

APORFINOIDES EN CORTEZA DE *Guatteria lehmannii* Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *in vitro*

Alex Saez*, Silvia Blair**, Jairo Saez**

Recibido marzo 18/97 - Aceptado septiembre 15/97

Keywords: guatteria, plasmodium, annonaceae.

RESUMEN

Un extracto de alcaloides de la corteza de *Guatteria lehmannii* presentó actividad antimalárica *in vitro*, se aislaron tres alcaloides aporfínicos, Nornuciferina 1, Lysicamina 2 y Norneolitsina 3. Las estructuras se determinaron por métodos espectrales.

ABSTRACT

An alkaloid extract derived from the bark of *Guatteria lehmannii* demonstrated antimalarial activity *in vitro*, and three aporphine alkaloids nornuciferine 1, lysicamine 2 and norneolitsine 3 were isolated. The structures were established by spectral methods.

INTRODUCCIÓN

Uno de los primeros compuestos naturales utilizados para el tratamiento del paludismo fue la Quinina, alcaloide de tipo quinolínicico aislado de especies de *Cinchona* (1); luego, con el descubrimiento de la artemisinina de la planta *Artemisia annua* (2), se incrementó la búsqueda de compuestos

naturales contra el paludismo. Dentro de los alcaloides isoquinolínicos, algunas bisbencilisoquinolinas del tipo tetrandrina y aporfínicos como la xilopina han presentado una buena actividad antiplasmódica *in vitro* (3,4,5) y otras como la fangchinolina, cordobina, monterina y costarricina han mostrado un buen efecto potenciador de la cloroquina (3,4,6,7). En el presente trabajo se evalúa la actividad antimalárica de la fracción de alcaloides presentes en la especie *Guatteria lehmannii* y se identifican tres alcaloides mayoritarios presentes en esa fracción.

PARTE EXPERIMENTAL

Material Vegetal.

La corteza de la planta, *Guatteria lehmannii*, se colectó en la finca "Primavera" del municipio de Caldas, región suroriental del departamento de Antioquia (Colombia) en mayo de 1996. Un ejemplar se encuentra depositado en el herbario de la Universidad de Antioquia bajo el número HUA 103888.

Extracción.

La corteza seca y molida (1870 g), se humectó con solución de hidróxido de amonio al 5%, y luego se extrajo por percolación en frío con diclorometano hasta agotamiento. La solución de diclorometano se concentró a presión reducida a un volumen de 500 ml y sometió a partición con ácido clorhídrico al 3%; la fase acuosa ácida se filtró y alcalinizó con hidróxido de amonio al 25% hasta pH 9 y posterior-

*Universidad EAFIT. A.A. 3300. Medellín, Colombia.

**Universidad de Antioquia. Departamento de Química. A.A. 1226. Medellín, Colombia.

mente los alcaloides base se extrajeron con diclorometano. La solución orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida obteniéndose un residuo de alcaloides totales terciarios (12.3 g) denominado AT. Parte del extracto de alcaloides totales AT se sometió a los ensayos de actividad antimalárica *in vitro* en cepas de *Plasmodium falciparum* FCB-2.

Separación cromatográfica.

Se realizó por cromatografía en columna repetitiva a partir de 10 g de AT, eluyendo con mezcla de diclorometano-metanol (9:1), la cual permitió la separación de tres fracciones que contenían tres alcaloides mayoritarios, los cuales fueron purificados por nuevas cromatografías en columna y en capa preparativa.

Los alcaloides 1, 2 y 3 se identificaron por métodos espectroscópicos.

Análisis cromatográfico y espectroscópico.

Los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se realizaron en un aparato Bruker AC-200 de 250 MHz (^1H) y 50 MHz (^{13}C), empleando como solvente cloroformo deuterado (CDCl_3). Las cromatografías de columna se efectuaron en sílica Kieselgel 60 (Merek 7734) y 60 H (Merek 7736). Las cromatografías sobre capa preparativa se llevaron a cabo sobre cromatoplasas Merek 7730.

Bioensayos.

Metodología de los cultivos *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Las cepas del *Plasmodium falciparum* FCB-2 aisladas en Santa Fe de Bogotá en el Instituto Nacional de Salud, se tienen en cultivo continuo en el Laboratorio de Hemoparásitos de la Universidad de Antioquia. Son mantenidas en cajas de Petri, en eritrocitos humanos O^+ a un hematocrito del 5% y a las cuales se les realiza diariamente los procedi-

mientos que se requieren para su mantenimiento, (8,9,10).

Condiciones experimentales del bioensayo.

Los bioensayos con cultivos continuos de *Plasmodium falciparum* se realizaron siguiendo el método de Rieckmann; Cruz Maneipe y Blair (8,9,10), bajo las siguientes condiciones:

-Cepa FCB-2.

-Hematocrito del 5% con glóbulos rojos O^+ .

-Parasitemia del 0.8% de *Plasmodium falciparum* mantenido en cultivo continuo. El ajuste de la parasitemia se realiza por adición de eritrocitos sanos.

-Se utilizan microplacas de 96 pozos. Por cada experimento se realizaron dos microplacas para obtener un número de repeticiones estadísticamente significativas. Las microplacas se distribuyen en 8 filas (A, B, C, etc.) y 12 columnas, de las cuales se dejan dos filas y dos columnas como control.

-La lectura de la parasitemia se realiza en extendidos coloreados con Giemsa; se cuenta en cada campo el número de parásitos asexuados discriminados en anillos, trofozoitos maduros y esquizontes con el fin de obtener una parasitemia total. Se evalúan 11 campos que tengan aproximadamente 300 glóbulos rojos cada uno. luego se multiplica cada uno de los valores, de los diferentes estadios del parásito por tres, se suman y se dividen por cien reportándose el resultado final en porcentaje de parasitemia (%P) (8,9).

-Las soluciones de prueba de los alcaloides totales extraídos de *Guatteria lehmannii*, se prepararon a concentraciones de: 43.0, 21.5, 10.8, 5.38, 2.69, 1.34, 0.67, 0.34, 0.17, 0.084, mg/100ml. en los cultivos *in vitro*.

Características de los compuestos obtenidos.

Nornuciferina 1: U.V. λ_{max} nm: 230, 272, 310. $[\alpha]_D^{25}$: -145° ($c=0.98$, C_2H_5OH). Ms: M^+ 281, 280 (100), 266, 252, 237, 221, 165, 152. 1H -RMN ($CDCl_3$, 250 MHz) (δ en ppm): 3.67 (OMe en C-1, s), 3.93 (OMe en C-2, s) 6.64, (H-3, s) 7.2-8.4, (H-8, H-9, H-10, m).

Lysicamina; 2: U.V. λ_{max} nm: 235, 270, 307, 400. ir (filme): 1675, cm^{-1} . 1H -RMN ($CDCl_3$, 250 MHz) (δ en ppm): 4.01, (OMe en C-1, s), 3.93, (OMe en C-2, s) 7.2-7.4 (H-3, s), 7.2-8.4, (H-8, H-9, H-10, m).

Norneolitsina (Cryptodorina) 3: $[\alpha]_D^{25}$: +61° ($CHCl_3$). U.V. λ_{max} nm (CH_3OH): 283, 311, Ms: M^+ 309 (100), M^+ 154.5, 280, 279, 278, 251, 250, 222. 1H -RMN: ($CDCl_3$, 250 MHz) (δ en ppm): 6.1 (OCH_3O , C9-C10, s), 6.0 (OCH_3O C1-C2, dd), 7.23 (H-8, s.), 7.6 (H-11, s), 6.69 (H-3, s), 3.41 (2 H en C-7, q), 3.94 (H-6a, dd). ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 250 MHz) (δ en ppm): 100.68 (OCH_3O en C1-C2, s), 101.2, (OCH_3O en C9, C10, s).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la actividad antimalárica.

En la tabla 1, las filas A, B, D, E, G, H, I, J, L, M, O, y P, corresponden a los tratamientos con las soluciones de Alcaloides totales. Las filas C, F, K, y N, corresponden al control del cultivo del parásito, al igual que las columnas 11 y 12 de todas las filas.

En la tabla 2:

Xp: Valores promedio del porcentaje de parasitemia (%P) según concentración de alcaloides totales (en mg/100 mL).

Xc: Valores promedio del porcentaje

de parasitemia de los cultivos control de *Plasmodium falciparum*.

Las columnas 11 y 12 también son controles del cultivo de *Plasmodium falciparum*. En esta tabla se reportan los promedios de estas columnas, para un total de 72 pozos control.

Análisis estadístico.

Cuando se hace la evaluación del efecto de los alcaloides totales con el control de parásitos, se plantea una hipótesis nula (H_0), las dos medias eran iguales; y una hipótesis alternativa (H_a), la media de cada concentración evaluada de los alcaloides totales era menor que la media del control.

Se realizó así el análisis estadístico a cada concentración de alcaloides totales, de la corteza de *Guatteria lehmannii*.

Comparamos la actividad antiparasitaria de 12 pozos donde se evalúa la concentración de alcaloides totales de 43.0 mg/100 mL (430 ppm) contra los 72 pozos de control. Para los controles se presentó una media de 1.1238%P, una mediana de 1.14%P y una desviación estándar de 0.2285, se había planteado una hipótesis nula (H_0) que las dos medias eran iguales, contra una hipótesis alternativa de que existía diferencia entre la media de los pozos control y la media de los pozos evaluados. Para un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ implica que se rechaza la hipótesis nula, es decir existe actividad antiparasitaria en los pozos evaluados con 43 mg/100 mL de alcaloides totales de *Guatteria lehmannii*.

Igualmente se establece el análisis de comparación de medias para las diez diluciones de alcaloides totales contra la media de los 72 pozos control.

Graficando el inverso del %P contra la concentración de AT y tomando como modelo una regresión lineal, con un

Tabla 1. Resultados del porcentaje de parasitemia del bioensayo con alcaloides totales de *Gutteria lehmannii*. Concentración de las soluciones de AT en mg/100ml.

Fila	43.0	21.5	10.8	5.38	2.69	1.34	0.67	0.34	0.17	0.08	11	12
A	0.06	0.09	0.24	0.51	0.99	0.99	0.93	1.05	0.93	1.02	1.20	0.84
B	0.09	0.06	0.36	0.51	1.02	0.78	0.78	0.99	0.99	1.14	1.26	1.17
C	1.20	0.78	0.96	0.99	1.23	1.02	1.29	1.02	1.26	0.75	1.14	1.20
D	0.06	0.12	0.33	0.51	0.87	0.93	0.81	0.93	0.93	0.81	1.62	1.30
E	0.09	0.12	0.30	0.57	1.14	1.05	1.11	0.78	0.78	0.99	1.44	1.32
F	1.08	0.90	1.08	1.23	0.60	0.93	0.99	1.50	1.05	1.50	1.89	1.35
G	0.06	0.18	0.12	0.60	1.17	0.60	1.08	1.08	1.38	1.32	1.05	1.41
H	0.09	0.12	0.30	0.60	0.48	0.54	0.99	1.23	1.47	1.41	1.02	1.05
I	0.06	0.12	0.39	0.63	1.08	0.96	1.08	1.35	1.08	1.23	1.02	1.23
J	0.03	0.06	0.36	0.33	0.54	1.14	1.05	1.14	1.05	1.05	1.14	1.20
K	1.29	1.20	0.99	0.96	1.14	1.35	1.14	0.99	1.02	1.11	1.56	1.19
L	0.06	0.09	0.48	0.75	0.81	1.08	0.93	1.53	1.17	0.99	1.38	0.87
M	0.03	0.09	0.48	0.57	0.69	0.90	0.74	0.81	0.99	0.75	0.90	1.14
N	1.47	1.35	0.93	1.02	1.14	1.11	0.93	1.20	0.90	1.02	1.14	1.14
O	0.06	0.09	0.27	0.54	0.66	0.72	0.84	0.78	0.60	0.78	0.81	0.81
P	0.06	0.12	0.42	0.48	0.66	0.90	0.72	0.81	0.75	0.39	0.78	0.72

Tabla 2. Valores promedios del porcentaje de parasitemia de los bioensayos con alcaloides totales de *G. lehmannii*.

AT	43.0	21.5	10.8	5.38	2.69	1.34	0.67	0.34	0.17	0.08	11	12
Xp	0.06	0.11	0.34	0.55	0.84	0.88	0.92	1.04	1.01	1.01		
Xc	1.26	1.06	0.99	1.05	1.03	1.10	1.09	1.18	1.06	1.10	1.21	1.12

intercepto de -1.3094 y una pendiente de 2.6554 encontramos que para que el porcentaje de parasitemia (%P) se reduzca de 0.8%P al 50% o sea a 0.4%P se necesita una dosis efectiva (ED_{50}) de 53.29 ppm.

Química de los alcaloides encontrados

Los alcaloides totales presentes en la corteza de *Guatteria lehmannii* representan un 0.66% del material vegetal. La figura 1 muestra la estructura de los tres alcaloides mayoritarios encontrados.

Alcaloide 1. Este compuesto se aisló en forma amorfa de una de las tres fracciones; responde a la fórmula molecular bruta $C_{18}H_{19}NO_2$, para un peso molecular 281.14 uma, determinada a partir de los datos espectrales.

En el espectro de RMN- 1H carece de señales alrededor de 2.5 ppm, lo que

confirma la ausencia de N-Metilo; presenta además dos singletes a 3.67 y 3.93 ppm que integran para tres hidrógenos cada uno, atribuidos a dos grupos metoxilos. Este espectro también presenta señales entre 7.2 y 8.4 ppm, características de aporfinas (8,9). El compuesto **1** es una Noraporfina que posee dos grupos metoxilos y el anillo D no está sustituido. A campo bajo se observa un singlete que integra para un protón el cual se asigna al H-3, un multiplete entre 7.2-7.4 de los protones H-8, H-9, y H-10, y finalmente un doblete a 8.4 ppm ($j=8$ Hz) del protón H-11. Los datos espectroscópicos obtenidos para el compuesto **1**, son idénticos a los reportados en la literatura para la Nornuciferina (8,9). La identidad de este compuesto se corroboró por comparación con una muestra auténtica en ccd. Esta aporfina ha sido reportada en otras familias como *Magnoliaceae* (*Liriodendron*, *Magnolia*), *Nymphaeaceae* (*Nelumbo*), *Rhamnaceae* (*Colubrina*, *Ziziphus*), *Menispermaceae* (*Chas-*



Figura 1. Alcaloides mayoritarios aislados de la corteza de *Guatteria lehmannii*.

manthera), *Monimiaceae* (*Laurelia*); en la familia *Annonaceae* los géneros *Polyalthia*, *Xylopia*, *Hexalobus*, *Schefferomitra*, *Enantia*, *Annona* e *Isolona* (9,10,11), y dentro del género *Gutteria* en las especies *G. chrysopetala*, *G. ouregou* y *G. sagotiana* (12).

Alcaloide 2. Esta sustancia posee un peso molecular de 291.09 una para una fórmula molecular $C_{18}H_{15}NO_3$. Se obtuvo en una de las fracciones; su naturaleza oxoaporfinica se sospecha por su comportamiento en solución clorofórmica y en medio ácido. Al observarse a la luz UV, la solución clorofórmica presenta fluorescencia amarilla verdosa (13) y en medio ácido una coloración roja oscura. El espectro de RMN- 1H presenta dos señales a 4.01 y 3.95 ppm atribuibles a dos grupos metoxilos ubicados en las posiciones 1 y 2, y una serie de señales entre 7.1 y 9.1 ppm de hidrógenos aromáticos confirmando que el anillo D no está sustituido (8). El análisis del espectro COSY 1H - 1H presenta el acoplamiento entre las señales a 7.5 y 8.6 ppm correspondiente a los protones H-4 y H-5, además los acoplamientos entre los protones H-10 y H-11. Los datos espectrales del compuesto **2** son compatibles con la estructura de la Lysicamina (8,9) confirmada por ccd con una muestra auténtica. La Lysicamina se aisló por primera vez de *Lysichiton* (*Araceae*), y ha sido reportada en las familias *Menispermaceae* (*Stephania*, *Abuta*, *Chasmanthera*, *Telitoxicum*), *Rhamnaceae* (*Colubrina*), *Magnoliaceae* (*Liriodendron*), y en *Annonaceae* (*Annona*, *Enantia*, *Gutteria*, *Polyalthia*). También se reporta su síntesis (9,10,11).

Alcaloide 3. Obtenido en forma amorfa, posee un peso molecular 309.10 una para una fórmula molecular $C_{18}H_{15}NO_4$ deducida en base a los datos espectrales.

El espectro RMN- 1H del compuesto **3**, sugiere la presencia de una Noraporfina con dos grupos metilendioxi, lo cual se confirma por las dos señales que aparecen a 100.68 y 101.02 ppm en el espectro DEPT de RMN- ^{13}C .

El análisis del espectro RMN- 1H nos permite proponer para el compuesto **3** la estructura de la Cryptodorina (8,9), ya que en efecto se observa un cuarteto a 3.41 ppm atribuido a los protones H-7, un doble doblete centrado a 3.94 ppm del protón 6a. Igualmente se observa en este espectro las señales para los dos grupos metilendioxi a 6.0 y 6.1 ppm, además tres singletes a 6.69, 7.23 y 7.6 ppm para tres protones aromáticos. Por los valores de los datos espectrales se puede postular que uno de los grupos metilendioxi está ubicado en las posiciones C-1 y C-2 de la molécula (8,9), por lo que uno de los singletes puede atribuirse al H-3 (6.69 ppm), el segundo grupo metilendioxi se debe situar necesariamente en las posiciones C-9 y C-10, para que los dos singletes restantes se ubiquen en las posiciones C-8 (7.23 ppm) y C-11 (7.6 ppm) del compuesto. Este alcaloide aporfínico fue reportado por primera vez por Bick I., et al (10) aislado de *Cryptocaria odorata* (*Lauraceae*), más tarde se reportó en el género *Laurus* (11); esta es la primera vez que se reporta en la familia *Annonaceae*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al biólogo Francisco Javier Roldan por la recolección y clasificación del material vegetal, a la profesora Akino Jossang del museo de Historia Natural de Paris (Francia) por la realización de los espectros de RMN en una y dos dimensiones, y a la química Jacqueline Mesa por la realización de los bioensayos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hohouse, H. *Seeds of change: five plants that transformed Mankind*, Sidgwick and Jackson. London, 1985, 3.
2. Klayman, D.L. *Science*. 1985, 228, 1049.
3. Lin, L-Z.; Shieh, H-L.; Angerhofer, C.K.; Xue, L.; Johnson, M.E.; Ruan-grungsi, N. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 22.
4. Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C.K.; Cordell, G.; Pezzuto, J.M.; Ruan-grungsi, N. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 30.
5. Likhitwitayawuid K.; Angerhofer, C.K.; Chai, H.; Cordell, G.; Pezzuto, J.M. *J. Nat. Prod.* 1993, 56, 1468.
6. Sáez, J.; Jossang, A.; Soudon, J.; Calvo, F.; Rasoañaivo, P.; Ratsima-manga-Urverg, S.; Schevrel, J.; Grelliers, P. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996, 40, 1476.
7. Boike, M. *J. Nat. Prod.* 1996, 59, 576.
8. Mesa, J. Tesis de pregrado en Química, Departamento de Química. Universidad de Antioquia. Medellín. Colombia. 1993.
9. Blair, S.; Martínez, A.; Madrigal, B.; Zuluaga, C.; Correa, A.M.; Carvajal, C.; Bravo, L.; Carmona, J. *Plantas Antimaláricas de Tumáco. Informe final*. Medellín: Universidad de Antioquia. 1991, 2t.
10. Cruz Mancipe, D.; Fuenmayor, D. Tesis de pregrado en Química Farmacéutica. Universidad Nacional de Colombia. 1989.
11. Shama, M. *The Isoquinoline Alkaloids: Chemistry and Pharmacol.* Academic Press. Verlag Chemie. New York. Vol I y II. 1972.
12. Guinaudeau, H.; Cavé, A.; Leboeuf, M., *Lloydia.*, 1975, 38, 275.
13. Guinaudeau, H.; Cavé, A.; Leboeuf, M. *J. Nat. Prod.*, 1979, 42, 325.
14. Guinaudeau, H.; Cavé, A.; Leboeuf, M. *J. Nat. Prod.*, 1983, 46, 761.
15. Cavé, A.; Leboeuf, M.; Cassels, B. *Alkaloids from Guatteria*, Laboratoire de Pharmacognose. Université de Paris Sur. Chatenay-Malabry (France). 1985.