las fracciones reunidas de la CLV de ASH-2b	28
Figura 2.3. Diagrama de aislamiento del compuesto 1 (cirsimarina).....	29
Figura 2.4. Monitoreo en CCD del precipitado (P) obtenido en ASH-2c.....	29
Figura 2.5. Diagrama de aislamiento del compuesto 2 (sorbifolín).....	30
Figura 2.6. Monitoreo en CCD de los precipitados obtenidos en ASH-3c, d y e.	30
Figura 2.7. Diagrama de aislamiento del compuesto 3 (cirsimarina).....	31
Figura 2.8. Monitoreo en CCD del precipitado obtenido en ASH-4b.....	31
Figura 2.9. Monitoreo en CCD del compuesto 4 (tirosol).....	32

Figura 2.10. Diagrama de aislamiento del compuesto 4 (tirosol).....	33
Figura 2.11. Monitoreo en CCD del compuesto 5 (hidroxitirosol).....	34
Figura 2.12. Diagrama del aislamiento del compuesto 5	34
Figura 2.13. Estructura del compuesto 1 (cirsimarina).....	36
Figura 2.14. Estructura del compuesto 2 (Sorbifolín).....	37
Figura 2.15. Estructura del compuesto 3 (cirsimaritina).....	37
Figura 2.16. Espectro de masas del compuesto 4 (tirosol).....	39
Figura 2.17. RMN- ¹ H (600 MHz en acetona- <i>d</i> ₆) del compuesto 4 (tirosol).....	40
Figura 2.18. RMN- ¹³ C (150 MHz en acetona- <i>d</i> ₆) del compuesto 4 (tirosol).....	41
Figura 2.19. Estructura del compuesto 4 (tirosol).....	42
Figura 2.20. RMN- ¹ H (600 MHz en CD ₃ OD) del compuesto 5 (hidroxitirosol).....	44
Figura 2.21. RMN- ¹³ C (150 MHz en CD ₃ OD) del compuesto 5 (hidroxitirosol).....	45
Figura 2.22. Estructura del compuesto 5 (hidroxitirosol).....	45
Figura 2.23. RMN- ¹ H (600 MHz en piridina- <i>d</i> ₅) del compuesto 6 (ASH-28P1).....	48
Figura 2.24. RMN- ¹³ C (150 MHz en piridina- <i>d</i> ₅) del compuesto 6 (ASH-28P1).....	49
Figura 2.25. Ampliación del espectro HSQC (anillo aromático y doble enlace) del compuesto 6 (ASH-28P1).....	50
Figura 2.26. Ampliación del espectro HSQC (final de la cadena esterificada) del compuesto 6 (ASH-28P1).....	50
Figura 2.27. Ampliación del espectro HMBC (anillo aromático) del compuesto 6 (ASH-28P1).....	51
Figura 2.28. Ampliación del espectro HMBC (final de la cadena alifática) del compuesto 6 (ASH-28P1).....	52

Figura 2.29. Estructura del compuesto 6 (ASH-28P1).....	53
Figura 2.30. RMN- ¹ H (600 MHz en piridina- <i>d</i> ₅) del compuesto 7 (ASH-28P3).....	54
Figura 2.31. RMN- ¹³ C (150 MHz en piridina- <i>d</i> ₅) del compuesto 7 (ASH-28P3).....	55
Figura 2.32. Ampliación del espectro HSQC (anillo aromático) del compuesto 7 (ASH-28P3)..	55
Figura 2.33. Ampliación del espectro HMBC del compuesto 7 (ASH-28P3).....	56
Figura 2.34. Estructura del compuesto 7 (ASH-28P3).....	57
Figura 3.1. Monitoreo de las fracciones DCR-2a y DCR-2b.	62
Figura 3.2. Placa cromatográfica de las fracciones obtenidas por CLV de DCR-2a.	62
Figura 3.3. Diagrama de aislamiento del compuesto 8 (cicloartocarpesina).....	64
Figura 3.4. Monitoreo de los tubos 27 a 32 del experimento 9 de <i>D. contrajerva</i>	65
Figura 3.5. Diagrama de aislamiento del compuesto 9 (1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol).....	65
Figura 3.6. Cromatograma de HPLC del compuesto 8 y la cicloartocarpesina.....	66
Figura 3.7. RMN- ¹ H (600 MHz en CDCl ₃) del compuesto 9 (1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol).....	68
Figura 3.8. Perfil cromatográfico por HPTLC de DCR-1a, DCR-2a y los compuestos 8 y 9	70
Figura 4.1. Curvas de crecimiento de amastigotes de <i>L. mexicana</i> incubados con diferentes concentraciones de ASH-1a, tirosol e hidroxitirosol.	80
Figura 4.2. Curvas de crecimiento de amastigotes de <i>L. mexicana</i> incubados con diferentes concentraciones de DCR-1a, cicloartocarpesina y 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil.....	83

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Especies de <i>Leishmania</i> patógenas en humanos.....	7
Tabla 1.2. Medicamentos más usados para el tratamiento de la leishmaniasis.....	10
Tabla 1.3. Clasificación taxonómica de <i>Aphelandra scabra</i>	15
Tabla 1.4. Clasificación taxonómica de <i>Dorstenia contrajerva</i> L.....	17
Tabla 2.1. Peso y rendimiento de las fracciones obtenidas de ASH-1a.....	26
Tabla 2.2. Peso de las fracciones reunidas de la CLV procedentes de ASH-2c.....	27
Tabla 2.3. Peso de las fracciones reunidas de la CLV procedentes de ASH-2b.....	28
Tabla 2.4. Peso de las fracciones reunidas y obtenidas a partir de ASH-3c.....	32
Tabla 2.5. Comparación de las señales observadas en RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto 4 con lo reportado en la literatura para el tirosol.....	41
Tabla. 2.6. Comparación de las señales observadas en RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto 5 con lo reportado en la literatura para el hidroxitirosol.....	45
Tabla. 2.7. Asignación espectroscópica de las señales de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto 6 (ASH-28P1).....	52
Tabla. 2.8. Asignación espectroscópica de las señales de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C del compuesto 7 (ASH-28P3).....	57
Tabla 3.1. Peso y rendimiento de las fracciones obtenidas por partición líquido-líquido de DCR-1a.....	61
Tabla 3.2. Peso de las fracciones reunidas de la CLV de DCR-2a.....	63
Tabla. 3.3. Comparación de las señales observadas en RMN- ¹ H del compuesto 9 con lo reportado en la literatura para el compuesto 1-O-linolenoil-2-O-estearoil-3-O-β-D-galactopiranosil glicerol.....	69

Tabla 4.1. Concentraciones empleadas de los extractos y metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> y <i>D. contrajerva</i> contra amastigotes de <i>L. mexicana</i>	75
Tabla 4.2. Actividad <i>in vitro</i> de ASH-1a y fracciones de la partición líquido-líquido contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	77
Tabla 4.3. Actividad <i>in vitro</i> de las fracciones obtenidas por CLV de ASH-2c contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	78
Tabla 4.4. Actividad <i>in vitro</i> de las fracciones obtenidas por CLV de ASH-2b contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	78
Tabla 4.5. Actividad leishmanicida de metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>	79
Tabla 4.6. Actividad leishmanicida del extracto metanólico y metabolitos secundarios de <i>A. scabra</i> contra amastigotes de <i>L. mexicana</i>	81
Tabla 4.7. Actividad <i>in vitro</i> de DCR-1a contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	82
Tabla 4.8. Actividad leishmanicida del extracto metanólico y metabolitos secundarios de <i>D. contrajerva</i> contra amastigotes de <i>L. mexicana</i>	84

ABREVIATURAS

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

RESUMEN

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

ABSTRACT

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