

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	45
ACTIVIDAD INHIBITORIA CONTRA PROMASTIGOTES DE <i>Leishmania (L.) mexicana</i> DEL EXTRACTO METANÓLICO Y FRACCIONES DE LA CORTEZA DE <i>Byrsonima crassifolia</i>	45
3.1 Introducción	45
3.2 Materiales y métodos	46
3.3 Resultados.....	51
3.4 Discusión	54
CAPÍTULO IV.....	58

IDENTIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE METABOLITOS Y MEZCLAS AISLADOS DE <i>Byrsonima crassifolia</i>	58
4.1 Introducción	58
4.2 Materiales y métodos	58
4.3 Resultados.....	60
4.4 Discusión	72
CAPÍTULO V.....	74
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	74
REFERENCIAS.....	76
ANEXOS	85

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>	24
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.....	32
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.....	36
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.	38
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.	41
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>	42
Figura 3.1 Esquema de la cámara de Neubauer.	47
Figura 3.2 Esquema de la distribución de las muestras en la microplaca.	48

Figura 3.3 Reducción del 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) a formazán.....	49
Figura 4.1 Cromatograma de gases y CCD de la muestra BcC-6b1 (1).....	60
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).	62
Figura 4.4 RMN- ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) del compuesto 2 (BcC-6g1).	63
Figura 4.5 Análisis de correlaciones del experimento HMBC del compuesto 2 (BcC-6g1).	64
Figura 4.6 Estructura y principales correlaciones en HMBC de crassifolín (2 , BcC-6g1).	65
Figura 4.7 Cromatograma en CG y CCD de la muestra BcC-3c1 (3).	65
Figura 4.8 Espectro de masas obtenidos por CG-EM mostrando el patrón de fragmentación del compuesto 3 (BcC-3c1).	66
Figura 4.9 Estructura del compuesto 3 (3β-friedelanol, BcC-3c1).	66
Figura 4.10 Cromatograma de gases y CCD del compuesto 4 (BcC-3c2).	68
Figura 4.11 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la friedelina (4 , BcC-3c2).	69
Figura 4.12 Cromatograma de gases y CCD de la mezcla de compuestos de la mezcla 5 (BcC-6g3). ...	69
Figura 4.13 Cromatograma obtenido por CG-EM y CCD de la mezcla 6 (BcC-3c3).	70
Figura 4.14 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la α-amirina.	71
Figura 4.15 Patrón de fragmentación en el espectro de masas y estructura de la β-amirina.	71

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).	 51
Tabla 3.2 Resultado del bioensayo de las fracciones BcC-2a - BcC-2d.	52
Tabla 3.3 Resultados de la actividad leishmanicida de metabolitos aislados de la corteza de <i>B. crassifolia</i>	53
 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).*	 64
Tabla 4.2 Análisis comparativo del desplazamiento químico en RMN- ¹³ C del 3β-friedelanol y el compuesto 3 (BcC-3c1).	67

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*.
