

UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE  
PRODUCTOS NATURALES, BIOLOGÍA VEGETAL Y EDAFOLOGÍA

**BÚSQUEDA DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS  
A PARTIR DE DOS ESPECIES DE LA FLORA COLOMBIANA:  
ALCALOIDES DE *PHAEDRANASSA DUBIA* (AMARYLLIDACEAE) Y  
BIFLAVONOIDES DE *GARCINIA MADRUNO* (CLUSIACEAE).**

EDISON JAVIER OSORIO DURANGO  
2008



UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE  
PRODUCTOS NATURALES, BIOLOGÍA VEGETAL Y EDAFOLOGÍA

Programa de doctorado: MEDICAMENTOS, ALIMENTACIÓN Y SALUD

BIENIO 2004-2006

BÚSQUEDA DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS  
A PARTIR DE DOS ESPECIES DE LA FLORA COLOMBIANA:  
ALCALOIDES DE *PHAEDRANASSA DUBIA* (AMARYLLIDACEAE) Y  
BIFLAVONOIDES DE *GARCINIA MADRUNO* (CLUSIACEAE).

Memoria presentada por Edison Javier Osorio Drurango para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Barcelona.

Directores,

El doctorando

Dr. Jaume Bastida Armengol  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona

Dr. Francesc Viladomat Meya  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona

Edison Javier Osorio Durango

EDISON JAVIER OSORIO DURANGO  
2008



## *AGRADECIMIENTOS*

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas y cada una de las personas y entidades que permitieron el desarrollo de esta tesis doctoral:

Al convenio Fundación Carolina – Universidad de Antioquia por proveerme una beca doctoral.

A la Generalitat de Catalunya (2005SGR-00020) por facilitar parte de los recursos necesarios para la realización del trabajo experimental.

A los doctores Jaume Bastida y Francesc Viladomat, por haberme aceptado como estudiante de doctorado y darme la oportunidad de realizar el trabajo experimental en su laboratorio, por sus buenos consejos y por la confianza depositada en mí. Le agradezco especialmente a Jaume su valiosa colaboración, en el estudio de la resonancia magnética nuclear de los productos naturales. De corazón, gracias por todos los buenos momentos durante mi permanencia en el laboratorio.

Igualmente al doctor Carles Codina, actual vicedecano académico de la Facultad de Farmacia, por su disposición y ayuda durante mi estancia doctoral.

Al doctor Gabriel Jaime Arango, director del Grupo de Investigación en Sustancias Bioactivas (GISB) de la Universidad de Antioquia (Medellín-Colombia), por haber permitido el trabajo dentro de su laboratorio para la realización de los extractos vegetales y la evaluación de la actividad antioxidante.

Al doctor Reto Brun del Instituto Tropical Suizo, (Basel-Suiza), por la realización de los ensayos biológicos antiparasitarios y por la discusión de los resultados.

A las doctoras Ana Linares y Maria Antonia Molins por su disposición y paciencia durante mis consultas sobre el manejo de los equipos y el software de resonancia magnética nuclear.



A todos y cada uno de los compañeros que han pasado por el laboratorio, que de una o de otra manera, han contribuido a la realización de esta tesis: a Laura, Gloria, Susana, Mariangela, Michela, Eva, Maria, Jean, y muy especialmente a Strajil y a Ricardo, por haberme transmitido parte de sus experiencias y conocimientos, gracias por todos sus consejos. También a “los de atrás”, Marta, Oscar, Susana y Miriam.

Igualmente a los compañeros del GISB por su ayuda, consejos y en especial por su amistad: Nando, Julian, Guillermo, Katalina, Consuelo, Rafael, Nora, Karen, Carolina, Cristina, Andrés, Luis y Oscar. Julian y Guillermo merecen un reconocimiento especial por su enorme ayuda en la realización de la actividad antioxidante.

Por último, le agradezco a toda mi familia, mi madre, mis hermanos y muy especialmente a mi padre, quien se ha marchado mientras hacia el doctorado. Gracias por permitirme ser quien ahora soy. Le agradezco también a mi esposa y a mi hija por apoyarme y animarme en todo momento, por su comprensión, por todo su amor y por no desfallecer a pesar del tiempo y la distancia.

A todos, MUCHAS GRACIAS por haber estado allí.

Edison  
Abril, 2008





3GT	<i>Antocianidina-3-glucosiltransferasas</i>	GB-1a	Biflavonoides de tipo flavanona-(3→8'')-flavanona
4CL	<i>4-cumaroil-CoA-ligasa</i>	GPx	<i>Glutación peroxidasa</i>
ACC	<i>Acetil-CoA-carboxilasa</i>	GSH	Glutación reducido
AcOEt	Acetato de etilo	GT	<i>Glicosiltransferasas</i>
AcOH	Acido acético	H <sub>2</sub> O	Agua
AH	Antioxidantes asociados a lipoproteínas de baja densidad	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
AlCl <sub>3</sub>	Cloruro de aluminio	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acido sulfúrico
ANR	<i>Antocianidina reductasa</i>	HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ANS	<i>Antocianidina sintasa</i>	HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
BuOH	Butanol	HO <sub>2</sub> ·	Radical hidroxiperoxilo
C4H	<i>Cinamato-4-hidroxilasa</i>	HOCl	Ácido hipocloroso
CAT	<i>Catalasa</i>	HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
CC	Cromatografía en columna	HR-EIMS	EIMS de alta resolución
CCF	Cromatografía en capa fina	HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
CCF prep.	CCF preparativa	HUA	Herbario Universidad de Antioquia
CD	Dicroísmo circular	IC <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado	Ifβ-h	Inhibición de la formación de β-hematina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado	IFS	<i>Isoflavona sintasa</i>
CDK	<i>Kinasas dependientes de ciclina</i>	IR	Espectro infrarrojo
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50	IR-TF	IR con transformada de Fourier
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano	IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada
CHI	<i>Chalcona flavanona isomerasa</i>	J	Constante de acoplamiento
CHS	<i>Chalcona sintasa</i>	KBr	Bromuro de potasio
CIMS	Espectrometría de masas por ionización química	LAR	<i>Leucoantocianidina reductasa</i>
CLV	Cromatografía líquida al vacío	LC	Leishmaniosis cutánea
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	LDL	Lipoproteínas de baja densidad
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i> <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	LH	Ácidos grasos poliinsaturados
CPRG	Sustrato clorofenol rojo β-D-galactopiranosido	LMC	Leishmaniosis mucocutánea
CQ	Difosfato de cloroquina	LOOH	Hidroperóxidos asociados a LDL
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato cuproso	L-Phe	L-fenilalanina
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>	L-Tyr	L-tirosina
DFR	<i>Dihidroflavonol-4-reductasa</i>	LV	Leishmaniosis visceral
DHFR-TS	<i>Dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa</i>	MDA	Malondialdehído
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetil sulfóxido deuterado	MeOH	Metanol
DNA	Ácido desoxirribonucleico	MHz	Megahertz
DPPH·	Radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazil	MIC	Concentración mínima inhibitoria
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	NaCl	Cloruro de sodio
EIMS	Espectrometría de masas por impacto electrónico	NaOAc	Acetato de sodio
EM	Espectrometría de masas	NaOMe	Metóxido de sodio
Et <sub>2</sub> O	Dietil-éter	NH <sub>3</sub>	Amoniaco
EtOH	Etanol	NH <sub>4</sub> OH	Amoniaco
Ev	Electronvoltio	NMT	<i>N-miristoil transferasa</i>
F3H	<i>Flavanona-3-hidroxilasa</i>	NO·	Radical óxido nítrico
FB	Fracción biflavonoide extraída de <i>Garcinia madruno</i>	NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
FBS	Suero fetal bovino	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singulete
FID	Caída libre de la inducción	O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
FLS	<i>Flavonol sintasa</i>	O <sub>2</sub> · <sup>-</sup>	Ión-radical superóxido
FNS	<i>Flavona sintasa</i>	O <sub>3</sub>	Ozono
GB1	Biflavonoides de tipo flavanona-(3→8'')-flavanonol	·OH	Radical hidroxilo
		OMS	Organización mundial de la salud
		OMT	<i>O-metiltransferasas</i>

ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrilo
PAL	<i>Fenilalanina amonio liasa</i>
PFT	<i>Protein farnesil transferasa</i>
PL	Peroxidación lipídica
Ppm	Parte por millón
Q	Quercetina
RF	Radiofrecuencia
RIt5'	Índice de reducción
RL	Radicales libres
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	RMN de protón
RMN <sup>13</sup> C	RMN de Carbono 13
RMN-2D	RMN bidimensional
RNA	Ácido ribonucleico
RO <sup>·</sup>	Radical alcoxilo
ROO <sup>·</sup>	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido
ROS	Especies reactivas del oxígeno
Sb <sup>V</sup>	Derivados de antimonio pentavalente
SDR	<i>Reductasas de cadena corta</i>
S.E.M	Desviación estándar de la media
SOD	<i>Superóxido-dismutasa</i>
STS	<i>Estilbeno sintasa</i>
TAH	Tripanosomiasis africana humana
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TMS	Trimetilsilano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	UV visible
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

**INDICE GENERAL**

	<b>Tema</b>	<b>Pág.</b>
<b>1.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Alcaloides de <i>Phaedranassa dubia</i> (Amaryllidaceae).....</b>	<b>5</b>
2.1.	Introducción.....	7
2.1.1.	Generalidades sobre los alcaloides presentes en la familia Amaryllidaceae.....	7
2.1.2.	Clasificación de los alcaloides tipo Amaryllidaceae.....	8
2.1.2.1.	Esqueleto tipo norbelladina.....	9
2.1.2.2.	Esqueleto tipo licorina.....	10
2.1.2.3.	Esqueleto tipo homolicorina.....	11
2.1.2.4.	Esqueleto tipo crinina.....	12
2.1.2.5.	Esqueleto tipo hemantamina.....	13
2.1.2.6.	Esqueleto tipo narciclasina.....	15
2.1.2.7.	Esqueleto tipo tazetina.....	15
2.1.2.8.	Esqueleto tipo montanina.....	16
2.1.2.9.	Esqueleto tipo galantamina.....	17
2.1.3.	Biosíntesis de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae.....	18
2.1.3.1.	Acoplamiento fenol oxidativo <i>orto-para'</i> .....	20
2.1.3.2.	Acoplamiento fenol oxidativo <i>para-para'</i> .....	22
2.1.3.3.	Acoplamiento fenol oxidativo <i>para-orto'</i> .....	24
2.1.4.	Características botánicas de la familia Amaryllidaceae.....	25
2.1.4.1.	Distribución y hábitat.....	25
2.1.4.2.	Aspecto botánico del género <i>Phaedranassa</i> .....	25
2.2.	Material y Métodos.....	27
2.2.1.	Procedimientos experimentales generales.....	27
2.2.2.	Material vegetal.....	27
2.2.3.	Extracción, fraccionamiento y purificación de alcaloides.....	27
2.2.4.	Caracterización de los alcaloides.....	29
2.2.4.1.	Espectroscopía ultravioleta (UV) y de infrarrojo (IR).....	29
2.2.4.2.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	30
2.2.4.2.1.	Experimentos monodimensionales.....	30

2.2.4.2.2.	Experimentos bidimensionales (RMN -2D).....	31
2.2.4.3.	Espectrometría de masas (EM).....	32
2.2.4.4.	Dicroísmo circular (CD).....	33
2.3.	Resultados y Discusión.....	35
2.3.1.	Caracterización de los alcaloides.....	35
2.3.1.1.	Fedranamina (1).....	35
2.3.1.2.	Pseudolicorina (2).....	45
2.3.1.3.	Sanguinina (3).....	45
2.3.1.4.	Galantamina (4).....	50
2.3.1.5.	Epinorgalantamina (5).....	50
2.3.1.6.	Hemantamina (6).....	55
2.3.1.7.	Ungeremina (7).....	55
2.3.1.8.	Zefbetaína (8).....	60
3.	<b>Biflavonoides de <i>Garcinia madruno</i> (Clusiaceae)</b> .....	63
3.1.	Introducción.....	65
3.1.1.	Clasificación de los flavonoides.....	65
3.1.1.1.	2-Fenilbenzopiranos.....	67
3.1.1.2.	Isoflavonoides.....	67
3.1.1.3.	Neoflavonoides.....	68
3.1.1.4.	Biflavonoides.....	69
3.1.1.5.	Otros flavonoides.....	70
3.1.2.	Biosíntesis de flavonoides.....	70
3.1.2.1.	Biosíntesis de biflavonoides.....	75
3.1.3.	Características botánicas de la Familia Clusiaceae.....	75
3.1.3.1.	Distribución y hábitat.....	75
3.1.3.2.	Aspectos botánicos del género <i>Garcinia</i> .....	77
3.1.3.3.	<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel.....	78
3.1.4.	Biflavonoides del género <i>Garcinia</i> .....	79
3.2.	Material y Métodos.....	85
3.2.1.	Procedimientos experimentales generales.....	85
3.2.2.	Material vegetal.....	85
3.2.3.	Extracción, fraccionamiento y purificación de biflavonoides.....	85
3.2.4.	Caracterización de biflavonoides.....	86

3.3.	Resultados y Discusión.....	87
3.3.1.	Caracterización de biflavonoides.....	87
3.3.1.1.	Amentoflavona (1).....	87
3.3.1.2.	Morelloflavona (2).....	91
3.3.1.3.	Volkensiflavona (3).....	100
3.3.1.4.	Fukugisido (4).....	103
3.3.1.5.	Madrinoudeasido (5).....	107
3.3.1.6.	Spicatasido (6).....	113
<b>4.</b>	<b>Ensayos de Actividad Biológica.....</b>	<b>117</b>
4.1.	Introducción a la actividad biológica antiparasitaria.....	119
4.1.1.	Enfermedades parasitarias.....	119
4.1.1.1.	Leishmaniosis.....	119
4.1.1.2.	Tripanosomiasis americana.....	121
4.1.1.3.	Tripanosomiasis africana.....	122
4.1.1.4.	Malaria.....	124
4.1.2.	Investigación en productos naturales antiparasitarios.....	126
4.1.3.	Alcaloides de Amaryllidaceae con actividad antiprotozoaria.....	130
4.1.4.	Biflavonoides con actividad antiprotozoaria.....	132
4.2.	Introducción a la actividad antioxidante.....	135
4.2.1.	El estrés oxidativo en los sistemas biológicos.....	135
4.2.1.1.	Daño oxidativo a biomoléculas.....	137
4.2.1.2.	Defensa antioxidante.....	139
4.2.1.2.1.	Sistema enzimático.....	139
4.2.1.2.2.	Sistema no enzimático.....	140
4.2.1.2.3.	Sistemas reparadores.....	140
4.2.1.3.	Procesos fisiológicos y patológicos relacionados con los radicales libres.....	141
4.2.2.	Los compuestos fenólicos como antioxidantes.....	141
4.2.2.1.	Biflavonoides como antioxidantes.....	145
4.3.	Material y Métodos.....	147
4.3.1.	Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> .....	147
4.3.1.1.	Ensayo <i>in vitro</i> frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	147
4.3.1.2.	Ensayo <i>in vitro</i> frente a <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> .....	148

4.3.1.3.	Ensayo <i>in vitro</i> frente a <i>Leishmania donovani</i> .....	148
4.3.1.4.	Ensayo <i>in vitro</i> frente a <i>Plasmodium falciparum</i> .....	148
4.3.2.	Ensayo de la actividad inhibitoria de la formación de $\beta$ -hematina.....	149
4.3.3.	Actividad antioxidante.....	149
4.3.3.1.	Cinética de decoloración del radical libre DPPH*.....	149
4.3.3.2.	Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL).....	151
4.3.3.2.1.	Aislamiento de LDL.....	151
4.3.3.2.2.	Cuantificación del contenido proteico.....	151
4.3.3.2.3.	Oxidación de la LDL.....	151
4.3.3.2.4.	Determinación TBARS.....	151
4.4.	Resultados y Discusión.....	153
4.4.1.	Actividad biológica antiprotozoaria.....	153
4.4.1.1.	Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> de alcaloides de Amaryllidaceae.....	153
4.4.1.2.	Actividad inhibitoria de la formación de $\beta$ -hematina (If $\beta$ -h).....	157
4.4.1.3.	Actividad antiprotozoaria <i>in vitro</i> de biflavonoides de <i>G. madruno</i> .....	159
4.4.2.	Actividad antioxidante de biflavonoides de <i>Garcinia</i> .....	161
4.4.2.1.	Actividad captadora de radicales libres (Método del DPPH).....	161
4.4.2.2.	Inhibición de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL).....	165
<b>5.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>171</b>
<b>6.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>175</b>

---

## INDICE DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1.	Esqueletos tipo de los alcaloides de Amaryllidaceae.....	9
2.	Biosíntesis de los precursores norbelladina y <i>O</i> -metilnorbelladina.....	19
3.	Tipos de acoplamiento fenol oxidativo en la biosíntesis de los alcaloides del tipo Amaryllidaceae.....	20
4.	Biosíntesis de alcaloides del tipo licorina y homolicorina.....	21
5.	Biosíntesis de los alcaloides con acoplamiento fenol oxidativo <i>para-para'</i> (tipos crinina, hemantamina, tazetina, narciclasina y montanina).....	23
6.	Biosíntesis de galantamina según Eichhorn <i>et al.</i> , 1998.....	24
7.	Aspecto de la flor de <i>Phaedranassa dubia</i> (Humboldt, Bonpland & Kunth) J.F. Macbride.....	26
8.	Mapa Político de Colombia.....	28
9.	Fedranamina (1). Espectro RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) tomado en CD <sub>3</sub> OD.....	37
10.	Fedranamina (1). RMN <sup>13</sup> C y DEPT (400 MHz) tomados en CD <sub>3</sub> OD.....	38
11.	Fedranamina (1). COSY (400 MHz) tomado en CD <sub>3</sub> OD.....	40
12.	Fedranamina (1). NOESY (400 MHz) tomado en CD <sub>3</sub> OD.....	41
13.	Fedranamina (1). HMBC (400 MHz) tomado en CD <sub>3</sub> OD.....	43
14.	Espectro CD de hemantamina (a) y fedranamina (b).....	44
15.	Pseudolicorina (2). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	46
16.	Pseudolicorina (2). Espectro RMN <sup>13</sup> C, DEPT.....	47
17.	Sanguinina (3). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	48
18.	Sanguinina (3). Espectro RMN <sup>13</sup> C, DEPT.....	49
19.	Galantamina (4). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	51
20.	Galantamina (4). Espectro RMN <sup>13</sup> C, DEPT.....	52
21.	Epinorgalantamina (5). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	53
22.	Epinorgalantamina (5). Espectro RMN <sup>13</sup> C, DEPT.....	54
23.	Hemantamina (6). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	56
24.	Hemantamina (6). Espectro RMN <sup>13</sup> C, DEPT.....	57
25.	Ungeremina (7). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	58
26.	Ungeremina (7). Espectro RMN <sup>13</sup> C, DEPT.....	59
27.	Zefbetaina (8). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	61

28.	Zefbetaina ( <b>8</b> ). Espectro RMN <sup>13</sup> C, DEPT.....	62
29.	Tipos fundamentales de flavonoides y biflavonoides.....	66
30.	Biosíntesis parcial de flavonoides tipo flavanona (Dewick, 2002; Green, 2007).....	72
31.	Biosíntesis de diversos flavonoides.....	74
32.	Mecanismo propuesto para la biosíntesis de biflavonoides tipo amentoflavona.....	76
33.	Mecanismo propuesto para la formación de moreloflavona, chamaejasmina y sus derivados (Li <i>et al.</i> , 2002).....	77
34.	<i>Garcinia madruno</i> (Kunth) Hammel.....	78
35.	Amentoflavona ( <b>1</b> ). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	88
36.	Amentoflavona ( <b>1</b> ). Espectro RMN <sup>13</sup> C.....	89
37.	Amentoflavona ( <b>1</b> ). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)...	90
38.	Experimento de RMN <sup>1</sup> H a temperatura variable de Moreloflavona ( <b>2</b> ).....	92
39.	Moreloflavona ( <b>2</b> ). Espectro RMN <sup>1</sup> H en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> (500 MHz).....	95
40.	Moreloflavona ( <b>2</b> ). Espectro RMN <sup>1</sup> H en CD <sub>3</sub> OD (300 MHz).....	95
41.	Moreloflavona ( <b>2</b> ). Espectro RMN <sup>13</sup> C (400 MHz).....	96
42.	Moreloflavona ( <b>2</b> ). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)...	97
43.	Espectro CD de los compuestos <b>2</b> y <b>5</b> .....	98
44.	Moreloflavona ( <b>2</b> ). Correlaciones NOE (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ).....	99
45.	Confórmero principal de moreloflavona ( <b>2a</b> ).....	99
46.	Volkensiflavona ( <b>3</b> ). Espectro RMN <sup>1</sup> H en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	101
47.	Volkensiflavona ( <b>3</b> ). Ampliación espectro RMN <sup>1</sup> H en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> .....	101
48.	Volkensiflavona ( <b>3</b> ). Espectro RMN <sup>13</sup> C.....	102
49.	Fukugisido ( <b>4</b> ). Espectro RMN <sup>1</sup> H.....	104
50.	Fukugisido ( <b>4</b> ). Espectro RMN <sup>13</sup> C.....	105
51.	Fukugisido ( <b>4</b> ). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	106
52.	Madrinoudeasido ( <b>5</b> ). Espectro RMN <sup>1</sup> H ( <b>a</b> ). Ampliación región aromática ( <b>b</b> ).....	108
53.	Madrinouedasido ( <b>5</b> ). Espectro RMN <sup>13</sup> C y DEPT.....	109
54.	Madrinoudeasido ( <b>5</b> ). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	111
55.	Spicatasido ( <b>6</b> ). Espectro RMN <sup>1</sup> H en CD <sub>3</sub> OD.....	114



56.	Spicatasido (6). Espectro RMN <sup>13</sup> C.....	115
57.	Spicatasido (6). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	116
58.	Estructuras químicas de fármacos antileishmania.....	120
59.	Estructuras químicas de fármacos utilizados en la enfermedad de Chagas.....	122
60.	Estructuras químicas de fármacos aprobados para TAH.....	123
61.	Estructuras químicas de fármacos antimaláricos.....	125
62.	Estructuras químicas de berberina, 2- <i>n</i> -propilquinolina y gabunina.....	128
63.	Alcaloides de Amaryllidaceae con actividad antiprotozoaria.....	131
64.	Biflavonoides con actividad antiprotozoaria.....	133
65.	Comparación de la actividad antiplasmodial de los alcaloides de tipo licorina, hemantamina y crinina.....	156
66.	Espectro IR-TF de hemina y β-hematina.....	158
67.	Ilustración para la terminación de radicales flavonoides por pérdida de electrones de los grupos fenol y formación de <i>orto</i> -quinonas.....	165
68.	Cinética de decoloración del radical libre DPPH calculado como Índice de Reducción (RI <sub>t5'</sub> ).....	166
69.	Inhibición de la peroxidación de LDL por la fracción <b>FB</b> y los biflavonoides aislados de <i>G. madruno</i> .....	168

---

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Grupos estructurales en los que se pueden clasificar los alcaloides de Amaryllidaceae.....	18
2. Datos de RMN- <sup>1</sup> H, RMN- <sup>13</sup> C, HSQC y HMBC de Fedranamina.....	39
3. Datos COSY y NOESY de Fedranamina.....	42
4. Biflavonoides del género <i>Garcinia</i> .....	80
5. Datos de RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C a 25°C de Morelloflavona ( <b>2</b> ) ( $\delta$ en ppm)...	94
6. Datos de RMN- <sup>1</sup> H (400.11 MHz), RMN- <sup>13</sup> C (100.60 MHz) y HMBC de <b>5</b> .....	110
7. Potenciales dianas moleculares en la investigación de agentes antiparasitarios.....	129
8. Clases de compuestos fenólicos en plantas.....	143
9. Protozoos parásitos y patrones utilizados en los ensayos <i>in vitro</i> .....	147
10. Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> , inhibición de la formación de $\beta$ -hematina (If $\beta$ -h) y toxicidad de los alcaloides aislados de <i>P. dubia</i> .....	154
11. Actividad antiplasmodial <i>in vitro</i> de alcaloides de Amaryllidaceae.....	156
12. Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> y toxicidad de los biflavonoides aislados de <i>G. madruno</i> .....	160
13. Actividad captadora de radicales libres (CE <sub>50</sub> ) y cinética de reducción inicial (RIt5') de <b>FB</b> y de los biflavonoides procedentes de <i>G. madruno</i> ....	163



## **1. *Objetivos***



Si analizamos las fuentes naturales que han dado lugar a nuevos principios activos utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, podemos observar que los productos naturales juegan un papel significativo en los procesos de descubrimiento y desarrollo de estos nuevos medicamentos. De los 1.010 productos aprobados entre 1981-2006, el 44 % fueron productos de origen natural o derivados a partir de ellos y, concretando, entre el 62-67 % de los medicamentos antibacterianos o anticancerígenos se derivaron, igualmente, a partir de sustancias de origen natural (Newman & Cragg, 2007). La búsqueda de nuevas fuentes de productos naturales activos, como por ejemplo antiparasitarios, es más productiva cuando la recolección tiene lugar en áreas donde la diversidad biológica es elevada, como en los ecosistemas tropicales y subtropicales, debido a las características ecológicas únicas de estas regiones. Basándose en estos principios, se han realizado tamizajes para determinar la actividad antiparasitaria en plantas de diversos países sudamericanos, tales como Bolivia (Muñoz *et al.*, 2000), Brasil (Botsaris, 2007), Colombia (Weniger *et al.*, 2001; Osorio *et al.*, 2007), y Perú (Kvist *et al.*, 2006).

Entre los principales factores que han favorecido la investigación en el campo de los productos naturales, se encuentran los avances en la tecnología de los ensayos biológicos. Debido fundamentalmente al progreso de la biología molecular, se ha pasado de la utilización de modelos animales '*in vivo*' a la realización de pruebas '*in vitro*', basadas en el mecanismo de acción, que hacen factible el 'screening' de un gran número de muestras de manera sencilla, rápida, reproducible, económica y lo suficientemente sensibles para detectar, de forma selectiva, moléculas biológicamente activas a niveles relativamente bajos. Además, los avances en la química y en la instrumentación, que se han producido de forma paralela, son de igual importancia. En este sentido, el advenimiento y el subsiguiente desarrollo de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), la Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HR-EIMS), la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la Cristalografía de Rayos X, han permitido el aislamiento y la caracterización estructural, de forma rápida y eficiente, de compuestos que se encuentran en pequeñas cantidades.

El presente trabajo tiene como objetivo buscar sustancias bioactivas en dos especies de la flora colombiana. Se pretende aislar y caracterizar los metabolitos secundarios sintetizados por *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) y *Garcinia madruno* (Clusiaceae), además de estudiar la actividad antiprotozoaria *in vitro* y de evaluar la actividad antioxidante de los metabolitos aislados.

El objetivo propuesto en el párrafo anterior se pretende alcanzar por medio de una serie de actividades que se describen a continuación:

- Extraer, separar y purificar los alcaloides de la especie *Phaedranassa dubia*.
- Extraer, aislar y purificar los biflavonoides de la especie *Garcinia madruno*.
- Caracterizar los alcaloides y los biflavonoides mediante técnicas espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY, NOESY, HSQC, HMBC, IR, EM) y por medio de sus propiedades físicas.
- Evaluar la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los alcaloides y de los biflavonoides aislados frente a los parásitos protozoos: *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum*.
- Evaluar la actividad inhibitoria de la formación de la  $\beta$ -hematina de aquellos compuestos que presenten una potente actividad frente a *Plasmodium falciparum*. Ensayo orientado a la determinación de su posible mecanismo de acción.
- Evaluar la actividad antioxidante de los biflavonoides aprovechando sus propiedades como fenoles. Para ello, se utiliza la actividad captadora de radicales libres por el método del DPPH $^{\bullet}$  y la inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) por el método de TBARS.



*2. Alcaloides de  
Phaedranassa dubia  
(Amaryllidaceae)*

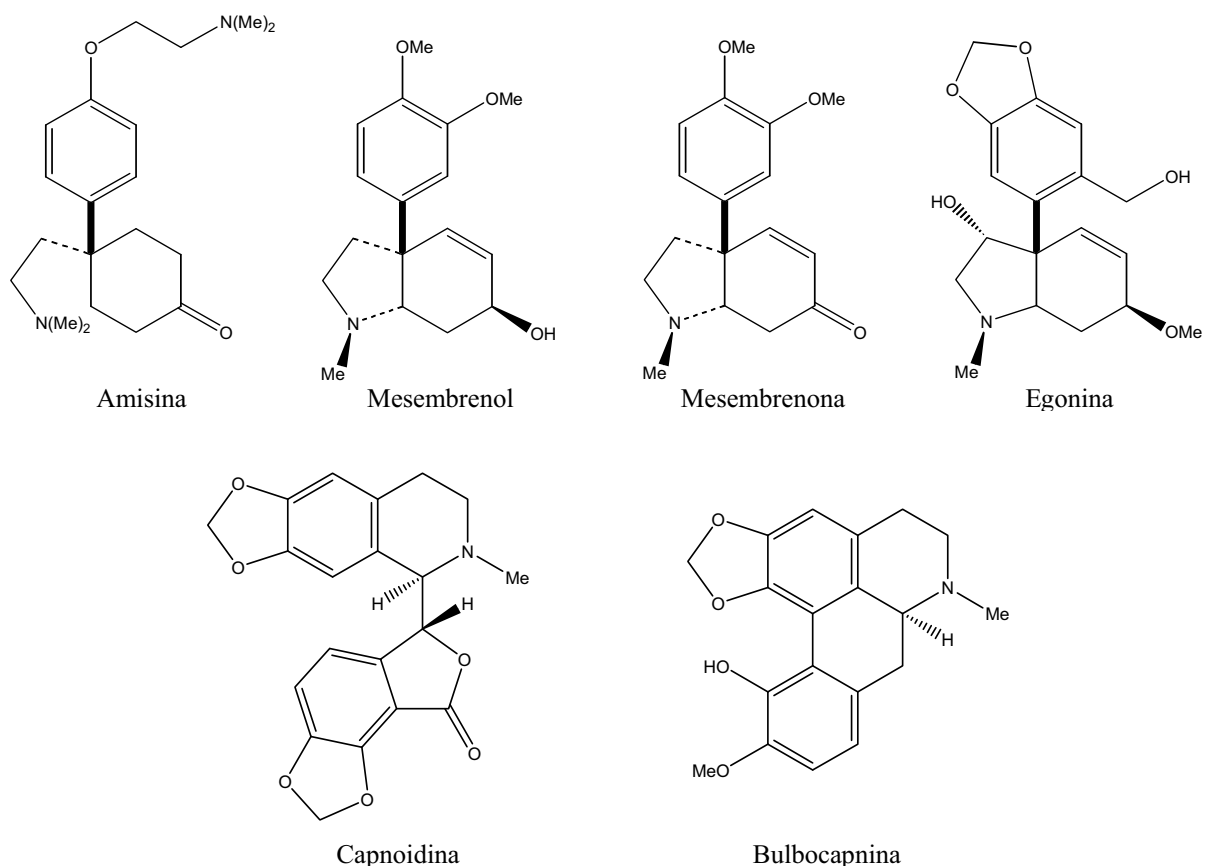




## 2.1. Introducción

### 2.1.1. Generalidades sobre los alcaloides presentes en la familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae presenta entre sus metabolitos secundarios un grupo de alcaloides, que tienen como característica principal la de ser exclusivos de esta familia de plantas, lo que les confiere valor quimiotaxonómico. Se han reportado algunas excepciones que confirman la regla. Así, el alcaloide crinamina ha sido aislado de *Dioscorea dregeana* (Dioscoreaceae), siendo éste el primer alcaloide isoquinolínico aislado de la familia Dioscoreaceae (Mulholland *et al.*, 2002). Por otro lado, no es habitual encontrar otro tipo de alcaloides en las especies de la familia Amaryllidaceae; aunque, hasta el momento, se han identificado cuatro alcaloides de tipo mesembrano (*Sceletium*), que generalmente están presentes en la familia Aizoaceae (Jeffs, 1981) y dos alcaloides de tipo isoquinolínico, hallados principalmente en las familias Fumariaceae, Lauraceae y Papaveraceae (Kaya *et al.*, 2004). Estos alcaloides son: amisina, aislado de *Hymenocallis arenicola* (Döpke *et al.*, 1980), mesembrenol de *Crinum oliganthum* (Döpke *et al.*, 1981), mesembrenona, de *Narcissus pallidulus* (Bastida *et al.*, 1989), egonina de *Hippeastrum equestre* (Pham *et al.*, 1999), y los alcaloides capnoidina y bulbocapnina, aislados de *Galanthus nivalis* subsp. *cilicicus* (Kaya *et al.*, 2004).



Las características químicas más importantes de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae son:

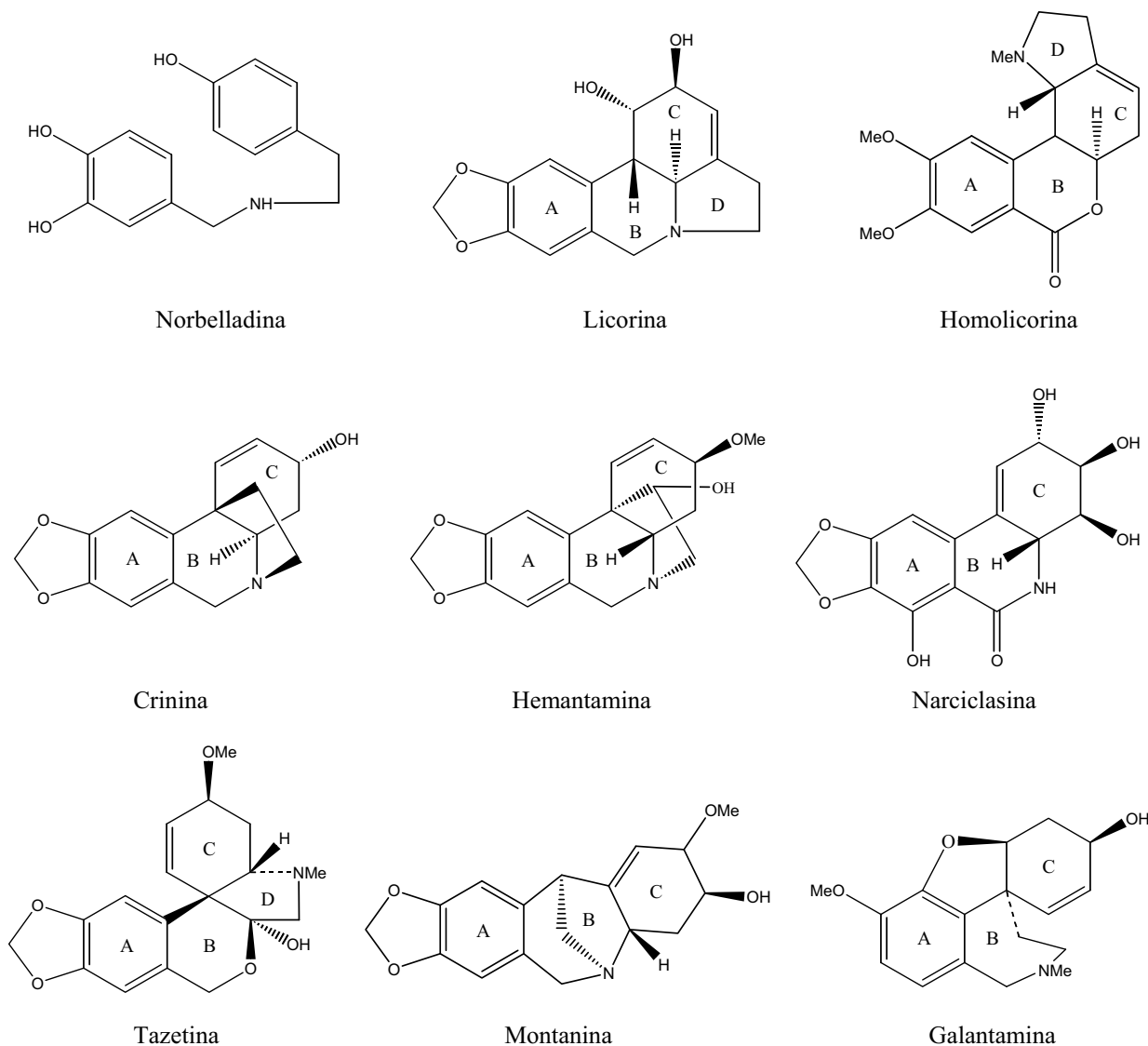
- Tienen una estructura base  $C_6-C_1-N-C_2-C_6$ . En la que, la fracción  $C_6-C_1$  deriva de L-fenilalanina (L-Phe) y la  $N-C_2-C_6$  deriva de L-tirosina (L-Tyr).
- Son bases moderadamente débiles, con un pKa entre 6 y 9.
- Contienen un solo átomo de nitrógeno, que puede ser secundario, terciario o incluso cuaternario, y generalmente el número de átomos de carbono oscila entre 16 y 20, dependiendo de los sustituyentes del sistema anillado.

### 2.1.2. Clasificación de los alcaloides tipo Amaryllidaceae

La clasificación de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae ha ido variando en función del conocimiento de sus relaciones biosintéticas. Aunque todos ellos provienen de L-Phe y L-Tyr, su diversidad estructural es consecuencia de los diferentes tipos de acoplamientos fenol oxidativos. En base al sistema heterocíclico que presentan, se pueden diferenciar los esqueletos tipo: norbelladina, licorina, homolicorina, crinina, hemantamina, narciclasina, tazetina, montanina y galantamina (Figura 1).

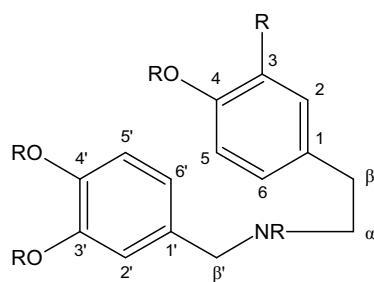
Otro aspecto importante es la numeración, que no sigue estrictamente las reglas de la IUPAC. De hecho, la numeración química de los distintos esqueletos tipo sigue la propuesta de Ghosal y colaboradores (Ghosal *et al.*, 1985) que prioriza la ruta biosintética. Así:

- La enumeración del anillo aromático A es siempre la misma, independientemente del tipo de esqueleto.
- La posición bencílica en  $\alpha$  con respecto al heteroátomo, es siempre 6.
- La posición vecinal del N en el anillo pirrolidínico no comprometida con los anillos B o C, es siempre 12.
- La enumeración en el anillo C es siempre en el sentido de las agujas del reloj, excepto para los alcaloides de tipo homolicorina, debido a su proceso biosintético.
- En los alcaloides de tipo norbelladina, la notación ['] hace referencia al anillo que procede biosintéticamente de L-Phe.



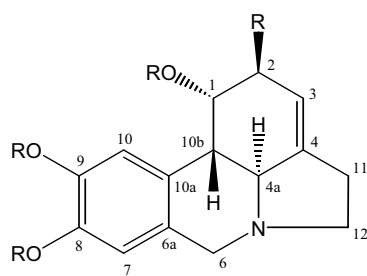
**Figura 1.** Esqueletos tipo de los alcaloides de Amaryllidaceae.

**2.1.2.1. Esqueleto tipo norbelladina:** Estos alcaloides son los únicos que no se derivan de una reacción de acoplamiento fenol oxidativo y presentan una estructura *N*-bencil-*N*-feniletilamina. Poseen funciones oxigenadas (grupos hidroxilo o metoxilo) en los carbonos 4, 3' y 4'. También pueden presentar un grupo NMe y un sustituyente oxigenado en 3.



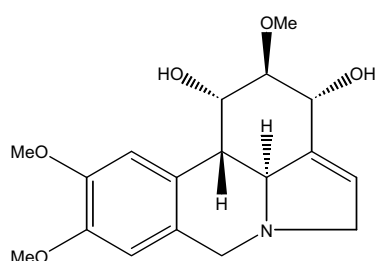
Tipo Norbelladina

**2.1.2.2. Esqueleto tipo licorina:** Este grupo de alcaloides está constituido por un número importante de alcaloides derivados de una estructura base pirrolo[d,e]fenantridina, originados por un acoplamiento fenol oxidativo *orto-para*'. Las posiciones 8 y 9 están sustituidas (generalmente por un grupo metilendioxo). Presentan una insaturación en las posiciones 3-4 y la fusión de los anillos B y C es, generalmente, en *trans*.

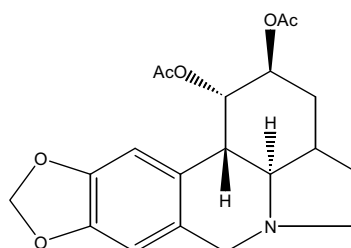


Tipo Licorina

Si la insaturación se encuentra entre las posiciones 4 y 11, en el carbono 3 puede encontrarse un sustituyente oxigenado, como es el caso de la narcisidina (Fuganti *et al.*, 1974). En el caso de la nartazina (Boit & Döpke, 1956), los anillos C y D están saturados.

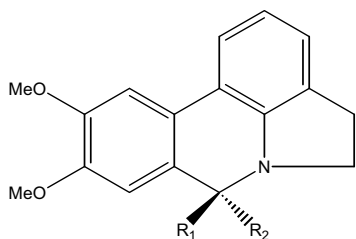


Narcisidina

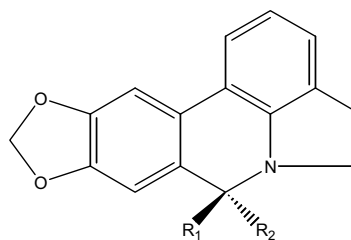


Nartazina

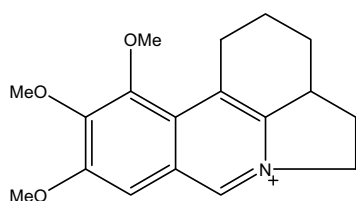
Se aprecian algunas variantes más en la estructura de estos alcaloides como en el caso de la oxoassoanina y la hippacina, ambos con un sustituyente oxigenado en la posición 6. Además, estos dos alcaloides, junto con la assoanina y la 11,12-dehidroanhidrolicorina, presentan el anillo C completamente insaturado (Llabrés *et al.*, 1986; Ramadan *et al.*, 2000; Ngoc Tram *et al.*, 2002). A su vez, el alcaloide roserina tiene tres grupos metoxilos en el anillo A, y un anillo B completamente insaturado (Bastida *et al.*, 1992). Por su parte, el estudio de la constante de acoplamiento entre los protones H-4a y H-10b demuestra que el alcaloide kirkina es una excepción a la regla, al ser coherente con una fusión *cis* entre los anillos B y C (Bastida *et al.*, 1995a).



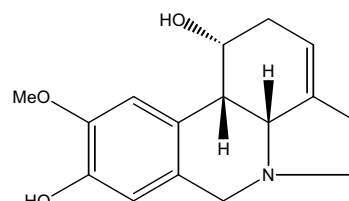
Oxoassoanina  $R_1 + R_2 = O$   
 Assoanina  $R_1 = R_2 = H$



Hippacina  $R_1 + R_2 = O$   
 11,12-dehidroanhidrolicorina  $R_1 = R_2 = H$

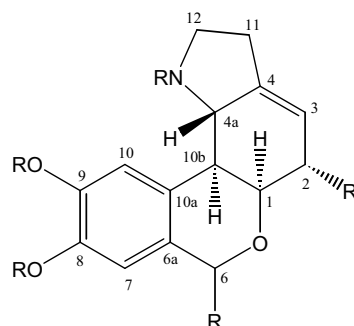


Roserina



Kirkina

**2.1.2.3. Esqueleto tipo homolicorina:** Los alcaloides de este grupo derivan directamente de los de tipo licorina, es decir, provienen de un acoplamiento fenol oxidativo *orto-para'*, con reestructuración posterior, presentando un esqueleto base 2-benzopirano[3,4-g]indol.

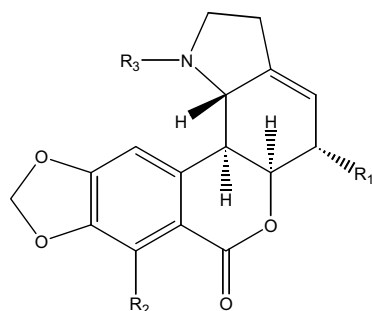


Tipo Homolicorina

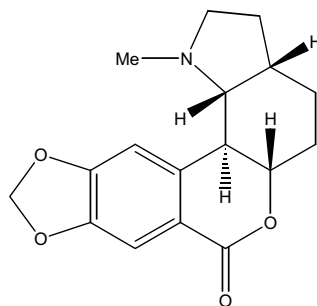
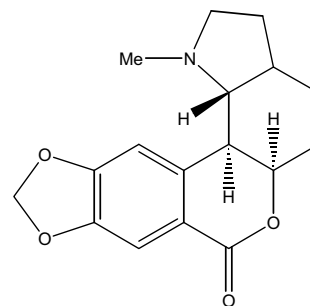
Con excepción de la normasonina (Kreh & Matush, 1995), todos los alcaloides de este tipo aislados hasta ahora, poseen un grupo NMe. A su vez, en este tipo de alcaloides, la fusión de los anillos B y C es *cis* y el anillo del pirano puede encontrarse en forma de lactona, hemiacetal o éter cíclico, siendo este último poco frecuente.

En las posiciones 8 y 9 encontramos sustituyentes oxigenados y la posición 2 puede estar igualmente sustituida. Estos alcaloides presentan además una insaturación entre los carbonos 3 y 4, aunque hay excepciones como en el caso de la clivonina, que además tiene la

peculiaridad de presentar una fusión *trans* entre los anillos B y C (Kobayashi *et al.*, 1980), contrariamente a lo observado para el resto de alcaloides de este tipo. La insaturación en el anillo C también puede presentarse entre las posiciones 2 y 3, como en el caso de la clivonidina (Ali *et al.*, 1983). La sustitución en la posición 7 es inusual, aunque existe algún ejemplo como en el caso del alcaloide candimina (Döpke, 1962).

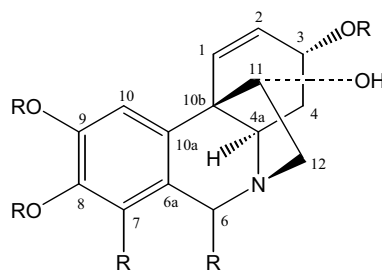


Normasonina

Candimina  $R_1 = OH, R_2 = OMe, R_3 = Me$  $R_1 = R_2 = R_3 = H$  Clivonina

Clivonidina

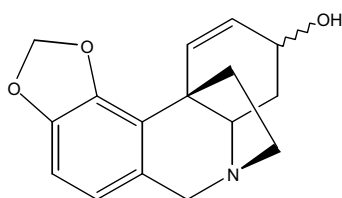
**2.1.2.4. Esqueleto tipo crinina:** Este tipo de alcaloides con una estructura base 5,10b-etanofenanthridina, provienen de un acoplamiento fenol oxidativo *para-para'*, y son muy comunes en las especies del género *Crinum* (Viladomat *et al.*, 1997). El protón de la posición 4a es siempre axial y en disposición *trans* con relación al puente etano existente entre el N y la posición 10b, de manera que la fusión entre los anillos B y C es siempre *trans*.



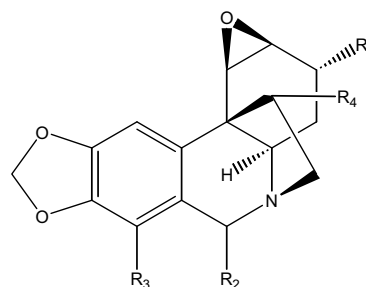
Tipo Crinina

Entre las posiciones 8 y 9, normalmente se encuentra un grupo metilendioxo, existiendo además un grupo oxigenado en la posición 3. En el caso de (-) powellamina y (+) powellamina (cripalina), el grupo metilendioxo se encuentra entre las posiciones 9 y 10 (Ngoc Tram *et al.*, 2002). Además, es posible encontrar sustituciones oxigenadas en las posiciones 6, 7 (generalmente metoxilo) y en la posición 11, donde el sustituyente puede estar orientado tanto en disposición *endo* como en *exo* predominantemente (Viladomat *et al.*, 1997).

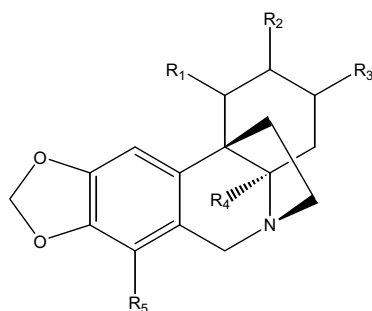
Es común la existencia de un doble enlace entre las posiciones 1 y 2, aunque pueden existir variaciones al respecto. Así, en los alcaloides augustina (Ali *et al.*, 1981), flexinina (Boit *et al.*, 1957), 11-*O*-acetil-1,2- $\beta$ -epoxiambellina, 6-hidroxicrinamidina y undulatina (Ngoc Tram *et al.*, 2002) se encuentra un grupo epóxido entre dichas posiciones. En otros casos, el anillo C puede estar completamente saturado. Así, en los alcaloides como la elwesina (Capo & Saa, 1989) y dihidrocrinidina (Ngoc Tram *et al.*, 2002), la insaturación esta hidrogenada. A su vez, la amabilina (Likhitwitayawuid *et al.*, 1993) y la 4a-dehidroxicrinamabina (Nair *et al.*, 2000) son ejemplos donde se observan sustituciones oxigenadas en las posiciones 1 y 2. En otros casos, como en el alcaloide nerbowdina (Lyle *et al.*, 1960), solo se observan sustituciones en la posición 1. Finalmente, en muy pocos casos la posición 3 no está oxigenada, tal sería el caso de los alcaloides josefinina (Viladomat *et al.*, 1994) y crinamabina (Pham *et al.*, 1998), que sin embargo presentan sustituciones en las posiciones 1 y 2.



(-) powellamina  
(+) powellamina

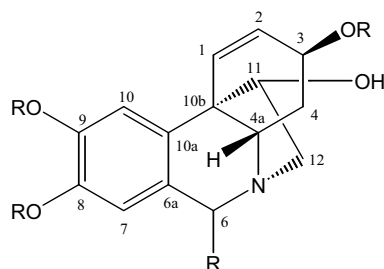


Augustina  $R_1 = \text{OMe}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$   
 Flexinina  $R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$   
 11-*O*-Acetil-1,2- $\beta$ -epoxiambellina  $R_1 = R_3 = \text{OMe}, R_2 = \text{H}, R_4 = \text{OAc}$   
 6-Hidroxicrinamidina  $R_1 = R_4 = \text{H}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OMe}$   
 Undulatina  $R_1 = R_3 = \text{OMe}, R_2 = R_4 = \text{H}$



Elwesina  $R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = \text{H}, R_3 = \alpha\text{OH}$   
 Dihydrocrinidina  $R_1 = R_2 = R_4 = \text{H}, R_3 = \text{OH}, R_5 = \text{OMe}$   
 Amabilina  $R_1 = R_2 = \alpha\text{OH}, R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$   
 4a-dehidroxicrinamabina  $R_1 = R_2 = \beta\text{OH}, R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$   
 Nerbowdina  $R_1 = R_3 = \alpha\text{OH}, R_2 = R_5 = \text{H}, R_4 = \text{OMe}$   
 Josefinina  $R_1 = \alpha\text{OH}, R_2 = \beta\text{OAc}, R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$   
 Crinamabina  $R_1 = R_2 = \beta\text{OH}, R_3 = R_5 = \text{H}, R_4 = \text{OH}$

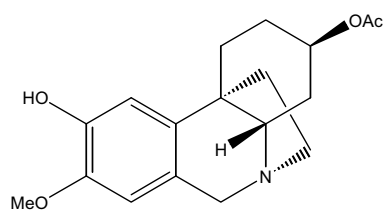
**2.1.2.5. Esqueleto tipo hemantamina:** Los alcaloides tipo hemantamina proceden de una reacción de acoplamiento fenol oxidativo *para-para'*. Presentan un puente etano con configuración  $\alpha$  entre el átomo de nitrógeno y la posición 10b, siendo esta la característica distintiva entre este grupo y los alcaloides tipo crinina. En general, presentan un doble enlace entre las posiciones 1 y 2, y sustituyentes oxigenados en las posiciones 3, 8 y 9.



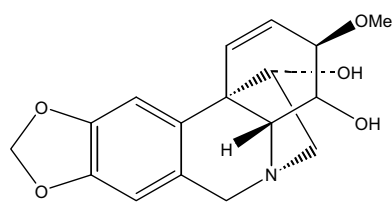
Tipo Hemantamina

Al igual que los alcaloides tipo crinina, en ocasiones pueden presentar sustituyentes oxigenados en las posiciones 6 y 11, y a diferencia de ellos, la posición 7, hasta el momento, no se ha encontrado sustituida. Pueden existir variaciones que involucran el anillo C, como es el caso del alcaloide cantabricina (Bastida *et al.*, 1995b), en el cual éste anillo se encuentra completamente saturado. Albiflomantina (Baudouin *et al.*, 1994) es un ejemplo en el cual se observa un grupo hidroxilo adicional en la posición 4.

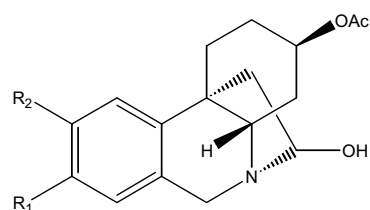
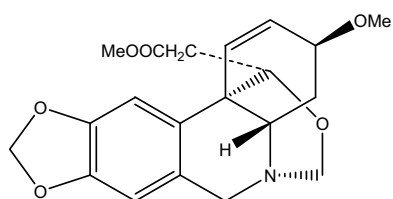
Hasta el momento, también se han aislado siete alcaloides con variaciones en el puente etano. Delagoensina y degaloenina (Nair *et al.*, 1998) presentan sustituida la posición 12, mientras que bujeína (Labraña *et al.*, 1999) es el primer alcaloide de este tipo con un puente de tres miembros. A su vez, cuatro alcaloides derivados de hamaina, obtenidos de *Galanthus nivalis*, presentaron sustituciones en la posición 11 (Berkov *et al.*, 2007), entre ellos, el 3,11-*O*-(3',3''-dihidroxitbutanoil) hamaina.



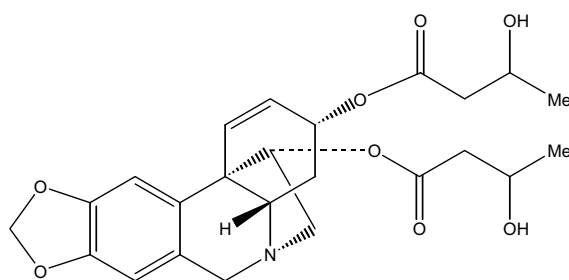
Cantabricina



Albiflomantina

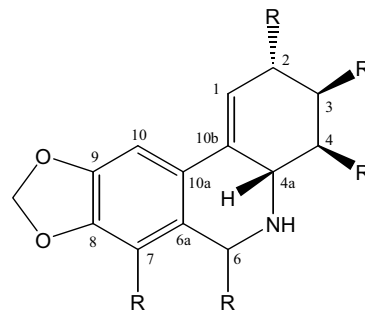
Delagoensina  $R_1 + R_2 = OCH_2O$   
Delagoenina  $R_1 = R_2 = OMe$ 

Bujeína

3,11-*O*-(3',3''-dihidroxitbutanoil) hamaina

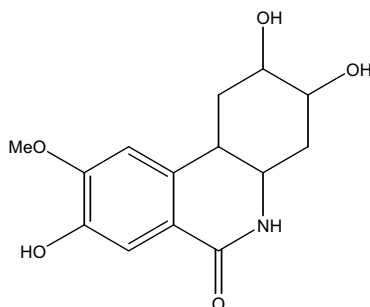


**2.1.2.6. Esqueleto tipo narciclasina:** Este grupo reducido de alcaloides tiene como esqueleto base la fenantridina. Se originan a partir de un acoplamiento fenol oxidativo *para-para'*, con una reestructuración posterior a partir de los alcaloides de tipo crinina - hemantamina.

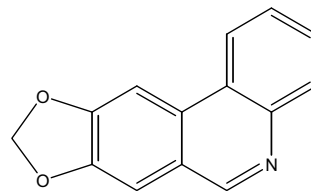


Tipo Narciclasina

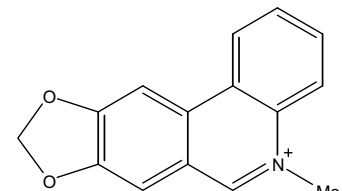
Entre las posiciones 8 y 9 se encuentra un grupo metilendioxo, con algunas excepciones como la narcicrinina (Ngoc Tram *et al.*, 2002). A su vez, las posiciones 2, 3, 4, 6 y 7 pueden encontrarse sustituidas. Las variaciones más frecuentes se encuentran en el anillo C, el cual puede estar completamente insaturado, como en los alcaloides trisferidina (Suau *et al.*, 1990) y bicolorina (Viladomat *et al.*, 1990).



Narcicrinina

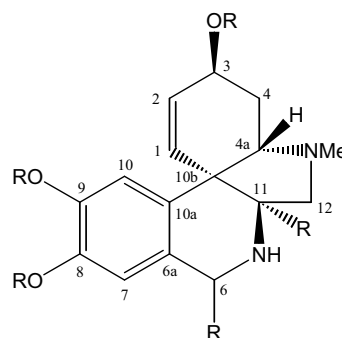


Trisferidina



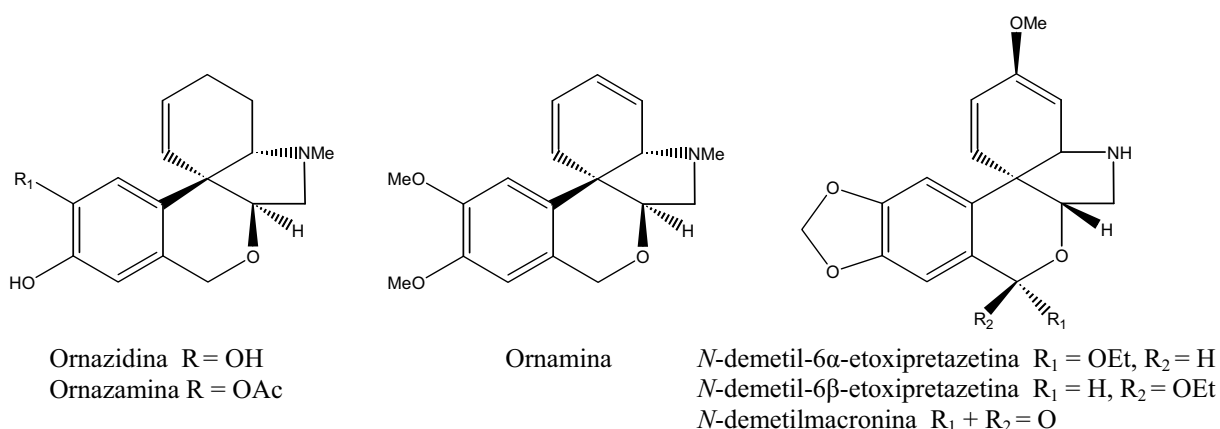
Bicolorina

**2.1.2.7. Esqueleto tipo tazetina:** Este grupo de alcaloides, que presentan una estructura base 2-benzopirano[3,4-c]indol, provienen igualmente de un acoplamiento fenol oxidativo *para-para'*, aunque con reestructuración posterior a partir de los de tipo hemantamina.

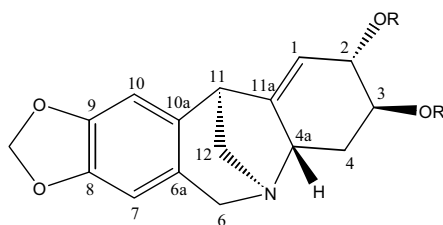


Tipo Tazetina

Generalmente poseen una insaturación entre las posiciones 1 y 2, y todos los alcaloides de este tipo presentan posiciones oxigenadas en los carbonos 8 y 9 (generalmente un grupo metilendioxo) y en el carbono 3, con excepción de ornazidina, ornazamina y ornamina, aislados de *Crinum ornatum* (Onyiriuka & Jackson, 1978). Además, la posibilidad de presentar sustituyentes en las posiciones 6 y 11 y un grupo NMe. Algunas publicaciones reportan alcaloides 6 $\alpha$  y 6 $\beta$ -etoxi sustituidos: *N*-demetil-6-etoxipretazetina, aislados de *Crinum bispermum* y la *N*-demetilmacronina (Ngoc-tram *et al.*, 2002). Sin embargo, los derivados etoxilados en Amaryllidaceae son probablemente artefactos procedentes de la extracción con EtOH.

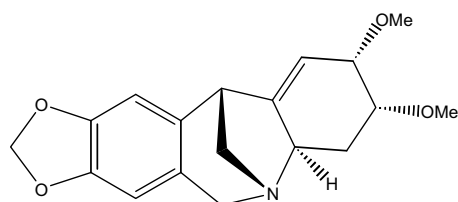


**2.1.2.8. Esqueleto tipo montanina:** Constituye un grupo de alcaloides poco frecuente que proviene de un acoplamiento fenol oxidativo *para-para'* y reestructuración a partir del esqueleto de la crinina. Presentan una estructura 5,11-metanomorfantridina. Como característica distintiva presentan un anillo de siete miembros y un puente 5,11-metano con configuración  $\alpha$ , excepto montabufina (Viladomat *et al.*, 1995).

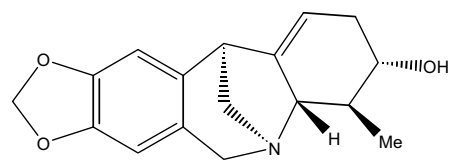


Tipo Montanina

El grupo metilendioxo entre las posiciones 8 y 9 está presente en todos los alcaloides de este grupo hasta ahora descritos, así como una insaturación entre las posiciones 1 y 11a y un sustituyente oxigenado en las posiciones 2 y 3, constituyendo una excepción la nangustina (Labraña *et al.*, 2002) donde los sustituyentes se ubican en las posiciones 3 y 4.

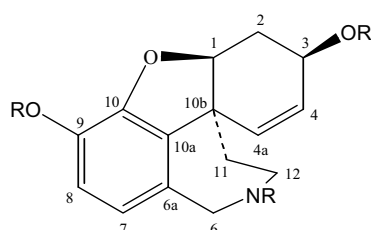


Montabufina



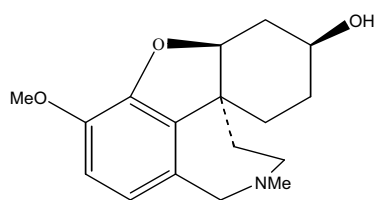
Nangustina

**2.1.2.9. Esqueleto tipo galantamina:** Este grupo de alcaloides es considerado uno de los más importantes desde el punto de vista farmacológico (Thomsen & Kewitz, 1990). Proceden de un acoplamiento fenol oxidativo *para-orto'* y tienen como estructura base un esqueleto dibenzofurano.

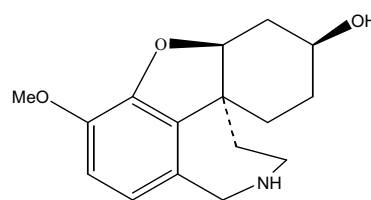


Tipo Galantamina

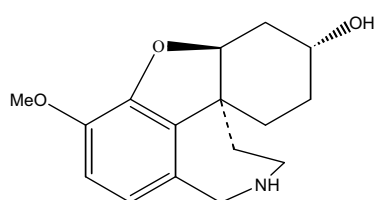
Suelen presentar sustituciones oxigenadas en las posiciones 3 y 9 y una insaturación entre los carbonos 4 y 4a. No obstante, licoramina y sus derivados (Li *et al.*, 1987; Kihara *et al.*, 1987; Bastida *et al.*, 1993; Youssef & Frahm, 1998) muestran un anillo C completamente saturado. Inusualmente, el alcaloide habrantina (Vásquez-Tato *et al.*, 1988) presenta una sustitución oxigenada en la posición 11.



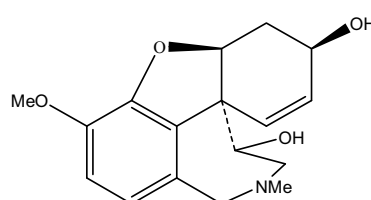
Licoramina



Norlicoramina



Epinorlicoramina



Habrantina

### 2.1.3. Biosíntesis de los alcaloides de la familia Amaryllidaceae

A pesar de las diferencias estructurales existentes en los alcaloides de las Amaryllidaceae, todos ellos proceden de una molécula matriz, la norbelladina, la cual, por diferentes acoplamientos de tipo fenol oxidativo y las subsecuentes transformaciones, da lugar a los alcaloides del tipo licorina / homolicorina (acoplamiento *orto-para'*), crinina / hemantamina / tazetina / narciclasina / montanina (acoplamiento *para-para'*), o a los alcaloides del tipo galantamina (acoplamiento *para-orto'*).

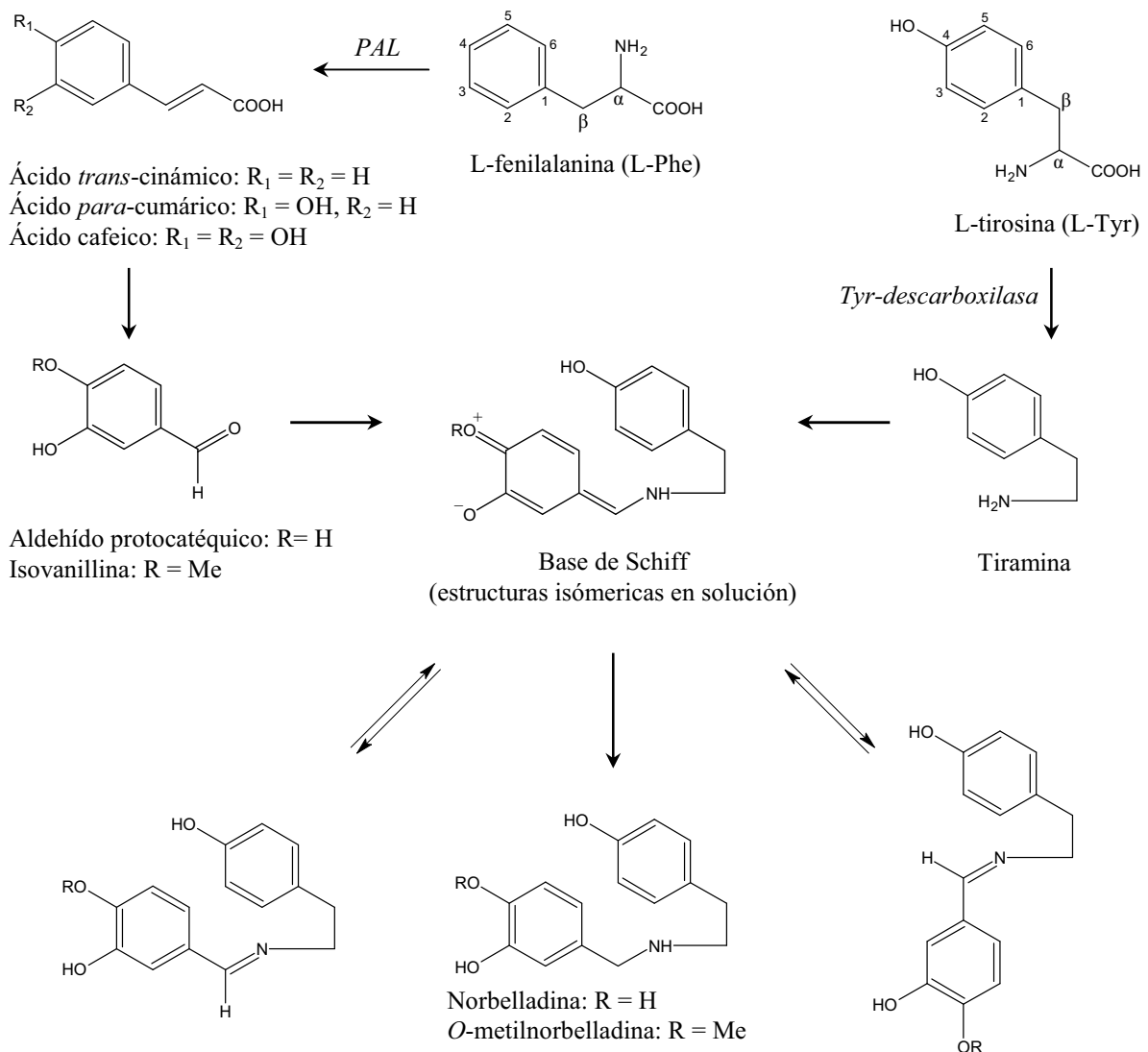
Si bien estos alcaloides pueden estar agrupados en función del tipo de acoplamiento fenol oxidativo del que proceden, también es frecuente agruparlos en función del sistema heterocíclico (Tabla 1).

**Tabla 1.** Grupos estructurales en los que se pueden clasificar los alcaloides de las Amaryllidaceae.

Grupo estructural	Esqueleto tipo	Tipo de acoplamiento
<i>N</i> -bencil- <i>N</i> -feniletilamina	Norbelladina	Sin acoplamiento
Pirrolod[e]fenantridina	Licorina	<i>orto-para'</i>
2-benzopirano[3,4-g]indol	Homolicorina	<i>orto-para'</i>
5,10b-etanofenantridina	Crinina / Hemantamina	<i>para-para'</i>
Fenantridina	Narciclasina	<i>para-para'</i>
2-benzopirano[3,4-c]indol	Tazetina	<i>para-para'</i>
5,11-metanomorfantridina	Montanina	<i>para-para'</i>
Dibenzofurano	Galantamina	<i>para-orto'</i>

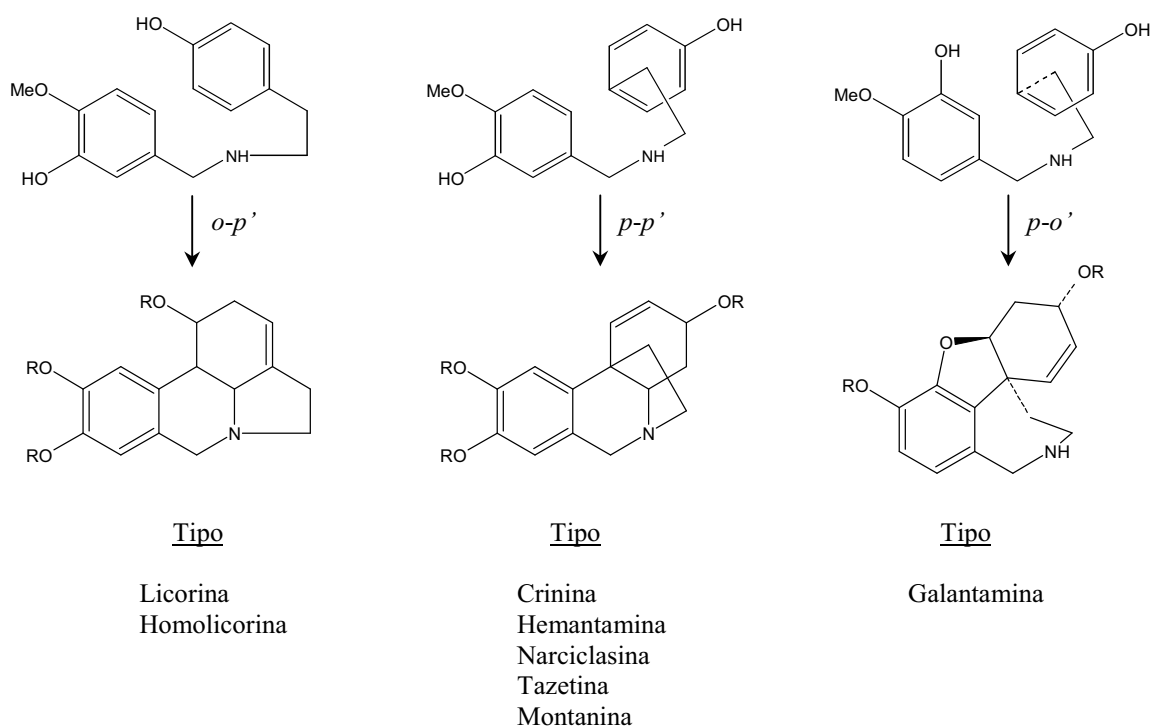
En los alcaloides de las Amaryllidaceae, la L-Phe es el precursor primario del fragmento C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, correspondiente al anillo A, mientras que L-Tyr es el precursor del fragmento C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-N, que incluye el anillo C, los dos carbonos de las posiciones 11 y 12 y el nitrógeno (Figura 2). Aunque la L-Phe y la L-Tyr están estructuralmente relacionados, en las plantas se forman independientemente a partir de prefenato y no son interconvertibles. La formación de la unidad C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> a partir de L-Phe, implica la pérdida de dos átomos de carbono de la cadena lateral, así como la introducción de dos sustituyentes oxigenados en el anillo aromático, lo

cual se lleva a cabo a través de la enzima *PAL* (del inglés: “*Phenylalanine ammonia lyase*”) y de los ácidos cinámicos. Mediante la enzima *PAL* se produce la desaminación oxidativa de la L-Phe de forma antiperiplanar para dar lugar al ácido *trans*-cinámico, con la pérdida del H pro-S de la posición  $\beta$  (Wightman *et al.*, 1972). Por ello, podría suponerse que L-Phe se incorporaría a los alcaloides de tipo Amaryllidaceae con retención del H pro-R de la posición  $\beta$ . Sin embargo, experimentos con marcadores radioactivos realizados en *Narcissus* cv. ‘Kind Alfred’ demostraron que el tritio originalmente presente en los protones del carbono  $\beta$  de la L-Phe, se perdía en la formación de alcaloides del tipo hemantamina y homolicorina, lo cual llevaba a la conclusión de que la fragmentación de los ácidos cinámicos involucra la oxidación del carbono  $\beta$  a nivel de carbonilo o carboxilo, siendo el producto final el aldehído protocatéutico o sus derivados (Figura 2).



**Figura 2.** Biosíntesis de los precursores norbelladina y O-metilnorbelladina.

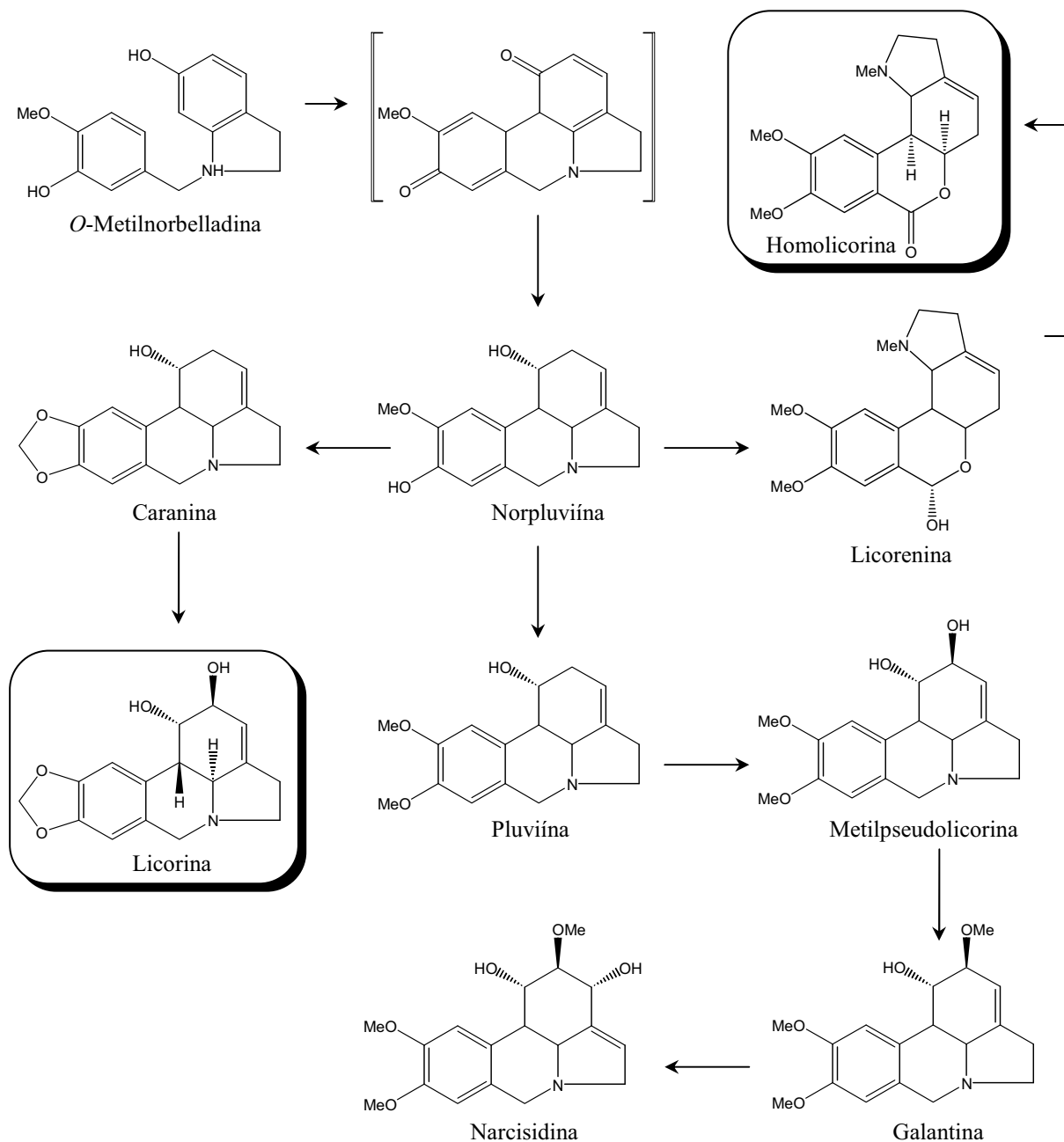
La L-Tyr, por su parte, se incorpora como tiramina, previa descarboxilación. La condensación del aldehído (protocatéquico o isovanillina) y la amina (tiramina) da lugar a una base de Schiff, dos de las cuales han sido aisladas, hasta el momento, del género *Crinum*: craugsodina (Ghosal *et al.*, 1986a) e isocraugsodina (Ghosal *et al.*, 1988). Por reducción de la base de Schiff se obtiene el precursor norbelladina, o *O*-metilnorbelladina, atendiendo al aldehído que se condensa. Los pasos posteriores son propios para cada grupo de alcaloides, en función del tipo de acoplamiento fenol oxidativo (Figura 3). Esta reacción ocupa una posición clave en el proceso biosintético, ya que representa la transición entre el metabolismo primario y secundario.



**Figura 3.** Tipos de acoplamiento fenol oxidativo en la biosíntesis de los alcaloides del tipo Amaryllidaceae.

**2.1.3.1. Acoplamiento fenol oxidativo *orto-para*':** Como se ha mencionado anteriormente, en este grupo se encuentran los alcaloides tipo licorina y homolicorina. Estudios realizados sobre la biosíntesis de los derivados de este tipo de alcaloides han mostrado que la norpluviína es precursor de la caranina, licorina, metilpseudolicorina, galantina y narcisidina. El grupo metoxilo de la posición 9 de la norpluviína, situado en *orto* respecto al grupo hidroxilo del anillo aromático, dará lugar al grupo metilendioxo, obteniéndose la caranina. Por otra parte, el grupo hidroxilo de la posición 8 de la norpluviína puede sufrir una metilación, dando lugar a la pluviína (Harken *et al.*, 1976), que por hidroxilación en la

posición 2 forma la metilpseudolicorina, la cual a su vez se metila para dar la galantina (Kirby & Tiwari, 1966). Finalmente, la galantina por una hidroxilación estereoespecífica puede dar lugar a la narcisidina. La ruta biosintética seguida por la norpluviina para originar los alcaloides tipo homolicorina comienza por una oxidación en la posición 6 seguida por la rotura del enlace C<sub>6</sub>-N formándose una amina y un aldehído. Tras un giro de 180°, la formación de un hemiacetal y la metilación del hidroxilo de la posición 8 y del nitrógeno, se obtiene la licorenina, y posteriormente, por oxidación de la posición 6, se forma la homolicorina (Bowman *et al.*, 1969; Harken *et al.*, 1976) (Figura 4).



**Figura 4.** Biosíntesis de alcaloides del tipo licorina y homolicorina.

**2.1.3.2. Acoplamiento fenol oxidativo *para-para*'**: A este grupo pertenecen los alcaloides tipo crinina, hemantamina, tazetina, narciclasina y montanina. La ruta biosintética de los alcaloides de tipo crinina - hemantamina se divide en dos series enantioméricas atendiendo a la configuración  $\alpha$  o  $\beta$  del puente etano entre el nitrógeno y el carbono 10b. Así, la noroxomaritidina da lugar a los alcaloides de la serie  $\alpha$  crinano, como la vitatina, hemantamina y hemantidina; por otro lado, la 2-oxocrinina da lugar a los alcaloides de la serie  $\beta$  crinano, como la crinina (Figura 5).

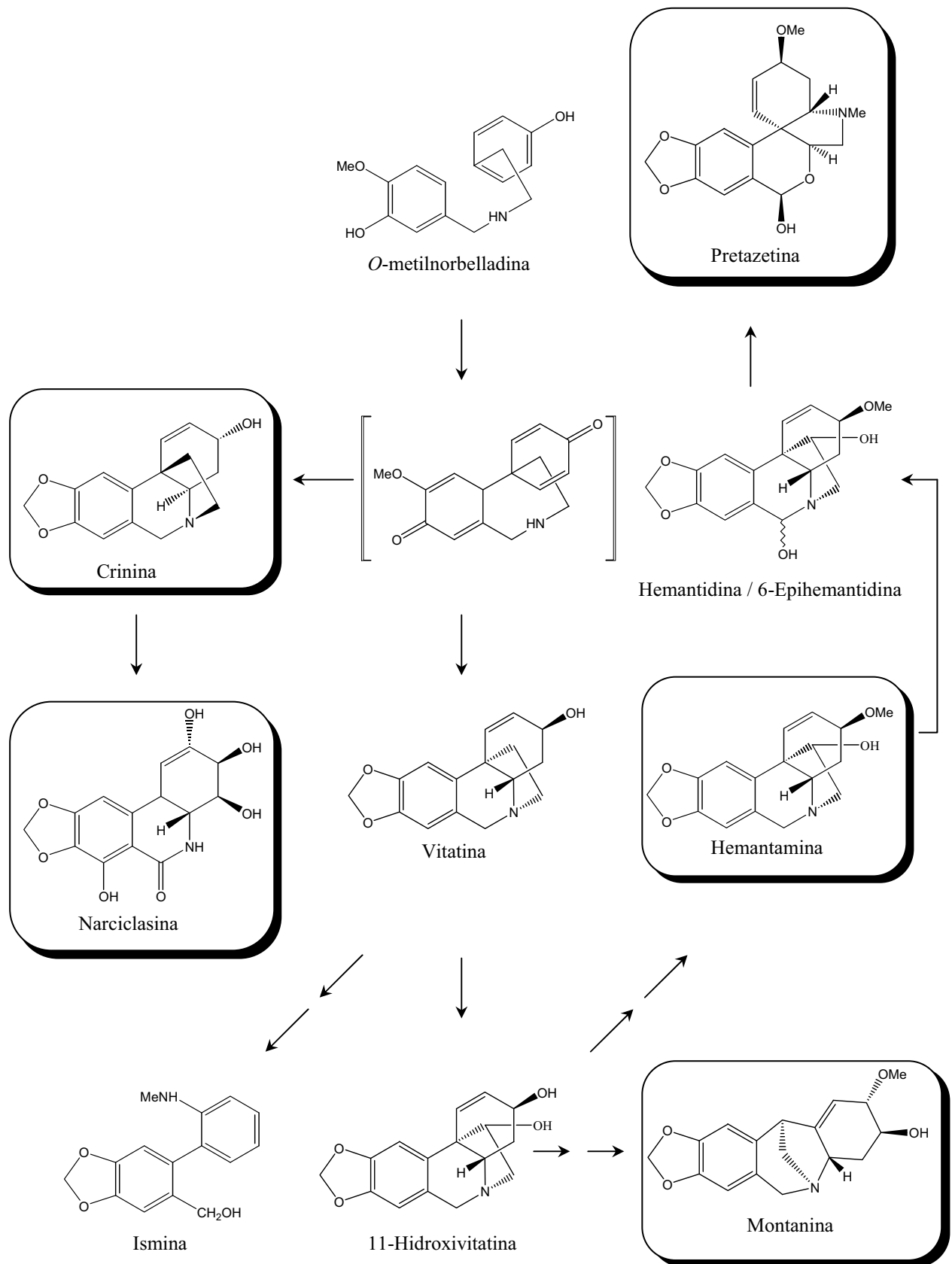
La incorporación de *O*-metilnorbelladina marcada a hemantamina puso de manifiesto que la hidroxilación de la posición 11 tiene lugar estereoespecíficamente, con pérdida del hidrógeno *pro-R* del carbono  $\beta$  de la mitad procedente de la L-Tyr y con retención de la configuración (Battersby *et al.*, 1971), además mostró como intermediarios a la noroxomaritidina y a la vitatina. Los resultados experimentales utilizando crinina marcada indicaron que las dos series enantioméricas no son interconvertibles.

En la biosíntesis del alcaloide narciclasina, la pérdida de los dos carbonos del puente etano puede ocurrir mediante una reacción retro-Prins sobre la 11-hidroxitatina, que también ha sido propuesta como intermediario en la biosíntesis de hemantamina y montanina, siguiendo la incorporación específica observada del alcaloide vitatina a estos dos alcaloides en *Rhodophiala bifida* (Feinstein & Wildman, 1976). Así mismo, se ha constatado que el alcaloide oxocrinina es el compuesto clave en la biosíntesis de la narciclasina, pasando por un intermediario que presenta un grupo hidroxilo pseudoaxial en la posición 3 (Fuganti & Mazza, 1972).

La noroxomaritidina está igualmente implicada en la biosíntesis de la narciclasina y es, además, el precursor de la ismina, la cual ha demostrado ser un producto de la transformación de la serie crinina - hemantamina (Fuganti & Mazza, 1972). El precursor oxocrinina marcado con tritio en las posiciones 2 y 4 se administró a *Sprekelia formosissima*, y la ismina aislada presentaba el marcaje en las mismas posiciones.

La ruta biosintética de los alcaloides tipo tazetina transcurre a través de hemantamina que, por oxidación bencílica, da lugar a la formación de una mezcla de epímeros (6-epihemantidina y hemantidina), y posteriormente a la pretazetina, previa rotura del enlace C<sub>6</sub>-N, rotación, formación de un hemiacetal y *N*-metilación (Fales & Wildman, 1964).

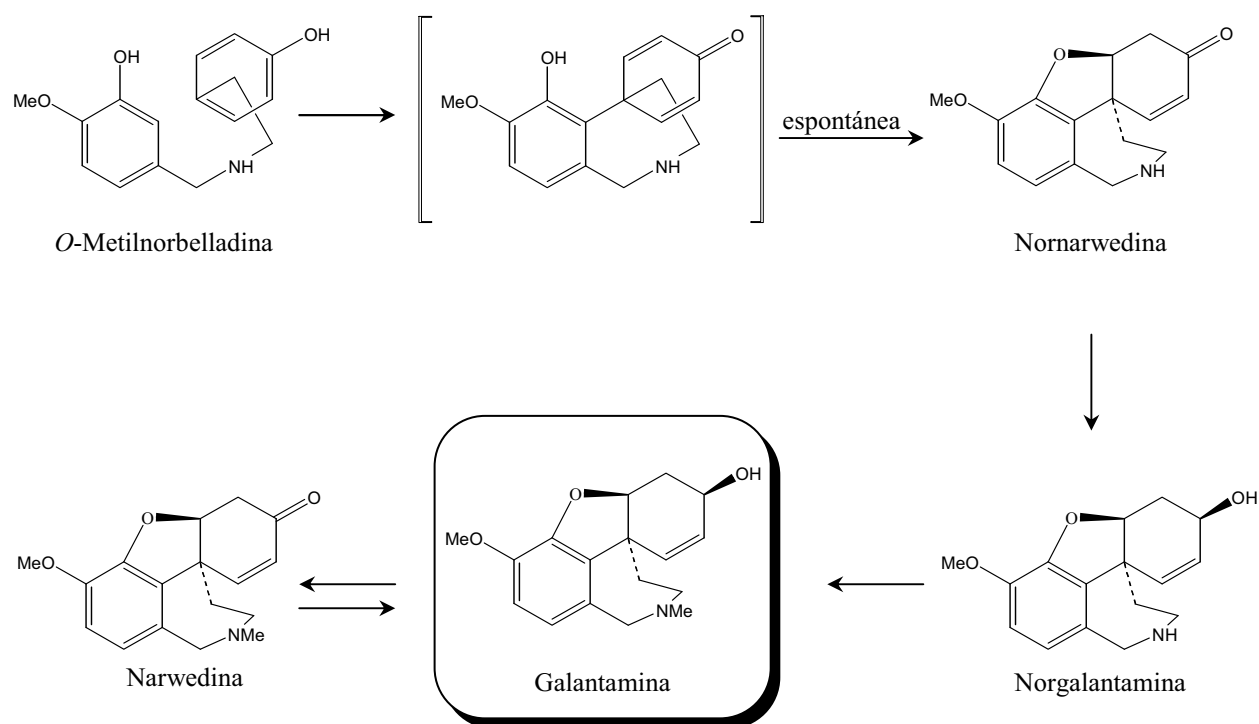




**Figura 5.** Biosíntesis de los alcaloides con acoplamiento fenol oxidativo *para-para'* (tipos crinina, hemantamina, tazetina, narciclasina y montanina).

Para los alcaloides tipo montanina se ha propuesto una ruta biosintética a partir de 11-hidroxivitatina, con una incorporación específica en el alcaloide montanina, todo ello observado en *Rhodophiala bifida* (Feinstein & Wildman, 1976). Esta propuesta ha sido corroborada por los resultados obtenidos con el marcaje realizado en *Haemanthus coccineus* donde se observa la conversión de *O*-metilnorbelladina en montanina (Fuganti & Mazza, 1972).

**2.1.3.3. Acoplamiento fenol oxidativo *para-orto*'**: A este grupo pertenecen los alcaloides del tipo galantamina. Mediante experimentos realizados en *Leucojum vernum* se ha demostrado que la ruta biosintética de la galantamina implica un acoplamiento fenol oxidativo de la *O*-metilnorbelladina en las posiciones *para-orto*' dando lugar a una dienona conjugada, la cual se cierra espontáneamente formando un puente éter, originando la nornarwedina, que se convertirá en norgalantamina tras una reducción estereoselectiva. Se ha demostrado que la norgalantamina se *N*-metila a galantamina en el paso final de la biosíntesis (Eichhorn *et al.*, 1998). De acuerdo con Eichhorn y colaboradores (1998), la narwedina no es el precursor directo de la galantamina y podría existir en equilibrio con ésta, mediante una reacción catalizada hipotéticamente por una *oxido-reductasa* reversible (Figura 6).



**Figura 6.** Biosíntesis de galantamina según Eichhorn *et al.*, 1998.

#### 2.1.4. Características botánicas de la familia Amaryllidaceae

La familia Amaryllidaceae está integrada por plantas bulbosas, aunque algunos géneros (*Clivia*, *Scadoxus* y *Cryptostephanus*) presentan rizoma. En su mayoría son geófitas, perennes o bianuales, ocasionalmente acuáticas o epífitas. Los bulbos son tunicados. Sus hojas, anuales o persistentes, son basales y no verticiladas, envainadas en la base, pueden ser sésiles y lineares o pecioladas y lanceoladas. Las flores son muy vistosas, se presentan solas o agrupadas en umbelas, envueltas por una vaina membranosa o espata mientras no florecen, rompiéndose en uno o dos segmentos papiráceos al iniciarse la floración. Las flores presentan simetría radial, periantio de piezas petaloides más o menos soldadas en la base y en la parte superior se proyectan en forma de copa, denominada corona. Los estambres raramente se presentan en cantidades mayores de seis. Tienen el ovario sincarpo, tricarpelado, inferior, trilocular (rara vez unilocular). El fruto es una cápsula loculicidal, generalmente dehiscente (Dahlgren *et al.*, 1985; Meerow & Snijman, 1998). En los últimos años, el cultivo de estas plantas para jardinería ha cobrado gran importancia habiéndose obtenido híbridos de gran belleza y diversidad de color (Ising, 1997).

Para realizar una clasificación sistemática de los géneros y especies de la familia Amaryllidaceae, en muchos casos se ha tenido que recurrir a estudios histológicos, citogenéticos o quimiosistemáticos, de mayor profundidad que los que normalmente suelen utilizarse (Dahlgren *et al.*, 1985).

**2.1.4.1. Distribución y hábitat:** La familia Amaryllidaceae incluye un grupo de plantas distribuido en zonas tropicales, subtropicales y de clima templado, con una notable variedad en Sudamérica (28 géneros) y África (19 géneros). En los dos centros de mayor diversidad, los cambios geológicos en Sudamérica y los climáticos en Sudáfrica, han representado factores importantes en la heterogeneidad de estas plantas (Meerow & Snijman, 1998). Solo el género *Crinum* (Tribu Amaryllideae) presenta semillas aparentemente bien adaptadas para dispersarse por el agua, y está representado en los dos continentes mencionados y en Asia.

**2.1.4.2. Aspecto botánico del género *Phaedranassa*:** La clasificación más reciente (Meerow & Snijman, 1998) contempla la división de esta familia en 15 tribus y 59 géneros. La clasificación del género objeto de estudio corresponde a:

Familia	Amaryllidaceae
Tribu	Stenomesseae Traub.
Género	<i>Phaedranassa</i> Herb.

El género *Phaedranassa* presenta hojas pecioladas con láminas lanceoladas a elípticas, algunas veces cubiertas con una pelusilla blanca azulada. Escapo sólido, aunque desarrollando un lumen de diámetro estrecho en el medio distal. Los bulbos se caracterizan por tener un color verde grisáceo. Flores actinomorfas, mayoritariamente tubulares, colgantes, con fragancia, de color rosado o rojo proximalmente y apicalmente verdes (Figura 7). Presentan un conducto estrecho y su unión con el ovario es más corto que los sépalos. Sépalos concéntricos en la mayor parte de su longitud. Estambres fasciculados y cercanos al perigonio, libres y de cuatro longitudes diferentes. Estigmas capitados. De cinco hasta quince flores por umbela. Semillas con testa de color negro o castaño.  $2n = 46$ .

Se han descrito once especies, algunas de ellas endémicas, que se distribuyen en Ecuador (*P. brevifolia*, *P. cinerea*, *P. dubia*, *P. glauciflora*, *P. lehmanni*, *P. schizantha*, *P. tunguraguae*, *P. viridiflora*), Colombia (*P. carmiolii*, *P. dubia*, *P. schizantha* y *P. ventricosa*), Costa Rica (*P. carmiolii*), y Perú (*P. megistophylla*) (W<sup>3</sup> Tropicos, 2008). Muchas son conocidas únicamente en una localidad específica, formando poblaciones muy localizadas pero amplias, en las orillas de los caminos y en otras áreas perturbadas, principalmente por encima de los 2.000 m. de altura (Meerow & Snijman, 1998).



**Figura 7.** Aspecto de la flor de *Phaedranassa dubia* (Humboldt, Bonpland & Kunth) J.F. Macbride.

## 2.2. Material y Métodos

### 2.2.1. Procedimientos experimentales generales

Rotación óptica: polarímetro Perkin-Elmer 241. Espectro IR: espectrómetro Perkin-Elmer modelo 1430, en película, empleando pastillas de NaCl de 1 cm de espesor. Espectro UV: los espectros se tomaron en un espectrómetro UV-Vis Varian Cary 50-Bio. Dicroísmo circular (CD): espectropolarímetro Jasco J-810, expresando los valores en elipticidad molar  $[\theta]$ . Espectrometría de masas (EIMS y CIMS): espectrómetro Hewlett-Packard modelo 5989 A, con inyección directa de la muestra y con energía de ionización de 70 eV. La espectroscopia de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) se realizó en instrumentos Varian modelos Gemini-300, Mercury-400 y VXR-500, usando  $\text{CD}_3\text{OD}$  o  $\text{CDCl}_3$  como solventes y TMS como patrón interno. Los valores de los desplazamientos químicos se indican en unidades  $\delta$  (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. Los espectros de correlación homo y heteronuclear (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) se obtuvieron en los equipos Mercury-400 y VXR-500, usando las secuencias estándar. La visualización de las manchas se realizó empleando el reactivo de Dragendorff en solución pulverizable (Munier & Macheboeuf, 1951).

### 2.2.2. Material vegetal

La recolección de los bulbos de *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae) se realizó en el municipio de la Sierra (1.833 msnm), departamento del Cauca-Colombia (Figura 8) en septiembre de 2003. Las muestras fueron autenticadas por el Dr. Bernardo Ramírez. Ejemplares de esta especie (pliego número 17-169) se encuentran en el Museo de Historia Natural, Sección Herbario, Universidad del Cauca (Colombia).

### 2.2.3. Extracción, fraccionamiento y purificación de alcaloides

El material vegetal seco (771.3 g de bulbos) se troceó y posteriormente se maceró con etanol agitando periódicamente. El extracto se evaporó a presión reducida y el residuo resultante se acidificó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 5 %. La solución ácida, una vez filtrada, se extrajo con  $\text{Et}_2\text{O}$  para eliminar el material neutro (clorofilas y otros compuestos apolares). Posteriormente, se basificó con  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH = 8-9), y se extrajo con AcOEt en repetidas ocasiones. La solución de AcOEt se concentró al vacío, obteniéndose así el extracto A (2.03 g).



**Figura 8.** Mapa Político de Colombia.

Para realizar una primera separación del extracto alcaloídico, se empaquetaron columnas cromatográficas líquidas al vacío (CLV) (Coll & Bowdem, 1986; Pelletier *et al.*, 1986) y columnas cromatográficas abiertas (CC), empleando como soporte sílica gel 60 A con una granulometría de 6-35 micras para la CLV y de 70-200 micras para la CC, respectivamente. Durante todo el proceso, se realizaron comprobaciones mediante cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios comerciales de sílica gel Alugram SIL G/UV<sub>254</sub>, 0.25 mm. (Macherey-Nagel), y como eluyentes, los mismos utilizados para la cromatografía en columna, aunque variando las proporciones. En algunos casos, las placas de seguimiento se eluyeron expuestas a vapores de amoníaco o añadiendo gotas del mismo al medio. Así, se

colectaron las fracciones que contenían el mismo alcaloide o mezclas de estos, que posteriormente se sometieron a un proceso de separación-purificación mediante cromatografía en capa fina preparativa (CCF prep.), utilizando placas comerciales de sílica gel, UV<sub>254</sub> (SDS, Art. CCM121354) y CC Sephadex LH20 (Amersham Biocience, 17-0090-01). Como sistema eluyente se utilizó el predeterminado por cromatografía analítica.

El extracto A se sometió a una separación cromatográfica CLV, comenzando la elución con hexano, 100 %, luego se incrementó progresivamente la cantidad de AcOEt hasta 100 %. Posteriormente, se adicionó MeOH, progresivamente, hasta completar la elución con una proporción final de (4:1). Se obtuvieron tres fracciones principales. La fracción I se cromatografió utilizando CCF prep., eluyendo con AcOEt-MeOH (7:3), y Sephadex LH20, eluyendo con MeOH; así se obtuvieron los alcaloides pseudolicorina (22 mg), fedranamina (18 mg) y sanguinina (5 mg). La fracción II se obtuvo utilizando repetidamente CCF prep., eluyendo con Acetona-MeOH (7:3), y Sephadex LH20, eluyendo con MeOH, de esta forma, se aisló sanguinina adicional (6 mg), galantamina (5 mg), epinorgalantamina (4 mg) y hemantamina (4 mg). La fracción III se cromatografió nuevamente por CC en sílica gel 60 mediante sucesivas CCF prep., eluyendo con BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O saturado con NH<sub>4</sub>OH, obteniéndose así los alcaloides del tipo betaina: zefbetaina (8 mg) y ungeremina (6 mg).

#### 2.2.4. Caracterización de los alcaloides

A continuación se relacionan las técnicas que se emplearon para determinar la estructura de los alcaloides aislados de la especie *Phaedranassa dubia*, técnicas que también se utilizaron para la caracterización de los biflavonoides de *Garcinia madruno*.

**2.2.4.1. Espectroscopia ultravioleta (UV) y de infrarrojo (IR):** La espectroscopía UV es una técnica que permite detectar la presencia de grupos funcionales en los compuestos analizados, siendo de gran utilidad para los análisis químicos, tanto desde el punto de vista cuantitativo como cualitativo (Aguilar, 2003). En nuestro caso, el trabajo rutinario en ultravioleta fue llevado a cabo en la región UV cercano. Por su parte, la espectroscopia IR proporciona cambios en la energía rotacional y vibracional de los compuestos orgánicos, los cuales son representados como un espectro de señales característico que ayudan a la identificación de los grupos funcionales de las moléculas.

**2.2.4.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN):** La espectroscopía de RMN es una técnica que proporciona información estructural y estereoquímica de gran interés en un espacio de tiempo muy reducido. Se trata de una técnica no destructiva que estudia el comportamiento de ciertos núcleos atómicos (aquéllos que poseen *spin* nuclear distinto de cero) en presencia de un campo magnético externo. El campo magnético aplicado produce un desdoblamiento de los niveles de energía del *spin* nuclear (en este caso  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), de modo que pueden inducirse transiciones entre ellos como consecuencia de la absorción de una radiación electromagnética adecuada (Heinrich *et al.*, 2004). En este momento, los espines, comportándose como pequeños imanes polarizados, comienzan a presionar con su frecuencia característica en torno al campo magnético externo, induciendo una pequeña corriente oscilante de radiofrecuencia (RF) en una bobina receptora situada en las inmediaciones de la muestra. A medida que los núcleos van regresando poco a poco a la situación inicial de equilibrio alineados con el campo magnético principal, la señal detectada va disminuyendo de intensidad hasta hacerse cero. Esta caída de la señal se conoce como caída libre de la inducción (FID, del inglés “free induction decay”) y da lugar al espectro de RMN (Heinrich *et al.*, 2004).

Para la elucidación estructural de las moléculas aisladas se han efectuado distintos experimentos de RMN tales como:

#### **2.2.4.2.1. Experimentos monodimensionales**

**RMN  $^1\text{H}$ :** El espectro de protón revela el valor del desplazamiento químico dependiendo del ambiente químico de cada protón (en ppm), la multiplicidad de cada señal, y la constante de acoplamiento para cada hidrógeno, lo cual permite relacionar estrechamente cada protón con los átomos de carbono adyacentes (Heinrich *et al.*, 2004).

**RMN  $^{13}\text{C}$ :** Esta técnica permite poner en evidencia todos los carbonos de la molécula mediante una señal única por átomo de carbono. El análisis se basa en los desplazamientos químicos observados en función del entorno de cada uno de los átomos de carbono (Heinrich *et al.*, 2004). El experimento DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) representa una forma especial de RMN  $^{13}\text{C}$ , la cual permite la distinción de los diferentes carbonos dentro de la molécula:  $-\text{CH}$ ,  $-\text{CH}_2$  y  $-\text{CH}_3$  (Duddeck & Dietrich, 1992; Heinrich *et al.*, 2004).



**2.2.4.2.2. Experimentos bidimensionales (RMN -2D):** La posibilidad de excitar la muestra con uno o más pulsos de RF (con las cuales se obtiene el espectros de RMN), cada uno de ellos aplicado con una potencia, duración, frecuencia, forma y fase particulares, e introducirlos en momentos específicos de tiempo durante el experimento de RMN, generalmente antes de que el sistema haya regresado al equilibrio por relajación, permite diseñar toda una gama de secuencias de pulsos de las que se puede extraer información molecular muy variada.

En un experimento de RMN bidimensional, la secuencia de pulsos debe constar de al menos dos pulsos y éstos deben estar separados por un periodo de espera incrementable. La secuencia de pulsos se repite un número de veces adquiriéndose una FID en cada ocasión. La fase de alguno de los pulsos puede alterarse en cada repetición así como incrementarse la duración de uno o más tiempos de espera variables. Si la secuencia de pulsos tiene un tiempo de espera incrementable el experimento tendrá dos dimensiones, si tiene dos será de tres dimensiones, si tiene tres el experimento será de cuatro dimensiones. Aunque en teoría no existe límite en el número de dimensiones de un experimento, experimentalmente hay limitaciones impuestas por la consiguiente pérdida de señal por relajación que conlleva la detección de las distintas dimensiones. A grosso modo, las interacciones que pueden detectarse por RMN se pueden clasificar en dos tipos:

- Las interacciones a través de enlaces, las cuales se basan en el acoplamiento escalar.
- Las interacciones a través del espacio, las cuales se basan en el acoplamiento dipolar.

Dependiendo del tipo de experimento y del número de núcleos involucrados pueden darse los siguientes casos de correlación en RMN bidimensional.

#### **Correlación homonuclear:**

- **COSY (Correlation Spectroscopy  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ):** En COSY, la transferencia de magnetización ocurre a través de enlaces. Esta técnica proporciona información acerca de los acoplamientos homonucleares  $^2J$  y  $^3J$  entre los protones adyacentes. Entre las diferentes aplicaciones de los experimentos COSY, se encuentra la elucidación de los datos estructurales de moléculas, que no son satisfactoriamente representadas en un espectro de RMN monodimensional.

- **NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy):** Además de los desplazamientos químicos y de los acoplamientos escalares existe un efecto muy importante para la determinación de estructuras mediante RMN, el llamado Efecto Nuclear Overhauser (NOE). Es una interacción a través del espacio mediante la cual cambia la intensidad de la señal de un determinado núcleo cuando se irradia otro núcleo vecino (cercano en el espacio). El NOE es una interacción dipolo-dipolo que nos permite medir distancias interatómicas de pocos Å.

#### **Correlación Heteronuclear:**

- **HSQC. (Heteronuclear Single Quantum Coherence):** Este experimento es utilizado frecuentemente en RMN de moléculas orgánicas y es de particular significancia en el campo de la RMN de proteínas. El espectro HSQC es bidimensional y presenta un eje para  $^1\text{H}$  y el otro para  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ , los cuales son los heteronúcleos mayoritariamente utilizados. Los espectros contienen una señal para cada único protón unido al heteronúcleo considerado ( $^1J_{\text{H-C}}$  o  $^1J_{\text{H-N}}$ ). Así, si el desplazamiento químico de un protón específico es conocido, el desplazamiento químico del heteronúcleo acoplado puede ser determinado, y viceversa.
- **HMBC (Heteronuclear Multibond Coherence):** Los experimentos HMBC se encuentran entre las principales herramientas de RMN bidimensional para realizar elucidación estructural. Las principales aplicaciones incluyen la asignación de las resonancias de los núcleos carbono o nitrógeno no protonados y la correlación a larga distancia (2 y 3 enlaces) de carbonos protonados que están separados por carbonos no protonados o por otros heteronúcleos. Así, este método muestra la detección de los acoplamientos de tipo  $^{2y3}J_{\text{H-C}}$  o  $^{2y3}J_{\text{H-N}}$ .

**2.2.4.3. Espectrometría de masas (EM):** La espectrometría de masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos desconocidos, para cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas (algunos pmoles) de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito. En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En la técnica clásica de impacto electrónico (EI), algunas de las moléculas ionizadas del analito “explotan” en una variedad de fragmentos

ionizados, el patrón de fragmentación resultante así como los iones residuales constituyen el espectro de masas. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado como su “huella química” para caracterizar el analito.

La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas en función de su relación masa-carga ( $m/z$ ). El proceso comprende básicamente cuatro etapas:

- Ionización de la muestra.
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Dispersión de los iones según su masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica.

**2.2.4.4. Dicroísmo circular (CD):** Un rayo de luz polarizada se considera formado por dos componentes polarizados circularmente, uno a la derecha y el otro a la izquierda. Estos componentes están en fase y son de la misma amplitud. Al pasar por un medio ópticamente activo, cada componente interactúa de manera diferente con los centros quirales de las moléculas presentes. La interacción de la radiación con la muestra induce un desfase y un cambio de magnitud diferenciales en ambos componentes circularmente polarizados de la luz, y estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo  $\alpha$  y la distorsión de este plano genera una elipse. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (CD) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros de estos fenómenos, esto es, gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de CD se obtienen generalmente en las regiones del UV cercano (250 a 350 nm) y lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética.



## 2.3. Resultados y Discusión

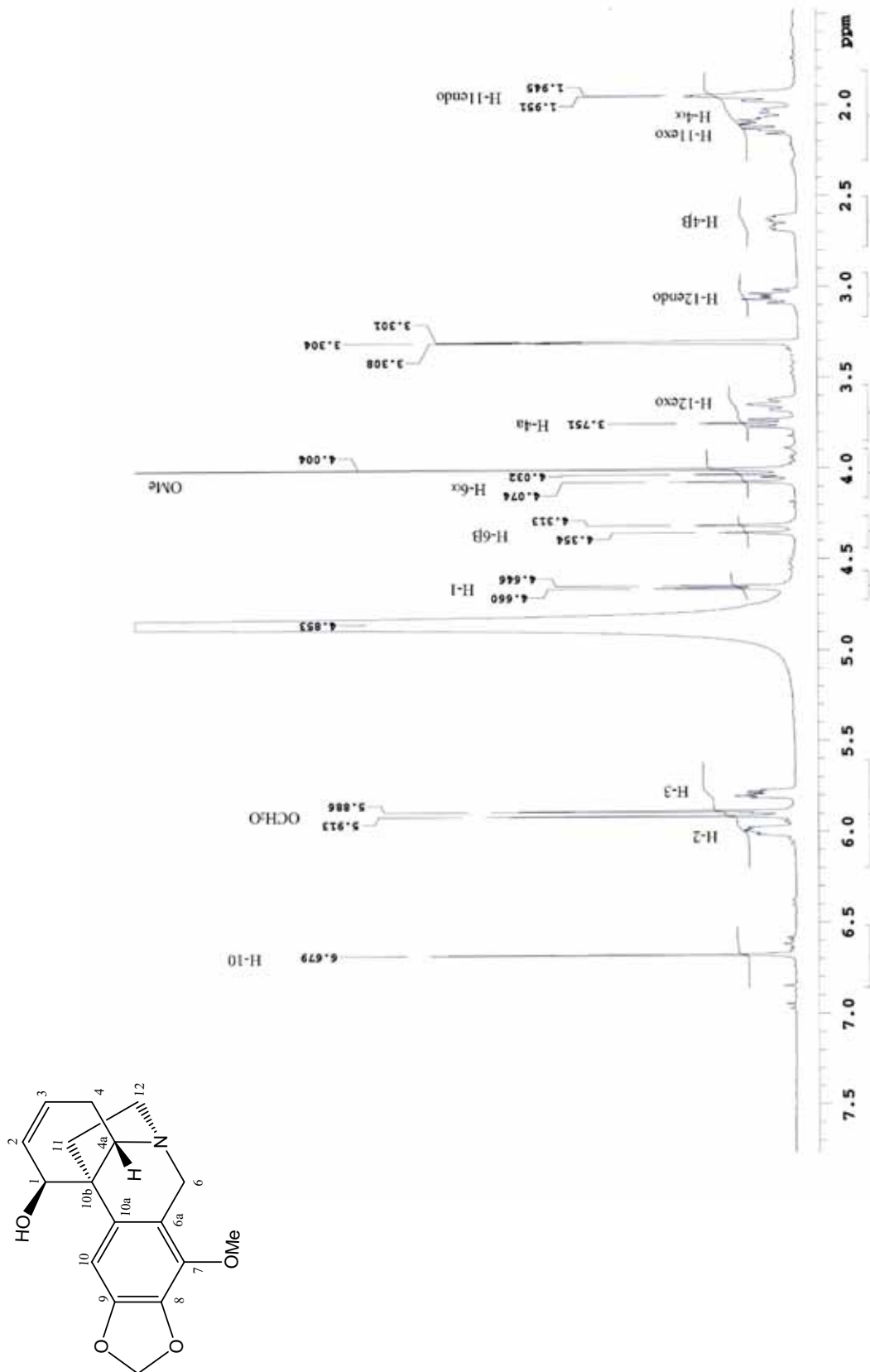
### 2.3.1. Caracterización de los alcaloides

Los bulbos de *Phaedranassa dubia* presentaron un nuevo alcaloide, fedranamina (**1**), además de siete alcaloides ya conocidos, pseudolicorina (**2**), sanguinina (**3**), galantamina (**4**), epinorgalantamina (**5**), hemantamina (**6**), ungeremina (**7**) y zefbetaina (**8**). Los compuestos se identificaron por comparación de sus datos físicos y espectrales (CCF, CD,  $[\alpha]_D$ , IR, EM, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y RMN-2D) con los reportados para estos compuestos en la literatura.

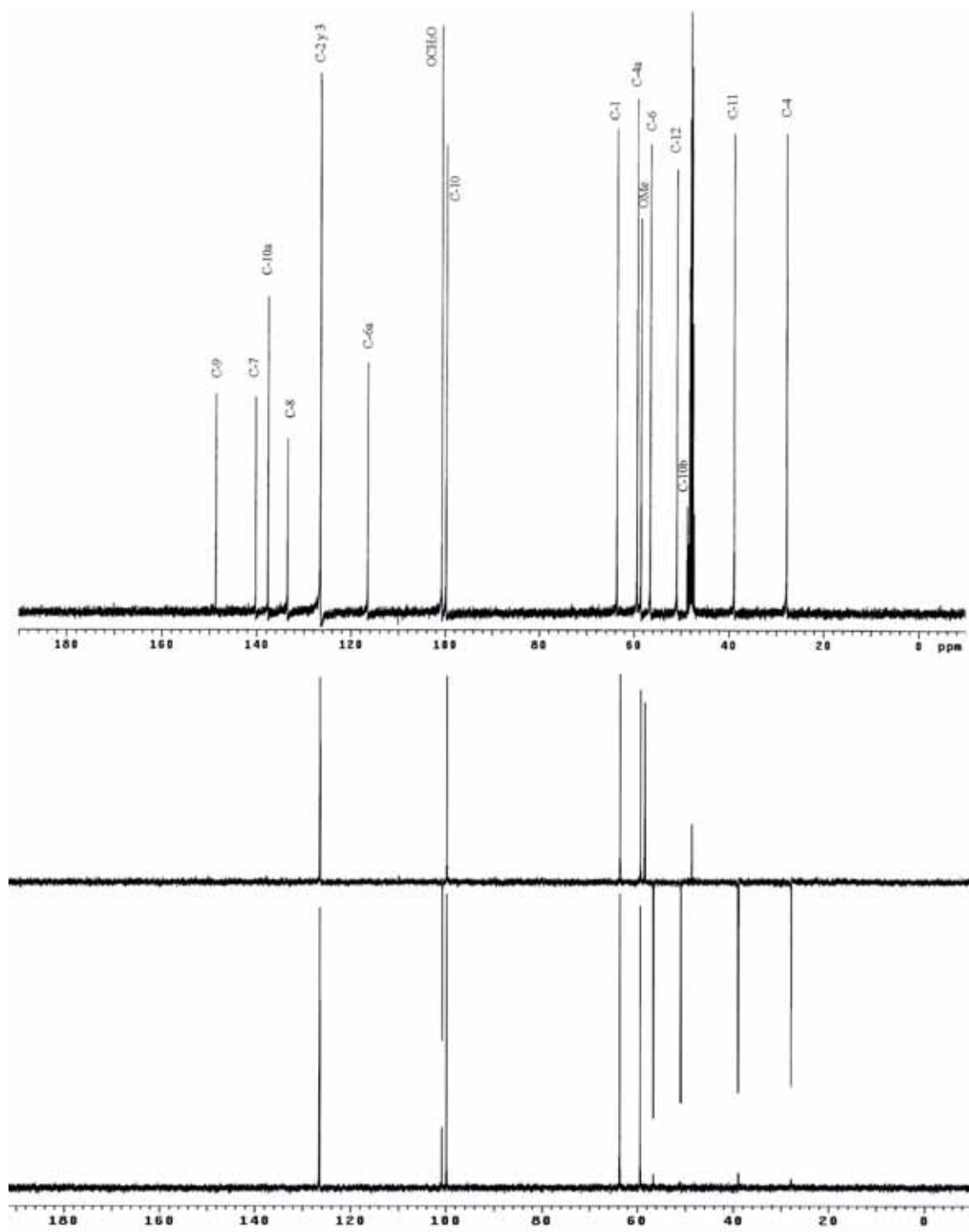
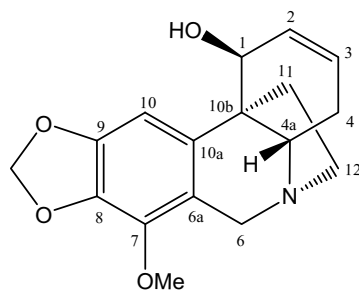
**2.3.1.1. Fedranamina (1).** El compuesto de estructura  $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_4$  se cristalizó utilizando acetato de etilo, dando cristales de color blanco, pf 176-178°C.  $[\alpha]_D^{20} + 172^\circ$  (*c* 0.82, MeOH). Su espectro IR mostró una banda de absorción ancha centrada a  $3.200\text{ cm}^{-1}$ , así como una banda a  $936\text{ cm}^{-1}$ , asociadas a grupos hidroxilo y metilendioxo, respectivamente. Otras señales en el IR $_{\text{vmax}}$  corresponden a 2.886, 1.735, 1.619, 1.476, 1.079, 1.045, 977,  $753\text{ cm}^{-1}$ . Su EIMS mostró un pico base a *m/z* a 301, el cual representa el ión molecular  $[\text{M}]^+$ . Otros picos corresponden a: *m/z* (int rel.) 300  $[\text{M}-\text{H}]^+$  (19), 284 (16), 282 (18), 272 (13), 256 (20), 231 (20), 218 (16), 204 (20), 77 (21). El HR-EIMS presentó un pico a *m/z* a 302.1390  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , el cual está en concordancia con un peso molecular calculado de 302.1392 para la fórmula  $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ . Para facilitar la asignación de las señales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de fedranamina (Figura 9 y 10; Tabla 2), se realizaron experimentos de RMN-2D incluyendo COSY, NOESY (Figuras 11 y 12; Tabla 3) y HMBC (Figura 13). En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), las constantes de acoplamiento entre H-1 y H-2 ( $J = 5.6\text{ Hz}$ ), H-2 y H-3 ( $J = 10.0\text{ Hz}$ ), H-3 y H-4 $\beta$  ( $J = 3.4\text{ Hz}$ ), y la constante geminal de 19.2 Hz entre H-4 $\alpha$  y H-4 $\beta$ , permiten asignar el grupo hidroxilo en la posición C-1 y la insaturación entre las posiciones C-2 y C-3. La multiplicidad de H-4 $\alpha$  confirma la asignación del doble enlace, por presentar una notable diferencia con el protón H-4 $\alpha$  axial en los alcaloides tipo hemantamina con el doble enlace entre las posiciones 1 y 2, en los cuales se aprecia, generalmente, una señal de tipo doble doblete (Bastida *et al.*, 2006). Los dos protones H-6 forman un sistema AB con una constante geminal alrededor de 16.6 Hz. El protón H-6 $\alpha$  se asignó a campos más altos como consecuencia de la correlación NOE con el H-12endo. Además, H-4 $\alpha$  mostró correlación espacial con H-12exo y H-6 $\beta$  con H-4 $\alpha$ , lo que confirmó la asignación propuesta. El protón aromático a  $\delta = 6.67$  se asignó a H-10, en base a la correlación a tres enlaces HMBC con C-6 $\alpha$ , C-8 y C10b, todo ello corroborado además por la proximidad espacial entre H-10 y H-1,

según el experimento NOESY. La posición del grupo metilendioxo como dos dobles a  $\delta = 5.90$  se estableció por experimentos de correlación HMBC, indicando que los carbonos aromáticos C-8 y C-9 a  $\delta = 133.81$  y  $148.47$ , respectivamente, soportan el grupo  $\text{OCH}_2\text{O}$ . De esta forma se infirió que el grupo metoxilo a  $\delta = 4.00$ , se encontraba unido a la posición C-7, confirmado además por la conectividad a tres enlaces según el espectro HMBC y la proximidad espacial con el protón H-6 $\alpha$ , según el experimento NOESY.

La asignación de las señales de  $^{13}\text{C}$  (Tabla 2) reportadas para **1** se confirmaron por medio del experimento HMBC. La localización del grupo hidroxilo en C-1 (a  $\delta = 63.89$ ), se confirmó por el pronunciado desapantallamiento en esta posición, así como la del carbono C-4, los cuales difieren de las señales correspondientes para los alcaloides 1,2-insaturados (Viladomat *et al.*, 1996; Bastida *et al.*, 2006). Adicionalmente, el protón H-1 aparece apantallado marcadamente, debido al grupo hidroxilo vecinal. Los carbonos cuaternarios C-6a y C-10a se asignaron gracias a su correlación a tres enlaces con el protón H-10 y con el protón H-1, respectivamente. El singulete a  $48.96$  se asignó al C-10b teniendo en cuenta su conectividad a tres enlaces con H-10 y con el protón H-4 $\beta$ . La configuración absoluta del puente 5,10b-etano fue determinada por dicroísmo circular (CD). El compuesto **1** presentó un espectro cualitativamente similar a los alcaloides del tipo hemantamina (con un puente 5,10b-etano en posición  $\alpha$ ), con un máximo alrededor de  $280$  nm y un mínimo de  $245$  nm (Wagner *et al.*, 1996; Pham *et al.*, 1998) (Figura 14). Por analogía, se sugiere la misma orientación  $\alpha$  del puente 5,10b para el compuesto **1**, el cual muestra un espectro CD con leves variaciones, probablemente debidas al efecto de los sustituyentes (Nair *et al.*, 2005). Entonces, el alcaloide **1** se identificó por medio de métodos espectroscópicos y se designó como fedranamina, un nuevo producto natural.



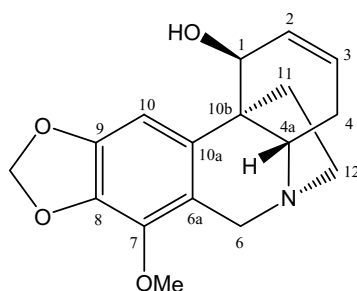
**Figura 9.** Fedranamina (1). Espectro RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) tomado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



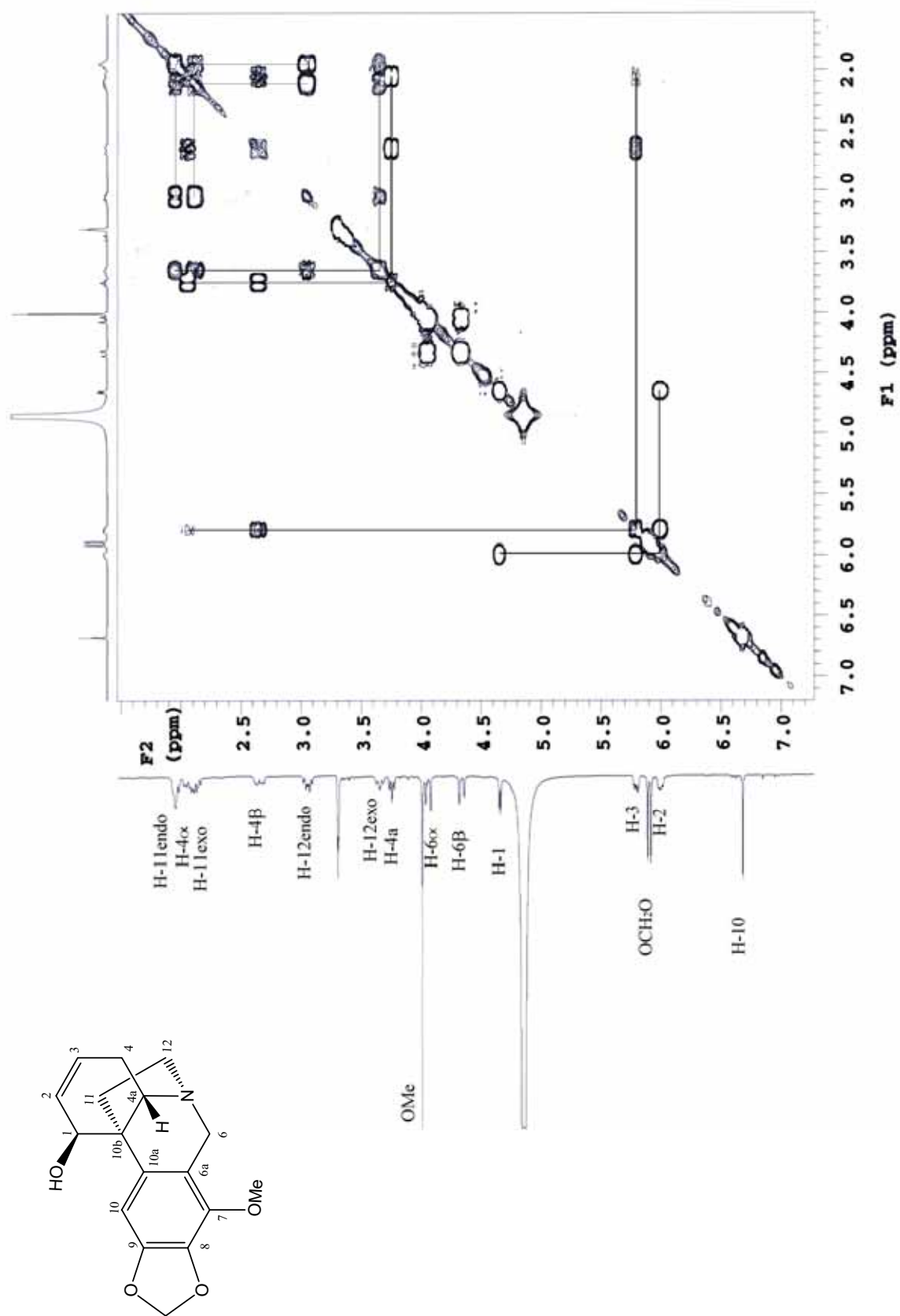
**Figura 10.** Fedranamina (1). RMN <sup>13</sup>C y DEPT (400 MHz) tomados en CD<sub>3</sub>OD.



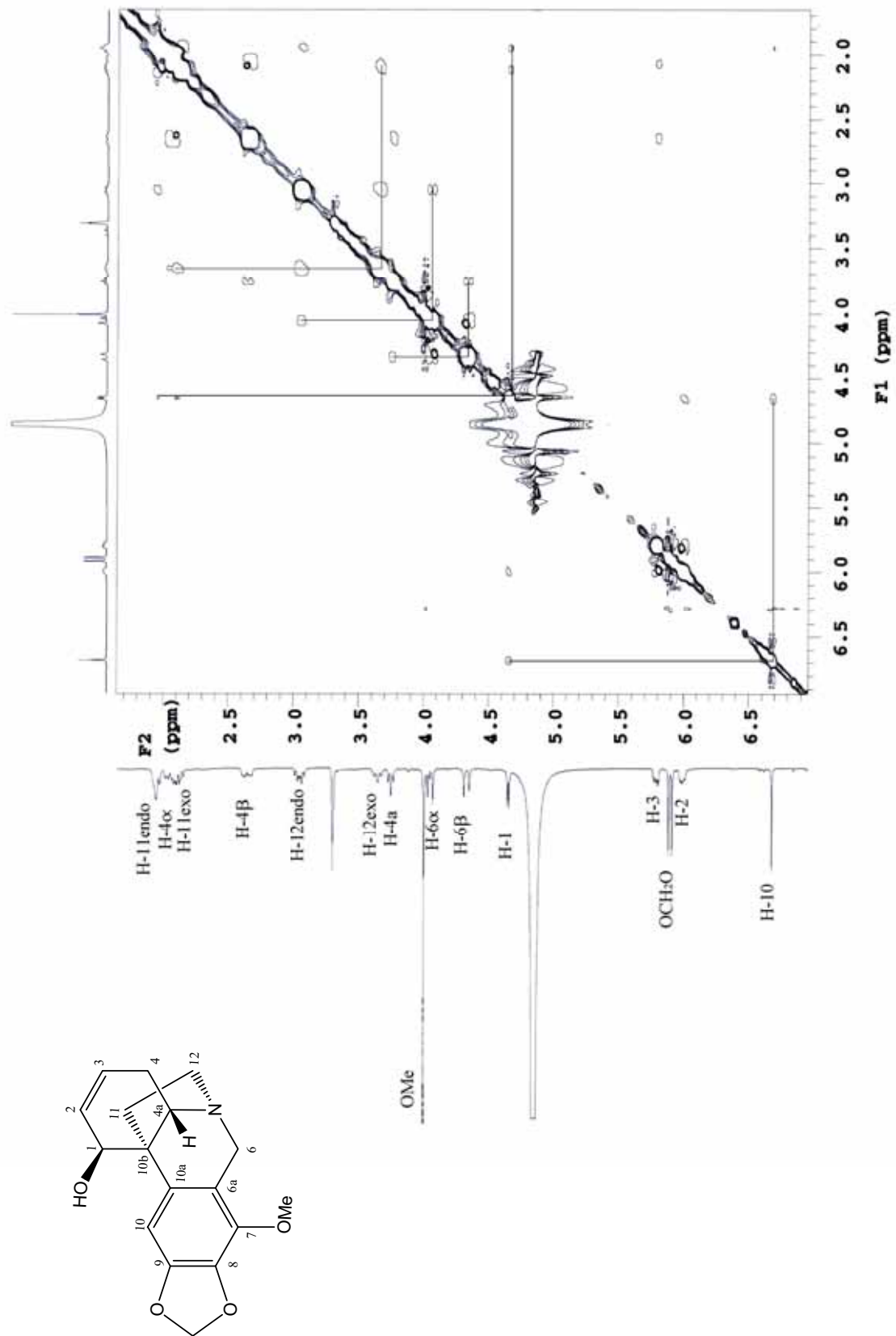
**Tabla 2.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, HSQC y HMBC de Fedranamina.



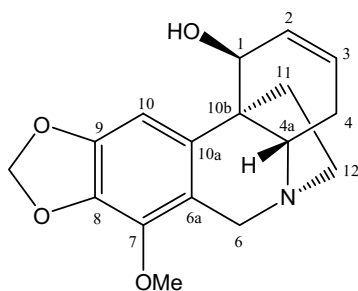
Protón	<sup>1</sup> H (δ)	m (J Hz)	Correlación con átomos de C	
			HSQC (m, DEPT)	HMBC
H-1	4.65	<i>d</i> (5.6)	63.89 ( <i>d</i> )	C-3, C-4a, C-10a
H-2	5.99	<i>dd</i> (10.0, 5.6)	126.32 ( <i>d</i> )	C-4
H-3	5.78	<i>ddd</i> (10.0, 4.4, 3.4)	126.32 ( <i>d</i> )	C-4
H-4 $\alpha$	2.04	<i>ddd</i> (19.2, 7.8, 4.4)	28.00 ( <i>t</i> )	C-2
H-4 $\beta$	2.64	<i>ddd</i> (19.2, 7.4, 3.4)	28.00 ( <i>t</i> )	C-2, C-10b
H-4a	3.75	<i>t</i> (7.6)	59.25 ( <i>d</i> )	C-6, C-10a, C-11, C-12
H-6 $\alpha$	4.05	<i>d</i> (16.8)	56.38 ( <i>t</i> )	C-4a, C-7, C-10a, C-12
H-6 $\beta$	4.33	<i>d</i> (16.4)	56.38 ( <i>t</i> )	C-10a, C-12
			116.24 ( <i>s</i> , C-6a)	
			140.22 ( <i>s</i> , C-7)	
			133.81 ( <i>s</i> , C-8)	
			148.47 ( <i>s</i> , C-9)	
H-10	6.67	<i>s</i>	100.01 ( <i>d</i> )	C-6a, C-8, C-10b
			137.92 ( <i>s</i> , C-10a)	
			48.96 ( <i>s</i> , C-10b)	
H-11endo	1.97	<i>m</i>	38.93 ( <i>t</i> )	
H-11exo	2.10	<i>m</i>	38.93 ( <i>t</i> )	C-10a
H-12endo	3.05	<i>ddd</i> (12.8, 8.4, 8.0)	51.12 ( <i>t</i> )	C-4a, C-6
H-12exo	3.64	<i>ddd</i> (12.5, 9.5, 4.5)	51.12 ( <i>t</i> )	C-4a
OMe	4.00	<i>s</i>	58.26 ( <i>q</i> )	C-7
OCH <sub>2</sub> O	5.90	<i>2d</i> (1.2)	101.16 ( <i>t</i> )	C-8, C-9



**Figura 11.** Fedranamina (1). COSY (400 MHz) tomado en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura 12.** Fedranamina (1). NOESY (400 MHz) tomado en CD<sub>3</sub>OD.

**Tabla 3.** Datos COSY y NOESY de Fedranamina.

Protón	COSY	NOESY
H-1	H-2	H-10, H-11endo, H-11exo
H-2	H-1, H-3	
H-3	H-2, H-4 $\alpha$ , H-4 $\beta$	
H-4 $\alpha$	H-3, H-4 $\beta$ , H-4a	H-12exo
H-4 $\beta$	H-3, H-4 $\alpha$ , H-4a	
H-4a	H-4 $\alpha$ , H-4 $\beta$	H-6 $\beta$
H-6 $\alpha$	H-6 $\beta$	H-12endo, OMe
H-6 $\beta$	H-6 $\alpha$	H-4a, OMe
H-10		H-1
H-11endo	H-11exo, H-12endo, H-12exo	H-1
H-11exo	H-11endo, H-12endo, H-12exo	H-1
H-12endo	H-11endo, H-11exo, H-12exo	H-6 $\alpha$
H-12exo	H-11endo, H-11exo, H-12endo	H-4 $\alpha$
OMe		H-6 $\alpha$ , H-6 $\beta$
OCH <sub>2</sub> O		

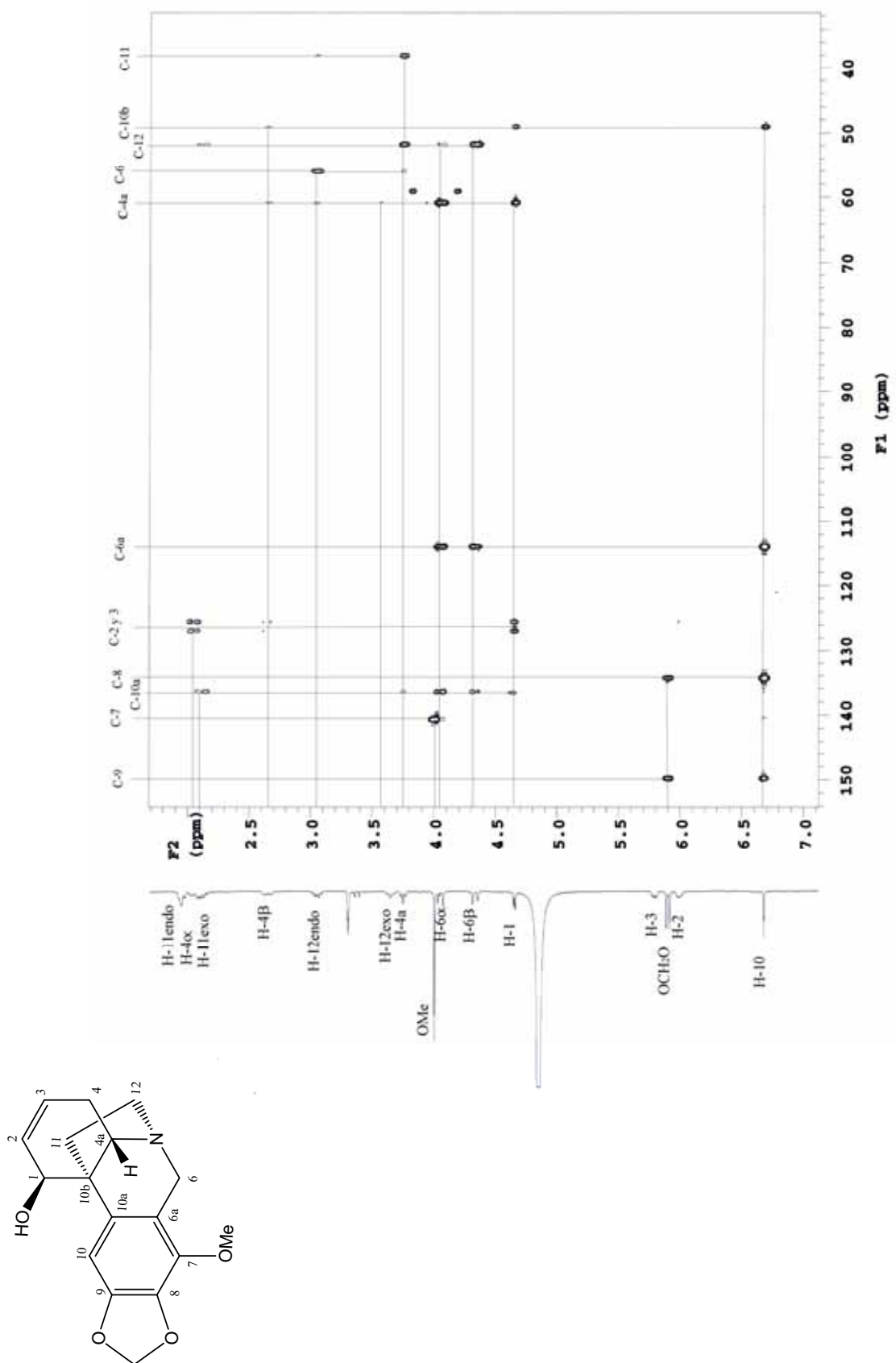
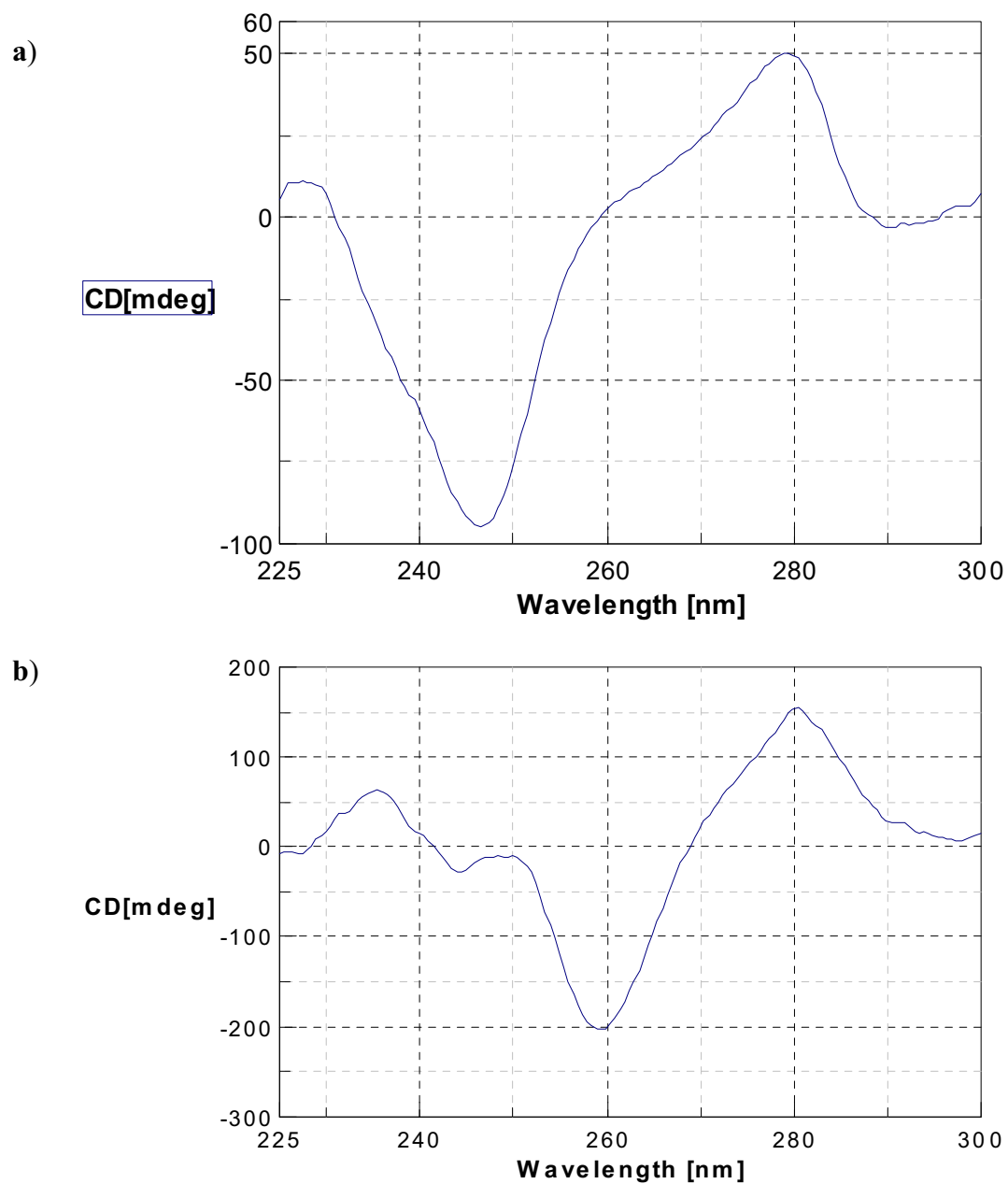


Figura 13. Fedranamina (1). HMBC (400 MHz) tomado en CD<sub>3</sub>OD.



**Figura 14.** Espectro CD de hemantamina (a) y fedranamina (b).

**2.3.1.2. Pseudolicorina (2).** El compuesto (2),  $C_{16}H_{19}NO_4$ , fue identificado como pseudolicorina por comparación de sus datos físicos y espectrales con los reportados para este compuesto en la literatura (Ghosal *et al.*, 1984; Llabrés *et al.*, 1986) y con los de una muestra patrón. Se aisló como cristales de color amarillento, pf 237-240°C.  $[\alpha]_D^{20} - 57.8^\circ$  (EtOH;  $c$  0.3).  $IR_{\nu_{\max}} \text{ cm}^{-1}$ : 3.400, 1.580, 1.510, 1.460, 1.260. EM 70 eV  $m/z$  (int rel.): 289  $[M]^+$  (39), 288 (16), 270 (24), 252 (13), 230 (15), 229 (82), 228 (100). RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  6.85 (1H, *s*, H-10), 6.70 (1H, *s*, H-7), 5.53 (1H, *sa*, H-3), 4.46 (1H, *s*, H-1), 4.15 (1H, *d*,  $J = 1.5$  Hz, H-2), 4.11 (1H, *d*,  $J = 14.0$  Hz, H-6 $\beta$ ), 3.81 (3H, *s*, 8-OMe), 3.56 (1H, *d*,  $J = 14.0$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.32 (1H, *m*, H-12 $\beta$ ), 2.87 (1H, *d*,  $J = 11.0$  Hz, H-4a), 2.71 (1H, *d*,  $J = 11.0$  Hz, H-10b), 2.63 (1H, *m*, H-11 $\alpha$ ), 2.58 (1H, *ddd*,  $J = 17.0; 9.0; 2.0$  Hz, H-11 $\beta$ ), 2.45 (1H, *dd*,  $J = 18.0; 9.0$  Hz, H-12 $\alpha$ ) (Figura 15). RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  145.74 (*s*, C-8), 144.96 (*s*, C-9), 139.41 (*s*, C-4), 126.63 (*s*, C-6a), 124.12 (*s*, C-10a), 118.51 (*d*, C-3), 110.66 (*d*, C-10), 109.66 (*d*, C-7), 70.64 (*d*, C-2), 69.25 (*d*, C-1), 60.40 (*d*, C-4a), 54.47 (*q*, 8-OMe), 54.25 (*t*, C-6), 52.74 (*t*, C-12), 37.88 (*d*, C-10b), 27.39 (*t*, C-11) (Figura 16).

**2.3.1.3. Sanguinina (3).** El compuesto (3) fue aislado como un sólido amarillo claro, pf 210-213°C.  $[\alpha]_D^{20} - 133^\circ$  (MeOH;  $c$  0.45).  $IR_{\nu_{\max}} \text{ cm}^{-1}$ : 3.500, 1.600, 1.503, 1.460, 1.290, 1.260, 1.040, 750. EM 70 eV  $m/z$  (int rel.): 273  $[M]^+$  (80), 272  $[M-H]^+$  (66), 256 (19), 230 (16), 216 (21), 212 (25), 202 (40), 160 (70). RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  6.58 (1H, *d*,  $J = 8.0$  Hz, H-8), 6.53 (1H, *d*,  $J = 8.0$  Hz, H-7), 6.07 (1H, *d*,  $J = 10.2$  Hz, H-4a), 5.96 (1H, *dd*,  $J = 10.2; 4.5$  Hz, H-4), 4.51 (1H, *sa*, H-1), 4.09 (1H, *m*, H-3), 4.02 (1H, *d*,  $J = 15.0$  Hz, H-6 $\beta$ ), 3.67 (1H, *d*,  $J = 15.0$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.32 (1H, *t*,  $J = 13.5$  Hz, H-12 $\beta$ ), 3.07 (1H, *da*,  $J = 13.5$  Hz, H-12 $\alpha$ ), 2.55 (1H, *ddd*,  $J = 16.0; 2.5; 2.0$  Hz, H-2 $\beta$ ), 2.37 (3H, *s*, NMe), 2.00 (2H, *m*, H-11), 1.75 (1H, *dda*,  $J = 16.0; 3.0$  Hz, H-2 $\alpha$ ) (Figura 17). RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  145.07 (*s*, C-9), 141.30 (*s*, C-10), 132.58 (*s*, C-10a), 127.16 (*d*, C-4a), 126.97 (*d*, C-4), 126.39 (*s*, C-6a), 122.48 (*d*, C-7), 116.11 (*d*, C-8), 88.04 (*d*, C-1), 61.92 (*d*, C-3), 60.03 (*t*, C-6), 53.33 (*t*, C-12), 48.29 (*s*, C-10b), 41.02 (*q*, NMe), 33.03 (*t*, C-11), 29.95 (*t*, C-2) (Figura 18). En base a estos datos espectroscópicos, el compuesto (3) se identificó como sanguinina ( $C_{16}H_{19}NO_3$ ) (Kobayashi *et al.*, 1976; Capo & Saa, 1989; Kobayashi *et al.*, 1991; Kihara *et al.*, 1994).

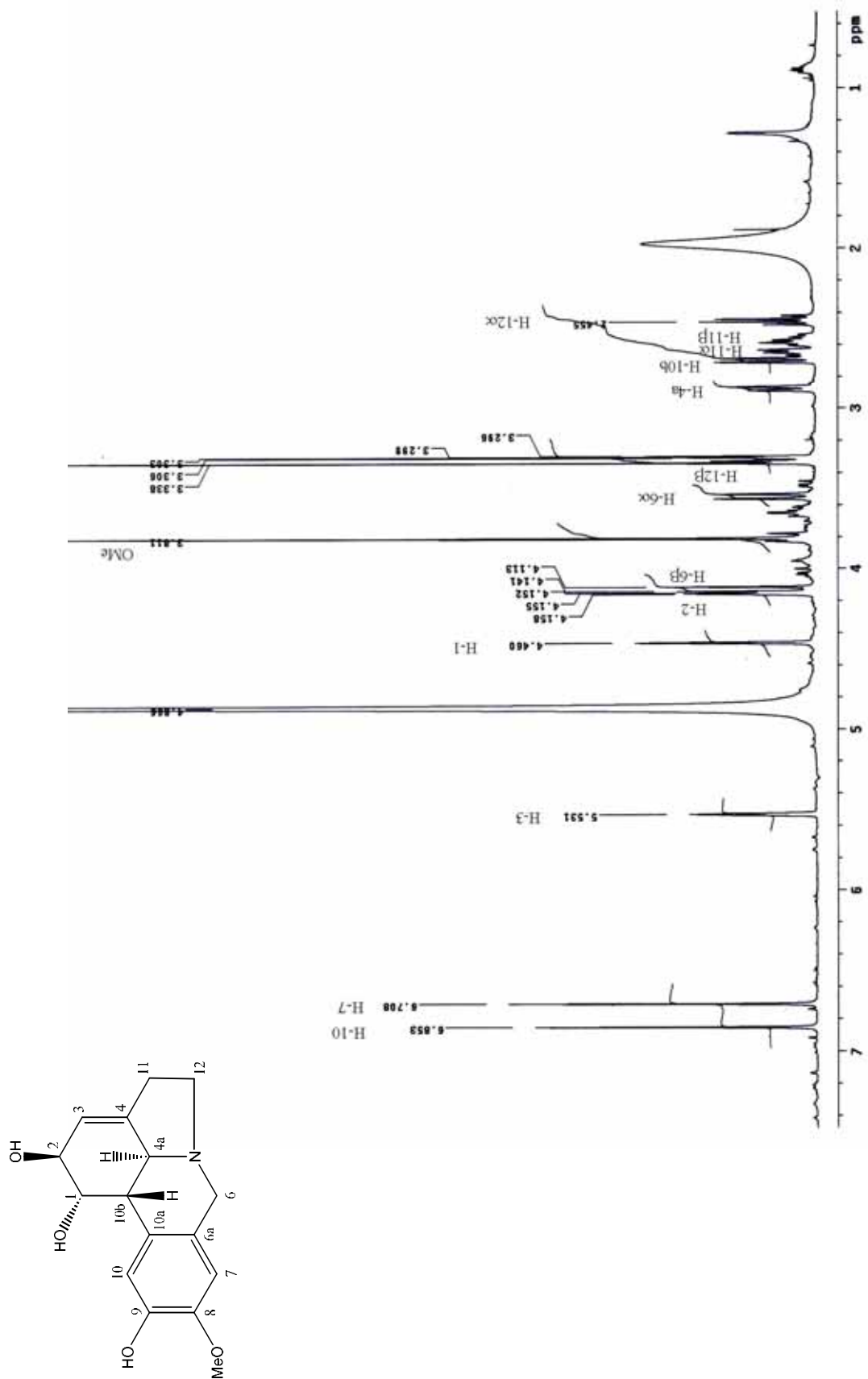


Figura 15. Pseudolicorina (2). Espectro RMN  $^1\text{H}$ .



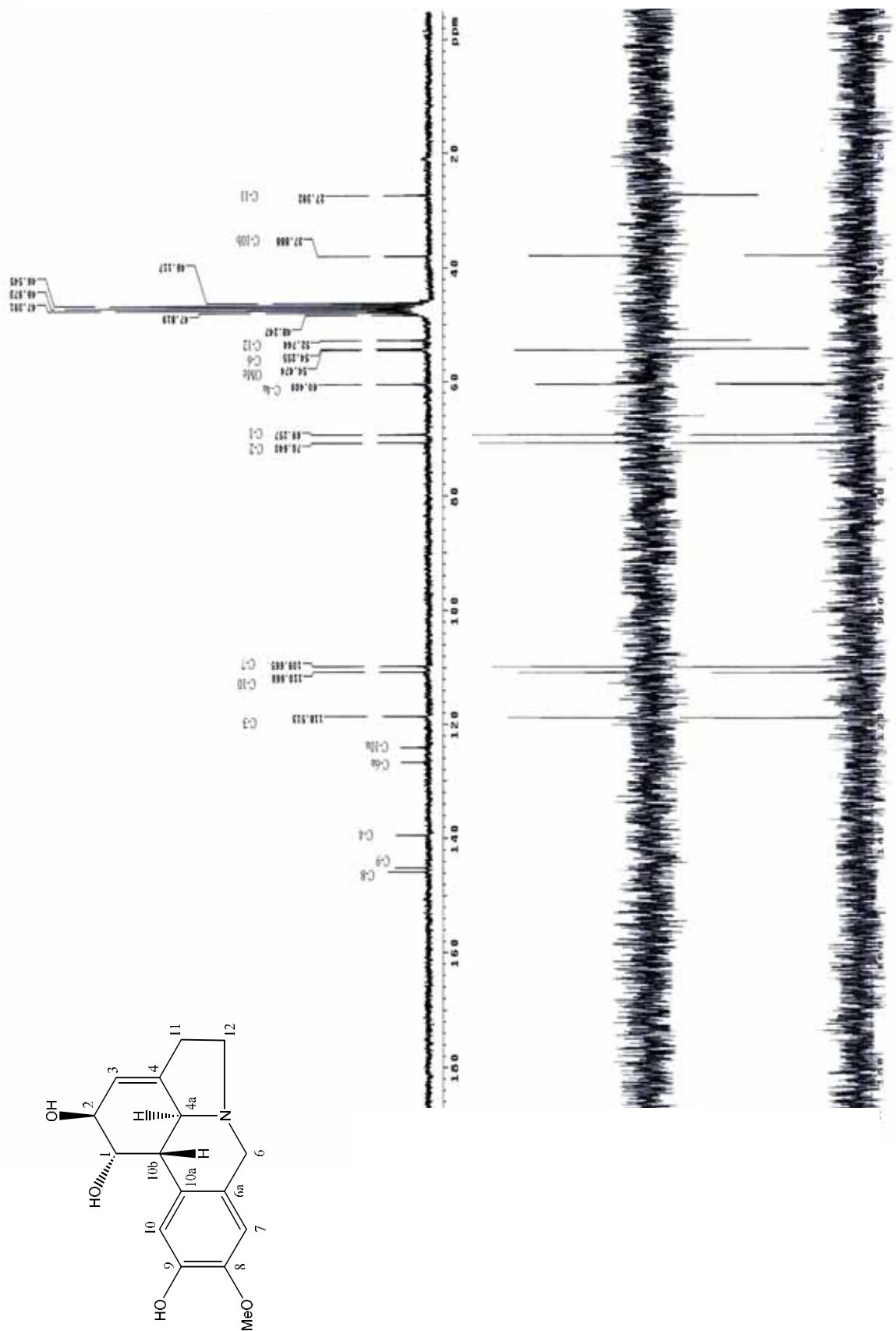


Figura 16. Pseudolicorina (2). Espectro RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT.

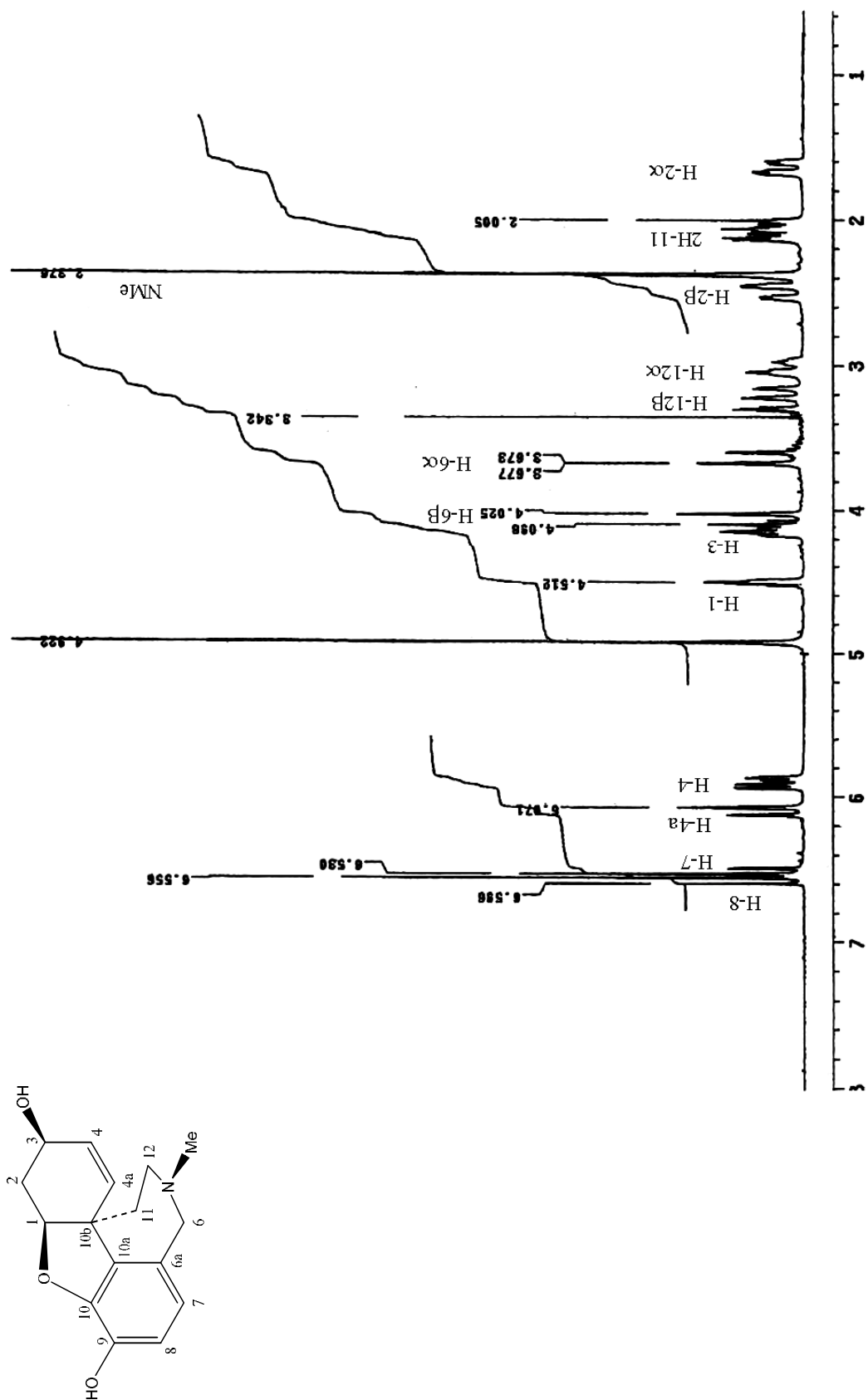


Figura 17. Sanguinina (3). Espectro RMN  $^1\text{H}$ .

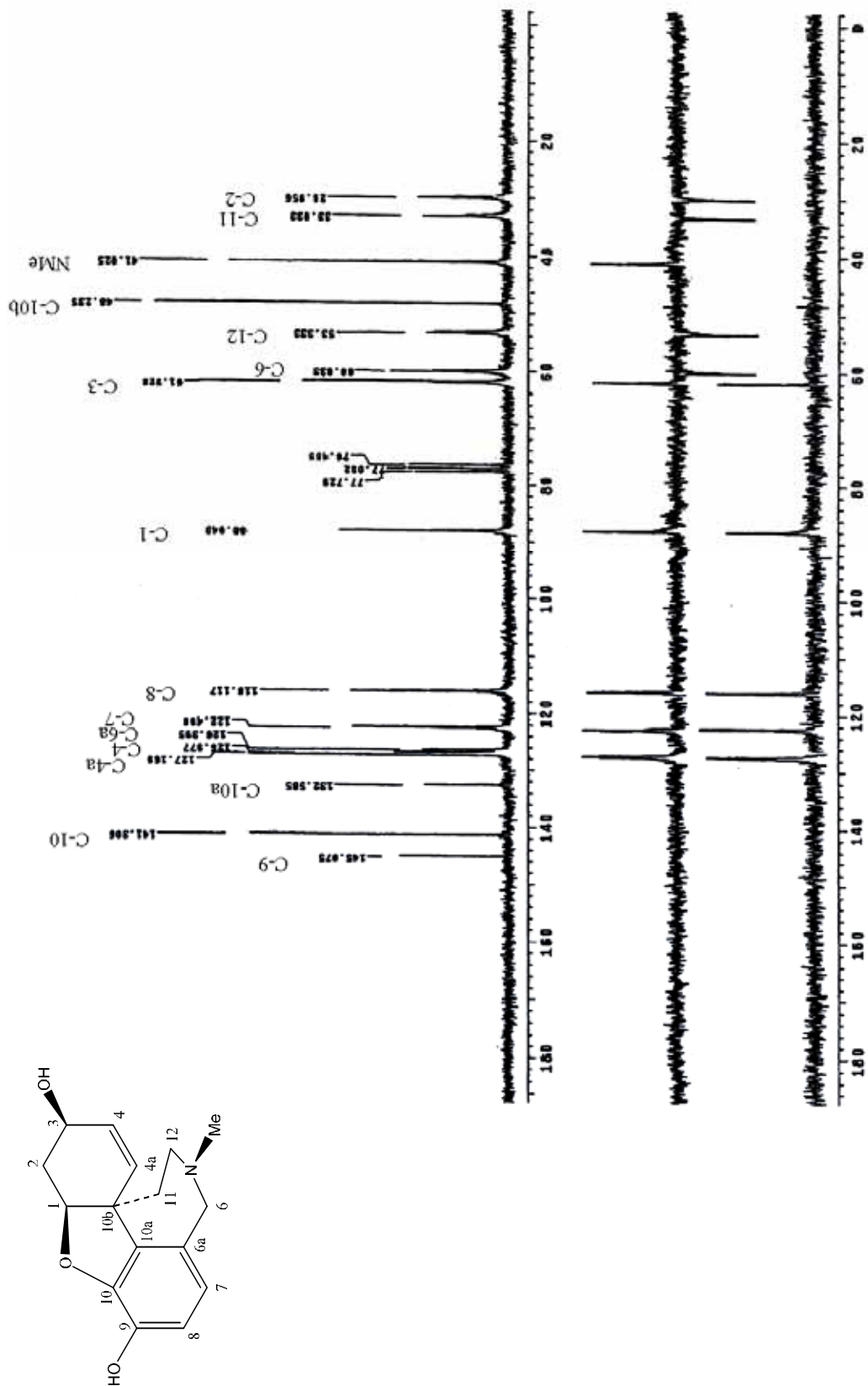


Figura 18. Sanguinina (3). Espectro RMN <sup>13</sup>C, DEPT.

**2.3.1.4. Galantamina (4).** El compuesto (4),  $C_{17}H_{21}NO_3$ , se identificó como galantamina (Bastida *et al.*, 1987). Tanto los datos físicos como espectroscópicos del compuesto aislado, están en concordancia con los datos reportados.  $mp$  124-126°C.  $[\alpha]_D^{20}$  -115° (EtOH;  $c$  0.50).  $IR_{v_{max}}$   $cm^{-1}$ : 3.270, 1.625, 1.510, 1.440, 1.280, 1.040. EM 70 eV  $m/z$  (int rel.): 287  $[M]^+$  (100), 286  $[M-H]^+$  (98), 244 (53), 230 (33), 216 (97), 174 (90), 44 (83). RMN  $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  6.66 (1H,  $d$ ,  $J = 8.2$  Hz, H-8), 6.64 (1H,  $d$ ,  $J = 8.2$  Hz, H-7), 6.04 (1H,  $dd$ ,  $J = 10.3$ ; 1.0 Hz, H-4a), 6.00 (1H,  $ddd$ ,  $J = 10.3$ ; 4.5; 1.4 Hz, H-4), 4.61 (1H,  $m$ , H-1), 4.13 (1H,  $m$ , H-3), 4.11 (1H,  $d$ ,  $J = 15.2$  Hz, H-6 $\beta$ ), 3.83 (3H,  $s$ , 9-OMe), 3.72 (1H,  $d$ ,  $J = 15.2$ , H-6 $\alpha$ ), 3.30 (1H,  $ddd$ ,  $J = 14.4$ ; 12.2; 2.1 Hz, H-12 $\beta$ ), 3.10 (1H,  $dt$ ,  $J = 14.4$ ; 3.5 Hz, H-12 $\alpha$ ), 2.70 (1H,  $ddt$ ,  $J = 15.7$ ; 3.7; 1.4 Hz, H-2 $\beta$ ), 2.40 (3H,  $s$ , NMe), 2.04 (1H,  $ddd$ ,  $J = 13.5$ , 12.2; 3.5 Hz, H-11 $\alpha$ ), 2.00 (1H,  $ddd$ ,  $J = 15.7$ ; 5.0; 2.5 Hz, H-2 $\alpha$ ), 1.60 (1H,  $ddd$ ,  $J = 13.5$ , 3.5; 2.2 Hz, H-11 $\beta$ ) (Figura 19). RMN  $^{13}C$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  145.52 ( $s$ , C-9), 144.06 ( $s$ , C-10), 132.87 ( $s$ , C-10a), 128.54 ( $s$ , C-6a), 127.62 ( $d$ , C-4a), 126.68 ( $d$ , C-4), 122.18 ( $d$ , C-7), 111.02 ( $d$ , C-8), 88.61 ( $d$ , C-1), 61.06 ( $d$ , C-3), 60.13 ( $t$ , C-6), 55.79 ( $q$ , 9-OMe), 53.41 ( $t$ , C-12), 48.01 ( $s$ , C-10b), 41.42 ( $q$ , NMe), 33.38 ( $t$ , C-11), 29.91 ( $t$ , C-2) (Figura 20).

**2.3.1.5. Epinorgalantamina (5).** El compuesto (5),  $C_{16}H_{19}NO_3$ , se identificó como epinorgalantamina por comparación de sus datos físicos y espectrales con los reportados para este compuesto en la literatura (Bastida *et al.*, 1993).  $mp$  150-152°C.  $[\alpha]_D^{25}$  -62° ( $CHCl_3$ ;  $c$  0.73).  $IR_{v_{max}}$   $cm^{-1}$ : 3.550, 2.930, 1.630, 1.507, 1.270, 1.058. EM 70 eV  $m/z$  (int rel.): 273  $[M]^+$  (71), 272  $[M-H]^+$  (57), 230 (27), 202 (17), 167 (10), 149 (22), 81 (38), 69 (80), 57 (45), 55 (43), 33 (76), 41 (100). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  6.72 (1H,  $d$ ,  $J = 8.0$  Hz, H-7), 6.64 (1H,  $d$ ,  $J = 8.0$  Hz, H-8), 6.13 (1H,  $d$ ,  $J = 10.4$  Hz, H-4a), 5.92 (1H,  $dd$ ,  $J = 10.4$ ; 4.8 Hz, H-4), 4.54 (1H,  $br s$ , H-1), 4.15 (1H,  $m$ , H-3), 4.06 (1H,  $d$ ,  $J = 15.2$  Hz, H-6 $\beta$ ), 3.90 (1H,  $d$ ,  $J = 15.2$  Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.79 (3H,  $s$ , 9-OMe), 3.26 (2H,  $m$ , H-12), 2.50 (1H,  $dd$ ,  $J = 15.6$ ; 2.0 Hz, H-2 $\beta$ ), 2.12 (1H,  $ddd$ ,  $J = 15.8$ , 4.8, 2.8 Hz, H-2 $\alpha$ ), 1.85 (2H,  $m$ , H-11) (Figura 21). RMN  $^{13}C$  (100 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  146.10 ( $s$ , C-9), 143.76 ( $s$ , C-10), 133.07 ( $s$ , C-10a), 132.90 ( $s$ , C-6a), 127.52 ( $d$ , C-4), 126.94 ( $d$ , C-4a), 120.41 ( $d$ , C-7), 110.72 ( $d$ , C-8), 88.19 ( $d$ , C-1), 61.45 ( $d$ , C-3), 55.47 ( $q$ , 9-OMe), 53.42 ( $t$ , C-6), 48.33 ( $s$ , C-10b), 46.59 ( $t$ , C-12), 39.98 ( $t$ , C-11), 29.64 ( $t$ , C-2) (Figura 22).

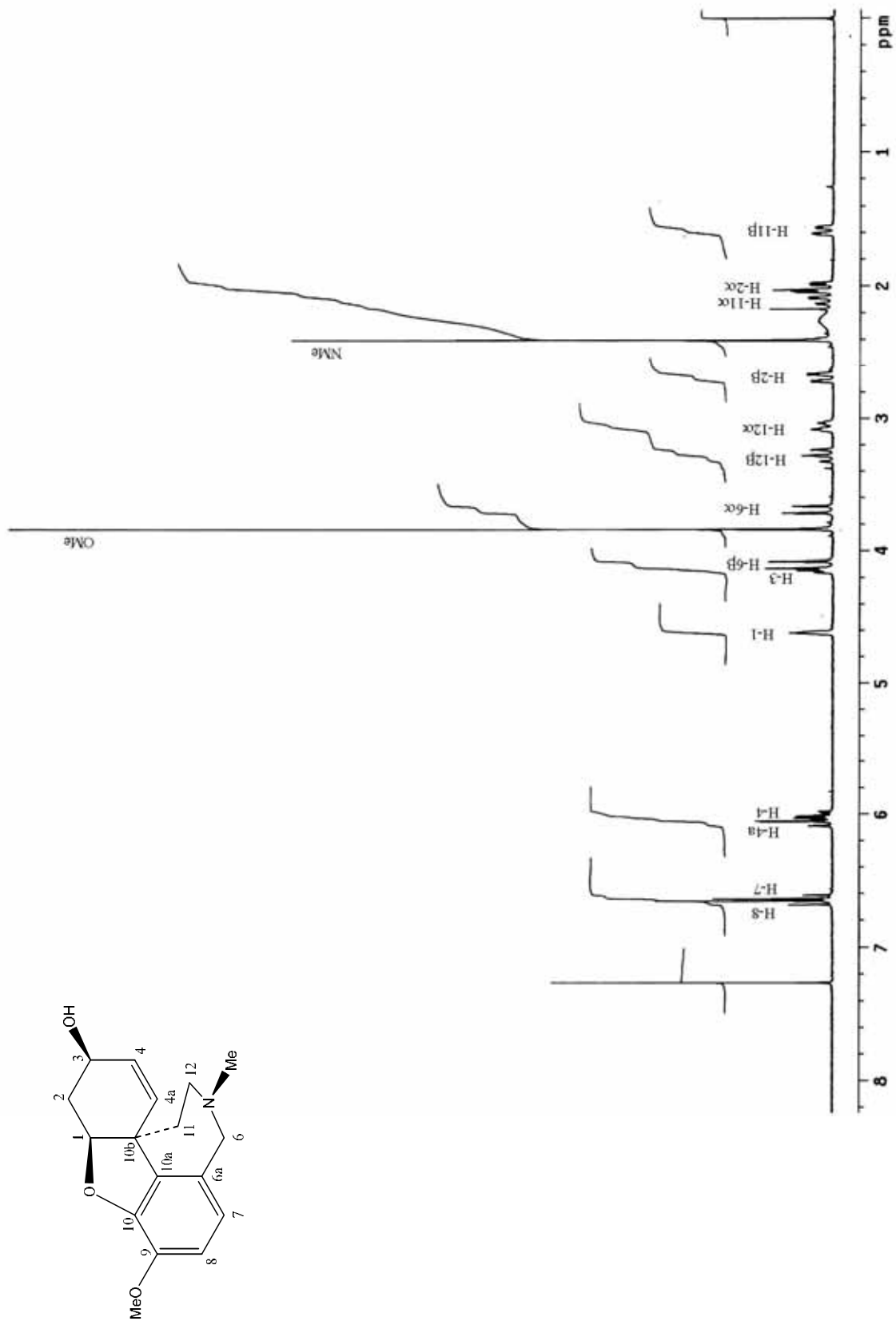


Figura 19. Galantamina (4). Espectro RMN  $^1\text{H}$ .

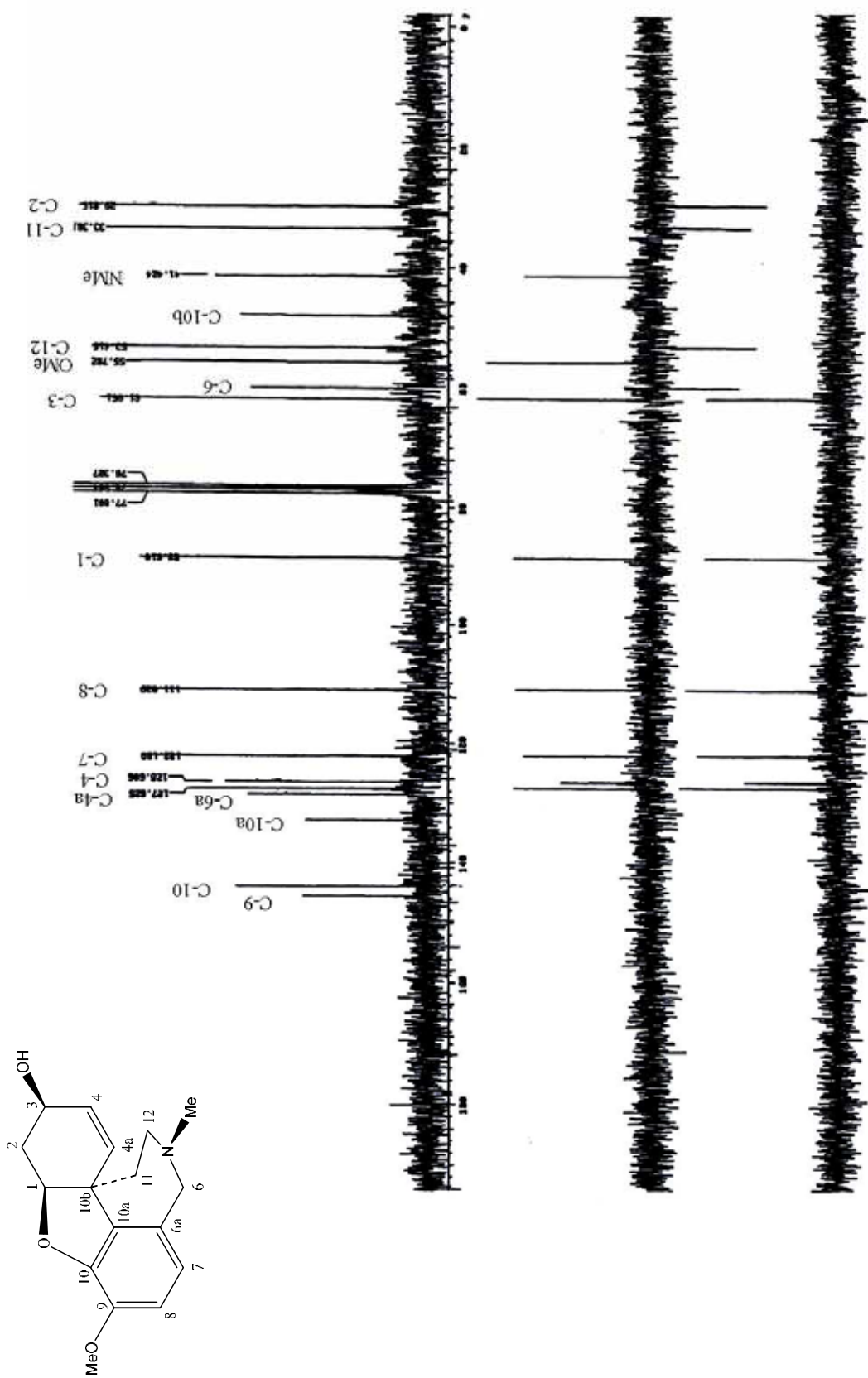


Figura 20. Galantamina (4). Espectro RMN <sup>13</sup>C, DEPT.

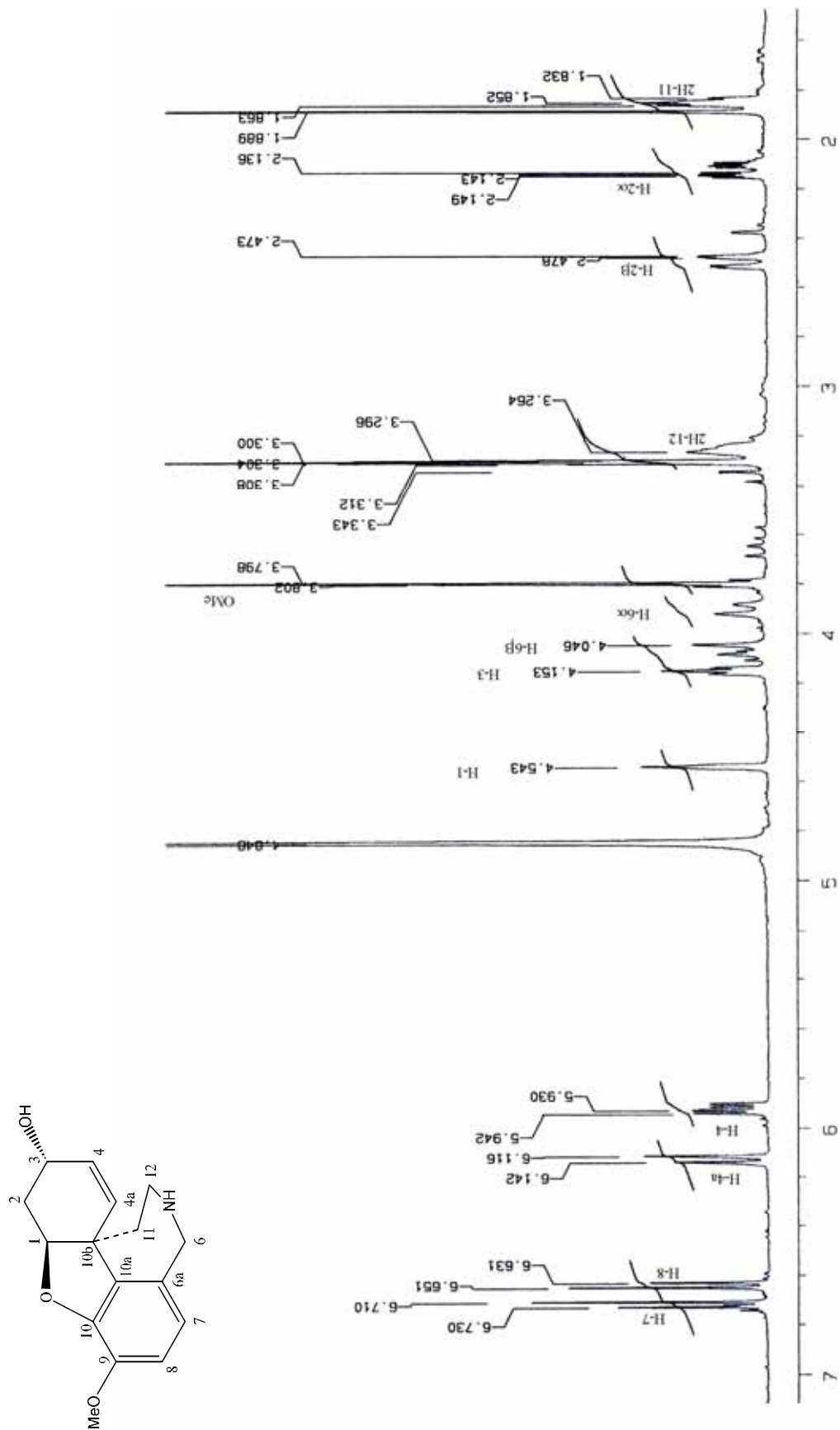


Figura 21. Epinorgalantamina (5). Espectro RMN  $^1\text{H}$ .

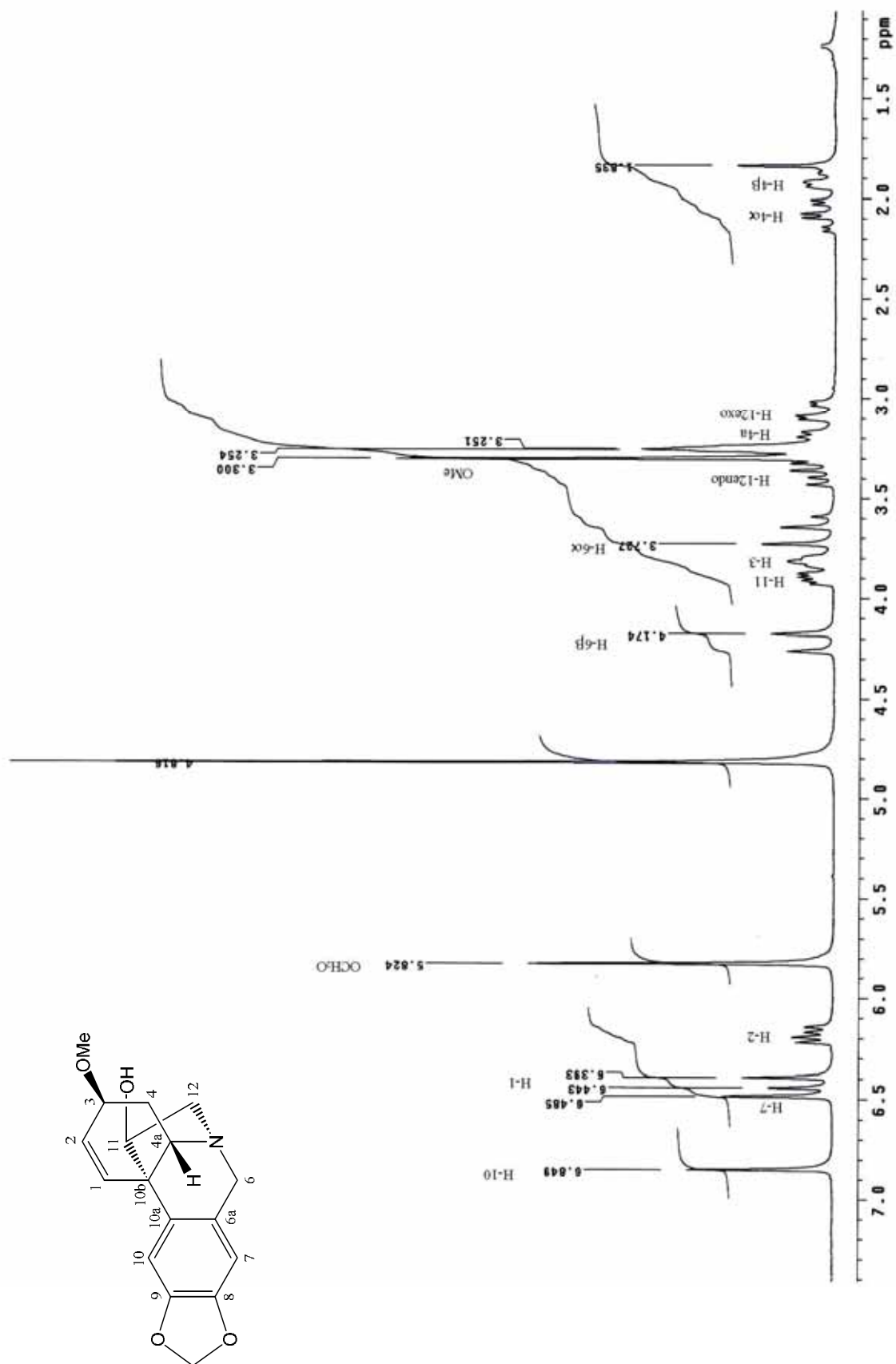


**Figura 22.** Epinorgalantamina (5). Espectro RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT.



**2.3.1.6. Hemantamina (6).** El compuesto fue aislado como un sólido cristalino anaranjado, pf 195-198°C.  $[\alpha]_D^{20} + 38^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>; *c* 0.45). El EM mostró un pico base a *m/z* 301 correspondiente con la fórmula C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>. CD  $[\theta]_{284} +1.624$ , CD  $[\theta]_{259} -3.436$ . IR<sub>vmax</sub> cm<sup>-1</sup>: 3.400, 2.960, 1.470, 1.320, 1.225, 1.025. RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  6.84 (1H, *s*, H-10), 6.48 (1H, *s*, H-7), 6.42 (1H, *d*, *J* = 15.0 Hz, H-1), 6.18 (1H, *dd*, *J* = 15.0; 5.0 Hz, H-2), 5.82 (2H, *s*, OCH<sub>2</sub>O), 4.17 (1H, *d*, *J* = 16.8 Hz, H-6 $\beta$ ), 3.90 (1H, *dd*, *J* = 6.7; 3.3 Hz, H-11), 3.82 (1H, *m*, H-3), 3.72 (1H, *d*, *J* = 16.8 Hz, H-6 $\alpha$ ), 3.38 (1H, *dd*, *J* = 13.9, 6.7 Hz, H-12*endo*), 3.30 (3H, *s*, 3-OMe), 3.20 (1H, *dd*, *J* = 13.6, 4.6 Hz, H-4a), 3.10 (1H, *dd*, *J* = 13.9, 3.3 Hz, H-12*exo*), 2.08 (1H, *ddd*, *J* = 13.7, 13.6; 4.2 Hz, H-4 $\alpha$ ), 1.90 (1H, *m*, H-4 $\beta$ ) (Figura 23). RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  147.00 (*s*, C-9), 146.92 (*s*, C-8), 135.01 (*s*, C-10a), 132.36 (*d*, C-1), 126.82 (*d*, C-2), 126.04 (*s*, C-6a), 106.88 (*d*, C-7), 103.27 (*d*, C-10), 100.82 (*t*, OCH<sub>2</sub>O), 79.76 (*d*, C-11), 72.40 (*d*, C-3), 62.83 (*t*, C-6), 62.49 (*d*, C-4a), 60.79 (*t*, C-12), 56.06 (*q*, 3-OMe), 50.06 (*s*, C-10b), 27.76 (*t*, C-4) (Figura 24). En base a estos datos espectroscópicos, el compuesto (6) se identificó como hemantamina (Frahm *et al.*, 1985; Bastida *et al.*, 1987, Pabuçcuoglu *et al.*, 1989; Bastida *et al.*, 1998).

**2.3.1.7. Ungeremina (7).** El compuesto (7) fue aislado como un polvo de color amarillo, pf 208°C. El EM mostró un pico base a *m/z* 265 correspondiente con la fórmula C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>. Otros fragmentos corresponden a 266 [M+H]<sup>+</sup> (20), 264 (100), 236 (10), 207 (12), 206 (18). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  8.85 (1H, *s*, H-6), 7.86 (1H, *s*, H-10), 7.49 (1H, *s*, H-7), 7.15 (1H, *d*, *J* = 1.2 Hz, H-1), 7.06 (1H, *d*, *J* = 1.2 Hz, H-3), 6.28 (2H, *s*, OCH<sub>2</sub>O), 5.07 (2H, *dd*, *J* = 7.2; 6.8 Hz, H-12), 3.60 (2H, *dd*, *J* = 7.2; 6.8 Hz, H-11) (Figura 25). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  163.82 (*s*, C-2), 158.34 (*s*, C-8), 152.75 (*s*, C-9), 143.07 (*d*, C-6), 141.33 (*s*, C-4), 134.28 (*s*, C-4a), 132.80 (*s*, C-10b), 127.98 (*s*, C-6a), 125.75 (*s*, C-10a), 119.11 (*d*, C-3), 112.29 (*d*, C-7), 109.15 (*d*, C-10), 106.38 (*t*, OCH<sub>2</sub>O), 105.35 (*d*, C-1), 58.03 (*t*, C-12), 29.38 (*t*, C-11) (Figura 26). El compuesto (7) se identificó como ungeremina (Ghosal *et al.*, 1986a, Abou-Donia *et al.*, 1992). Tanto los datos físicos como espectroscópicos del compuesto aislado, están en concordancia con los datos reportados.



**Figura 23.** Hemantamina (6). Espectro RMN  $^1\text{H}$ .

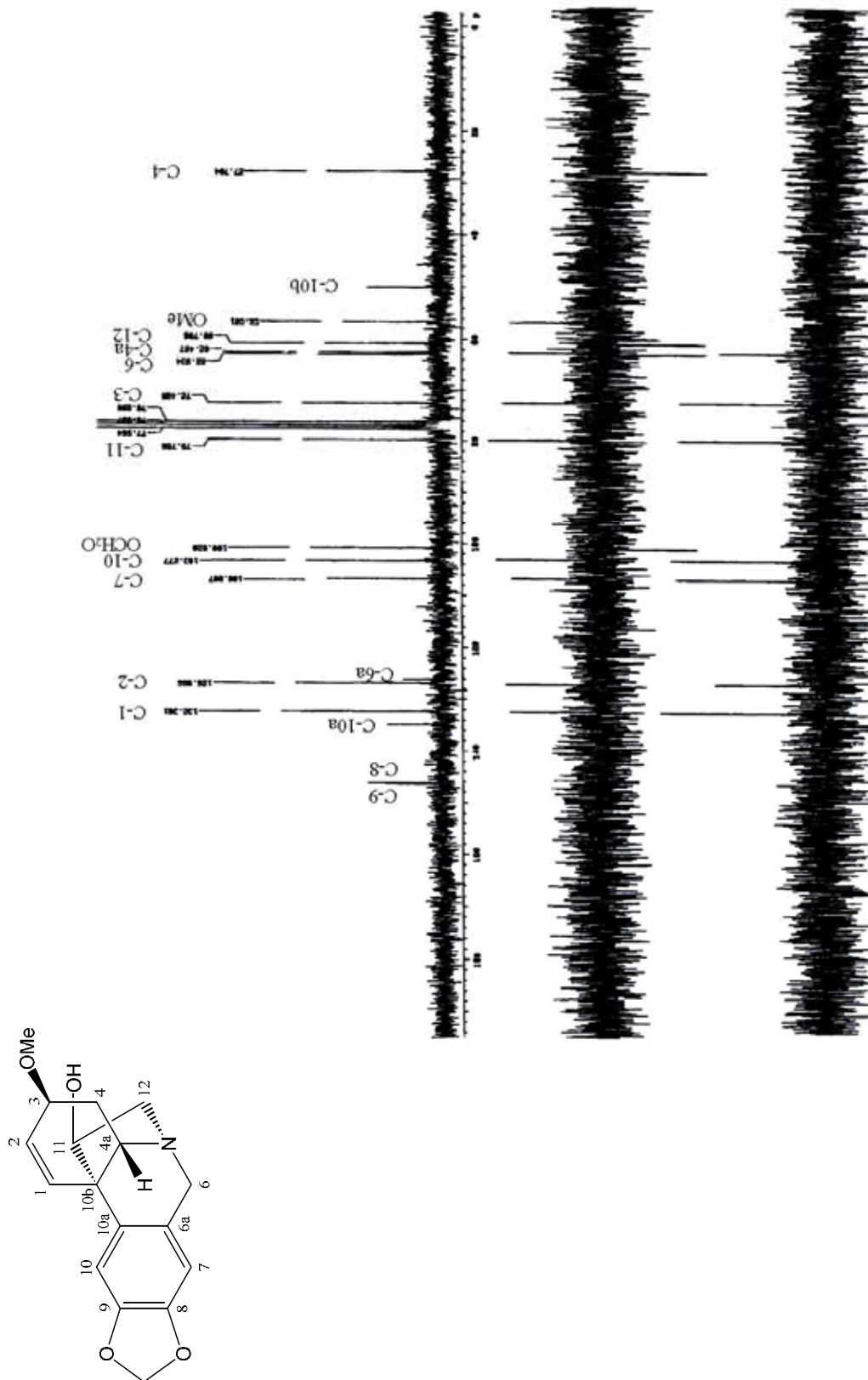
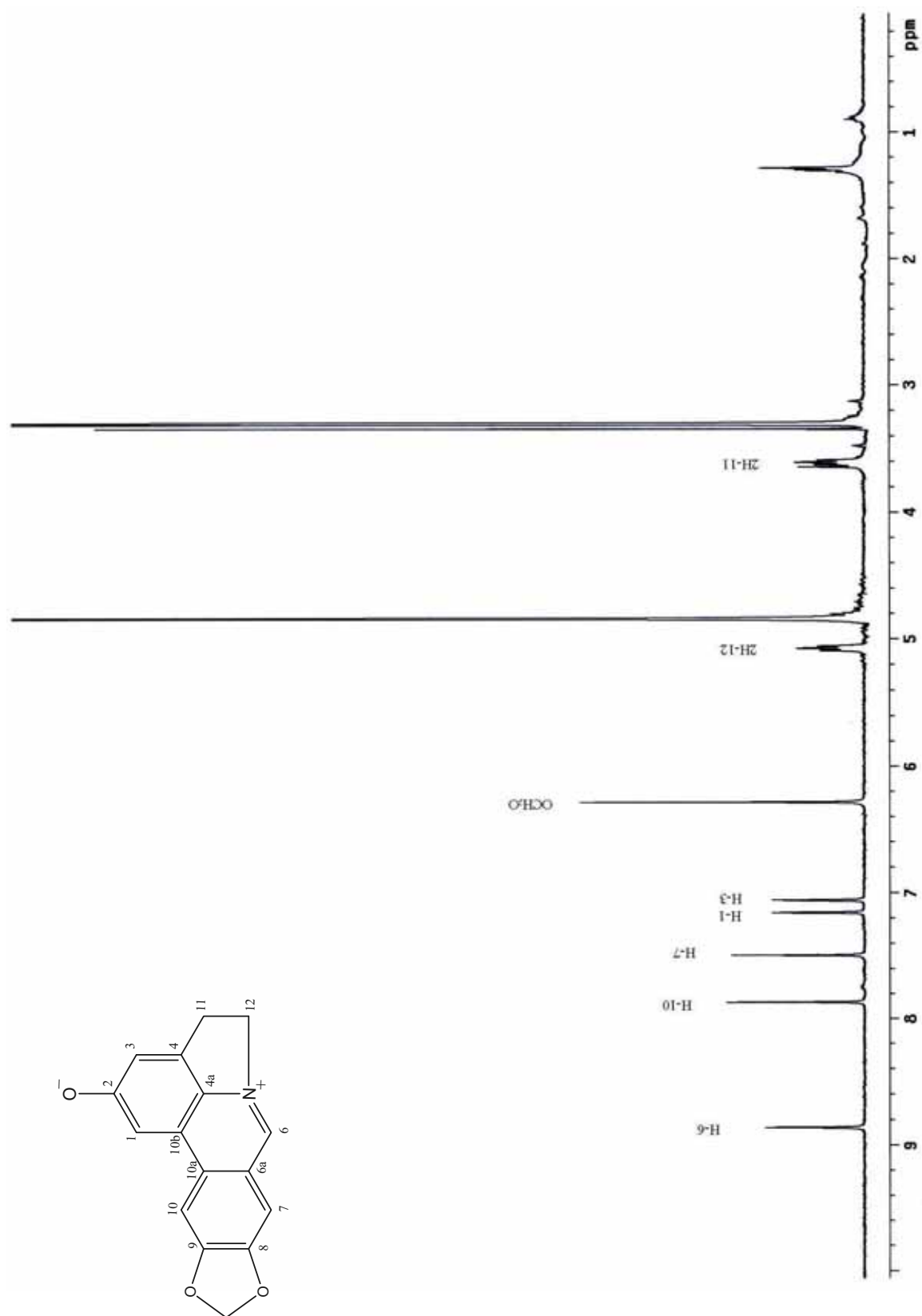


Figura 24. Hemantamina (6). Espectro RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT.



**Figura 25.** Ungeremina (7). Espectro RMN  $^1\text{H}$ .

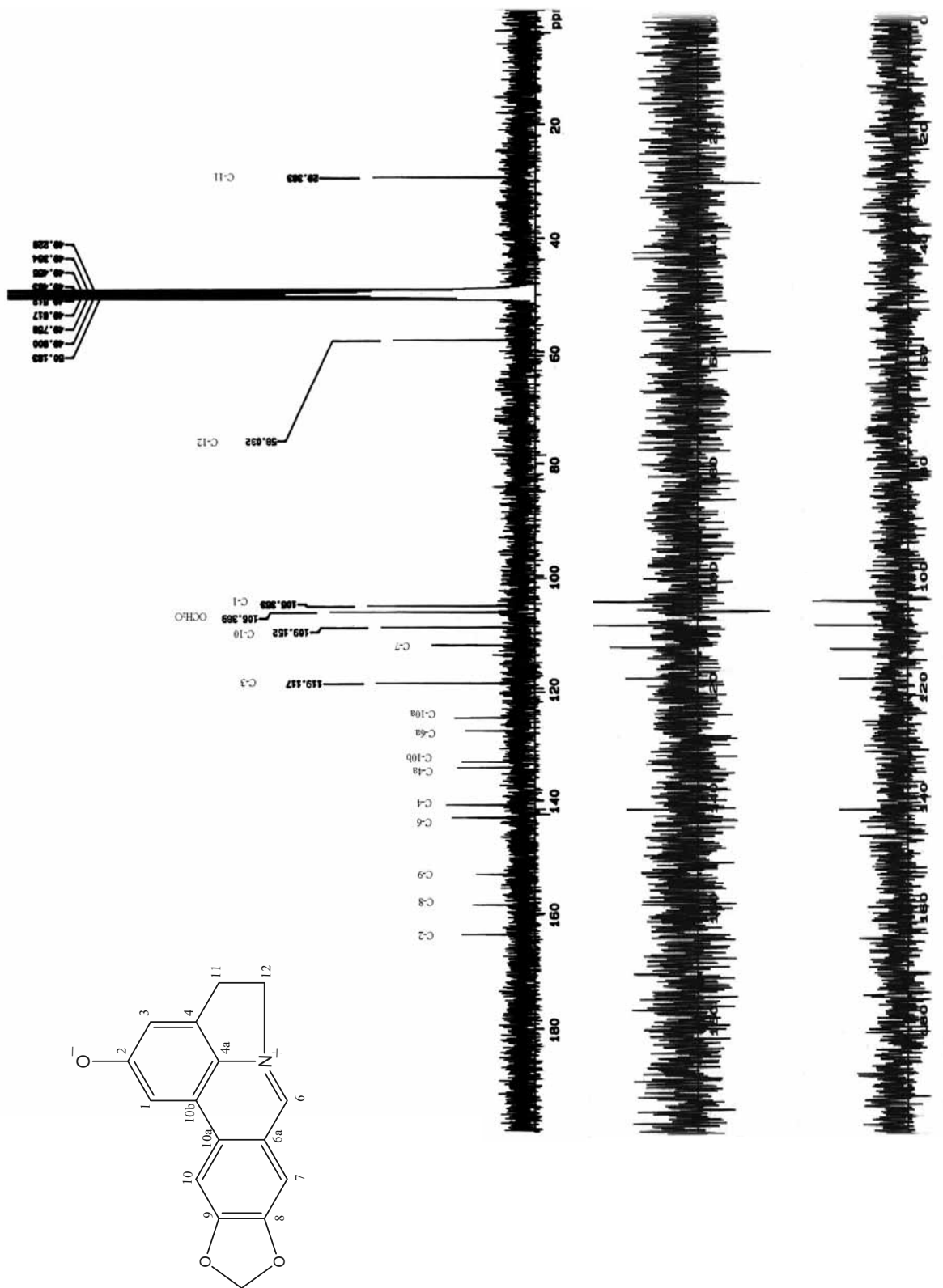


Figura 26. Ungeremina (7). Espectro RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT.

**2.3.1.8. Zefbetaina (8).** El compuesto fue cristalizado a partir de EtOH como un polvo de color café claro, pf 208°C. IR $\nu_{\max}$  cm $^{-1}$ : 1.618, 1.600, 1.510, 938. EM 70 eV  $m/z$  (int rel.): 295 [M] $^{+}$  (100), 294 [M-H] $^{+}$  (84), 278 (12), 267 (17), 266 (15), 250 (14), 206 (7), 205 (7). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CD $_3$ OD):  $\delta$  8.46 (1H, *s*, H-6), 7.32 (1H, *s*, H-10), 7.16 (1H, *s*, H-7), 7.13 (1H, *d*,  $J = 1.6$  Hz, H-1), 6.94 (1H, *d*,  $J = 1.6$  Hz, H-3), 4.82 (2H, *m*, H-12), 3.90 (3H, *s*, 8-OMe), 3.50 (2H, *t*,  $J = 7.2$  Hz, H-11) (Figura 27). RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz, CD $_3$ OD):  $\delta$  163.87 (*s*, C-2), 158.62 (*s*, C-8), 153.96 (*s*, C-9), 142.86 (*d*, C-6), 137.48 (*s*, C-4), 130.75 (*s*, C-4a), 130.23 (*s*, C-10b), 127.93 (*s*, C-6a), 124.54 (*s*, C-10a), 119.24 (*d*, C-3), 109.15 (*d*, C-7), 106.38 (*d*, C-10), 103.13 (*d*, C-1), 58.03 (*t*, C-12), 56.09 (*q*, OMe), 29.36 (*t*, C-11) (Figura 28). En base a estos datos espectroscópicos, el compuesto (8) se identificó como zefbetaina (Ghosal *et al.*, 1986b, Abou-Donia *et al.*, 1992).

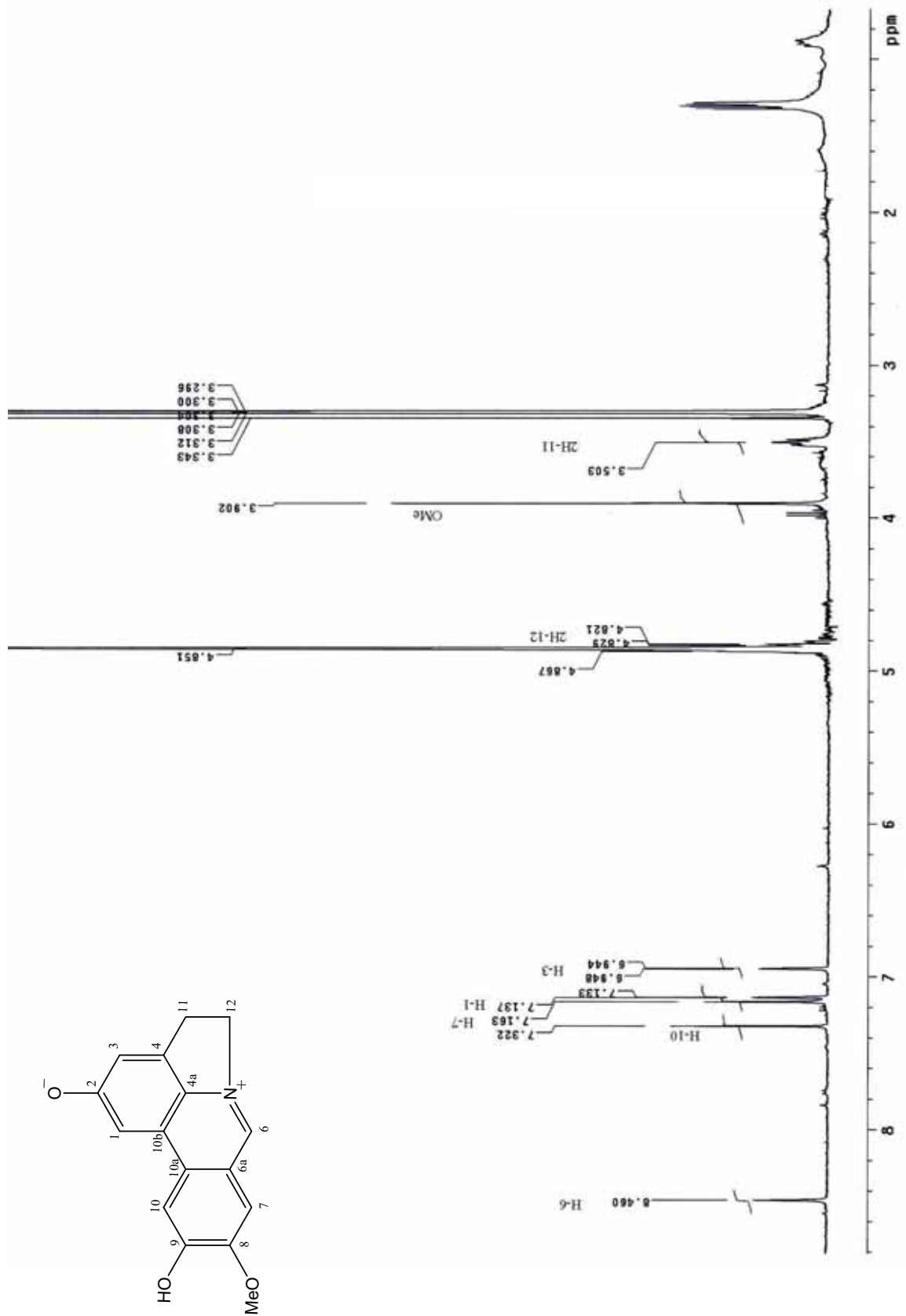
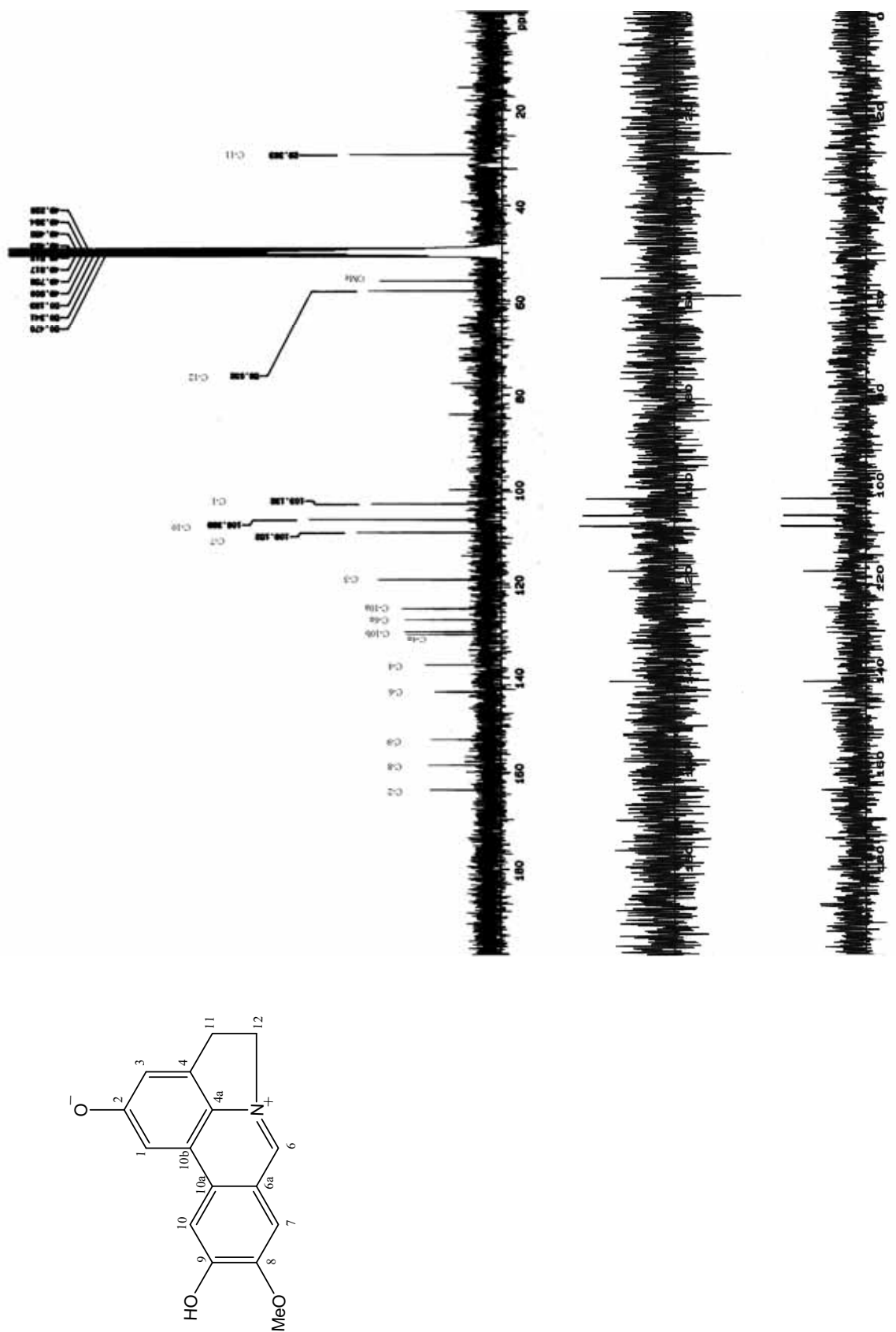
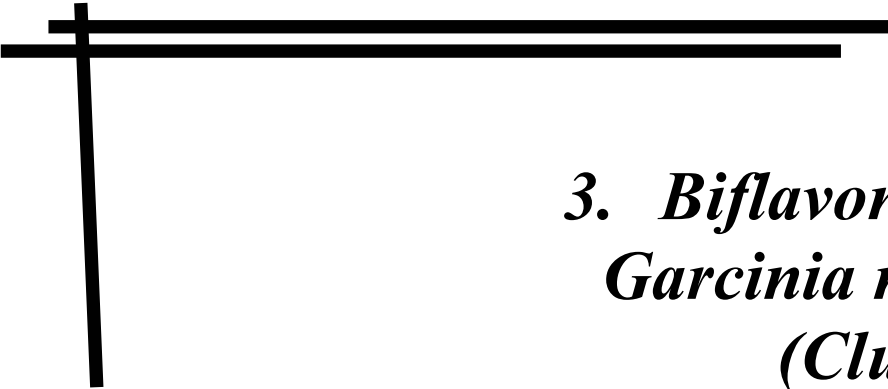


Figura 27. Zefbetaina (8). Espectro RMN  $^1\text{H}$ .



**Figura 28.** Zefbetaina (8). Espectro RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT.





***3. Biflavonoides de  
Garcinia madruno  
(Clusiaceae)***



### 3.1. Introducción

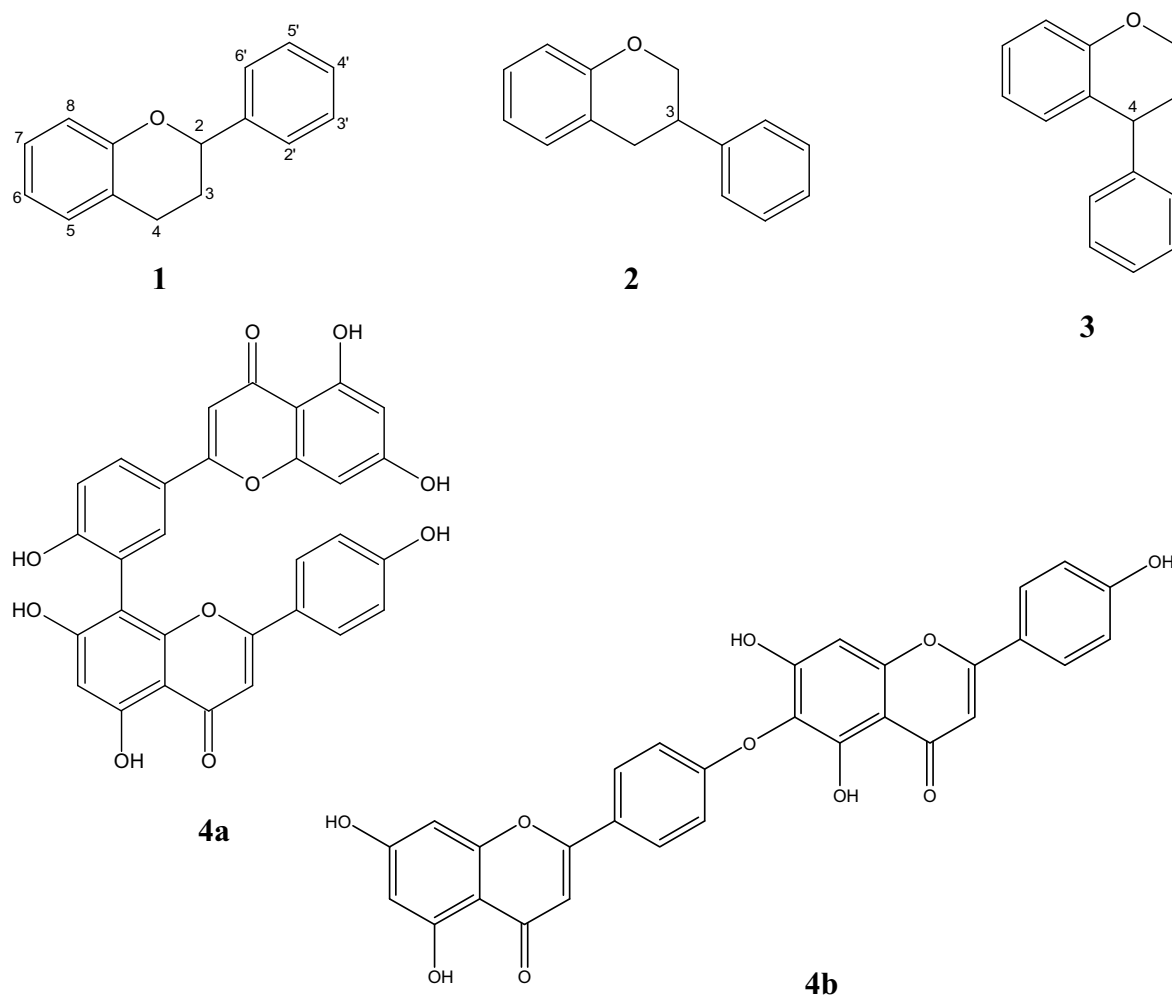
Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, tales como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otras. El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Martínez-Flórez *et al.*, 2002).

Estos compuestos contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, lo cual les confiere una gran capacidad antioxidante y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición. En las plantas, los flavonoides se encuentran como *O* o *C*-glucósidos. Los *O*-glucósidos presentan sustituciones a nivel del azúcar, las cuales están unidas a los grupos hidroxilo de las agliconas, generalmente, los ubicados en posición C-3 o C-7, mientras que en los *C*-glucósidos, los grupos del azúcar están unidos a carbonos de la aglicona, usualmente C-6 o C-8. Los carbohidratos más comunes son ramnosa, glucosa, galactosa y arabinosa. Por todo ello, estos compuestos presentan una gran variedad estructural. De hecho, no debería sorprender el gran número de flavonoides presentes en la naturaleza. Son conocidos alrededor de 6.500 flavonoides, entre los cuales se incluyen más de 3.000 flavonas y aproximadamente 700 isoflavonas (Rijke *et al.*, 2006). La notable diversidad estructural y funcional de los flavonoides presentes en las plantas, ha proporcionado las bases para la investigación en áreas que van desde la genética y la bioquímica a la ecología, la evolución y la salud humana. Además, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías. Es así como son reconocidas sus actividades antialérgicas, antiinflamatorias, antivíricas, anticancerosas y antioxidantes. Igualmente, afectan a una gran cantidad de enzimas y proteínas asociadas a la fotofosforilación (Winkel-Shirley, 2006).

#### 3.1.1. Clasificación de los flavonoides

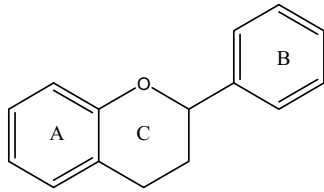
El término “flavonoide” se utiliza normalmente para describir una amplia colección de productos naturales que presentan una estructura difenilpropano (sistema C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), formado

por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por una unidad C<sub>3</sub>, la cual puede estar ciclada formando un *O*-heterociclo (anillo C). La mayoría de los flavonoides presentan, por tanto, una funcionalidad fenilbenzopirano. Dependiendo de la unión del anillo aromático con la fragmento benzopirano (cromano), este grupo de productos naturales puede dividirse en tres tipos fundamentales: Los flavonoides propiamente dichos (2-fenilbenzopiranos) (**1**), los isoflavonoides (3-fenilbenzopiranos) (**2**), y los neoflavonoides (4-fenilbenzopiranos) (**3**) (Marais *et al.*, 2006). Estos, a su vez, pueden presentarse como monómeros, dímeros y oligómeros. Los biflavonoides (**4**), que se presentan de forma natural como dímeros de flavonoides, pueden unirse por enlaces de tipo C-C o C-O-C (**4a** y **4b**, respectivamente) (Figura 29) (Yamaguchi *et al.*, 2005). Los polímeros (oligómeros) más importantes constituyen el grupo de los taninos condensados. Todos estos grupos de compuestos comparten un precursor común, una chalcona; por consiguiente, están biogénica y estructuralmente relacionados (Marais *et al.*, 2006).

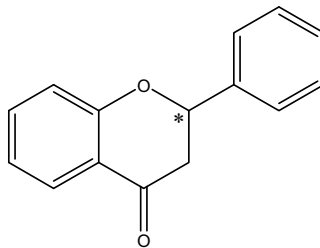


**Figura 29.** Tipos fundamentales de flavonoides y biflavonoides.

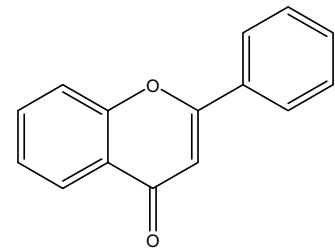
**3.1.1.1. 2-Fenilbenzopiranos:** Según el grado de oxidación y de saturación de la fracción C<sub>3</sub> (anillo C), los flavonoides se clasifican en diferentes grupos, los más significativos de los cuales son:



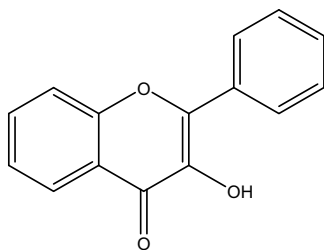
Flavanos



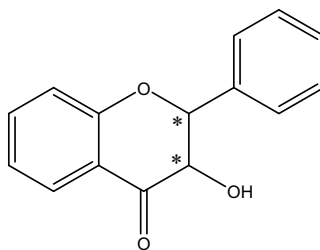
Flavanonas



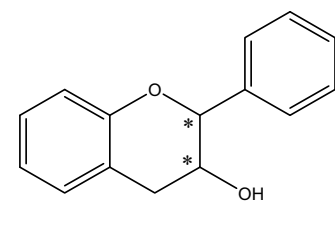
Flavonas



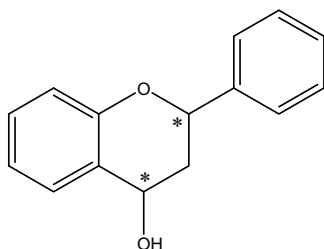
Flavonoles



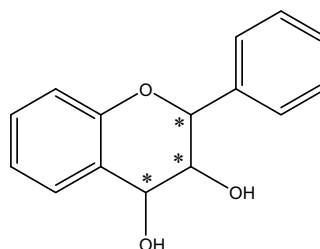
2,3-dihidroflavonoles



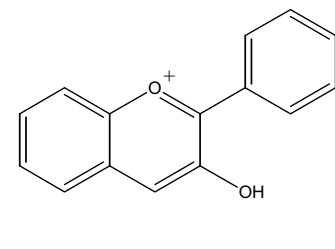
3-hidroxi flavanos



4-hidroxi flavanos



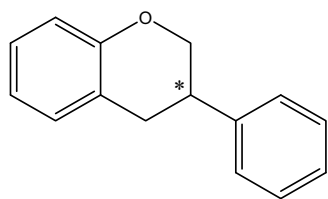
3,4-dihidroxi flavanos



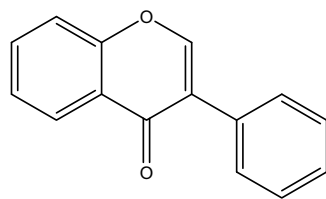
Antocianidinas

\* Estereocentros

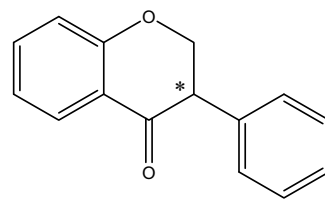
**3.1.1.2. Isoflavonoides:** Los isoflavonoides poseen un esqueleto 3-fenilcromano que se origina a partir de un precursor 2-fenilcromano por migración de la fracción fenólica desde la posición 2 a la posición 3. A pesar de su limitada distribución en el reino vegetal, los isoflavonoides son notablemente diversos, lo cual se deriva no solo en el número y complejidad de los sustituyentes, sino también de los diferentes niveles de oxidación y en la presencia de anillos heterocíclicos adicionales. Los isoflavonoides más significativos (Veitch, 2007) pueden dividirse en:



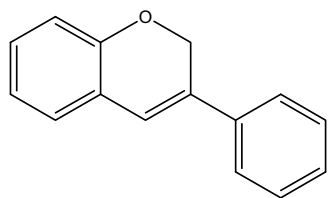
Isoflavanos



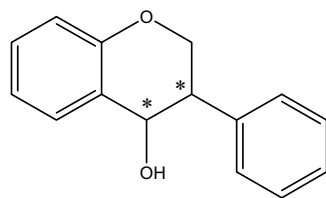
Isoflavonas



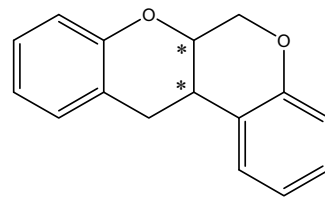
Isoflavanonas



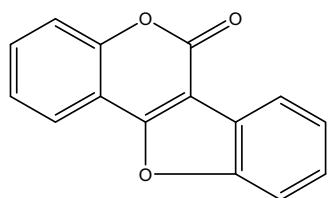
Isoflav-3-enos



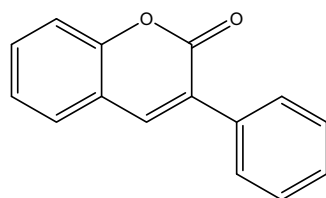
4-hidroxiisoflavanos



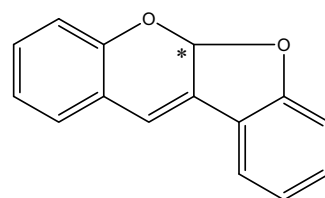
Rotenoides



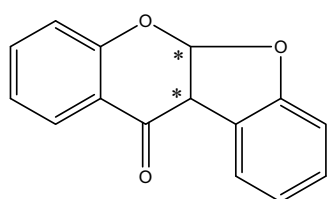
Cumestanos



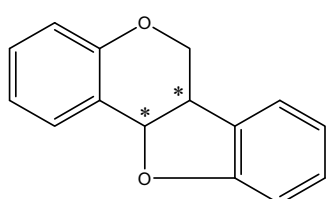
3-arilcumarinas



Cumaronocromenos



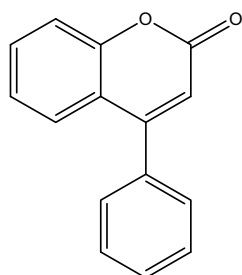
Cumaronocromonas



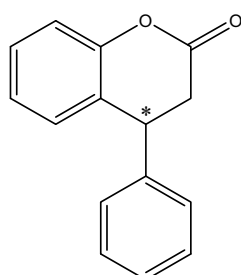
Pterocarpanos

\* Estereocentros

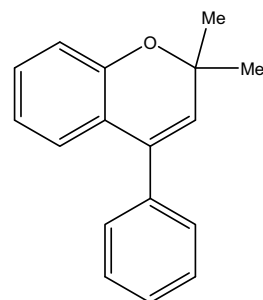
**3.1.1.3. Neoflavonoides:** Los neoflavonoides son estructural y biogeneticamente relacionados con los flavonoides y los isoflavonoides y comprenden las 4-arilcumarinas, las 3,4-dihidro-4-arilcumarinas y los neoflavenos:



4-arilcumarinas



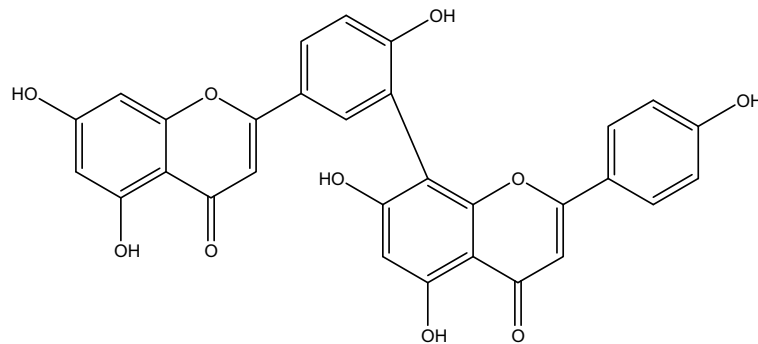
3,4-dihidro-4-arilcumarinas



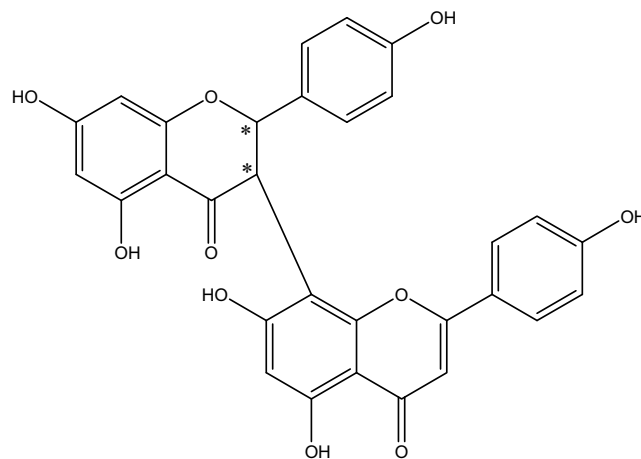
neoflavenos

\* Estereocentros

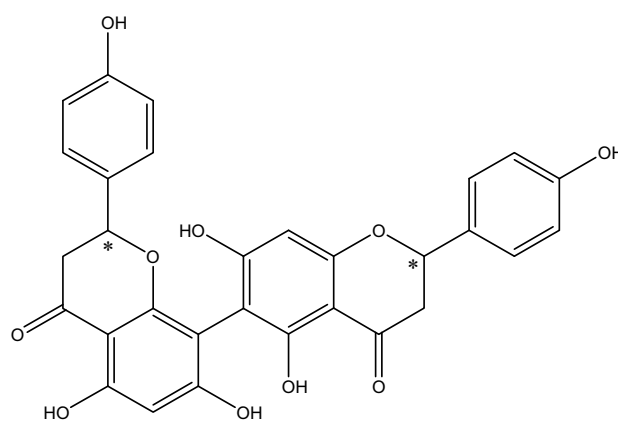
**3.1.1.4. Biflavonoides:** Los biflavonoides se caracterizan por la unión covalente de dos unidades monoméricas de flavonoides. Estas unidades pueden ser del mismo o diferente tipo estructural, por ejemplo, flavona–flavona, flavanona–flavona y flavanona-flavanona:



Flavona-Flavona (Amentoflavona)



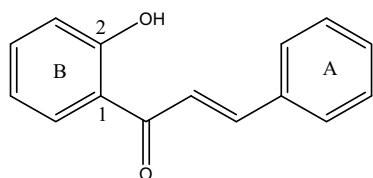
Flavanona-Flavona (Volkensiflavona)



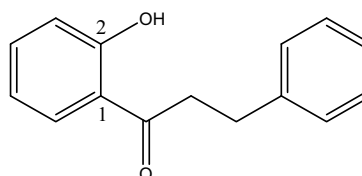
Flavanona-Flavanona (Rhusflavanona)

\* Estereocentros

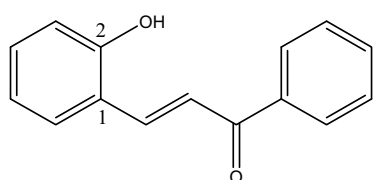
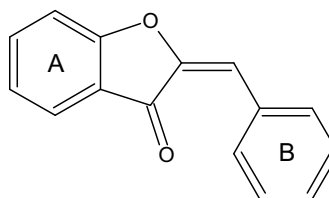
**3.1.1.5. Otros flavonoides:** Productos naturales tales como chalconas y auronas también contienen un esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y son considerados como flavonoides sencillos. Estos grupos de compuestos incluyen las 2-hidroxicalconas, las 2-hidroxi-dihidrochalconas, las 2-hidroxi-*retro*-chalconas, las auronas y los auronoles:



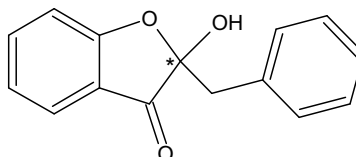
2-hidroxicalconas



2-hidroxi-dihidrochalconas

2-hidroxi-*retro*-chalconas

Auronas



Auronoles

\* Estereocentros

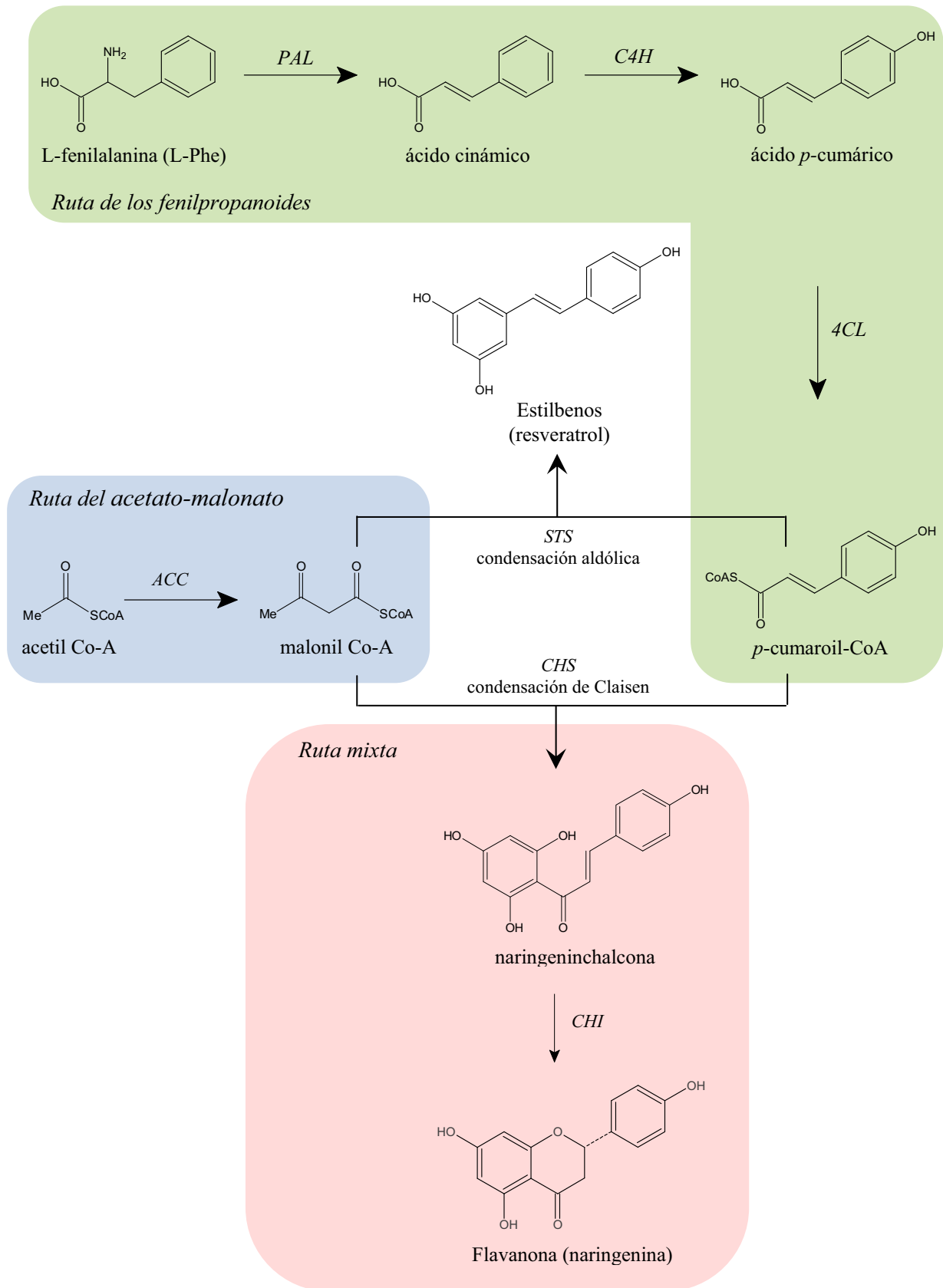
### 3.1.2. Biosíntesis de flavonoides

La ruta biosintética de los flavonoides es una de las vías metabólicas más estudiadas del reino vegetal. Los caminos que llevan a su síntesis han sido caracterizados en detalle en numerosas especies vegetales (Dixon & Steele, 1999; Harborne & Williams, 2000; Winkel-Shirley, 2001; Springob *et al.*, 2003). De hecho, existen evidencias de que esta ruta deriva del metabolismo primario y que utiliza una gran variedad de enzimas, incluyendo miembros de las *hidroxilasas* dependientes del citocromo P450, *dioxigenasas* dependientes de 2-oxoglutarato, *dehidrogenasas / reductasas de cadena corta (SDR)*, *O-metiltransferasas (OMT)*, y miembros de la familia de las *glicosiltransferasas (GT)* (Winkel-Shirley, 2006).



Biosintéticamente, los flavonoides pueden considerarse como tetracétidos de síntesis mixta, ya que utilizan el *p*-cumaroil-CoA como molécula iniciadora, a la cual se unen tres moléculas de malonil-CoA. El *p*-cumaroil-CoA proviene de la ruta del siquimato-fenilpropanoides, y el malonil-CoA implica a la ruta del acetato-malonato. La vía del siquimato se utiliza para sintetizar compuestos aromáticos a partir de glúcidos. De hecho, proporciona los elementos básicos para la síntesis de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), así como de muchos otros compuestos aromáticos de gran importancia para los organismos productores. Esta vía solamente se lleva a cabo en plantas y microorganismos. En las plantas superiores se origina en los cloroplastos a partir de fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato. La entrada en la ruta de los fenilpropanoides se produce por la acción de la *fenilalanina amonio liasa* (*PAL*). Este enzima, mediante un proceso de desaminación oxidativa, actúa sobre la L-fenilalanina (L-Phe) dando lugar al ácido cinámico. Posteriormente, mediante la acción de la *cinamato-4-hidroxilasa* (*CHH*), el ácido cinámico es convertido al ácido *p*-cumárico, el cual es activado en forma de *p*-cumaroil-CoA gracias a la *4-cumaroil-CoA-ligasa* (*4CL*) (Julsing *et al.*, 2006; Green, 2007). A su vez, la ruta del acetato-malonato se inicia con la formación de malonil-CoA, a partir de acetil-CoA, mediante la *acetil-CoA-carboxilasa* (*ACC*).

El primer paso en la biosíntesis de flavonoides es una condensación secuencial del *p*-cumaroil-CoA, como molécula iniciadora, con tres moléculas de malonil-CoA y posterior condensación intramolecular de Claisen, catalizado todo por la *chalcona sintasa* (*CHS*), que da lugar a la naringinichalcona (familia de las chalconas), molécula de estructura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, precursora de todos los flavonoides hallados en el reino vegetal (Springob *et al.*, 2003; Green, 2007). En las plantas, la naringinichalcona, de color amarillo, es convertida estereoespecíficamente a la flavanona incolora (2*S*)-naringenina por medio de la *chalcona-flavanona isomerasa* (*CHI*) (Figura 30) (Springob *et al.*, 2003). En la ausencia de *CHI*, la isomerización ocurre espontáneamente produciendo la mezcla racémica (2*R/S*)-naringenina. Es habitual la asociación de la *CHS* y la *CHI* en un complejo que garantiza la direccionalidad y la especificidad estereoquímica que requieren las siguientes enzimas del camino metabólico (Dewick, 2002). Por su parte, los estilbenos, como el resveratrol, se sintetizan mediante la acción de la *estilbeno sintasa* (*STS*), que actúa de forma similar a la *CHS*, de manera que a una molécula de *p*-cumaroil-CoA se unen 3 moléculas de malonil-CoA; pero, en este caso, el proceso de ciclación se produce mediante una condensación aldólica, dando lugar a una estructura básica de tipo C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, a partir de la cual se forman los estilbenos (Figura 30) (Dewick, 2002).

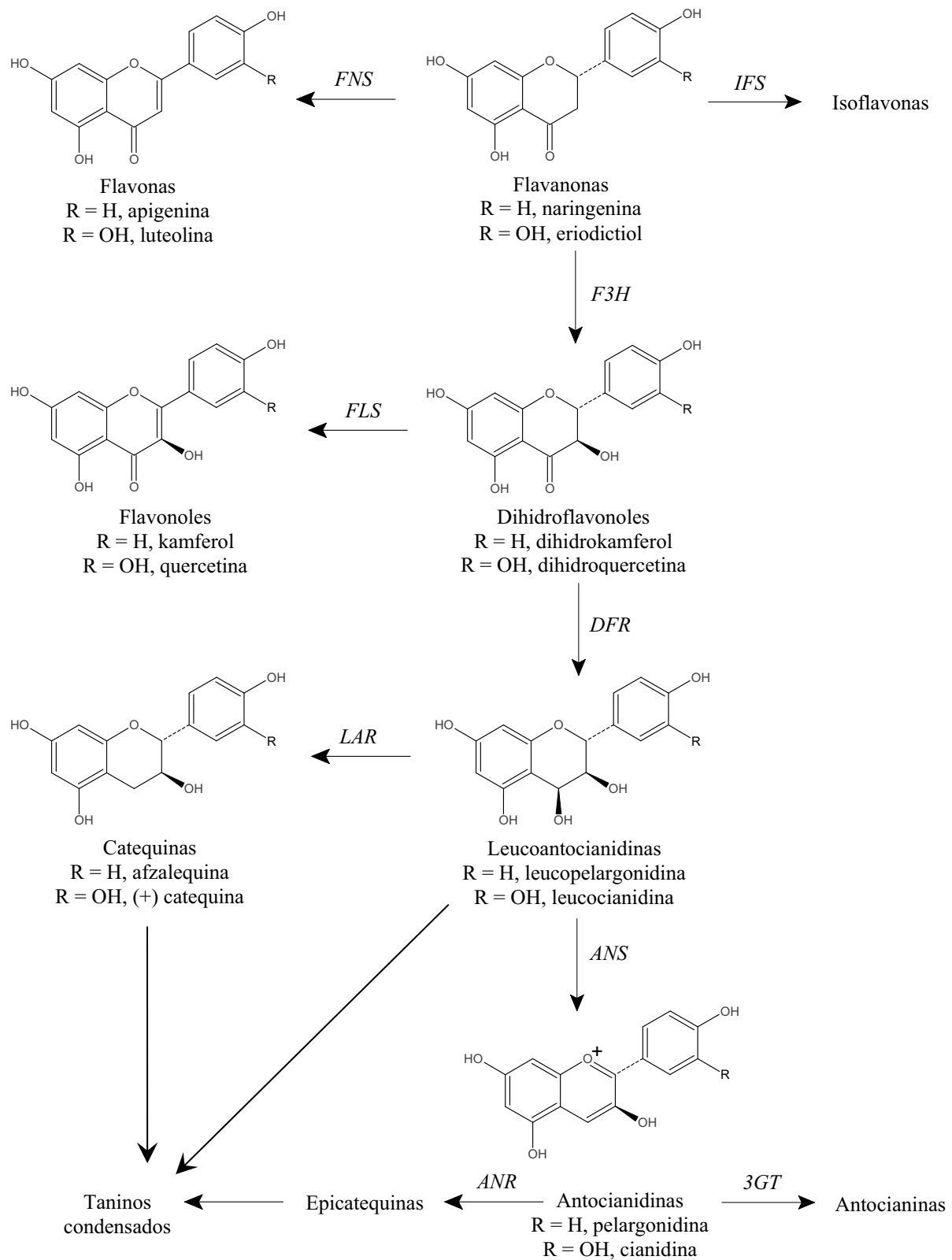


**Figura 30.** Biosíntesis parcial de flavonoides tipo flavanona. *PAL*, fenilalanina amonio liasa; *C4H*, cinamato-4-hidroxilasa; *4CL*, 4-cumaroil-CoA-ligasa; *STS*, estilbeno sintasa; *CHS*, chalcona sintasa; *ACC*, acetil-CoA-carboxilasa; *CHI*, chalcona-flavanona isomerasa (Adaptado de Dewick, 2002; Green, 2007).

Las flavonas se forman por acción de la *flavona sintasa (FNS)*, que crea un doble enlace entre las posiciones 2 y 3. La mayoría de las flavonas están glucosidadas, constituyendo uno de los grupos de flavonoides más numerosos (Martens & Mithöfer, 2005). Los 4-hidroxi flavanos se originan mediante la *dihidroflavonol-4-reductasa (DFR)*, la misma enzima que convertirá los dihidroflavonoles en leucoantocianidinas. Las isoflavonas se forman gracias a la actividad del complejo de la *isoflavona sintasa (IFS)*, y a partir de ellas se origina el resto de isoflavonoides. Debido a que la *IFS* es un complejo enzimático de distribución restringida, los isoflavonoides, se presentan prácticamente solo en la familia de las Fabaceae (Ayabe & Akashi, 2006).

Los dihidroflavonoles (3-hidroxi flavanonas) se sintetizan por acción de la *flavanona-3-hidroxilasa (F3H)*, y a partir de ellos pueden formarse los flavonoles (por acción de la *flavonol sintasa, FLS*) y las leucoantocianidinas (por acción de la *dihidroflavonol-4-reductasa, DFR*). A partir de las leucoantocianidinas pueden formarse antocianinas (previa formación de antocianidinas) y taninos condensados (previa formación de catequinas o epicatequinas). Las antocianinas se forman previa conversión de las leucoantocianidinas en antocianidinas por acción de la *antocianidina sintasa (ANS)*, las cuales dan lugar a las antocianinas mediante las *antocianidina-3-glucosiltransferasas (3GT)* (Xie & Dixon, 2005). Los taninos condensados constituyen el grupo de polímeros de flavonoides más significativo. Son productos de polimerización (cadenas de 4 a 8 unidades) de 3-hidroxi flavanos (catequinas y epicatequinas) y de 3,4-dihidroxi flavanos (leucoantocianidinas). Las catequinas (2,3-*trans*-) se originan a partir de las leucoantocianidinas por acción de la *leucoantocianidina reductasa (LAR)*, mientras que las epicatequinas (2,3-*cis*-) se forman a partir de las antocianidinas mediante la *antocianidina reductasa (ANR)* (Figura 31) (Dixon *et al.*, 2005; Xie & Dixon, 2005).

Pueden presentarse modificaciones en el patrón de hidroxilación en los dos sistemas aromáticos de los diferentes tipos de flavonoides, también es posible encontrar modificaciones debidas a metilaciones, glicosilaciones y alquilaciones, incrementando enormemente el rango de compuestos. Realmente, la mayoría de flavonoides están glucosidados, siendo los más abundantes los glucósidos de flavonas, flavonoles y antocianidinas. La glucosidación puede incluir, además de monosacáridos, una gran variedad de disacáridos y trisacáridos, que suelen acumularse en las vacuolas o en las secreciones hidrofílicas.



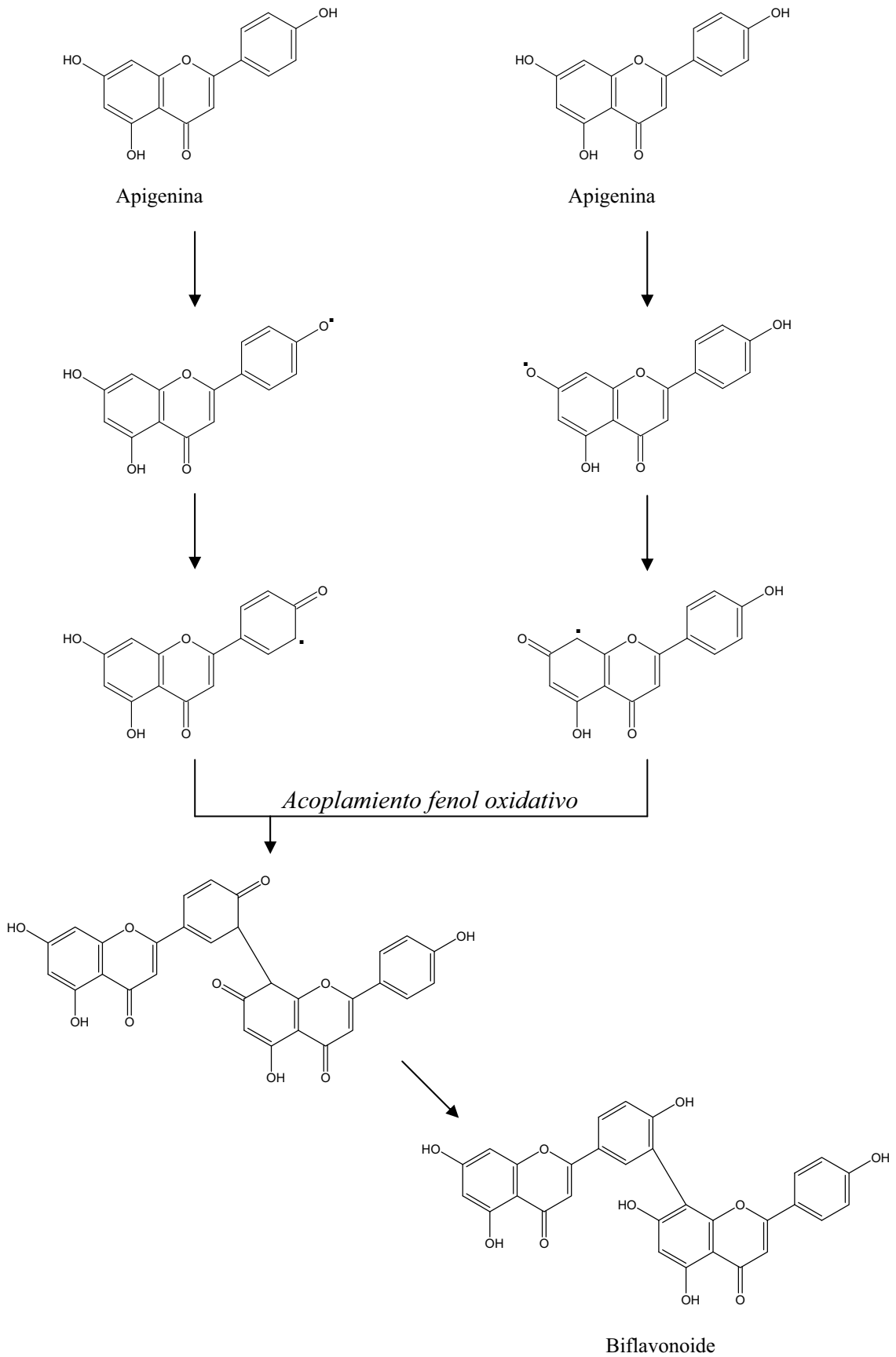
**Figura 31.** Biosíntesis de diversos flavonoides. *FNS*, flavona sintasa; *IFS*, isoflavona sintasa; *F3H*, flavanona-3-hidroxilasa; *FLS*, flavonol sintasa; *DFR*, dihidroflavonol-4-reductasa; *LAR*, leucoantocianidina reductasa; *ANS*, antocianidina sintasa; *ANR*, antocianidina reductasa; *3GT*, antocianidina-3-glucosiltransferasas (Adaptación de Dewick, 2002; Xie & Dixon, 2005; Green, 2007).

**3.1.2.1. Biosíntesis de biflavonoides:** El conocimiento de la bioquímica de los biflavonoides (p.e. su distribución en la planta, su biosíntesis y factores que controlan su acumulación y formación) es limitado (Lobstein *et al.*, 1999). Sin embargo, algunos datos sugieren que en la biosíntesis de biflavonoides intervienen reacciones de acoplamiento fenol oxidativo entre dos unidades, principalmente, flavonas, flavanonas y auronas (Carneiro *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2005; Green, 2007). El biflavonoide resultante presenta un grupo carbonilo en la posición C-4, y como resultado de la presencia de este grupo, los biflavonoides no producen antocianidinas bajo condiciones ácidas fuertes (Bennie *et al.*, 2000; 2001). Una propuesta para el acoplamiento fenol oxidativo, tal como se produce en el compuesto licoagrona, la primera biaurona prenilada identificada (Asada *et al.*, 1999), se iniciaría con la generación de radicales libres a partir de flavonas, que se estabilizarían formando enlaces covalentes entre dos unidades (acoplamiento fenol oxidativo), posteriormente, la molécula resultante se equilibraría mediante un proceso de tautomería ceto-enólica (Figura 32). Otro mecanismo propuesto, involucra la generación de radicales electrofílicos a partir de chalconas sustituidas (Li *et al.*, 2002). Los intermediarios podrían seguir procesos de dimerización y/o sustitución por diferentes unidades de flavonoides, y finalmente, procesos de ciclización, algunos de las cuales, de forma no estereo-selectiva, produciendo así, mezclas de compuestos racémicos. El aislamiento de chamaejasmina y sus derivados con diferente configuración en los C-2 y C-3, apoya esta hipótesis (Figura 33) (Li *et al.*, 2002).

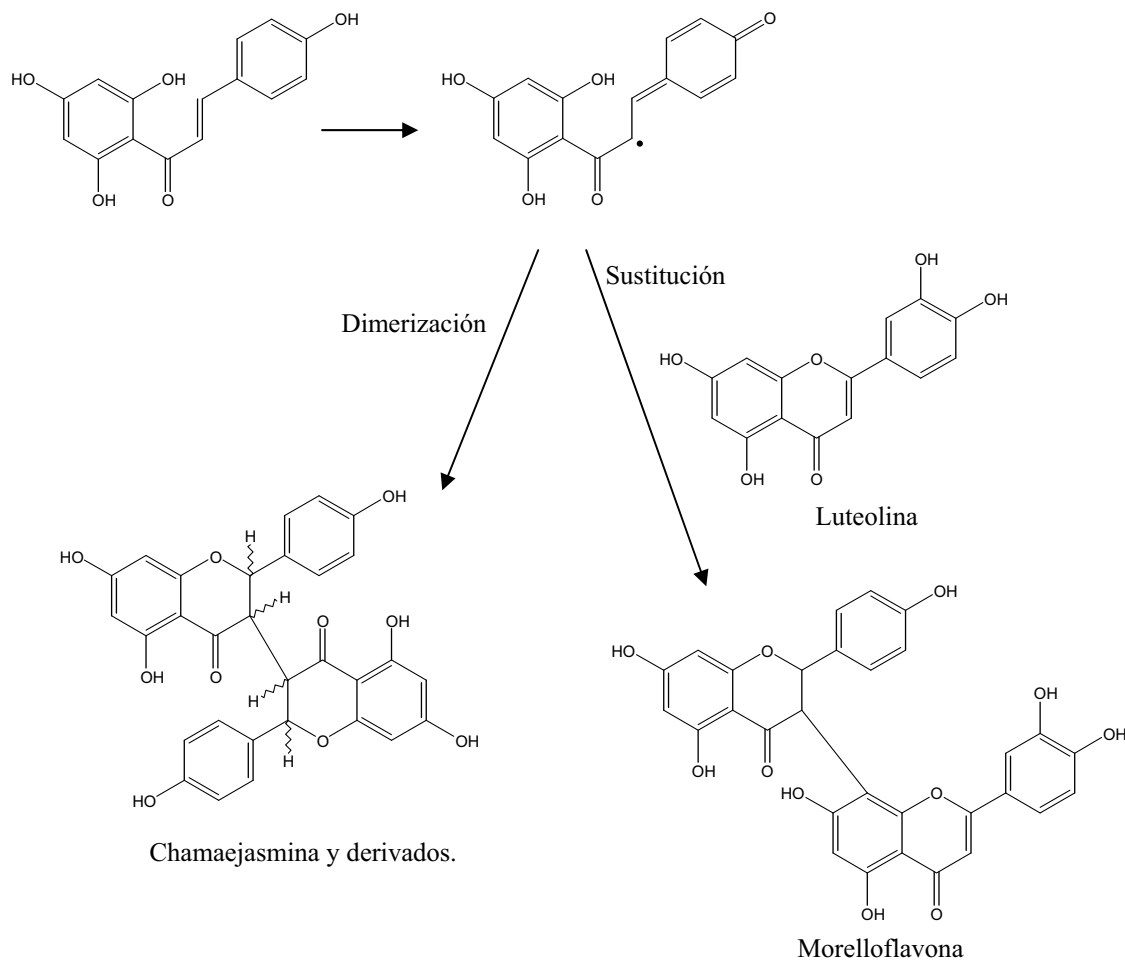
### 3.1.3. Características botánicas de la Familia Clusiaceae

Se trata de una familia formada por árboles, arbustos y raras veces hierbas. Sus miembros presentan hojas opuestas o verticiladas, simples, a menudo engrosadas, generalmente verdes, y sin estípulas. Tanto hojas como tallo y otras piezas están provistas de glándulas aceitosas. Flores regulares, bisexuales o unisexuales en plantas separadas; solitarias o en inflorescencias cimosas. Tienen entre 2-14 sépalos, 2-14 pétalos y numerosos estambres libres o ligeramente unidos en la base o en 2-5 haces. Fruto bacciforme, drupáceo o capsular, con semillas a veces aladas. En ocasiones, la subfamilia Hypericoideae es considerada como una familia aparte (Hypericaceae).

**3.1.3.1. Distribución y hábitat:** La familia Clusiaceae, también conocida como Guttiferae, la forman unos 50 géneros y alrededor de 1.200 especies distribuidas en zonas tropicales, salvo



**Figura 32.** Mecanismo propuesto para la biosíntesis de biflavonoides tipo amentoflavona.



**Figura 33.** Mecanismo propuesto para la formación de morelloflavona, chamaejasmina y sus derivados (Li *et al.*, 2002).

algunas especies de climas templados (Ulloa & Jorgensen, 2004). Engloba especies de interés económico por la producción de frutos comestibles, maderas, drogas y tintes. Se cultivan especies de los géneros *Clusia*, *Calophyllum*, *Garcinia* y *Mammea*.

**3.1.3.2. Aspectos botánicos del género *Garcinia*:** Se trata de un género que engloba numerosas especies (alrededor de 200) de árboles o arbustos polígamos, distribuidos en Asia, África y Centro y Sudamérica. (Jena *et al.*, 2002; Mbwambo *et al.*, 2006). Alrededor de 20 especies se encuentran en Colombia. Presentan hojas opuestas o verticiladas, enteras, coriáceas, con la nervadura lateral paralela, muy reticulada entre los nervios, con punteaduras translúcidas y glándulas rojas o negras en las venas laterales. Flores polígamas, terminales o axilares, solitarias o en racimos. Cáliz con 2-4 sépalos, a menudo imbricados; corola con 2-4 pétalos, blancos, amarillos o rojos, decusados o imbricados, a menudo de diferentes tamaño.

Flores masculinas con numerosos estambres libres, fasciculados o unidos en una masa central. Ovario con 2-12 lóculos, con 1 óvulo por lóculo. Estilo corto o ausente. Fruto en baya dura o carnosa, que contiene entre 1 y 13 semillas.

**3.1.3.3. *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel** (Figura 34): Presenta una distribución restringida a Costa Rica, Panamá y el norte de Sudamérica. En Colombia, es conocida tradicionalmente como madroño. Es un árbol dioico, de tamaño mediano, que alcanza de 10 a 15 m de altura, tronco recto, corteza grisácea, copa simétrica. Hojas opuestas, de color verde oscuro, elípticas a oblongas, de 5 a 20 cm de largo y de 0.5 a 6 cm de ancho, que contienen un látex amarillo. Flores amarillentas, en grupos de 1 a 15 en los nudos de las ramas. Fruta esférica, ovoide o elipsoide, de 5 a 10 cm de largo, con cáscara gruesa, amarilla y cubierta de protuberancias; pulpa blanca, aromática, jugosa, de sabor agridulce, y que contiene de 1 a 3 semillas (Rivero & Brunner, 2006).



**Figura 34.** *Garcinia madruno* (Kunth) Hammel.

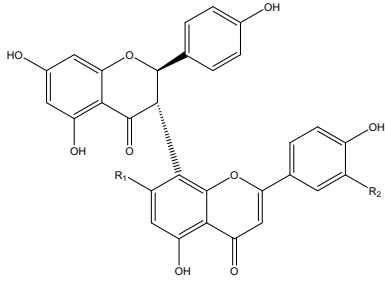


La fruta se consume principalmente al natural, también se utiliza en la elaboración de jaleas y jugos. Es un árbol vistoso, resistente a plagas y enfermedades y adaptable a diferentes condiciones ambientales. Estas cualidades, también lo hacen ideal como árbol ornamental. *G. madruno* está relacionado con el mangostán (*G. mangostana*) y con especies americanas de *Garcinia*, como *G. macrophylla*, *G. brasiliensis* y *G. magnifolia* (a la que también se la llama madroño). No se conocen variedades; sin embargo, existe variabilidad en características de interés, como por ejemplo, el tamaño y la calidad de la fruta, y la productividad de los árboles, entre otras. *G. madruno* también es conocido como *Rheedia madruno*, *R. acuminata* y *Calophyllum madruno*. En el pasado, se consideraba que el género *Garcinia* existía en el Viejo Mundo y *Rheedia* en el Nuevo, pero hoy está aceptado que no hay una distinción taxonómica verdadera, y todas se ubican en el género *Garcinia* (Rivero & Brunner, 2006).

#### 3.1.4. Biflavonoides del género *Garcinia*

Estudios fitoquímicos de plantas pertenecientes al género *Garcinia* han revelado la presencia de xantonas, benzofenonas y biflavonoides (Ampofo & Waterman, 1986; Cao *et al.*, 1998b; Baggett *et al.*, 2005). En el caso concreto de los biflavonoides y tal como se muestra la Tabla 4, pueden clasificarse en 4 tipos: Tipo morelloflavona (flavanona-(3→8'')-flavona); Tipo GB1 (flavanona-(3→8'')-flavanonol); Tipo GB-1a (flavanona-(3→8'')-flavanona) y tipo amentoflavona (flavona-(3'→8'')-flavona). El primer biflavonoide del tipo flavanona-(3→8'')-flavona, aislado e identificado en 1967 de las semillas de *G. morella*, correspondió a morelloflavona (Karanjgaokar *et al.*, 1967). Esta clase de compuestos presentan una sustancial complejidad espectral en el nivel dimérico debido a la rotación de las estructuras flavanona y flavona alrededor del eje C3→C8'' (Li *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005). Por su parte, GB1 (de: *Garcinia* biflavonoide 1) es uno de los biflavonoides de la especie que más se ha estudiado dentro del género, específicamente *G. kola* (Iwu *et al.*, 1990a). Esta especie medicinal es ampliamente utilizada en África para el tratamiento de la laringitis, enfermedades hepáticas, contra la tos y la pérdida de la voz (Farombi *et al.*, 2000). Los biflavonoides de tipo GB-1a, también denominados por I-3,II-8-binaringenina (Mbwambo *et al.*, 2006), se han aislado de 12 especies del género *Garcinia* (Duddeck *et al.*, 1978). Por último, los biflavonoides del tipo amentoflavona presentan una unión inter-flavonoide (3'→8'') diferente a las vistas hasta el momento, no obstante, son igualmente abundantes dentro del género. También es de mencionar la presencia de biflavonoides que no pertenecen a ninguno de los 4 grupos principales; sin embargo, su distribución es mucho más limitada.

Tabla 4. Biflavonoides del género *Garcinia*.

Estructura	Nombre / Fuente	Ref.
<p><b>Tipo morelloflavona (flavanona-(3→8'')-flavona).</b></p> 	<p><b>Morelloflavona, Fukugetin, (3-8''-naringenilluteolina).</b>  <math>R_1 = R_2 = \text{OH}</math>.  <i>G. morella</i>  <i>G. spicata</i>  <i>G. linii</i>  <i>G. multiflora</i></p> <p><i>G. talboti</i>  <i>G. volkensii</i>  <i>G. xanthochymus</i>  <i>G. livingstonii</i>  <i>G. densivenia</i>  <i>G. quadrifaria</i>  <i>G. scortechinii</i>.  <i>G. subelliptica</i>  <i>G. xanthochymus</i>  <i>G. dulcis</i></p> <p><i>G. livingstonei</i>  <i>Rhedia acuminata</i>  <i>R. gardneriana</i></p>	<p>Karanjgaokar <i>et al.</i>, 1967  Konoshima <i>et al.</i>, 1969  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Konoshima <i>et al.</i>, 1970; Chen <i>et al.</i>, 1975a; Lin <i>et al.</i>, 1997; 2001  Joshi <i>et al.</i>, 1970  Herbin <i>et al.</i>, 1970  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Pelter <i>et al.</i>, 1971  Waterman &amp; Crichton, 1980  Waterman &amp; Hussain, 1982  Sukpondma <i>et al.</i>, 2005  Masuda <i>et al.</i>, 2005  Baggett <i>et al.</i>, 2005  Deachathai <i>et al.</i>, 2005; 2006; Hutadilok-Towatana <i>et al.</i>, 2007  Mbwambo <i>et al.</i>, 2006  Li <i>et al.</i>, 2002  Verdi <i>et al.</i>, 2004</p>
	<p><b>Volkensiflavona, talbotaflavone, (3-8''-naringenilapigenina).</b>  <math>R_1 = \text{OH}</math>, <math>R_2 = \text{H}</math>.  <i>G. multiflora</i></p> <p><i>G. spicata</i>  <i>G. talboti</i>  <i>G. volkensii</i>  <i>G. xanthochymus</i></p> <p><i>G. livingstonii</i>  <i>G. scortechinii</i>  <i>G. dulcis</i>  <i>G. livingstonei</i>  <i>R. gardneriana</i></p>	<p>Konoshima <i>et al.</i>, 1970; Chen <i>et al.</i>, 1975a; Lin <i>et al.</i>, 1999; 2001  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Joshi <i>et al.</i>, 1970  Herbin <i>et al.</i>, 1970  Konoshima <i>et al.</i>, 1970; Baggett <i>et al.</i>, 2005  Pelter <i>et al.</i>, 1971  Sukpondma <i>et al.</i>, 2005  Deachathai <i>et al.</i>, 2006  Mbwambo <i>et al.</i>, 2006  Verdi <i>et al.</i>, 2004</p>
	<p><b>O-metil fukugetin, (3''-O-metilmorelloflavona).</b>  <math>R_1 = \text{OH}</math>, <math>R_2 = \text{OCH}_3</math>  <i>G. spicata</i>  <i>G. densivenia</i>  <i>G. quadrifaria</i></p>	<p>Konoshima <i>et al.</i>, 1969  Waterman &amp; Crichton, 1980  Waterman &amp; Hussain, 1982</p>

---

**Continuación Tabla 4. Biflavonoides del género *Garcinia*.**


---

**Fukugiside,  
(Morelloflavona-7"-O-glucósido).**
 $R_1 = O\text{-Glc}, R_2 = \text{OH}.$ 
*G. spicata*
*G. xanthochymus*

Konoshima & Ikeshiro, 1970  
 Konoshima *et al.*, 1970;  
 Baggett *et al.*, 2005  
 Chen *et al.*, 1975b  
 Deachathai *et al.*, 2006  
 Verdi *et al.*, 2004

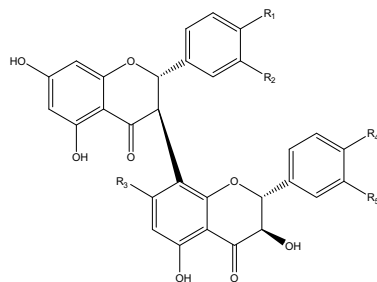
*G. multiflora*
*G. dulcis*
*R. gardneriana*
**Morelloflavona-7"-sulfato.**
 $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{SO}_3\text{H}.$ 
*R. acuminata*
*Li et al.*, 2002

**Spicataside,  
(volkensiflavona-7"-O-glucósido).**
 $R_1 = O\text{-Glc}, R_2 = \text{H}.$ 
*G. spicata*
*G. multiflora*

Konoshima *et al.*, 1970  
 Chen *et al.*, 1975b;  
 Lin *et al.*, 2001

**Volkensiflavona-7-sulfato.**
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{SO}_3\text{H}.$ 
*R. acuminata*
*Li et al.*, 2002

---

**Tipo GB-1  
(flavanona-(3→8"-)-flavanonol)**

**GB-1.**
 $R_1 = R_3 = R_4 = \text{OH}, R_2 = R_5 = \text{H}.$ 
*G. buchananii*
*G. eugeniifolia*
*G. linii*
*G. multiflora*
*G. kola*

Jackson *et al.*, 1967; 1971  
 Jackson *et al.*, 1969; 1971  
 Konoshima *et al.*, 1970  
 Konoshima *et al.*, 1970  
 Iwu & Igboko, 1982;  
 Kabangu *et al.*, 1987; Iwu *et al.*,  
 1990a; 1990b; Han *et al.*,  
 2005; Okunji *et al.*, 2007

**GB-2.**
 $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}, R_2 = \text{H}.$ 
*G. buchananii*
*G. eugeniifolia*
*G. linii*
*G. multiflora*
*G. xanthochymus*
*G. kola*

Jackson *et al.*, 1967; 1971  
 Jackson *et al.*, 1969; 1971  
 Konoshima *et al.*, 1970  
 Konoshima *et al.*, 1970  
 Konoshima *et al.*, 1970  
 Kabangu *et al.*, 1987; Iwu *et al.*,  
 1990a; 1990b; Okunji *et al.*,  
 2007

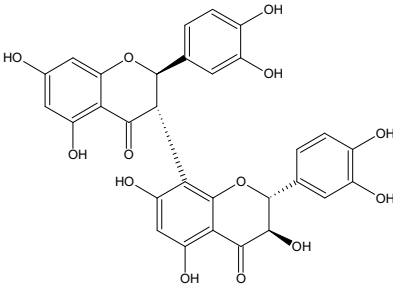
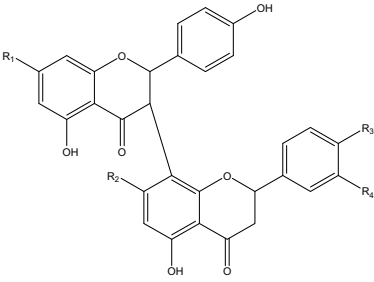
**Kolaf flavanona.**
 $R_1 = R_3 = R_5 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_4 = \text{OCH}_3.$ 
*G. kola*

Iwu & Igboko, 1982; Hussain  
*et al.*, 1982; Kabangu *et al.*,  
 1987; Iwu *et al.*, 1990a;  
 1990b; Okunji *et al.*, 2007

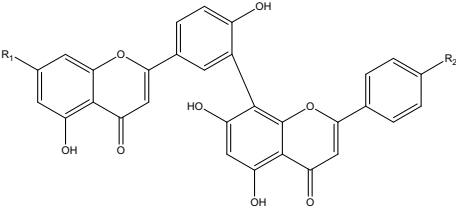
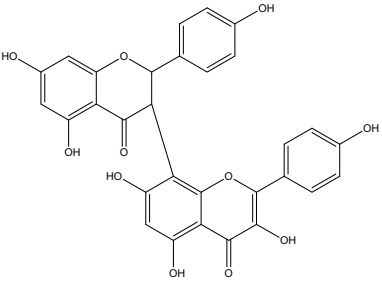
**GB-3.**
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}.$ 
*G. kola.*
*Kabangu et al.*, 1987

---

Continuación Tabla 4. Biflavonoides del género *Garcinia*.

	<p><b>Manniflavanona.</b>  <math>R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{OH}</math>.  <i>G. mannii</i>  <i>G. kola</i></p>	<p>Crichton &amp; Waterman, 1979  Iwu, 1982; Iwu <i>et al.</i>, 1990a</p>	
	<p><b>3''-metoximanniflavanona.</b>  <math>R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}</math>, <math>R_5 = \text{OCH}_3</math>.  <i>G. kola</i></p>	<p>Iwu, 1982</p>	
	<p><b>GB-2-7''-O-glucósido.</b>  <math>R_1 = R_4 = R_5 = \text{OH}</math>, <math>R_2 = \text{H}</math>, <math>R_3 = \text{O-Glc}</math>.  <i>G. kola</i></p>	<p>Iwu, 1982</p>	
	<p><b>Manniflavanona-7''-O-glucósido</b>  <math>R_1 = R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}</math>, <math>R_3 = \text{O-Glc}</math>  <i>G. kola</i></p>	<p>Iwu, 1982</p>	
	<p><b>Garciniflavona.</b>  <i>G. kola</i></p>	<p>Iwu <i>et al.</i>, 1990a</p>	
			
	<p><b>Tipo GB-1a  (flavanona-(3→8'')-flavanona)</b></p>	<p><b>GB-1a,  (3-8''-binaringenina).</b>  <math>R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}</math>, <math>R_4 = \text{H}</math>.  <i>G. buchananii</i>  <i>G. eugeniifolia</i>  <i>G. lirii</i>  <i>G. multiflora</i>    <i>G. spicata</i>  <i>G. volkensis</i>  <i>G. xanthochymus</i>  <i>G. kola</i></p>	<p>Jackson <i>et al.</i>, 1967; 1971  Jackson <i>et al.</i>, 1969; 1971  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Konoshima <i>et al.</i>, 1970; Chen  <i>et al.</i>, 1975a; Lin <i>et al.</i>, 1997;  2001  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Herbin <i>et al.</i>, 1970  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Kabangu <i>et al.</i>, 1987; Okunji <i>et al.</i>,  2007</p>
			
	<p><b>GB-2a,  (3-8''-naringenileriodictiol).</b>  <math>R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}</math>.  <i>G. eugeniifolia</i>  <i>G. lirii</i>  <i>G. multiflora</i>    <i>G. spicata</i>  <i>G. volkensis</i>  <i>G. xanthochymus</i>  <i>G. buchananii</i>  <i>G. subelliptica</i>  <i>G. dulcis</i></p>	<p>Jackson <i>et al.</i>, 1969; 1971  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Konoshima <i>et al.</i>, 1970; Chen  <i>et al.</i>, 1975a; Lin <i>et al.</i>, 1997;  2001  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Herbin <i>et al.</i>, 1970  Konoshima <i>et al.</i>, 1970  Jackson <i>et al.</i>, 1971  Masuda <i>et al.</i>, 2005  Deachathai <i>et al.</i>, 2006</p>	

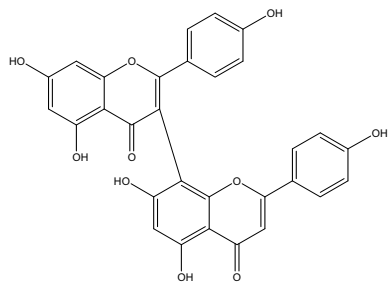
**Continuación Tabla 4. Biflavonoides del género *Garcinia*.**

	<p><b>GB-1a-7''-O-β-glucósido, (3-8''-binaringenin-7''-O-β-glucósido).</b>  <math>R_1 = R_3 = \text{OH}, R_2 = \text{O-Glc}, R_4 = \text{H}.</math>  <i>G. multiflora.</i></p> <p><i>G. kola</i></p>	<p>Chen <i>et al.</i>, 1975b; Lin <i>et al.</i>, 1997; 2001 Okunji <i>et al.</i>, 2007</p>
	<p><b>Xantochimuside, (GB-2a-7''-O-β-glucósido).</b>  <math>R_1 = R_3 = R_4 = \text{OH}, R_2 = \text{O-Glc}.</math>  <i>G. xanthochymus</i></p> <p><i>G. multiflora</i></p>	<p>Konoshima &amp; Ikeshiro, 1970; Konoshima <i>et al.</i>, 1970 Chen <i>et al.</i>, 1975b; Lin <i>et al.</i>, 2001</p>
	<p><b>GB-2a-7-O-glucósido,</b>  <math>R_1 = \text{Glc}, R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH}.</math>  <i>R. gardneriana</i></p>	<p>Verdi <i>et al.</i>, 2004</p>
	<p><b>Ent-naringeninil-(I-3α,II-8)-4'-O- metilnaringenina,</b>  <math>R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{OMe}, R_4 = \text{H}.</math>  <i>G. livingstonei</i></p>	<p>Mbwambo <i>et al.</i>, 2006</p>
<p><b>Tipo Amentoflavona (flavona-(3'→8'')-flavona)</b></p> 	<p><b>Amentoflavona, (3'-8''-biapigenina).</b>  <math>R_1 = R_2 = \text{OH}.</math>  <i>G. livingstonii</i>  <i>G. kola</i></p> <p><i>G. intermedia</i>  <i>G. xanthochymus</i>  <i>R. acuminata</i></p>	<p>Pelter <i>et al.</i>, 1971 Iwu &amp; Igboko, 1982; Iwu <i>et al.</i>, 1990a Abe <i>et al.</i>, 2004 Baggett <i>et al.</i>, 2005 Li <i>et al.</i>, 2002</p>
	<p><b>Podocarpusflavona A.</b>  <math>R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OMe}.</math>  <i>G. livingstonii</i>  <i>G. intermedia</i></p>	<p>Pelter <i>et al.</i>, 1971 Abe <i>et al.</i>, 2004</p>
	<p><b>7-O-metilamentoflavona.</b>  <math>R_1 = \text{OMe}, R_2 = \text{OH}.</math>  <i>G. xanthochymus</i></p>	<p>Parveen <i>et al.</i>, 1994</p>
<p><b>Otros biflavonoides</b></p> 	<p><b>Garcinianina</b>  <i>G. kola</i></p>	<p>Terashima <i>et al.</i>, 1995</p>

---

**Continuación Tabla 4.** Biflavonoides del género *Garcinia*.

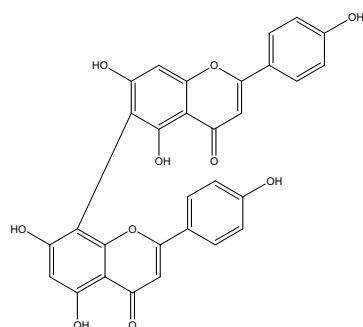
---



**3-8''-biapigenina.**

*G. xanthochymus*

Baggett *et al.*, 2005

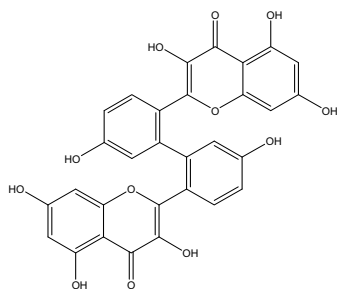


**Agathisflavona**

**6-8''-biapigenina.**

*G. xanthochymus*

Parveen *et al.*, 1994



**2'-2'''-biflavonol.**

*G. nervosa*

Parveen *et al.*, 2004

---

## 3.2. Material y Métodos

### 3.2.1. Procedimientos experimentales generales

Rotación óptica: polarímetro Perkin-Elmer 241. Espectro IR: espectrómetro Perkin-Elmer modelo 1430, en película, empleando pastillas de NaCl de 1 cm de espesor. Espectro UV: los espectros se tomaron en un espectrómetro UV-Vis Varian Cary 50-Bio. Dicroísmo circular (CD): espectropolarímetro Jasco J-810, expresando los valores en elipticidad molar [ $\theta$ ]. Espectrometría de masas (EIMS y CIMS): espectrómetro Hewlett Packard modelo 5989A, con inyección directa de la muestra y con energía de ionización de 70 eV. Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se midieron en instrumentos Varian modelos Gemini-300, Mercury-400 y VXR-500, usando  $\text{CD}_3\text{OD}$  o  $\text{DMSO}-d$  como solventes. Los valores de desplazamiento químicos se indican en unidades  $\delta$  (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz. Los espectros de correlación homo y heteronuclear (COSY, NOESY, HSQC y HMBC), se obtuvieron en los equipos Mercury-400 y VXR-500, usando las secuencias estándar. La visualización de las manchas se realizó empleando luz UV (254 nm) y aspersion con una solución de tricloruro férrico al 1 % en metanol.

### 3.2.2. Material vegetal

Las partes aéreas (hojas y ramas) de *G. madruno* se recolectaron en Julio de 2004 en predios de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) (Figura 8). Las muestras se identificaron por M.Sc Fernando Alzate y un espécimen (pliego número Alzate-3030) se depositó en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA).

### 3.2.3. Extracción, fraccionamiento y purificación de biflavonoides

Las partes aéreas secas de *G. madruno* (1.8 kg) fueron extraídas a temperatura ambiente con hexano (3 x 8 L), AcOEt (3 x 8 L) y MeOH (3 x 8 L), sucesivamente. Los extractos AcOEt y metanólico se llevaron a sequedad, obteniendo 104 y 120 g, respectivamente. Una porción del extracto de AcOEt (50 g) se fraccionó por CLV (Silica gel SDS cromagel 60A CC, 6-35  $\mu\text{m}$ ), comenzando la elución con hexano, 100 %, luego incrementando progresivamente la cantidad de AcOEt hasta 100 % y entonces se adicionó MeOH progresivamente hasta completar la elución (3:1). De esta forma se obtuvieron ocho fracciones marcadas como A-H en base a su

perfil cromatográfico en CCF (Silica gel 60 F254, Macherey-Nagel). La fracción C (7.72 g) se sometió a CC utilizando Sephadex LH-20 (Amersham Bioscience) eluyendo con MeOH y posteriormente a CC utilizando sílica gel como soporte, y un gradiente de hexano-AcOEt para dar cinco fracciones (C 1-5). Los compuestos puros se obtuvieron por cristalización directa o después de purificaciones adicionales por procesos cromatográficos. La combinación de las fracciones 1-3 se cristalizó con una mezcla hexano–AcOEt (3:1), obteniendo amentoflavona (**1**) (0.27 g). A partir de la fracción D (9.36 g), se realizó un proceso de separación líquido-sólido utilizando hexano. La fracción insoluble fue sometida a un proceso de separación en CC utilizando el sistema Hexano-AcOEt-MeOH (6:3:1) y obteniendo 4 fracciones finales en relación a su comportamiento cromatográfico en CCF. La fracción 3 (0.45 g) fue denominada fracción biflavonoide (**FB**) debido a su relativa pureza. Una porción de **FB** (80 mg) se separó por CCF prep. eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1) para dar morelloflavona (**2**) (0.51 mg), volkensiflavona (**3**) (12.73 mg) y amentoflavona (**1**) (6.36 mg). La fracción H (3.89 g) fue primero cromatografiada con Sephadex LH-20 eluyendo con MeOH y entonces por CC con sílica gel como fase estacionaria, utilizando AcOEt-Eter-BuOH (7:2:1) como eluyente, para dar tres fracciones (H 1-3). El compuesto puro fukugisido (**4**) (0.40 g) se obtuvo por cristalización directa con hexano-AcOEt (2:1) a partir de la fracción H-1.

El extracto metanólico se sometió a una separación líquido-líquido en hexano para dar una fracción soluble (71.5 g) y una fracción insoluble (48.2 g). Con la fracción soluble se llevó a cabo una CLV utilizando el gradiente de solventes ya descrito en este apartado para el extracto obtenido mediante AcOEt. De esta forma se obtuvieron seis fracciones principales, las cuales fueron rotuladas como M 1-6. La combinación de las fracciones M 2-4 (5.36 g) se cromatografió en Sephadex LH-20 eluyendo con MeOH y mediante CCF prep. eluyendo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1). Se obtuvo fukugisido (**4**) (82 mg), madrunoudeasido (**5**) (6 mg) y spicatasido (**6**) (8 mg).

#### **3.2.4. Caracterización de biflavonoides**

Las técnicas empleadas en la caracterización de los biflavonoides son las ya descritas en la sección 2.2.4.



### 3.3. Resultados y Discusión

#### 3.3.1. Caracterización de biflavonoides

Extensivos procesos cromatográficos de los extractos AcOEt y MeOH de las hojas y ramas de *Garcinia madruno* permitieron la separación de un nuevo biflavonoide glucosilado tipo flavanona-(3→8'')-flavona, madrunoudeasido (**5**), además de cinco biflavonoides conocidos, amentoflavona (**1**), morelloflavona (**2**), volkensiflavona (**3**), fukugisido (**4**) y spicatasido (volkensiflavona-7''-O-glucósido) (**6**). Los biflavonoides conocidos se identificaron por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos (CD,  $[\alpha]_D$ , IR, EM, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y RMN 2D) con los reportados para estos compuestos en la literatura. A continuación se presentan los biflavonoides aislados con énfasis especial sobre madrunoudeasido y su aglicona, morelloflavona.

**3.3.1.1. Amentoflavona (1).** El compuesto de estructura  $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$  se precipitó a partir de una solución de hexano-acetato de etilo (2:1) como un polvo de color amarillo, pf 254-256°C.  $[\alpha]_D^{25} + 9$  (MeOH;  $c$  0.50). UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 205 (4.76), 235 (3.80), 270 (4.48), 340 (4.12) nm. IR  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ : 3.250, 1.645, 1.670, 1.645, 1.080, 960, 740. EM 70 eV  $m/z$  (int rel.): 539  $[\text{M}+1]^+$  (6), 538  $[\text{M}]^+$  (4), 431 (11), 391 (19), 279 (41), 248 (13), 223 (21), 180 (61), 152 (38), 144 (30), 127 (100). La determinación del compuesto **1** se basó en el análisis de los datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (Figura 35, 36). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz), tomado en  $\text{CD}_3\text{OD}$ , mostró dos señales a  $\delta = 6.15$  ( $d$ ,  $J = 2.0$  Hz) y  $6.36$  ( $d$ ,  $J = 2.0$  Hz), cuya constante de acoplamiento nos indica una disposición *meta*, se asignaron a H-6 y H-8, respectivamente, en concordancia con el experimento COSY. Al no presentarse un doblete similar para H-6'' y H-8'', el anclaje entre las unidades flavonoides podría involucrar a C-6'' o C-8''. Un patrón ABX consistente en un doblete a  $\delta = 7.08$  ( $d$ ,  $J = 8.8$  Hz), un doblete a  $\delta = 7.85$  ( $dd$ ,  $J = 2.0, 8.8$  Hz) y un doblete a  $\delta = 7.95$  ( $d$ ,  $J = 2.0$  Hz) se asignó a H-5', H-6' y H-2', respectivamente. Se observó también un sistema  $\text{A}_2\text{B}_2$  asignados a los cuatro protones aromáticos, H-2'''/H-6'''-H-3'''/H-5''', como dos dobletes a  $\delta = 7.50$  ( $d$ ,  $J = 8.8$  Hz) y a  $\delta = 6.69$  ( $d$ ,  $J = 8.8$  Hz), respectivamente. Además la presencia de tres singuletes a  $\delta = 6.57, 6.56$  y  $6.34$  asignables a H-3, H-3'' y H-6'' excluyó la posibilidad de cualquier unión entre las unidades flavonas en C-3'' o C-6'' con C-3'. La posición de unión de las dos unidades de flavonas se confirmó por el experimento HMBC como (3'→8'') en base a la correlación a tres enlaces HMBC entre el H-2' y el C-8'' (Figura 37).

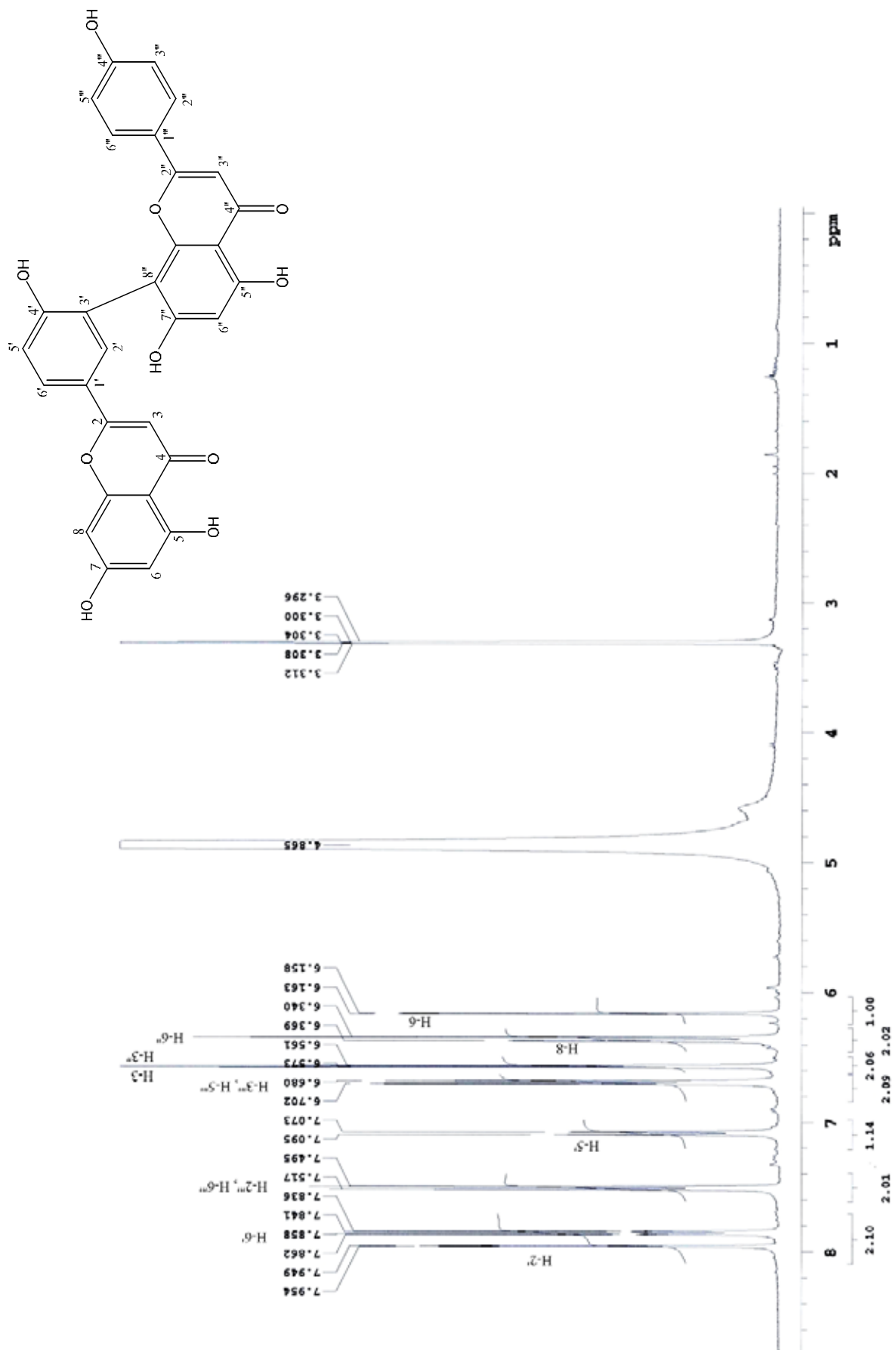


Figura 35. Amentoflavona (1). Espectro RMN  $^1\text{H}$ .

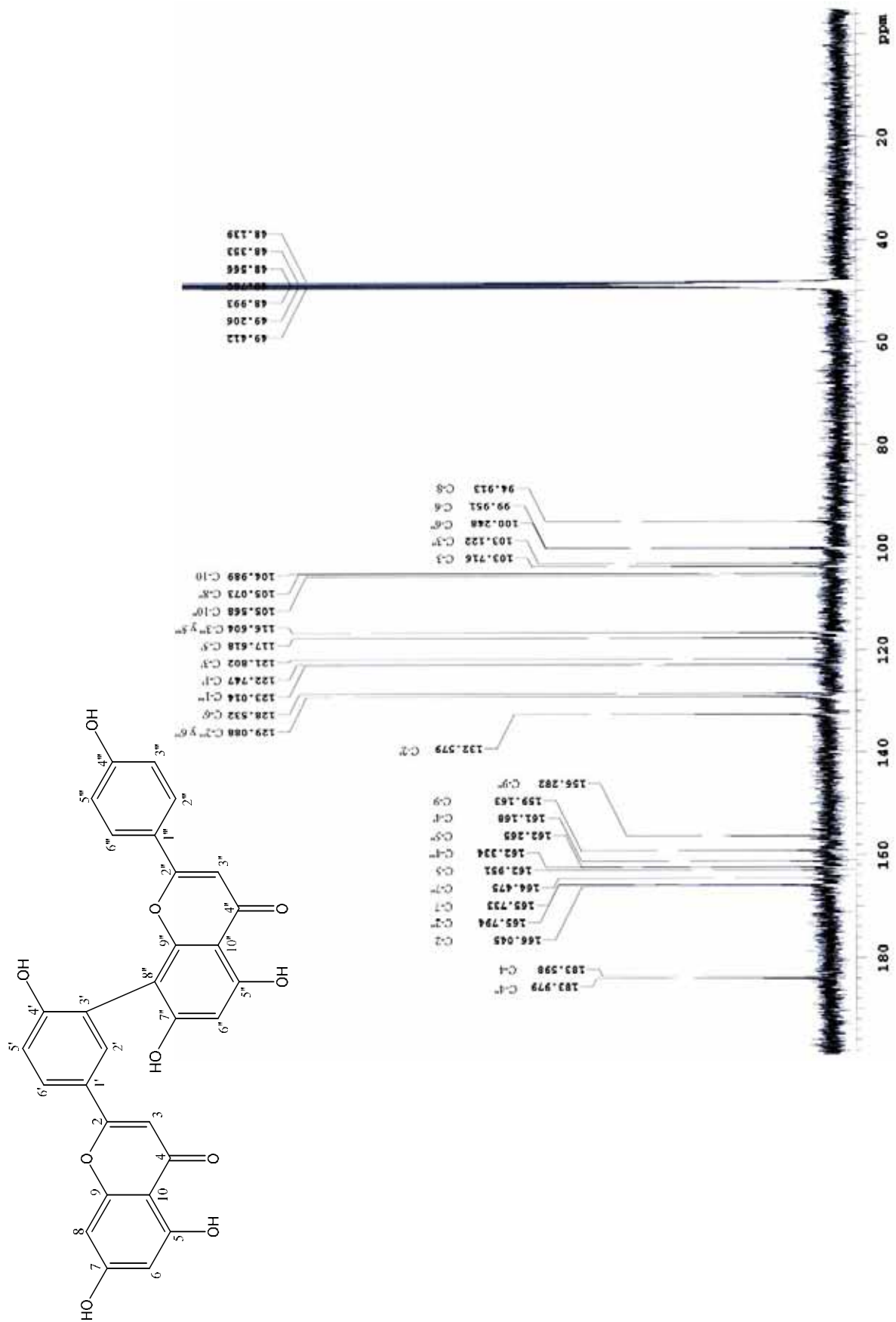


Figura 36. Amentoflavona (1). Espectro RMN  $^{13}\text{C}$ .

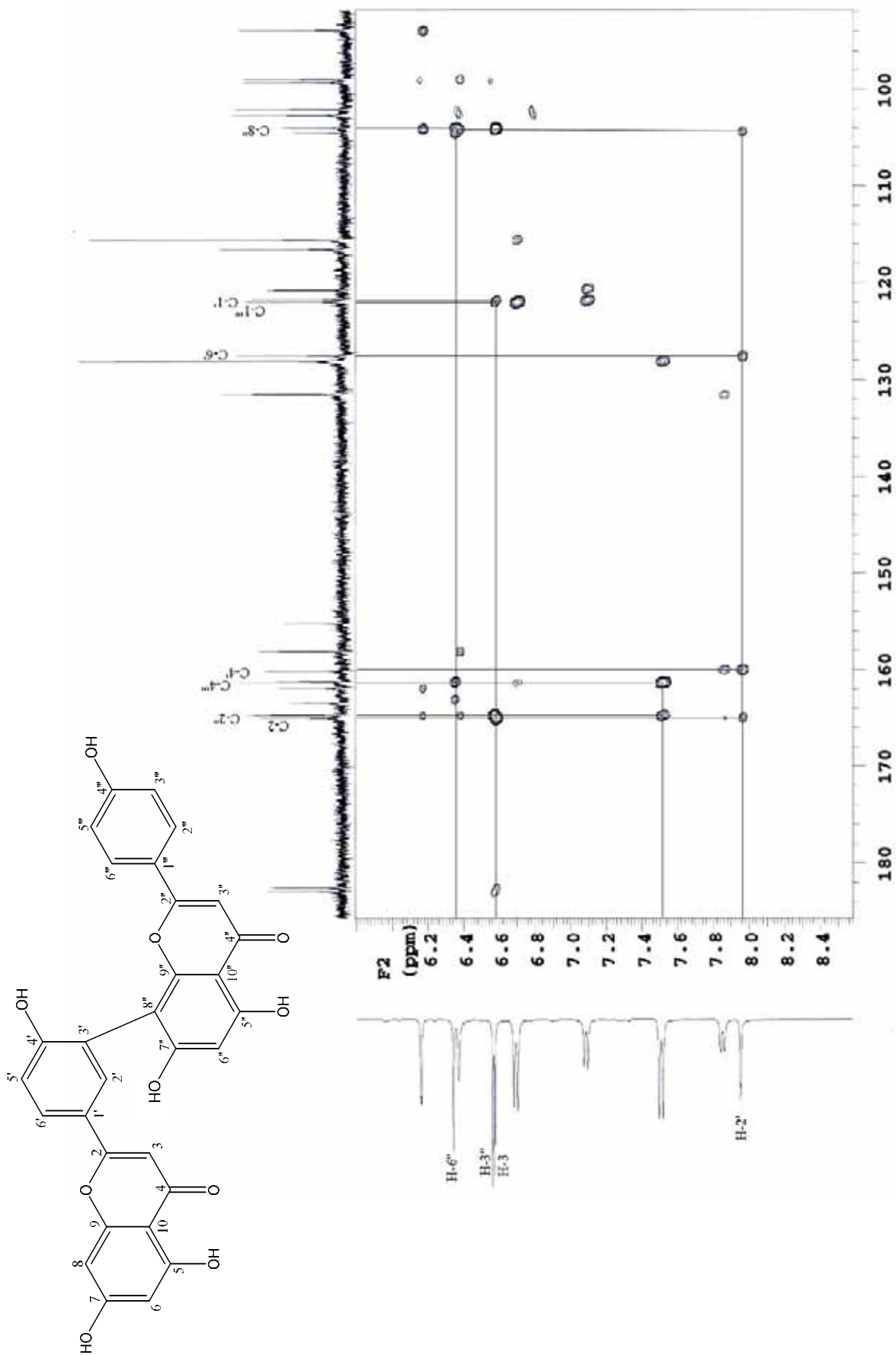


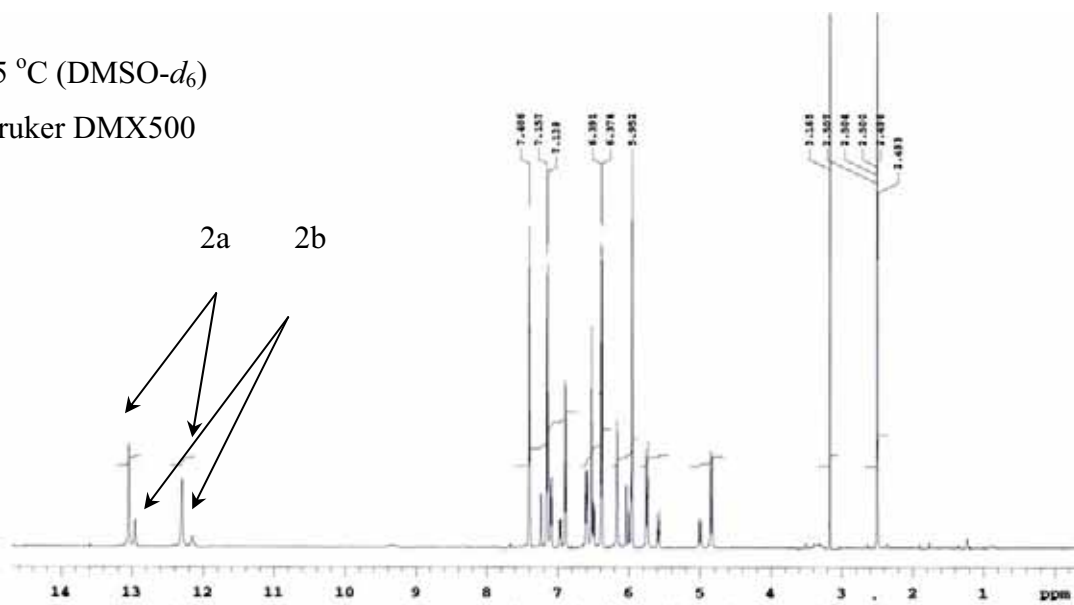
Figura 37. Amentoflavona (1). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  183.97 (s, C-4"), 183.59 (s, C-4), 166.04 (s, C-2), 165.79 (s, C-2"), 165.73 (s, C-7), 164.47 (s, C-7"), 162.95 (s, C-5), 162.33 (s, C-4""), 162.26 (s, C-5"), 161.16 (s, C-4'), 159.16 (s, C-9), 156.28 (s, C-9"), 132.57 (d, C-2'), 129.08 (d, C-2""), 129.08 (d, C-6""), 128.53 (d, C-6'), 123.01 (s, C-1""), 122.74 (s, C-1'), 121.80 (s, C-3'), 117.61 (d, C-5'), 116.60 (d, C-3""), 116.60 (d, C-5""), 105.56 (s, C-10"), 105.07 (s, C-8"), 104.98 (s, C-10), 103.71 (d, C-3), 103.12 (d, C-3""), 100.24 (d, C-6"), 99.95 (d, C-6), 94.91 (d, C-8). Acorde con los resultados, el compuesto (**1**) fue determinado como amentoflavona, un biflavonoide con anclaje (3'→8'')-interflavonoide en concordancia con previas investigaciones (Chari *et al.*, 1977; Markham *et al.*, 1987; Fonseca *et al.*, 2000).

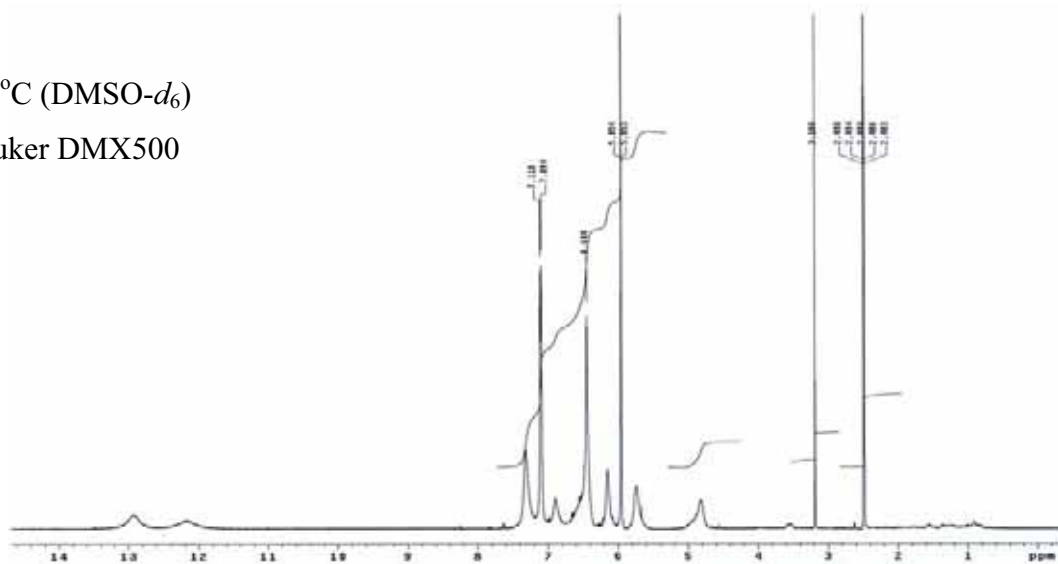
**3.3.1.2. Morelloflavona (2).** El compuesto fue aislado como un polvo cristalino de color amarillo rojizo, pf 280-282°C.  $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 188^\circ$  (MeOH; *c* 0.1). UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 210 (4.56), 235 (sh, 4.54), 285 (sh, 4.30), 345 (4.16) nm. IR  $\nu_{\text{max}}$ : 3.400 (br), 1.642, 1.610, 1.515, 1.365, 1.260, 1.162, 1.088, 840  $\text{cm}^{-1}$ . EM 70 eV *m/z* (int rel.): 557  $[\text{M}+1]^+$  (2), 556  $[\text{M}]^+$  (4), 430 (11), 326 (20), 125.9 (95), 94 (100). En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  tomado en  $\text{DMSO}-d_6$  a temperatura ambiente, los picos principales estuvieron acompañados por picos de menor intensidad con similares desplazamientos químicos. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a temperatura ambiente fue igualmente complejo. La pobre resolución en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de biflavonoides tipo flavanona-(3→8'')-flavanonas a temperatura ambiente ya fue observada por Jackson *et al.* (1971). Tal fenómeno se atribuyó a la existencia de varias conformaciones de las moléculas a temperatura ambiente o inferiores, que resultaban de los puentes de hidrógeno tanto intra- como intermoleculares de varios grupos hidroxilos. Es así como se reportó la presencia de confórmeros en dos biflavonoides tipo flavanona-(3→8'')-flavonol: garcinianina y pancibiflavonol (Terashima *et al.*, 1995), y recientemente, en flavanona-(3→8'')-flavanonol (Han *et al.*, 2005) y en diferentes biflavonoides flavanona-(3→8'')-flavona (Li *et al.*, 2002). La duplicación de señales en el compuesto **2**, en la proporción 1:0.5 y 1:0.3 en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  y  $\text{DMSO}-d_6$  respectivamente, sugiere la existencia de dos confórmeros a temperatura ambiente. La principal razón de la existencia de tales confórmeros son las restricciones de rotación alrededor del enlace C3→C8''. El aumento de la temperatura revela cambios en el espectro tal como muestra la Figura 38. A 100 °C (temperatura máxima utilizada en este experimento), se observó un grupo simple de señales a partir de un único confórmero. Los desplazamientos químicos de las señales de **2** a 100 °C son aproximadamente, el promedio de los desplazamientos químicos de los dos confórmeros a temperatura ambiente (Li *et al.*, 2002). Pasada una hora, y

25 °C (DMSO- $d_6$ )

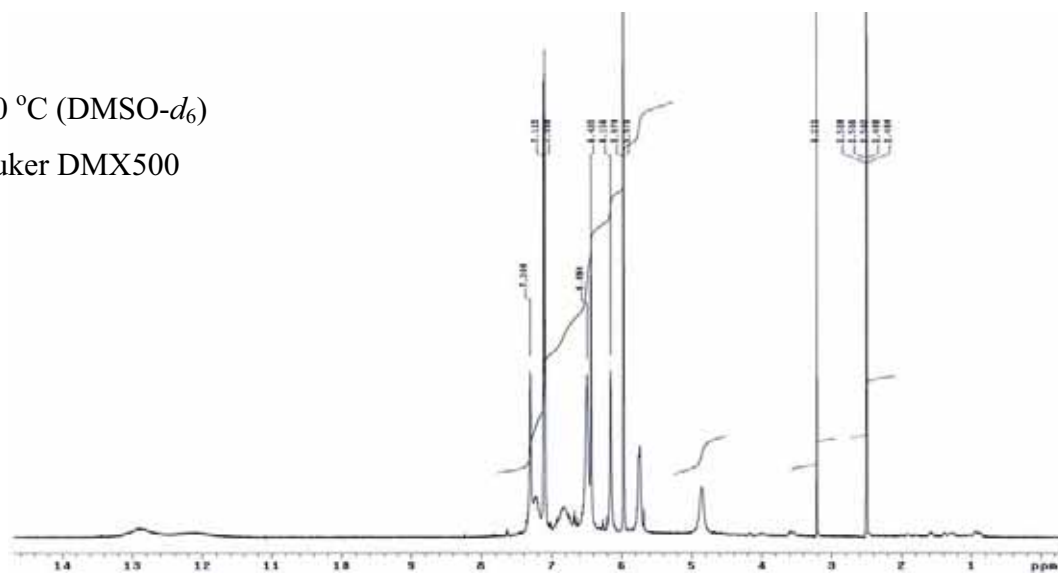
Bruker DMX500

80 °C (DMSO- $d_6$ )

Bruker DMX500

100 °C (DMSO- $d_6$ )

Bruker DMX500



**Figura 38.** Experimento de RMN  $^1\text{H}$  a temperatura variable de Morelloflavona (2).

utilizando la misma muestra a 25 °C, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostró el mismo ratio de los dos conformeros. Este experimento de RMN a temperatura variable confirmó la presencia de dos conformeros distintos del compuesto **2** en solución a temperatura ambiente.

Para facilitar la asignación de las señales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  a temperatura ambiente de los dos conformeros del compuesto **2** (**a** y **b**) en solución, fueron utilizados experimentos de RMN 2D incluyendo COSY, HMQC y HMBC. Las señales de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 39 y 40) y RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 41) del conformero principal (**2a**) fueron inequívocamente asignadas y listadas en la Tabla 5. Para el conformero minoritario (**2b**), se asignó solamente las señales de RMN  $^1\text{H}$  ya que las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  fueron, generalmente, de baja intensidad. El espectro  $^1\text{H}$  mostró la presencia de un protón aromático a  $\delta = 6.16$  asignado a H-6". El singulete ancho para dos protones a  $\delta = 5.95$ , se asignó a los protones H-6 y H-8. El protón H-3" mostró un singulete a  $\delta = 6.52$ . Basándonos en la correlación  $^1\text{H}-^1\text{H}$  (COSY), en la conectividad heteronuclear a larga distancia (HMBC) y en las constante de acoplamiento, los dos dobletes que integran para cuatro protones aromáticos a  $\delta = 7.14$  ( $d, J = 9.0$ ) y  $6.38$  ( $d, J = 8.5$ ) se asignaron al sistema  $A_2B_2$  (H-2'/6' y H-3'/5', respectivamente). Los protones del anillo E muestran un patrón ABX consistente con un doblete *orto* como  $\delta = 6.89$  ( $d, J = 8.5$ ) asignado a H-5"', un doblete ancho a  $\delta = 7.39$  ( $brd, J = 8.5$ ) correspondiente a H-6"' y un singulete ancho a  $\delta = 7.40$  correspondiente con H-2"". Este sistema fue confirmado por HMBC. La estereo-estructura relativa del compuesto **2** fue identificada por poseer una relación *trans* entre las posiciones 2 y 3 debido a la constante de acoplamiento de  $J_{2,3} = 11.5$  Hz. La correlación a larga distancia (HMBC) fue útil en la asignación de los carbonos cuaternarios tal como muestra la Figura 42. Entre las principales correlaciones a tres enlaces, están la del H-2 con los correspondientes C-4, C-2', C-6' y C-8", las cuales fueron útiles para designar una unión inter-flavonoide de tipo 3→8".

La configuración absoluta del compuesto **2** se confirmó por su curva de dicroísmo circular (CD) como  $2R,3S$  (Li *et al.*, 2002). La inspección en la curva de CD (Figura 43) de los compuestos **2** y **5** indican efectos Cotton positivos para las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$  alrededor de 345 y 285 nm, respectivamente. La alta amplitud del efecto Cotton positivo sobre 285 indica una orientación  $\beta$  del anillo B y por lo tanto una configuración absoluta  $2R$  (Li *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta los datos de CD y las constantes de acoplamiento del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto **2** ( $J_{2,3}$ , ca. 11.5 Hz), se facilita la asignación de una configuración relativa de las posiciones 2,3 en *trans* y una configuración absoluta  $3S$ .

**Tabla 5.** Datos de RMN  $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  a 25°C de Morelloflavona (**2**) ( $\delta$  en ppm).

Protón	$^1\text{H}$ en DMSO- $d_6$ ( $J$ en Hz)		$^1\text{H}$ en CD $_3$ OD ( $J$ en Hz)		$^{13}\text{C}$ en CD $_3$ OD
	<b>2a</b>	<b>2b</b>	<b>2a</b>	<b>2b</b>	
H-2	5.74 <i>d</i> (11.5)	5.58 <i>d</i> (12.5)	5.72 <i>d</i> (12.3)	5.60 <i>d</i> (12.0)	82.62 <i>d</i>
H-3	4.84 <i>d</i> (11.5)	5.00 <i>d</i> (12.0)	4.78 <i>d</i> (12.0)	**	48.41 <i>d</i>
					197.89 <i>s</i> (C-4)
					164.81 <i>s</i> (C-5)
H-6	5.95 <i>brs</i>	5.99 <i>brs</i>	5.95 <i>brs</i> *	6.01 <i>brs</i>	96.62 <i>d</i>
					165.65 <i>s</i> (C-7)
H-8	5.95 <i>brs</i>	5.96 <i>brs</i>	5.93 <i>brs</i> *	5.97 <i>brs</i>	96.94 <i>d</i>
					168.88 <i>s</i> (C-9)
					103.07 <i>s</i> (C-10)
					130.60 <i>s</i> (C-1')
H-2'	7.14 <i>d</i> (9.0)	7.09 <i>d</i> (8.5)	7.08 <i>d</i> (8.1)	7.06 <i>d</i> (8.1)	129.26 <i>d</i>
H-3'	6.38 <i>d</i> (8.5)	6.60 <i>d</i> (8.5)	6.40 <i>d</i> (8.1)	6.62 <i>d</i> (8.1)	115.52 <i>d</i>
					158.49 <i>s</i> (C-4')
H-5'	6.38 <i>d</i> (8.5)	6.60 <i>d</i> (8.5)	6.40 <i>d</i> (8.1)	6.62 <i>d</i> (8.1)	115.52 <i>d</i>
H-6'	7.14 <i>d</i> (9.0)	7.09 <i>d</i> (8.5)	7.08 <i>d</i> (8.1)	7.06 <i>d</i> (8.1)	129.26 <i>d</i>
HO-5	12.28 <i>s</i>	12.16 <i>s</i>			
					165.70 <i>s</i> C-2'')
H-3''	6.52 <i>s</i>	6.58 <i>s</i>	6.34 <i>s</i>	6.49 <i>s</i>	103.26 <i>d</i>
					183.74 <i>s</i> (C-4'')
					162.50 <i>s</i> (C-5'')
H-6''	6.16 <i>s</i>	6.03 <i>s</i>	6.22 <i>s</i>	6.03 <i>s</i>	100.08 <i>d</i>
					164.07 <i>s</i> (C-7'')
					102.16 <i>s</i> (C-8'')
					157.44 <i>s</i> (C-9'')
					104.72 <i>s</i> (C-10'')
					123.31 <i>s</i> (C-1''')
H-2'''	7.40 <i>brs</i>	7.23 <i>d</i> (2.0)	7.30 <i>brs</i>	7.20 <i>brs</i>	114.12 <i>d</i>
					146.85 <i>s</i> (C-3''')
					151.04 <i>s</i> (C-4''')
H-5'''	6.89 <i>d</i> (8.5)	6.49 <i>d</i> (8.0)	6.86 <i>d</i> (8.4)	6.54 <i>d</i> (7.8)	116.84 <i>d</i>
H-6'''	7.39 <i>brd</i> (8.5)	6.96 <i>dd</i> (2.0, 8.0)	7.25 <i>brd</i> (8.1)	7.08 <i>d</i> (8.1)	120.51 <i>d</i>
OH-5''	13.03 <i>s</i>	12.96 <i>s</i>			

La serie **a** representa el conformero principal a 25°C; la serie **b** representa el conformero minoritario a 25°C.

\* Señales intercambiables.

\*\* Solapamiento con señal del solvente.





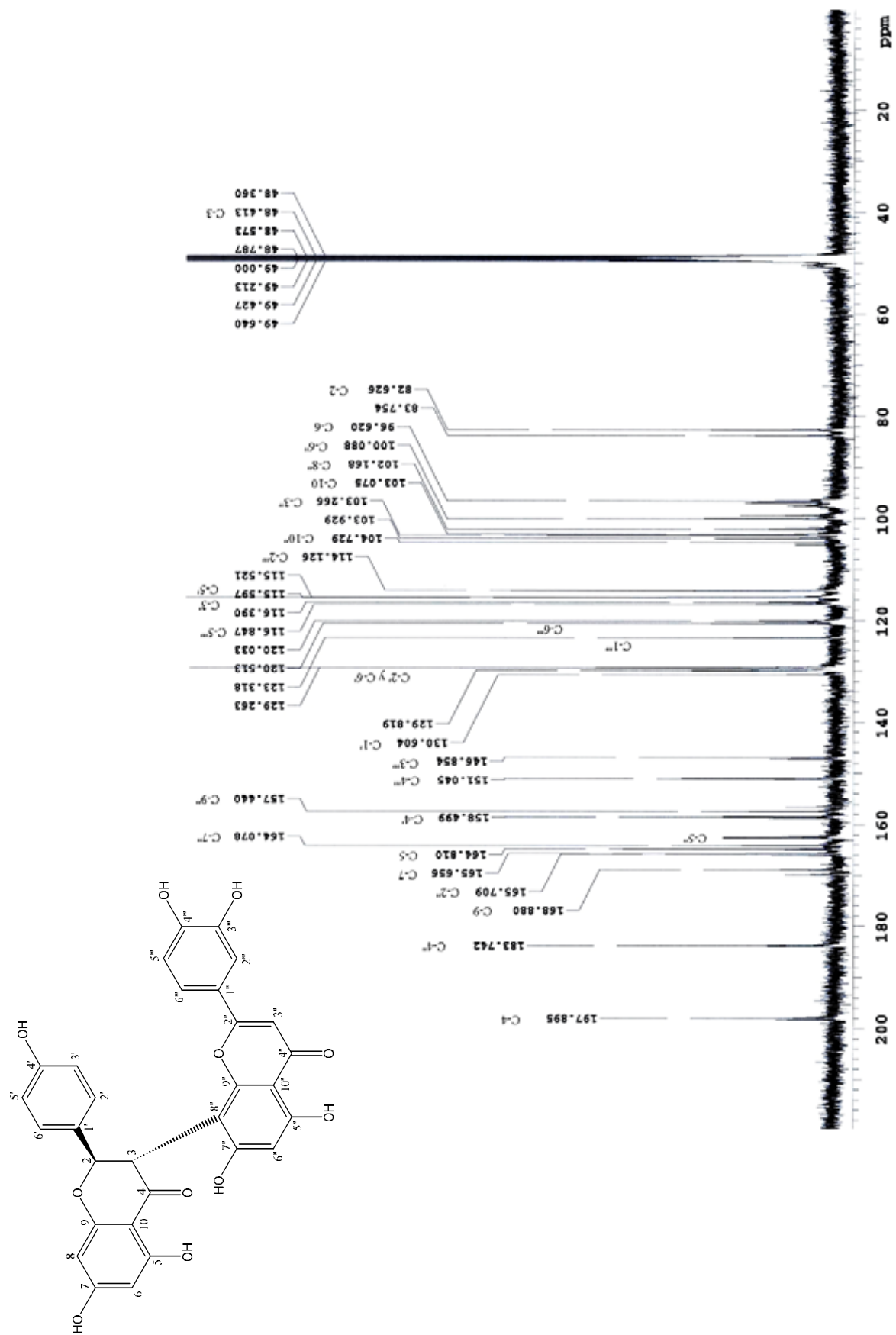
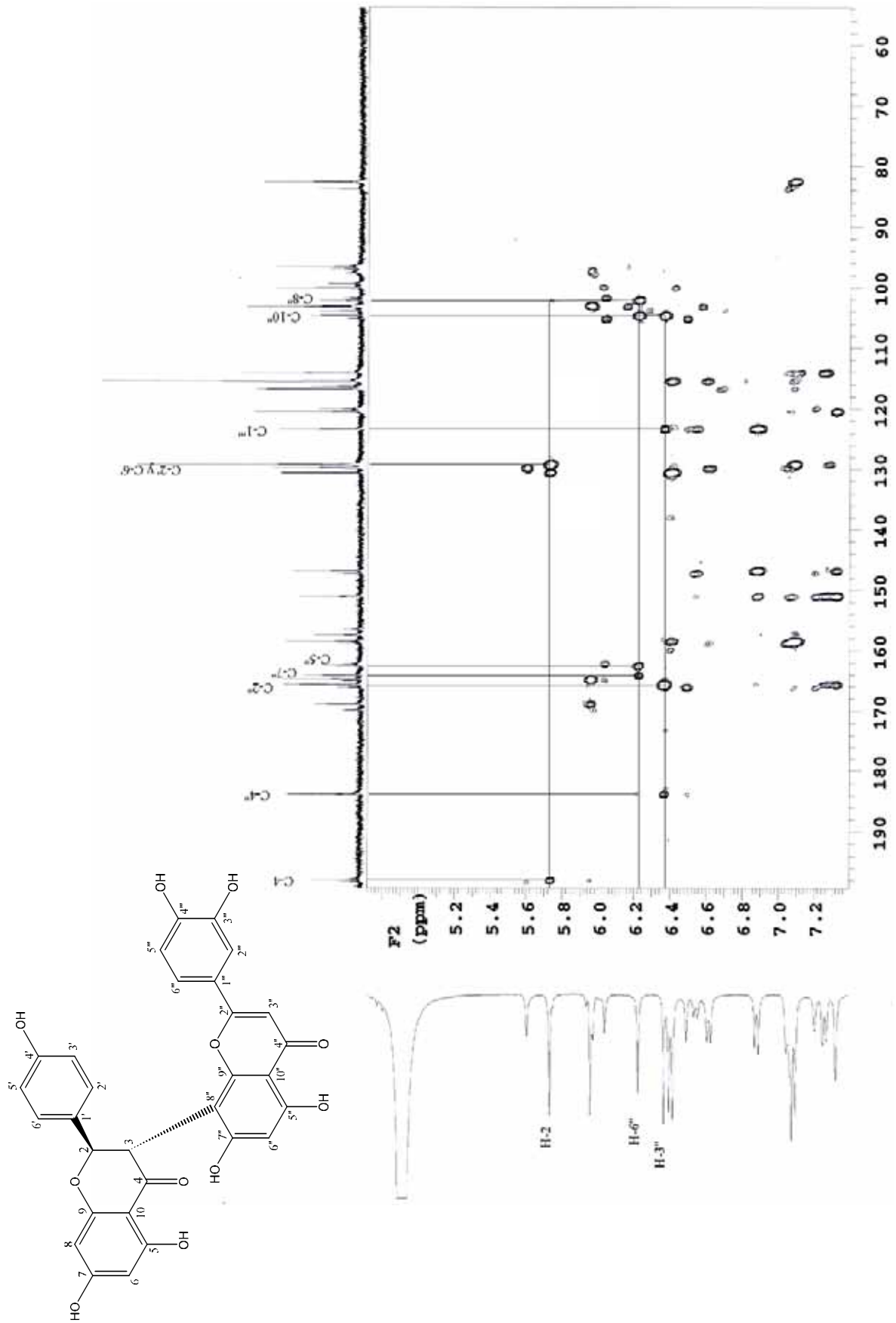
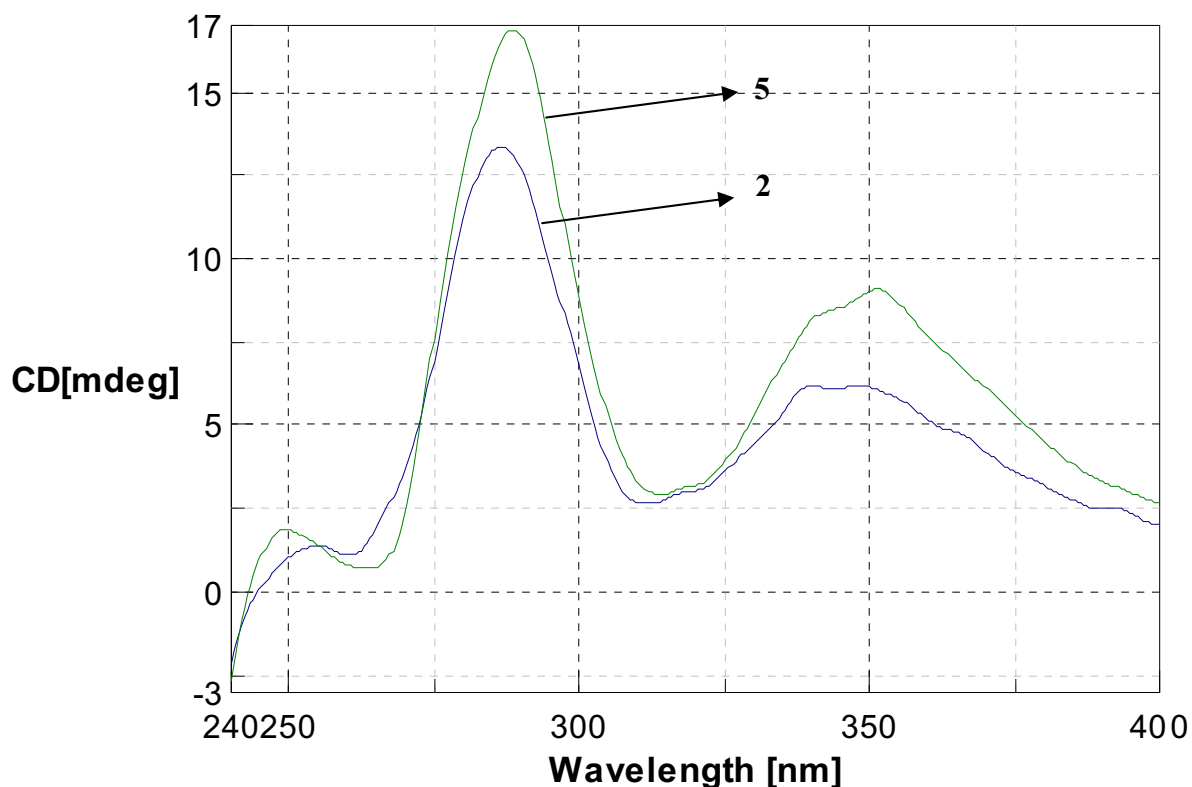


Figura 41. Morelloflavona (2). Espectro RMN <sup>13</sup>C (400 MHz).

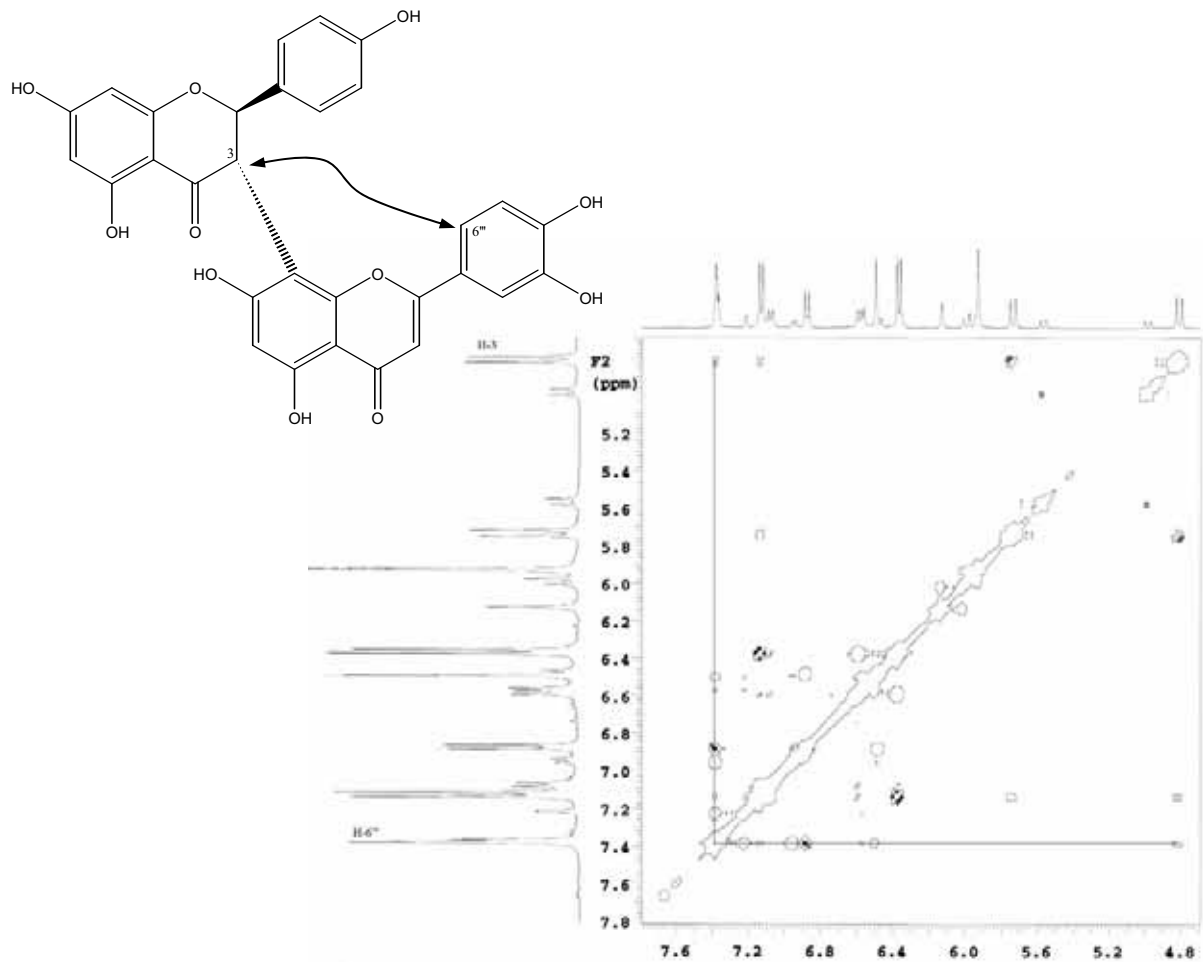


**Figura 42.** Morelloflavona (2). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

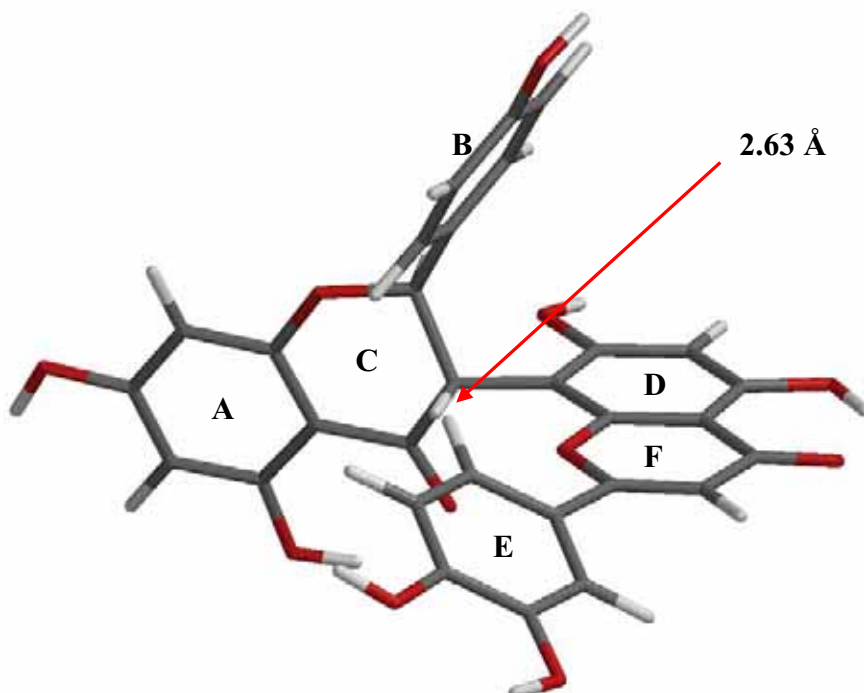


**Figura 43.** Espectro CD de los compuestos **2** y **5**.

En concordancia con lo anterior, fue utilizado el experimento NOESY a temperatura ambiente en DMSO- $d_6$  para determinar la correlación espacial entre protones relacionados de los dos conformeros en solución (Figura 44). Una señal fue observada entre los protones H-3 del anillo C y H-6''' del anillo E del conformero principal. Esto indica claramente que la unidad flavona DEF está extendida por encima del plano A/C de la unidad flavanona. Dicha correlación NOE no fue observada en el conformero minoritario. Para explorar la conformación del conformero principal, se utilizó cálculos computacionales usando el software Spartan Pro. La optimización final indicó que la estructura más estable del compuesto **2a**, presentaba una entalpía de  $-311,389$  Kcal/mol. El cálculo de la distancia entre H-3 y H-6''' en la estructura de este conformero fue de  $2.63$  Å, explicando la presencia de la correlación NOE entre los dos protones en el espectro NOESY (Figura 45). A partir de los datos espectroscópicos mostrados, el compuesto **2** fue hallado por ser estructuralmente idéntico con el biflavonoide (+)-morelloflavona (Li *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2005).



**Figura 44.** Morelloflavona (2). Correlaciones NOE (500 MHz, DMSO- $d_6$ ).



**Figura 45.** Confórmero principal de morelloflavona (2a).

**3.3.1.3. Volkensiflavona (3):** El compuesto **3** se identificó como volkensiflavona por comparación de sus datos físicos y espectrales con los reportados para este compuesto en la literatura (Herbin *et al.*, 1970; Chari *et al.*, 1977). Se aisló como cristales amarillos, *mp* 290-292°C.  $[\alpha]_D^{20} + 2^\circ$  (MeOH; *c* 0.10).  $UV_{max}$  (MeOH) nm ( $\log \epsilon$ ): 215 (2.15), 275 (2.02), 290 (2.42), 350 (2.29).  $IR_{v_{max}}$   $cm^{-1}$ : 3.545, 1.640, 1.610, 1.495. El EM (70 eV) mostró un pico base a *m/z* 540 correspondiente con la fórmula  $C_{30}H_{20}O_{10}$ . Otros picos correspondieron a (int rel.): 414 (14), 310 (19), 127 (17), 126 (91), 94 (100). El compuesto **3** mostró similar complejidad en el espectro de RMN  $^1H$  que el compuesto **2**, fenómeno característico de biflavonoides con enlace inter-flavonoide C3→C8". Sin embargo, mientras que **2** presentó un simple sistema  $A_2B_2$ , los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  del compuesto **3** (Figuras 46, 47 y 48) mostraron dos sets de señales aromáticas debido al sistema  $A_2B_2$  adicional del anillo E. RMN  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : confórmero principal (**3a**), 7.88 (2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-2", H-6"), 7.09 (2H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.93 (2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-3"', H-5'''), 6.57 (1H, *s*, H-6"), 6.35 (2H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 6.18 (1H, *s*, H-3"), 5.92 (2H, *brs*, H-6, H-8), 5.71 (1H, *d*,  $J = 12.4$  Hz, H-2), 4.90 (1H, *d*,  $J = 12.4$  Hz, H-3). Confórmero menor (**3b**), 7.59 (2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-2"', H-6'''), 7.08 (2H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.72 (1H, *s*, H-6"), 6.62 (2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-3''', H-5'''), 6.58 (2H, *d*,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 6.03 (1H, *s*, H-3"), 6.01 (1H, *s*, H-6), 5.96 (1H, *s*, H-8), 5.53 (1H, *d*,  $J = 12.4$  Hz, H-2), 4.98 (1H, *d*,  $J = 12.4$  Hz, H-3). Los protones H-6 y H-8 pueden ser intercambiables. Solo se muestran las señales de RMN  $^{13}C$  para el confórmero principal, las señales de **3b** fueron de baja intensidad. RMN  $^{13}C$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  198.47 (*s*, C-4), 183.42 (*s*, C-4"), 168.85 (*s*, C-9), 165.84 (*s*, C-2"), 165.10 (*s*, C-7), 164.78 (*s*, C-7"), 163.25 (*s*, C-4'''), 162.44 (*s*, C-5), 159.21 (*s*, C-5"), 157.38 (*s*, C-4'), 156.49 (*s*, C-9"), 130.62 (*d*, C-2'''), 130.62 (*d*, C-6'''), 130.43 (*d*, C-2'), 130.43 (*d*, C-6'), 130.04 (*s*, C-1'), 122.80 (*s*, C-1'''), 117.95 (*d*, C-3'''), 117.95 (*d*, C-5'''), 116.36 (*d*, C-3'), 116.36 (*d*, C-5'), 104.82 (*s*, C-10"), 104.03 (*d*, C-3"), 103.44 (*s*, C-10), 102.91 (*s*, C-8"), 100.98 (*d*, C-6"), 98.12 (*d*, C-6), 97.22 (*d*, C-8), 82.79 (*d*, C-2), 50.16 (*d*, C-3).

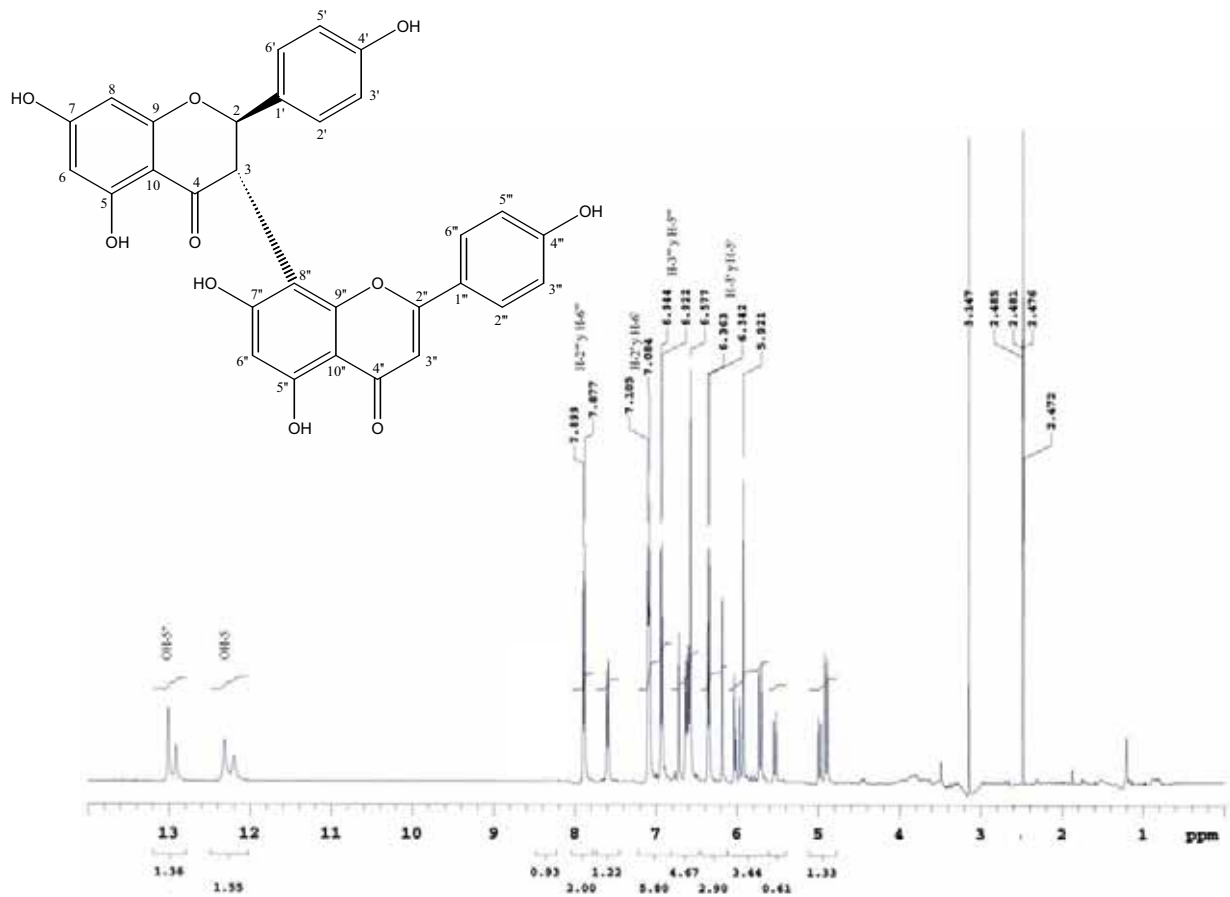


Figura 46. Volkensiflavona (3). Espectro RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{DMSO}-d_6$ .

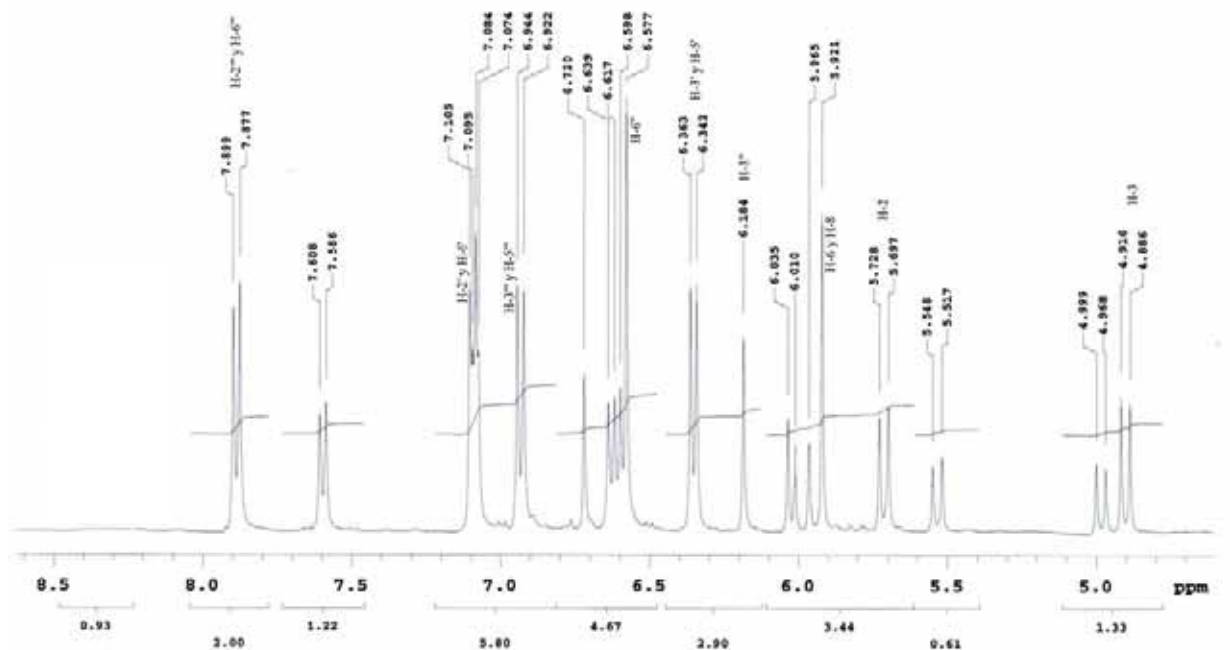


Figura 47. Volkensiflavona (3). Ampliación espectro RMN  $^1\text{H}$  en  $\text{DMSO}-d_6$ .

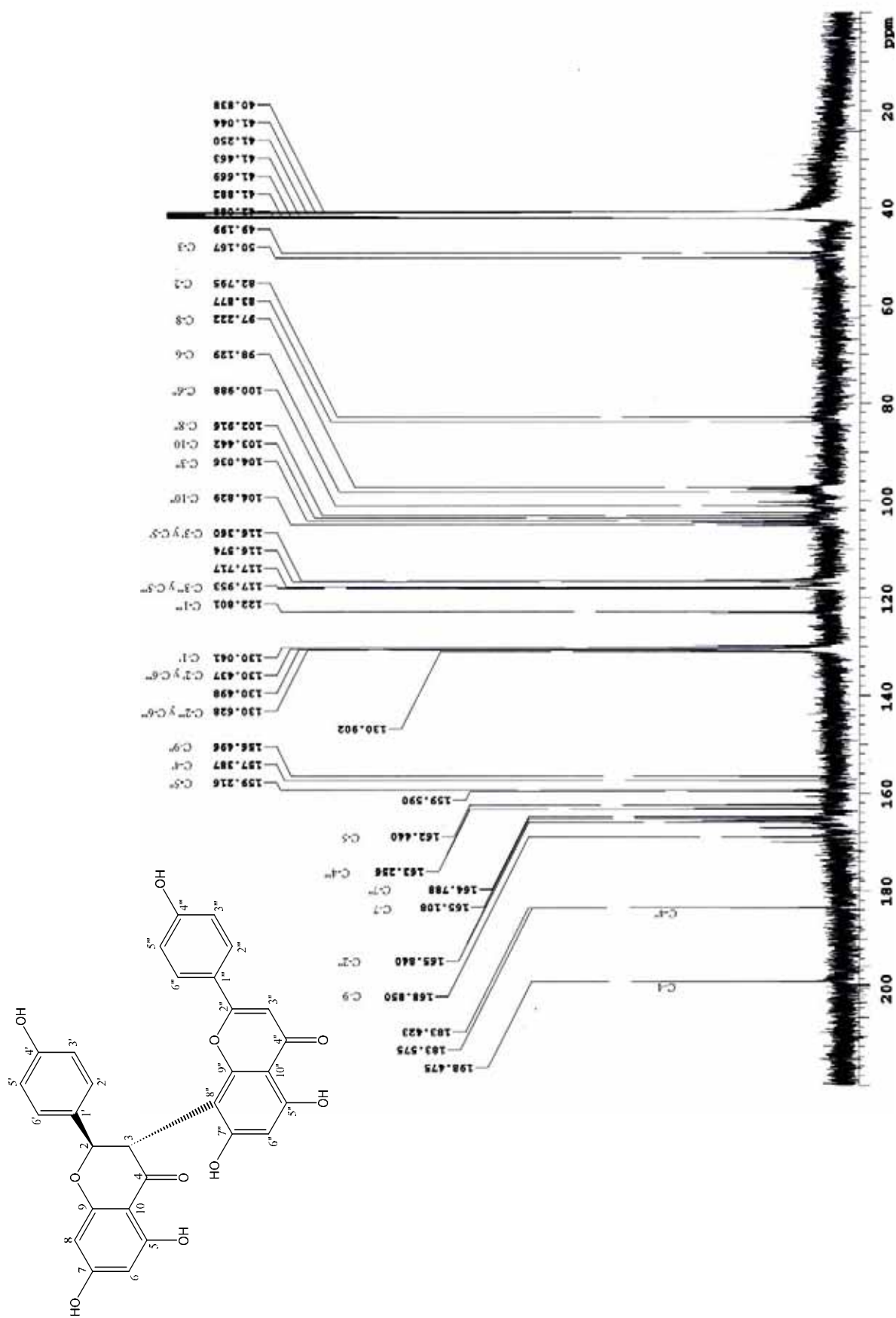


Figura 48. Volkensiflavona (3). Espectro RMN <sup>13</sup>C.



**3.3.1.4. Fukugisido (4).** El compuesto se aisló como un polvo de color blanco grisáceo, pf 242-243°C.  $[\alpha]_D^{20} + 25^\circ$  (MeOH;  $c$  0.1). UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 215 (3.44), 234 (3.96), 275 (sh, 4.22), 359 (3.98) nm. IR  $\nu_{max}$ : 3300 (br), 1.640, 1.600, 1.520, 1.160  $\text{cm}^{-1}$ . EM 70 eV  $m/z$  (int rel.): 719  $[M+1]^+$  (6), 718  $[M]^+$  (8), 430 (11), 326 (20), 125.9 (95), 94 (100). Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en  $\text{CD}_3\text{OD}$  a temperatura ambiente sugirieron la existencia de dos conformeros debido a su comportamiento rotamérico (atropisomerismo). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  presentó una gran similitud con el compuesto **2**, además de las señales características para un compuesto glucosidado (Figura 49). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : conformero principal (**4a**), 7.33 (1H, brs, H-2'''), 7.28 (1H, brd,  $J = 8.0$  Hz, H-6'''), 7.11 (2H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.88 (1H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-5'''), 6.65 (1H,  $s$ , H-6''), 6.41 (1H,  $s$ , H-3''), 6.36 (2H,  $d$ ,  $J = 8.0$  Hz, H-3', H-5'), 5.98 (1H,  $d$ ,  $J = 1.2$  Hz, H-8), 5.93 (1H,  $d$ ,  $J = 1.2$  Hz, H-6), 5.76 (1H,  $d$ ,  $J = 12.0$  Hz, H-2), 5.16 (1H,  $d$ ,  $J = 7.6$  Hz, H-1'''), 4.86 para H-3 presentó solapamiento con señales del solvente [en  $\text{DMSO}-d_6$ : 5.39 (1H,  $d$ ,  $J = 12.5$  Hz, H-3)], 3.91 (1H,  $d$ ,  $J = 11.6$  Hz, H-6a'''), 3.72 (1H,  $dd$ ,  $J = 5.6, 11.8$  Hz, H-6b'''), 3.47 (1H,  $m$ , H-2'''), 3.35 (1H,  $m$ , H-3'''), 3.30 (1H,  $m$ , H-4'''), 3.28 (1H,  $m$ , H-5'''). Conformero menor (**4b**), 7.23 (1H, brs, H-2'''), 7.10 (1H,  $dd$ , H-6''') (solapamiento con otras señales), 7.10 (2H,  $d$ , H-2', H-6') (solapamiento con otras señales), 6.61 (1H,  $d$ ,  $J = 8.0$  Hz, H-5'''), 6.59 (1H,  $s$ , H-6''), 6.59 (1H,  $s$ , H-3''), 6.55 (2H,  $d$ ,  $J = 7.6$  Hz, H-3', H-5'), 6.03 (1H, brs, H-8), 5.98 (1H, brs, H-6), 5.76 (1H,  $d$ ,  $J = 12.0$  Hz, H-2), 4.72 (1H,  $d$ ,  $J = 7.6$  Hz, H-1'''), 4.86 para H-3 presentó solapamiento con señales del solvente [en  $\text{DMSO}-d_6$ : 4.90 (1H,  $d$ ,  $J = 12.0$  Hz, H-3)], 3.91 (1H,  $m$ , H-6a'''), 3.72 (1H,  $m$ , H-6b'''), 3.47 (1H,  $m$ , H-2'''), 3.35 (1H,  $m$ , H-3'''), 3.30 (1H,  $m$ , H-4'''), 3.28 (1H,  $m$ , H-5'''). Las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  para el conformero minoritario fueron de baja intensidad (Figura 50), por tal razón, solo se asignan las de **4a**. RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  196.40 ( $s$ , C-4), 182.75 ( $s$ , C-4''), 167.131 ( $s$ , C-9), 164.95 ( $s$ , C-2''), 164.58 ( $s$ , C-5), 163.66 ( $s$ , C-7), 161.58 ( $s$ , C-5''), 160.51 ( $s$ , C-7''), 157.32 ( $s$ , C-4'), 155.48 ( $s$ , C-9''), 149.98 ( $s$ , C-4'''), 145.60 ( $s$ , C-3'''), 129.20 ( $s$ , C-1'), 128.25 ( $d$ , C-2'), 128.25 ( $d$ , C-6'), 121.89 ( $s$ , C-1'''), 119.62 ( $d$ , C-6'''), 115.70 ( $d$ , C-5'''), 114.26 ( $d$ , C-3'), 114.26 ( $d$ , C-5'), 113.13 ( $d$ , C-2'''), 105.28 ( $s$ , C-10''), 102.94 ( $s$ , C-8''), 102.40 ( $d$ , C-3''), 102.12 ( $s$ , C-10), 100.35 ( $d$ , C-1'''), 98.36 ( $d$ , C-6''), 96.45 ( $d$ , C-6), 95.27 ( $d$ , C-8), 81.63 ( $d$ , C-2), 77.36 ( $d$ , C-2'''), 77.16 ( $d$ , C-5'''), 74.00 ( $d$ , C-3'''), 69.89 ( $d$ , C-4'''), 61.27 ( $d$ , C-6'''), 49.83 ( $d$ , C-3). La unión del grupo glucosilo con el núcleo biflavonoide fue identificado por la correlación HMBC del protón H-3 y el anomérico H-1'''' con el carbono C-7'' (Figura 51). A partir de los datos espectroscópicos mostrados, el compuesto **4** corresponde a fukugisido o 7''-*O*-glucosil-morelloflavona (Konoshima & Ikeshiro, 1970).

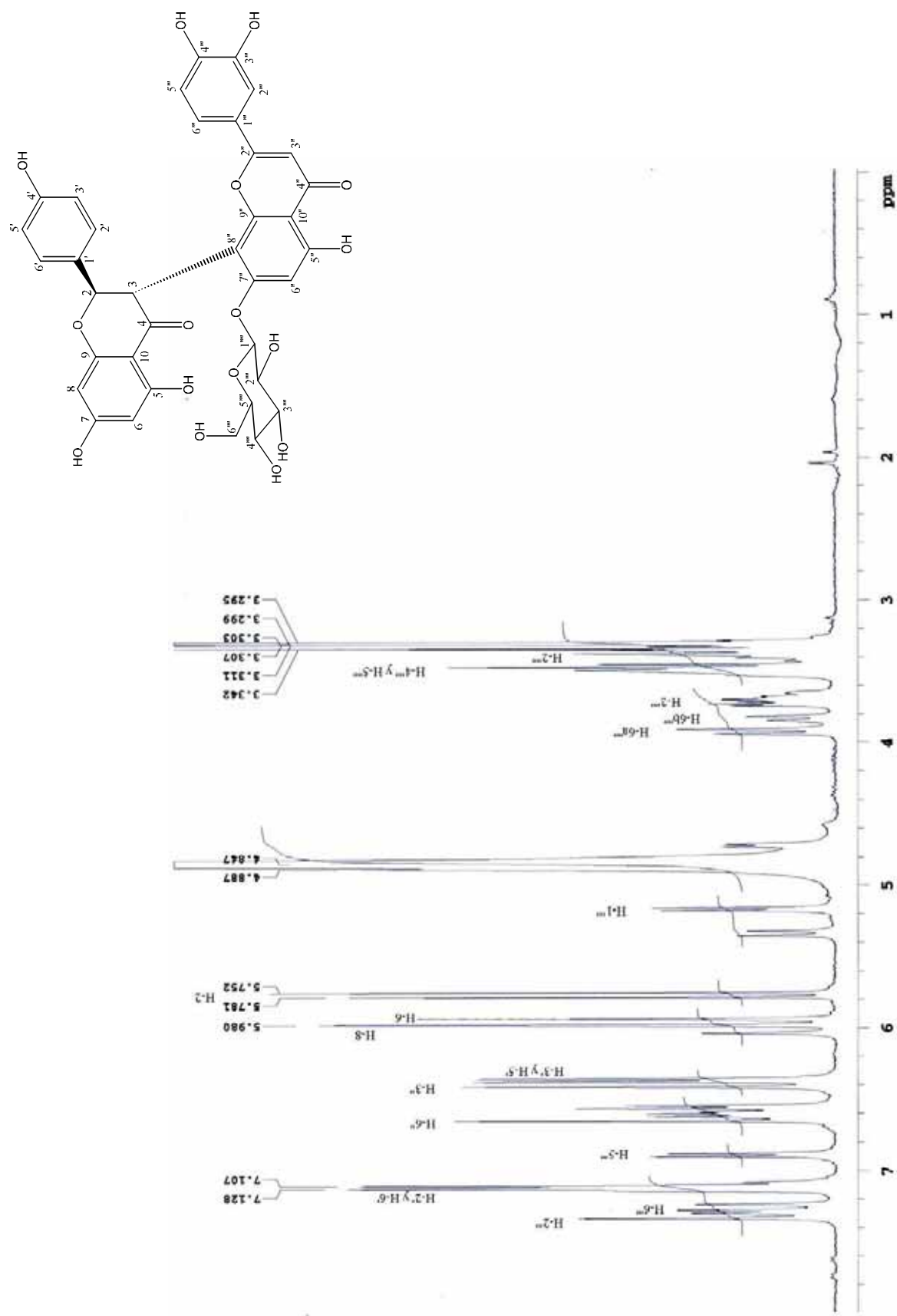


Figura 49. Fukugisido (4). Espectro RMN <sup>1</sup>H.

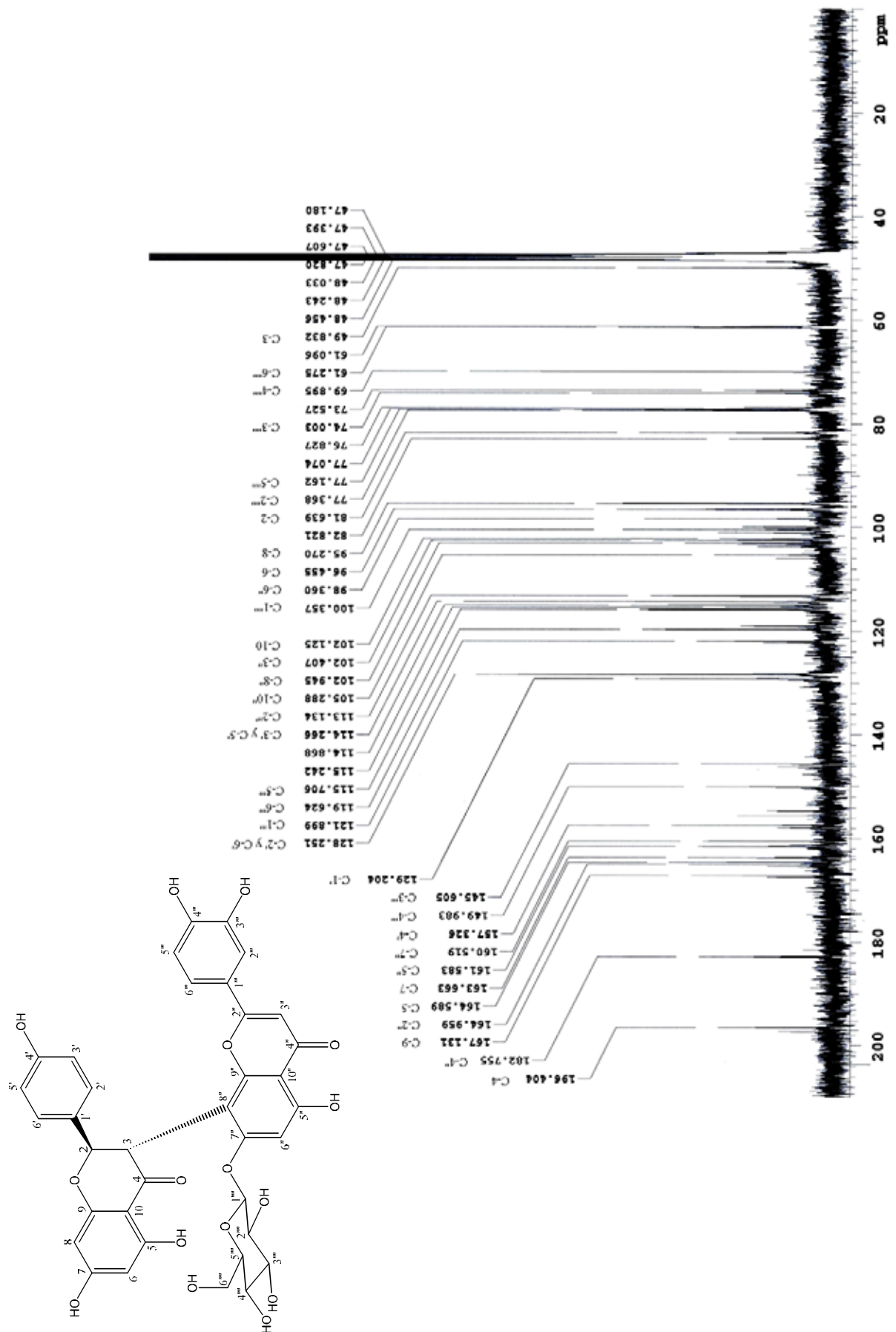
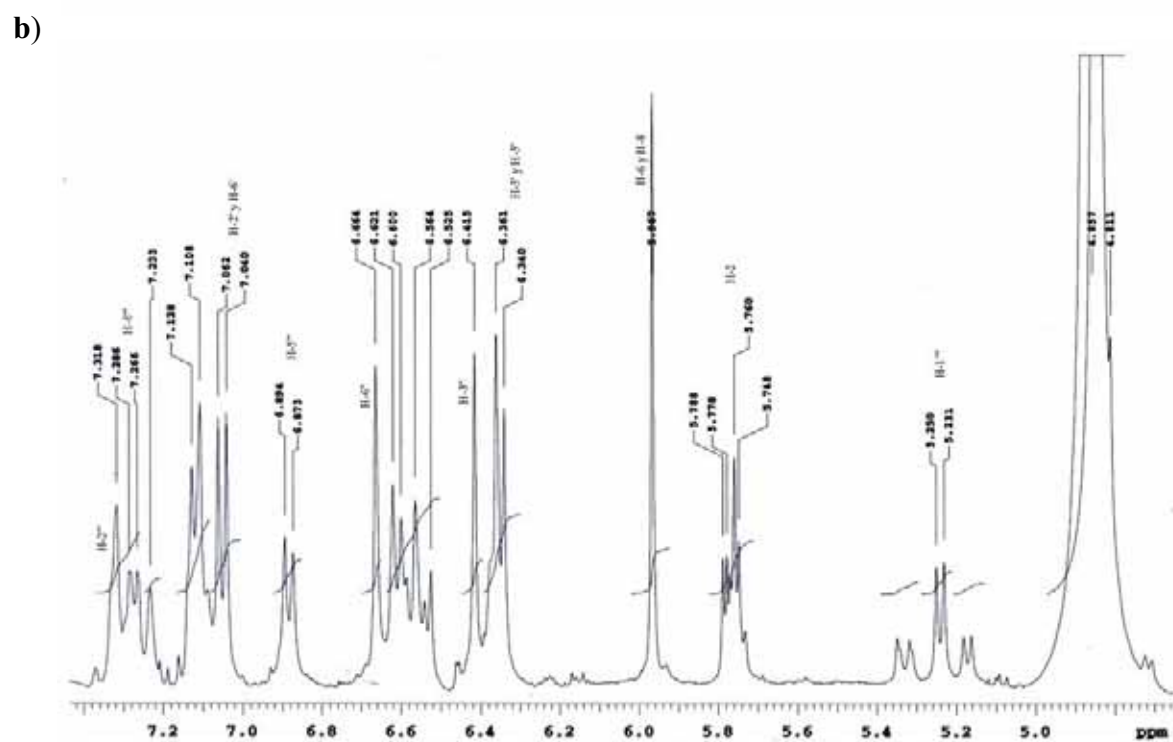
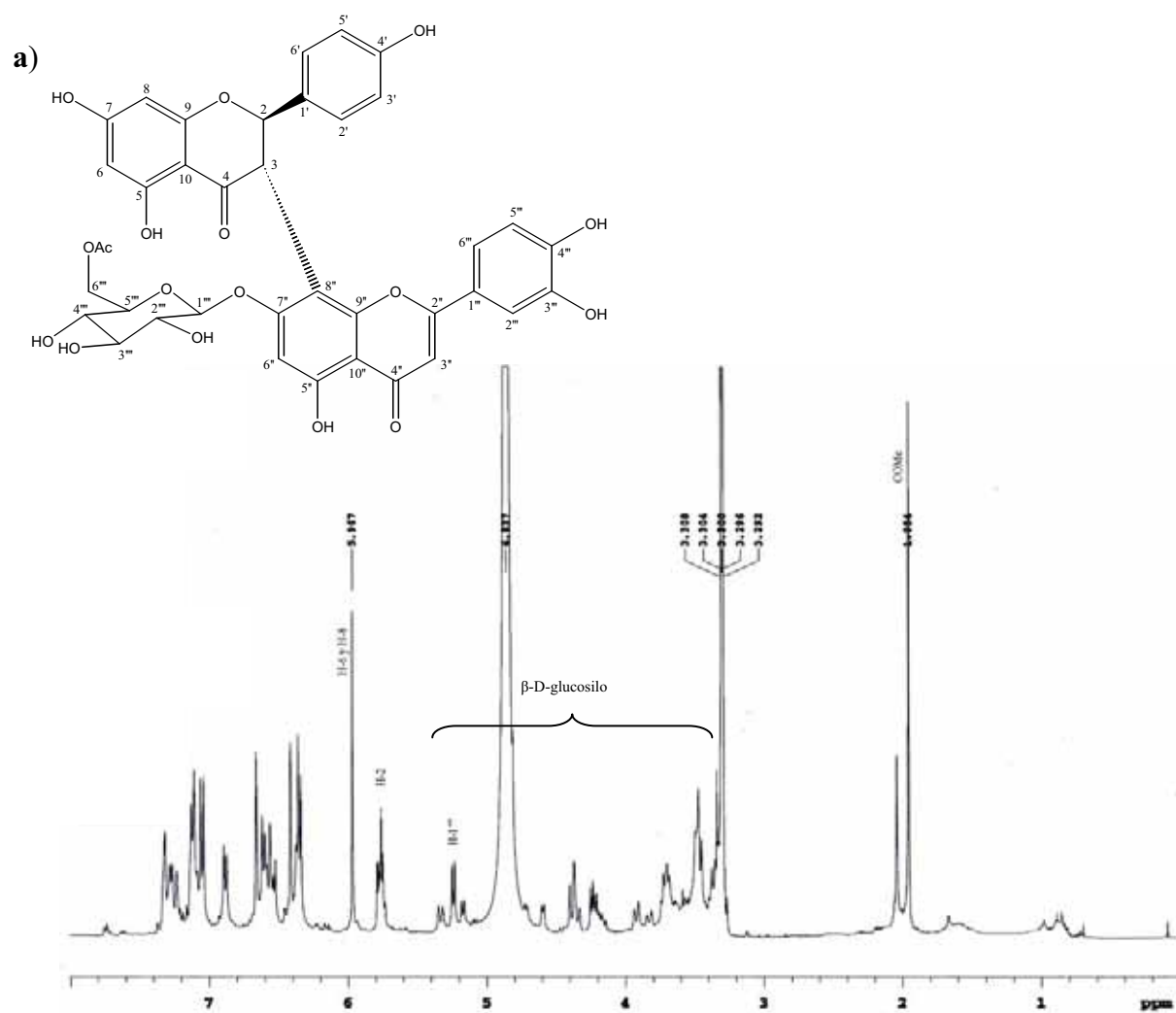


Figura 50. Fukugisido (4). Espectro RMN <sup>13</sup>C.



**3.3.1.5. Madrunoudeasido (5):** El compuesto de estructura  $C_{38}H_{32}O_{17}$ , se obtuvo como un polvo de color castaño claro, p.f. 268-270 °C. En CCF dio un color verde oscuro cuando se reveló con tricloruro férrico en metanol, indicando su naturaleza fenólica. UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 215 (3.61), 225 (4.09), 240 (4.11), 270 (4.04), 335 (sh 3.51) nm. El espectro UV de **5** mostró cambios batocrómicos con NaOMe en la banda I y en la banda II con  $AlCl_3$  y NaOAc, soportando la presencia de grupos hidroxilos libres en las posiciones 4', 5 y 7 (Mabry *et al.*, 1970). En el espectro de RMN  $^1H$  tomado con  $CD_3OD$  a temperatura ambiente (Figura 52), las señales principales estuvieron acompañadas por señales de menor intensidad con similares desplazamientos químicos. El espectro de RMN  $^{13}C$  en  $CD_3OD$  a temperatura ambiente fue igualmente complejo (Figura 53). La duplicación de señales en los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  de **5**, sugiere la existencia de dos conformeros a temperatura ambiente debido a su comportamiento rotamérico (atropisomerismo). Esta clase de compuestos presenta una complejidad a nivel dimérico debido al diferente grado de rotación entre las unidades flavanona y flavona alrededor del eje C-3/C-8" (Li *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2005). El mismo fenómeno fue observado en todos los biflavonoides flavanona-(3→8")-flavona aislados.

Los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (Tabla 6) mostraron para el conformero principal (**5a**), la presencia de dos carbonilos a  $\delta$  197.36 (*s*, C-4) y 184.04 (*s*, C-4") y un grupo carbonilo adicional a  $\delta$  172.75 (*s*,  $O\text{C}OCH_3$ ), en comparación con el espectro de RMN de  $^1H$  de fukugisido (**4**); además, un protón aromático aislado  $\delta$  6.66, asignado a la posición H-6" debido a la correlación a larga distancia con los carbonos C-8" y C-10" (Figura 54); un singlete ancho para dos protones a  $\delta$  5.96, los cuales se asignaron a H-6 y H-8 por la correlación HMBC con C-8 y C-10 y un singlete a  $\delta$  6.41 ubicado en la posición H-3". Basado en la correlación  $^1H$ - $^1H$  (COSY), el espectro de conectividad heteronuclear a larga distancia (HMBC) y las constantes de acoplamiento, los dos dobletes para cuatro protones aromáticos a  $\delta$  7.05 (2H, *d*,  $J = 8.8$ ) y 6.35 (2H, *d*,  $J = 8.4$ ) se asignaron al sistema  $A_2B_2$  [H-2'/6' y H-3'/5', respectivamente;  $\delta$  129.33 (*d*, C-2'/6'), 115.51 (*d*, C-3'/5')]. Los protones del anillo E muestran un patrón ABX consistente con un doblete con constante de acoplamiento *orto* a  $\delta$  6.88 (1H, *d*,  $J = 8.4$ ) asignado para H-5''' [ $\delta$  116.97 (*d*, C-5''')], un doblete ancho a  $\delta$  7.27 (1H, *brd*,  $J = 8.0$ ) correspondiente a H-6''' [ $\delta$  120.89 (*d*, C-6''')] y un singlete ancho a  $\delta$  7.31 (1H, *brs*) correspondiente a H-2''' [ $\delta$  114.38 (*d*, C-2''')]. Este sistema se confirmó por HMBC, al presentarse correlación HMBC entre el protón H-6''' y los carbonos C-2'', C-2''' y C-4'''. Las señales de RMN  $^{13}C$  para el conformero minoritario fueron de baja intensidad, por tal razón, en la tabla 6 solo se muestran las señales del conformero **5a**.



**Figura 52.** Madrunoudeasido (5). Espectro RMN  $^1\text{H}$  (a). Ampliación región aromática (b).

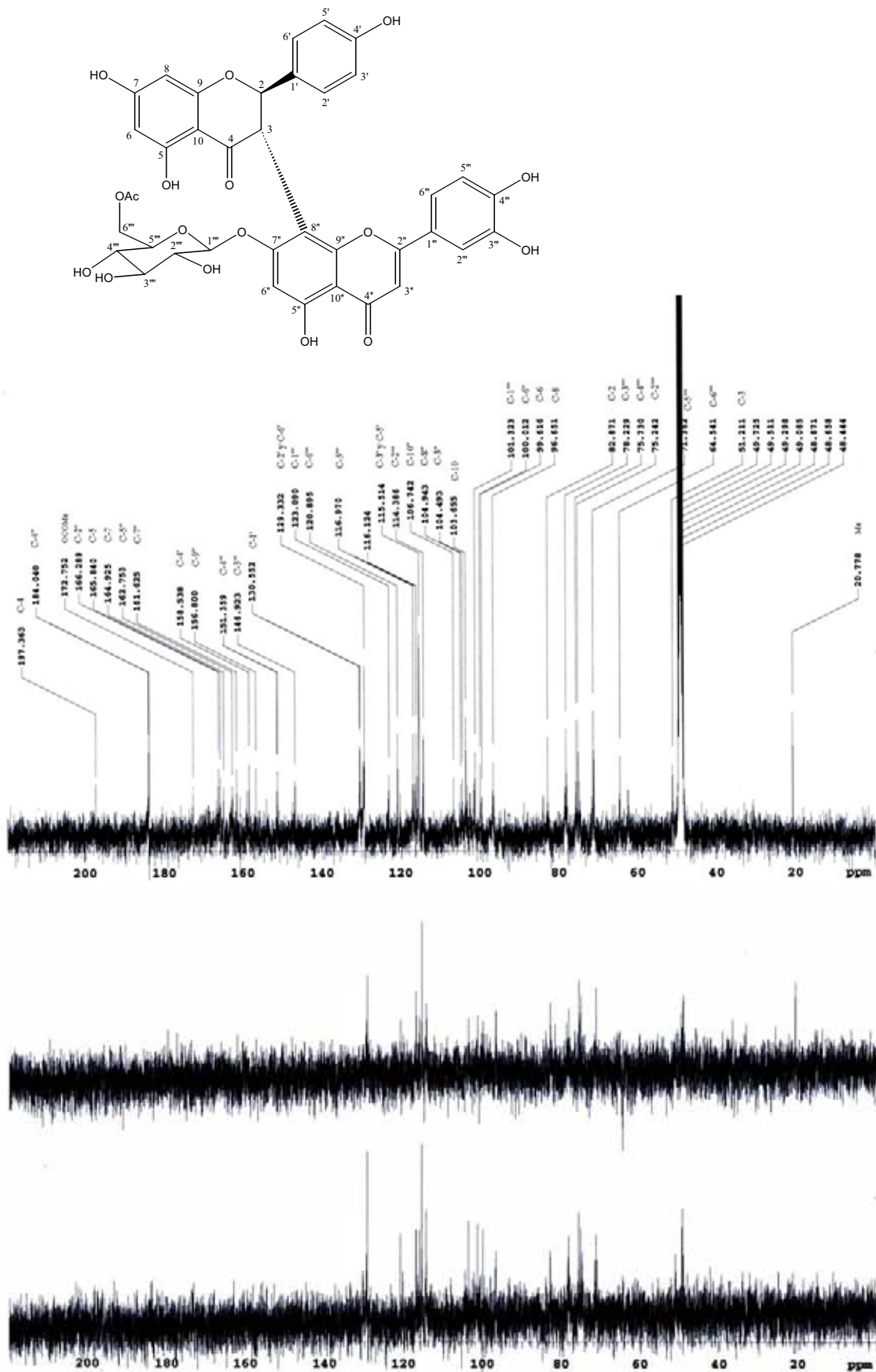


Figura 53. Madrunoudeasido (5). Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT.

**Tabla 6.** Datos de RMN-<sup>1</sup>H (400.11 MHz), RMN-<sup>13</sup>C (100.60 MHz) y HMBC de **5**.

	<sup>1</sup> H en CD <sub>3</sub> OD ( <i>J</i> en Hz)		<sup>13</sup> C en CD <sub>3</sub> OD	HMBC
	<b>5a</b>	<b>5b</b>		
2	5.76 <i>d</i> (12.0)	5.76 <i>d</i> **	82.87 <i>d</i>	C-1'
3	4.81 *	5.33 <i>d</i> (12.0)	51.21 <i>d</i>	C-1', C-7'', C-9''
4			197.36 <i>s</i>	
5			165.84 <i>s</i>	
6	5.96 <i>brs</i>	5.96 <i>brs</i>	99.61 <i>d</i>	C-8, C-10
7			164.92 <i>s</i>	
8	5.96 <i>brs</i>	5.96 <i>brs</i>	96.65 <i>d</i>	C-10
9			168.51 <i>s</i>	
10			103.65 <i>s</i>	
1'			130.55 <i>s</i>	
2'	7.05 <i>d</i> (8.8)	7.11 <i>d</i> (8.0)	129.33 <i>d</i>	C-2, C-4', C-6'
3'	6.35 <i>d</i> (8.4)	6.35 <i>d</i> (8.4)	115.51 <i>d</i>	C-1', C-5'
4'			158.53 <i>s</i>	
5'	6.35 <i>d</i> (8.4)	6.35 <i>d</i> (8.4)	115.51 <i>d</i>	C-1', C-3'
6'	7.05 <i>d</i> (8.8)	7.11 <i>d</i> (8.0)	129.33 <i>d</i>	C-2, C-2', C-4'
2''			166.28 <i>s</i>	
3''	6.41 <i>s</i>	6.52 <i>s</i>	104.49 <i>d</i>	C-1'''
4''			184.04 <i>s</i>	
5''			162.75 <i>s</i>	
6''	6.66 <i>s</i>	6.56 <i>s</i>	100.01 <i>d</i>	C-8'', C-10''
7''			161.62 <i>s</i>	
8''			104.94 <i>s</i>	
9''			156.80 <i>s</i>	
10''			106.74 <i>s</i>	
1'''			123.09 <i>s</i>	
2'''	7.31 <i>brs</i>	7.26 <i>brs</i>	114.38 <i>d</i>	C-6'''
3'''			146.92 <i>s</i>	
4'''			151.35 <i>s</i>	
5'''	6.88 <i>d</i> (8.4)	6.61 <i>d</i> (8.4)	116.97 <i>d</i>	C-3'''
6'''	7.27 <i>brd</i> (8.0)	7.10 <i>brd</i> **	120.89 <i>d</i>	C-2'', C-2''', C-4'''
1''''	5.24 <i>d</i> (7.6)	5.17 <i>d</i> (8.0)	101.32 <i>d</i>	C-7''
2''''	3.34 <i>m</i>	3.34 <i>m</i> **	75.24 <i>d</i>	
3''''	3.38 <i>dd</i> (9.2, 8.8)	3.38 <i>m</i> **	78.22 <i>d</i>	
4''''	3.82 <i>m</i>	3.82 <i>m</i> **	75.73 <i>d</i>	
5''''	3.60 <i>ddd</i> (11.2, 6.2, 2.3)	3.60 <i>m</i> **	71.36 <i>d</i>	
6''''a	4.27 <i>dd</i> (12.0, 2.3)	4.27 <i>m</i> **	64.54 <i>t</i>	OCOMe
6''''b	4.13 <i>dd</i> (12.0, 6.4)	4.13 <i>m</i> **		
OCOMe			172.75 <i>s</i>	
Me	1.95 <i>s</i>	2.03 <i>s</i>	20.77 <i>q</i>	OCOMe

La serie **a** y **b** representan el confórmero principal y minoritario, respectivamente.

\* Solapamiento con señal del solvente.

\*\* Solapamiento con otras señales.



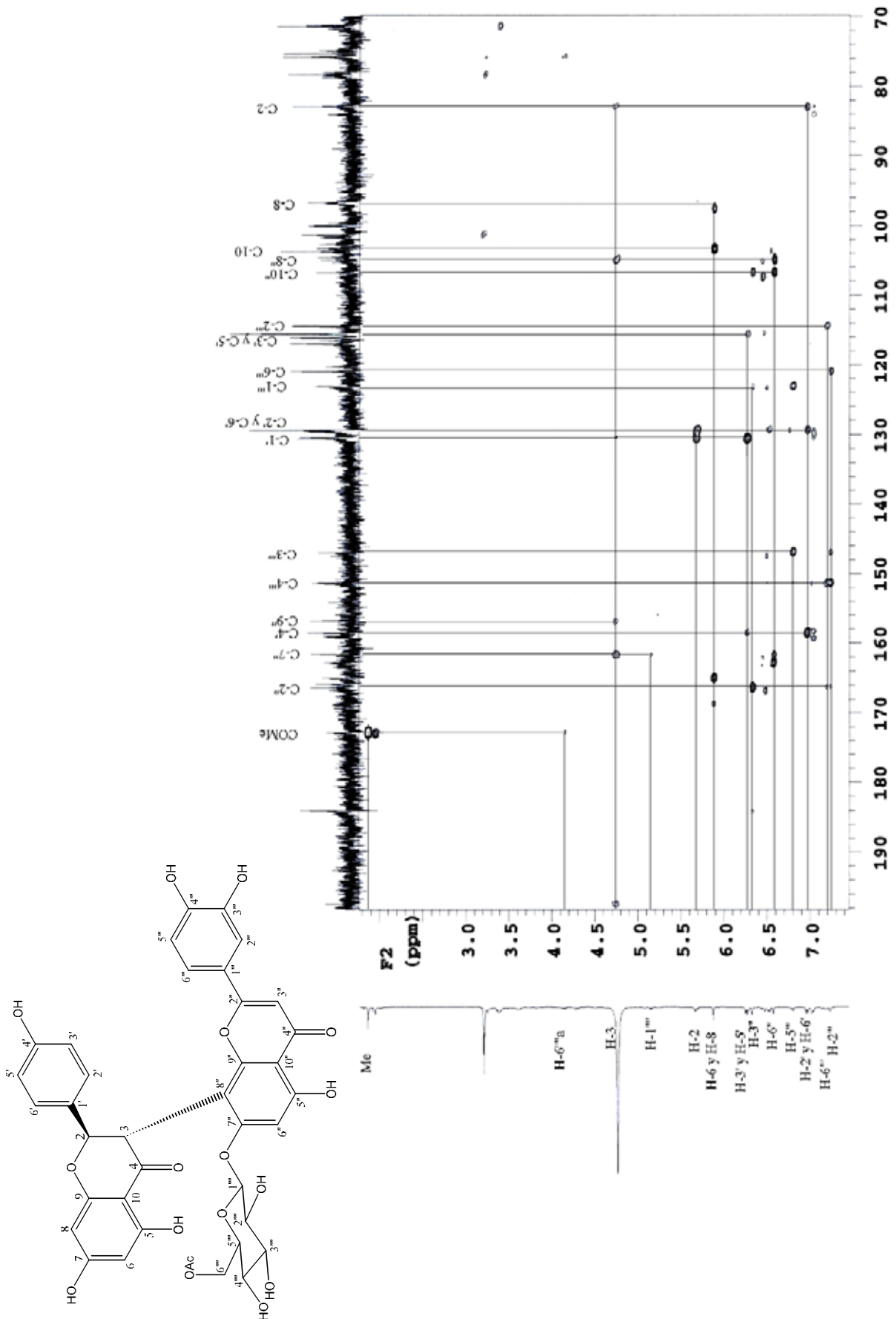


Figura 54. Madrunoudeasido (5). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

La presencia de un derivado *O*- $\beta$ -D-glucosilo fue confirmada por la señal  $^1\text{H}$  del protón anomérico a  $\delta$  5.24 (*d*,  $J = 7.6$  Hz) (Pauli, 2000; Švehlíková *et al.*, 2004). Otras señales para la unidad  $\beta$ -D-glucosilo correspondieron a  $\delta$  3.34 (*m*, H-2'''), 3.38 (*dd*,  $J = 9.2, 8.8$ ; H-3'''), 3.82 (*m*, H-4'''), 3.60 (*ddd*,  $J = 11.2, 6.2, 2.3$ ; H-5'''), 4.27 (*dd*,  $J = 12.0, 2.3$ ; H-6'''a) y 4.13 (*dd*,  $J = 6.4, 12.0$ ; H-6'''b). La unión de la unidad glucosilo y el núcleo biflavonoide se identificó por la correlación HMBC del protón anomérico H-1''' y el C-7''. Este último carbono presentó, igualmente, correlación a tres y a dos enlaces con los protones H-3 y H-6'', respectivamente. Otras importantes correlaciones HMBC se presentan entre H-3 y el carbono C-9'' y entre el protón H-6'' y el carbono C-10''. Estas evidencias experimentales demuestran la unión interflavonoide de tipo C3 $\rightarrow$ C8'' y el anclaje de la unidad glucosil en C-7''. La presencia de un grupo acetilo se confirmó para **5** por los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , los cuales revelaron un singlete para tres protones a  $\delta$  1.95 y un carbono carbonilo adicional a  $\delta$  172.75, respectivamente. En adición, el cambio hacia campo bajo de las señales H-6''', requiere que el grupo acetilo este atado al grupo 6-hidroxilo de la glucosa (Markham & Geiger, 1994; Švehlíková *et al.*, 2004). Los datos de RMN  $^{13}\text{C}$  disponibles confirman lo anterior. La señal del C-6 de la glucosa aparece a  $\delta$  64.54, 3.2 ppm a campo bajo en comparación de fukugisido (**4**), biflavonoide glucósido sin grupo acetilo. La unión del acetilo a la posición 6 del residuo 7''-*O*-glucosil se confirmó además por el experimento HMBC, en donde, se aprecia una correlación a tres enlaces entre el protón H-6'''a y los protones del grupo Me, con el carbonilo a  $\delta$  172.75 ppm.

La estereo-estructura relativa del compuesto **5** se identificó por poseer una relación *trans* entre las posiciones 2 y 3 debido a la constante de acoplamiento  $J_{2,3} = 12$  Hz. La estereoquímica absoluta fue deducida como 2*R*,3*S* por consideración de la rotación óptica positiva observada ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 155^\circ$ ) y su curva de Dicroísmo Circular (CD) con un máximo alrededor de 350 y 287 nm, cualitativamente similar a la curva de CD del compuesto morelloflavona (**2**) (Figura 43) (Li *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2005). A partir de los datos espectroscópicos mostrados, su comparación con los datos obtenidos para su aglicona morelloflavona (**2**) y con los del biflavonoide glucósido sin grupo acetilo, fukugisido (**4**), el compuesto **5** definido como 7''-*O*-(6'''-acetil)glucósido de morelloflavona, se designó como madrunoudeasido, un nuevo producto natural.

**3.3.1.6. Spicatasido (6):** El compuesto se aisló como un sólido blanco amarillento, pf 235-237°C.  $[\alpha]_D^{20} + 16^\circ$  (MeOH;  $c$  0.50).  $UV_{max}$  (MeOH) nm (log  $\epsilon$ ): 210 (2.28), 230 (3.09), 290 (3.11), 345 (2.71).  $IR_{v_{max}}$   $cm^{-1}$ : 3.350, 1.643, 1.605, 1.580, 1.520, 1.070, 1.040. El EM (70 eV) mostró un pico base a  $m/z$  702 correspondiente con la fórmula  $C_{36}H_{30}O_{15}$ . El compuesto **6** mostró similar complejidad en el espectro de RMN  $^1H$  que los compuestos con unión interflavanoide C3→C8". El espectro de RMN  $^1H$  presentó una gran similitud con el espectro del compuesto **3** tomado en metanol- $d_4$  (datos no mostrados), sin embargo, mientras que este último presentó un patrón de señales característicos de aglicona, los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  del compuesto **6** mostraron señales adicionales debidas a una unidad  $\beta$ -glucosilo (Figura 55 y 56). RMN  $^1H$  (400 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$ : conformero principal (**6a**), 7.67 (2H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-2"', H-6'''), 7.09 (2H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-2', H-6'), 6.70 (2H,  $d$ ,  $J = 8.8$  Hz, H-3''', H-5'''), 6.63 (1H,  $s$ , H-6''), 6.60 (2H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 6.53 (1H,  $s$ , H-3''), 5.81 (2H,  $s$ , H-6, H-8), 5.64 (1H,  $d$ ,  $J = 12.4$  Hz, H-2), 5.21 (1H,  $d$ ,  $J = 7.6$  Hz, H-1'''), 4.85 para H-3 presentó solapamiento con señal del solvente, 3.91 (1H,  $m$ , H-6a'''), 3.80 (1H,  $m$ , Hz, H-6b'''), 3.72 (1H,  $m$ , H-5'''), 3.64 (1H,  $m$ , H-4'''), 3.43 (1H,  $m$ , H-3'''), 3.35 (1H,  $m$ , Hz, H-2'''). Conformero minoritario (**6b**), 7.73 (2H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-2''', H-6'''), 7.09 (2H,  $d$ ,  $J = 8.8$  Hz, H-2', H-6'), 6.90 (2H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-3''', H-5'''), 6.68 (1H,  $s$ , H-6''), 6.36 (2H,  $d$ ,  $J = 8.4$  Hz, H-3', H-5'), 6.45 (1H,  $s$ , H-3''), 5.82 (2H,  $s$ , H-6, H-8), 5.68 (1H,  $d$ ,  $J = 12.4$  Hz, H-2), 5.19 (1H,  $d$ ,  $J = 7.6$  Hz, H-1'''), 4.85 para H-3 presentó solapamiento con señal del solvente, 3.91 (1H,  $m$ , H-6a'''), 3.80 (1H,  $m$ , Hz, H-6b'''), 3.72 (1H,  $m$ , H-5'''), 3.64 (1H,  $m$ , H-4'''), 3.43 (1H,  $m$ , H-3'''), 3.35 (1H,  $m$ , Hz, H-2'''). Las señales de RMN  $^{13}C$  para el conformero minoritario fueron de baja intensidad, por tal razón, solo se muestran las del conformero mayoritario (**6a**). RMN  $^{13}C$  (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  195.60 ( $s$ , C-4), 183.01 ( $s$ , C-4''), 165.80 ( $s$ , C-2''), 165.64 ( $s$ , C-7''), 163.53 ( $s$ , C-4'''), 161.56 ( $s$ , C-5''), 157.93 ( $s$ , C-4'), 157.60 ( $s$ , C-5), 154.61 ( $s$ , C-9''), 135.14 ( $s$ , C-1'), 128.99 ( $d$ , C-2'''), 128.99 ( $d$ , C-6'''), 128.51 ( $d$ , C-2'), 128.51 ( $d$ , C-6'), 120.63 ( $s$ , C-1'''), 116.49 ( $d$ , C-3'''), 116.49 ( $d$ , C-5'''), 114.81 ( $d$ , C-3'), 114.81 ( $d$ , C-5'), 102.57 ( $s$ , C-8''), 101.79 ( $s$ , C-10), 101.14 ( $d$ , C-1'''), 100.16 ( $d$ , C-6''), 100.00 ( $d$ , C-3''), 97.42 ( $d$ , C-6), 97.27 ( $d$ , C-8), 82.22 ( $d$ , C-2), 77.05 ( $d$ , C-5'''), 76.83 ( $d$ , C-3'''), 73.56 ( $d$ , C-2'''), 70.02 ( $d$ , C-4'''), 61.21 ( $d$ , C-6'''), 50.01 ( $d$ , C-3). El anclaje de la unidad glucosilo y el núcleo biflavonoide se identificó por la correlación HMBC entre el protón anomérico H-1'''' y el C-7'', además de la correlación a tres enlaces entre el H-2 y el C-8'' (Figura 57). El compuesto **6** se identificó como spicatasido (volkensiflavona-7''- $O$ -glucósido) por comparación de sus datos físicos y espectrales con los reportados para este compuesto en la literatura (Chen *et al.*, 1975b).

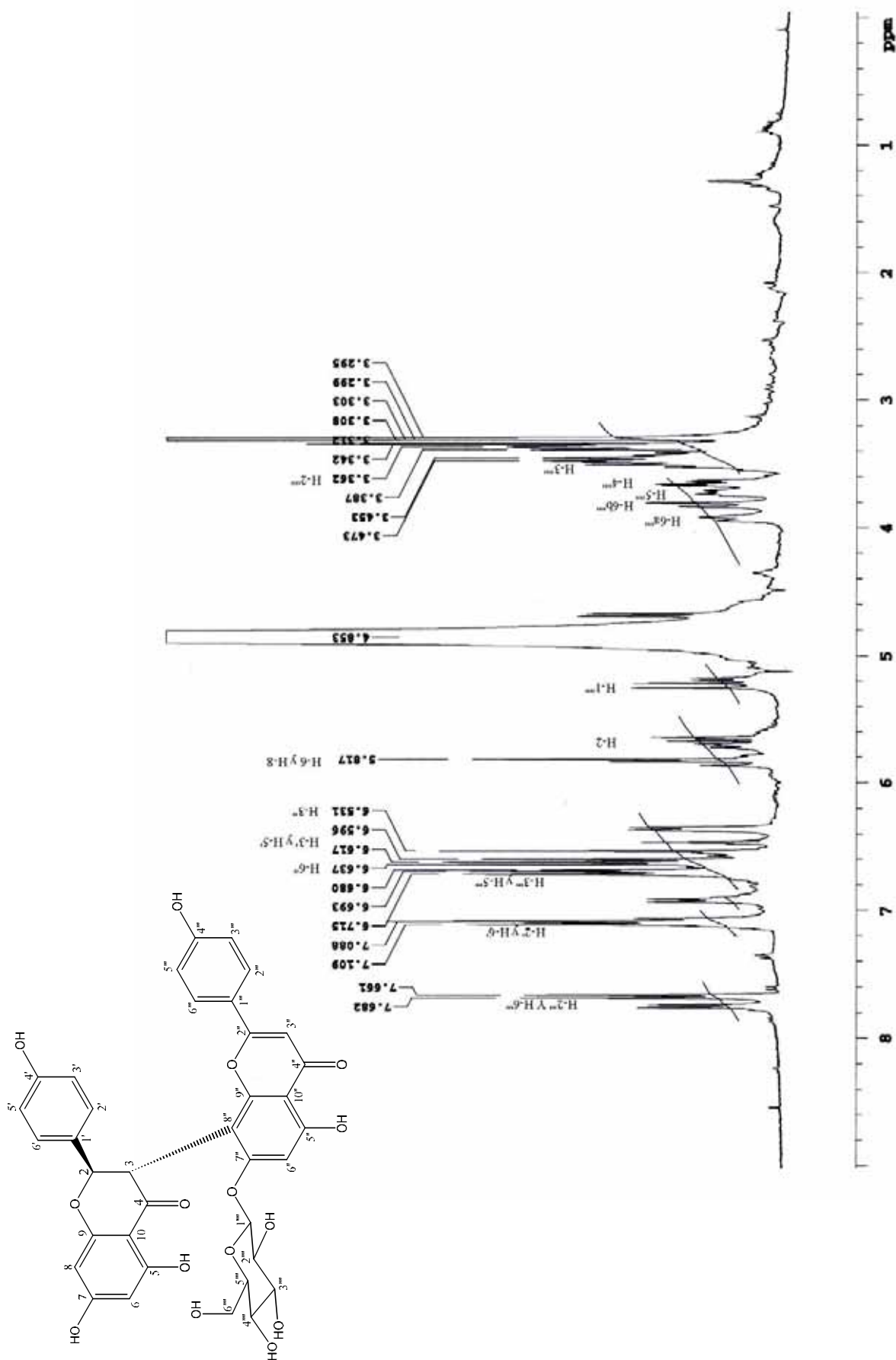


Figura 55. Spicatasido (6). Espectro RMN <sup>1</sup>H en CD<sub>3</sub>OD.

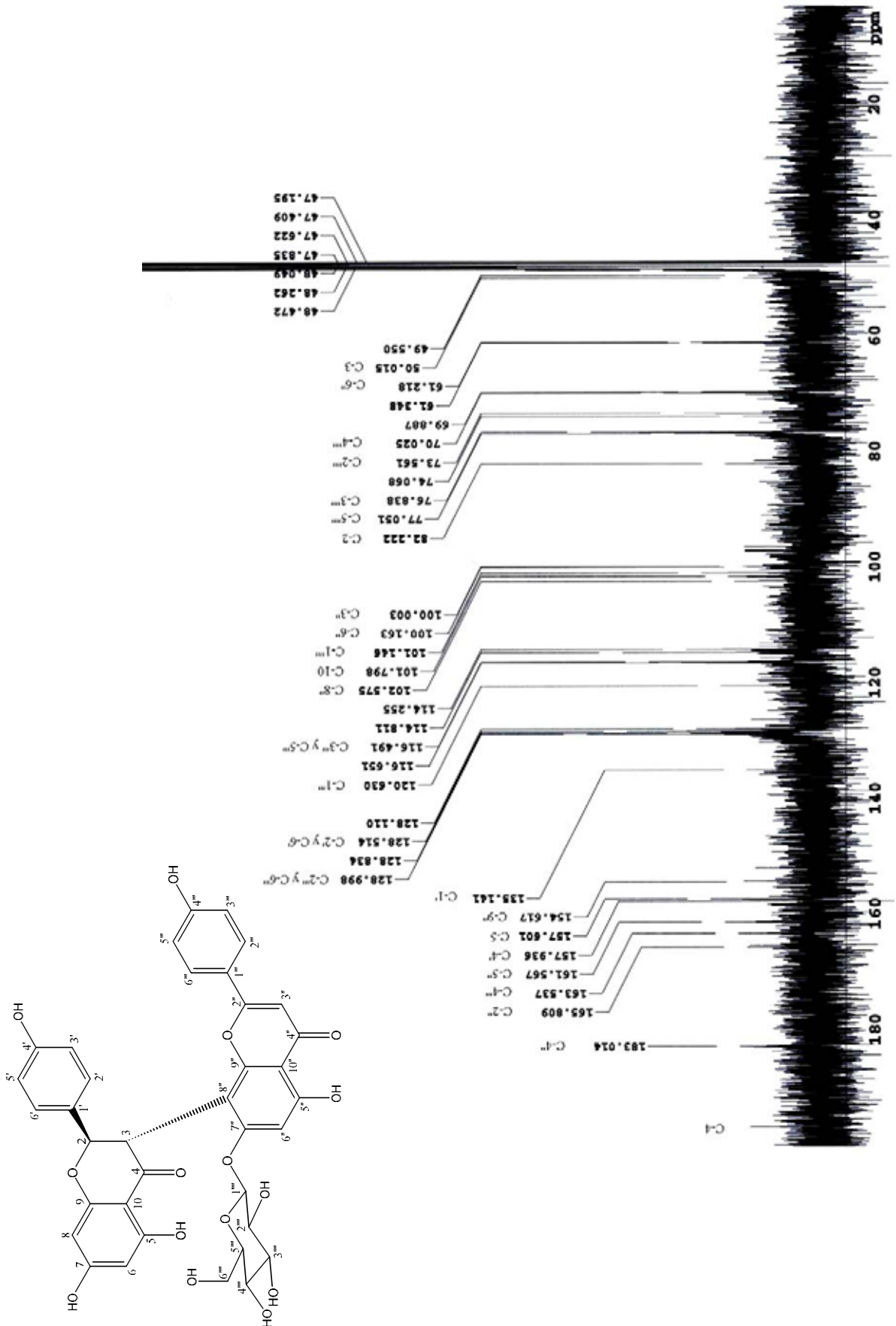


Figura 56. Spicatasido (6). Espectro RMN <sup>13</sup>C.

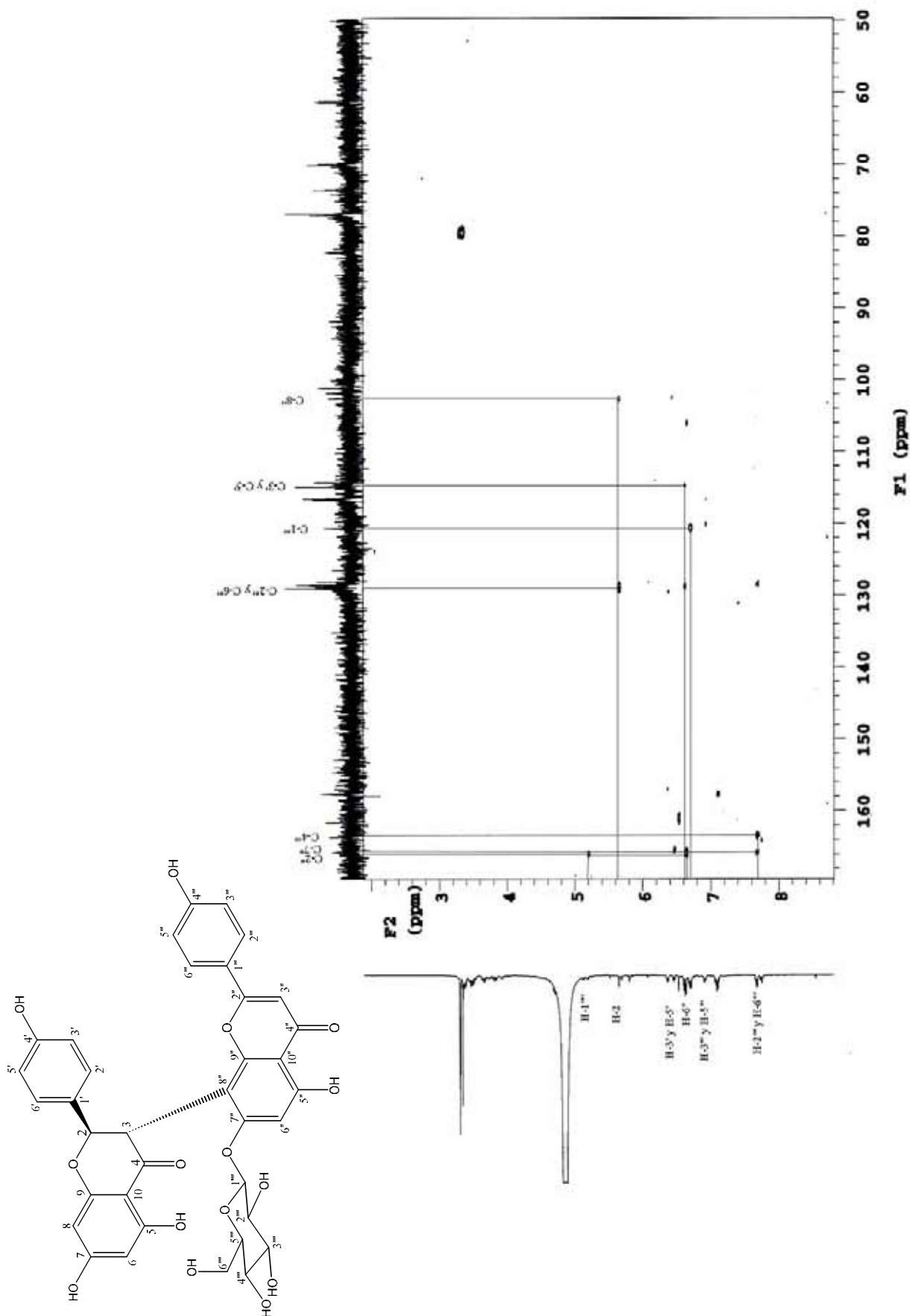


Figura 57. Spicatasido (6). Importantes correlaciones HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



***4. Ensayos de Actividad  
Biológica***



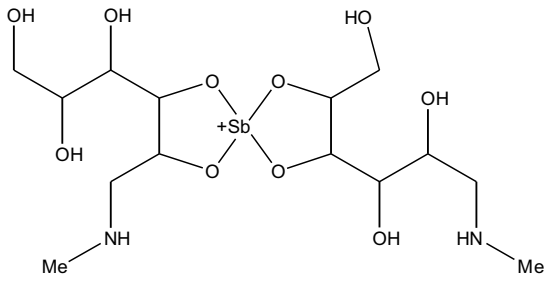


## 4.1. Introducción a la actividad biológica antiparasitaria

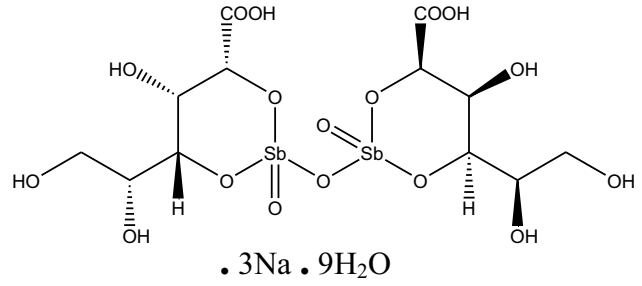
### 4.1.1. Enfermedades parasitarias

**4.1.1.1. Leishmaniosis:** La leishmaniosis es una enfermedad infecciosa producida por al menos 17 especies de parásitos protozoos del género *Leishmania* (familia Trypanosomatidae). Tradicionalmente, ha sido clasificada en tres diferentes formas clínicas, leishmaniosis visceral (LV), leishmaniosis cutánea (LC) y leishmaniosis mucocutánea (LMC), las cuales presentan diferentes inmunopatologías y grados de morbilidad y mortalidad (Croft & Coombs, 2003). Se distribuye alrededor del mundo, principalmente en los trópicos y subtropicos, con una prevalencia de 12 millones de casos y una incidencia anual aproximada de 0,5 y 1,5 millones de casos de LV y de formas cutáneas (LC y LMC), respectivamente (Croft & Coombs, 2003).

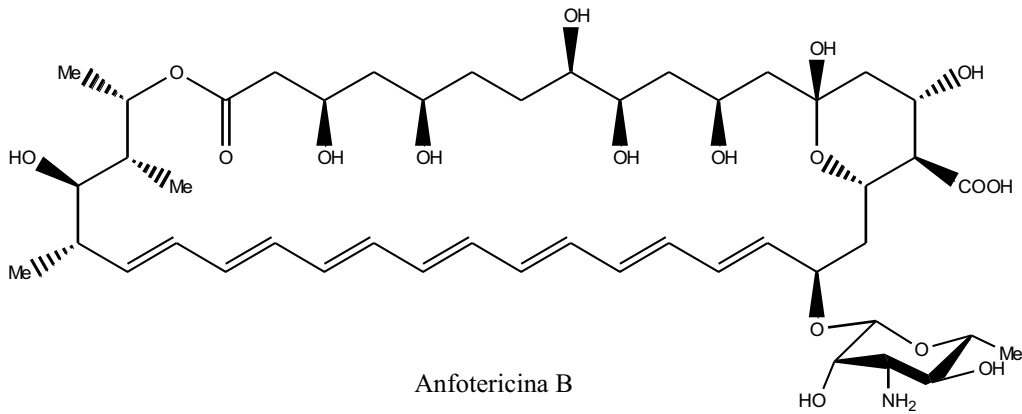
En relación a la quimioterapia (Figura 58), las drogas actualmente recomendadas para el tratamiento de la leishmaniosis incluyen los derivados de antimonio pentavalente ( $Sb^V$ ) estibogluconato de sodio (Pentostame®, GlaxoSmithKline) y antimoniato de meglumina (Glucantime®, Aventis), la amfotericina B (Bristol-Myers Squibb) y su formulación lipídica AmBisomew® (Gilead), y la pentamidina (Aventis) (Croft & Coombs, 2003). Los  $Sb^V$  fueron introducidos por primera vez en 1945 y han sido efectivos para algunas formas de leishmaniosis; sin embargo, los requerimientos de administración parenteral de un mínimo de 28 días, la eficacia variable frente a las diferentes formas de la enfermedad, los efectos adversos que generalmente se producen y la aparición de parásitos resistentes, son factores que hacen poco atractivos a estos medicamentos (Borst & Ouellette, 1995; Hardman *et al.*, 1996; Croft & Coombs, 2003; Singh & Sivakumar, 2004). El uso de la diamina pentamidina y del antibiótico amfotericina B como agentes leishmanicidas está limitado debido a su toxicidad; sin embargo, desde su introducción en 1952, la pentamidina ha sido valorada como un fármaco de segunda línea, cuando los agentes antimoniales no son efectivos. De igual forma, la quimioterapia antileishmania se benefició con el desarrollo de la formulación lipídica de la amfotericina B, que es menos tóxica y presenta un tiempo de vida media mayor; aunque su elevado costo limita su utilización masiva (Croft & Coombs, 2003). Otros medicamentos potencialmente efectivos son el alopurinol y la mefloquina (Batista



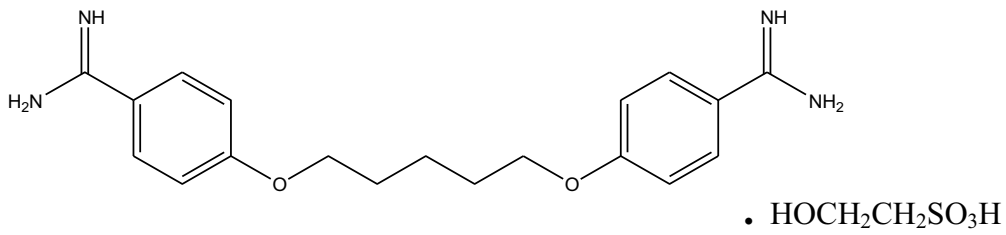
Antimoniato de Meglumina



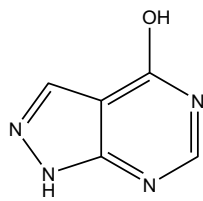
Estibogluconato de sodio



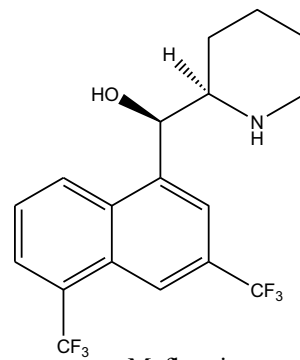
Anfotericina B



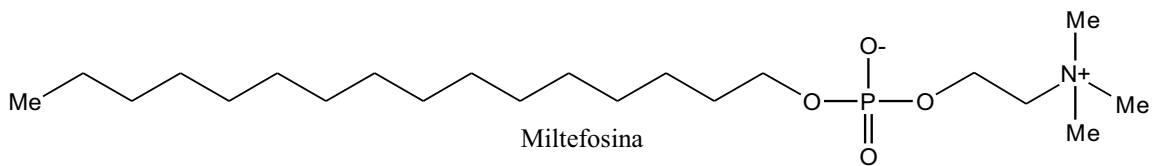
Pentamidina



Alopurinol



Mefloquina



Miltefosina

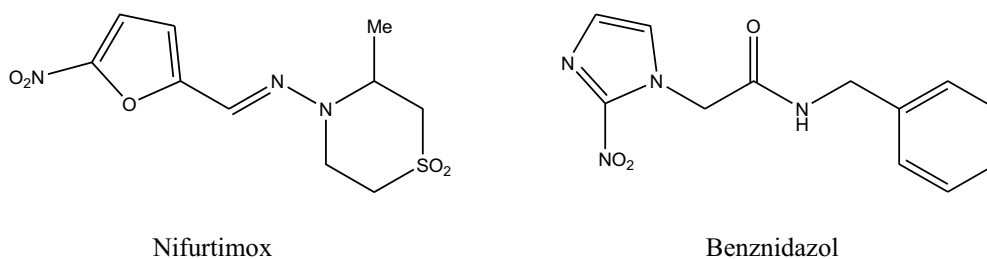
**Figura 58.** Estructuras químicas de fármacos antileishmania.

*et al.*, 2000; Berman, 2001; Sundar *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2003). Éstos pueden presentar eficacias similares a las obtenidas con los Sb<sup>V</sup>, aunque los resultados varían en función de la forma clínica de la enfermedad y de la especie de *Leishmania* involucrada (Baum & Berens, 1994; Vélez *et al.*, 1997; Hendrikx *et al.*, 1998; Laguna-Torres *et al.*, 1999). Actualmente el mejor candidato es la miltefosina, que ha mostrado buenas tasas de curación en la India y recientemente en Colombia (Sundar *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2001; 2004). Al ser un medicamento de administración oral representa una buena opción; sin embargo, se requieren estudios adicionales debido a las variaciones que presenta en cuanto a su eficacia, dependiendo de la especie de *Leishmania* implicada. Por lo tanto, mientras ello ocurre, los medicamentos más utilizados se basan en los derivados Sb<sup>V</sup>. Desafortunadamente, el valor clínico de la terapia con los derivados Sb<sup>V</sup> está amenazado por la aparición cada vez más frecuente de fallas en el tratamiento. Esta ineficacia terapéutica puede deberse a variaciones no sólo en el contenido de Sb<sup>V</sup> en los lotes del medicamento como se ha evidenciado previamente (Jackson *et al.*, 1990) sino también a la aparición de parásitos resistentes (Farault-Gambarelli *et al.*, 1997; Bhattacharyya *et al.*, 2002).

**4.1.1.2. Tripanosomiasis americana:** La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una de las más importantes en el continente americano. El protozoo flagelado causante de la enfermedad, *Trypanosoma cruzi*, es un parásito obligado del hombre y de muchos mamíferos y afecta primordialmente a la población pobre y marginal. Si bien la enfermedad se encuentra presente en toda América Central y del Sur, sus manifestaciones y características epidemiológicas son altamente variables entre una y otra zona endémica. Existe una gran diversidad en las tasas de prevalencia, formas de transmisión, características parasitarias, patología clínica, vectores y reservorios (Guhl, 2000). La enfermedad de Chagas representa un problema de salud en 21 países latinoamericanos, con un total estimado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 28 millones de personas expuestas a la enfermedad y alrededor de 15 millones de personas infectadas (OMS, 2007). Se estima que cada año se infectan alrededor de 41.200 personas. La mortalidad asciende a 12.500 casos, ocurridos principalmente durante la fase aguda de la enfermedad.

La terapia de la enfermedad de Chagas hasta la actualidad, ha dependido de dos drogas: el nifurtimox y el benznidazol (Cancado, 2001) (Figura 59). El nitrofurano nifurtimox

se introdujo en la década de 1960, mientras que el nitroimidazol benznidazol lo fue en la década de 1970. Estos dos compuestos son agentes tripanocidas principalmente contra los tripomastigotes circulantes. A pesar de esto, el nifurtimox no ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento de la enfermedad, ya que su fabricante detuvo la producción en vista de la clara ventaja que en el mercado disfrutaba el benznidazol (Barrett *et al.*, 2003). Las reacciones adversas al medicamento se han reportado con una frecuencia entre el 4 y 30 %, pudiendo ser dérmicas, gastrointestinales, neurológicas y osteomusculares (Castro, 1993; Nicholls *et al.*, 2003). Estos efectos están directamente relacionados con la dosis y la edad, presentándose una mejor tolerancia al fármaco en los niños (WHO, 2002).



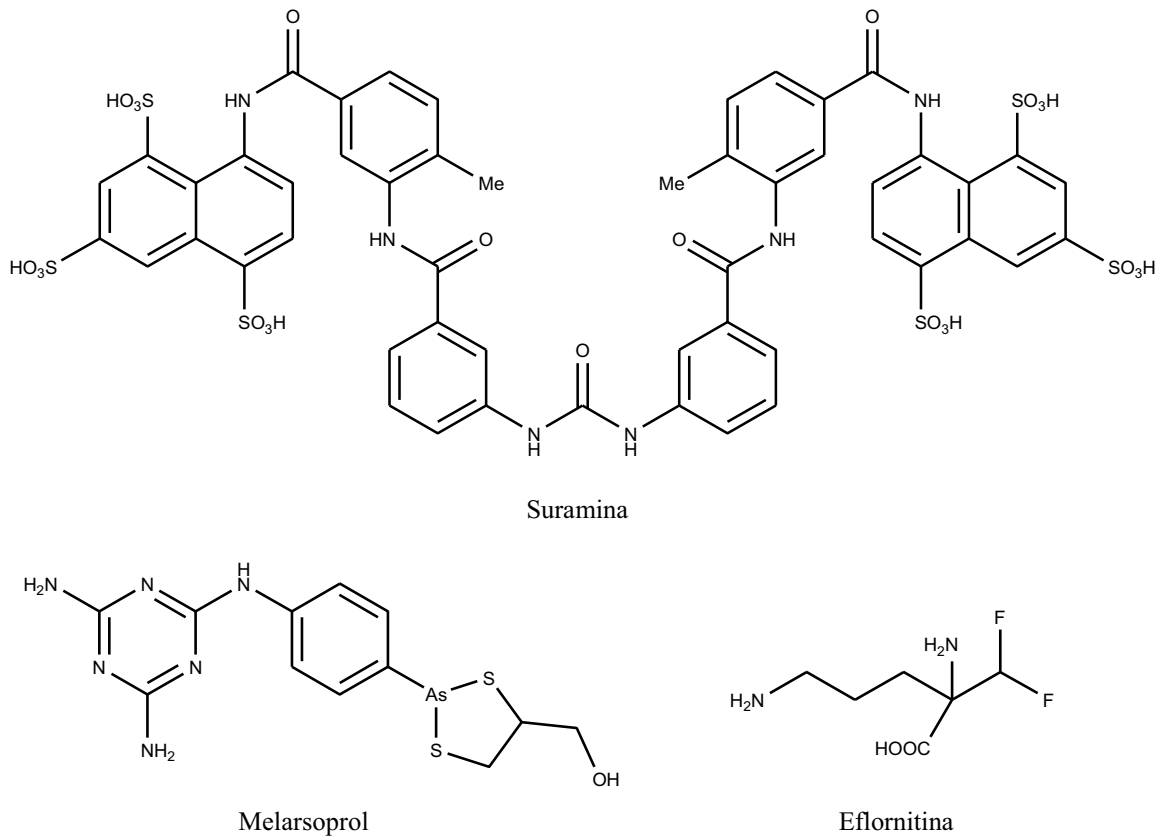
**Figura 59.** Estructuras químicas de fármacos utilizados en la enfermedad de Chagas.

**4.1.1.3. Tripanosomiasis africana:** La tripanosomiasis africana es la enfermedad parasitaria responsable de los principales problemas económicos y de salud en las regiones rurales de África subsahariana. Los agentes etiológicos son protozoos flagelados pertenecientes al género *Trypanosoma* que, por un lado incluye a *Trypanosoma brucei rhodesiense* y *T. b. gambiense*, causantes de la enfermedad del sueño (tripanosomiasis africana humana, TAH), y por otro a *T. b. brucei* (morfológica y bioquímicamente indistinguible de las dos primeras especies), *T. congolense* y *T. vivax*, causantes de la enfermedad en el ganado (ovejas y cabras). Los parásitos son transmitidos entre huéspedes vertebrados por la mosca tsetse (*Glossina* spp.) (Hoet *et al.*, 2004). Otras dos importantes especies para el ganado son *T. evansi* y *T. equiperdum*, los cuales son transmitidos por picaduras de mosquitos o durante el coito, respectivamente (Brun *et al.*, 1998).

La TAH es endémica en alrededor de 30 países africanos y amenaza a 60 millones de personas. Alcanza proporciones epidémicas en algunos países, como Angola, el sur del

Sudán, Uganda y la República Democrática del Congo. Se reportaron casi 45.000 casos de la enfermedad durante 1999, sin embargo la Organización Mundial de la Salud estima que el número actual está entre 300.000 y 500.000, y tan sólo 3-4 millones de personas en riesgo de infección están bajo vigilancia regular o acceso a centros médicos (Barrett, 1999; WHO, 2000a).

Las actuales opciones quimioterapéuticas son limitadas y lejos de ser ideales. Existen cuatro medicamentos aprobados para la TAH, tres de los cuales se desarrollaron hace más de medio siglo: suramina, pentamidina, melarsoprol y eflornitina (Figura 60). Otras moléculas tales como homidium, isometamidium y diminazen aceturato son usados en infecciones de animales. Solamente melarsoprol y eflornitina, que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, pueden ser utilizados cuando la infección alcanza al sistema nervioso central. Los efectos adversos son severos, algunas veces de carácter mortal. Igualmente se presentan un buen número de ineficacia en el tratamiento, sobre todo con melarsoprol y no siempre se ha garantizado la disponibilidad de estos medicamentos por parte de las compañías farmacéuticas debido a la falta de rentabilidad.



**Figura 60.** Estructuras químicas de fármacos aprobados para TAH.

**4.1.1.4. Malaria:** La malaria es una enfermedad producida por parásitos del género *Plasmodium*. En el hombre, la infección puede ser ocasionada por *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malarie* y *P. ovale*, los cuales son transmitidos por mosquitos hembra del género *Anopheles*. También son frecuentes las infecciones mixtas. Según la OMS, 2.400 millones de personas en el mundo viven en regiones de alto riesgo para la transmisión de la malaria, siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en 90 países ubicados en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, especialmente en África (región Subsahariana), el sudeste de Asia y Latinoamérica. La OMS estima que anualmente se producen de 300 a 500 millones de casos clínicos de malaria, de los cuales 1,5 a 2,7 millones son mortales (WHO, 2000b).

El tratamiento de la malaria se ha realizado con diversos medicamentos que actúan sobre estadios eritrocíticos del parásito (Figura 61), entre los que se encuentran la quinina, un alcaloide aislado a partir de diferentes especies del género *Cinchona* (Rubiaceae), y sus derivados sintéticos cloroquina, primaquina y mefloquina, desarrollados posteriormente y que mostraron ser más efectivos, menos tóxicos y de bajo costo (Marshall, 2000). Otros medicamentos como la pirimetamina, un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa, se utilizaron con muy buenos resultados, sin embargo su uso disminuyó considerablemente debido a la aparición de parásitos resistentes. La sulfadoxina se utiliza en el tratamiento de la malaria en combinación con la piremamina, debido a la inhibición de diferentes enzimas implicadas en la síntesis de folato, (dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa, respectivamente). El tratamiento intermitente con estos dos compuestos es seguro, bien tolerado y reduce la tasa de malaria clínica en un 59 % y la tasa de anemia grave en un 50 %. El descubrimiento reciente más importante ha sido la identificación de la artemisinina, una lactona sesquiterpénica obtenida de *Artemisia annua* (Asteraceae), y sus derivados, el artemether y el artesunato, que son medicamentos de rápida acción, efectivos contra cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina y contra las complicaciones fatales de malaria cerebral (Meshnick, 1998; Wright, 2004). Sin embargo, la actividad de la artemisinina se ve condicionada por su baja solubilidad y escasa biodisponibilidad. A su vez, los derivados artemether y artesunato, aunque presentan una mejor absorción, rapidez de acción y mayor efectividad frente a cepas de *P. falciparum* multirresistentes, poseen una mayor citotoxicidad y efectos adversos (Galal *et al.*, 1996; Beekman *et al.*, 1997).

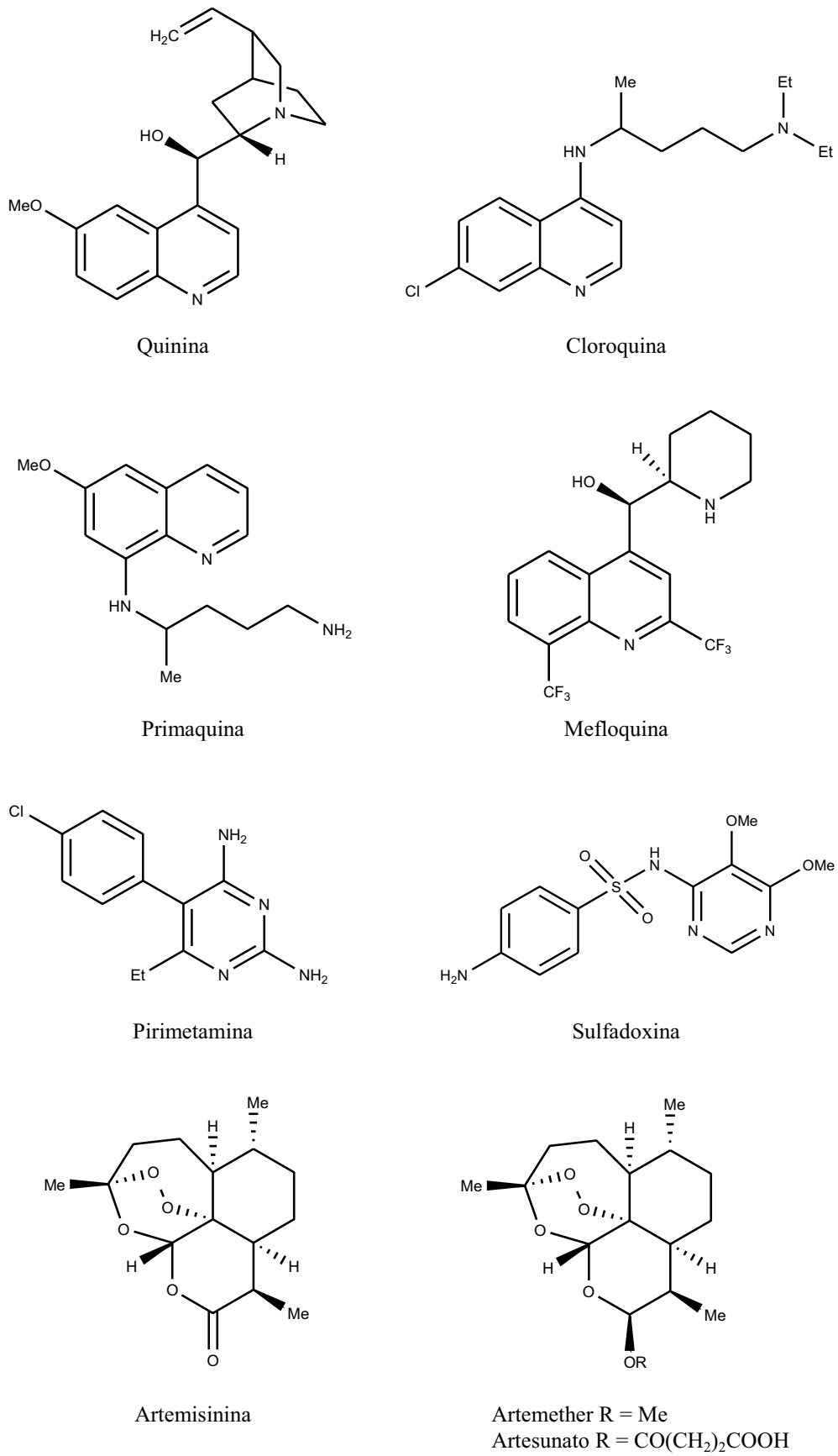


Figura 61. Estructuras químicas de fármacos antimaláricos.

El tratamiento de la malaria continúa siendo uno de los mayores retos para los programas de control debido al fenómeno de resistencia del parásito contra los medicamentos. Durante muchos años la cloroquina fue el tratamiento de elección para la malaria, sin embargo, en 1957 se reportaron los primeros casos de resistencia en Suramérica y desde entonces el fenómeno se expandió hacia toda América, África y Asia. En algunas regiones se ha informado de la resistencia a todos los antimaláricos disponibles con excepción de los derivados de la artemisinina, los cuales aún se reservan para los casos de malaria que no responden a los demás tratamientos (Phillips, 2001).

#### **4.1.2. Investigación en productos naturales antiparasitarios**

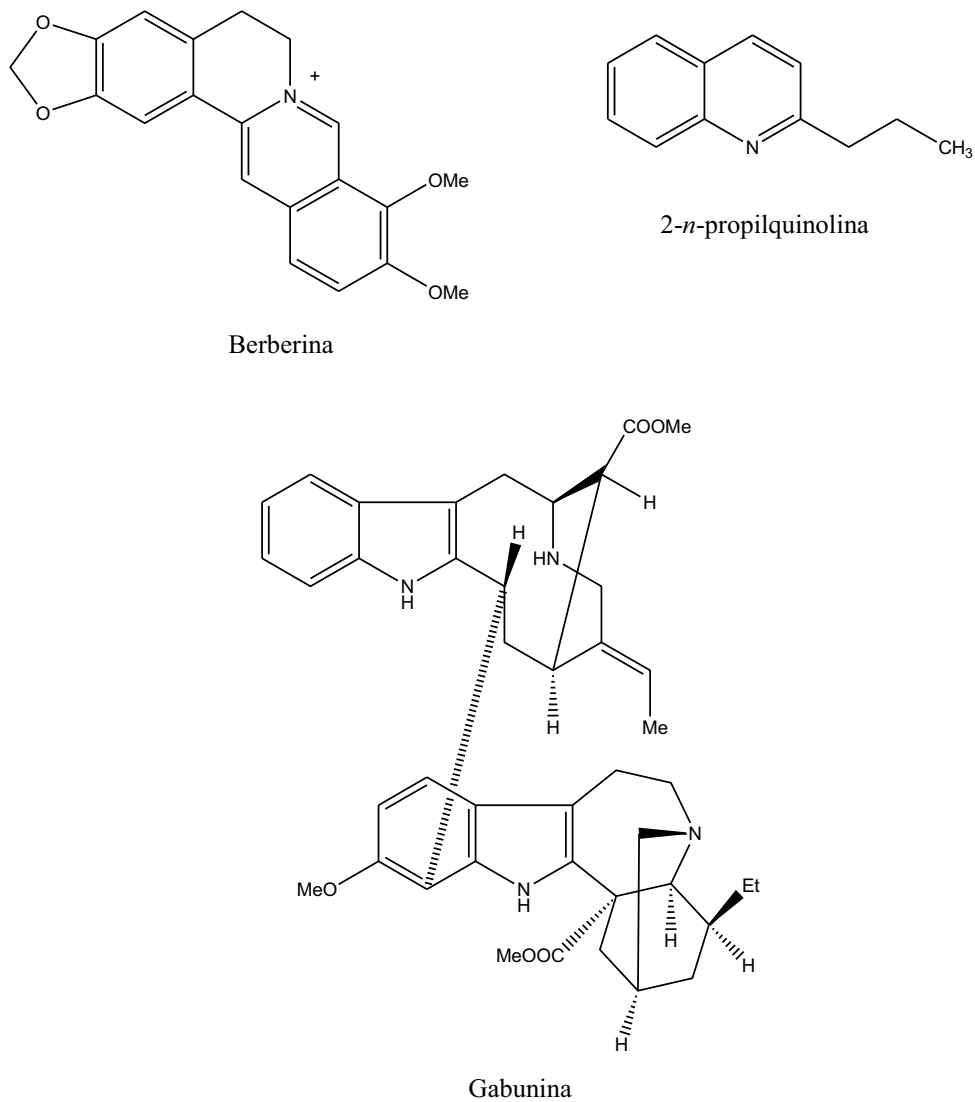
La evidencia de la magnitud del problema relacionado con las enfermedades parasitarias, junto con la necesidad de desarrollar nuevos compuestos activos para los cuales *T. cruzi*, *T. brucei*, *P. falciparum* y las diferentes especies de *Leishmania* no hayan desarrollado resistencia, requiere alternativas efectivas, seguras, económicas y que puedan contribuir a disminuir la transmisión, la morbilidad y la mortalidad. Se hace necesario, por tanto, explorar todas las posibilidades, entre las cuales se encuentra la evaluación de compuestos de origen natural y de sus derivados, debido a la sorprendente cantidad de moléculas naturales existentes, las cuales presentan una gran diversidad estructural y funcional (Newman *et al.*, 2003).

Muchos principios activos antiprotozoarios, han tenido su origen en la naturaleza a través de la evaluación científica de plantas medicinales. Por ejemplo, es importante recordar que el primer producto farmacéutico desarrollado para el tratamiento de la malaria y la amebiasis fueron los alcaloides quinina y emetina, obtenidos de diferentes especies del género *Cinchona* y de *Cephaelis ipecacuanha* (Rubiaceae), respectivamente (Hoet *et al.*, 2004). Asimismo, el uso clínico de la artemisinina para el tratamiento de la malaria, ha incitado una vez más el interés en la investigación de nuevos productos farmacéuticos de origen vegetal con actividad antiprotozoaria (Phillipson & Wright, 1991). Además, estos productos naturales han sido usados como punto de partida (cabezas de serie) para desarrollar compuestos sintéticos o semisintéticos con mejor eficacia, seguridad y/o perfil farmacocinético (Tagboto & Townson, 2001).



Algunos trabajos han mostrado la diversidad de productos naturales con actividad antiprotozoaria, cubriendo moléculas que son activas contra los agentes etiológicos de la malaria, leishmaniosis, enfermedad de Chagas y tripanosomiasis africana (Sepulveda-Boza & Cassels, 1996; Chan & Peña-Rodríguez, 2001; Fournet & Muñoz, 2002; Schwikkard & Heerden, 2002; Kayser *et al.*, 2003; Hoet *et al.*, 2004; Wright, 2004). Estos estudios han confirmado la importancia de muchas especies vegetales como fuente de nuevos metabolitos con actividad antiparasitaria. Sin embargo, y aunque existe un número importante de productos naturales que han demostrado potencial como posibles agentes antiparasitarios, la mayoría de ellos no tienen todos los requerimientos considerados como esenciales para su comercialización: ser administrados tópicamente u oralmente, ser efectivos a dosis moderada y no causar efectos adversos (Chan & Peña-Rodríguez, 2001). Hasta la fecha, y entre los alcaloides, solamente la berberina (Figura 62) aplicada por vía parenteral, es utilizada clínicamente para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea (Iwu *et al.*, 1994), mientras que la 2-*n*-propilquinolina se encuentra en fase de evaluación clínica para el tratamiento de la leishmaniosis (Croft & Coombs, 2003). En relación con la enfermedad de Chagas, ningún compuesto se encuentra en experimentación clínica, sin embargo se evalúa la actividad de ciertos funguicidas (Barrett *et al.*, 2003). Por su parte las quinolinas, con su principal representante la quinina, son históricamente reconocidas por su importante papel en la quimioterapia de la malaria. Una de las principales razones por la cual los metabolitos de origen vegetal con potente actividad antiparasitaria no hayan superado la evaluación clínica es su toxicidad. Se debe hacer notar que los agentes antiprotozoarios son básicamente agentes citotóxicos, que actúan selectivamente contra los parásitos. De hecho, muchos metabolitos tales como gabunina, que carecen de citotoxicidad, presentan una baja actividad leishmanicida *in vivo*. Quizás, las transformaciones químicas de estos metabolitos podrían mejorar su actividad antiprotozoaria y al mismo tiempo conservar su baja toxicidad. Actualmente, las publicaciones sobre nuevos agentes antiparasitarios incluyen la valoración de la actividad contra líneas celulares de mamíferos y/o humanos.

Por otro lado, como resultado de la investigación de nuevos agentes terapéuticos contra las enfermedades parasitarias, y teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos el mecanismo de acción de los productos naturales con actividad antiprotozoaria no se conoce, se ha propuesto la detección de dianas moleculares en donde estos productos



**Figura 62.** Estructuras químicas de berberina, 2-*n*-propilquinolina y gabunina.

sean activos (Chan & Peña-Rodríguez, 2001). Se debe hacer notar que entre los compuestos con buena actividad antiparasitaria, existe una gran diversidad estructural, lo cual puede reflejar la variedad de dianas moleculares en *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Plasmodium*. En la Tabla 7 se pueden observar algunas dianas terapéuticas utilizadas actualmente en la investigación de nuevos agentes antiparasitarios. En un futuro, la investigación de productos naturales podría realizarse principalmente, en una línea de investigación de un departamento de química médica, buscando moléculas bioactivas frente a determinadas dianas moleculares.

Por último, la mayoría de los estudios que se han preocupado en obtener productos naturales con actividad biológica contra parásitos protozoarios, se han centrado

**Tabla 7.** Potenciales dianas moleculares en la investigación de agentes antiparasitarios.

<i>Leishmania</i>	Ref.	<i>Trypanosoma</i>	Ref.	<i>Plasmodium</i>	Ref.
<i>Tripanotion reductasa</i>	Schmidt <i>et al.</i> , 2002.	<i>Tripanotion reductasa</i>	Schmidt <i>et al.</i> , 2002.	CDKs	Go, 2003.
<i>Cistein proteasas</i>	Sajid & McKerrow, 2002.	<i>Cistein proteasas</i>	Caffrey <i>et al.</i> , 2000.	<i>Cistein proteasas</i>	Go, 2003.
Biosíntesis de esterol	Roberts <i>et al.</i> , 2003.	Biosíntesis de esterol	Urbina, 1997.	<i>Proteasas aspárticas</i>	Silva <i>et al.</i> , 1996.
<i>DHFR-TS</i>	Gilbert, 2002.	<i>DHFR-TS</i>	Gilbert, 2002.	<i>DHFR-TS</i>	Yuthavong <i>et al.</i> , 2005.
<i>PFT</i> y <i>NMT</i>	Gelb <i>et al.</i> , 2003.	Vía de la pentosa fosfato	Barrett & Gilbert, 2002.	<i>PFT</i>	Chakrabarti <i>et al.</i> , 1998.
Glicólisis	Verlinde <i>et al.</i> , 2001.	Glicólisis	Verlinde <i>et al.</i> , 2001.	Transportadores de colina	Wengelnik <i>et al.</i> , 2002.
<i>Ornitina descarboxilasa</i>	Müller <i>et al.</i> , 2001.	Kinetoplasto	Barrett <i>et al.</i> , 2003.	Formación de la hemozoina	Dorn <i>et al.</i> , 1998.
<i>Protein kinasa</i>	Doerig, 2004.	Acidocalcisoma	Docampo <i>et al.</i> , 2001.	<i>Citocromo C oxireductasa</i>	Rosenthal, 2003.
Microtubulos	Jayanarayan <i>et al.</i> , 2002.	<i>Topoisomerasa I</i>	Shapiro <i>et al.</i> , 1990.		
<i>Topoisomerasa I</i>	Shapiro <i>et al.</i> , 1990.				

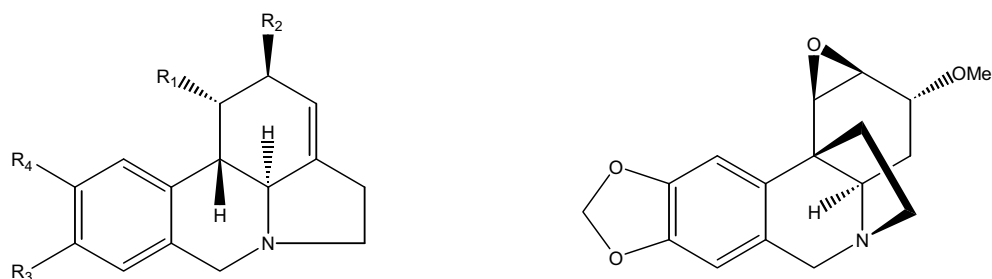
Abreviaturas: *DHFR-TS*, *Dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa*; *PFT*, *Protein farnesil transferasa*; *NMT*, *N-miristoil transferasa*; *CDK*, *quinasas dependientes de ciclina*.

principalmente en la investigación de metabolitos con actividad antimalárica y amebicida (*Entamoeba histolytica*) y, relativamente en una menor proporción, contra especies de *Leishmania* y *Trypanosoma*. Todas estas investigaciones han arrojado una gran cantidad de compuestos antiprotozoarios con una inmensa variedad estructural. Sin embargo, y a pesar de los grandes avances de las últimas décadas, muchos de estos compuestos solamente han sido estudiados *in vitro*. Además, algunos de los alcaloides identificados como antiprotozoarios son también tóxicos y quizás no servirán como medicamentos. No obstante, y aun teniendo en cuenta estos problemas, los metabolitos naturales pueden jugar un papel muy importante en el desarrollo de una nueva generación de fármacos antiparasitarios.

#### **4.1.3. Alcaloides de Amaryllidaceae con actividad antiprotozoaria**

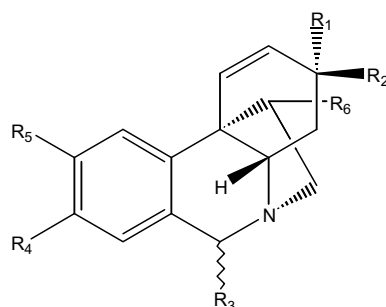
Durante mucho tiempo existió una gran tendencia a la obtención de medicamentos por vía sintética. Sin embargo, en la actualidad, se observa una tendencia a considerar de nuevo los productos de origen natural. Los productos naturales son considerados aún como una fuente importante en la búsqueda de nuevos medicamentos, siendo la evaluación de extractos vegetales una práctica común en la industria farmacéutica (Ortholand & Ganesan, 2004). Es por ello que, el interés por conocer la química de las plantas crece constantemente.

Las especies de la familia Amaryllidaceae son conocidas por producir alcaloides únicos desde el punto de vista estructural y por presentar un amplio rango de efectos fisiológicos, incluyendo actividad antitumoral, antiviral, citotóxica, inhibitoria de la acetilcolinesterasa, inmunoestimuladora y antiinflamatoria. Algunos de ellos han sido incluso usados en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, la miastenia gravis y la miopatía (Şener *et al.*, 2003). A su vez, algunos miembros de esta familia de alcaloides son particularmente interesantes por su potencial actividad antiprotozoaria (Figura 63). Así, licorina, augustina y crinamina fueron considerados como los principales constituyentes antimaláricos aislados de los bulbos de *Crinum amabile* y, entre ellos, la augustina, un alcaloide de tipo 5,10b-ethanophenanthridina, mostró ser el más activo (Likhitwitayawuid *et al.*, 1993). En otros estudios sobre la actividad antimalárica de los alcaloides de Amaryllidaceae (Şener *et al.*, 2003), hemantamina y hemantidina presentaron actividad frente a la cepa cloroquina-sensible T9/96 de *P. falciparum* (IC<sub>50</sub>

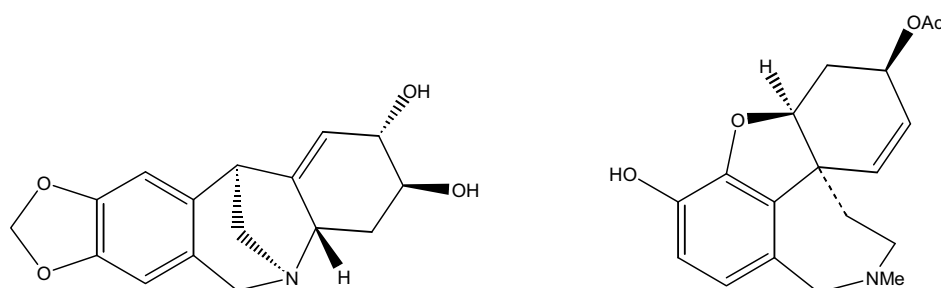


Licorina  $R_1 = R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 + R_4 = \text{OCH}_2\text{O}$   
 Galantina  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OMe}$   
 1,2-*O*-diacetyllicorina  $R_1 = R_2 = \text{Ac}$ ,  $R_3 + R_4 = \text{OCH}_2\text{O}$

Augustina



Crinamina  $R_1 = \text{OMe}$ ,  $R_2 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_4 + R_5 = \text{OCH}_2\text{O}$ ,  $R_6 = \text{OH}$   
 Hemantamina  $R_1 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OMe}$ ,  $R_4 + R_5 = \text{OCH}_2\text{O}$ ,  $R_6 = \text{OH}$   
 Hemantidina  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OMe}$ ,  $R_3 = R_6 = \text{OH}$ ,  $R_4 + R_5 = \text{OCH}_2\text{O}$   
 3-Epihidroxibulbispermina  $R_1 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_2 = R_6 = \text{OH}$ ,  $R_4 + R_5 = \text{OCH}_2\text{O}$   
 Oxomaritidina  $R_1 + R_2 = \text{O}$ ,  $R_3 = R_6 = \text{H}$ ,  $R_4 + R_5 = \text{OMe}$



Pancracina

3-*O*-Acetylsanguinina

**Figura 63.** Alcaloides de Amaryllidaceae con actividad antiprotozoaria.

= 2.33 y 1.10  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Además de hemantamina y hemantidina, licorina, 3-epihidroxibulbispermina, galantina y pancracina, han mostrado también poseer actividad antimalárica frente a la cepa cloroquina-resistente K1 de *P. falciparum*, con valores de  $\text{IC}_{50}$  por debajo de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Herrera *et al.*, 2001a; Labraña *et al.*, 2002; Şener *et al.*, 2003). Por otro lado, hemantidina, aislada de *Zephyranthes citrina*, y 3-*O*-

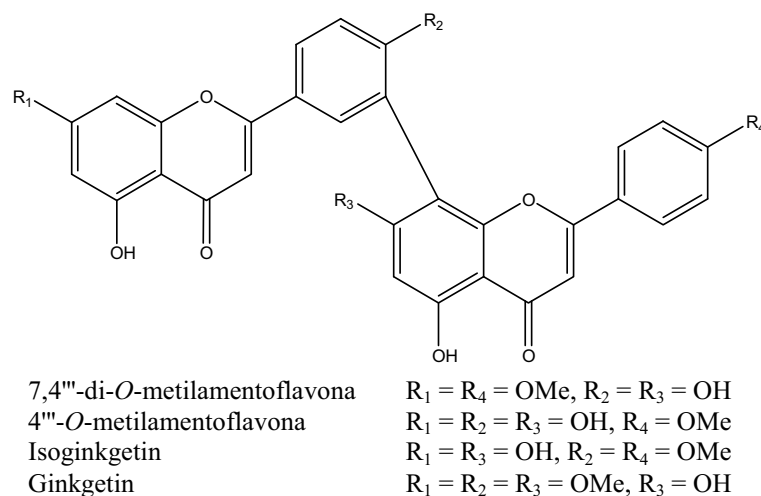
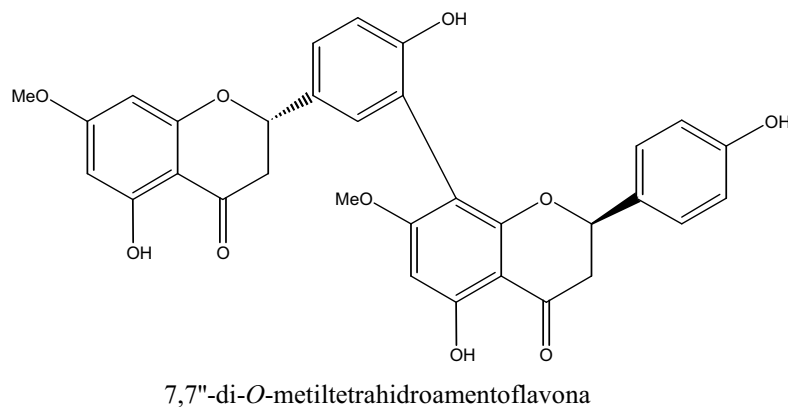
acetilsanguinina obtenida de los bulbos de *Crinum kirkii*, presentaron actividad biológica *in vitro* frente a *T. b. rhodesiense* (cepa STIB-900) con similares valores de IC<sub>50</sub> de 3.47 y 3.48 μM, respectivamente, y frente a *T. cruzi* (cepa Tulahuen C4) con una IC<sub>50</sub> de 4.35 y 7.29 μM, respectivamente. Por su parte, galantina, pancracina, oxomaritidina y 1,2-*O*-diacetillicorina, solamente mostraron actividad frente a *T. b. rhodesiense* con valores de IC<sub>50</sub> de 9.77, 2.44, 9.81 y 2.69 μM, respectivamente (Herrera *et al.*, 2001a; Herrera *et al.*, 2001b; Labraña *et al.*, 2002; Machocho *et al.*, 2004). Es interesante hacer notar que pancracina no mostró citotoxicidad frente a células L-6 (mioblastos de ratas), lo cual confirma la actividad selectiva de este compuesto por *T. b. rhodesiense* y *P. falciparum* (Labraña *et al.*, 2002).

Estos resultados motivan la investigación de los alcaloides de *Phaedranassa dubia*, evaluando la actividad antiprotozoaria *in vitro* de sus alcaloides frente a los parásitos *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi*, *L. donovani* y *P. falciparum*. De acuerdo con la información de que disponemos, ninguna especie de este género ha sido investigada con anterioridad.

#### 4.1.4. Biflavonoides con actividad antiprotozoaria

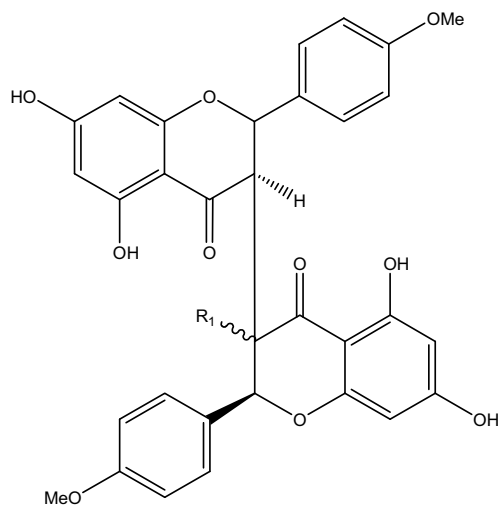
En un esfuerzo por descubrir nuevas cabezas de serie para enfermedades infecciosas, diferentes grupos de investigadores han estudiado numerosos extractos de plantas para detectar metabolitos secundarios con actividad biológica relevante. Con relación a los biflavonoides, se dispone de poca información relativa a la actividad antiprotozoaria; aunque, recientemente se ha podido establecer cierta actividad para algunos compuestos de este tipo (Figura 64). Así, la biflavanona 7,7''-di-*O*-metiltetrahidroamentoflavona, aislada de las hojas de *Rhus retinorrhoea* (Anacardiaceae), presentó una moderada actividad frente a las cepas W2 y D6 de *P. falciparum* con valores de IC<sub>50</sub> de 0,98 y 2,80 μg/ml, respectivamente (Ahmed *et al.*, 2001). Así mismo, las biflavonas 7,4'''-di-*O*-metilamentoflavona y 4'''-*O*-metilamentoflavona, aisladas de *Podocalyx loranthoides* (Euphorbiaceae), mostraron porcentajes de inhibición de 28,79 y 38,29 %, respectivamente, sobre el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana*, al ser evaluadas a una concentración de 100,0 μg/ml, (Suárez *et al.*, 2003). El extracto *n*-BuOH de la raíz de *Wikstroemia indica* (Thymelaeaceae) mostró, a su vez, un potente efecto inhibitorio sobre parásitos de *P. falciparum*. El fraccionamiento del extracto activo permitió el aislamiento de dos biflavonoides, sikokianin B y sikokianin C con valores de IC<sub>50</sub> de

0,54  $\mu\text{g/ml}$  y 0,56  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente, frente a la cepa cloroquina-resistente K1 de *P. falciparum* (Nunome *et al.*, 2004). El biflavonoide *ent*-naringeninil-(I-3,II-8)-4'-*O*-metilnaringenina, aislado de la raíz de *Garcinia livingstonei*, también mostró una moderada actividad frente a la cepa cloroquina-resistente Ghana de *P. falciparum* ( $\text{IC}_{50} = 6,7 \mu\text{M}$ ) (Mbwambo *et al.*, 2006). Otro estudio examinó la actividad antiplasmodial, leishmanicida y antitripanosomal de ocho biflavonoides y, entre ellos, la lanaroflavona, mostró una elevada actividad antiplasmodial frente a la cepa cloroquina-resistente K1 de *P. falciparum* ( $\text{IC}_{50} = 0,48 \mu\text{M}$ ). Isoginkgetin, por su parte, fue el compuesto de mayor efectividad frente a amastigotes de *L. donovani* ( $\text{IC}_{50} = 1,19 \mu\text{M}$ ), mientras que ginkgetin e isoginkgetin presentaron la mayor actividad frente a *T. cruzi* (cepa Tulahuen C2C4) con una  $\text{IC}_{50}$  de 11,0 y 13,0  $\mu\text{M}$ , respectivamente, y frente a *T. b. rhodesiense* (cepa STIB 900) con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 7,0 y 3,5  $\mu\text{M}$  (Weniger *et al.*, 2006). La lanaroflavona presentó el mayor índice de selectividad ( $\text{IS} = 159$ ), indicando así, una actividad antiplasmodial preferencial.

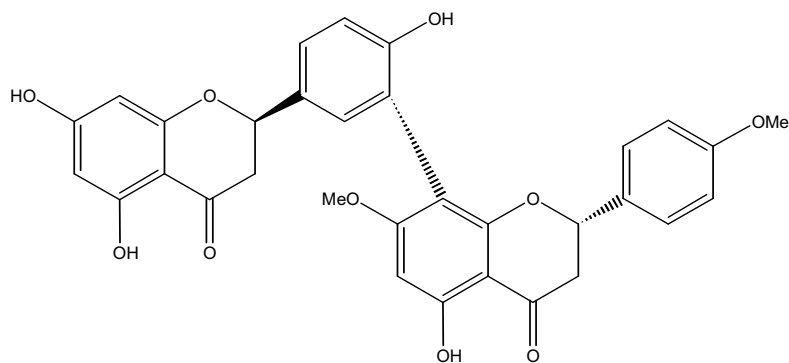


**Figura 64.** Biflavonoides con actividad antiprotozoaria.

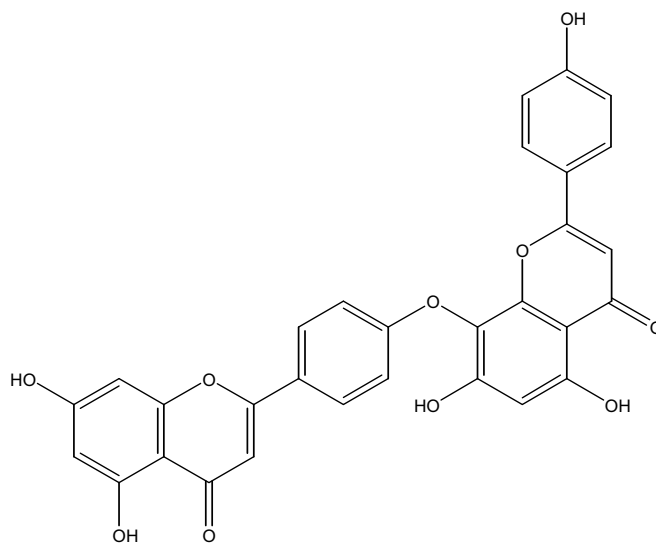
**Continuación figura 64.** Biflavonoides con actividad antiprotozoaria.



Sikokianin B R1 = H en posición  $\alpha$   
 Sikokianin C R1 = H en posición  $\beta$



*ent*-naringeninil-(I-3,II-8)-4'-*O*-metilnaringenina



Lanaroflavona



## 4.2. Introducción a la actividad antioxidante

### 4.2.1. El estrés oxidativo en los sistemas biológicos

El oxígeno esta asociado a las condiciones de vida aerobia (Davis, 1995), representa la fuerza motriz para el mantenimiento del metabolismo y viabilidad celular, al mismo tiempo que entraña un peligro potencial debido a sus especiales características paramagnéticas, responsables de la formación de intermediarios dotados de una alta reactividad, conocidas como especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés "Reactive Oxygen Species") (González *et al.*, 2001). Muchas especies reactivas del oxígeno son radicales libres (RL).

Un radical libre es una molécula o fragmento de molécula que contiene uno o más electrones desapareados en el orbital externo de uno de sus átomos. Estos electrones desapareados confieren al radical una gran reactividad química; ya que, al ser inestables, tienen tendencia a ceder o a captar un electrón de otra molécula o radical para conseguir una configuración electrónica estable. Esta elevada reactividad implica una baja especificidad química, de manera que pueden reaccionar con todo tipo de moléculas vecinas, ya sean lípidos, proteínas, glúcidos o ácidos nucleicos. Esta elevada reactividad también hace que estos radicales no sobrevivan más de unos cuantos microsegundos en el medio, y en unas concentraciones muy bajas.

Los radicales libres más importantes en los sistemas biológicos son los derivados del oxígeno, pero también hay algunas moléculas que tienen oxígeno y que no son radicales libres como el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), el ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), el oxígeno molecular ( $O_2$ ) y el ozono ( $O_3$ ), que participan de forma activa en las reacciones de los radicales libres en los sistemas biológicos. Para englobar todos estos compuestos derivados del oxígeno, radicales y no radicales, se ha creado el término especie reactiva de oxígeno (Halliwell, 2006). Así pues, entre las especies reactivas de oxígeno podemos encontrar:

- **Radicales:** El Ión-radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), y los radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ), alcoxilo ( $RO\cdot$ ), peroxilo ( $ROO\cdot$ ) y óxido nítrico ( $NO\cdot$ ).

- **No radicales:** Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ozono ( $\text{O}_3$ ), hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) y peroxinitrilo ( $\text{ONOO}^-$ ).

La formación de ROS es un proceso natural, constante e inevitable asociado a la vida en condiciones aeróbicas. Todas las células producen ROS continuamente. También llegan ROS procedentes del exterior del organismo. Entre las fuentes endógenas destacan:

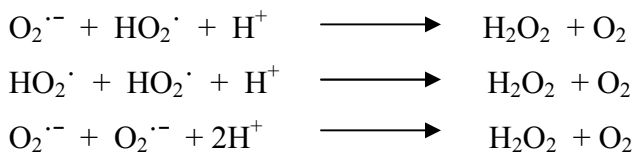
- La cadena respiratoria, donde la reducción de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estos compuestos. Debe señalarse que el 95 % del oxígeno que respiramos es reducido a  $\text{H}_2\text{O}$  por la acción de la *citocromo oxidasa* mitocondrial, último eslabón de la cadena de transporte electrónico. De hecho, la generación accidental del radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) se debe, fundamentalmente, a la fuga de electrones de diferentes sistemas (cadena de transporte electrónico de mitocondrias y cloroplastos, citocromos P-450 y enzimas donantes de electrones).
- Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la *NADPH oxidasa* generando directamente ión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Por otra parte, como mecanismo de defensa, dichas células generan óxido nítrico ( $\text{NO}^{\cdot}$ ), por acción de la *óxido nítrico sintasa* sobre la L-arginina intracelular. La combinación del ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) con el ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) da lugar a la formación del peroxinitrilo ( $\text{ONOO}^-$ ) capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas.
- La autooxidación de compuestos de carbono reducido como aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de estos radicales.
- La activación catalítica de diversas enzimas del metabolismo intermediario como la *hipoxantina y xantina oxidasas*, *aldehído oxidasa*, *monoamino oxidasa*, *ciclooxigenasa* y *lipoxigenasa*, son fuentes representativas de esta producción (González *et al.*, 2001).

Las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser:

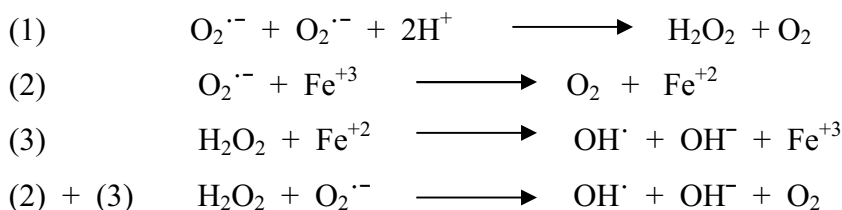
- Ambientales: radiación electromagnética, luz solar, ozono y tabaco, entre otras.
- Farmacológicas: xenobióticos, y drogas, entre otras.
- Nutricionales: Contaminantes y aditivos, entre otras.

Junto a los radicales de oxígeno existen otros derivados centrados en átomos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, etc., que indiscutiblemente contribuyen a la propagación y mantenimiento de nuevas reacciones conducentes a la formación de radicales libres.

**4.2.1.1. Daño oxidativo a biomoléculas:** Son muchas las especies reactivas de oxígeno que actúan como oxidantes biológicos, pero el ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es el más significativo. La simple adición de un protón da lugar a la formación del radical hidroxiperoxilo ( $HO_2^{\cdot}$ ), convirtiéndose en un agente oxidante muy activo. Estas transformaciones básicas se resumen del modo siguiente:



En solución acuosa, el ión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) no es particularmente reactivo con los lípidos, glúcidos o ácidos nucleicos y exhibe reactividad limitada frente a determinadas proteínas. Esta evidencia constata que el anión superóxido reacciona tan solo con proteínas que contienen metales en su grupo prostético. Este radical tiene una vida media muy corta, por lo cual no se aleja del lugar de síntesis. Se destruye rápidamente por dismutación dando lugar al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), de manera natural o mediante la enzima *superóxido-dismutasa* (*SOD*), jugando un papel muy importante en la formación de otros intermediarios reactivos. En este sentido, la principal trascendencia de los radicales superóxido se debe al hecho de que son la fuente más importante de  $H_2O_2$  y que actúan como reductores de metales de transición, siendo ambos precursores del peligroso radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). También pueden reaccionar, entre otros, con el radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) dando lugar al peroxinitrilo ( $ONOO^{\cdot}$ )



El estrés oxidativo está asociado a un exceso de especies reactivas de oxígeno, que pueden reaccionar con diferentes tipos de componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, produciendo efectos locales y una eventual disfunción de los órganos. Así, pueden actuar:

- Sobre lípidos poliinsaturados de las membranas produciendo pérdida de la fluidez y lisis celular como consecuencia de la peroxidación lipídica (PL). Los lípidos son probablemente las biomoléculas más susceptibles al ataque de los radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno, en particular el radical hidroxilo, tienen como objetivo preferente los ácidos grasos poliinsaturados que formen parte de la fase lipídica de las membranas celulares. La PL se desarrolla mediante una serie de reacciones en cadena. Una vez puesta en marcha, se propaga rápidamente, dando lugar a lesiones que disminuyen la fluidez de las membranas.
- Sobre las proteínas produciendo inactivación y desnaturalización. De hecho, las proteínas también pueden ser atacadas por las ROS, produciéndose cambios estructurales y funcionales; aunque, no son tan susceptibles como los ácidos grasos poliinsaturados, al presentar menores posibilidades para la progresión de las reacciones en cadena. El ataque de los radicales libres a las proteínas únicamente se produce cuando existe una acumulación de radicales, o cuando el ataque, facilitado por la unión de la proteína a un ión de un metal de transición, converge en un lugar concreto de la proteína.
- Sobre los ácidos nucleicos mediante la modificación de bases produciendo mutagénesis y carcinogénesis. Las lesiones sobre los ácidos nucleicos, igual que en el caso de las proteínas, no son tan frecuentes, y solamente se dan cuando los radicales libres se forman en sus inmediaciones (por ejemplo como consecuencia de una irradiación). En este caso, los efectos más frecuentes son las modificaciones de las bases, la rotura de las fibras y la formación de enlaces cruzados. Las lesiones oxidativas del DNA en condiciones metabólicas normales son bastante elevadas; pero existe un grupo de enzimas reparadoras que solucionan estas lesiones. Por lo tanto, las lesiones oxidativas y las mutaciones van acumulándose con la edad y pueden contribuir al desarrollo de enfermedades como el cáncer y procesos inflamatorios crónicos.

Por otra parte debe de tenerse en cuenta que el organismo también utiliza a estos compuestos oxidantes en beneficio propio, pudiendo actuar a distintos niveles: como señales intercelulares y reguladoras de genes implicados en el proceso de crecimiento y desarrollo celular; como inductores de la expresión de genes; regulando la estructura y función de determinadas proteínas; interviniendo en el control del tono muscular; interviniendo en la síntesis de tiroxina en la glándula tiroides; participando en los procesos de eliminación de patógenos; entre otros aspectos importantes.

**4.2.1.2. Defensa antioxidante:** La formación de estos compuestos oxidantes es necesaria y beneficiosa para la supervivencia de los seres vivos; pero, si estas especies reactivas están en exceso serán perjudiciales. Por tanto, son necesarias unas defensas antioxidantes que los neutralicen, de manera que se mantenga un equilibrio entre la cantidad de especies reactivas y las defensas antioxidantes. En este contexto, el estrés oxidativo se puede definir como el estado en el cual el nivel de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes del organismo, como resultado de un desequilibrio entre los sistemas de formación y eliminación de especies reactivas de oxígeno (Finkel & Holbrook, 2000; Mittler, 2002).

Los antioxidantes son sustancias capaces de prevenir, parar o retardar determinadas reacciones de oxidación, protegiendo las moléculas biológicas de las agresiones oxidativas. Existe un amplio abanico de sistemas y compuestos antioxidantes. Estos se pueden clasificar según diferentes criterios, como por ejemplo según el mecanismo de acción (enzimático, no enzimático), los puntos de actuación en la cadena oxidativa (preventivos, reparadores), o según su procedencia (endógenos o exógenos). De todas maneras, todos estos antioxidantes tan diversos no actúan por separado, sino que se complementan entre sí, regenerándose los unos a los otros e interviniendo en diferentes puntos, conformando un equilibrio de piezas destinado a evitar un exceso de sustancias oxidantes en el organismo. A continuación se expone una breve descripción de cada tipo de antioxidante, según su mecanismo de acción.

**4.2.1.2.1. Sistema enzimático:** Los organismos aerobios han desarrollado enzimas antioxidantes tales como: *superóxido dismutasa (SOD)*, *catalasa (CAT)*, *glutación peroxidasa (GPx)* y *DT-diaforasa*, que actúan tal y como se muestra en el esquema siguiente:



- **Directo:** Reducción de los grupos S-S de los aminoácidos azufrados de las proteínas por enzimas específicas como la *disulfuro reductasa* y la *sulfóxido reductasa*.
- **Indirectos:** En primer lugar se reconoce el daño molecular siendo éste eliminado o degradado y, en segundo lugar, se sintetiza la parte eliminada. Esto ocurre tanto en las proteínas oxidadas y los peróxidos lipídicos, como en las oxidaciones del DNA y RNA.

#### **4.2.1.3. Procesos fisiológicos y patológicos relacionados con los radicales libres:**

Ante el estrés oxidativo, el organismo responde con la defensa antioxidante, pero en determinadas ocasiones puede ser insuficiente. Durante los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre esta situación de desequilibrio y una serie de procesos fisiológicos y patológicos que limitan la calidad y la expectativa de vida de muchas personas. Entre estos procesos destacan: mutagénesis, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, procesos de isquemia / reperfusión, diabetes, cataratas, asfixia del neonato, enfermedades inflamatorias, trastornos del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas (e.j. Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple y síndrome de Down), entre otros (Rice-Evans *et al.*, 1995; Halliwell, 1996; Aruoma, 2003). Asimismo, los procesos patológicos propios del envejecimiento se aceleran en relación directa con la magnitud del estrés oxidativo (Waris & Ahsan, 2006). Por esto, mientras en un principio se señaló que los organismos que vivían más años eran aquellos que tenían una tasa metabólica inferior, actualmente se ha demostrado que son aquellos con mejores defensas antioxidantes (Finkel & Holbrook, 2000).

#### **4.2.2. Los compuestos fenólicos como antioxidantes**

En el organismo se produce un equilibrio entre oxidantes / antioxidantes, cuando este equilibrio se rompe a favor de los oxidantes se produce un estrés oxidativo el cual está implicado en muchos procesos fisiopatológicos (enfermedades, envejecimiento celular, etc). Por tanto, es de vital importancia el consumo de productos que contengan antioxidantes naturales y se pueda mantener el equilibrio entre oxidantes /antioxidantes. Además, si tenemos en cuenta que a medida que el individuo envejece dicho balance se decanta a favor de los oxidantes, es de vital importancia un consumo de antioxidantes

naturales tales como los compuestos fenólicos, para contrarrestar el desequilibrio (Cao *et al.*, 1998a; Young *et al.*, 1999).

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo muy numeroso de metabolitos secundarios que derivan fundamentalmente de las rutas biosintéticas del siquimato-fenilpropanoide, del acetato-malonato y de la ruta mixta fenilpropanoide-acetato. Los flavonoides y los estilbenos se originan por la ruta mixta (Randhir *et al.*, 2004). Estos compuestos, uno de los grupos fitoquímicos más ampliamente distribuido, son de considerable importancia, tanto estructural como funcional, para los organismos vivos, ya que realizan un amplio abanico de funciones biológicas (Balasundram *et al.*, 2006). Además, se han asociado con los beneficios sobre la salud derivados del consumo de altos niveles de frutas y vegetales (Parr & Bolwell, 2000). Los efectos benéficos han sido atribuidos a su actividad antioxidante (Heim *et al.*, 2002).

Estructuralmente, los compuestos fenólicos están conformados por estructuras aromáticas con uno o varios sustituyentes hidroxilos, presentando un rango que va desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos altamente polimerizados (Bravo, 1998). A pesar de su diversidad estructural, este grupo de compuestos es frecuentemente referido como polifenoles. La mayoría de los compuestos fenólicos están conjugados con mono y polisacáridos, unidos a uno o más grupos fenólicos. También pueden presentarse como derivados funcionales de ester y metil-ester (Balasundram *et al.*, 2006). De tal diversidad estructural resulta un amplio rango de compuestos fenólicos, que pueden ser categorizados en varias clases, tal como se muestra en la Tabla 8 (Balasundram *et al.*, 2006). De estos, los derivados de ácidos benzoicos e hidroxicinámicos, así como los taninos, son considerados como los compuestos fenólicos dietarios más abundantes (King & Young, 1999).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se puede llevar a cabo a través de distintos mecanismos: habilidad captadora de radicales libres, donación de electrones, quelación de cationes metálicos que intervienen en las reacciones de formación de especies reactivas de oxígeno, modulación de la expresión de genes responsables de la síntesis de enzimas antioxidantes, activación o inhibición de enzimas e interacción con señales celulares (Amarowicz *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Soobrattee *et al.*, 2005; Balasundram *et al.*, 2006).



**Tabla 8.** Clases de compuestos fenólicos en plantas.

Clase	Estructura
Fenoles simples, benzoquinonas.	$C_6$
Ácidos hidroxibenzoicos.	$C_6 - C_1$
Acetofenonas, ácidos fenilacéticos.	$C_6 - C_2$
Ácidos hidroxicinámicos, derivados fenilpropanoides.	$C_6 - C_3$
Naftoquinonas.	$C_6 - C_4$
Xantonas.	$C_6 - C_1 - C_6$
Estilbenos, antraquinonas.	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoides, isoflavonoides.	$C_6 - C_3 - C_6$
Lignanós, neolignanós.	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoides.	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas.	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados (proantocianidinas).	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

El mecanismo más estudiado ha sido la captación de radicales libres. Esta propiedad depende de la estructura química de la molécula; ya que, el principal determinante es el número y la localización de los grupos hidroxilo dadores de electrones. Al ceder un electrón al radical libre, la molécula se queda con un electrón desapareado, que se estabiliza gracias a la deslocalización de los dobles enlaces, segunda característica importante para la actividad antiradicalaria (Siquet *et al.*, 2006). En el caso de los ácidos benzoicos por ejemplo, la actividad antioxidante depende del número y posiciones de los grupos hidroxilo en relación al grupo funcional carboxilo (Robards *et al.*, 1999). Los ácidos monohidroxibenzoicos con una función OH en la posición *orto* o *para* con relación al grupo COOH, no muestran actividad antioxidante; en cambio, en posición *meta*, son activos (Rice-Evans *et al.*, 1996a). La actividad antioxidante de los ácidos hidroxibenzoicos se incrementa con el grado de hidroxilación, tal es el caso del ácido gálico (trihidroxilado), el cual presenta una elevada actividad antioxidante. Sin embargo, la sustitución de los grupos hidroxilo con grupos metoxilo en las posiciones 3 y 5, reduce la actividad (Rice-Evans *et al.*, 1996a).

Los ácidos hidroxicinámicos exhiben una alta actividad antioxidante comparada con la del correspondiente a el ácido hidroxibenzoico (Andreasen *et al.*, 2001). El incremento de la actividad podría ser debida a la presencia del doble enlace conjugado del grupo C<sub>3</sub> (-CH=CH-COOH), el cual incrementa la habilidad de ceder electrones a los radicales libres en comparación con el grupo COOH de los ácidos hidroxibenzoicos (Rice-Evans *et al.*, 1996a). Las relaciones estructura-actividad han demostrado, además, que el grupo catecol es el principal determinante de la actividad antioxidante de los fenoles, hecho que justifica que el ácido clorogénico y el ácido cafeico sean más efectivos que los antioxidantes clásicos como el ácido ascórbico (Rice-Evans *et al.*, 1996a).

En el caso particular de los flavonoides, el estudio de la relación estructura-actividad es más complicado, debido a la relativa complejidad de las moléculas. Algunas de las características estructurales que determinan la actividad antioxidante son:

- El grado de hidroxilación y la posición del grupo OH en el anillo B; en particular, una estructura *orto*-dihidroxilo (grupo catecol) produce una elevada actividad, ya que confiere una mayor estabilidad al radical aroxilo por deslocalización electrónica (van Acker *et al.*, 1996); actuando además como sitio de fijación preferida para trazas de metales (Pietta, 2000).
- La presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B (grupo pirogalol) ha sido reportada por incrementar la actividad antioxidante, en comparación con la de flavonoides que tienen un simple grupo hidroxilo. Sin embargo, bajo las mismas condiciones, tales compuestos pueden actuar como pro-oxidantes, neutralizando el efecto antioxidante (van Acker *et al.*, 1996).
- Un doble enlace entre los carbonos C-2 y C-3, conjugado con el grupo 4-oxo, en el anillo C, incrementa la capacidad captadora de radicales de los flavonoides (Pietta, 2000).
- Un doble enlace entre C-2 y C-3, combinado con un 3-OH, en el anillo C, incrementa también la capacidad captadora de radicales, como es el caso del camferol (van Acker *et al.*, 1996). Una sustitución del grupo 3-OH produce un incremento del ángulo de torsión y una pérdida de coplanaridad y, subsecuentemente, una reducción de la actividad antioxidante (Seeram & Nair, 2002).

- La sustitución de grupos hidroxilo en el anillo B por grupos metoxilos altera el potencial redox y la capacidad captadora de radicales de los flavonoides (Pietta, 2000; Seeram & Nair, 2002).

**4.2.2.1. Biflavonoides como antioxidantes:** Son pocos los trabajos publicados con relación a la actividad antioxidante de biflavonoides y, en algunos casos, contradictorios. Algunos de ellos estudian fracciones de extractos con caracterización tanto fitoquímica como antioxidante. Entre ellos tenemos el de la fracción biflavonoide aislada a partir de *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) y conformada principalmente por biflavonoides del tipo amentoflavona. Esta fracción fue capaz de proteger membranas liposomales contra la degradación peroxidativa causada por irradiación UV (Yamaguchi *et al.*, 2005). A su vez, la fracción más activa en cuanto a la protección frente a la peroxidación lipídica, obtenida a partir del extracto etanólico de *Hypericum perforatum*, era la única que contenía biflavonoides, entre ellos amentoflavona y biapigenina (Silva *et al.*, 2005). Dicha fracción estuvo, además, entre las más activas como captadoras de radicales libres. Otra especie del género *Hypericum*, *H. Triquetrifolium*, ha sido reportada por contener biapigenina, un compuesto con una potente actividad antioxidante (Couladis *et al.*, 2002). Por otro lado, a partir de *Garcinia xanthochymus* fueron aislados una serie de biflavonoides. En este caso, la menor actividad captadora de radicales DPPH<sup>•</sup> fue observada para los biflavonoides amentoflavona y biapigenina con una CE<sub>50</sub> por encima de 100 μM; los más activos fueron los biflavonoides del tipo morelloflavona (Baggett *et al.*, 2005). Recientemente, el biflavonoide morelloflavona se reportó como un potente antioxidante frente a la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Hutadilok-Towatana *et al.*, 2007). Algunos biflavonoides también han sido reportados por presentar efectos protectivos en estudios de muerte celular inducida por estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Todos los biflavonoides evaluados a una concentración de 10 μM redujeron significativamente la muerte celular provocada por el peróxido de hidrógeno; entre ellos, los biflavonoides de los tipos amentoflavona, hinokiflavona y ochnaflavona (Kang *et al.*, 2005).



### 4.3. Material y Métodos

#### 4.3.1. Actividad antiprotozoaria *in vitro*

Los ensayos *in vitro* frente a protozoos parásitos se llevaron a cabo en el Swiss Tropical Institute de Basilea, Suiza. Ocho alcaloides aislados de *Phaedranassa dubia* y seis biflavonoides aislados de *Garcinia madruno*, se evaluaron sobre cuatro tipos de parásitos responsables de diferentes enfermedades en humanos. En la Tabla 9 se muestra el nombre, cepa y estadio, así como el patrón empleado en cada caso. Los valores se expresan como  $CI_{50}$  en  $\mu\text{g/ml}$ . A su vez, la toxicidad de estos compuestos se evaluó empleando macrófagos y células L-6, expresándose los resultados en forma de concentración mínima inhibitoria (MIC) en  $\mu\text{g/ml}$ .

**Tabla 9.** Protozoos parásitos y patrones utilizados en los ensayos *in vitro*.

Parásito	Cepa	Estadio	Patrón
<i>T. cruzi</i>	Talahuen C4	Tripomastigotes	Benznidazol
<i>T. b. rhodesiense</i>	STIB 900	Tripomastigotes	Melarsoprol
<i>L. donovani</i>	MHOM-ET-67/L82	Amastigote	Pentostam
<i>P. falciparum</i>	K1	IEF	Cloroquina

**4.3.1.1. Ensayo *in vitro* frente a *Trypanosoma cruzi*:** Mioblastos de rata (células L-6) se sembraron en microplacas en una proporción de 2.000 células / pozo, cada uno de los cuales contenía 100  $\mu\text{l}$  de medio RPMI 1640 con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 2 mM de L-glutamina. Después de 24 h se añadieron 100  $\mu\text{l}$  / pozo de una solución que contenía 5.000 tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Talahuen C4 portadora del gen galactosidasa Lac Z) y, además, diluciones seriadas del compuesto a ensayar. Las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de  $\text{CO}_2$  durante 4 días. A las 96 h, la MIC se determinó microscópicamente. Para determinar el  $IC_{50}$  se añadió el sustrato CPRG / Nonicet a cada pocillo. El color de la reacción se desarrolló en las siguientes 2-4 h y se leyó fotométricamente a 540 nm. Los valores de  $IC_{50}$  se calcularon a partir de los valores de la curva de inhibición sigmoidal. La toxicidad se determinó utilizando la misma serie de diluciones sobre células L-6 no infectadas.

**4.3.1.2. Ensayo *in vitro* frente a *Trypanosoma brucei rhodesiense*:** 50 µl de medio mínimo esencial suplementado con 2-mercaptoetanol y un 15 % de suero de caballo inactivado térmicamente (Baltz *et al.*, 1985) se añadieron a cada pozo de una microplaca de 96 pozos. Diluciones seriadas del compuesto a ensayar se adicionaron a cada pozo. Posteriormente se añadieron 50 µl de suspensión de *T. b. rhodesiense* y se incubó a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 h, tras lo cual se añadieron 50 µl de Alamar azul, prolongándose la incubación 2-4 h más. La placa se leyó con un cytofluor Millipore 2300, empleando una λ de excitación de 530 nm y una λ de emisión de 590 nm (Ráz *et al.*, 1997). Las lecturas fluorescentes se expresaron en porcentajes respecto a la lectura control y se determinaron los valores de IC<sub>50</sub>. El control se preparó sin compuesto activo.

**4.3.1.3. Ensayo *in vitro* frente a *Leishmania donovani*:** Macrófagos peritoneales de ratón se sembraron en microplacas Lab-tek de 16 cámaras, conteniendo un medio RPMI 1640 con un 10 % de FBS inactivado por calor. A las 24 h se añadieron amastigotes de *L. donovani* y macrófagos en una proporción 3:1, respectivamente. Después de 4 h, se reemplazó el medio RPMI 1640 y tras una incubación de 24 h, se sustituyó nuevamente por medio RPMI 1640 conteniendo diferentes concentraciones del compuesto a ensayar. Posteriormente, las placas se incubaron 4 días a 37 °C bajo una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub> y, tras eliminar el medio, se fijaron con MeOH y se tiñeron con Giemsa. La relación entre los macrófagos infectados y los no infectados se determinó microscópicamente. Los valores se expresaron en porcentajes respecto a la lectura control y el valor de IC<sub>50</sub> se calculó por regresión lineal.

**4.3.1.4. Ensayo *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum*:** La actividad antiplasmódica se determinó empleando cepas K1 (resistentes a la cloroquina y a la piremetamina). Se utilizó para ello una modificación del ensayo de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-hipoxantina (Ridley *et al.*, 1996). Así, los glóbulos rojos recién infectados fueron sometidos a una serie de diluciones en microplacas, permaneciendo durante 48 h a 37 °C en una atmósfera con cierta carencia de oxígeno y con exceso de CO<sub>2</sub>. La hipoxantina marcada se añadió a cada pozo y, luego de incubar durante 24 h, se filtraron y se sometieron a un conteo mediante un contador de centelleo líquido. El valor de IC<sub>50</sub> se calculó a partir de la curva de inhibición sigmoidal obtenida. El ensayo se realizó por duplicado.

### 4.3.2. Ensayo de la actividad inhibitoria de la formación de $\beta$ -hematina

Para el ensayo de inhibición de la formación de  $\beta$ -hematina se utilizó el método de Baelmans con algunas modificaciones (Osorio *et al.*, 2005). En resumen, la síntesis de la  $\beta$ -hematina se realizó con una mezcla de: 100  $\mu$ l de hemina 6,5 mM recién preparada, disuelta en una solución de NaOH 0,2 N; 50  $\mu$ l de ácido acético glacial 17,4 M; 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada; y 200  $\mu$ l de tampón acetato de sodio trihidratado 3 M, con un pH final aproximado de 4,0 (pHmetro Schott handylab 1 pH2000 CII). La mezcla fue incubada durante 1h a 60 °C. Posteriormente, fue centrifugada a 12.000 rpm durante 10 min (centrífuga 5415 Eppendorf, Brinkmann). Luego de descartar el sobrenadante, el precipitado fue lavado 3 veces con 200  $\mu$ l de DMSO para eliminar la hemina no reaccionante. El sólido de  $\beta$ -hematina obtenido fue disuelto en una solución de NaOH 0,1 N, de la cual se tomó una alícuota para la lectura espectrofotométrica a 386 nm (Spectronic® Genesys 2). La formación de  $\beta$ -hematina se monitoreo por medio de espectroscopía IR-TF (Perkin-Elmer), utilizando un rango de barrido entre 4.000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ . Para la evaluación de la actividad inhibitoria de los compuestos puros, los 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O fueron remplazados por una solución de la sustancia correspondiente a una concentración final de 2,0 mg/ml. Con la lectura espectrofotométrica se calcularon los porcentajes de inhibición mediante la fórmula:

$$\%Inhibicion = 100 * \left[ 1 - \left( \frac{Ab_{muestra}}{Ab_{control}} \right) \right]$$

Donde  $Ab_{muestra}$  y  $Ab_{control}$  son la absorbancia de la  $\beta$ -hematina con y sin el uso de la sustancia a evaluar, respectivamente. El difosfato de cloroquina (CQ) fue utilizado como control positivo y su actividad inhibitoria fue expresada en términos de  $CI_{50}$ . Es decir, la concentración de CQ necesaria para la inhibición del 50 % de la formación de  $\beta$ -hematina, la cual es calculada mediante el paquete estadístico GraphPad 4.0 (Prism, USA). Todos los ensayos fueron realizados dos veces por triplicado.

### 4.3.3. Actividad antioxidante

**4.3.3.1. Cinética de decoloración del radical libre DPPH':** El efecto de cada uno de los biflavonoides y de la fracción biflavonoide (**FB**) sobre el radical DPPH' fue

estimado de acuerdo al procedimiento descrito por Brand-Williams y col (1995). Así, una alícuota (500  $\mu$ l) de las soluciones conteniendo diferentes concentraciones de los biflavonoides fue agregada a 1000  $\mu$ l de una solución metanólica de DPPH $\cdot$  (0,02 mg/ml). La absorbancia a 517 nm fue tomada cada dos minutos, en un Cary 50, hasta que la reacción se estabilizará. La concentración de DPPH $\cdot$  en el medio de reacción ( $[DPPH\cdot]_T$ ) fue calculada de acuerdo con la ecuación de la recta:

$$A_{517nm} = 31.63 [DPPH\cdot]_T - 0.01686$$

Con un coeficiente de regresión linear igual a 0.999, y una desviación estándar de 0.004351.

El porcentaje de DPPH $\cdot$  remanente ( $\%[DPPH\cdot]_{REM}$ ) fue calculado por la siguiente expresión:

$$\%[DPPH\cdot]_{REM} = ([DPPH\cdot]_T / [DPPH\cdot]) * 100$$

Para diferentes concentraciones de los biflavonoides y de la **FB**, los parámetros de tiempo necesario para disminuir en un 50 % la concentración de DPPH $\cdot$  ( $T_{50}$ , segundos) y la concentración de DPPH $\cdot$  en el estado estable ( $DPPH\cdot_{ss}$ , mmol DPPH $\cdot$ ), fueron calculados mediante el paquete estadístico GraphPad 4.0 (Prism, USA). El modelo de curva dosis-respuesta obtenido al graficar el porcentaje de DPPH $\cdot$  remanente frente a la concentración de antioxidante, permite calcular la cantidad de antioxidante necesaria para estabilizar en un 50 % el radical libre ( $CE_{50}$ ) (Motulsky & Christopoulos, 2003).

La cantidad de DPPH $\cdot$  estabilizado se estimó para los primeros cuatro minutos de reacción en una concentración de compuesto cercana al valor de  $CE_{50}$ . Estos valores fueron convertidos a un ratio dividiéndolos por el total de DPPH $\cdot$  reducido en el estado estable. Este ratio fue denominado Índice de Reducción ( $RI_{t5}$ ), un parámetro cinético que mide la velocidad de reacción de la reducción del DPPH $\cdot$  (Silva *et al.*, 2005). Todos los parámetros fueron calculados gráficamente utilizando el software GraphPad 4.0 (Prism, USA).



#### 4.3.3.2. Inhibición de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL)

**4.3.3.2.1. Aislamiento de LDL:** La fracción de LDL fue obtenida por ultracentrifugación, aplicando un gradiente discontinuo de densidad en un equipo Beckman XL-100, utilizando un rotor SW-55Ti y tubos ultraclear de 5 ml (Ted Wilsona). Se parte de 50 ml de plasma procedente de voluntarios sanos y no fumadores (20-25 años), que se centrifugaron a 2.500 rpm y a 4 °C con citrato de sodio como anticoagulante (10,6  $\mu\text{mol}$  citrato de sodio/ml de sangre). La fracción Quilomicrones-VLDL fue obtenida adicionando 1,6 ml de NaCl (1,006 g/ml) sobre 3,2 ml de plasma y centrifugando a 5 °C por un periodo de 12 h a 49.500 rpm. La fracción superior (1,6 ml) fue retirada y se adicionaron 1,6 ml de KBr (1,182 g/ml), centrifugándose nuevamente a 5 °C durante 18 h a 49.500 rpm. Se utilizó la SDS-PAGE para confirmar la pureza de las fracciones colectadas (Quilomicrones, VLDL, LDL, y HDL).

**4.3.3.2.2. Cuantificación del contenido proteico:** La fracción LDL obtenida por ultracentrifugación fue cuantificada por el ensayo estándar mediante espectrofotometría (Protein Quantification Kit-Rapid de Fluka).

**4.3.3.2.3. Oxidación de la LDL:** 400  $\mu\text{l}$  de LDL a una concentración de 430  $\mu\text{g/ml}$ , se preincubaron durante 15 minutos con 50  $\mu\text{l}$  de los biflavonoides y de **FB** a diferentes concentraciones. La oxidación se inició con la adición de 50  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{CuSO}_4$  (100  $\mu\text{M}$ ) y se mantuvo la reacción a 37 °C durante 12 h. El proceso se detuvo con la adición de 25  $\mu\text{l}$  de una solución al 1 % de EDTA y enfriando en un baño de hielo durante 15 minutos.

**4.3.3.2.4. Determinación TBARS:** Los productos de la peroxidación lipídica, principalmente malonildialdehído (MDA), formados durante el proceso de oxidación, fueron medidos en un espectrofotómetro Cary 50 aplicando el método TBARS (del inglés, "Thiobarbituric Acid Reactive Substances"). Para ello, se adicionó 1 ml de una solución que contiene: 0,67 % de ácido tiobarbitúrico (TBA), 15 % de ácido tricloroacético (TCA) y 0,1 N de HCl, a 0,5 ml de la solución de oxidación de la LDL. El cromóforo obtenido a partir del TBA y el MDA, se forma a 95 °C al cabo de 60

minutos. La solución fue pasada a través de filtros de esteres de metilcelulosa (0,20 micrones). Las lecturas de tres experimentos independientes se realizaron a 532 nm, y la cantidad de equivalentes de malondialdehído (MDA) formados se calculó usando un coeficiente de extinción molar de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Rojstaczer & Triggle, 1996).

## 4.4. Resultados y Discusión

### 4.4.1. Actividad biológica antiprotozoaria

El estudio sistemático de compuestos antiprotozoarios procedentes de plantas ha requerido el desarrollo de bioensayos, especialmente *in vitro*, que permitan evaluar, de forma rápida y fiable, la actividad contra protozoos patógenos de un gran número de extractos vegetales. Los ensayos *in vitro* son particularmente útiles para el fraccionamiento biodirigido de los extractos de especies vegetales activas. Sin embargo, no siempre es posible ensayar contra los estados del ciclo de vida de los protozoos que verdaderamente infectan el hombre; ya sea porque no pueden ser cultivados o porque podrían no infectar los modelos animales utilizados. Así, por ejemplo, los ensayos *in vitro* frente a las especies de *Trypanosoma* spp., se realizan frecuentemente utilizando la forma epimastigote, la cual se halla en el insecto vector. A su vez, los ensayos *in vitro* contra *P. falciparum* no fueron desarrollados hasta el año 1979 y no ha sido posible cultivarlos en modelos con animales inferiores, de manera que el ensayo *in vivo* utiliza de forma rutinaria el parásito de roedores, *P. berghei* (Wright, 2004). A pesar de esto, estas evaluaciones ofrecen un valor indicativo de la posible actividad antiparasitaria de los extractos y metabolitos evaluados (Chan & Peña-Rodríguez, 2001).

**4.4.1.1. Actividad antiprotozoaria *in vitro* de alcaloides de Amaryllidaceae:** Ocho alcaloides aislados de *Phaedranassa dubia* se ensayaron frente a cuatro protozoos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Leishmania donovani* y *Plasmodium falciparum*, en colaboración con el Swiss Tropical Institute de Basilea. La actividad antiprotozoaria *in vitro* (CI<sub>50</sub>) de los compuestos ensayados se muestra en la Tabla 10. Igualmente, se evaluó la actividad citotóxica de estos compuestos sobre la línea celular L6 (mioblastos de ratas). También fue evaluada la capacidad inhibitoria de la formación de β-hematina (Ifβ-h) en aquellos compuestos que presentaron actividad antiplasmodial (Tabla 10).

En comparación con los demás alcaloides, el compuesto (7) mostró una elevada actividad frente a tres de los cuatro parásitos ensayados. Este alcaloide mostró actividad frente a *T. b. rhodesiense* (IC<sub>50</sub> = 0,97 µg/ml; Melarsoprol, IC<sub>50</sub> = 0,003 µg/ml), *T. cruzi* (IC<sub>50</sub> = 0,85 µg/ml; Benznidazol, IC<sub>50</sub> = 0,22 µg/ml) y *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> = 0,09 µg/ml;

**Tabla 10.** Actividad antiparasitaria *in vitro*, inhibición de la formación de  $\beta$ -hematina (If $\beta$ -h) y toxicidad de los alcaloides aislados de *P. dubia*.

Parásito	<i>T.b.rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. donovani</i>	<i>P. falciparum</i>	If $\beta$ -h <sup>b</sup>	Citotoxicidad
Estado	Trypomastigote	Trypomastigote	Amastigote	IEF		
Cepa	STIB 900	Tulahuen C4	MHOM-ET-67/L82	K1		L6
Estándar/compuesto	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>		IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
Fedranamina (1)	28,75	> 30,00	> 30,00	4,31		> 90,00
Pseudolicorina (2)	10,48	> 30,00	> 30,00	0,24	5,40	> 90,00
Sanguinina (3)	22,49	> 30,00	> 30,00	> 5,00		> 90,00
Galantamina (4)	37,92	> 30,00	> 30,00	> 5,00		> 90,00
Epinorgalantamina (5)	25,46	> 30,00	> 30,00	> 5,00		> 90,00
Hemantamina (6)	0,49	> 30,00	> 30,00	0,69	6,21	> 90,00
Ungeremina (7)	0,97	0,85	> 30,00	0,09	0,69	17,30
Zefbetaina (8)	39.22	> 30,00	> 30,00	> 5,00		> 90,00
Melarsoprol	0.003					
Benznidazol		0,220				
Pentostam			0,170			
Cloroquina				0,046	98,060 <sup>c</sup>	
Podophyllotoxina						0,008

<sup>a</sup> Todos los valores en:  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>b</sup> Porcentaje de inhibición de la formación de  $\beta$ -hematina a 2,0 mg/ml.<sup>c</sup> La cloroquina se evaluó a 1,3 mg/ml (IC<sub>50</sub> = 0,84 mg/ml).

Cloroquina,  $IC_{50} = 0,046 \mu\text{g/ml}$ ), pero no frente a *L. donovani*. Además, a pesar de mostrar algún grado de citotoxicidad hacia las células L6 ( $IC_{50} = 17,30 \mu\text{g/ml}$ ; Podophyllotoxin,  $IC_{50} = 0,008 \mu\text{g/ml}$ ), su índice de selectividad ( $IC_{50 \text{ L6}} / IC_{50 \text{ K1}}$ ) para *P. falciparum* estuvo alrededor de 185, lo cual confirma la actividad selectiva del compuesto **7** hacia este protozooario. A su vez, el compuesto **2** presentó actividad frente a *P. falciparum* ( $IC_{50} = 0,24 \mu\text{g/ml}$ ) y el compuesto **6** mostró cierta efectividad *in vitro* frente a *T. b. rhodesiense* ( $IC_{50} = 0,49 \mu\text{g/ml}$ ) y *P. falciparum* ( $IC_{50} = 0,69 \mu\text{g/ml}$ ). Los resultados de este último compuesto están de acuerdo con publicaciones anteriores, en las cuales se muestra la actividad antiplasmodial de la hemantamina (Herrera *et al.*, 2001a; Şener *et al.*, 2003). Para los compuestos **2** y **6** no se observó actividad citotóxica hacia las células L6, lo cual confirma la actividad selectiva hacia los parásitos protozoarios.

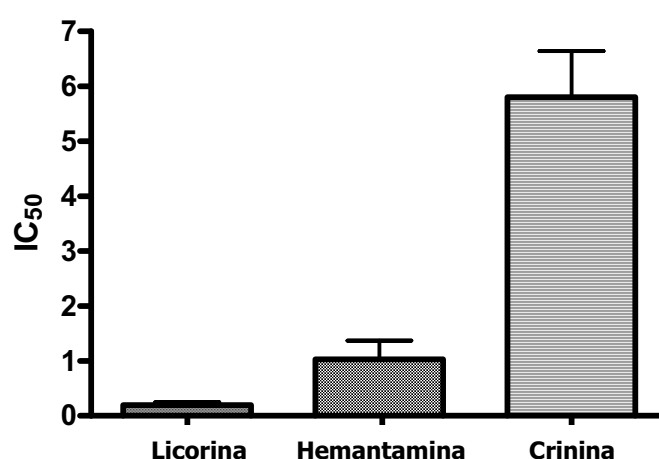
Ninguno de los alcaloides aislados de *P. dubia* presentó actividad antiprotozoaria similar a la de los medicamentos estándar. Sin embargo, y debido a la baja toxicidad mostrada por algunos de ellos, podrían ser considerados como moléculas de partida (cabezas de serie) para el desarrollo de fármacos antiparasitarios. Son especialmente interesantes: pseudolicorina, hemantamina y, principalmente, ungeremina. Igualmente, la estructura de estos compuestos puede aportar ideas para la síntesis de compuestos alternativos para el tratamiento de estas afecciones. Ciertamente es que todo ello requiere estudios en profundidad.

Los datos disponibles de la actividad antiprotozoaria *in vitro* de los alcaloides aislados de *P. dubia* son insuficientes para abordar una aproximación de relación estructura-actividad. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos disponibles en nuestro laboratorio sobre estudios de alcaloides de Amaryllidaceae con actividad frente a *P. falciparum* (Tabla 11), se puede obtener una valiosa información de los alcaloides de tipo licorina, crinina, galantamina y hemantamina en relación con su actividad biológica. En términos generales, se observa que algunos alcaloides de tipo licorina y hemantamina presentan mayor actividad antiplasmodial *in vitro* frente a la cepa K1 de *P. falciparum*. Las actividades antiplasmodiales (valores de  $CI_{50}$ ) se encuentran en el orden de 0,09 a 0,70  $\mu\text{g/ml}$ . Estos datos fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza (ANOVA), utilizando el software GraphPad 4.0 (Prism, USA) (Figura 65). Todos aquellos datos de  $CI_{50}$  mayores de 5.0  $\mu\text{g/ml}$  no fueron incluidos en el análisis.

**Tabla 11.** Actividad antiplasmodial *in vitro* de alcaloides de Amaryllidaceae.

Compuesto	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	Compuesto	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
<i>Tipo Crinina</i>		<i>Tipo Galantamina</i>	
Fedranamina	4,31	Sanguinina	> 5,0
Crinamidina	5,90	Galantamina	> 5,0
Flexinina	7,20	Epinorgalantamina	> 5,0
Amabilina	> 5,0	3- <i>O</i> -acetilsanguinina	1,37
Macowina	> 5,0		
<i>Tipo Hemantamina</i>		<i>Tipo licorina</i>	
Hemantamina	0,69	Pseudolicorina	0,24
Crinamina	0,69	Galantina	0,25
Maritidina	> 5,0	Zefirantina	> 5,0
Hemantidina	0,70	Ungeremina	0,09
11-Hidroxivitatina	2,04	Zefbetaina	> 5,0
Cloroquina	0,046		

<sup>a</sup> Todos los valores son en µg/ml frente a la cepa K1 de *P. falciparum*.



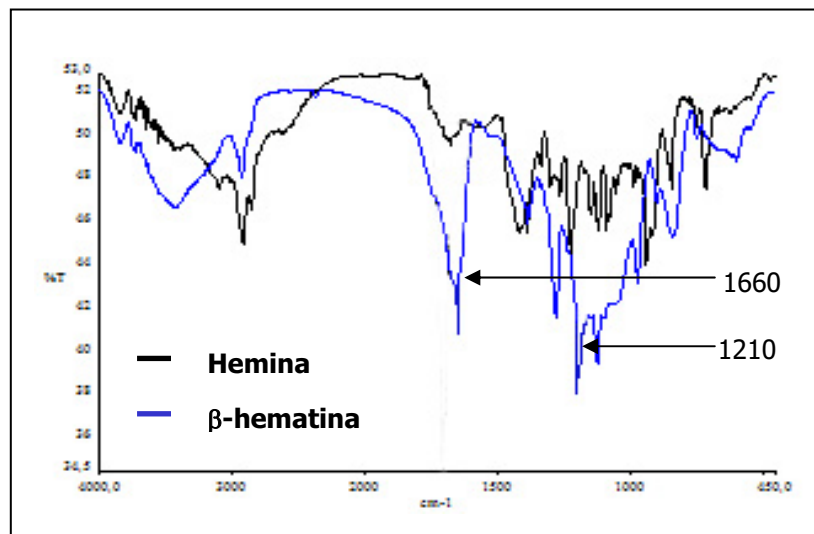
**Figura 65.** Comparación de la actividad antiplasmodial de los alcaloides de tipo licorina, hemantamina y crinina. Cada columna representa la media ± S.E.M de los alcaloides de la Tabla 11 con IC<sub>50</sub> < 5,0 µg/ml.

Así, los alcaloides de tipo galantamina fueron eliminados por no presentar datos suficientes para la determinación del error estándar de la media. Estadísticamente, existe una diferencia significativa entre la actividad antiplasmodial de licorina vs crinina ( $p$ -value < 0,05), según el test de comparación múltiple de *Dunn's*. Los alcaloides de tipo licorina presentan mayor planaridad en el espacio en comparación con los de tipo hemantamina y crinina, que presentan un puente 5,10b-etano con orientación  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente. Quizás este aspecto es importante para desempeñar su función antiplasmodial.

**4.4.1.2. Actividad inhibitoria de la formación de  $\beta$ -hematina (If $\beta$ -h):** Fue evaluada la capacidad inhibitoria de la formación de  $\beta$ -hematina (If $\beta$ -h) para comprobar el posible mecanismo de acción de los alcaloides aislados de *P. dubia* que presentaron algún grado de actividad frente a *P. falciparum* (compuestos **2**, **6**, **7**; Tabla 10). La relevancia de evaluar dicha actividad se basa en la siguiente observación: En su ciclo intraeritrocítico, el parásito de la malaria degrada una gran cantidad de la hemoglobina presente en el citoplasma de la célula huésped (entre el 60–80 %) (Francis, 1997). Durante el proceso de proteólisis de la hemoglobina, en la vacuola digestiva ácida del parásito, se produce un compuesto hemo (Ferriprotoporfirina IX), potencialmente tóxico para el microorganismo (Goldberg *et al.*, 1990; Loria *et al.*, 1999). El parásito carece de hemo oxigenasa, enzima del que disponen otras especies. Por esto, este compuesto se elimina, en parte, incorporándolo en una sustancia cristalina, inerte e insoluble, denominada hemozoína (o pigmento malárico) (Slater *et al.*, 1991; Goldberg *et al.*, 1992) y, el resto, mediante procesos de degradación peroxidativos (Loria *et al.*, 1999). Esta función especializada hace de la vacuola digestiva de *P. falciparum* una diana atractiva para la búsqueda de nuevos compuestos antimaláricos. Así, un compuesto capaz de inhibir la formación de hemozoína, podría ser potencialmente letal para el parásito. Para muchas sustancias, su habilidad de inhibir esta formación esta directamente relacionada con su potencialidad antimalárica (Egan *et al.*, 1994; 1999; Raynes *et al.*, 1996; Dorn *et al.*, 1998).

Una sustancia similar a la hemozoína, la  $\beta$ -hematina, puede ser formada *in vitro* a partir de una solución de hemina (hidroxiferriprotoporfirina IX) bajo ciertas condiciones de pH, temperatura y concentración de sales, que simulan el ambiente de la vacuola digestiva (Dorn *et al.*, 1995; Adams *et al.*, 1996; Basilico *et al.*, 1998). La  $\beta$ -hematina

sintética es espectrofotométrica y químicamente idéntica a la hemozoína. Además conserva las propiedades de solubilidad de la sustancia nativa (Bohle *et al.*, 1997; Pagola *et al.*, 2000), lo cual la hace útil en el estudio y diseño de nuevos agentes terapéuticos. La metodología aplicada para la formación de  $\beta$ -hematina se controló por espectroscopía de IR-TF, pudiéndose distinguir inequívocamente la hemina de la  $\beta$ -hematina (Basilico *et al.*, 1998). El espectro IR de  $\beta$ -hematina mostró bandas a 1.662 y 1.209  $\text{cm}^{-1}$ , características de la unión hierro-carboxilato (Slater *et al.*, 1991), las cuales no están presentes en el espectro IR de la hemina (Figura 66).



**Figura 66.** Espectro IR-TF de hemina y  $\beta$ -hematina. El espectro IR de  $\beta$ -hematina presenta bandas a 1.660 y 1.210  $\text{cm}^{-1}$  características de la unión hierro-carboxilato.

En general, los compuestos evaluados a una concentración de 2 mg/ml, no presentaron actividad  $\text{I}\beta\text{-h}$ , lo cual sugiere que su posible mecanismo de acción no está relacionado con la inhibición de la formación de la hemozoína (pigmento malárico). Podríamos tener un modelo de compuestos que no presentaría resistencia cruzada en parásitos resistentes a la cloroquina. De hecho, se requieren estudios adicionales para determinar el eventual mecanismo de acción. De todas maneras, en el ensayo  $\text{I}\beta\text{-h}$ , el valor de  $\text{CI}_{50}$  de la cloroquina fue de 1,15 mg/ml (2,24 mM). Estos resultados están en concordancia con publicaciones anteriores (Baelmans *et al.*, 2000), donde se muestra que un exceso de cloroquina, prácticamente previene la formación de  $\beta$ -hematina a pH 4,8 y 36°C.



**4.4.1.3. Actividad antiprotozoaria *in vitro* de los biflavonoides de *G. madruno*:** Seis biflavonoides puros y la fracción biflavonoide (**FB**), aislados de *G. madruno*, se ensayaron frente a cuatro protozoos: *T. cruzi*, *T. b. rhodesiense*, *L. donovani* y *P. falciparum*, en colaboración con el Swiss Tropical Institute de Basilea. La actividad antiprotozoaria *in vitro* ( $CI_{50}$ ) de los compuestos ensayados se muestra en la Tabla 12. Igualmente, se evaluó la actividad citotóxica de estos compuestos sobre la línea celular L6 (mioblastos de ratas). En términos generales, los diferentes biflavonoides, así como la fracción **FB**, no presentaron elevada actividad antiprotozoaria frente a *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi* y *L. donovani*. Solamente el compuesto amentoflavona (**1**) mostró una moderada actividad antitripanosomal, con una  $IC_{50}$  menor de 20,0  $\mu\text{g/ml}$  frente a *T. b. rhodesiense*. Por otro lado, dos compuestos, amentoflavona (**1**) y volkensiflavona (**3**), presentaron una baja actividad antiplasmodial con valores de  $IC_{50}$  de 4,02 y 4,39  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente.

Todos los biflavonoides evaluados en este estudio, presentan una unión inter-flavonoide de tipo C–C. Sin embargo, la unión  $C3' \rightarrow C8''$  del compuesto **1**, parece tener relevancia con respecto a la actividad antiprotozoaria. A pesar de no presentar una elevada actividad, el compuesto amentoflavona (**1**), mostró la mayor acción frente a los parásitos *T. b. rhodesiense* y *P. falciparum*, en comparación con los demás biflavonoides, todos con unión inter-flavonoide  $C3 \rightarrow C8''$ . No obstante, se requieren algunos parámetros estructurales adicionales para alcanzar una actividad biológica efectiva; así, los biflavonoides con unión inter-flavonoide de tipo C–C, presentan una tendencia a incrementar la actividad antimalárica, según el número de grupos metoxilo en la molécula (Weniger *et al.*, 2006). Además, la escasa actividad de los biflavonoides del tipo morelloflavona, está en concordancia con publicaciones anteriores (Mbwambo *et al.*, 2006).

La motivación para el estudio de la actividad antiprotozoaria de los biflavonoides aislados de *G. madruno*, se debe, principalmente, al elevado número de estudios que muestran a estos compuestos como potencialmente bioactivos y, a las diferentes propiedades reportadas a partir de extractos del género *Garcinia*. Recientemente, los biflavonoides han estado en la vanguardia de los polifenoles por su actividad antiviral y antituberculosa (Lin *et al.*, 1997; 1999; 2001). Los biflavonoides también se han reportado por presentar actividad antinociceptiva (Bittar *et al.*, 2000), citotóxica (Lin *et*

**Tabla 12.** Actividad antiparasitaria *in vitro* y toxicidad de los biflavonoides aislados de *G. madruno*.

Parásito	<i>T.b.rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. donovani</i>	<i>P. falciparum</i>	Citotoxicidad
Estado	Trypomastigote	Trypomastigote	Amastigote	IEF	
Cepa	STIB 900	Tulahuen C4	MHOM-ET-67/L82	K1	L6
Estándar/compuesto	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup>
<b>FB</b>	> 90,00	> 30,00	> 30,00	> 5,00	> 90,00
Amentoflavona (1)	19,70	> 30,00	> 30,00	4,02	86,99
Morelloflavona (2)	73,20	> 30,00	> 30,00	> 5,00	89,90
Volkensiflavona (3)	27,60	> 30,00	> 30,00	4,39	45,02
Fukugisido (4)	> 90,00	> 30,00	> 30,00	> 5,00	> 90,00
Madrunoudeasido (5)	> 90,00	> 30,00	> 30,00	> 5,00	> 90,00
Spicatasido (6)	> 90,00	> 30,00	> 30,00	> 5,00	> 90,00
Melarsoprol	0,003				
Benznidazol		0,440			
Miltefosina			0,170		
Cloroquina				0,072	
Podophyllotoxina					0,006

<sup>a</sup> Todos los valores en: µg/ml.

*al.*, 2000; Chen *et al.*, 2005), antiinflamatoria (Kim *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2006), neuroprotectora (Kang *et al.*, 2005), hepatoprotectora (Farombi *et al.*, 2000), antioxidante (Baggett *et al.*, 2005; Deachathai *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2005), antimicrobial (Verdi *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2005; Pegnyemb *et al.*, 2005) y especialmente, antiprotozoaria (Ahmed *et al.*, 2001, Suárez *et al.*, 2003, Nunome *et al.*, 2004; Weniger *et al.*, 2006). Los extractos obtenidos a partir de hojas y tallos de *G. madruno*, han presentado actividad antibacterial, siendo especialmente activos frente a *Staphylococcus aureus* (Suffredini *et al.*, 2006). Otras especies del género *Garcinia* han sido extensamente reportadas por presentar diferentes actividades biológicas, tales como curativa de infecciones superficiales y heridas (Mahabusarakam *et al.*, 1987), antimicrobiana (Grosvenor *et al.*, 1995; Mackeen *et al.*, 1997b; Taiwo *et al.*, 1999; Mackeen *et al.*, 2000; Verdi *et al.*, 2004), antitumoral (Murakami *et al.*, 1995), antinematoda (Mackeen *et al.*, 1997a), antioxidante (Mackeen *et al.*, 2000), tripanocida (Abe *et al.*, 2002) y antiplasmódica (Tona *et al.*, 2004).

#### **4.4.2. Actividad antioxidante de biflavonoides de *Garcinia***

En los últimos años ha cobrado especial interés el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en especial la evaluación de la capacidad antioxidante asociada a ellos. Estos compuestos, a menudo actúan de forma sinérgica con las vitaminas C y E, aumentando y prolongando los beneficios de estas vitaminas (Rice-Evans *et al.*, 1996b; Soobrattee *et al.*, 2005). Se ha comprobado su capacidad para actuar como dadores de electrones o quelantes de iones metálicos como el hierro y el cobre, inhibiendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Rice-Evans *et al.*, 1996b). Las LDL están implicadas en la patogénesis de las enfermedades coronarias e inhiben la agregación plaquetaria (Hertog *et al.*, 1997; González *et al.*, 2001). Es por ello que en este trabajo, fue examinada la actividad antioxidante de la fracción biflavonoide (**FB**) y de los compuestos aislados de *G. madruno* por medio de dos sistemas, el método del 2,2'-difeníl-1-picrilhidracil (DPPH<sup>•</sup>) y la inhibición de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

**4.4.2.1. Actividad captadora de radicales libres (Método del DPPH<sup>•</sup>):** El DPPH<sup>•</sup> es un reactivo útil para la investigación de la actividad captadora de radicales libres de compuestos fenólicos (Lebeau *et al.*, 2000). La reducción de la absorción del radical

DPPH<sup>•</sup> es una medida indicativa de la capacidad de una sustancia para atrapar radicales libres, independientemente de cualquier actividad enzimática. La solución de DPPH<sup>•</sup> recién preparada es de color púrpura oscuro, con un máximo de absorción a 517 nm. Este color, generalmente, disminuye cuando un antioxidante está presente en el medio; así, las moléculas antioxidantes pueden hacer disminuir la concentración de los radicales libres del DPPH<sup>•</sup> (proporcionando los electrones que eventualmente reaccionarán con el DPPH<sup>•</sup>), convirtiéndolo en un producto incoloro (2,2-difenil-1-hidrazina o en análogos de hidrazina sustituidos). Como consecuencia, se produce una disminución en la absorbancia a 517 nm (Yamaguchi *et al.*, 1998). Cuanto más rápidamente decrece la absorbancia, más potente es la actividad antioxidante de un extracto o sustancia en términos de la capacidad de donar electrones. Las reacciones que puede llevarse a cabo con el DPPH<sup>•</sup> no son simples y requiere conocer más acerca de su química (Amarowicz *et al.*, 2004). No obstante, la prueba del DPPH<sup>•</sup>, es un ensayo empleado con asiduidad que ofrece una técnica rápida de tamizaje para potenciales antioxidantes.

La comparación de la capacidad de cada biflavonoide para atrapar el radical DPPH<sup>•</sup> se realizó en términos de concentración en  $\mu\text{M}$ , mientras que la importancia relativa de la **FB** se expresó en términos de  $\mu\text{g/ml}$ . La fracción **FB** y la mayoría de los biflavonoides ensayados promovieron la estabilización del radical DPPH<sup>•</sup> (Tabla 13). Los mejores captadores de radicales fueron la fracción **FB** y los compuestos morelloflavona (**2**) y volkensiflavona (**3**), con valores de  $\text{CE}_{50}$  de 4,50, 4,34, y 4,94  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Los glucósidos fukugisido (**4**), madrunoudeasido (**5**) y spicatasido (**6**) presentaron igualmente una buena actividad atrapadora de radicales, en el rango comprendido entre 6,9 y 12,6  $\mu\text{g/ml}$  (5,2 y 8,9  $\mu\text{M}$ ). La menor actividad fue observada para la amentoflavona (**1**) (un biflavonoide flavona-flavona), con unos valores de  $\text{CE}_{50}$  por encima de 100  $\mu\text{M}$ , lo cual esta en concordancia con publicaciones anteriores (Baggett *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2005). Es interesante destacar que, compuestos como **2** presentaron la mayor actividad captadora de radicales libres, mediante el ensayo del DPPH<sup>•</sup>, entre los biflavonoides aislados de *G. xanthochymus*; sin embargo, en publicaciones anteriores, su  $\text{CE}_{50}$  estaba alrededor de los 60  $\mu\text{M}$  (Baggett *et al.*, 2005). Diferencias en los procedimientos del ensayo y medios de solubilización de los compuestos podrían explicar dicho fenómeno. La quercetina (**Q**) se utilizó como control positivo en este ensayo, mostrando una actividad de 23,36  $\mu\text{M}$ . Cabe mencionar que **Q**

**Tabla 13.** Actividad captadora de radicales libres (CE<sub>50</sub>) y cinética de reducción inicial (RIt5') de **FB** y de los biflavonoides procedentes de *G. madruno*.

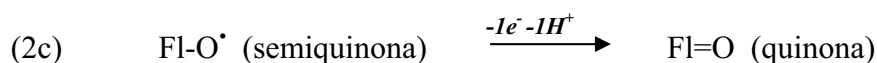
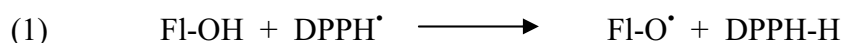
Muestra	CE <sub>50</sub> [µg/ml, (µM)] <sup>a</sup>	RIt5'
<b>FB</b>	4,50	0,84
Amentoflavona ( <b>1</b> )	66,53 (120,00)	0,75
Morelloflavona ( <b>2</b> )	4,34 (7,80)	0,86
Volkensiflavona ( <b>3</b> )	4,94 (9,14)	0,83
Fukugisido ( <b>4</b> )	6,33 (8,82)	0,84
Madrinoudeasido ( <b>5</b> )	5,27 (6,93)	0,85
Spicatasido ( <b>6</b> )	8,88 (12,64)	0,78
Quercetina ( <b>Q</b> )	7,06 (23,36)	0,85

<sup>a</sup> Los valores de CE<sub>50</sub> se han expresado en términos de µg/ml y µM para los compuestos puros y en µg/ml para la fracción **FB**.

Los valores son el promedio de 3 replicas independientes.

es un monoflavonoide y que su actividad en términos de µg/ml presenta unos niveles de CE<sub>50</sub> equivalentes a los de los biflavonoides activos (7,06 µg/ml).

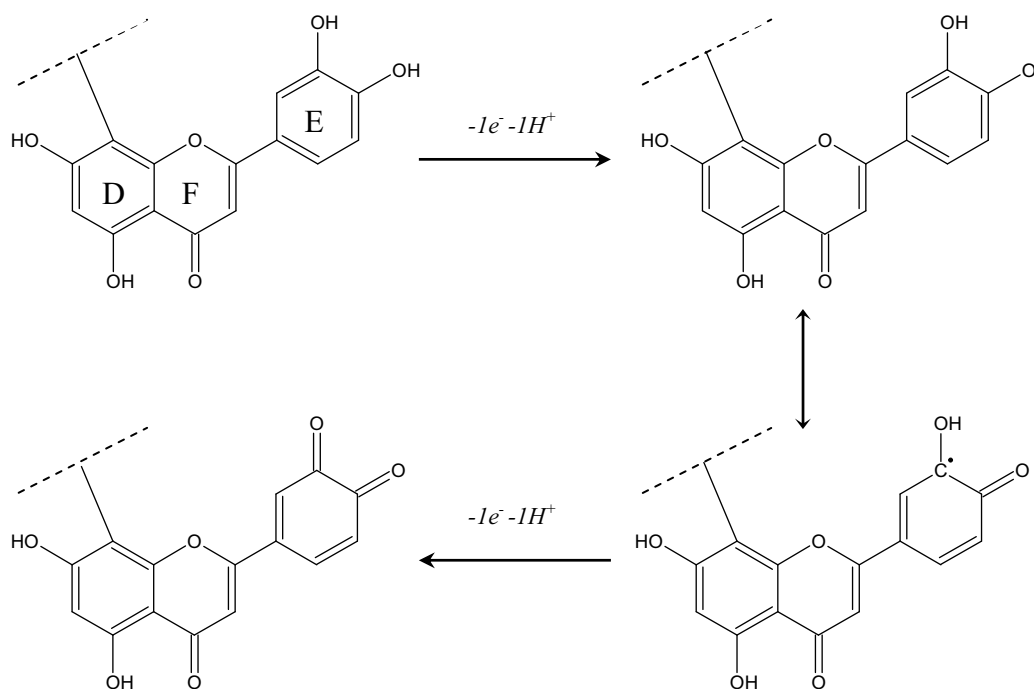
Generalmente es aceptado que, la combinación de la sustitución 3',4'-dihidroxi (catecol) en el anillo B, con un doble enlace entre C-2 y C-3 y una función carbonilo en la posición C-4, son requerimientos estructurales esenciales para la estabilización del radical aroxil flavonoidal (Rice-Evans *et al.*, 1996a; Furuno *et al.*, 2002). Nuestros resultados confirman dichas observaciones. De hecho, las reacciones más aceptadas para definir la capacidad de captación de radicales libres, las cuales son inicialmente atribuidas a la alta reactividad de los sustituyentes hidroxilo, son (Heim *et al.*, 2002; Amić *et al.*, 2003; Seyoum *et al.*, 2006):



La reacción (2a) representa el acoplamiento entre dos radicales flavonoides (dimerización), la reacción (2b) el acople entre un radical flavonoide con un radical DPPH<sup>\*</sup> y la reacción (2c) representa, probablemente, el mecanismo de terminación predominante, el cual se produce mediante la formación de una quinona, más estable, a partir de una semiquinona, por pérdida de 1 electrón (Amić *et al.*, 2003; Seyoum *et al.*, 2006). Por lo tanto, el grupo catecol en el anillo B de los flavonoides (anillo E en biflavonoides), es el principal grupo funcional en lo concerniente a la actividad antioxidante (Dugas Jr. *et al.*, 2000; Pannala *et al.*, 2001). Los biflavonoides con 2 grupos hidroxilos adyacentes en el anillo E, tales como **2** y **4**, son más efectivos que sus equivalentes monohidroxilo **3** y **6**, respectivamente. El mecanismo predominante de la acción es probablemente vía donación de un electrón por parte del flavonoide, formándose una semiquinona, la cual dona un electrón adicional para formar una *orto*-quinona por deslocalización electrónica (Figura 67). Para compuestos como la amentoflavona, que contiene un grupo 4'-monohidroxilo en el anillo E, el mecanismo de acción implica probablemente la formación de radicales fenoxilo, los cuales son relativamente menos estables y captadores débiles de radicales libres (Pannala *et al.*, 2001; Heim *et al.*, 2002). El doble enlace entre C-2 y C-3 y la función carbonilo en la posición C-4, son importantes para la actividad antioxidante; sin embargo, no son suficientes por sí solos para proveer de actividad captadora de radicales libres.

En los biflavonoides glucosidados se observa claramente que la actividad captadora de radicales libres se debe a la presencia del aglicón y que la presencia del azúcar no parece ser esencial para esta actividad. Esto se observa por el mayor valor de CE<sub>50</sub> en compuestos como fukugisido (**4**) y spicatasido (**6**), en comparación con sus aglicones morelloflavona (**2**) y volkensiflavona (**3**), respectivamente.

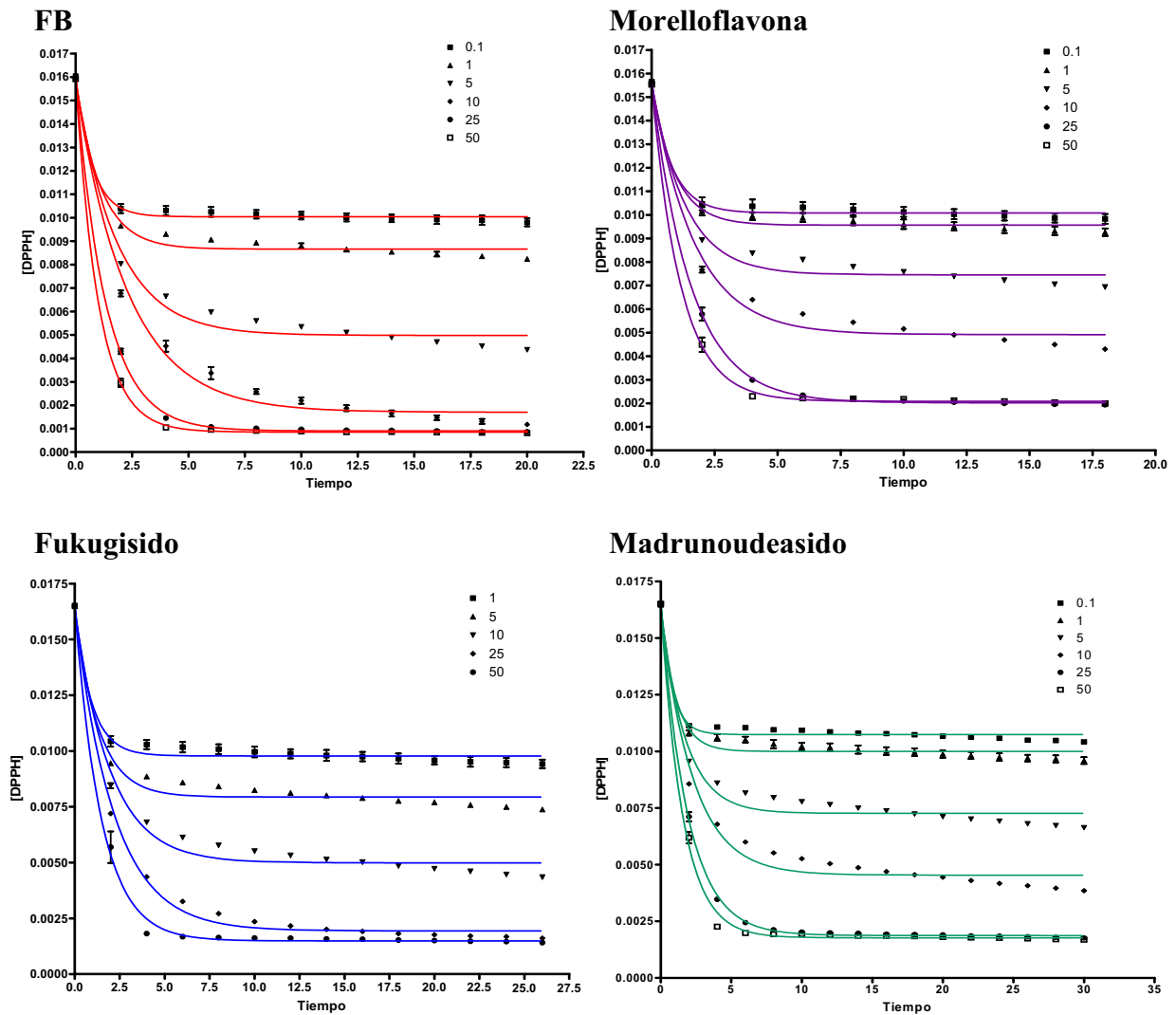
La CE<sub>50</sub> es un parámetro ampliamente utilizado para describir la habilidad de un compuesto o extracto para atrapar el radical DPPH<sup>\*</sup>. Sin embargo, los valores de CE<sub>50</sub> dan poca información, en términos de velocidad, en relación con la cinética de una reacción (Lebeau *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2005). Es por ello que, para completar la información, utilizamos un parámetro adicional, el Índice de Reducción (Rit5') (Tabla 13). Este parámetro da una idea aproximada de la reactividad de cada compuesto o fracción en el proceso de la decoloración del radical libre DPPH<sup>\*</sup>. Varios compuestos puros, así como la fracción **FB**, indujeron un marcado descenso en la concentración de



**Figura 67.** Ilustración para la terminación de radicales flavonoides por pérdida de electrones de los grupos fenol y formación de *orto*-quinonas.

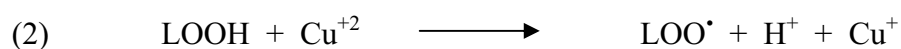
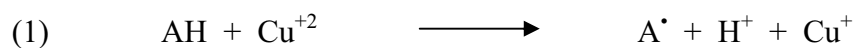
DPPH $\cdot$  cuando fueron comparados con la reactividad de **Q** (Figura 68). Las especies más reactivas fueron la fracción **FB** y los compuestos morelloflavona (**2**), fukugisido (**4**) y madrunoudeasido (**5**), los cuales presentaron valores de Rit5' similares (0,84 – 0,86), aunque con diferentes valores de CE<sub>50</sub>. Es interesante notar que todos estos compuestos presentan una estructura flavanona-flavona con enlace interflavanil C3→C8". La amentoflavona mostró la menor reactividad, significativamente diferente a la de cualquier otro compuesto estudiado.

**4.4.2.2. Inhibición de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL):** Se ha evaluado también la inhibición de la peroxidación lipídica, utilizando la formación de malondialdehído (MDA) como un índice de la oxidación de LDL, después de la oxidación con CuSO<sub>4</sub>. En vista de la compleja naturaleza de la oxidación de LDL *in vivo* y de la incertidumbre con respecto a los detalles del mecanismo (o mecanismos) responsables de la iniciación de la peroxidación, los estudios *in vitro* utilizan usualmente un modelo simple con un generador de radicales libres soluble en agua o un ión de un metal de transición; de los cuales, el cobre es el más común, por su mayor relevancia al ser fácilmente comparado con modelos *in vivo* (Rice - Evans, 1996a;



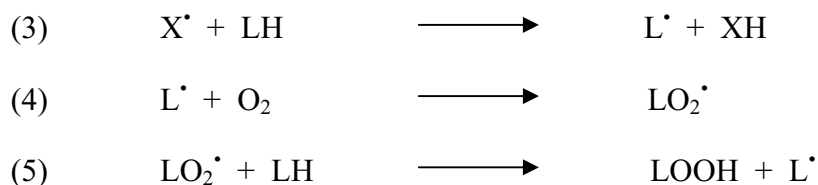
**Figura 68.** Cinética de decoloración del radical libre DPPH<sup>•</sup> calculado como Índice de Reducción (RI5'). La cantidad de DPPH<sup>•</sup> reducido fue estimado para los primeros cuatro minutos de reacción, con un factor de dilución cercano al valor de CE<sub>50</sub> estimado. Los valores reflejados son el promedio de 3 replicas independientes.

Pinchuk & Lichtenberg, 2002). *In vitro*, los iones de cobre, a concentraciones micromolares, pueden formar radicales libres en la superficie de las lipoproteínas, al interactuar con antioxidantes asociados a LDL (AH), principalmente tocoferol, o con hidroperóxidos preformados, asociados a LDL (LOOH) (Pinchuk & Lichtenberg, 2002).





Como consecuencia de la producción de radicales libres ( $X^\bullet$ , donde  $X^\bullet = A^\bullet$  o  $LOO^\bullet$ ), la peroxidación se propaga interaccionando con los hidroperóxidos formados a partir de los ácidos grasos poliinsaturados (LH).

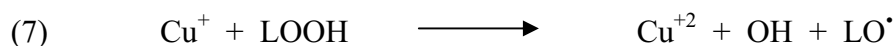


Las reacciones en cadena continúan mientras haya radicales libres presentes en el sistema. Normalmente, la reacción termina con una unión biradical, formando un producto no radical (PNR).



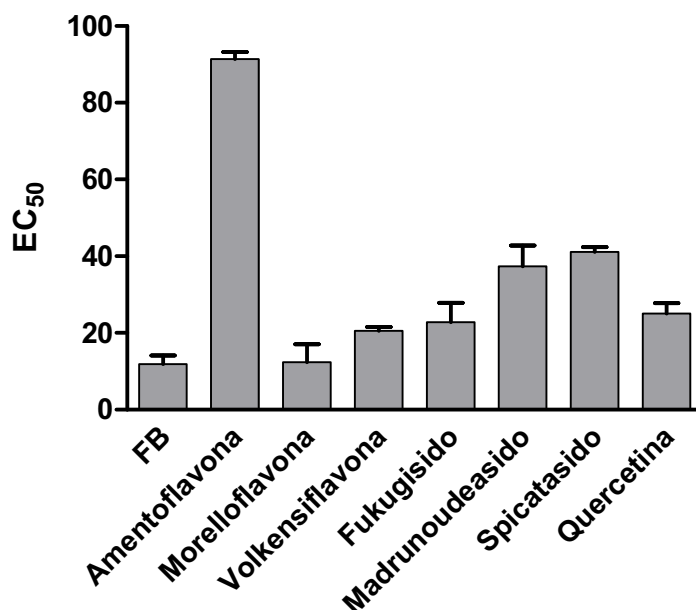
En donde  $Y^\bullet = X^\bullet$  o  $L^\bullet$ .

El número de pasos de la reacción en cadena es una compleja función que depende de la concentración de los lípidos y del inductor de la oxidación. Además, la propagación de la reacción requiere la oxidación de  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Cu}^{+2}$ , la cual también se traduce en la producción de radicales libres:



Todos estos productos de la peroxidación lipídica son utilizados como una medida del estrés oxidativo, incluyendo los hidroperóxidos (LOOH), comúnmente expresado como dienos conjugados, así como el producto final malondialdehído (MDA), el cual es ampliamente utilizado (Dotan *et al.*, 2004). El ensayo TBARS está basado en la medida del MDA por medio de la formación de productos de oxidación secundarios (Pihlanto, 2006).

La peroxidación lipídica se realizó en presencia de la fracción biflavonoide (**FB**) y de los compuestos puros aislados de *G. madruno*. En la Figura 69, cuyos valores son



**Figura 69.** Inhibición de la peroxidación de LDL por la fracción **FB** y los biflavonoides aislados de *G. madruno*. La peroxidación es inducida por CuSO<sub>4</sub>. En cada columna se representa la media de la CE<sub>50</sub> en µg/ml ± S.E.M.

expresados en CE<sub>50</sub>, se muestra la protección conferida por las sustancias evaluadas en el proceso de peroxidación inducida por CuSO<sub>4</sub>. Podemos observar que, la fracción **FB** reduce la peroxidación en una forma dependiente de la dosis, demostrando ser un antioxidante efectivo. El valor de CE<sub>50</sub> determinado para el efecto inhibitorio de **FB** en la peroxidación lipídica fue de 11,85 µg/ml, el más bajo observado entre las sustancias evaluadas. Entre los biflavonoides puros, los mejores inhibidores de la peroxidación fueron los compuestos con enlace inter-flavonoide C3→C8": morelloflavona (**2**) y volkensiflavona (**3**), con unos valores de CE<sub>50</sub> de 12,36 y 20,57 µg/ml, respectivamente. La menor actividad fue observada para el biflavonoide amentoflavona (**1**) con una CE<sub>50</sub> de 91,34 µg/ml y para los biflavonoides glucosidados madrunoudeasido (**5**) y spicatasido (**6**), con valores de CE<sub>50</sub> de 37,39 y 41,14 µg/ml, respectivamente. En este ensayo, la quercetina (**Q**) fue utilizada como control positivo, mostrando una actividad de 25,06 µg/ml.

La fracción biflavonoide (**FB**), principal contribuyente de la actividad antioxidante de *G. madruno*, fue analizada por HPLC. Contenía tres biflavonoides principales: dos

biflavonoides del tipo flavonona-(3→8'')-flavona, morelloflavona (**2**) y volkensiflavona (**3**), además de amentoflavona (**1**), en unas proporciones aproximadas de 8:2:1, respectivamente. El biflavonoide **2** era el responsable de la mayor parte de la actividad captadora de DPPH<sup>•</sup> y de la protección contra la peroxidación lipídica de la **FB**; aunque, es posible un proceso de sinergismo, ya que, a pesar de que la **FB** contenía biflavonoides de baja actividad relativa como **1**, su CE<sub>50</sub> en algunos casos fue superior a la obtenida para el compuesto **2** puro. En este sentido, diversos estudios ponen de manifiesto que los polifenoles presentan mayor poder antioxidante en combinación, que de forma aislada. Así, los polifenoles aislados como el galato de epigalocatequina, la quercetina, el diosmetin y el pignogenol, ejercen una protección parcial ante la peroxidación lipídica; en cambio, la combinación de todos ellos aumenta muchísimo el efecto protector (Ueda *et al.*, 1996).

En general, la glucosidación de un grupo hidroxilo disminuye la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos (Rice-Evans *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2005). La adición de una unidad glucídica disminuye la actividad del aglicón, probablemente debido a impedimento estérico (Silva *et al.*, 2005). Es así como Cos *et al.*, (2001), utilizando un modelo de peroxidación lipídica, observaron que la quercetina presentaba valores de CI<sub>50</sub> menores que los de sus derivados glucosilados quercetrina y rutina. Esto está en concordancia con la actividad captadora de DPPH<sup>•</sup> obtenida para los diferentes biflavonoides y con la inhibición de la peroxidación lipídica observada para madrunoudeasido (**5**) y spicatasido (**6**). En el modelo de peroxidación lipídica, además de los efectos estructurales, otros factores tales como la hidrofobicidad de los compuestos, también podrían ser tenidos en cuenta (Areias *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2005). La alta eficiencia de los aglicones de biflavonoides en sistemas lipídicos, en comparación con los correspondientes compuestos glucosilados, se debe principalmente a su baja polaridad y elevado coeficiente de partición (Schroeter *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2005). Así, los aglicones presentes en *G. madruno* podrían tener una mayor habilidad para interactuar con las lipoproteínas, siendo así más efectivos en la prevención de la peroxidación lipídica, si los comparamos con sus derivados glucosilados, compuestos con un carácter hidrofílico mayor.





## ***5. Conclusiones***



Es la primera vez que se lleva a cabo un estudio de este tipo sobre una especie del género *Phaedranassa*. El trabajo fitoquímico realizado con *Phaedranassa dubia* ha permitido el aislamiento de un nuevo alcaloide de tipo Amaryllidaceae, fedranamina, cuya estructura se ha establecido por análisis espectroscópicos (UV, EM, RMN y CD). Otros alcaloides identificados en esta especie han sido: pseudolicorina, sanguinina, galantamina, epinorgalantamina, hemantamina, ungeremina y zefbetaina.

Se ha reportado por primera vez el producto natural 7"-O-(6""-acetil)-glucósido de morelloflavona, al cual se ha dado el nombre trivial de madrunoudeasido, un nuevo biflavonoide aislado del extracto metanólico de las partes aéreas de *Garcinia madruno* (Clusiaceae). Es la primera vez que se reporta un biflavonoide acetil-glucósido, aislado del género *Garcinia*. Igualmente se reportan los biflavonoides amentoflavona, morelloflavona, volkensiflavona, fukugisido y spicatasido, a partir de la misma especie vegetal.

Los biflavonoides de tipo flavanona-(3→8")-flavona presentan, como característica, un fenómeno de atropisomerismo, con la presencia de confórmeros que difieren en la rotación alrededor del enlace inter-flavonoide C3→C8". Las observaciones sugieren que dicho fenómeno varía con la temperatura pero no con los solventes, de manera que estos últimos no tienen un efecto significativo en el comportamiento rotamérico de los compuestos.

Se estudió la actividad antiparasitaria *in vitro* de los alcaloides aislados de *P. dubia* y de los biflavonoides de *G. madruno*. Entre los alcaloides, ungeremina mostró la mayor actividad frente a *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi* y *P. falciparum*. Su índice de selectividad para *P. falciparum* estuvo alrededor de 185, lo cual confirma la actividad selectiva del compuesto hacia este protozoo. Otros alcaloides activos fueron pseudolicorina y hemantamina, los cuales mostraron actividad frente a *P. falciparum* y *T. b. rhodesiense*. En relación a la actividad antiplasmodial de los alcaloides ungeremina, pseudolicorina y hemantamina, se estableció que su posible mecanismo de acción no está relacionado con la inhibición de la formación de la hemozoina. Por otro lado, los biflavonoides no presentaron actividad antiprotozoaria frente a *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi* y *L. donovani*; aunque, los compuestos amentoflavona y volkensiflavona, presentaron una baja actividad antiplasmodial.

Se ha estudiado la actividad antioxidante de los biflavonoides aislados de *G. madruno*, por medio de los métodos del 2,2'-difenil-1-picrilhidracil (DPPH<sup>•</sup>) y de la inhibición de la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL). En general, los compuestos con enlace inter-flavonoide C3→C8'' presentan una potente actividad captadora de radicales DPPH<sup>•</sup>. Los biflavonoides que presentan esta característica en combinación con una sustitución 3''',4'''-dihidroxi (catecol) en el anillo E, un doble enlace entre C-2'' y C-3'' y una función carbonilo en la posición C-4'', son los captadores de radicales más activos. En relación a los inhibidores de la peroxidación de LDL, los mejores inhibidores fueron los compuestos con enlace inter-flavonoide C3→C8'': morelloflavona y volkensiflavona.

Se ha estudiado la actividad antioxidante de la fracción biflavonoide (**FB**) aislada de *G. madruno*, compuesta principalmente por morelloflavona, volkensiflavona y amentoflavona. Los datos sugieren que la **FB** es un excelente candidato para ser utilizado como antioxidante. Es probable que se produzcan procesos de sinergismo en la **FB**, toda vez que presenta una actividad captadora de radicales y una inhibición de la peroxidación de LDL superior, en algunos casos, a los compuestos más activos.





## ***6. Referencias bibliográficas***



- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-Estrada, M., Reyes-Chilpa, R. (2002). Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **25**, 1188-1191.
- Abe, F., Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Estrada-Muñiz, E., Huerta-Reyes, M., Reyes-Chilpa, R. (2004). Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **27**: 141-143.
- Abou-Donia, A.H., Abib, A.A., El Din, A.S., Evidente, A., Gaber, M., Scopa, A. (1992). Two betaine-type alkaloids from Egyptian *Pancratium maritimum*. *Phytochemistry* **31**: 2139-2141.
- Adams, P., Egan, T., Ross, D., Silver, J., Marsh, P. (1996). The chemical mechanism of beta-haematin formation studied by Mossbauer spectroscopy. *Journal of Biochemistry* **318**: 25-27.
- Aguilar, I.V. (2003). Estudio fitoquímico de dos especies colombianas con actividad antioxidante, *Vismia laevis* y *Tovomita rhizophoroides* (Clusiaceae). Tesis de Maestría. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. pp. 14-28.
- Ahmed, M.S., Galal, A.M., Ross, S.A., Ferreira, D., ElSohly, M.A., Ibrahim, A.R.S., Mossa, J.S., El-Feraly, F.S. (2001). A weakly antimalarial biflavanone from *Rhus retinorrhoea*. *Phytochemistry* **58**: 599-602.
- Ali, A.A., Kating, H., Frahm, A.W., El-Moghazy, A.M., Ramadan, M.A. (1981). Two non-hydroxylated alkaloids in *Crinum augustum*. *Phytochemistry* **20**: 1121-1123.
- Ali, A.A., Ross, S.A., El-Moghazy, A.M., El-Moghazy, S.A. (1983). Clivonidine, a new alkaloid from *Clivia miniata*. *Journal of Natural Products* **46**: 350-352.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry* **84**: 551-562.
- Amić, D., Davidović-Amić, D., Bešlo, D., Trinajstić, N. (2003). Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta* **76**: 55-61.
- Ampofo, S.A., Waterman, P.G. (1986). Xanthones from three *Garcinia* species. *Phytochemistry* **25**: 2351-2355.
- Andreasen, M.F., Landbo, A.K., Christensen, L.P., Hansen, A., Meyer, A.S. (2001). Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 4090-4096.

- Areias, F.M., Rego, A.C., Oliveira, C.R., Seabra, R.M. (2001). Antioxidant effect of flavonoids after ascorbate/Fe<sup>2+</sup>-induced oxidative stress in cultured retinal cells. *Biochemical Pharmacology* **62**: 111–118.
- Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* **523-524**: 9-20.
- Asada, Y., Li, W., Yoshikawa, T. (1999). The first prenylated bioaurone, licoagrone from hairy root cultures of *Glycyrrhiza glabra*. *Phytochemistry* **50**: 1015-1019.
- Ayabe, S., Akashi, T. (2006). Cytochrome P450s in flavonoid metabolism. *Phytochemistry Reviews* **5**: 271-282.
- Baelmans, R., Deharo, E., Bourdy, G., Muñoz, V., Quenevo, C., Sauvain, M., Ginsburg, H. (2000). A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products?. *Journal of Ethnopharmacology* **73**: 271-275.
- Baggett, S., Protiva, P., Mazzola, E.P., Yang, H., Ressler, E.T., Basile, M.J., Weinstein, I.B., Kennelly, E.J. (2005). Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. *Journal of Natural Products* **68**: 354-360.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191–203.
- Baltz, T., Baltz, D., Giroud, C., Crockett, J. (1985). Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *European Molecular Biology Organization Journal* **4**: 1273-1277.
- Barrett, M.P. (1999). The fall and rise of sleeping sickness. *Lancet* **353**: 1113-1114.
- Barrett, M.P., Gilbert, I.H. (2002). Perspectives for new drugs against trypanosomiasis and leishmaniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2**: 471–482.
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasc, A.C., Cazzulo, J.J., Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* **362**: 1469-1480.
- Basilico, N., Pagani, E., Monti, D., Oliaro, P., Taramelli, D. (1998). A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **42**: 55-60.
- Bastida, J., Viladomat, F., Llabres, J.M., Codina, C., Feliz, M., Rubiralta, M. (1987). Alkaloids from *Narcissus confusus*. *Phytochemistry* **26**: 1519-1524.
- Bastida, J., Viladomat, F., Llabrés, J.M., Ramirez, G., Codina, C., Rubiralta, M. (1989). *Narcissus* alkaloids, VIII. Mesembrenone: An unexpected alkaloid from *Narcissus pallidulus*. *Journal of Natural Products* **52**: 478-480.

- Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F., Rubiralta, M., Quirion, J.C., Wenigwe, B. (1992). *Narcissus* alkaloids, XV. Roserine from *Narcissus pallidulus*. *Journal of Natural Products* **55**: 134-136.
- Bastida, J., Viladomat, F., Bergoñon, S., Fernández, J.M., Codina, C., Rubiralta, M., Quirion, J.C. (1993). Alkaloids from *Narcissus leonensis*. *Phytochemistry* **34**: 1656-1658.
- Bastida, J., Codina, C., Peeters, P., Rubiralta, M., Orozco, M., Luque, F.J., Chhabra, S.C. (1995a). Alkaloids from *Crinum kirkii*. *Phytochemistry* **40**: 1291-1293.
- Bastida, J., Contreras, J.L., Codina, C., Wright, C.W., Phillipson, J.D. (1995b). Alkaloids from *Narcissus cantabricus*. *Phytochemistry* **40**: 1549-1551.
- Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. *Narcissus* alkaloids. En "Studies in Natural Products Chemistry" (Atta-ur-Rahman, ed.). Vol. 20. pp. 323-405. Elsevier, Amsterdam, (1998).
- Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F. Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. En "The Alkaloids, Chemistry and Biology" (Cordell, G.A., ed.). Vol. 63. pp. 87-179. Elsevier-Academic Press, New York, (2006).
- Batista, P., Arribas, A., Ferreira, E. (2000). Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **36**: 69-96.
- Battersby, A.R., Kelsey, J.E., Staunton, J. (1971). Hydroxylation at saturated carbon: Haemanthamine. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* **1971**: 183-184.
- Baudouin, G., Tillequin, F., Koch, M. (1994). Albiflomanthine. A crinane alkaloid from *Haemanthus albiflos* (Jacq.). *Heterocycles* **38**: 965-970.
- Baum, K.F., Berens, R.L. (1994). Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol after failure of treatment with ketoconazole. *Clinical Infectious Diseases* **18**: 813-815.
- Beekman, A., Barentsen, A., Woerdenbag, H. (1997). Stereochemistry dependent cytotoxicity of some artemisinin derivatives. *Journal of Natural Products* **60**: 325-330.
- Bennie, L., Malan, E., Coetzee, J., Ferreira, D. (2000). Structure and synthesis of ether-linked proteracacinidin and promelacacinidin proanthocyanidins from *Acacia caffra*. *Phytochemistry* **53**: 785-793.
- Bennie, L., Coetzee, J., Malan, E., Ferreira, D. (2001). Structure and stereochemistry of triflavanoids containing both ether and carbon-carbon interflavanyl bonds. *Phytochemistry* **57**: 1023-1034.
- Berkov, S., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2007). Alkaloids from *Galanthus nivalis*. *Phytochemistry* **68**: 1791-1798.
- Berman, J. (2001). Leishmaniasis. *Current Treatment Options in Infectious Diseases* **3**: 333-336.

- Bhattacharyya, A., Mukherjee, M., Duttagupta, S. (2002). Studies on stibionate unresponsive isolates of *Leishmania donovani*. *Journal of Biosciences* **27**: 503-508.
- Bittar, M., De Souza, M.M., Yunes, R.A., Lento, R., Delle Monache, F., Cechinel Filho, V. (2000). Antinociceptive activity of I3,II8-binarigenin, a biflavonoid present in plants of the Guttiferae. *Planta Medica* **66**: 84-86.
- Bohle, D., Dinnebier, R., Madsen, S., Stephens, P. (1997). Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 713-716.
- Boit, H.G., Döpke, W. (1956). Alkaloide von *Narcissus tazetta* und *N. poeticus* (XIII. Mitteil. Über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte* **89**: 2462-2465.
- Boit, H.G., Döpke, W., Stender, W. (1957). Alkaloide aus *Crinum*, *Zephyranthes*, *Leucojum* und *Clivia* Arten. *Chemische Berichte* **90**: 2203-2206.
- Borst, P., Ouellette, M. (1995). New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology* **49**: 427-460.
- Botsaris, A.S. (2007). Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* **3**: 18-25.
- Bowman, W.R., Bruce, I.T., Kirby, W.C. (1969). Biosynthetic incorporation of [ $\beta$ - $^{14}\text{C}$ ; 3,5- $^2\text{H}_2$ ; 4- $^3\text{H}$ ]-cinnamic acid into capsaicin and norpluviine: lack of an apparent isotope effect following and NIH shift. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications* **1969**: 1075-1077.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology (Lebensm Wiss U Technol)* **28**: 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **56**: 317-333.
- Brun, R., Hecker, H., Lun, Z.R. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary Parasitology* **79**: 95-107.
- Caffrey, C.R., Scory, S., Steverding, D. (2000). Cysteine proteinases of trypanosome parasites: novel targets for chemotherapy. *Current Drug Targets* **1**: 155-162.
- Cancado, J.R. (2001). Etiological treatment of chronic Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **43**: 173-181.
- Cao, G., Booth, S., Sadowski, J.A., Prior, L. (1998a). Increases in human plasma antioxidants capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *The American Journal of Clinical Nutrition* **68**: 1081-1087.

- Cao, S.G., Wu, X.H., Sire, K.Y., Tan, B.K.H., Pereira, J.T., Wong, W.H., Hew, N.F., Goh, S.H. (1998b). Cytotoxic caged tetraprenylated xanthonoids from *Garcinia gaudichaudii* (Guttiferae). *Tetrahedron Letters* **39**: 3353-3356.
- Capo, M., Saa, J.M. (1989). Alkaloids from *Leucojum aestivum* sub. *pulchellum* Amaryllidaceae. *Anales de Química* **85**: 119-121.
- Carneiro, F.J.C., Boralle, N., Silva, D.H.S., Lopes, L.M.X. (2000). Bi- and tetraflavonoids from *Aristolochia ridicula*. *Phytochemistry* **55**: 823-832.
- Castro, S.L. (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* **53**: 83-98.
- Chakrabarti, D., Azam, T., DelVecchio, C., Qiu, L., Park, Y., Allen, C.M. (1998). Protein prenyl transferase activities of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **94**: 175-184.
- Chan, M.J., Peña-Rodríguez, L.M. (2001). Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports* **18**: 674-688.
- Chari, V.M., Ilyas, M., Wagner, H., Neszmelyi, A., Chen, F.C., Chen L.K., Lin, Y.C., Lin, Y.M., (1977). <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy of biflavanoids. *Phytochemistry* **16**: 1273-1278.
- Chen, F.C., Lin, Y.M., Hung, J.C. (1975a). Phenolic compounds from the heartwood of *Garcinia multiflora*. *Phytochemistry* **14**: 300-303.
- Chen, F.C., Lin, Y.M., Hung, J.C. (1975b). A new biflavanone glucoside from *Garcinia multiflora*. *Phytochemistry* **14**: 818-820.
- Chen, J.J., Duh, C.Y., Chen, J.F. (2005). New cytotoxic biflavanoids from *Selaginella delicatula*. *Planta Medica* **71**: 659-665.
- Chen, J., Chang, H.W., Kim, H.P., Park, H. (2006). Synthesis of phospholipase A2 inhibitory biflavanoides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**: 2373-2375.
- Coll, J.C., Bowden, B.F. (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products* **49**: 934-936.
- Cos, P., Calomme, M., Sindambiwe, J.B., De Bruyne, T., Cimanga, K., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D. (2001). Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Medica* **67**: 515-519.
- Couladis, M., Baziou, P., Verykokidou, E., Loukis, A. (2002). Antioxidant activity of polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Phytotherapy Research* **16**: 769-770.
- Crichton, E.G., Waterman, P.G. (1979). Manniflavanone, a new 3,8-linked flavanone dimer from the stem bark of *Garcinia mannii*. *Phytochemistry* **18**: 1553-1557.
- Croft, S.L., Coombs, G.H. (2003). Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology* **19**: 502-508.

- Dahlgren, R.M.T., Clifford, H.T., Yeo, P.F. The Families of Monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy. pp. 199-206. Springer Verlag, Berlin, (1985).
- Davies, C.R., Kaye, P., Croft, S.L., Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ Clinical Research* **326**: 377-382.
- Davis, J.K. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium* **61**: 1-31.
- Deachathai, S., Mahabusarakam, W., Phongpaichit, S., Taylor, W.C. (2005). Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry* **66**: 2368–2375.
- Deachathai, S., Mahabusarakam, W., Phongpaichit, S., Taylor, W.C., Zhang, Y.J., Yang, C.R. (2006). Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry* **67**: 464–469.
- Dewick, P.M. Medicinal natural products. A Biosynthetic Approach. Second edition. pp. 149-151. John Wiley & Sons Ltd., Chippenham, Wilts. (2002).
- Dixon, R.A., Steele, C.L. (1999). Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science* **4**: 394-400.
- Dixon, R.A., Xie, D., Sharma, S.B. (2005). Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist* **165**: 9-28.
- Docampo, R., Moreno, S.N. (2001). The acidocalcisome. *Molecular and Biochemical Parasitology* **114**: 151–159.
- Doerig, C. (2004). Protein kinases as drug targets in parasitic protozoa. *Biochimica et Biophysica Acta* **1697**: 155-168.
- Döpke, W. (1962). Alkaloide aus *Hippeastrum*-Arten. *Archiv der Pharmazie* **12**: 920-922.
- Döpke, W., Sewerin, E., Trimiño. (1980). Zur struktur und stereochemie des caribins aus *Hymenocallis arenicola* Northrop, (Amaryllidaceae). *Zeitschrift für Chemie* **20**: 26-27.
- Döpke, W., Sewerin, E., Trimiño. (1981). Isolierung, struktur und stereochemie eines neuen alkaloids aus *Crinum oliganthum*. *Zeitschrift für Chemie* **21**: 358-358.
- Dorn, A., Stoffel, R., Matile, H., Bubendorf, A., Ridley, R. (1995). Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein. *Nature* **374**: 269-271.
- Dorn, A., Vippagunta, S.R., Matile, H., Jacquet, C., Vennerstrom, J.L., Ridley, R.G. (1998). An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochemical Pharmacology* **55**: 727–736.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* **43**: 200–227.



- Duddeck, H., Snatzke, G., Yemul, S.S. (1978).  $^{13}\text{C}$  NMR and CD of some 3,8''-biflavanoids from *Garcinia* species and of related flavanones. *Phytochemistry* **17**: 1369-1373.
- Duddeck, H., Dietrich, W. Structure elucidation by modern NMR. Second edition. Springer verlag, New York. (1992).
- Dugas Jr, A.J., Castañeda-Acosta, J., Bonin, G.C., Price, K.L., Fischer, N.H., Winston, G.W. (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: Structure-activity relationships. *Journal of Natural Products* **63**: 327-331.
- Egan, T.J., Ross, D.C., Adams, P.A. (1994). Quinoline antimalarial drugs inhibit spontaneous formation of  $\beta$ -haematin (malaria pigment). *FEBS Letters* **352**: 54-57.
- Egan, T.J., Marques, H.M. (1999). The role of haem in the activity of chloroquine and related antimalarial drugs. *Coordination Chemistry Review* **192**: 493-517.
- Eichhorn, J., Takada, T., Kita, Y., Zenk, M.H. (1998). Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine. *Phytochemistry* **49**: 1037-1047.
- Fales, H.M., Wildman, W.C. (1964). Biological interconversions in the Amaryllidaceae. I. The haemanthamine-haemanthidine-tazettine sequence. *Journal of the American Chemical Society* **86**: 294-295.
- Farault-Gambarelli, F., Piarroux, R., Deniau, M., Giusiano, B., Marty, P., Michel, G., Faugere, B., Dumon, H. (1997). *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**: 827-830.
- Farombi, E.O., Tahnteng, J.G., Agboola, A.O., Nwankwo, J.O., Emerole, G.O. (2000). Chemoprevention of 2-acetylaminofluorene-induced hepatotoxicity and lipid peroxidation in rats by Kolaviron – A *Garcinia kola* seed extract. *Food and Chemical Toxicology* **38**: 535-541.
- Feinstein, A.I., Wildman, W.C. (1976). Biosynthetic oxidation and rearrangement of vittatine and its derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* **41**: 2447-2450.
- Ferreira, D., Marais, J.P.J., Slade, D. (2005). Heterogeneity of the interflavanyl bond in proanthocyanidins from natural sources lacking C-4 (C-ring) deoxy flavonoid nucleophiles. *Phytochemistry* **66**: 2216-2237.
- Finkel, T., Holbrook N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**: 239-247.
- Fonseca, F.N., Ferreira, A.J.S., Sartorelli, P., Lopes, N.P., Floh, E.I.S., Handro, W., Kato, M.J. (2000). Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. *Phytochemistry* **55**: 575-580.
- Fournet, A., Muñoz, V. (2002). Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2**: 1215-1237.

- Frahm, A.W., Ali, A.A., Ramadan, M.A. (1985).  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectra of Amaryllidaceae alkaloids. I Alkaloids with the crinine skeleton. *Magnetic Resonance in Chemistry* **23**: 804-808.
- Francis, S., Sullivan, D., Goldberg, D. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Annual Review of Microbiology* **51**: 97-123.
- Fuganti, C., Mazza, M. (1972). The absolute configuration of narciclasine: A biosynthetic approach. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1972**: 239-239.
- Fuganti, C., Ghiringhelli, D., Grasselli, P. (1974). Biosynthesis of narcissidine. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1974**: 350-351.
- Furuno, K., Akasako, T., Sugihara, N. (2002). The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **25**: 19-23.
- Galal, A., Ahmad, M., El-Feraly, F., McPhail, A. (1996). Preparation and characterization of a new artemisinin-derived dimer. *Journal of Natural Products*. **59**: 917-920.
- Gelb, M.H., Van Voorhis, W.C., Buckner, F.S., Yokoyama, K., Eastman, R., Carpenter, E.P., Panethymitaki, C., Brown, K.A., Smith, D.F. (2003). Protein farnesyl and *N*-myristoyl transferases: piggy-back medicinal chemistry targets for the development of antitrypanosomatid and antimalarial therapeutics. *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**: 155-163.
- Ghosal, S., Kumar, Y., Singh, S. (1984). Glucosyloxy alkaloids from *Pancreatium biflorum*. *Phytochemistry* **24**: 1167-1171.
- Ghosal, S., Saini, K.S., Razdan, S. (1985). *Crinum* alkaloids: Their chemistry and biology. *Phytochemistry* **24**: 2141-2156.
- Ghosal, S., Kumar, Y., Singh, S.K., Kumar, A. (1986a). Chemical constituents of Amaryllidaceae. Part 21. Ungeremine and Criasbetaine, Two anti-tumour alkaloids from *Crinum asiaticum*. *Journal of Chemical Research* **25**: 112-113.
- Ghosal, S., Singh, S.K., Srivastava, R.S. (1986b). Alkaloids of *Zephyranthes flava*. *Phytochemistry* **25**: 1975-1978.
- Ghosal, S., Shanthi, A., Singh, S.K. (1988). Isocraugsodine, an *N*-arylidenephenethylamine from *Crinum asiaticum* and its E-Z isomerism. *Phytochemistry* **25**: 1975-1978.
- Gilbert, I.H. (2002). Inhibitors of dihydrofolate reductase in *Leishmania* and *trypanosomes*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1587**: 249-257.
- Go, M.L. (2003). Novel antiplasmodial agents. *Medicinal Research Reviews* **23**: 456-487.
- Goldberg, D., Slater, A., Cerami, A., Henderson, G. (1990). Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: An ordered process in a unique organelle.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 2931-2935.
- Goldberg, D., Slater, A. (1992). The pathway of hemoglobin degradation in malaria. *Parasitology Today* **8**: 280–283.
- González, M.L., Muñiz-Rodríguez, P., Valls-Bellés, V. (2001). Actividad antioxidante de la cerveza: estudios *in vitro* e *in vivo*. Centro de información: Cerveza y Salud. Consultada en marzo de 2008, pagina web: [www.nutricion.org/publicaciones/pdf/libro\\_cerveza\\_8.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/libro_cerveza_8.pdf).
- Green, R. C. (2007). Physicochemical properties and phenolic composition of selected Saskatchewan fruits: buffaloberry, chokecherry and sea buckthorn. Tesis Doctoral. Universidad de Saskatchewan. pp. 41-49. Consultada en marzo de 2008, pagina web: [http://library2.usask.ca/theses/available/etd-07262007-084516/unrestricted/green\\_r.pdf](http://library2.usask.ca/theses/available/etd-07262007-084516/unrestricted/green_r.pdf)
- Grosvenor, P.W., Supriono, A., Gray, D.O. (1995). Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology* **45**: 97-111.
- Guhl, F. (2000). Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana. Situación actual en Colombia. *Medicina*. 22 (2). Consultada en marzo de 2008, pagina web: <http://www.encolombia.com/medicina/academedicina/220253.htm>.
- Halliwel, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review Nutrition* **16**: 33-50.
- Halliwel, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**: 312-322.
- Han, Q.B., Lee, S.F., Qiao, C.F., He, Z.D., Song, J.Z., Sun, H.D., Xu, H.X. (2005). Complete NMR assignments of the antibacterial biflavonoid GB1 from *Garcinia kola*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **53**: 1034-1036.
- Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- Hardman, J., Limbird, L., Molinoff, P. Las Bases farmacológicas de la Terapéutica. Vol. 2. Novena edición. pp. 1033-1034, 1050, 1126-1130, 1321-1322. McGraw Hill, México, (1996).
- Harken, R.D., Christensen, C.P. Wildman, W.C. (1976). Interconversions in the pluviine-lycorenine series. *The Journal of Organic Chemistry* **41**: 2450-2454.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **13**: 572–584.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytoterapy. pp. 60-63, 113-123. Churchill Livingstone, España, (2004).

- Hendrikcx, E., Agudelo, S., Muñoz, D., Puerta, J., Vélez, I. (1998) Lack of efficacy of mefloquine in the treatment of new world cutaneous leishmaniasis in Colombia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **59**: 889-892.
- Herbin, G.A., Jackson, B., Locksley, H.D., Scheinmann, F., Wolstenholme, W.A. (1970). The biflavonoids of *Garcinia volkensii* (Guttiferae). *Phytochemistry* **9**: 221-226.
- Herrera, M.R., Machocho, A.K., Nair, J.J., Campbell, W.E., Brun, R., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. (2001a). Alkaloids from *Cyrtanthus elatus*. *Fitoterapia* **72**: 444-448.
- Herrera, M.R., Machocho, A.K., Brun, R., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. (2001b). Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Medica* **67**: 191-193.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Kromhout, D. (1997). Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet* **349**: 699.
- Hoet, S., Opperdoes, F., Brun, R., Quetin-Leclercq, J. (2004). Natural products active against African trypanosomes: a step towards new drugs. *Natural Product Reports* **21**: 353-364.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 1841-1856.
- Hussain, R.A., Owegby, A.G., Parimoo, P., Waterman, P.G. (1982). Kolanone, a novel polyisoprenylated benzophenone with antimicrobial properties from the fruit of *Garcinia kola*. *Planta Medica* **44**: 78-81.
- Hutadilok-Towatana, N., Kongkachuay, S., Mahabusarakam, W. (2007). Inhibition of human lipoprotein oxidation by morelloflavone and camboginol from *Garcinia dulcis*. *Natural Product Research* **21**: 655-662.
- Ising, G. (1997). Hibridization in *Cyrtanthus*. *Herbertia* **57**: 153-165.
- Iwu, M.M. (1982). Biflavonoids and glycosides of *Garcinia kola* stem bark. *Planta Medica* **45**: 146-146.
- Iwu, M., Igboko, O. (1982). Flavonoids of *Garcinia kola* seeds. *Journal of Natural Products* **45**: 650-651.
- Iwu, M.M., Igboko, O.A., Tempesta, M.S. (1990a). Biflavonoid constituents of *Garcinia kola* roots. *Fitoterapia* **61**: 178-181.
- Iwu, M.M., Okunji, C.O., Akah, P., Tempesta, M.S., Corley, D. (1990b). Antidiabetic and aldose reductase activities of biflavanones of *Garcinia kola*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **42**: 290-292.
- Iwu, M.M., Jackson, J.E., Schuster, B.G. (1994). Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitology Today* **10**: 65-68.

- Jackson, B., Locksley, H.D., Scheinmann, F., Wolstenholme, W.A. (1967). The isolation of a new series of biflavanones from the heartwood of *Garcinia buchananii*. *Tetrahedron Letters* **8**: 787–792.
- Jackson, B., Locksley, H.D., Scheinmann, F. (1969). Extractives from Guttiferae. Part XIII. Isolation and structure of five xanthenes from *Garcinia eugeniifolia* Wall. *Journal of the Chemical Society C* **1969**: 2201-2203.
- Jackson, B., Locksley, H.D., Scheinmann, F., Wolstenholme, W.A. (1971). Extractives from Guttiferae. Part XXII. The isolation and structure of four novel biflavanones from the heartwoods of *Garcinia buchananii* Baker and *G. eugeniifolia* Wall. *Journal of the Chemical Society C* **1971**: 3791-3804.
- Jackson, J.E., Tally, J.D., Ellis, W.Y. (1990). Quantitative *in vitro* drug potency and drug susceptibility evaluation of *Leishmania* sp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **90**: 464-480.
- Jayanarayan, K.G., Dey, C.S. (2002). Microtubules: dynamics, drug interaction and drug resistance in *Leishmania*. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **27**: 313–320.
- Jeffs, P.W. Sceletium alkaloids. En: “The Alkaloids” (Manske, R.H.F., Rodrigo R.G.A., eds.). Vol. 19. pp. 1-80. Academic Press, New York, (1981).
- Jena, B.S., Jayaprakasha, G.K., Singh, R.P., Sakariah, K.K. (2002). Chemistry and biochemistry of (-)-hydroxycitric acid from *Garcinia*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 10-22.
- Joshi, B.S., Kamat, V.N., Viswanathan, N. (1970). The isolation and structure of two biflavones from *Garcinia talboti*. *Phytochemistry* **9**: 881-888.
- Julsing, M.K., Koulman, A., Woerdenbag, H.J., Quax, W.J., Kayser, O. (2006). Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular Engineering* **23**: 265–279.
- Kabangu, K., Galeffi, C., Aonzo, E., Nicoletti, M., Messana, I. (1987). A new biflavanone from the bark of *Garcinia kola*. *Planta Medica* **53**: 275-277.
- Kang, S.S., Lee, J.Y., Choi, Y.K., Song, S.S., Kim, J.S., Jeon, S.J., Han, Y.N., Son, K.H., Han, B.H. (2005). Neuroprotective effects of naturally occurring biflavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**: 3588–3591.
- Karanjgaokar, C.G., Radhakrishnan, P.V., Venkatarama, K. (1967). Morelloflavone, a 3-(8-) flavonylflavanone, from the heartwood of *Garcinia morella*. *Tetrahedron Letters* **8**: 3195–3198.
- Kaya, G.I., Unver, N., Gözler, B., Bastida, J. (2004). (-)-Capnoidine and (+)-bulbocapnine from an Amaryllidaceae species, *Galanthus nivalis* subsp. *Cilicicus*. *Biochemical Systematics and Ecology* **32**: 1059–1062.

- Kayser, O., Kiderlen, A.F., Croft, S.L. (2003). Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research* **90**: S55-62.
- Kihara, M., Koike, T., Imakura, Y., Kida, K., Shingu, T., Kobayashi, S. (1987). Alkaloidal constituents of *Hymenocallis rotata* Herb. (Amaryllidaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **35**: 1070-1075.
- Kihara, M., Xu, L., Konishi, K., Kida, K., Nagao, Y., Kobayashi, S., Shingu, T. (1994). Isolation and structure elucidation of a novel alkaloid, incartine, a supposed biosynthetic intermediate, from flowers of *Lycoris incarnata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **42**: 289-292.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. (2000). Effects of naturally occurring flavonoids on inflammatory responses and their action mechanisms. *Natural Products Science* **6**: 170-178.
- King, A., Young, G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association* **99**: 213-218.
- Kirby, G.M., Tiwari, H.P. (1966). Phenol oxidation and biosynthesis. Part IX. The biosynthesis of norpluviine and galanthine. *Journal of the Chemical Society C* **1966**: 676-682.
- Kvist, L.P., Christensen, S.B., Rasmussen, H.B., Mejia, K., Gonzalez, A. (2006). Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology* **106**: 390-402.
- Kobayashi, S., Takeda, S., Ishikawa, H., Matsumoto, H., Kihara, M., Shingu, T., Numata, A., Uyeo, S. (1976). Alkaloids of the Amaryllidaceae. A new alkaloid, sanguinine, from *Lycoris sanguinea* Maxim. var. *Kiushiana* Makino, and pretazettine from *Lycoris radiata* Herb. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **24**: 1537-1543.
- Kobayashi, S., Ishikawa, H., Sasakawa, E., Kihara, M., Shingu, T., Kato, A. (1980). Isolation of clivacetine from *Clivia miniata* Regel (Amaryllidaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **28**: 1827-1831.
- Kobayashi, S., Satoh, K., Numata, A., Shingu, T., Kihara, M. (1991). Alkaloid N-oxides from *Lycorys sanguinea*. *Phytochemistry* **38**: 675-677.
- Konoshima, M., Ikeshiro, Y., Nishinaga, A., Matsuura, T., Kubota, T., Sakamoto, H. (1969). The constitution of flavonoids from *Garcinia spicata* Hook. f. *Tetrahedron Letters* **10**: 121-124.
- Konoshima, M., Ikeshiro, Y. (1970). Fukugiside, the first biflavonoid glycoside from *Garcinia spicata* hook. f. *Tetrahedron Letters* **11**: 1717-1720.
- Konoshima, M., Ikeshiro, Y., Miyahara, S. (1970). The constitution of biflavonoids from *Garcinia* plants. *Tetrahedron Letters* **11**: 4203-4206.

- Kreh, M., Matusch, R. (1995). *O*-methyloduline and *N*-demethylmasonine, alkaloids from *Narcissus pseudonarcissus*. *Phytochemistry* **38**: 1533-1535.
- Labraña, J., Choy, G., Solans, X., Font-Bardia, M., de la Fuente, G., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. (1999). Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **50**: 183-188.
- Labraña, J., Machocho, A.K., Kricsfalusy, V., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. (2002). Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. *transcarpathicus* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* **60**: 847-852.
- Laguna-Torres, V.A., Silva, C.A., Correia, D., Carvalho, E.M., Magalhaes, A.V., Macedo, Vde O. (1999). Efficacy of mefloquine in the treatment of skin leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **32**: 529-532.
- Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J.L., Duriez, P., Teissier, E., Cotelle, N. (2000). Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine* **29**: 900-912.
- Li, H.Y., Ma, G.E., Xu, Y., Hong, S.H. (1987). Alkaloids of *Lycoris Guangxiensis*. *Planta Medica* **53**: 259-261.
- Li, X.C., Joshi, A.S., Tan, B., ElSohly, H.N., Walker, L.A., Zjawiony, J.K., Ferreira, D. (2002). Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3→8'')-flavone biflavonoids from *Rhedia acuminata*. *Tetrahedron* **58**: 8709-8717.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Chai, H., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A. (1993) Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *Journal of Natural Products* **56**: 1331-1338.
- Lin, Y.M., Anderson, H., Flavin, M.T., Pai, Y.H., Mata-Greenwood, E., Pengsuparp, T., Pezzuto, J.M., Schinazi, R.F., Hughes, S.H., Chen, F.C. (1997). *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *Journal of Natural Products* **60**: 884-888.
- Lin, Y.M., Flavin, M.T., Schure, R., Chen, F.C., Sidwell, R., Barnard, D.L., Huffman, J.H., Kern, E.R. (1999). Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Medica* **65**: 120-125.
- Lin, L.C., Kuo, Y.C., Chou, C.J. (2000). Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *Journal of Natural Products* **63**: 627-630.
- Lin, Y.M., Flavin, M.T., Cassidy, C.S., Mar, A., Chen, F.C. (2001). Biflavonoids as novel antituberculosis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **11**: 2101-2104.
- Llabrés, J.M., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., Serrano, M., Rubiralta, M., Feliz, M. (1986). Two alkaloids from *Narcissus requienii*. *Phytochemistry* **25**: 1453-1459.
- Lobstein, A., Archipoff, G.H., Englert, J., Kuhry, J.G., Anton, R. (1999). Chemotaxonomical investigation in the genus *Viburnum*. *Phytochemistry* **50**: 1175-1180.

- Loria, P., Miller, S., Foley, M., Tilley, L. (1999). Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *The Biochemical Journal* **339**: 363-370.
- Lyle, R.E., Kielar, E.A., Crowder, J.R., Wildman, W.C. (1960). The alkaloids of *Nerine bowdenii* W. Wats and *Crinum moorei* J.D. Hook. *Journal of the American Chemical Society* **82**: 2620-2625.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B. The systematic identification of flavonoids. pp. 4-15, 41-61. Springer Verlag, New York, (1970).
- Machocho, A.K, Bastida, J., Codina, C., Viladomat, F., Brun, R., Chhabra, S.C. (2004). Augustamine type alkaloids from *Crinum kirkii*. *Phytochemistry* **65**: 3143-3149.
- Mackeen, M.M., Ali, A.M., Abdullah, M.A., Nasir, R.M., Mat, N.B., Razak, A.R., Kawazu, K. (1997a). Antinematodal activity of some Malaysian plant extracts against the Pine Wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Pesticide Science* **51**: 165-170.
- Mackeen, M.M., Ali, A.M., El-Sharkawy, S.H., Salleh, K.M., Lajis, N.H., Kawazu, K. (1997b). Antimicrobial and cytotoxic properties of some Malaysian traditional vegetables (ulam). *International Journal of Pharmacognosy* **35**: 174-178.
- Mackeen, M.M., Ali, A.M., Lajis, N.H., Kawazu, K., Hassan, Z., Amran, M., Habsah, M., Mooi, L.Y., Mohamed, S.M. (2000). Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. *Journal of Ethnopharmacology* **72**: 395-402.
- Mahabusarakam, W., Wiriyachitra, P., Taylor, W.C. (1987). Chemical constituents of *Garcinia mangostana*. *Journal of Natural Products* **50**: 474-478.
- Marais, J.P.J., Deavours, B., Dixon, R.A., Ferreira, D. The Stereochemistry of flavonoids. En "The Science of Flavonoids" (Grotewold, E., ed.). pp. 1-46. Springer, New York, (2006).
- Markham, K.R., Geiger, H. <sup>1</sup>H Nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeutero-dimethylsulfoxide. En "The Flavonoids-Advances in Research since 1986" (Harborne, J.B., ed.). pp. 441-473. Chapman and Hall, London, (1994).
- Markham, K.R., Sheppard, C., Geiger, H. (1987). <sup>13</sup>C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. *Phytochemistry* **26**: 3335-3337.
- Marshall, E. (2000) Reinventing an ancient cure for malaria. *Science* **290**: 437-439.
- Martens, S., Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66**: 2399-2407.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., Tuñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria* **17**: 271-278.



- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S. (2005). Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of Seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69**: 197-201.
- Mbwambo, Z.H., Kapingu, M.C., Moshi, M.J., Machumi, F., Apers, S., Cos, P., Ferreira, D., Marais, J.P.J., Berghe, D.V., Maes, L., Vlietinck, A., Pieters, L. (2006). Antiparasitic activity of some xanthenes and biflavonoids from the root bark of *Garcinia livingstonei*. *Journal of Natural Products* **69**: 369-372.
- Meerow, A.W., Snijman, D.A. Amaryllidaceae. En "The families and genera of vascular plants. Flowering plants monocotyledons. Liliace (except Orchidaceae)" (Kubitzki, K., ed.). Vol. 3. pp. 83-110. Springer-Verlag, Berlin, (1998).
- Meshnick, S. (1998). Artemisin antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Medecine Tropicale* **58** (suppl 3): 13-17.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405-410.
- Motulsky, H.J. Christopoulos, A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting. pp. 257-275. GraphPad software Inc., San Diego CA, (2003).
- Mulholland, D.A., Crouch, N., Decker, B., Smith, M.T. (2002). The isolation of the Amaryllidaceae alkaloid crinamine from *Dioscorea dregeana* (Dioscoreaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **30**: 183-185.
- Müller, S., Coombs, G.H., Walter, R.D. (2001). Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends in Parasitology* **17**: 242-249.
- Munier, R., Macheboeuf, M. (1951). Paper partition microchromatography of alkaloids and of various biological nitrogenous bases. III. Examples of the separation of various alkaloids by the acid solvent phase technic (atropine, cocaine, nicotine, sparteine, strychnine and corynanthine families). *Bulletin de la Société de Chimie Biologique* **33**: 846-846.
- Muñiz, P., Sáez, G., Valls, Valls, V. Función y mecanismos antioxidantes. Importancia durante la transición feto-neonato. En "Radicales libres y estrés oxidativo en biomedicina y utilidad de los antioxidantes en la prevención de procesos fisiopatológicos relacionados. pp. 63-70. Fundación Valenciana de Estudios Avanzados, Valencia, (2000).
- Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G. (2000). A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology* **69**: 127-137.
- Murakami, A., Jiwajinda, S., Koshimizu, K., Ohigashia, H. (1995). Screening for *in vitro* anti-tumor promoting activities of edible plants from Thailand. *Cancer Letters* **95**: 139-146.
- Nair, J.J., Campbell, W.E., Gammon, D.E., Albrecht, C.F., Villadomat, F., Codina, C. (1998). Alkaloids from *Crinum dalagoense*. *Phytochemistry* **49**: 2539-2443.

- Nair, J.J., Machocho, A.K., Campbell, W.E., Brun, R., Villadomat, F., Codina, C. (2000). Alkaloids from *Crinum macowanii*. *Phytochemistry* **54**: 945-950.
- Nair, J., Campbell, W., Brun, R., Viladomat, F., Codina, C., Bastida, J. (2005). Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry* **66**: 373-382.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* **66**: 1022-1037.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* **70**: 461-477.
- Ngoc Tram, N.T., Titorenkova, T.V., Bankova, V.S., Handjieva, N.V., Popov, S.S. (2002). *Crinum* L. (Amaryllidaceae). *Fitoterapia* **73**: 183-208.
- Nicholls, S., Guhl, F., Montoya, R., Rosas F., Zipa J. (2003). El tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. *Biomédica* **23** (suppl. 1): 44-46.
- Nunome, S., Ishiyama, A., Kobayashi, M., Otoguro, K., Kiyohara, H., Yamada, H., Omura, S. (2004). *In vitro* antimalarial activity of biflavonoids from *Wikstroemia indica*. *Planta Medica* **70**: 76-78.
- Okunji, C., Komarnytsky, S., Fear, G., Poulev, A., Ribnicky, D. M., Awachie, P.I., Ito, Y., Raskin, I. (2007). Preparative isolation and identification of tyrosinase inhibitors from the seeds of *Garcinia kola* by high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1151**: 45-50.
- Onyiriuka, O.S., Jackson, A.H. (1978). Alkaloid from the bulbs of *Crinum ornatum* (Amaryllidaceae). *Israel Journal of Chemistry* **17**: 185-192.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico. Reporte TDR/SWG/09. Buenos Aires. (2007).
- Ortholand, J.Y., Ganesan, A. (2004). Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**: 271-280.
- Osorio, E., Arango, G., García, E., Muñoz, K., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M. A., Giménez, A. (2005). Actividad antiplasmodial *in vitro* e inhibición de la formación de la  $\beta$ -hematina de plantas colombianas de la familia Annonaceae. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **24**: 527-532.
- Osorio, E., Arango, G.J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M.A., Giménez, A., Robledo, S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology* **111**: 630-635.
- Pabuçcuoglu, V., Richomme, P., Gözler, T., Kivçak, B., Freyer, A.J., Shamma, M. (1989). Four new crinine-type alkaloids from *Sternbergia* species. *Journal of Natural Products* **52**: 785-791.

- Pagola, S., Stephens, P., Bohle, D., Kosar, A., Madsen, S. (2000). The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature* **404**: 307-310.
- Pannala, A.S., Chan, T.S., O'Brien, P.J., Rice-Evans, C.A. (2001). Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282**: 1161-1168.
- Parr, A.J., Bolwell, G.P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 985-1012.
- Parveen, N., Singh, M.P., Khan, N.U., Logani, M.K. (1994). Flavonoidic constituents of *Garcinia xanthochymus*. *Fitoterapia* **65**: 89-89.
- Parveen, M., Ilyas, M., Mushfiq, M., Busudan, O.A., Muhaisen, H.M.H. (2004). A new biflavonoid from leaves of *Garcinia nervosa*. *Natural Product Research* **18**: 269-275.
- Pauli, G.F. (2000). Higher order and substituent chemical shift effects in the proton NMR of glycosides. *Journal of Natural Products* **63**: 834-838.
- Pegnyemb, D.E., Mbing, J.N., Atchadé, A.T., Tih, R.G., Sondengam, B.L., Blond, A., Bodo, B. (2005). Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. *Phytochemistry* **66**: 1922-1926.
- Pelletier, S.W., Chokshi, H.P., Desai, H.K. (1986). Separation of diterpenoid alkaloid mixtures using Vacuum Liquid Chromatography. *Journal of Natural Products* **49**: 892-900.
- Pelter, A., Warren, R., Chexal, K.K., Handa, B.K., Rahman, W. (1971). Biflavonyls from Guttiferae - *Garcinia livingstonii*. *Tetrahedron* **27**: 1625-1634.
- Pham, H.L., Döpke, W., Wagner, J., Mugge, C. (1998). Alkaloids from *Crinum amabile*. *Phytochemistry* **48**: 371-376.
- Pham, L.H., Grundemann, E., Wagner, J., Bartoszek, M., Döpke, W. (1999). Two novel Amaryllidaceae alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb.: 3-O-demetyltazettine and egonine. *Phytochemistry* **51**: 327-332.
- Phillips, R.S. (2001) Current status of malaria and potential for control. *Clinical Microbiology Reviews* **14**: 208-226.
- Phillipson, J.D., Wright, C.W. (1991). Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Medica* **57**: S53-59.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **63**: 1035-1042.
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal* **16**: 1306-1314.

- Pinchuk, I., Lichtenberg, D. (2002). The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Progress in Lipid Research* **41**: 279–314.
- Ramadan, M.A., Kamel, M.S., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K. (2000). Minor phenolics from *Crinum bulbispermum* bulbs. *Phytochemistry* **54**: 891-896.
- Randhir, R., Lin, Y.T., Shetty, K. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* **13**: 295–307.
- Raynes, K., Foley, M., Tilley, L., Deady, L. (1996). Novel bisquinoline antimalarials. Synthesis, antimalarial activity, and inhibition of haem polymerisation. *Biochemical Pharmacology* **52**: 551–559.
- Ráz, B., Iten, M., Grether-Bühler, Y., Kaminsky, R., Brun, R. (1997). The Alamar Blue assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T. b. rhodosiense* and *T. b. gambiense*) *in vitro*. *Acta Tropica* **68**: 139-147.
- Rice-Evans, C. Free radicals and antioxidants in normal and pathological processes. En “Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction” (Rice-Evans, C., Bruckdorfer, K.R., eds.). pp. 1-32. Portland Press, London, (1995).
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996a). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* **20**: 933–956.
- Rice-Evans, C., Leake, D., Bruckdorfer, K.R., Diplock, A.T. (1996b). Practical approaches to low density lipoprotein oxidation: whys, wherefores and pitfalls. *Free Radical Research* **25**: 285–311.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* **2**: 152–159.
- Ridley, R.G., Hofheinz, W., Matile, H., Jacquet, C., Dorn, A., Masciadri, R., Jolidon, S., Richter, W.F., Guenzi, A., Girometta, M.A., Urwyler, H., Huber, W., Thaitong, S., Peters, W. (1996). 4-aminoquinolone analogs of chloroquine with shortened side chains retain activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 1846-1854.
- Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* **1112**: 31–63.
- Rivero, J.A., Brunner, B.R. Árboles frutales exóticos y poco conocidos en Puerto Rico. pp. 71-73. La Editorial Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico, (2006).
- Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **66**: 401–436.

- Roberts, C.W., McLeod, R., Rice, D.W., Ginger, M., Chance, M.L., Goad, L.J. (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology* **126**: 129–142.
- Rojstaczer, N., Triggle, D.J. (1996). Structure-function relationships of calcium antagonists. Effect on oxidative modification of low density lipoprotein. *Biochemical Pharmacology* **51**: 141-150.
- Rosenthal, P.J. (2003). Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *The Journal of Experimental Biology* **206**: 3735-3744.
- Sajid, M., McKerrow, J.R. (2002). Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* **120**: 1–21.
- Schmidt, A., Krauth-Siegel, R.L. (2002). Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2**: 1239-1259.
- Schroeter, H., Williams, R.J., Matin, R., Iversen, L., Rice-Evans, C.A. (2000). Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biology & Medicine* **29**: 1222–1233.
- Schwikkard, S., Heerden, F.R. (2002). Antimalarial activity of plant metabolites. *Natural Product Reports* **19**: 675-692.
- Seeram, N.P., Nair, M.G. (2002). Inhibition of lipid peroxidation and structure–activity related studies of the dietary constituents anthocyanins, anthocyanidins, and catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 5308–5312.
- Şener, B., Orhan, I., Satayavivad, J. (2003). Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research* **17**: 1220-1223.
- Sepulveda-Boza, S., Cassels, B.K. (1996). Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica* **62**: 98-105.
- Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F.K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* **67**: 2058-2070.
- Shapiro, T. A., Englund, P. T. (1990). Selective cleavage of kinetoplast DNA minicircles promoted by antitrypanosomal drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 950-954.
- Silva, A.M., Lee, A.Y., Gulnik, S.V., Maier, P., Collins, J., Bhat, T.N., Collins, P.J., Cachau, R.E., Luker, K.E., Gluzman, I.Y., Francis, I.Y., Francis, S.E., Oksman, A., Goldberg, D.E., Erickson, J.W. (1996). Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 10034–10039.

- Silva, B.A., Ferreres, F., Malva, J.O., Dias, A.C.P. (2005). Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Phytochemistry* **90**: 157-167.
- Singh, S., Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy* **10**: 307-315.
- Siquet, C., Paiva-Martins, F., Lima J.L.F.C., Reis, S., Borges, F. (2006). Antioxidant profile of dihydroxy- and trihydroxyphenolic acids. A structure-activity relationship study. *Free Radical Research* **40**: 433-442.
- Slater, A., Swiggard, W., Orton, B., Orton, B.R., Flitter, W.D., Goldberg, D.E., Cerami, A., Henderson, G.B. (1991). An iron carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 325-329.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* **579**: 200-213.
- Soto, J., Toledo, J., Gutiérrez, P., Nicholls, R.S., Padilla, J., Engel, J., Fischer, C., Voss, A., Berman, J. (2001). Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. *Clinical Infectious Diseases* **33**: E57-61.
- Soto, J., Arana, B.A., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J.C., Diaz, A., Luz, M., Gutierrez, P., Arboleda, M., Berman, J.D., Jungle, K., Engel, J., Sindermann, H. (2004). Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* **38**: 1266-1272.
- Springob, K., Nakajima, J., Yamazaki, M., Saito, K. (2003). Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Product Reports* **20**: 288-303.
- Suárez, A.I., Diaz, B.M., Delle Monache, F., Compagnone, R.S. (2003). Biflavonoids from *Podocalyx loranthoides*. *Fitoterapia* **74**: 473-475.
- Suau, R., Gómez, A.I., Rico, R. (1990). Ismine and related alkaloids from *Lapiedra martinezii*. *Phytochemistry* **29**: 1710-1712.
- Suffredini, I.B., Paciencia, M.L.B., Nepomuceno, D. C., Younes, R.N., Varella, A.D. (2006). Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts - Clusiaceae. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **101**: 287-290.
- Sukpondma, Y., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S. (2005). Xanthone and sesquiterpene derivatives from the fruits of *Garcinia scortechinii*. *Journal of Natural Products* **68**: 1010-1017.
- Sundar, S.J., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., Berman, J. (2002). Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis. *The New England Journal of Medicine* **347**: 1739-1746.
- Švehlíková, V., Bennett, R.N., Mellon, F.A., Needs, P.W., Piacente, S., Kroon, P.A., Bao, Y. (2004). Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-

- glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert). *Phytochemistry* **65**: 2323-2332.
- Tagboto, S., Townson, S. (2001). Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Advances in Parasitology* **50**: 199-295.
- Taiwo, O., Xu, H.X., Lee, S.F. (1999). Antibacterial activities of extracts from Nigerian chewing sticks. *Phytotherapy Research* **13**: 675-679.
- Terashima, K., Aqil, M., Niwa, M. (1995). Garcinianin, A. Novel biflavonoids from the roots of *Garcinia kola*. *Heterocycles* **41**: 2245-2250.
- Thomsen, T., Kewitz, H. (1990). Selective inhibition of human acetylcholinesterase by galanthamine *in vitro* and *in vivo*. *Life Sciences* **46**: 1553-1558.
- Tona, L., Cimanga, R.K., Mesia, K., Musuamba, C.T., De Bruyne, T., Apers, S., Hernans, N., Miert, S.V., Pieters, L., Totté, J., Vlietinck, A.J., (2004). *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* **93**: 27-32.
- Ueda, T., Ueda, T., Armstrong, D. (1996). Preventive effect of natural and synthetic antioxidants on lipid peroxidation in mammalian eye. *Ophthalmic Research* **28**: 184-192.
- Ulloa, C.U., Jorgensen, P.M. (2004). Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador. Consultada en marzo de 2008, pagina web: [http://www.efloras.org/flora\\_page.aspx?flora\\_id=201](http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=201)
- Urbina, J.A. (1997). Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* **114** (suppl): S91-99.
- van Acker, S.A.B.E., van den Berg, D.-J., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., van Bennekom, W.P., van der Vijgh, W.J.F. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine* **20**: 331-342.
- Vásquez-Tato, M.P., Castedo, L., Riguera, R. (1988). New alkaloids from *Pancreatium maritimum* L. *Heterocycles* **27**: 2833-2838.
- Veitch, N.C. (2007). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Products Reports* **24**: 417-464.
- Vélez, I., Agudelo, S., Hendrickx, E., Puerta, J., Grogl, M., Modabber, F., Berman, J. (1997). Inefficacy of allopurinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. A randomized controlled trial. *Annals of Internal Medicine* **126**: 232-236.
- Verdi, L.G., Pizzolatti, M.G., Montanher, A.B.P., Brighente, I.M.C., Júnior, A.S., Smania, E. de F.A., Simionatto, E.L., Monached, F.D. (2004). Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. *Fitoterapia* **75**: 360-363.
- Verlinde, C.L., Hannaert, V., Blonski, C. (2001). Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resistance Updates* **4**: 50-65.

- Viladomat, F., Bastida, J., Tribó, G., Codina, C., Rubiralta, M. (1990). Alkaloids from *Narcissus bicolor*. *Phytochemistry* **29**: 1307-1310.
- Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., Campbell, W.E., Mathee, S. (1994). Alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry* **35**: 809-012.
- Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., Campbell, W.E., Mathee, S. (1995). Alkaloids from *Boophane flava*. *Phytochemistry* **40**: 307-311.
- Viladomat, F., Almanza, G.R., Codina, C., Bastida, J., Campbell, W.E., Mathee, S. (1996). Alkaloids from *Brunsvigia orientalis*. *Phytochemistry* **43**: 1379-1384.
- Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C., Nair, J.J. Campbell, W.E. Alkaloids from South African Amaryllidaceae. En "Recent Research and Development in Phytochemistry" (Pandalai, S.G., ed.). Vol. 1. pp. 131-171. Research Signpost Publisher, Trivandrum, (1997).
- W<sup>3</sup> Tropicos. Missouri Botanical Garden's VAST nomenclatural database. Consultada en marzo de 2008, pagina web: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>.
- Wagner, J., Pham, H.L., Döpke, W. (1996). Alkaloids from *Hippeastrum equestre* Herb. -5. Circular dichroism studies. *Tetrahedron* **52**: 6591-6600.
- Waris, G., Ashan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* **5**: 14.
- Waterman, P.G., Crichton, E.G. (1980). Xanthones and biflavonoids from *Garcinia densivenia* stem bark. *Phytochemistry* **19**: 2723-2726.
- Waterman, P.G., Hussain, R.A. (1982). Major xanthones from *Garcinia quadrifaria* and *Garcinia staudtii* stem barks. *Phytochemistry* **21**: 2099-2101.
- Wengelink, K., Vidal, V., Ancelin, M.L., Cathiard, A.M., Mongat, J.L., Kocken, C.H., Calas, M., Herrera, S., Thomas, A.W., Vial, H.J. (2002). A class of potent antimalarials and their specific accumulation in infected erythrocytes. *Science* **295**: 1311-1314.
- Weniger, B., Robledo, S., Arango, G. J., Deharo, E., Aragón, R., Muñoz, V., Callapa, J., Lobstein, A., Anton, R. (2001). Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology* **78**: 193-200.
- Weniger, B., Vonthron-Sénécheau, C., Kaiser, M., Brun, R., Anton, R. (2006). Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine* **13**: 176-180.
- Wightman, R.H., Staunton, J., Battersby, A.R., Hanson, K.R. (1972). Studies of enzyme-mediated reactions. Part I. Syntheses of deuterium or tritium labeled (3*S*)- and (3*R*)-phenylalanines: Stereochemical course of the elimination catalysed by L-phenylalanine ammonia-lyase. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1**: 2355-2364.



- Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology* **126**: 485-493.
- Winkel-Shirley, B. The biosynthesis of flavonoids. En “The Science of Flavonoids” (Grotewold, E. ed.). pp. 71-96. Springer, New York, (2006).
- World Health Organization (WHO). (2000a). Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases. Consultada en marzo de 2008, pagina web: [http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/en/a\\_tryps.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/en/a_tryps.pdf).
- World Health Organization (WHO). (2000b). Expert Committee on Malaria. Technical Report Series. Twentieth Report, World Health Organization. Geneva. Consultada en marzo de 2008, pagina web: <http://www.emro.who.int/rbm/publications/WHOExpertCommittee.pdf>
- World Health Organization (WHO). Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. Technical reports series 905. World Health Organization. Geneva. (2002).
- Wright, C.W. Antiprotozoal natural products. En “Trease and Evans Pharmacognosy” (Evans, W.C., Saunders, W.B., eds.). pp. 407–413. Saunders, Edinburgh, (2004).
- Xie, D.Y., Dixon, R.A. (2005). Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?. *Phytochemistry* **66**: 2127-2144.
- Yamaguchi, T., Takamura H., Matoba T., Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**: 1201–1204.
- Yamaguchi, L.F., Vassão, D.G., Kato, M.J., Mascio, P.D. (2005). Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potentials protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. *Phytochemistry* **66**: 2238–2247.
- Young, J.F., Nielsen, S.E., Heraldottier, J., Danesfvar, B., Lauridsen, S.T., Knuthsen, P., Crozier, A., Sandstrom, B., Dragsted, L.O. (1999). Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidants status. *The American Journal of Clinical Nutrition* **69**: 87-94.
- Youssef, D.T.A., Frahm, A.W. (1998). Alkaloids of the flowers of *Pancreatium maritimum*. *Planta Medica* **64**: 669-670.
- Yuthavong, Y., Yuvaniyama, J., Chitnumsub, P., Vanichtanankul, J., Chusacultachai, S., Tarnchompoo, B., Vilaivan, T., Kamchonwongpaisan, S. (2005). Malarial (*Plasmodium falciparum*) dihydrofolate reductase-thymidylate synthase: structural basis for antifolate resistance and development of effective inhibitors. *Parasitology* **130** (Pt 3): 249-259.