

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS



## **Estudio químico de dos plantas bolivianas de la Etnia Tacana: *Galipea longiflora* y *Bowdichia virgilioides***

“Tesis de Post-grado para optar el título de Magíster Scientiarum en Ciencias Biológicas y Biomédicas en la mención de Biología de Poblaciones”

Elaborado por:

Lic. Juan Carlos Ticona Huallpara

Asesores:

Ninoska Flores Quisbert Ph. D.

Alberto Giménez Turba Ph. D.

La Paz-Bolivia  
2008



*Con gratitud, dedico este trabajo a:  
Mis Amados padres Carlota y Dionicio,  
hermanos, por su constante motivación y  
confianza y por el apoyo en todos  
los momentos de mi vida.*

*A la Dra. Ninoska Flores por toda su enseñanza brindada por su comprensión y paciencia, por el constante apoyo, por su fuerza de motivación y sobre todo por su gran amistad brindada.*

*A la Dra. Isabel López por su enseñanza, colaboración, por el constante apoyo durante el desarrollo de este trabajo y por su gran amistad brindada.*

*Al Dr. Alberto Giménez por su permanente guía, enseñanza, y colaboración incondicional, por su espíritu de motivación, sobre todo por su confianza y gran amistad.*

*Al Dr. Antonio Jiménez, por su enseñanza, colaboración, dedicación y apoyo durante el desarrollo de este trabajo, sobre todo gracias por la amistad brindada.*

## AGRADECIMIENTOS

A la Maestría de Ciencias Biológicas y Biomédicas que mediante las becas del IRD, me permitieron realizar el presente trabajo en el estudio de especies vegetales con actividad antiparasitaria.

A la AECI Programa Intercampus (PCI-Iberoamérica) de Cooperación Inter-universitaria 2007 por el financiamiento del proyecto (PCI A/4954/06), que me permitieron realizar la elucidación de los metabolitos aislados.

Al Instituto Universitario de Bio-orgánica Antonio González IUBO, de la Universidad de La Laguna, por haberme acogido en sus laboratorios, para culminar el presente trabajo.

A los proyectos "Enfermedades Infecciosas" ASDI-SAREC y Flora Regional OEA por el financiamiento de equipos y reactivos para el desarrollo de este trabajo.

A la fundación Alexander Von Humboldt por la donación de equipos para hacer posible la realización de este trabajo.

A Don Rogelio Chuqui y a los comunarios de Santa Rosa de Maravilla por haber colaborado en la recolecta de las especies medicinales.

Al Dr. Enrique Udaeta por su constante apoyo, colaboración, enseñanza y por sus conocimientos, y además por su grata amistad brindada.

A mis amigos Nayra, Gabriel y Efraín, por su apoyo incondicional y colaboración en el desarrollo del presente trabajo y por su gran amistad brindada.

Al Dr. David Gutiérrez y Crispín Paredes por su constante colaboración, orientación y amistad brindada durante la realización de este trabajo.

A todos mis amigos del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas y de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por su gran amistad.

Con el añadido especial cariño que tengo al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas que permitió la realización del estudio de plantas medicinales.

## RESUMEN

Estudios químicos se han realizado sobre dos especies medicinales de la etnia Tacana: Corteza de árboles adultos de *Galipea longiflora* colectada en diferentes zonas [Santa Rosa de Maravilla (SR), Hernández (HE), Y-Abanico (YA), Covendo (CO), Luz Porvenir (PO)] y corteza de plantines de diferentes tamaños (14, 19, 30 y 51 cm) colectada en la comunidad de Santa Rosa de Maravilla. Hojas de *Bowdichia virgilioides* colectadas cerca de la comunidad de Macahua en el Departamento de La Paz, Bolivia.

La corteza seca de *Galipea longiflora* (colectada en diferentes zonas y de plantines) fue pulverizada y sometida a extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y en los extractos crudos se han cuantificado los alcaloides totales (CAT). Seguidamente, todos los CAT fueron fraccionados por cromatografía en columna y las fracciones fueron procesadas por cromatografía en capa fina, analítica y preparativa, además de otras técnicas de cromatografía de absorción. Los alcaloides aislados fueron caracterizados por espectrometría (EM alta resolución) y espectroscopía (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT) con experimentos homo-nucleares (COSY, ROESY) y hetero-nucleares (HSQC, HMBC). De todas las muestras se han caracterizado siete alcaloides quinolínicos: 2-fenil-quinolina; 2-*n*-pentil-quinolina; 2-fenil-4-metoxi-quinolina; 2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-quinolina; 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina; Shiquimianina y Evolitrina, mientras que 2-*n*-pentil-quinolina (de PO y YA) y Evolitrina (de YA y CO) estaban ausentes en los CAT.

De las cortezas de los diferentes plantines: 2-fenil-quinolina y 2-fenil-4-metoxi-quinolina, (14, 19 y 51 cm) junto con 2-*n*-pentil-quinolina (30 cm), y Shiquimianina (19 y 30 cm) fueron aislados.

Extracciones a nivel de planta piloto, con corteza de plantas adultas, han sido estandarizadas y formulaciones farmacéuticas orales al 1, 2 y 5% de CAT se han elaborado.

Las hojas secas de *Bowdichia virgilioides*, se sometieron a maceración con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y el extracto crudo fue purificado por técnicas de cromatografía de exclusión utilizando Sephadex LH-20 y otras técnicas de cromatografía de absorción para rendir cinco triterpenos: Lupeol y Lupenona (esqueleto del Lupano),  $\beta$ -Sitosterol y Stigmasterol (esqueleto de los Esteroles), y  $\beta$ -Amirina (esqueleto del Oleano) los cuales fueron caracterizados por datos espectroscópicos y espectrométricos.

## ABSTRACT

Chemical studies were performed on two medicinal plants used by the Tacana ethnic group: The bark of adult trees of *Galipea longiflora* was collected in different zones [Santa Rosa de Maravilla (SR), Hernández (HE), Y-Abanico (YA), Covendo (CO), Luz Porvenir (PO)] and bark from different size plantlets (14, 19, 30 and 51 cm) were collected in Santa Rosa de Maravilla community. The leaves of *Bowdichia virgilioides*, were collected near Macahua community at La Paz department, Bolivia.

The dry bark of *Galipea longiflora* (collected in different zones and size plants) were grounded and extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , and from the crude organic extracts of the bark the total alkaloids (CAT) were yielded. Subsequently, all CAT were fractionated by column chromatographic, and the fractions were follow up by preparative thin layer chromatography and other chromatography techniques. The alkaloids were identified by spectrometric (MS accurate) and spectral (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT) data measurements with homo nuclear (COSY, ROESY) and hetero nuclear (HSQC, HMBC) experiments. From all samples, seven quinolinic alkaloids have been characterized: 2-phenyl-quinoline, 2-*n*-pentyl-quinoline, 4-methoxy-2-phenyl-quinoline, 2-(3',4'-methylenedioxyphenylethyl)-quinoline, 2-(3',4'-dimethoxyphenylethyl)-quinoline, skimmianine and evolitrina, while the 2-*n*-pentyl-quinoline (from PO and YA) and evolitrina (from YA and CO) were absent in the CAT.

From the different plantlets bark: 2-phenyl-quinoline, 4-methoxy-2-phenyl-quinoline (14, 19 and 51 cm) with 2-*n*-pentyl-quinoline (30 cm), and skimmianine (19 and 30cm), were isolated.

Pilot plant size extractions to obtain CAT have been standardized and pharmaceutical oral formulations have been develop with 1, 2 and 5% content of CAT.

The dry leaves of *Bowdichia virgilioides*, were extracted by maceration with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . and the extract was purified by molecular exclusion with Sephadex LH-20 and diverse absorption chromatography techniques, to obtain five triterpene derivatives: Lupeol and Lupenone (Lupane skeleton),  $\beta$ -Sytosterol and Stigmasterol (Sterols skeleton) and  $\beta$ -Amirine (Oleane skeleton) which were characterized by spectral data.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pag.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>OBJETIVOS</b>	4
Objetivos General	5
Objetivos Específicos	5
<b>PRIMERA PARTE: Estudios de <i>Galipea longiflora</i></b>	6
Género <i>Galipea</i>	7
Clasificación taxonómica	9
Estudios químicos y biológicos del género <i>Galipea</i>	10
Alcaloides	19
Ruta de biogénesis de los alcaloides furoquinolínicos	20
Enfermedades parasitarias tropicales	22
Leishmaniasis	25
Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	27
Epidemiología	28
Tratamiento de la leishmaniasis	31
Quimioterapia	31
Formulaciones fitoterapéuticas	37
Formulación farmacéutica de productos fitoterapéuticos	38
Jarabes	39
Alteraciones de los jarabes	40
Preservantes para jarabes	40
Excipientes y auxiliares de formulación de origen natural en tecnología farmacéutica	40
Excipientes de origen vegetal	41
<b>Resultados y discusiones: <i>Galipea longiflora</i></b>	43
Obtención de alcaloides totales a escala piloto de corteza de <i>G. longiflora</i>	44
Determinación del tiempo de maceración	44
Metabolitos bioactivos aislados de corteza de <i>Galipea longiflora</i>	46
Determinación estructural del compuesto 1	47
Determinación estructural del compuesto 2	49
Determinación estructural del compuesto 3	51
Determinación estructural del compuesto 4	54
Determinación estructural del compuesto 7	55
Determinación estructural del compuesto 13	58
Determinación estructural del compuesto 28	61
Análisis comparativo de alcaloides totales obtenido de corteza de <i>G. longiflora</i> recolectadas en diferentes zonas	63

Análisis químico comparativo de alcaloides presentes en la corteza de árboles recolectadas en cinco zonas	64
Análisis comparativo de alcaloides totales de plantines	68
Análisis químico comparativo de alcaloides presentes en la corteza de plantines de diferentes tamaños	69
Elaboración de la emulsión con el extracto de alcaloides totales de <i>G. longiflora</i>	72
Preparación de jarabe simple	73
Preparación de la emulsión de alcaloides totales <i>G. longiflora</i>	73
<b>Metodología: <i>Galipea longiflora</i></b>	74
Obtención de alcaloides totales de <i>Galipea longiflora</i>	75
Colección del material vegetal	75
Preparación del extracto crudo a escala piloto	75
Tiempo de maceración y punto de saturación del solvente	76
Obtención de alcaloides totales a escala piloto	76
Obtención de alcaloides totales de cortezas de árboles y de plantines	77
Separación y aislamiento de los componentes de alcaloides totales	78
Estudio cromatográfico de los alcaloides totales	81
Datos espectrométricos y espectroscópicos	81
Ficha técnica de elaboración de la emulsión de alcaloides totales de <i>G. longiflora</i>	84
<b>SEGUNDA PARTE: Estudios de <i>Bowdichia virgilioides</i></b>	85
Género <i>Bowdichia</i>	86
Clasificación taxonómica	88
Estudios fitoquímicos y biológicos	89
Terpenoides	93
Malaria	99
Ciclo biológico	101
Epidemiología	103
Tratamiento de malaria	105
Productos naturales con actividad antiplasmódica	108
<b>Resultados y discusiones: <i>Bowdichia virgilioides</i></b>	113
Metabolitos aislados del extracto de hojas de <i>Bowdichia virgilioides</i>	114
Determinación estructural del compuesto 60	115
Determinación estructural del compuesto 62	117
Determinación estructural del compuesto 63	119
Determinación estructural del compuesto 102	121
Determinación estructural del compuesto 104	122
Actividad antiplasmódica	124

<b>Metodología: <i>Bowdichia virgilioides</i></b>	125
Colección del material vegetal	127
Preparación del extracto	127
Separación y aislamiento de los componentes del extracto	127
Datos espectrométricos y espectroscópicos	128
Actividad antiplasmódica	130
Preparación de la placa	130
<b>TERCERA PARTE: Técnicas experimentales</b>	131
Técnicas cromatográficas	132
Técnicas espectroscópicas y espectrométricas	134
<b>CUARTA PARTE: Conclusiones</b>	136
<b>QUINTA PARTE: Publicaciones</b>	140
Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de <i>Galipea longiflora</i>	141
Estudio fitoquímico de las hojas de <i>Bowdichia virgilioides</i>	156



## ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
BPM	Buenas Prácticas de Manufactura
CI <sub>50</sub>	Concentración que inhibe el 50% del desarrollo
CI <sub>90</sub>	Concentración que inhibe el 90% del desarrollo
CAT	Alcaloides totales de corteza
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
CLV	Cromatografía líquida al vacío
CPCF	Cromatografía preparativa en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
COSY	Correlación espectroscópica H/H
d	Doblete
DEPT	Transferencia de la Polarización de Distorsiones Ampliadas
δ	Desplazamiento químico
dd	Doble doblete
EtOH	Etanol
Et <sub>2</sub> O	Éter dietílico
EM	Espectrometría de masas de baja resolución
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
EP	Éter de petróleo
H	Hidrógeno
HMBC	Correlación Heteronuclear de un enlace
HMQC	Correlación Heteronuclear de múltiples enlaces
Hz	Herz
J	Constante de acoplamiento
L.	<i>Leishmania</i>
L. a	<i>Leishmania amazonensis</i>
L. b	<i>Leishmania braziliensis</i>
L. d	<i>Leishmania donovani</i>
m	multiplete
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
MeOH	Metanol
n-Hex	n-hexano
Me	Metilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
OMe	Metoxilo
p	pentuplete
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono
ROESY	Espectroscopia nuclear rotatoria del efecto de Overhauser
s	singulete
SiO <sub>2</sub>	Gel de sílice
t	triplete
UV	Ultra violeta



# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Durante miles de años las plantas han sido la base de sofisticados sistemas de medicina tradicional y ahora los productos naturales aislados a partir de ellas, son investigados como compuestos bioactivos. Estos estudios han confirmado la importancia de muchas especies vegetales como fuente importante de nuevos metabolitos con actividad antiparasitaria. Sin embargo, y aunque existe un número importante de productos naturales que han demostrado potencial como agentes antiparasitarios, la mayoría de ellos no llenan todos los requerimientos considerados esenciales para su comercialización: ser administrados tópicamente u oralmente, ser efectivos a dosis moderadas y no causar efectos adversos, no obstante, y aun teniendo en cuenta estos problemas, los metabolitos naturales, juegan un papel importante en el desarrollo de una nueva generación de fármacos antiparasitarios.<sup>1</sup>

Las enfermedades infecciosas tropicales constituyen un problema, para un gran porcentaje de seres humanos que habitan las zonas tropicales de nuestro planeta, se evidencia una urgente necesidad en la búsqueda de alternativas terapéuticas de nuevas moléculas seguras efectivas económicas y fáciles de administrar.<sup>2</sup>

El incremento de numerosos casos de enfermedades tropicales tales como la leishmaniasis y malaria en las regiones de Bolivia, nos lleva a la necesidad del descubrimiento de agentes terapéuticos para el tratamiento de estas enfermedades.<sup>3</sup>

En relación a la quimioterapia, las drogas actualmente recomendadas para el tratamiento contra la leishmaniasis (cutánea, mucocutánea y visceral) incluyen los derivados pentavalentes de antimonio, glucantime, pentostam, ketoconazol, algunos derivados imidazólicos, anfotericina B, sulfato de aminosidina,

<sup>1</sup> Osorio E. J.; Montoya, G. L.; Arango, G. J. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. **2006**, 13, 1, 61-84.

<sup>2</sup> Nwaka, S.; Hudson, A. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2006**, 5, 941-955.

<sup>3</sup> Torrez, J. Dirección de Control y Prevención de Enfermedades. Programa Nacional de Leishmaniasis. **2005**. Ministerio de Salud y Deporte.

pentamidina y miltefosina. Por otra parte para el tratamiento de la malaria se utilizan la quinina y sus derivados sintéticos mefloquina y cloroquina, primaquina, pirimetamina, atovaquona, artemisinina y sus derivados artemeter y artesunato. No obstante, debido a las variaciones en cuanto a eficacia dependiendo de las especies implicadas y la variedad de especies circulantes, se necesitan muchos más estudios, además las drogas específicas presentan serios efectos secundarios incluyendo toxicidad cardiaca, hepática y renal.<sup>4</sup>

Bolivia cuenta con una amplia variedad de especies vegetales con propiedades medicinales, tal es así que el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), desde 1993 esta trabajando en la evaluación biológica de plantas medicinales listadas en Farmacopeas Tradicionales a través de proyectos multidisciplinarios, de las cuales las especies *Galipea longiflora* (Evanta) y *Bowdichia virgilioides* (Chiriguano), han sido seleccionadas por sus propiedades antiparasitaria de entre más de 800 extractos. El IIFB ha desarrollado formulaciones farmacéuticas tópicas, a base de los alcaloides totales de corteza de Evanta y como parte de un grupo multidisciplinario, va realizando los estudios clínicos de Fase I y II.<sup>5</sup>

La presente memoria consta de dos partes. La primera se ha realizado el estudio químico de la corteza de *Galipea longiflora* colectada en diferentes zonas [Santa Rosa de Maravilla (**SR**), Hernández (**HE**), Y-Abanico (**YA**), Covendo (**CO**), Luz Porvenir (**PO**)] y de plantines de diferentes tamaños (14 cm, 19 cm, 30 cm y 51 cm), recolectadas en el departamento de La Paz, Bolivia.

Las plantas secas y pulverizadas fueron llevadas a maceración con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, obteniéndose los extractos crudos de cortezas (de las diferentes zonas y tamaños), posterior extracción ácido-base nos permitió aislar los alcaloides totales (CAT), los cuales posteriormente fueron sometidos a sucesivas cromatografías aislándose alcaloides quinolínicos, la estructura de los mismos se determinaron a

<sup>4</sup> Croft, S. L.; Coombs, G. H. *Trends Parasitol.* **2003**, 19, 11, 502-508.

<sup>5</sup> Giménez, A.; Avila, J.; Ruiz, G.; Paz, M.; Udaeta, E.; Ticona, J.; Salamanca, E.; Paredes, C.; Rodríguez, N.; Quints, K.; Feraudy, C.; Gutierrez, I.; Chuqui, R.; Quenevo, C.; Dalence, M.; Bascope, M. *Revista Boliviana de Química*, **2005**, 1, 22, 94-107.

través de sus datos espectrométricos (EM de baja y alta resolución) y espectroscópicos (RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT) y experimentos homonucleares (COSY, ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC).

Primero se ha estandarizado el método de extracción de los alcaloides totales a escala piloto. En las diferentes muestras de corteza de árboles de *G. longiflora* fueron identificados siete alcaloides quinolínicos: 2-fenilquinolina, 2-*n*-pentil-quinolina, 2-fenil-4-metoxi-quinolina, 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina, 2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina, shiquimianina y evolitrina,

En la corteza de plantines de **14 cm**, **19 cm** y **51 cm** de tamaño se identificaron los compuestos: 2-fenilquinolina, y 2-fenil-4-metoxi-quinolina, en plantines de **19 cm** y **30 cm** el compuesto shiquimianina. En los plantines de **30 cm** se identificaron los mismos alcaloides aislados en la corteza de los árboles, con la excepción del compuesto evolitrina.

Por otra parte, se elaboraron jarabes de alcaloides totales de corteza a concentraciones de 1%, 2% y 5%, para ser empleados en los estudios pre-clínicos del tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Por otra parte se ha realizado el estudio de las hojas de *Bowdichia virgilioides*, colectadas en el departamento de La Paz, Bolivia, fueron llevados a maceración con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , el extracto orgánico fue sometido diferentes técnicas cromatográficas. Las estructuras químicas de los metabolitos aislados se determinaron a través de sus datos espectrométricos y espectroscópicos, habiéndose identificado cinco metabolitos: dos de la serie del lupano: el lupeol y lupenona; dos de la serie esteroides:  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol y uno de la serie oleano:  $\beta$ -amirina.



## OBJETIVOS

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Realizar el estudio químico de dos plantas bolivianas de la Etnia Tacana: *Galipea longiflora* y *Bowdichia virgilioides*

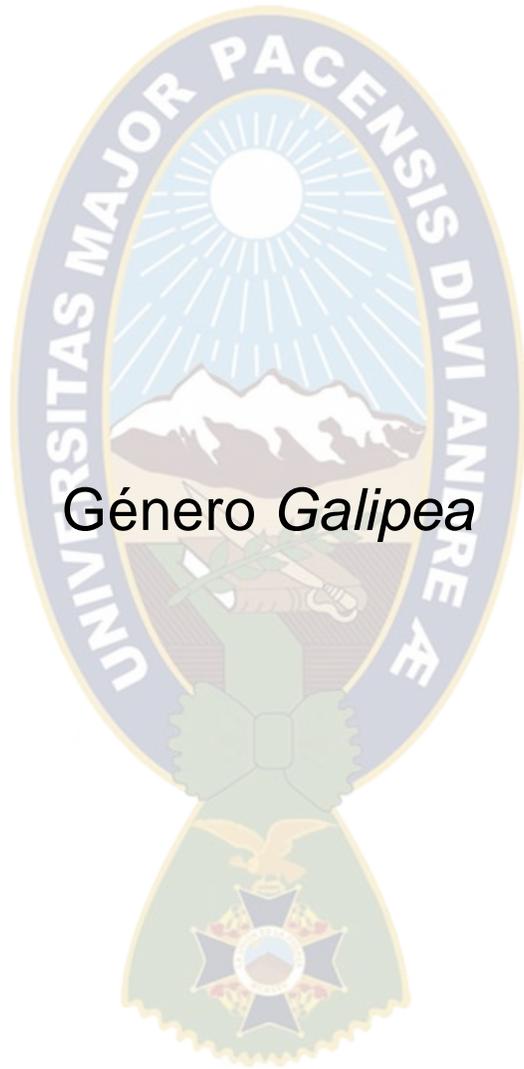
### Objetivos específicos

1. Realizar la recolección, secado y tamizaje de corteza de *Galipea longiflora* y hojas de *Bowdichia virgilioides*.
2. Obtener a escala piloto el extracto de alcaloides totales de corteza de *G. longiflora*.
3. Obtener alcaloides totales de la corteza de *G. longiflora* recolectadas en las zonas de Santa Rosa de Maravilla, Hernández, Covendo, Y-abanico y Luz Porvenir.
4. Obtener alcaloides totales de la corteza de plantines de 14 cm, 19 cm, 30 cm, 51 cm de tamaño de *G. longiflora* recolectadas en las zonas de Santa Rosa de Maravilla.
5. Aislamiento y elucidación estructural de alcaloides presentes en los extractos.
6. Identificar y comparar los alcaloides quinolínicos presentes en las cortezas recolectadas en diferentes zonas de *G. longiflora*.
7. Identificar y comparar los alcaloides quinolínicos presentes en las cortezas de plantines de diversos tamaños de *G. longiflora*.
8. Elaborar formulaciones orales con los alcaloides totales de *G. longiflora*.
9. Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Bowdichia virgilioides*.



PRIMERA PARTE:

*Estudios de Galipea longiflora*



Género *Galipea*

## Género *Galipea*

El género *Galipea* cuenta con unas treinta especies aproximadamente distribuidas desde Panamá, Guatemala, Nicaragua, Cuba, Perú, Venezuela y el Sur de Brasil.<sup>1</sup> En Bolivia la especie *Galipea longiflora* (K. Krause) se distribuye en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos del departamento de Beni y La Paz, figura N°1.<sup>2</sup>

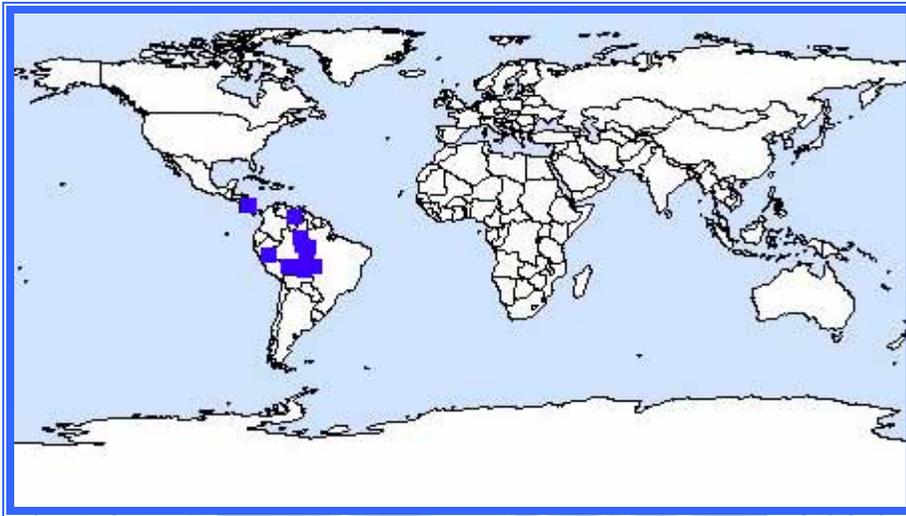


Figura N°1. Distribución mundial del género *Galipea*.<sup>1</sup>

Es un árbol de una altura de hasta 12 metros, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama, con un pecíolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos, zigomorfas más o menos vistosas en los meses de mayo a junio, los frutos se observan en los meses de junio a julio.<sup>3</sup>

En Bolivia en la Etnia Tacana *Galipea longiflora* es conocida como *Evanta* o *Yuruma huana epuna*, su corteza es empleada para el tratamiento de la leishmaniasis, la cual se pulveriza y el polvo se aplica como cataplasma en la úlcera, cambiándola dos veces al día hasta que sane la herida. Para un mejor efecto, se recomienda tomar sancochado de pedazos de corteza en agua,

<sup>1</sup> [www.Missouribotanicalgarden.com](http://www.Missouribotanicalgarden.com). Fecha de acceso julio 2007.

<sup>2</sup> [www.Zipcodezoo.com/Plants/G/Galipea\\_longiflora.asp](http://www.Zipcodezoo.com/Plants/G/Galipea_longiflora.asp). Fecha de acceso julio 2007.

<sup>3</sup> Killen, T.J.; García, E.; Beck, S. *Guía de árboles de Bolivia*. Quipus S.R.L. La Paz-Bolivia, 1993. 709-710.

tomando dos veces al día, durante tres días consecutivos. Es utilizada también para diarreas causadas por parásitos intestinales, enflaquecimiento, debilidad en niños y como fortificante para adultos, figura N°2.<sup>4</sup>



Figura N°2. *Galipea longiflora*.

### Clasificación taxonómica<sup>1,2</sup>

**Dominio:** *Eucariota*  
**Reino:** *Plantae*  
**Subreino:** *Viridaeplantae*  
**Phylum:** *Tracheofita*  
**Subphylum:** *Spermatofitina*  
**Infraphylum:** *Angiospermae*  
**Clase:** *Magnoliopsida*  
**Subclase:** *Rosidae*  
**Superorden:** *Rutanae*  
**Orden:** *Rutales*  
**Suborden:** *Rutineae*  
**Familia:** *Rutaceae*  
**Genero:** *Galipea*  
**Especie:** *G. longiflora*  
**Sinónimo:** *Angostura longiflora* (K.Krause) J. A. Kallunki

<sup>4</sup> Bourdy, G.; Giménez, A.; Quenevo, C. "Tacana: Ecuánasha aquí, ecuanasha id'rene cuana, me schanapaque" (Tacana: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas). Editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD. Plural, La Paz, Bolivia, 1999, 411-416.

## Estudios químicos y biológicos del género *Galipea*

Tres especies, *G. longiflora*,<sup>5</sup> *Galipea officinalis*<sup>6</sup> y *G. bracteata*<sup>7</sup> fueron estudiadas químicamente y caracterizadas por su alto contenido de alcaloides quinolínicos.

De corteza del tronco, corteza de raíz y hojas de *Galipea longiflora* se aislaron alcaloides 2-aril y 2-alkil quinolínicos, identificándose 13 componentes activos, tabla N°1.<sup>8</sup>

**Tabla N°1.** Rendimientos y actividad leishmanicida *in vitro* de alcaloides quinolínicos aislados de la corteza del tronco, hojas y corteza de raíz de *Galipea longiflora*.

Productos	Corteza %	Hojas %	Raíz %	CI <sub>90</sub> (µg/mL)
2-fenilquinolina (1)	47.7	29	66.7	100 <sup>a,b,c</sup>
2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)	2.8		3.3	50 <sup>a,b,c</sup>
2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-quinolina (3)	10.2		6.7	100 <sup>a,b,c</sup>
2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina (4)	1.1			100 <sup>a,b,c</sup>
2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-4-metoxi-quinolina (cusparina) (5)	3.1		2	100 <sup>a,b,c</sup>
2- <i>n</i> -pentil-4-metoxi-quinolina (6)	1			100 <sup>a,b,c</sup>
2- <i>n</i> -pentilquinolina (7)	2.4		17.3	100 <sup>a,b,c</sup>
2- <i>n</i> -propilquinolina (8)	1.3	12.5		50 <sup>a,b,c</sup>
2- <i>n</i> -propil-4-metoxi-quinolina (Chimanina A) (9)	2.4			100 <sup>a,b,c</sup>
2-( <i>E</i> )-prop-1'-enilquinolina (Chimanina B) (10)		16.7		25 <sup>a,b,c</sup>
2-( <i>E</i> )-prop-1'-enil-4-metoxi-quinolina (Chimanina C) (11)		0.5		-----
2-(1', 2'- <i>trans</i> -epoxipropil)-quinolina (Chimanina D) (12)		1.7		25 <sup>a,b,c</sup>
Shiquimianina (13)		1.7	4	100 <sup>a,b,c</sup>

a) *L. braziliensis* (2903); b) *L. amazonensis* (PH8) y (H-142); c) *L. donovani* (2682) y (HS-70).

Los alcaloides chimanina B (10) y chimanina D (12) aislados de hojas mostraron actividad leishmanicida *in vitro* contra cepas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* en sus formas promastigotes con valores de CI<sub>90</sub> = 25 µg/mL. El compuesto 2-*n*-propilquinolina (8) aislado de hojas y corteza, y el 2-

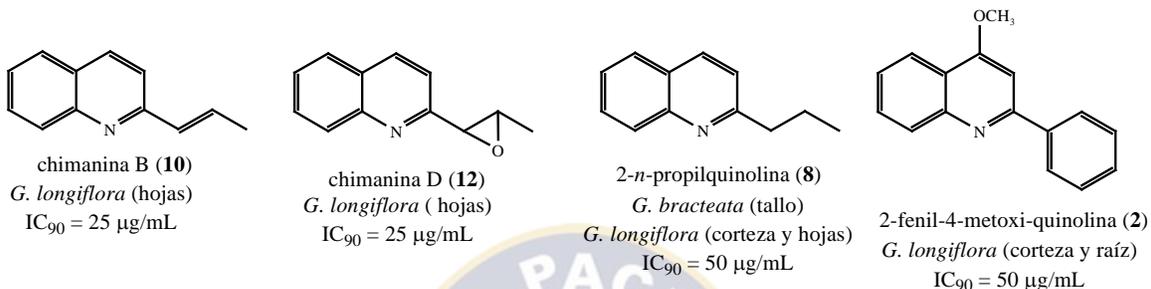
<sup>5</sup> Fournet, A.; Vagneur, B.; Richomme, P.; Bruneton, J. *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 2116-2118.

<sup>6</sup> Rakotoson, J.H.; Fabre, N.; Jacquemond-Collet, I.; Hannedouche, S.; Fourasté, I.; Moulis, C. *Planta Med.* **1998**, 64, 762-763.

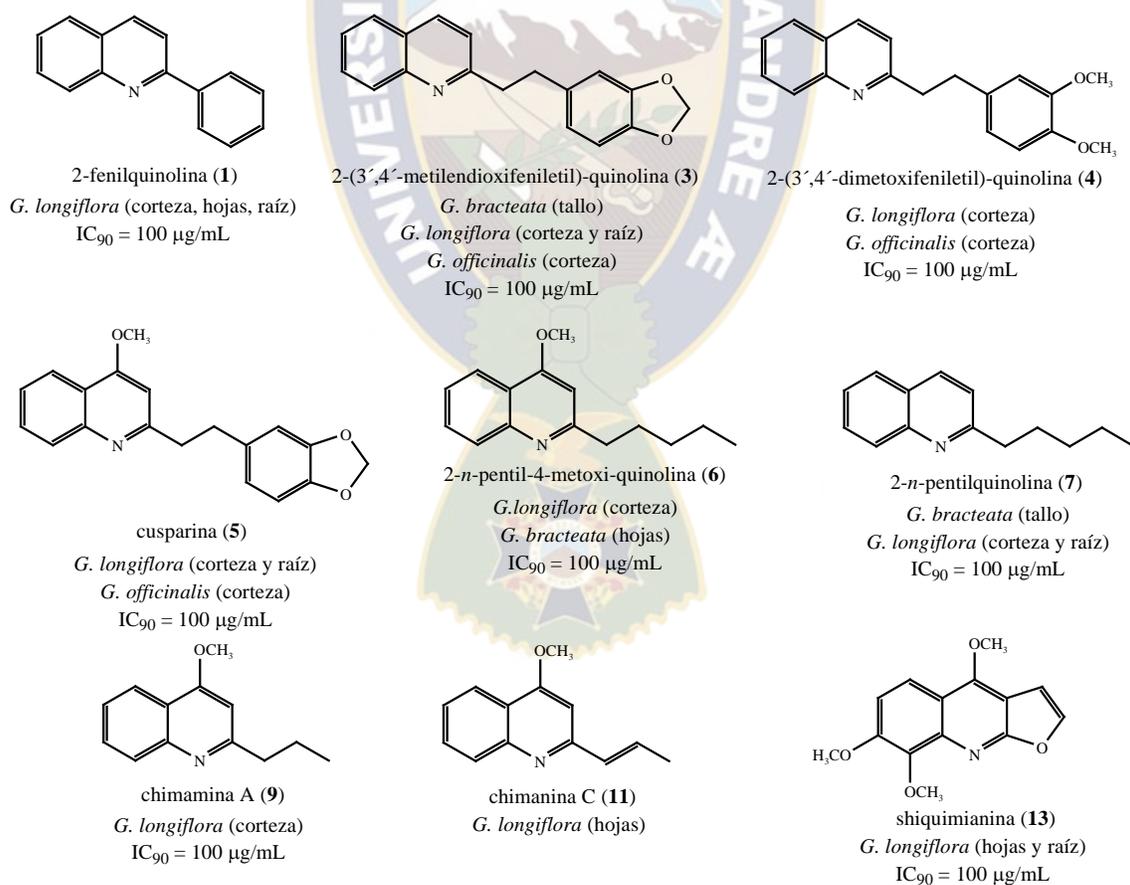
<sup>7</sup> Cheng, M.-J.; Lee, K.-H.; Tsai, I.-L.; Chen, I.-S. *Biorganic Medicinal Chemistry.* **2005**, 13, 5915-5920.

<sup>8</sup> Fournet, A.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cavé, A.; Richomme, P.; Bruneton, J. *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 9, 1547-1552.

fenil-4-metoxi-quinolina (2) aislado de corteza y raíces fueron menos activos con una  $CI_{90} = 50 \mu\text{g/mL}$ .<sup>8,9</sup>



Los compuestos 2-fenilquinolina (1), 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (3), 2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina (4), cusparina (5), 2-*n*-pentil-4-metoxi-quinolina (6), 2-*n*-pentilquinolina (7), chimanina A (9), chimanina C (11), y shiquimianina (13) mostraron actividad leishmanicida con un  $CI_{90} = 100 \mu\text{g/mL}$ .<sup>8,9</sup>



<sup>9</sup> Caron, S.; Desfossés, S.; Dionea, R.; Théberge, N.; Burnell, R. *Journal of Natural Products*. 1993, 56, 1, 138-139.

Las Chimaninas A (9), B (10), C (11), y D (12), aisladas de las hojas de *G. longiflora* demostraron eficacia y baja toxicidad en modelos *in vivo*, por lo que fueron patentados (US4209519/15/04/93).<sup>10</sup>

Los alcaloides quinolínicos chimanina B (10), chimanina D (12) y 2-*n*-propilquinolina (8) fueron activos *in vitro* contra varias cepas de *T. cruzi* (CI<sub>50</sub> = 25-50 µg/mL).<sup>11,12</sup> Así mismo el compuesto 2-*n*-pentilquinolina (7), mostró actividad antiplásmoica *in vivo* en ratones infectados con *Plasmodium vinckei petteri* a una dosis de 50 mg/Kg.<sup>13</sup>

Lesiones cutáneas en patas de ratones causadas por *Leishmania amazonensis* y *Leishmania venezuelensis*, fueron tratados con 2-*n*-propilquinolina (8) por vía oral durante dos semanas a una dosis de 100 mg/Kg/día, mostrando la misma eficacia que la droga de referencia, Glucantime®, (200 mg/Kg/día); observándose una reducción en el tamaño de la lesión y en el número de parásitos. Siguiendo el mismo protocolo, el compuesto chimanina D (12) mostró ser un poco menos activo que el Glucantime®.<sup>14</sup>

En otro estudio se administraron por vía oral 2-*n*-propilquinolina (8) y chimanina D (12) en ratones infectados con *Leishmania donovani*, a una dosis de 50 mg/Kg/día durante cinco días, los que mostraron una leve reducción en la cantidad de parásitos de 87.8% y 72.9% respectivamente. El mismo tratamiento con 2-*n*-propilquinolina (8) (0.54 mmol/Kg) durante diez días, suprimió un 99.9% la presencia de parásitos.<sup>15</sup> El tratamiento con chimanina B (10) a una dosis de 50 mg/Kg/día por vía oral e intralesional durante cuatro a seis semanas pos-

<sup>10</sup> <http://www.Patentes.ibm/cgi.bin/viewpat.cmd>. Fecha visitada marzo 2008.

<sup>11</sup> Fournet, A.; Barrios, A. A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cavé, A.; Richomme, P.; Bruneton, J. *Phytotherapy Research*. **1994**, 8, 174-178.

<sup>12</sup> Nayama, H.; Ferreira, M. E.; Rojas, A.; Vera, N.; Torres, S.; Schinini, A.; Fournet, A. *Phytotherapy Research*. **2001**, 15, 630-632

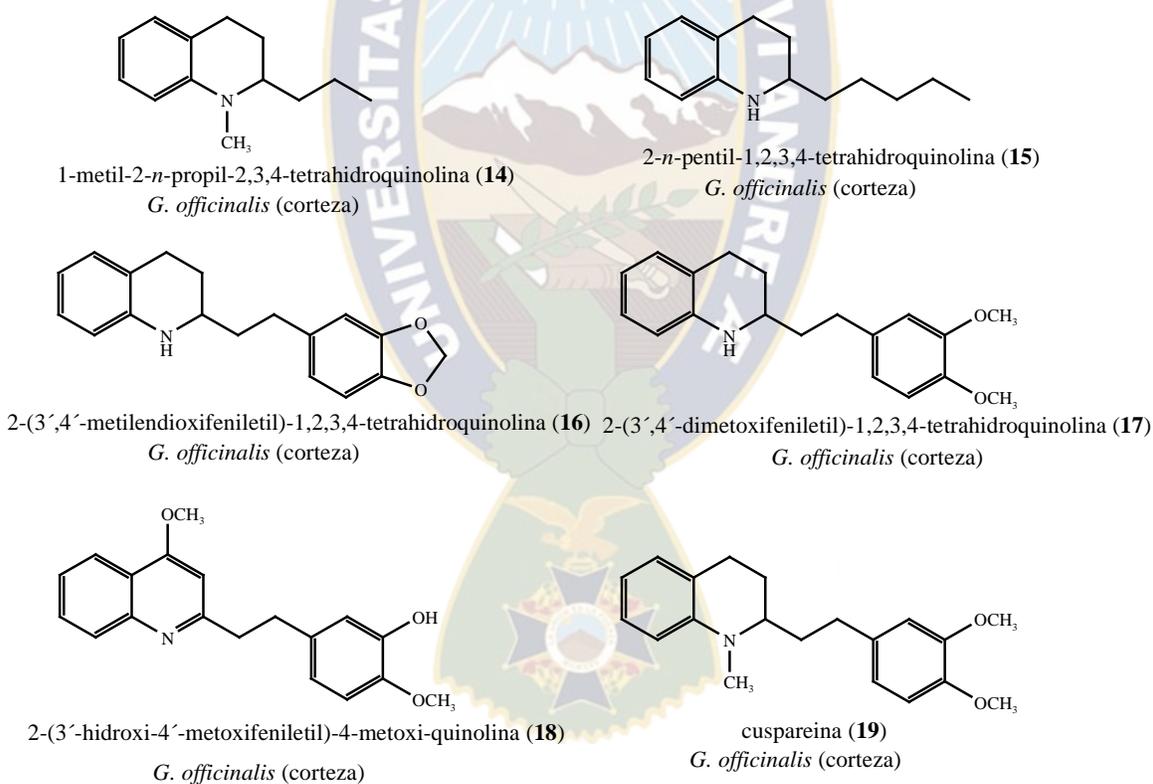
<sup>13</sup> Gantier, J.C.; Fournet, A.; Munos, M. H.; Hocquemiller, R. *Planta Med.* **1996**, 62, 285-286.

<sup>14</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Cavé, A.; Bruneton, J. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1993**, 37, 4, 859-863.

<sup>15</sup> Fournet, A.; Gantier, J.C.; Gautheret, A.; Leysalles, L.; Munos, M. H.; Mayrargue, J.; Moskowitz, H.; Cavé, A.; Hocquemiller, R. *J. Antimicrob. Chemother.* **1994**, 33, 537-544.

infección en ratones infectados con *Leishmania amazonensis* y *Leishmania venezuelensis*, redujo el número de parásitos en 95% y 70% respectivamente.<sup>16</sup>

Según los conocimientos de la medicina tradicional venezolana la corteza de la especie *Galipea officinalis* es utilizada para el tratamiento de la dispepsia, disentería, diarreas crónicas y fiebre.<sup>17</sup> Estudios químicos realizados de la corteza de esta especie, han aislado e identificado los compuestos 1-metil-2-*n*-propil-2,3,4-tetrahydroquinolina (**14**), 2-*n*-pentil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina (**15**), 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolina (**16**), 2-(3',4'-dimetoxifeniletíl) 1,2,3,4-tetrahydroquinolina (**17**), 2-(3'-hidroxi-4'-metoxifeniletíl)-4-metoxiquinolona (**18**), cuspareína (**19**).

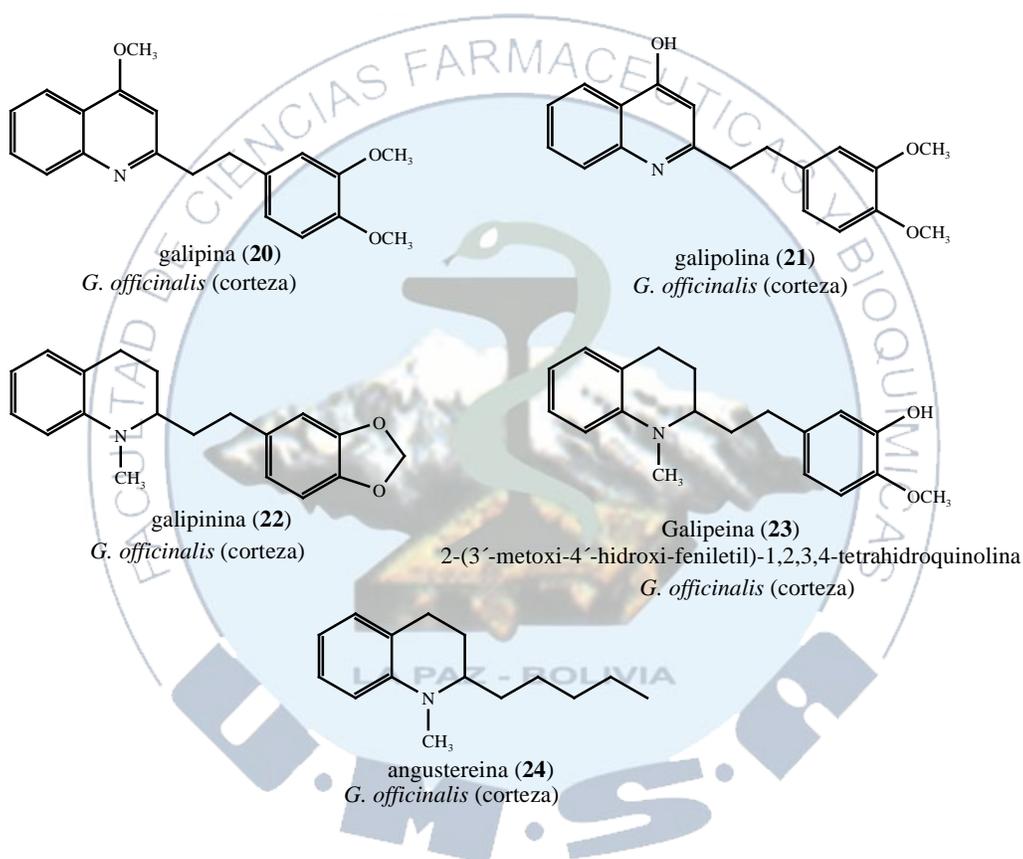


Los compuestos cusparina (**5**), galipina (**20**) y galipolina (**21**), mostraron una notable actividad simpático-mimética y efectos estimulantes a nivel del

<sup>16</sup> Fournet, A.; Ferreira, M. E. Rojas, A.; Torres, S.; Fuentes, S.; Nakayama, H.; Schinini, A.; Hocquemiller, R. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **1996**, 40, 11, 2447-2451.

<sup>17</sup> Mester, I. *Fitoterapia*. **1973**, 44, 123-152.

sistema respiratorio,<sup>18</sup> así mismo se aislaron los alcaloides galipinina (**22**),<sup>6</sup> galipeina (**23**) y angustereina (**24**),<sup>19,20</sup> de los cuales el alcaloide **22**<sup>21</sup> demostró una potente actividad frente a *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente con una  $CI_{50} = 0.9 \mu\text{g/mL}$ . En estudios realizados frente a líneas celulares HeLa el extracto crudo y compuestos puros, mostraron actividad citotóxica con una  $CI_{50}$  entre  $5.8\text{-}50 \mu\text{g/mL}$ .<sup>22</sup> En otro estudio el extracto etanólico de la corteza mostró actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>23</sup>



En otros estudios los alcaloides quinolínicos: 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**3**), 2-*n*-pentilquinolina (**7**) y 2-(1'-pentenil)-quinolina (**25**) mostraron

<sup>18</sup> Bidet, L.; Strumza, M. V. *Therapie*. **1953**, 8, 669-674.

<sup>19</sup> Jacquemond-Collet, I.; Hannedouche, S.; Fabre, N.; Fourasté, I. Moulis, C. *Phytochemistry*. **1999**, 51, 1167-1169.

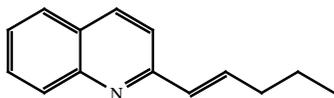
<sup>20</sup> Theeraladanon, Ch.; Arisawa, M. Nakagawa, M.; Nishida A. *Tetrahedron : Asymetry*. **2005**, 16, 827-831.

<sup>21</sup> Jacquemond-Collet, I.; Bessiére, J. M.; Hannedouche, S.; Bertrand, C.; Fourasté, I.; Moulis, C. *Phytochemical Análisis*. **2001**, 12, 312-319.

<sup>22</sup> Jacquemond-Collet, I.; Benoit-Vical, F.; Mustofa; Valentin, A.; Stanislas, E. Mallie, M.; Fouraste, I. *Planta Med*. **2002**, 68, 1, 68-69.

<sup>23</sup> Houghton, P.J.; Woldemariam, T. Z.; Watanabe, Y.; Yates, M. *Planta Medica*. **1999**, 65, 3, 250-254.

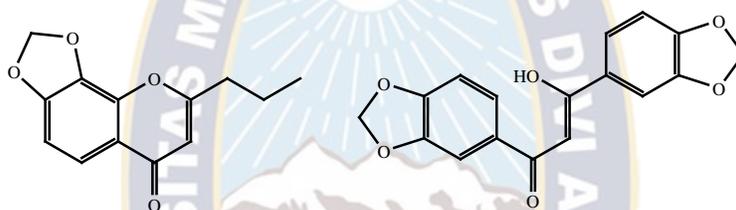
actividad moluscicida contra *biomphalaria glabrata*, transmisor de la esquistosomiasis.<sup>24</sup>



2-(1'-pentenil)-quinolina (25)

*G. bracteata* (tallo)

Los compuestos granulosina (26) y galiposina (27)<sup>25</sup> fueron aislados de la corteza de *Galipea granulosa*, el compuesto 26<sup>26</sup> y cuatro análogos mostraron toxicidad frente a *Artemia salina* a una concentración de 30 ppm.<sup>27</sup>



granulosina (26)

*G. granulosa* (corteza)

galiposina (27)

*G. granulosa* (corteza)

El compuesto cusparina (5) aislado de la corteza de *G. longiflora* y *G. officinalis*, en estudios *in vivo* mostró incrementos de la sensibilidad en el sistema nervioso simpático.<sup>28</sup> Del tallo y corteza de raíz de *Galipea trifoliata* fueron identificados tetrahydroquinolinas, cumarinas y flavonoides.<sup>29,30</sup>

También fueron aislados alcaloides furanoquinolínicos como shiquimianina (13), evolitrina (28) de *G. longiflora* y maculosidina (29) de *G. officinalis*.<sup>31</sup> Se evaluaron la inhibición del proceso de replicación del VIH en células de linfocitos H9, donde shiquimianina (13) mostró una  $CI_{50} = 22.5 \mu\text{g/mL}$

<sup>24</sup> Vieira, P. C.; Kubo, I. *Phytochemistry*, **1990**, 29, 3, 813-815.

<sup>25</sup> López, J. A.; Barillas, W.; Gomez-Laurito, J.; Martin, G. E.; Lin, F.; Al-Rehaily, A. J.; Zemaitis, M. A.; Schiff, P. L. *Planta Medica*. **1998**, 64, 1, 76-77.

<sup>26</sup> López, J. A.; Barillas, W.; Gomez-Laurito, J.; Martin, G. E.; Al-Rehaily, A. J.; Zemaitis, M. A.; Schiff, P. L. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 24-26.

<sup>27</sup> Kaye, P. T.; Nchinda, A. T.; Gray, C. A. *Journal of Chemical Research, Synopses*. **2002**, 7, 321-325.

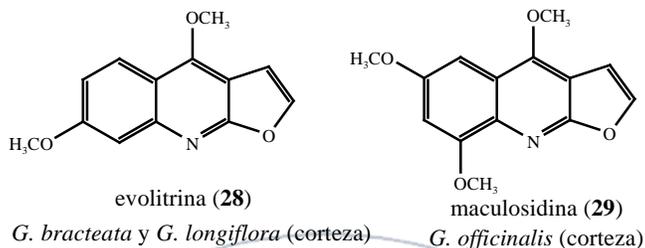
<sup>28</sup> Raymond-Hamet. *Compt. Rend.* **1944**. 218, 727-729.

<sup>29</sup> Wirasutisna, K. R.; Gleye, J.; Moulis, C.; Stanislas, E.; Moretti, C. *Phytochemistry*. **1987**, 26, 12, 3372.

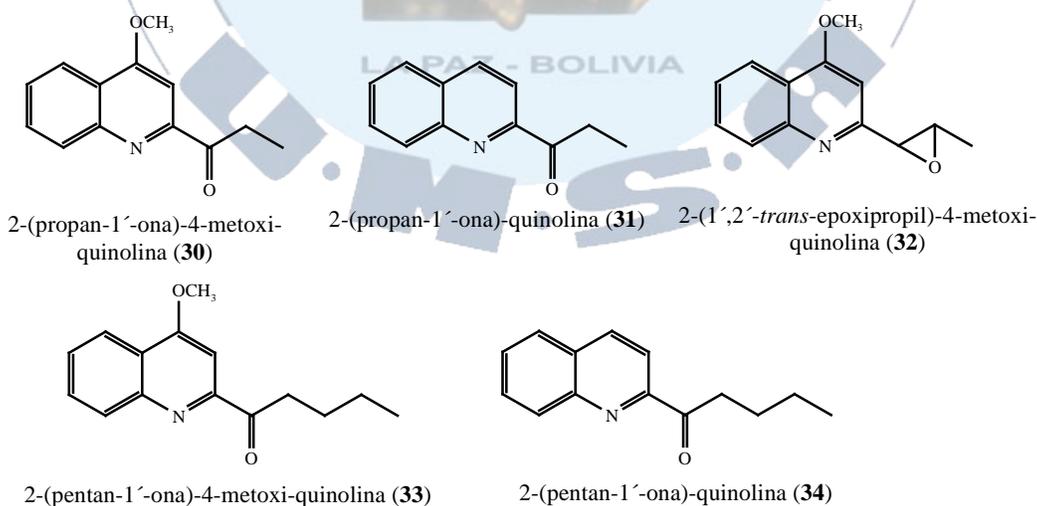
<sup>30</sup> Bakhtiar, A.; Gleye, J.; Moulis, C.; Fouraste, I.; Stanislas, E. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 4, 1339-1340.

<sup>31</sup> Jacquemond-Collet, I.; Bessiére, J-M.; Hannedouche, S.; Bertrand, C.; Fourasté, I.; Moulis, C. *Phytochemical Analysis*. **2001**, 12, 312-319.

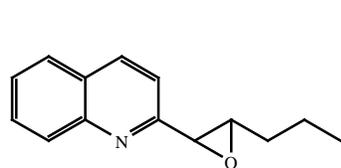
y un IT (índice terapéutico) de 3.04, estos resultados sugirieron que el metoxilo en la posición 8 del anillo furanoquinolínico es necesario para la actividad anti-VIH.<sup>7</sup>



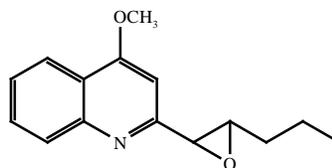
La actividad leishmanicida de los siguientes alcaloides quinolínicos como 2-(propan-1'-ona)-4-metoxi-quinolina (30), 2-(propan-1'-ona)-quinolina (31), 2-(1',2'-*trans*-epoxipropil)-4-metoxi-quinolina (32), 2-(pentan-1'-ona)-4-metoxi-quinolina (33), 2-(pentan-1'-ona)-quinolina (34), 2-(1',2'-*trans*-epoxipentil)-quinolina (35), 2-(1',2'-*trans*-epoxipentil)-4-metoxi-quinolina (36) y 2-n-heptil-4-metoxi-quinolina (37) aislados de las hojas de *G. bracteata* fueron evaluados a través de la enzima APRT (adenina fosforribosil transferasa) de *Leishmania tarantolae*, los cuales mostraron una inhibición enzimática entre 5.6 y 41.9% a concentraciones de 50 y 25 µg/mL.<sup>32</sup>



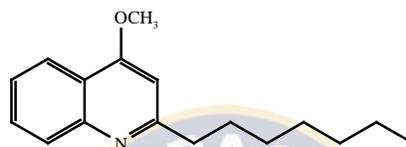
<sup>32</sup> Andrade, M.R. *Alcaloides de Rutaceae: Química y actividad biológica*, Tesis Doctoral. **2003**, 120-122.



2-(1',2'-*trans*-epoxipentil)-quinolina (35)

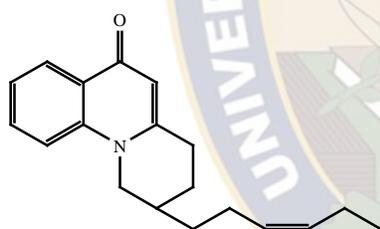


2-(1',2'-*trans*-epoxipentil)-4-metoxi-quinolina (36)

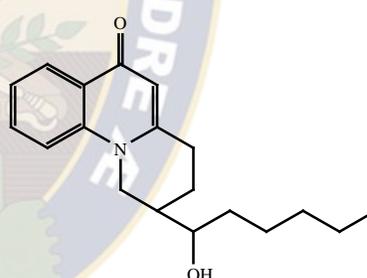


2-*n*-heptil-4-metoxi-quinolina (37)

Entre otro tipo de alcaloides con potente actividad leishmanicida podemos citar a dictiolomida A (38) y dictiolomida B (39) aisladas de *Dictyoloma peruviana*, los cuales producen un lisis total de promastigotes de *L. amazonensis* a 0.27  $\mu\text{M}$  y menor actividad en promastigotes de *L. braziliensis* a la misma concentración.<sup>33</sup>



dictiolomida A (38)



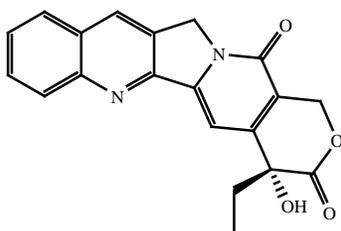
dictiolomida B (39)

De las hojas de *Teclea trichocarpa* (Rutaceae), fueron aislados alcaloides quinolínicos de tipo acridina.<sup>34</sup> Camptotecina (40), alcaloide quinolínico monoterpénico aislado a partir de las hojas de *Camptotheca acuminata* (Nissaceae), mostró resultados promisorios contra los parásitos de *Trypanosoma* y *Leishmania* cuando fue evaluado a 1.5 – 3.2  $\mu\text{M}$ .<sup>35</sup>

<sup>33</sup> Lavaud, C.; Massiot, G.; Vasquez, C.; Moretti, C.; Sauvain, M.; Balderrama, L. *Phytochemistry*. **1995**, 40, 1, 317-320.

<sup>34</sup> Muriithi, M. W.; Abraham, W. R.; Addae-Kyereme, J. *Journal Natural Products*. **2002**, 65, 7, 956-959.

<sup>35</sup> Bodley, A.L.; Shapiro, T. A. *Products Natural Academy Scientific USA*. **1995**, 92, 9, 3726-3730.



camptotecina (40)

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), a partir del año 1993 ha desarrollado estudios comprendidos desde el aislamiento y caracterización de alcaloides quinolínicos, de corteza y hojas de *G. longiflora*, todos con actividad leishmanicida evaluadas sobre promastigotes de: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. chagasi*, así mismo mediante modelos tóxico-cinéticos, se determinaron la toxicidad aguda, subcrónica y parámetros farmacocinéticos para el extracto crudo en modelos murino; sobre la base de los antecedentes descritos, en el IIFB ha desarrollado formulaciones farmacéuticas tópicas,<sup>36</sup> a base de los alcaloides totales de corteza de Evanta (*Galipea longiflora*), para iniciar los estudios clínicos de Fases I y II. Dada la importancia de esta especie medicinal, en el desarrollo de tratamientos alternativos para la leishmaniasis, se ha establecido un sistema de cultivo celular semi-continuo *in vitro*, de células de Evanta, destinados al estudio de la producción de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida, bajo condiciones controladas.<sup>37</sup>

<sup>36</sup> Rodríguez, B. A. *Estudio de preformulación en una forma farmacéutica semisólida de uso tópico para el extracto orgánico y concentrado de alcaloides totales de la especie Galipea longiflora Evanta*. Tesis de Maestría. **2006**. 29-81.

<sup>37</sup> Paz, M.; Vasquez, F.; Chuqui, R.; Paredes, C.; Sauvain, M.; Giménez, A. *Lat. Am. J. Pharm.* **2007**, 26, 1, 15-19.

## Alcaloides

Los alcaloides poseen una diversidad estructural y exhiben una gamma de actividades biológicas como ningún otro grupo de productos naturales. Aunque muchos de los alcaloides clásicos fueron aislados y caracterizados hace muchas décadas, se siguen extrayendo y aislando continuamente nuevos compuestos de esta naturaleza. Hoy en día se conocen alrededor de doce mil estructuras y como promedio se describe en la bibliografía un nuevo alcaloide cada día. Se encuentran sobre todo en las plantas, aunque también se han aislado en menor extensión en microorganismos y animales.<sup>38</sup>

De los miles de alcaloides conocidos la mayoría está presente en las plantas y se calcula que el 40% de todas las familias de plantas tienen al menos una especie que contiene alcaloides, siendo importante su contenido en las Leguminosas, Solanáceas y las Rutáceas, pero poco frecuentes en las Gimnospermas, los Helechos y las Monocotiledoneas.<sup>38</sup> Los alcaloides pueden estar presentes en toda la planta ó restringidos en ciertos tejidos, como la raíz o la corteza y su concentración pueden variar entre 0.1 y 12% del peso seco. Los alcaloides se acumulan principalmente en los tejidos de gran actividad (crecimiento), almacenándose frecuentemente en lugares distintos al de su biosíntesis. Cada especie adopta el sistema de biosíntesis a sus necesidades, dinámica que se manifiesta en las oscilaciones en el contenido de alcaloides a lo largo del día, siendo un buen ejemplo de ello las variaciones en la cantidad de morfina del látex de las cápsulas jóvenes de “la adormidera”, que por la mañana es mayor que en el resto del día. En cuanto a la función de los alcaloides en la planta, se cree que sirven de protección frente a herbívoros y al mismo tiempo como almacén de reserva de nitrógeno.<sup>38</sup>

Químicamente los alcaloides son compuestos nitrogenados con uno o más átomos de nitrógeno, que puede estar presente como amina primaria, secundaria o terciaria. Se clasifican de acuerdo a la naturaleza del tipo de

---

<sup>38</sup> Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin*. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden. 1999, 415-417.

nitrógeno presente en el anillo heterocíclico, como por ejemplo los derivados de pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol y estructuras en general, mientras que a medida que aumenta su complejidad, se incrementa el número de subdivisiones. El átomo de nitrógeno del aminoácido del cual proviene se mantiene intacto en la estructura del alcaloide, mientras que el carbono carboxílico frecuentemente se pierde por descarboxilación.<sup>39</sup>

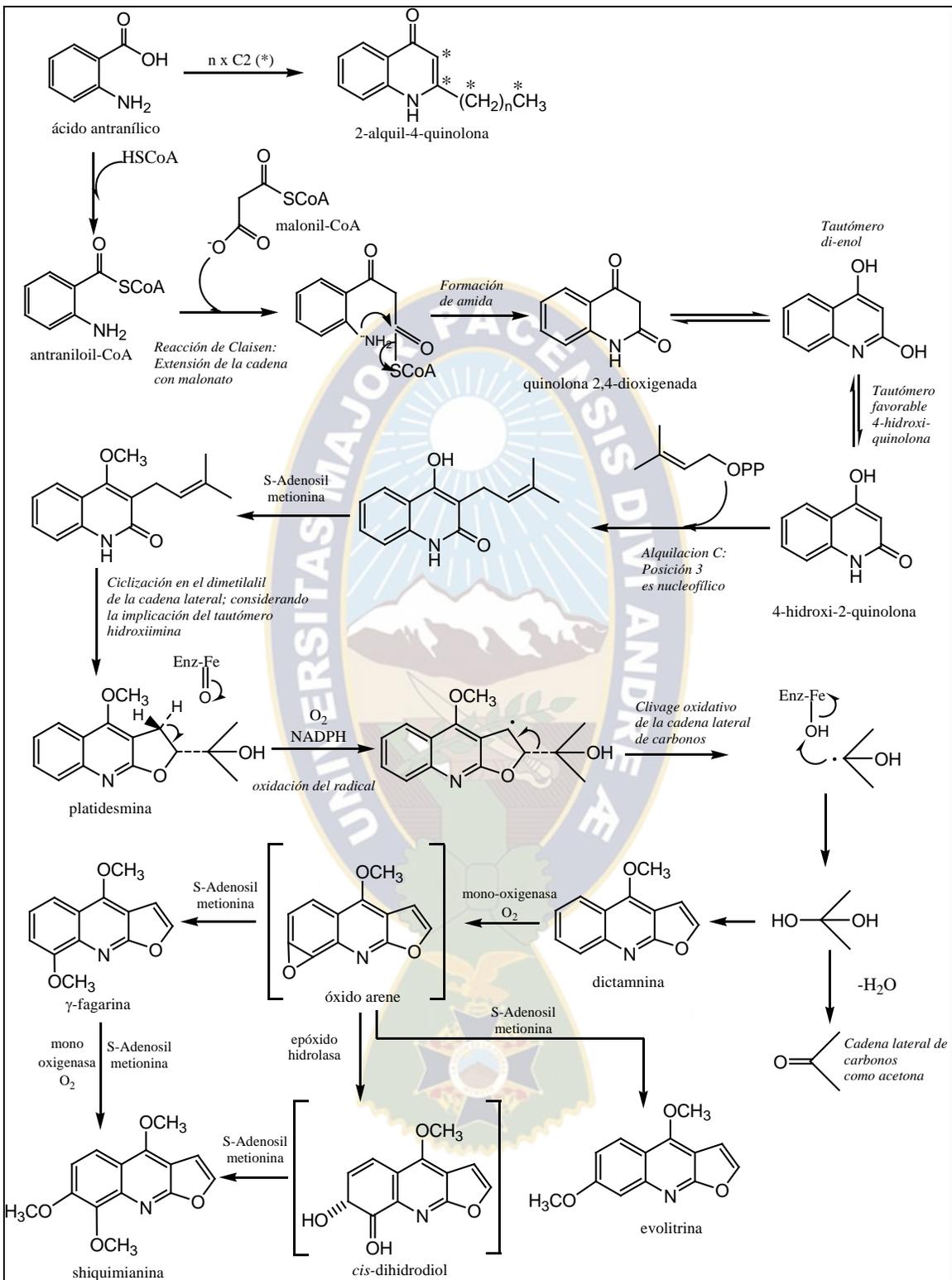
### Ruta de biogénesis de los alcaloides furanoquinolínicos

En la familia Rutaceae los alcaloides se encuentran clasificados según su origen biogénico: en derivados de fenilalanina/tirosina, derivados del triptófano, derivados del ácido antranílico, derivados de histidina y alcaloides de origen no definido. Por lo general la familia Rutaceae está caracterizada por la presencia de alcaloides derivados del ácido antranílico, que son considerados como marcadores quimiotaxonómicos.<sup>39</sup>

La ruta de biogénesis del anillo quinolínico comienza por la combinación del ácido antranílico y una o más unidades de acetato/malonato, así, el antraniloil-CoA actúa como el iniciador en la extensión de la cadena mediante una molécula de malonil-CoA, el cual da lugar a la formación de un sistema heterocíclico llamado 4-hidroxi-2-quinolona, siendo la forma más estable. Para simplificar el mecanismo de interpretación de estas reacciones, es conveniente considerar la forma di-enol del sistema quinolona. La posición 3 del compuesto 4-hidroxi-2-quinolona es altamente nucleofílica y susceptible de alquilación, posterior a la ciclización del dimetilalil por una serie de reacciones análogas, sus derivados actúan como precursores de alcaloides furanoquinolínicos como la dictamina y shiquimianina, estos alcaloides fueron encontrados en *Dictamnus albus* y *Skimmia japonica* (Rutaceae), esquema N°1.<sup>40,41</sup>

<sup>39</sup> Ambrozin, A., R. *Estudio Fitoquímico de plantas de familias Rutaceae y Meliaceae, aislamiento de sustancias prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos antichagásicos e antileishmaniosis*. Tesis Doctoral. **2004**. 84-85.

<sup>40</sup> Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, Ltd., Baffins Lane, Chichester, 2da. Ed. **2002**, 377-379.



**Esquema N°1.** Ruta biogénica de alcaloides furanoquinolínicos de Rutaceae.<sup>40,41</sup>

<sup>41</sup> Boyd, D.R.; Sharma, N.D. Dowd, C.R.; Carroll, J. G.; Loke, P.L.; Allen, C.C. *Royal Society of Chemistry*. **2005**, 3989-3991.

# Enfermedades parasitarias tropicales



## Enfermedades parasitarias tropicales

Dentro de las enfermedades infecciosas las enfermedades parasitarias continúan siendo el principal problema de salud pública, afectando a cientos de millones de personas, particularmente en países tropicales en desarrollo. Estudios recientes han indicado que las enfermedades tropicales corresponden al 10% de las enfermedades globales, así dentro de las 11 enfermedades tropicales consideradas altamente prioritarias por el programa de enfermedades tropicales (TDR) de la Organización mundial de la salud (OMS), siete son parasitarias.<sup>1</sup> La incidencia y mortalidad anual de las principales enfermedades parasitarias se detalla en la tabla N°2.

**Tabla N°2.** Incidencia y mortalidad anual de las principales enfermedades parasitarias.<sup>2</sup>

Enfermedad (parasito responsable)	Población en riesgo (millones)	Muertes en el 2002 (miles)	DALYs <sup>a</sup> 2002 (millones)
Malaria <i>Plasmodium spp</i>	>2.100	1.272	46.4
Leishmaniasis <i>Leishmania spp</i>	350	51	2.1
Tripanosomiasis Africana <i>Tripanosoma brucei</i>	>60	48	1.5
Enfermedad de Chagas <i>Tripanosoma cruzi</i>	120	14	0.7
Esquistosomiasis <i>Schistosoma spp</i>	600	15	1.7
Filariasis linfatica <i>Brugia Malawi</i>	1.000	0	5.8
Oncocercosis <i>Onchocerca volvulus</i>	120	0	0.5

<sup>a</sup>DALYs: Discapacidad y años de vida perdidos

El territorio boliviano está constituido por algo más del 70% de regiones tropicales, el que paulatinamente incrementa su población debido al fenómeno de migración de la población de regiones no infectadas, por factores socio-económicos y otros. Estas poblaciones no escapan a las endemias parasitarias del mundo tropical, entre ellas las tres grandes parasitosis que afecta a esta

<sup>1</sup> World Health Organization. World Health Report. 2004.

<sup>2</sup> Pink, R.; Hudson, A.; Mouriés, M. A.; Bending, M. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005, 4, 727-740

población son: la leishmaniasis, la malaria y la enfermedad de Chagas, que son causa frecuente de trastornos en la salud de la población llegando a índices preocupantes lo que conlleva a consecuencias sociales diversas.<sup>1</sup>

En la presente memoria se describirán dos de las siete enfermedades parasitarias, la leishmaniasis y malaria, a razón de que los metabolitos aislados de las especies *Galipea longiflora* y *Bowdichia virgilioides* presentan propiedades leishmanicidas y antiplasmódicas.





Leishmaniasis

## Leishmaniasis

La leishmaniasis se puede definir como un conjunto de enfermedades provocadas por la infección de diferentes especies de protozoos parásitos pertenecientes al género *Leishmania*. La epidemiología de la enfermedad es extremadamente diversa: unas 20 especies y subespecies de *Leishmania* son patogénicas para el hombre y unas 30 especies de mosquito pueden actuar como vectores, figura N°3 y 4.<sup>1</sup>



Figura N°3. *Phlebotomus*.



Figura N°4. *Leishmania donovani*.

La leishmaniasis se puede clasificar en cuatro tipos principales:<sup>1</sup>

**Leishmaniasis visceral (LV):** Es la forma más agresiva de leishmaniasis y mortal en unos meses, cuando no se trata. Involucra todo el sistema retículo-endotelial y se caracteriza por espasmos irregulares y fiebre, pérdida sustancial de peso, hepato y esplenomegalia y anemia. Después de una curación aparente pueden aparecer complicaciones cutáneas tardías, las dermatitis post-kala-azar, particularmente frecuentes en la India y en Sudán, figura N°5.

**Leishmaniasis cutánea (LC):** La forma más común. La incubación, de duración muy variable, a menudo es de uno a tres meses, tiempo al final del cual generalmente aparece en el punto de inoculación la lesión ulcerosa de 0.5 a 10 cm de diámetro, recubierta de una costra, con un borde saliente morado y escamoso, figura N°6.

<sup>1</sup> World Health Organization. [www.who.int/tdr/diseases/leishmaniasis/diseaseinfo.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/leishmaniasis/diseaseinfo.htm). Fecha de acceso diciembre 2007.

**Leishmaniasis mucocutánea (LMC):** También llamada espundia, es una afección de las selvas tropicales amazónicas. Al principio es exclusivamente cutánea (una o varias lesiones) y parece curar al cabo de algunos meses. Pero después de un tiempo, entre un 20 y 50% de los casos, según los focos, aparecen lesiones granulomatosas hemorrágicas en la mucosa nasal, luego bucal y rinofaríngea, evolucionando hacia una necrosis extendida y espantosas mutilaciones, figura N°7.



**Figura N°5.** Leishmaniasis visceral.



**Figura N°6.** Leishmaniasis cutánea.



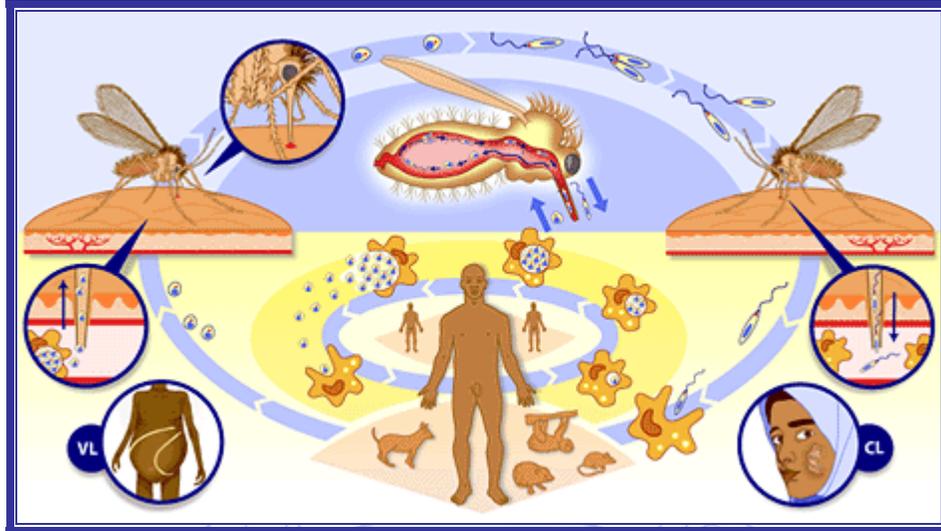
**Figura N°7.** Leishmaniasis mucocutánea.

**Leishmaniasis cutánea difusa (LCD):** Enfermedad difícil de tratar que se caracteriza por la aparición en todo el cuerpo de nódulos diseminados que se extienden poco a poco hasta llegar a ser confluentes. Se trata de una forma que corresponde con un estado de debilitamiento del paciente.

### **Ciclo biológico de *Leishmania***

Durante su ciclo biológico, los parásitos del género *Leishmania* existen en dos formas, según el hospedador en el que se encuentran:

- Forma promastigote, móvil, flagelada y extracelular que se encuentra en el vector.
- Forma amastigote, inmóvil, no flagelada, e intracelular, que se encuentra en el hombre y los mamíferos, figura N°8.



**Figura N°8.** Ciclo de biológico de *Leishmania*.

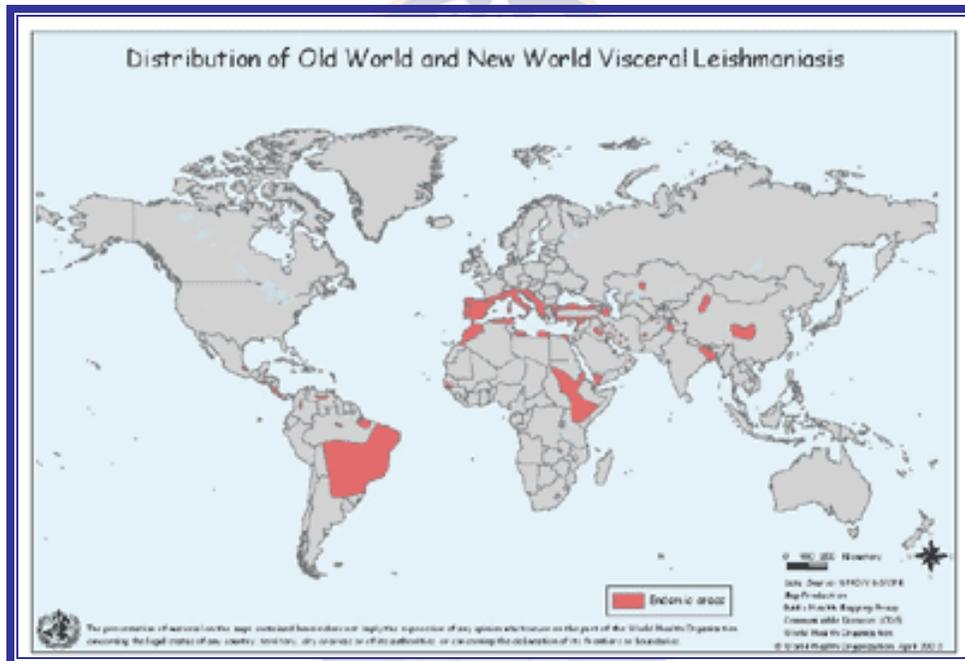
El ciclo comienza cuando un mosquito hembra infectado pica a un hospedador. Las formas promastigote del parásito entran en el hospedador a través de la probóscide, junto con la saliva anticoagulante del mosquito. Una vez dentro del hospedador, las formas promastigote son fagocitadas por macrófagos dentro de los cuales son capaces de sobrevivir, pasando a formas amastigote y reproduciéndose por división binaria. El número de parásitos aumenta hasta que acaban rompiendo el macrófago. Las formas amastigote liberadas son fagocitadas por nuevos macrófagos y el ciclo continúa cuando un nuevo mosquito hembra pica al hospedador infectado y en la sangre que extrae se lleva macrófagos infectados. Las formas amastigote son liberadas en el estómago del insecto y casi inmediatamente pasan a formas promastigote que se dividirán por fisión binaria cerrándose así el ciclo.<sup>2</sup>

## Epidemiología

La leishmaniasis constituye un grave problema de salud pública mundial, que afecta a 88 países, 67 en el viejo mundo y 21 en América, 72 de los cuales son países en vías de desarrollo y 13 se encuentran entre los países menos desarrollados. El 90% de los casos de LV se presenta en cinco países:

<sup>2</sup> Flores, N. *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora Boliviana*. Tesis doctoral. 2007.

Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil y el 90% de los casos de LC se dan en siete países: Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria. La incidencia anual se estima en 1.5 millones de casos de LC, LMC y LCD y 500.000 casos de LV. Actualmente, hay 12 millones de casos, 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y unas 59.000 muertes anuales debidas a la leishmaniasis, figura N°9.<sup>3</sup>



**Figura N°9.** Distribución mundial de leishmaniasis visceral en el viejo y nuevo mundo.

En varias regiones del mundo los casos de leishmaniasis están aumentando claramente, por ejemplo, la LC en Brasil pasó de 21.800 casos en el 1998 a 60.000 en el 2003 y en Kabul y Afganistán, los casos de LC en 1994 eran 14.200 y en el año 2002 aumentaron hasta 67.500. Numerosas regiones, particularmente África oriental y el Medio Oriente, sufren epidemias mortales. Recientemente, se ha descrito la aparición de casos de leishmaniasis visceral en perros localizados en 21 estados de EE.UU. y Canadá.<sup>4</sup>

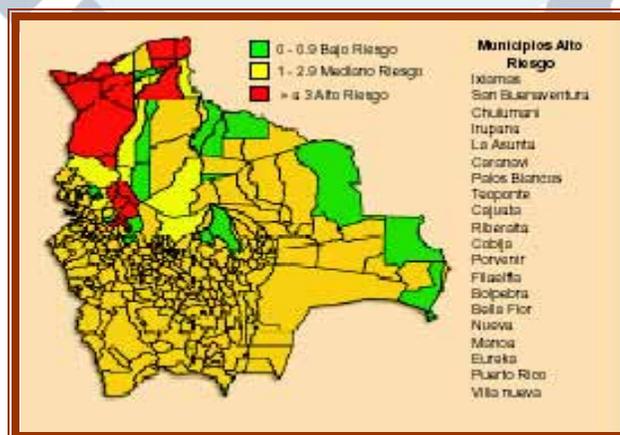
<sup>3</sup> WHO. *Weekly. Epidemiological Record.* **2002**, 77, 365.

<sup>4</sup> Gaskin, A. A.; Schantz, P.; Jackson, J.; Birkenheuer, A.; Tomlinson, L.; Gramiccia, M.; Levy, M.; Steurer, F.; Kollmar, E.; Hegarty, B. C.; Ahn, A.; Breitschwerdt, E. B. *J. Vet. Intern. Med.* **2002**, 16, 34.

En Europa, la principal población de riesgo son los consumidores de drogas por vía intravenosa, mientras que en el este de África y en la India, el problema está frecuentemente relacionado con inmigrantes, trabajadores estacionales, refugiados, profesionales del sexo y camioneros. Además la malnutrición y la inmunosupresión juegan papeles importantes como factores de riesgo individuales.<sup>5</sup>

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentra en alto riesgo de enfermar con leishmaniasis; en muchos casos se trata de grupos humanos muy receptivos, que provienen de zonas no infectadas. Los datos disponibles aún son considerados parciales y no revelan la magnitud del problema, Esta tendencia al aumento de casos, está relacionado con el desarrollo económico y cambios ambientales que aumentan la exposición a los vectores como son los nuevos asentamientos en zonas no habitadas previamente, intrusión en bosques primarios, deforestación, migraciones masivas de zonas rurales a zonas urbanas y una urbanización no planificada.<sup>5</sup>

La leishmaniasis en Bolivia se encuentra geográficamente distribuida en el área rural de las zonas de Yungas, valles, trópicos y subtrópicos, entre 270 y 2.400 m.s.n.m. abarcando en total 2/3 partes del territorio nacional de los departamentos de La Paz, Beni, Santa Cruz, Pando, Cochabamba, Tarija y Chuquisaca, figura N°10.<sup>5</sup>

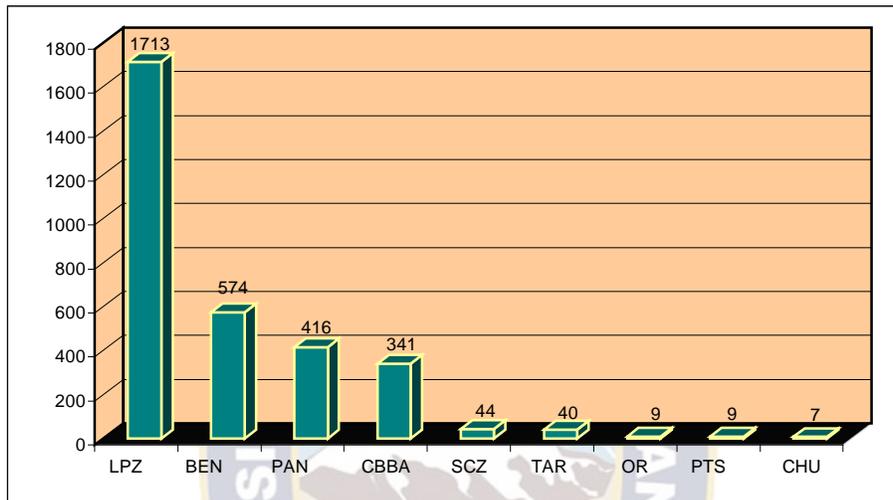


**Figura N°10.** Distribución geográfica de leishmaniasis en Bolivia, 2007.

<sup>5</sup> Ministerio de Salud y Deporte. Programa Nacional de control de las Leishmaniasis. *Leishmaniasis. Guía operativa para el control en Bolivia.* 2007.13-30.

La situación epidemiológica nacional a partir del año 1995 y la tendencia de la enfermedad se han incrementado por la presencia de mayor número de casos, reportados 2.808 casos el año 2007, cuadro N°1.<sup>5</sup>

**Cuadro N°1.** Número de casos de leishmaniasis por departamentos en Bolivia registrados en la gestión 2007.<sup>4</sup>



La Paz (LPZ), Beni (BEN), Pando (PAN), Cochabamba (CBBA), Santa Cruz (SCZ), Tarija (TAR), OR (Oruro), Potosí (PTS), Chuquisaca (CHU).

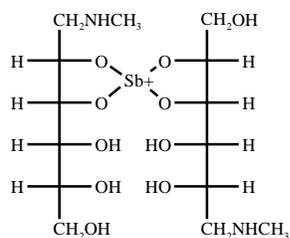
## Tratamiento de leishmaniasis

### Quimioterapia

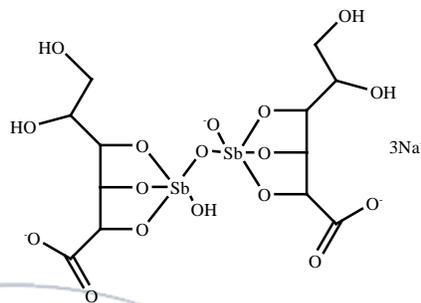
Se deben tener en cuenta muchos factores a la hora de elegir el tratamiento más apropiado así podemos citar: el carácter endémico de las cepas de *Leishmania*, el estado nutricional e inmune de la población, el nivel y patrón de la resistencia del parásito a los fármacos y obviamente el coste del tratamiento.

Actualmente, para el tratamiento de la leishmaniasis, los fármacos de primera elección continúan siendo los antimoniales pentavalentes como el antimonio de meglumina (**41**) (Glucantime) vía intramuscular y el estibogluconato de sodio (**42**) (Pentostam) vía intravenosa, a pesar de sus

numerosos efectos secundarios tales como fatiga, dolor corporal, pancreatitis, toxicidad cardiaca y renal.<sup>6</sup>

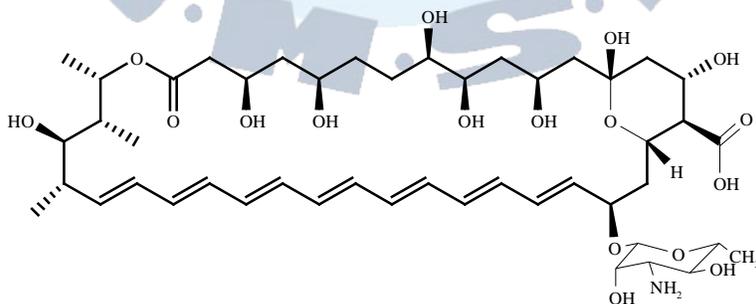


antimonio de meglumina (41)



estibogluconato de sodio (42)

En caso de pacientes infectados con cepas de *Leishmania* resistentes a los antimoniales, el tratamiento de primera elección, suele ser con anfotericina B (43) (Ambisome, en liposomas), esta formulación liposomal ha aumentado la eficacia de la anfotericina convencional. La duración del tratamiento se ha reducido a 5-7 días, existiendo una posibilidad de tratamiento más corto en niños, que representa una cierta ventaja respecto a las terapias tradicionales utilizadas. Sus efectos secundarios están ligados principalmente a la vía de administración (fiebre temblores, dolor óseo) o a la toxicidad (insuficiencia renal, anemia y toxicidad cardiaca); sin embargo en muchas ocasiones esta toxicidad es controlable.<sup>7</sup> El elevado costo es un serio inconveniente para los países en desarrollo, lo que limita la utilización de estas formulaciones.

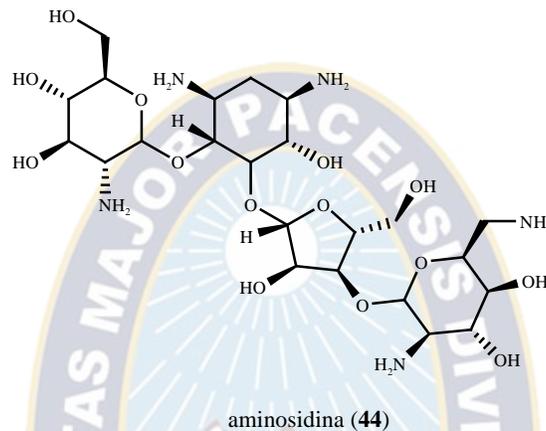


anfotericina B (43)

<sup>6</sup> Dedet, J. P. *Les Leishmanioses*. University Francophones. 1999.

<sup>7</sup> Marry, P. ; Rosenthal, E. *Expert Opinion Pharmacotherapy*. 2002, 3, 1101-08.

La aminosidina (**44**) (Paranomicina) es un fármaco alternativo de segunda línea. Es un antibiótico aminoglucosídico con alta actividad leishmanicida, normalmente se administra por vía intramuscular. La aminosidina combinada con antimoniales, permite la reducción del tratamiento.<sup>8</sup>



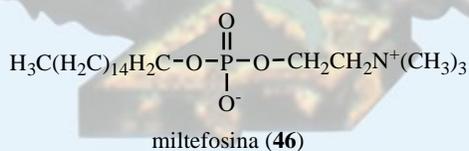
La pentamidina (**45**) (Pentacarinat) es utilizada para el tratamiento de la leishmaniasis, sobre todo en alternancia con un antimonial durante los tratamientos prolongados. Se caracteriza por presentar efectos secundarios particularmente para el páncreas, con riesgo de diabetes irreversible, lo que conjuntamente con su elevado costo hace que su uso sea muy restringido.<sup>8</sup>



El hecho de que la mayoría de los fármacos disponibles contra la leishmaniasis sean caros, tóxicos, requieran tratamientos prolongados y sean cada vez menos efectivos debido a la aparición de resistencias, ha hecho que uno de los grandes objetivos relacionado con la leishmaniasis sea el desarrollo de nuevos tratamientos, más efectivos y menos costosos.<sup>8</sup>

<sup>8</sup> Desjeux, P. *Med. Mal. Infect.* **2005**, 35, 2, S 74-76.

La miltefosina (**46**) pertenece a una serie de alquil-lisofosfolípidos desarrollados inicialmente como antitumorales. Es el primer medicamento de administración por vía oral (vida media larga 150-200 horas) utilizado en leishmaniasis visceral<sup>9,10</sup> y cuya venta ha sido autorizada en la India y Alemania, después de realizar estudios clínicos en pacientes con leishmaniasis visceral resistente a los antimoniales y con leishmaniasis cutánea.<sup>11</sup> También fue aprobado en el año 2005 para el tratamiento de leishmaniasis cutánea del nuevo mundo (Perú, Guatemala, Colombia) por los buenos resultados obtenidos.<sup>12,13</sup> Sin embargo, su utilización en los países en desarrollo tiene algunos inconvenientes, ya que es teratógeno, tiene un costo elevado (120 \$us/paciente en la India), un bajo índice terapéutico y es susceptible de favorecer las resistencias en monoterapia.<sup>6</sup> En este sentido, cabe destacar las investigaciones realizadas en la búsqueda del posible mecanismo de resistencia de estos fármacos en especies de *Leishmania*, así como nuevos revertidores de la multiresistencia a los mismos. Los efectos secundarios observados hasta el momento son tolerables, siendo los más frecuentes los vómitos y diarreas.<sup>14</sup>



La sitamaquina (**47**) un compuesto derivado 8-aminoquinolina, se encuentra en fase II de ensayos clínicos en Kenia y Brasil, su administración es vía oral y los resultados obtenidos hacen de él un fármaco prometedor. Actualmente, se están realizando estudios para determinar la eficacia y el patrón de toxicidad de este compuesto.<sup>15,16</sup> A pesar de no ser un producto natural, este

<sup>9</sup> Croft, S. L.; Neal, R. A.; Pendergast, W.; Chan, J. H. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, 36, 2633-2636.

<sup>10</sup> Sundar, S.; Jha, T. K.; Thakur, C. P.; Engel, L.; Sinderman, H.; Fisher, C.; Jungle, K.; Bryceson, A.; Berman. *J. N. Engl. J. Med.* **2002**, 347, 1739-1746.

<sup>11</sup> Schmidt-Ott, R.; Klenner, T.; Overath, P.; Aebischer, T. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1999**, 93, 85.

<sup>12</sup> Berman, J. *Expert Opin. Pharmacother.* **2005**, 6, 1381-1388.

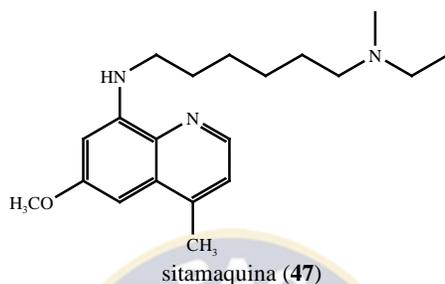
<sup>13</sup> Croft, S. L.; Barret, M. P.; Urbina, J. A. *Trends in Parasitology.* **2005**, 21, 508-512.

<sup>14</sup> Pérez-Victoria, J. M.; Pérez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, 45, 2468-2474.

<sup>15</sup> Wasunna, M. K.; Rashid, J. R.; Embui, J.; Kirigi, G.; Kinoti, D.; Lodenyo, H.; Felton, J. M.; Sabin, A. J.; Horton. *J. Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, 73, 871-876.

<sup>16</sup> Garnier, T.; Brown, M.; Lawrence, M. J.; Croft, S. L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **2006**, 58, 1043-1054.

compuesto verifica la importancia de los alcaloides quinolónicos como potenciales fármacos antiprotozoarios.



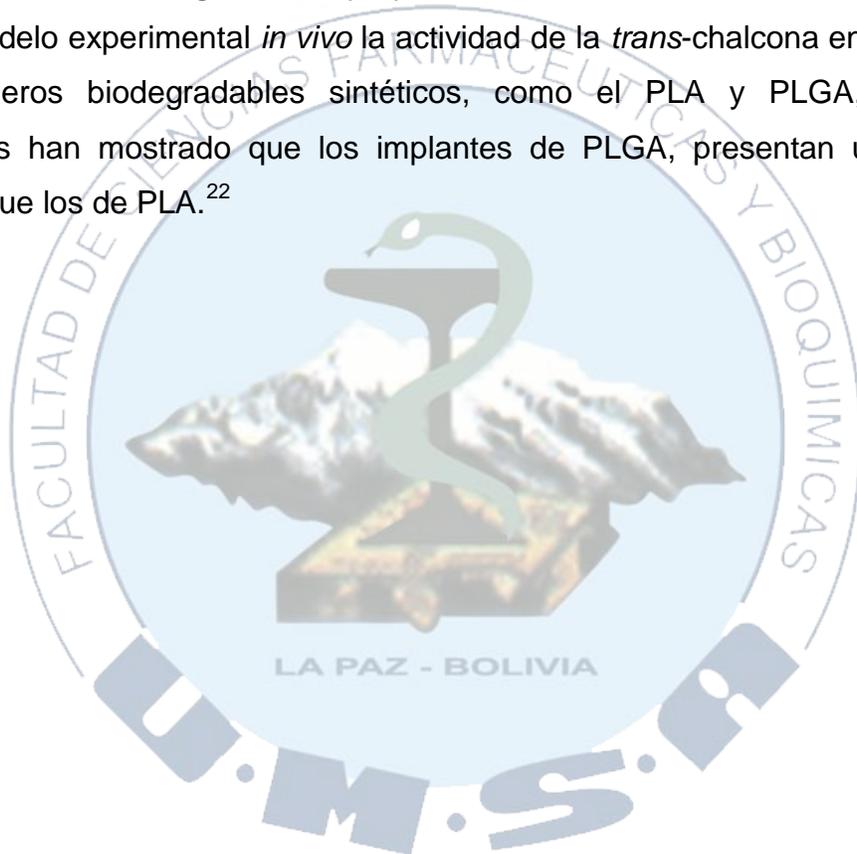
Uno de los principales problemas concernientes al control de la leishmaniasis es el incremento de la resistencia a los fármacos utilizados en su tratamiento. En los últimos años se han hecho importantes avances en el conocimiento de los mecanismos implicados en la multiresistencia a los fármacos (MDR).<sup>17</sup>

Recientemente, las terapias alternativas que utilizan nuevas formulaciones y sistemas de liberación de fármacos, como son los polímeros biodegradables, representan un avance en la eficacia de los tratamientos para la leishmaniasis, debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que permite reducir la dosis, la frecuencia de administración, los posibles efectos secundarios y por consiguiente se incrementa la eficacia del tratamiento. En la actualidad se están elaborando diversos polímeros biodegradables que presentan una gran versatilidad en términos de la amplia gama de fármacos que pueden ser encapsulados, así como los diferentes tiempos y vías de liberación. La inclusión de los fármacos en polímeros biocompatibles de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico/glicólico (PLGA) han tenido un gran avance sobre otros sistemas debido a la fácil preparación, largo tiempo de vida, liberación prolongada y gran estabilidad en los fluidos biológicos.<sup>18</sup>

<sup>17</sup> Pérez-Victoria, J. M.; Di Pietro, A.; Barron, D.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Current Drugs Targets*. **2002**, 3, 311-333.

<sup>18</sup> Langer, R. *Nature*. **1998**, 392, 5-10.

En esta línea, los primeros trabajos desarrollan nanopartículas con poliláctico biodegradable, que se proponen como un sistema de liberación de los fármacos en los macrófagos, lo que podría incrementar el índice terapéutico de los agentes leishmanicidas.<sup>19</sup> Esta metodología se aplicó para la preparación de nanopartículas de poliláctico (D, L) con 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona, lo que mejoró notablemente la actividad leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de la chalcona.<sup>20</sup> También han sido evaluadas frente a *Leishmania*,<sup>21</sup> microesferas de fosfolípidos y nanopartículas biodegradables preparadas con PLGA. Así mismo, se evaluó en un modelo experimental *in vivo* la actividad de la *trans*-chalcona en implantes de polímeros biodegradables sintéticos, como el PLA y PLGA, y cuyos resultados han mostrado que los implantes de PLGA, presentan una mayor eficacia que los de PLA.<sup>22</sup>



<sup>19</sup> Rodríguez, J. M.; Croft, S.L.; Fessi, H.; Bories, C.; Devissaguet, J. P. *Trop. Med. Parasitol.* **1994**, 45, 223-228.

<sup>20</sup> Torres-Santos, E.C.; Rodríguez, J. M.; Moreira, D. L.; Kaplan, M. A.; Rossi-Bergman, B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, 43, 1776-1778.

<sup>21</sup> Medda, S.; Jaisankar, P.; Manna, R. K.; Pal, B.; Giri, V. S.; Basu, M. K. *J. Drugs Target.* **2003**, 11, 123-128.

<sup>22</sup> Piñero, J. Temporal, R. M.; Silva-Goncalves, A. J.; Jiménez, I. A.; Bazzocchi, L. I.; Olivia, A.; Pereira, A.; León, L. L.; Valladares, B. *Acta Tropica.* **2006**, 98, 59-65.

Formulaciones fitoterapéuticos



## Formulación farmacéutica de productos fitoterapéuticos

Los conocimientos y las técnicas de fabricación de medicamentos, preparados a partir de sustancias activas obtenidas por vía sintética, son aplicables en un todo a los productos naturales puros. Los productos fitoterapéuticos, debido a su naturaleza, merecen consideraciones y cuidados adicionales.<sup>1</sup>

Los extractos son materias primas que contienen cantidades variables, pero siempre pequeñas, de principios activos y grandes cantidades de material secundario (sales orgánicas e inorgánicas, ácidos y bases orgánicas, saponinas, polifenoles, taninos, azúcares, polisacáridos entre otros); este material secundario puede afectar significativamente la tecnología de fabricación y la estabilidad de la forma farmacéutica.

En la formulación de productos fitoterapéuticos deben ser consideradas no solamente la solubilidad y la estabilidad de los principios activos, sino también las características de los componentes secundarios del extracto, como la higroscopicidad en las formas farmacéuticas sólidas o la baja solubilidad en las formas farmacéuticas líquidas.

Prácticamente todas las formas farmacéuticas puede ser preparadas a partir de extractos:

1. Formulaciones líquidas como gotas, jarabes, soluciones o suspensiones para las cápsulas blandas de gelatina.
2. Formulaciones sólidas como los comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina y gránulos.
3. Preparaciones semi-sólidas para uso externo, como las cremas, lociones, pomadas y supositorios.

---

<sup>1</sup> Sharapin, N.; Machado, L.; Souza, E.; Rocha, E. M.; Macedo dos Santos, E. V. Lopes, J. M. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santa fé de Bogotá, D. C., Colombia. **2000**. 113-131.

En la selección de la forma farmacéutica de un producto fitoterapéutico, los aspectos principales que deben tenerse en cuenta son los siguientes:

La forma debe ser aceptable para el paciente.

La forma debe ser química y físicamente estable.

El producto debe ser correctamente envasado.

El producto debe ser exento de contaminación microbiana.

El producto debe ser capaz de proporcionar una dosis correcta de la droga.

El producto debe ser terapéuticamente eficaz.

El proceso debe ser económico para la fabricación en gran escala.

La fabricación de formas farmacéuticas de productos fitoterapéuticos debe obedecer a las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF o GMP- Good Manufacturing Practices). El fabricante debe elaborar los productos fitoterapéuticos garantizando que estos estén bajo la legislación vigente y debe asumir la responsabilidad por la calidad de cualquier producto por él elaborado.

### **Jarabes**

Son preparaciones farmacéuticas acuosas, límpidas, que contienen 85% de sacarosa en agua destilada. La alta concentración de azúcar en los jarabes, además de sus propiedades energéticas y edulcorantes, tiene un papel de conservante y debido a la baja constante dieléctrica, facilita la disolución de los componentes de la preparación. Para favorecer la solubilidad de los componentes de la preparación y retardar la cristalización del azúcar se puede agregar sorbitol o glicerina a la fórmula del jarabe. El jarabe preparado solamente con azúcar y agua se denomina jarabe simple y se utiliza como vehículo para jarabes medicamentosos, aromáticos y en la preparación de recubrimientos para las grageas.<sup>1</sup>

## **Alteraciones de los jarabes**

La alteración de un jarabe puede ocurrir debido al exceso o deficiencia en la concentración de sacarosa. Si la concentración es muy alta, la sacarosa se cristaliza. Este problema se corrige adicionando agua en una cantidad adecuada para obtener la densidad correcta del jarabe. Si el jarabe está diluido en exceso el contenido de la sacarosa es bajo y, como consecuencia, pueden proliferar las bacterias, las levaduras y los hongos. Puede ocurrir también la inversión de la sacarosa por la acción de la invertasa e, incluso, la fermentación alcohólica. Las condiciones inadecuadas del envasado del jarabe producen también crecimiento de microorganismos. Al utilizar temperaturas durante el envase superiores a la temperatura ambiente el agua se evapora dentro del frasco y al condensarse en la superficie del jarabe, crea condiciones favorables para el crecimiento de microorganismos. Los frascos deben esterilizarse antes de ser usados (en estufa, a 150°C durante 2 h) y deben llenar completamente, es importante no dejar ningún espacio libre dentro del frasco.<sup>1</sup>

## **Preservantes para jarabes**

Para evitar la proliferación microbiana se utilizan sustancias preservantes, las más utilizadas son los ésteres del ácido para-hidroxibenzoico: metilparabeno (nipagin), y propilparabeno (nipazol). Es común utilizar la mezcla de los dos ésteres del ácido para-hidroxibenzoico, porque con esta mezcla se obtiene un efecto antimicrobiano mayor.<sup>1</sup>

## **Excipientes y auxiliares de formulación de origen natural en tecnología farmacéutica**

Son sustancias que ayudan en la formulación farmacéutica dando a la forma farmacéutica las características deseadas de estabilidad, peso, volumen viscosidad y velocidad de desintegración y otros. Actúan incluso como diluentes, aglutinantes, lubricantes y agentes de corrección de color y sabor.

Los excipientes son inertes, no deben tener actividad farmacológica propia y no deben inhibir o aumentar la actividad del principio activo, en el caso de excipientes líquidos, éstos no deben interaccionar con el material de envase. Su uso no se limita a la tecnología de productos fitoterapéuticos. La mayor parte de los excipientes y auxiliares son de origen natural: vegetal, animal o mineral, algunos modificados por semi-síntesis. Cada excipiente se define por sus características físico-químicas y por sus características tecnológicas, las cuales determinan su uso en tecnología farmacéutica.<sup>1</sup>

### **Excipientes de origen vegetal**

La **glicerina** se obtiene por la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos abundantes en el reino vegetal, se usa en la fabricación de formas líquidas a concentraciones de hasta 30% como emoliente y humectante. En soluciones orales la glicerina es usada como solvente, preservante antimicrobiano y como agente que incrementa la viscosidad. En concentraciones superiores a 20% se utiliza como preservativo y como edulcorante en elixires.<sup>1,2</sup>

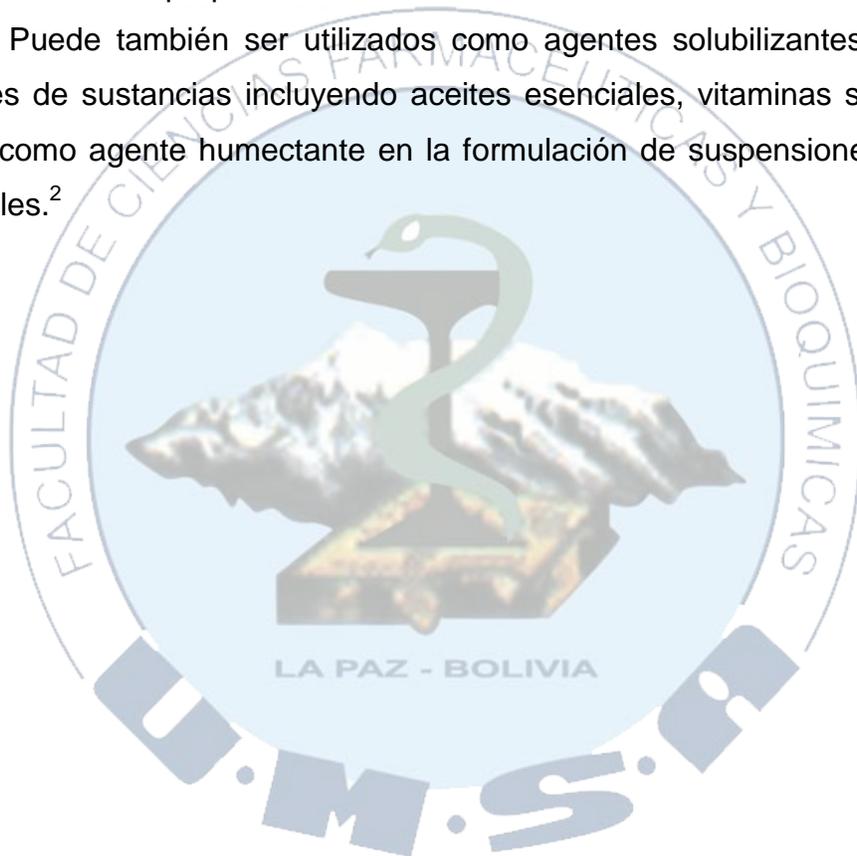
Los **aceites vegetales** más usados en tecnología farmacéutica son los de maní (*Arachis hypogea*), maíz (*Zea mays*), algodón (*Gossypium herbaceum*) y de sésamo (*Sesamum indicum*). Estos aceites se usan como vehículo para la preparación de soluciones inyectables de uso intramuscular, soluciones orales y en la elaboración de jabones, ungüentos y linimentos.<sup>1</sup>

La **sacarosa** producto natural obtenido de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) o de la remolacha (*Beta vulgaris*). La sacarosa se utiliza en la fabricación de comprimidos en concentraciones del 2 al 20% como aglutinante, diluyente o como agente de recubrimiento en la fabricación de grageas. También se utiliza para proporcionar viscosidad en jarabes y como agente edulcorante en concentraciones inferiores a 85%.<sup>1</sup>

---

<sup>2</sup> Kibbe, A. H. *Handbook Pharmaceutical Excipients*. Pharmaceutical Press, London, Reino Unido. **2000**. 220-222, 340-344, 416-419, 450-453.

Los **ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilénico** o **Polisorbatos** son una serie de ésteres parciales de ácidos grasos de sorbitol y son anhídridos copolimerizados con aproximadamente 20, 5 o 4 moles de óxido de etileno por cada mol de sorbitol. El producto resultante es por lo tanto una mezcla de moléculas de varios tamaños en vez de una mezcla de un solo químico. Los polisorbatos contienen 20 unidades de oxietileno, son surfactantes no iónicos hidrofílicos los cuales son usados ampliamente como agentes emulsificantes en la preparación de emulsiones farmacéuticas estables aceite en agua. Puede también ser utilizados como agentes solubilizantes para una variedad de sustancias incluyendo aceites esenciales, vitaminas solubles en aceite, y como agente humectante en la formulación de suspensiones orales y parenterales.<sup>2</sup>



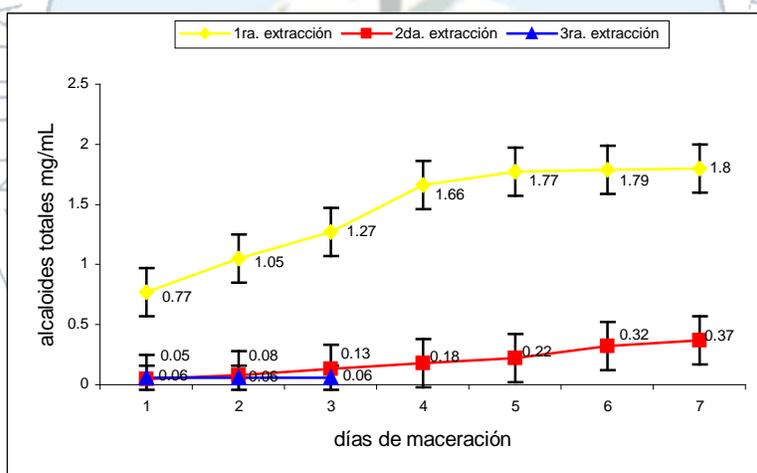
Resultados y discusiones:  
*Galipea longiflora*



## Obtención de alcaloides totales a escala piloto de corteza de *G. longiflora*

### Determinación del tiempo de maceración

La corteza seca y molida de *G. longiflora* (5 Kg) fue macerada en 25 L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en percoladores cónicos (42 x 74 cm), de ellos se obtuvo 1 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  cada día durante el proceso de maceración, los volúmenes de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  fueron sometidos a extracciones ácido-base, de las fracciones ácidas se determinaron las concentraciones de alcaloides totales por espectroscopia UV-visible. En una primera extracción a partir de los 5 días de maceración el solvente llega a saturarse a una concentración cercana a los 1.77 ( $\pm 0.2$ ) mg/mL; en la segunda extracción a los 6 días de maceración llega a 0.32 ( $\pm 0.2$ ) mg/mL; en una tercera extracción el solvente llega a una concentración de 0.06 ( $\pm 0.1$ ) mg/mL desde el primer día de maceración, figura N°11 y tabla N°3.

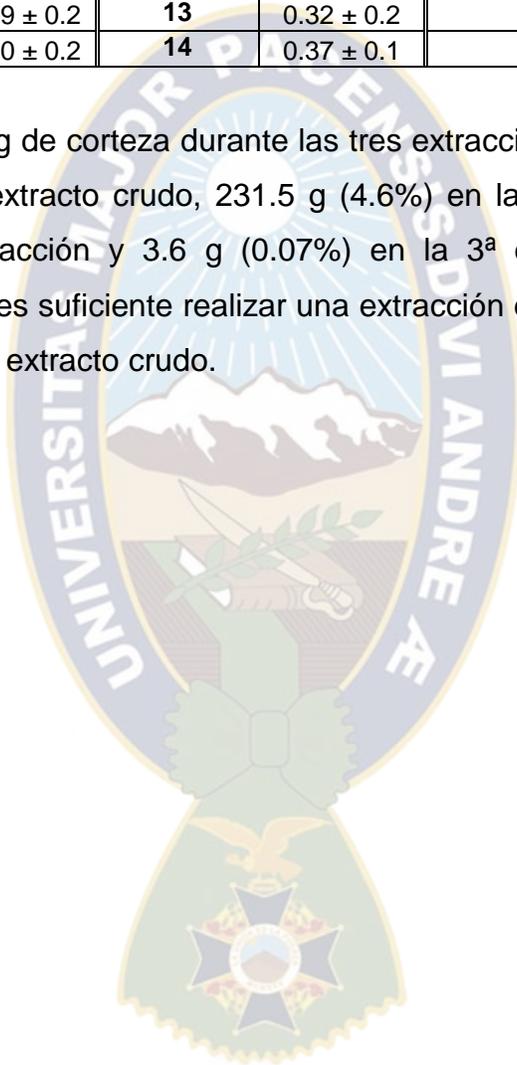


**Figura N°11.** Relación entre la concentración de alcaloides totales y el tiempo de maceración de corteza de *G. longiflora* en una 1ª, 2ª y 3ª extracción.

**Tabla N°3.** Promedios y desviaciones estándares de alcaloides totales de corteza de *G. longiflora* en una 1ª, 2ª y 3ª extracción.

días maceración	1ª extracción	días maceración	2ª extracción	días maceración	3ª extracción
1	0.77 ± 0.2	8	0.05 ± 0.2	15	0.06 ± 0.1
2	1.05 ± 0.1	9	0.08 ± 0.1	16	0.06 ± 0.1
3	1.27 ± 0.2	10	0.13 ± 0.2	17	0.06 ± 0.1
4	1.66 ± 0.1	11	0.18 ± 0.1		-
5	1.77 ± 0.2	12	0.22 ± 0.2		-
6	1.79 ± 0.2	13	0.32 ± 0.2		-
7	1.80 ± 0.2	14	0.37 ± 0.1		-

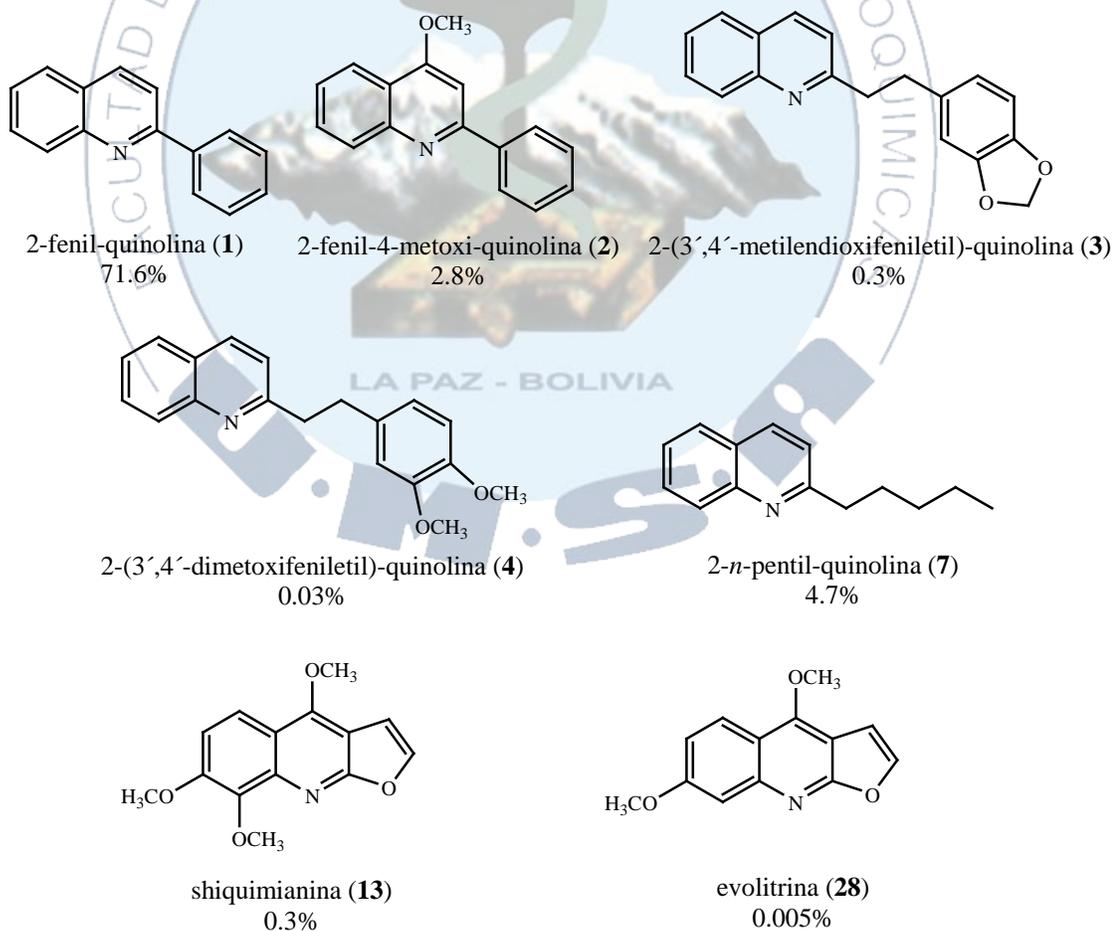
A partir de 5 Kg de corteza durante las tres extracciones se obtuvieron un total de 249.4 g de extracto crudo, 231.5 g (4.6%) en la 1ª extracción, 14.3 g (0.3%) en la 2ª extracción y 3.6 g (0.07%) en la 3ª extracción. Según los resultados obtenidos es suficiente realizar una extracción durante 5 días por que se obtiene el 5.0% de extracto crudo.



## Metabolitos bioactivos aislados de corteza de *Galipea longiflora*

La corteza seca y molida de *Galipea longiflora* (3 Kg) fue sometida a una extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , obteniéndose 134.2 g de extracto crudo, el cual fue sometido a una extracción ácido-base, rindiendo 60 g de alcaloides totales.

Los alcaloides totales fueron sometidos a diversas técnicas cromatográficas como: cromatografía en columna sobre gel de sílice, cromatografía flash, cromatografía en capa fina y preparativa que permitieron el aislamiento de alcaloides quinolínicos: 2-fenil-quinolina (**1**), 2-fenil-4-metoxi-quinolina (**2**), 2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-quinolina (**3**), 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina (**4**), 2-*n*-pentil-quinolina (**7**), dos furoquinolínicos: shiquimianina (**13**) y evolitrina (**28**).



La identificación de cada uno de los metabolitos fue realizada por métodos espectroscópicos, espectrométricos y comparados con los datos reportados en la bibliografía. La numeración de los compuestos aislados, fue realizada acorde a la literatura.<sup>1</sup>

### Determinación estructural del compuesto 1

El compuesto **1** forma cristales blancos en *n*-hexano, con punto de fusión de 76.5°C, y muestra en su espectro de masas un ión molecular a 205 *m/z*, correspondiente a una fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N, determinada por espectrometría de masas de alta resolución, en el espectro de masas de baja resolución se observó un fragmento significativo que corresponde a 102 *m/z* [C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>], figura N°12.

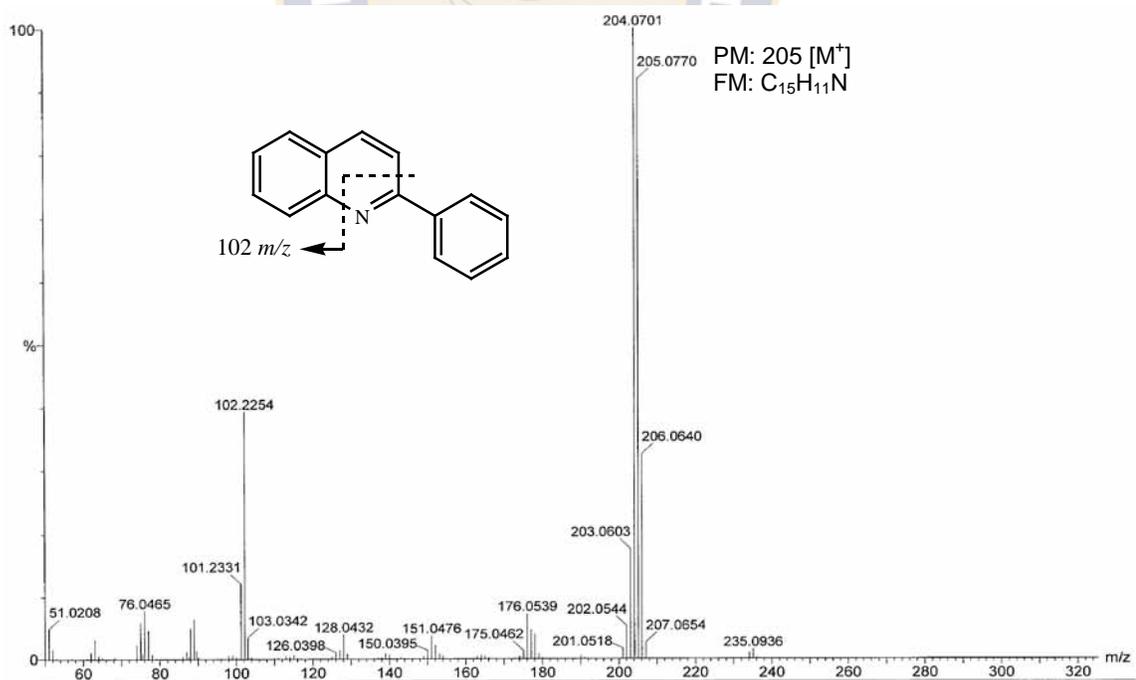
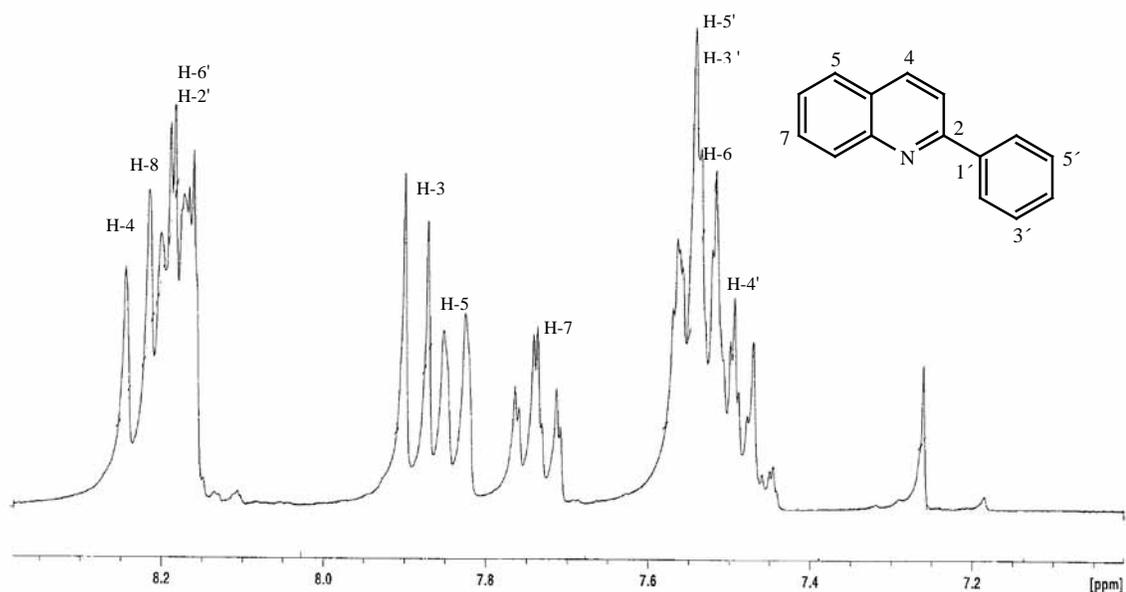


Figura N°12. Espectro de masas de baja resolución de 1.

<sup>1</sup> Weast, R., *CRC Handbook of chemistry and physics*, CRC Press, Boca Raton, Florida. 1984, 64, 617.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H en la región aromática se observaron señales como tres tripletes a  $\delta_H$ : 7.48 (1H, t,  $J=7.5$ Hz, H-4'), 7.53 (2H, t,  $J=7.4$ Hz, H-3', H-5') y 7.75 (1H, t,  $J=8.4$ Hz, H-7), un multiplete a  $\delta_H$ : 7.52 (1H, m, H-6), cinco dobletes a  $\delta_H$ : 7.84 (1H, d  $J=8.0$ Hz, H-5), 7.86 (1H, d,  $J=8.6$ Hz, H-3), 8.17 (2H, d,  $J=6.8$ Hz, H-2', H-6'), 8.19 (1H, d,  $J=8.5$ Hz, H-8) y 8.23 (1H, d,  $J=8.7$ Hz, H-4), figura N°13.



**Figura N°13.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de **1**.

En su espectro de RMN-<sup>13</sup>C y los experimentos DEPT 90 y 135, se observaron señales en la región aromática correspondiente a once carbonos metínicos a  $\delta_C$ : 118.7 (C-3), 126.1 (C-4'), 127.4 (C-5), 127.5 (C-6', C-2'), 128.7 (C-3', C-5'), 129.2 (C-6), 129.5 (C-7), 129.6 (C-8), 136.6 (C-4), cuatro carbonos cuaternarios a  $\delta_C$ : 127.0 (C-9), 139.5 (C-1'), 148.1 (C-10) y 157.0 (C-2), el conjunto de estos datos determinan la estructura de **1** como 2-fenil-quinolina, acorde a los datos reportados en la literatura,<sup>2,3</sup> figura N°14.

<sup>2</sup> Fournet, A.; Vagneur, B.; Richomme, P.; Bruneton. *J. Can. J. Chem.* **1989**, 67, 2116-2118.

<sup>3</sup> Giménez, A.; Avila, J.; Ruiz, G.; Paz, M.; Udaeta, E.; Ticona, J.; Salamanca, E.; Paredes, C.; Rodríguez, N.; Quints, K.; Feraudy, C.; Gutierrez, I.; Chuqui, R.; Quenevo, C.; Dalence, M.; Bascope, M. *Revista Boliviana de Química.* **2005**, 1, 22, 94-107.

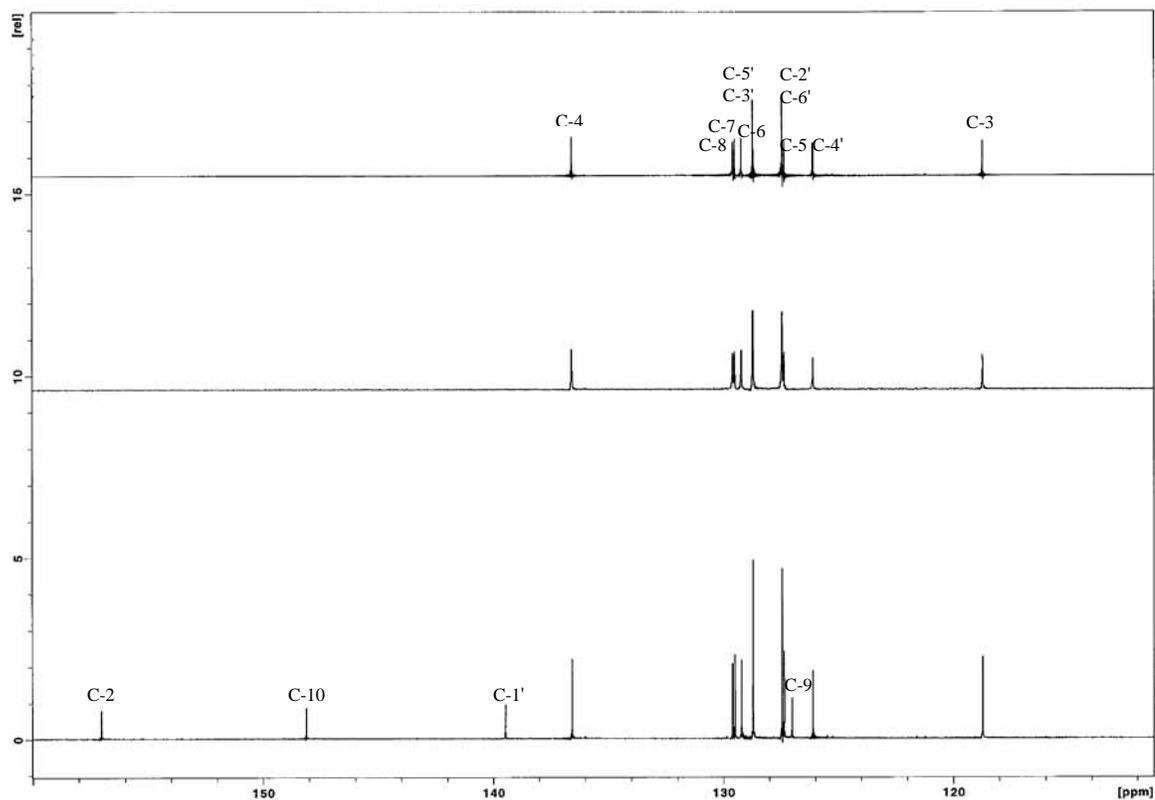


Figura N°14. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 90 y 135 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **1**.

### Determinación del compuesto **2**

El compuesto **2** líquido aceitoso de color amarillo, muestra en su espectro de masas un ión molecular a 235  $m/z$  correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos significativos a 204  $m/z$  [ $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}$ ], 143  $m/z$  [ $\text{C}_9\text{H}_5\text{NO}$ ], figura N°15.

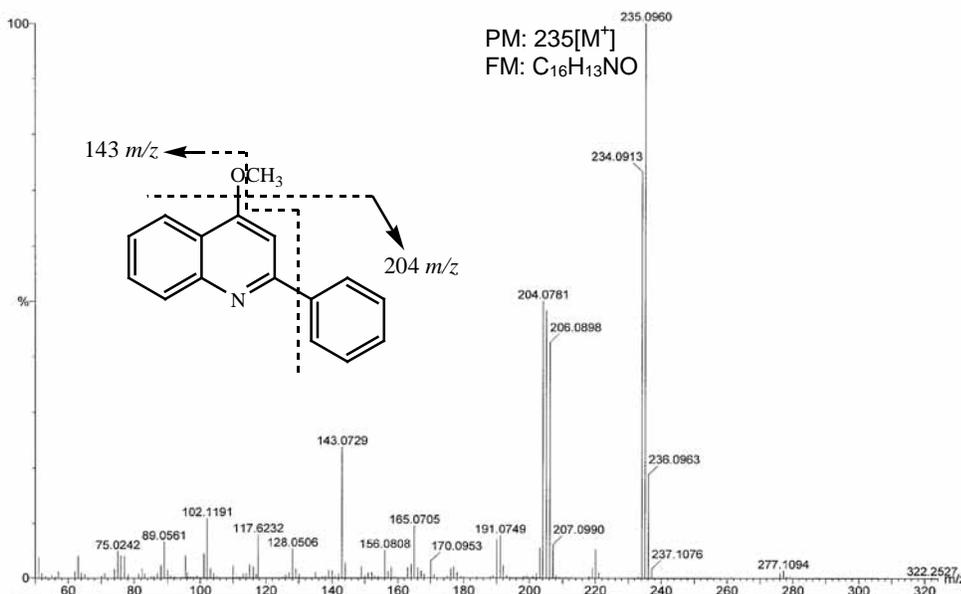


Figura N°15. Espectro de masas de baja resolución de 2.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H se observaron señales de dos singuletes a  $\delta_H$ : 4.12 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>) característico de un metoxilo, y otro a  $\delta_H$ : 7.18 (1H, s, H-3), un multiplete a  $\delta_H$ : 7.51 (1H, m, H-6), así mismo se observaron tres tripletes a  $\delta_H$ : 7.47 (1H, t,  $J=7.0$ Hz, H-4'), 7.54 (2H, t,  $J=6.7$ Hz, H-5',H-3'), y 7.72 (1H, t,  $J=8.3$ Hz, H-7), tres dobletes a  $\delta_H$ : 7.71 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-5), 8.11 (1H, d,  $J=7.3$ Hz, H-8) y 8.20 (1H, d,  $J=7.4$ Hz, H-2', H-6'), figura N°16.

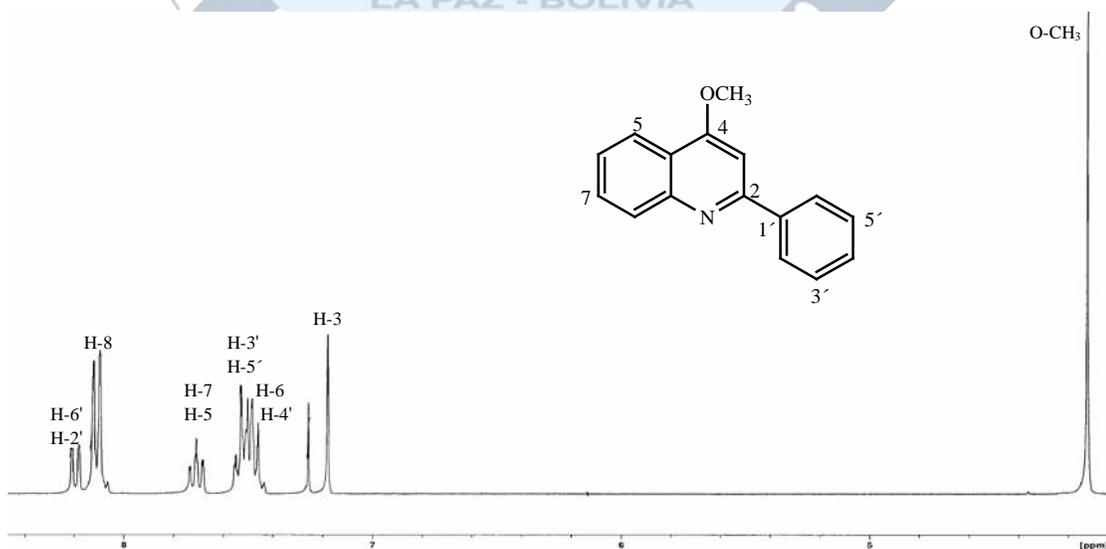


Figura N°16. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de (2).

En su espectro de RMN-<sup>13</sup>C y los experimentos DEPT 90 y 135, indicaron señales para un metoxilo a  $\delta_C$ : 55.4 (O-CH<sub>3</sub>), así mismo se observaron ocho carbonos metínicos a  $\delta_C$ : 97.8 (C-3), 121.4 (C-8), 125.2 (C-4'), 127.3 (C-2', C-6'), 128.5 (C-3', C-5'), 128.9 (C-6), 129.0 (C-7), 129.7 (C-5), cinco carbonos cuaternarios a  $\delta_C$ : 120.1 (C-9), 140.2 (C-1'), 148.9 (C-10), 158.6 (C-2) y 162.6 (C-4), el conjunto de estos datos determinan la estructura de **2** como 2-fenil-4-metoxi-quinolina, acorde a los datos reportados en la literatura,<sup>2,3</sup> figura N°17.

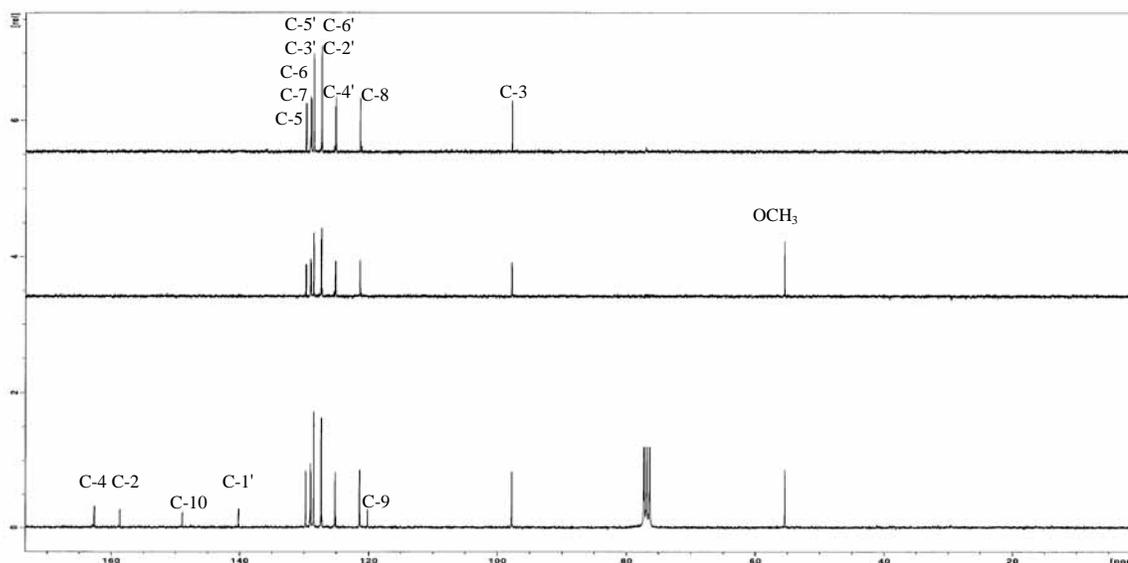
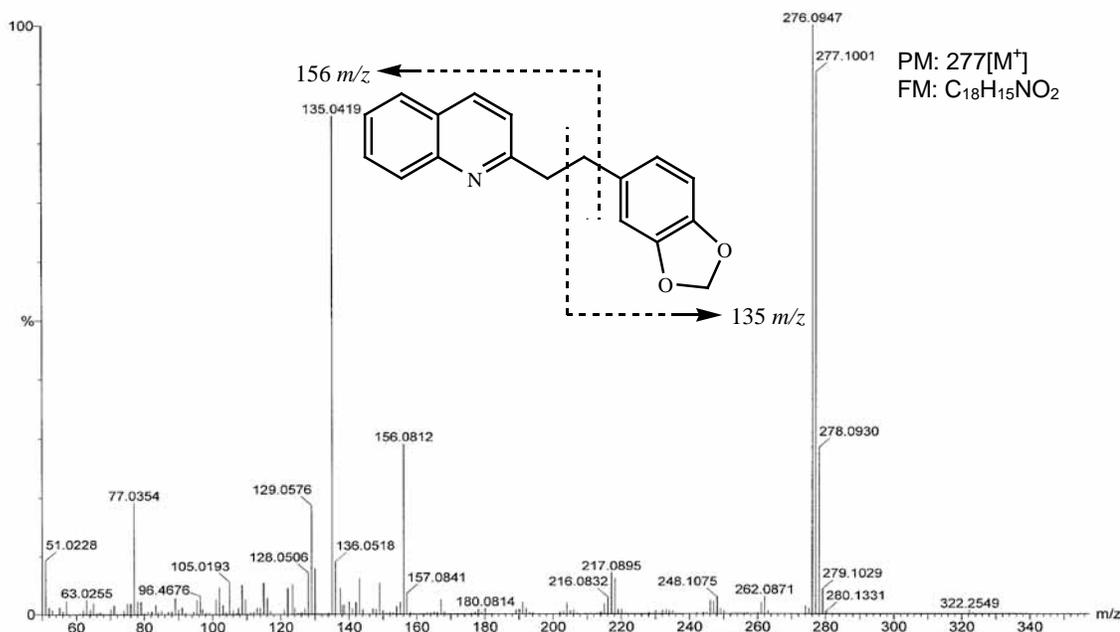


Figura N°17. Espectro de RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) de **2**.

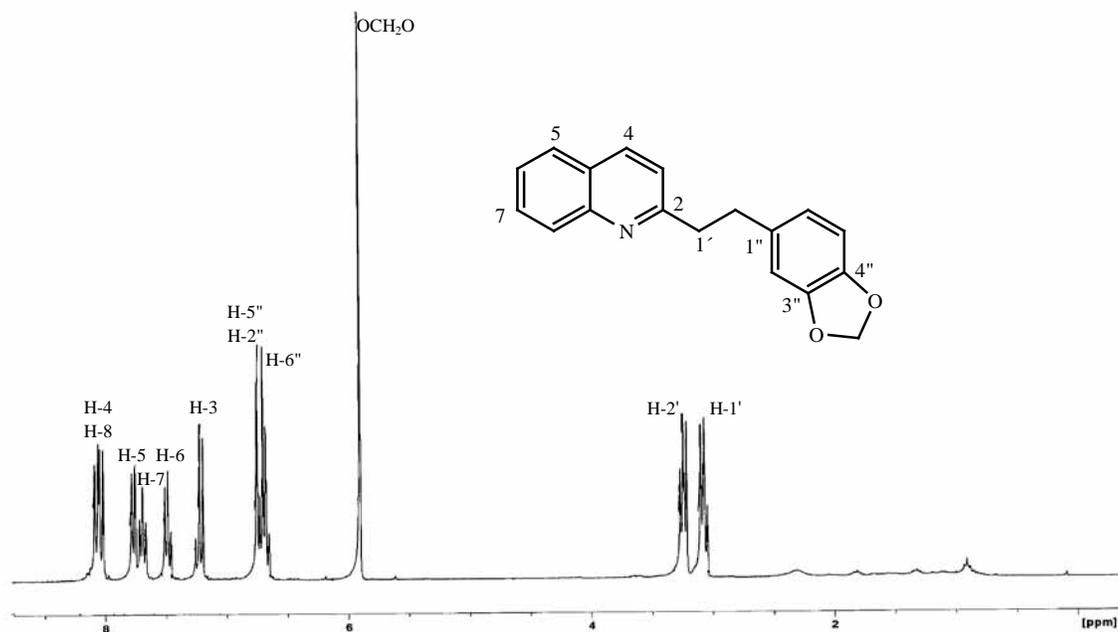
### Determinación estructural del compuesto **3**

El compuesto **3** líquido aceitoso de color amarillo, muestra en su espectro de masas un ión molecular a 277 *m/z*, correspondiente a una fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>, determinada por espectrometría de masas de alta resolución, en el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos significativos a 156 *m/z* [C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N] y 135 *m/z* [C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>], figura N°18.



**Figura N°18.** Espectro de masas de baja resolución de **3**.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H en la región alifática se observaron un sistema AB de dos doble dobles a  $\delta_H$ : 3.06 (2H, dd,  $J=10.2$  y 8.8Hz, H-1') y 3.25 (2H, dd,  $J=10.4$  y 8.8Hz, H-2'), un singulete a  $\delta_H$ : 5.91 (2H, s, OCH<sub>2</sub>O) característico del metilendioxi, así mismo en la región aromática se observaron tres doble dobles a  $\delta_H$ : 6.67 (1H, dd,  $J=8.0$  y 1.3Hz, H-6"), 7.51 (1H, dd,  $J=7.8$  y 7.3Hz, H-6), 7.71 (1H, dd,  $J=7.9$  y 7.4Hz, H-7), cinco dobletes a  $\delta_H$ : 6.72 (1H, d,  $J=7.9$ Hz, H-5"), 6.75 (1H, d,  $J=1.3$ Hz, H-2"), 7.22 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-3), 7.78 (1H, d,  $J=8.1$ Hz, H-5) y 8.06 (2H, d,  $J=8.2$ Hz, H-4, H-8), figura N°19.



**Figura N°19.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **3**.

En su espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  y los experimentos DEPT 90 y 135, en la región alifática se observaron señales para dos carbonos metilenos a  $\delta_{\text{C}}$ : 35.4 (C-2') y 41.0 (C-1'), un carbono cetálico a  $\delta_{\text{C}}$ : 100.5 (OCH<sub>2</sub>O), así mismo en la región aromática se observaron nueve carbonos metínicos a  $\delta_{\text{C}}$ : 107.9 (C-6''), 108.8 (C-2''), 121.1 (C-5''), 121.4 (C-3), 125.6 (C-6), 127.3 (C-5), 128.6 (C-8), 129.2 (C-7) y 136.0 (C-4), además de seis carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$ : 126.6 (C-9), 135.1 (C-1''), 145.5 (C-4''), 147.3 (C-10), 147.7 (C-3'') y 161.4 (C-2), el conjunto de estos datos determinan la estructura de **3** como 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina, acorde a los datos reportados en la literatura,<sup>2,3</sup> figura N°20.

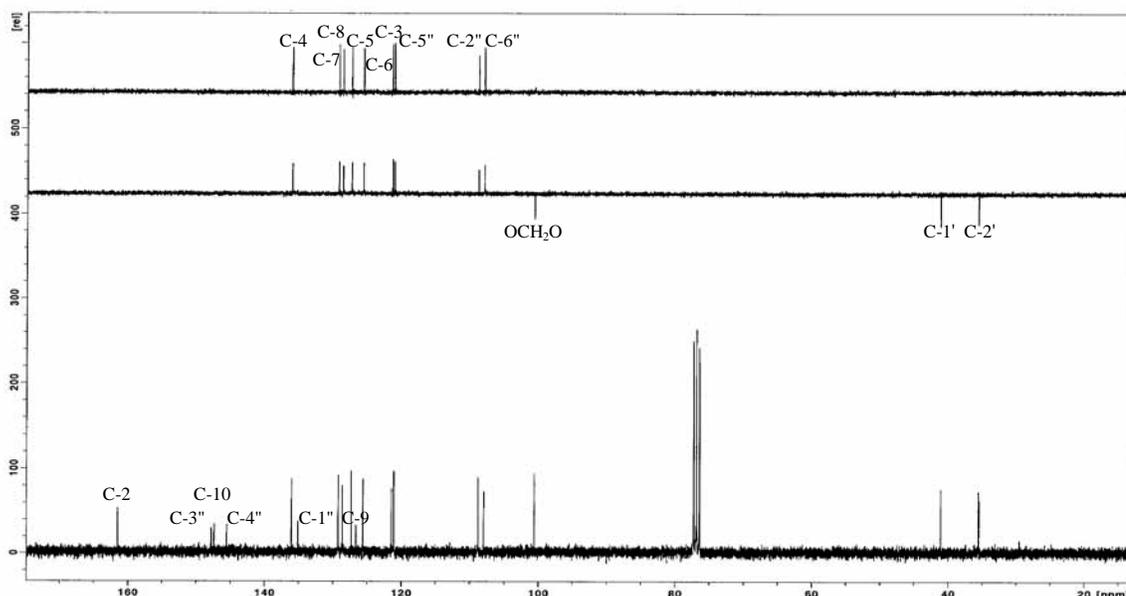


Figura N°20. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **3**.

### Determinación estructural del compuesto **4**

El compuesto **4** sólido blanco, muestra en su espectro de masas un ión molecular a 293  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución, en el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos significativos a 278  $m/z$  [ $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ ], 156  $m/z$  [ $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}$ ] y 151  $m/z$  [ $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2$ ], figura N°21.

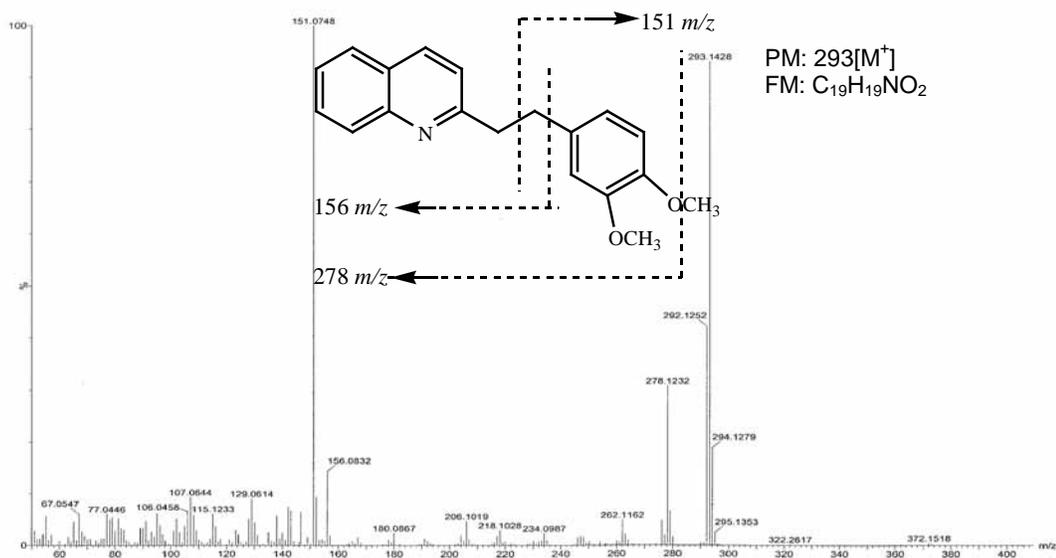


Figura N°21. Espectro de masas de baja resolución de **4**.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H en la región alifática se observaron un sistema AB de dos dobletes a  $\delta_H$ : 3.08 (2H, dd,  $J=10.2$  y  $8.9$ Hz, H-1') y 3.29 (2H, dd,  $J=10.4$  y  $9.0$ Hz, H-2'), y dos singuletes a  $\delta_H$ : 3.80 (3H, s, 4''-OCH<sub>3</sub>) y 3.85 (3H, s, 3''-OCH<sub>3</sub>) correspondientes a metoxilos, en la región aromática se observaron seis dobletes a  $\delta_H$ : 6.76 (2H, d,  $J=8.0$ Hz, H-6'', H-5''), 6.78 (1H, d,  $J=1.3$ Hz, H-2''), 7.23 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-3), 7.78 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-5), 8.05 (1H, d,  $J=8.6$ Hz, H-4), 8.09 (1H, d,  $J=8.7$ Hz, H-8), dos dobletes a  $\delta_H$ : 7.51 (1H, dd,  $J=7.8$  y  $7.1$ Hz, H-6) y 7.69 (1H, dd,  $J=8.3$  y  $7.1$ Hz, H-7), el conjunto de estos datos determinan la estructura de **4** como 2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina, acorde a los datos reportados en la literatura,<sup>2,3</sup> figura N°22.

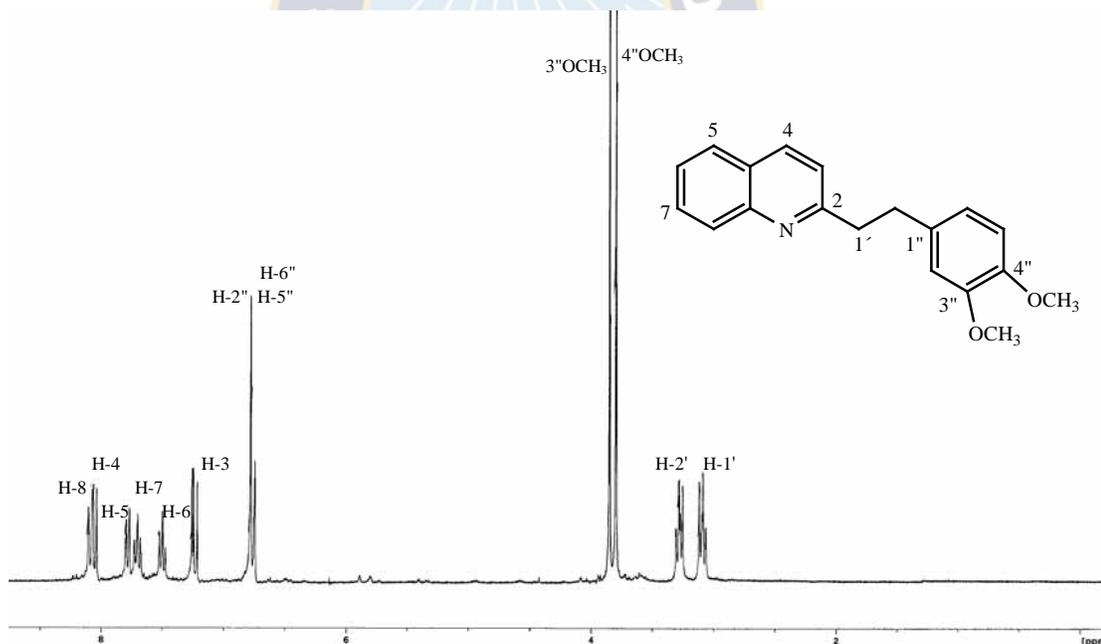


Figura N°22. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de **4**.

### Determinación estructural del compuesto **7**

El compuesto **7** líquido aceitoso de color amarillo, muestra en su espectro de masas un ión molecular a  $199 m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N, determinada por espectrometría de masas de alta resolución.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H en la región alifática se observaron señales como un triplete a  $\delta_H$ : 0.79 (3H, t,  $J=6.8$ Hz, H-5') correspondiente a un metilo, dos multipletes a  $\delta_H$ : 1.27 (4H, m, H-3', H-4') y 1.70 (2H, m, H-2'), un doble doblete a  $\delta_H$ : 2.85 (2H, dd,  $J=8.1$  y 7.6Hz, H-1'), así mismo se observaron en la región aromática dos doble dobletes a  $\delta_H$ : 7.30 (1H, dd,  $J=7.6$  y 7.2Hz, H-6) y 7.51 (1H, dd,  $J=7.5$  y 7.2Hz, H-7), cuatro dobletes a  $\delta_H$ : 7.08 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-3), 7.57 (1H, d,  $J=8.5$ Hz, H-5), 7.83 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-8), y 8.00 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-4), figura N°23.

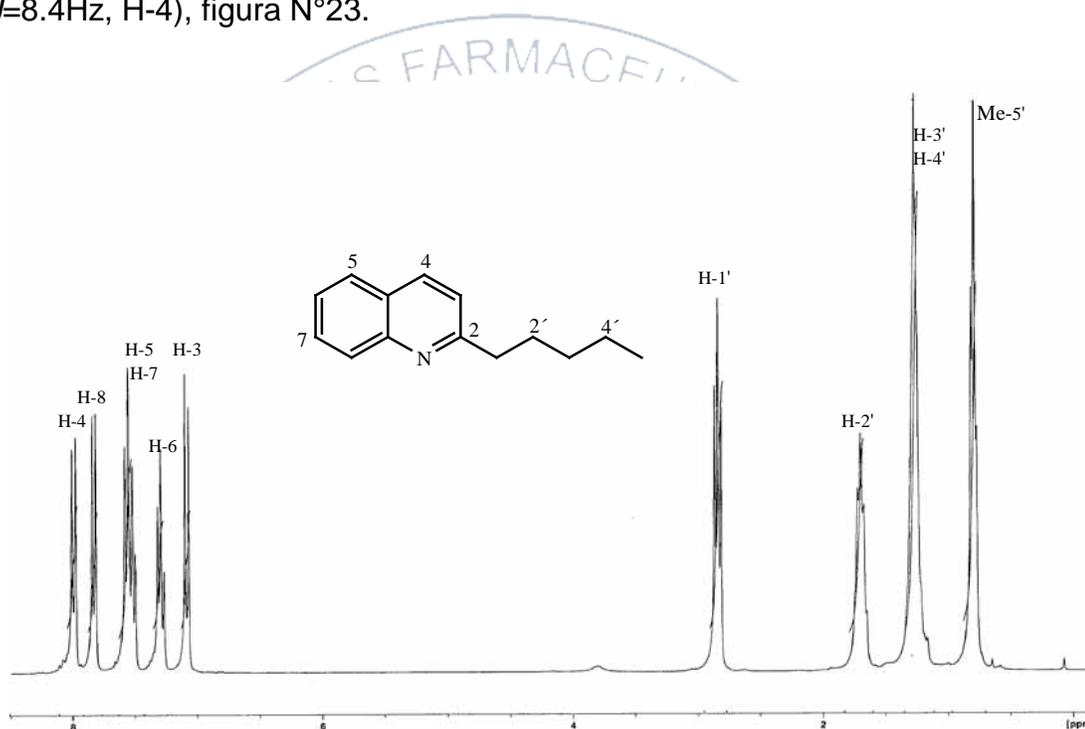


Figura N°23. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de 7.

En su espectro de RMN-<sup>13</sup>C y los experimentos DEPT 90 y 135, se observaron señales en la región alifática de cinco átomos de carbono, un metilo a  $\delta_C$ : 13.7 (C-5') y cuatro metilenos a  $\delta_C$ : 22.2 (C-4'), 29.3 (C-2'), 31.4 (C-3'), 38.8 (C-1'), así mismo se observaron en la región aromática nueve átomos de carbono, seis metínicos a  $\delta_C$ : 120.9 (C-3), 125.2 (C-6), 127.0 (C-5), 128.4 (C-7), 128.8 (C-8), 135.7 (C-4) y tres cuaternarios a  $\delta_C$ : 126.3 (C-9), 147.5 (C-10), 162.5 (C-2), el conjunto de estos datos determinan la estructura de 7 como 2-*n*-

pentil-quinolina acorde a los datos reportados en la literatura,<sup>2,3</sup> figura N°24 y N°25.

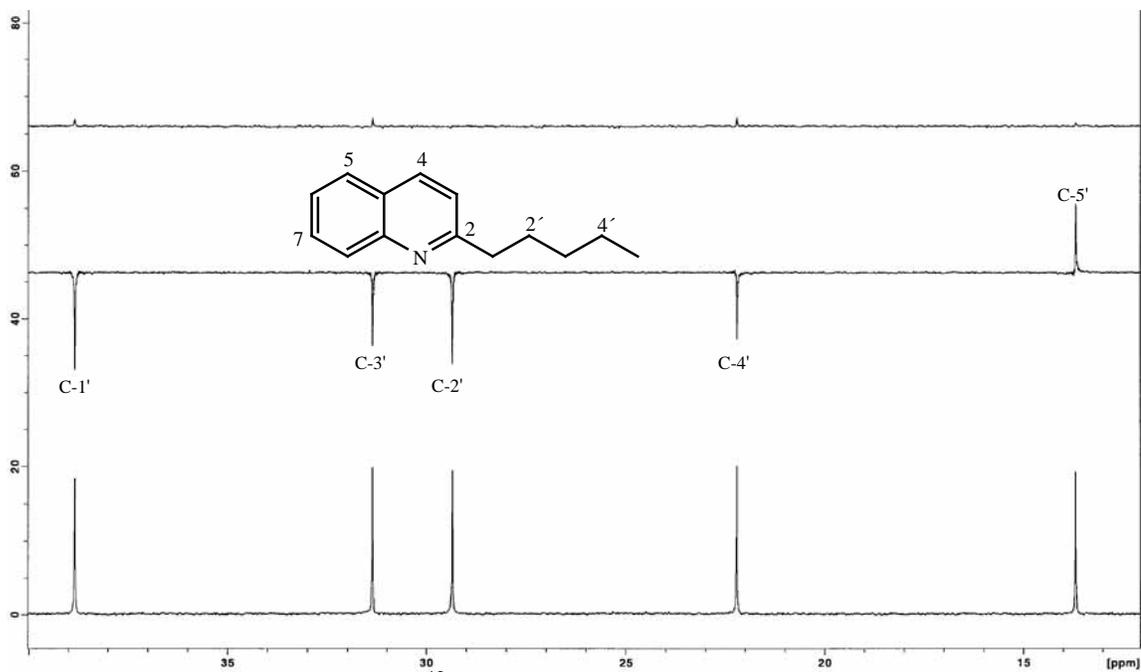


Figura N°24. Espectro de RMN <sup>13</sup>C, DEPT 90 y 135 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), región alifática de 7.

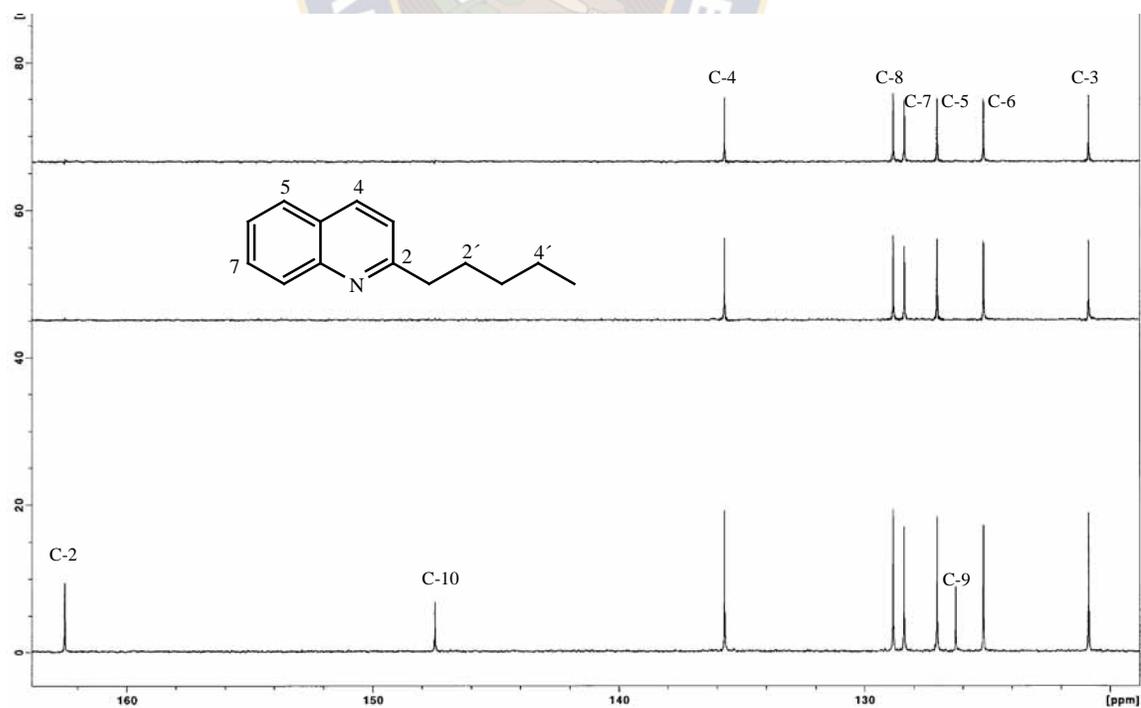
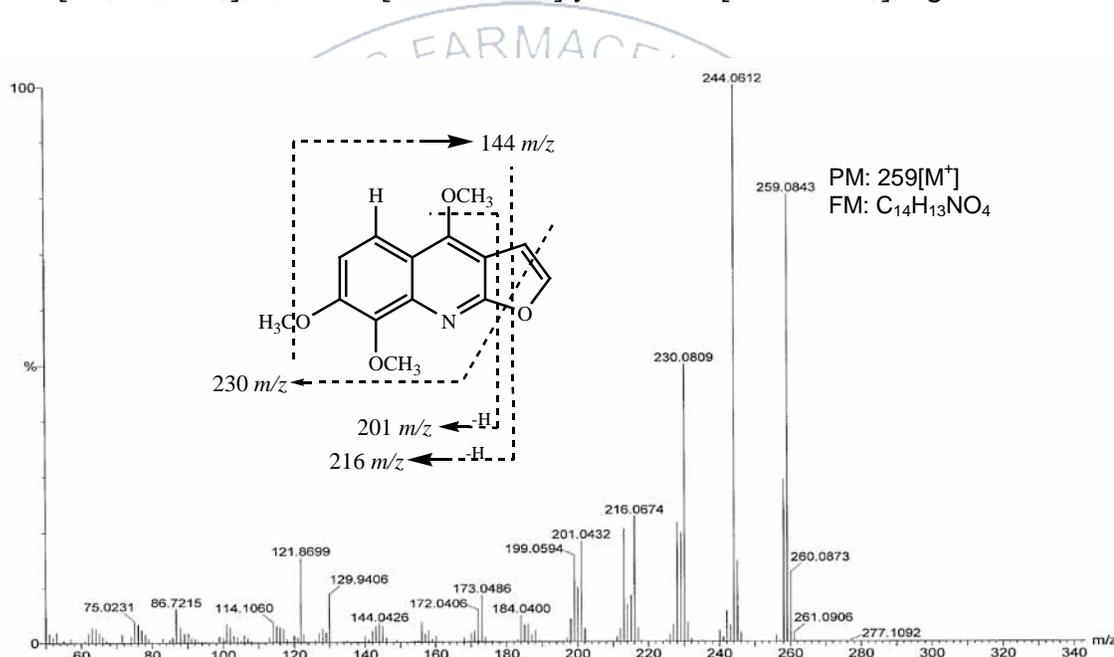


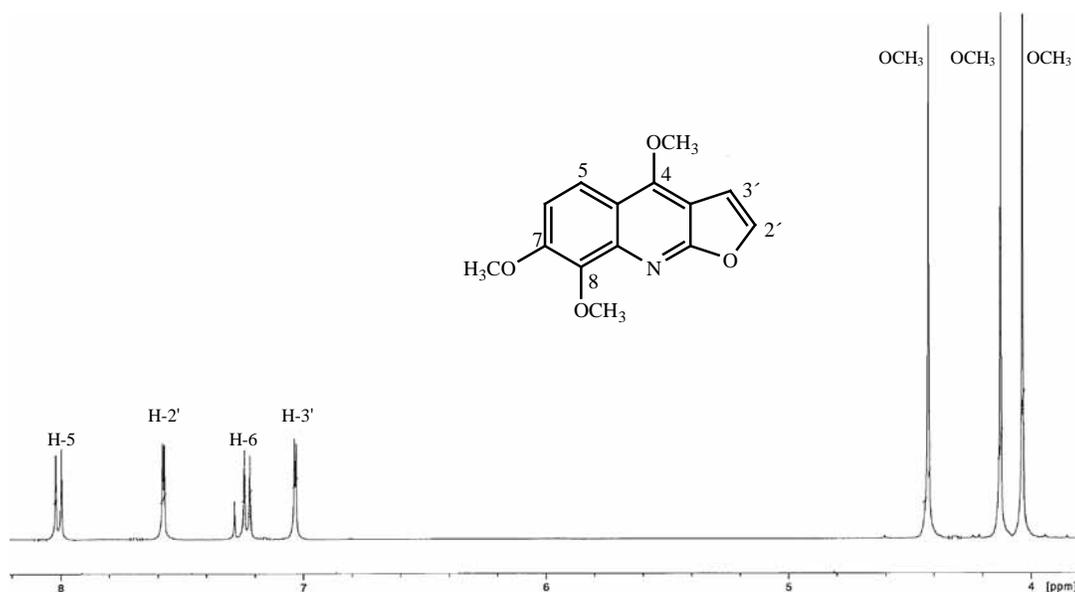
Figura N°25. Espectro de RMN <sup>13</sup>C, DEPT 90 y 135 (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), región aromática de 7.

## Determinación estructural del compuesto 13

El compuesto **13** de características físicas: sólido, blanco, amorfo, punto de fusión: 157°C, muestra en su espectro de masas un ión molecular a 259  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{14}H_{13}NO_4$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos significativos a 244  $m/z$  [ $C_{13}H_{10}NO_4$ ], 230  $m/z$  [ $C_{13}H_{12}NO_3$ ], 216  $m/z$  [ $C_{12}H_{10}NO_3$ ] y 201  $m/z$  [ $C_{11}H_7NO_3$ ], figura N°26.

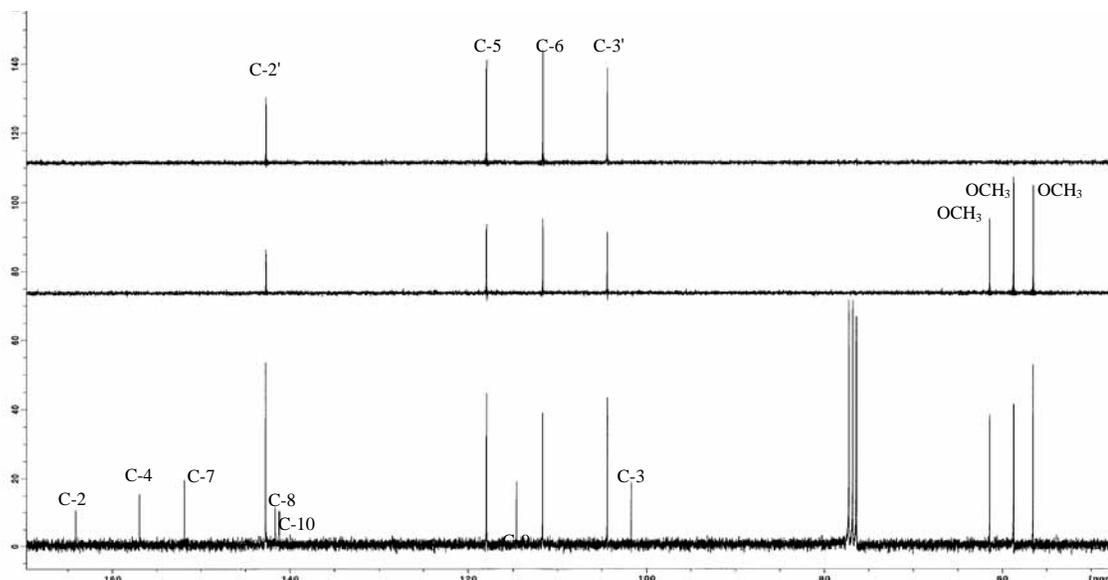


En su espectro de RMN- $^1H$  en la región alifática se observaron tres singuletes a  $\delta_H$ : 4.01 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 4.10 (3H, s, OCH<sub>3</sub>) y 4.40 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), correspondientes a grupos metoxilos, así mismo en la región aromática se observaron cuatro dobletes a  $\delta_H$ : 7.00 (1H, d,  $J=2.8$ Hz, H-3'), 7.20 (1H, d,  $J=9.4$ Hz, H-6), 7.55 (1H, d,  $J=2.8$ Hz, H-2') y 7.98 (1H, d,  $J=9.4$ Hz, H-5), figura N°27.



**Figura N°27.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **13**.

En su espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  y los experimentos DEPT 90 y 135, en la región alifática se observaron señales para tres metoxilos a  $\delta_{\text{C}}$ : 56.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 58.7 ( $\text{OCH}_3$ ) y 61.4 ( $\text{OCH}_3$ ), en la región aromática se observaron cuatro carbonos metínicos a  $\delta_{\text{C}}$ : 104.4 (C-3'), 111.7 (C-6), 117.9 (C-5) y 142.7 (C-2'), así mismo se observaron siete carbonos cuaternarios a  $\delta_{\text{C}}$ : 101.7 (C-3), 114.6 (C-9), 141.2 (C-10), 141.7 (C-8), 151.9 (C-7), 156.9 (C-4) y 164.1 (C-2), figura N°28.



**Figura N°28.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de **13**.

La estructura fue confirmada mediante el estudio de los experimentos bidimensionales homo (COSY y ROESY) y heteronucleares (HSQC y HMBC). Así, podemos observar en el experimento HMBC como correlaciones más significativas la del protón H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  7.55) con los carbonos C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  164.1) y C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  101.7), el  $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.40) con el carbono C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  156.9), permitiendo ubicar uno de los metoxilos sobre C-4, así mismo las correlaciones del protón H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  7.98) con los carbonos C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  156.9), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  151.9) y C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  141.2), el protón H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  7.20) con los carbonos C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  141.7) y C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  114.6), los protones del  $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.01) con el carbono C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  151.9) y  $\text{OCH}_3$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.10) con el carbono C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  141.7), el conjunto de estos datos nos permitieron determinar la estructura de **13** como shiquimianina, acorde a los datos reportados en la literatura,<sup>4</sup> figura N°29.

<sup>4</sup> Ambrozin, A. R. *Estudio fitoquímico de plantas de familias Rutaceae y Meliaceae, aislamiento de sustancias prototipos para el desarrollo de nuevos fármacos antichagásicos e antileishmaniosis*, Tesis Doctoral. **2004**, 91-93.

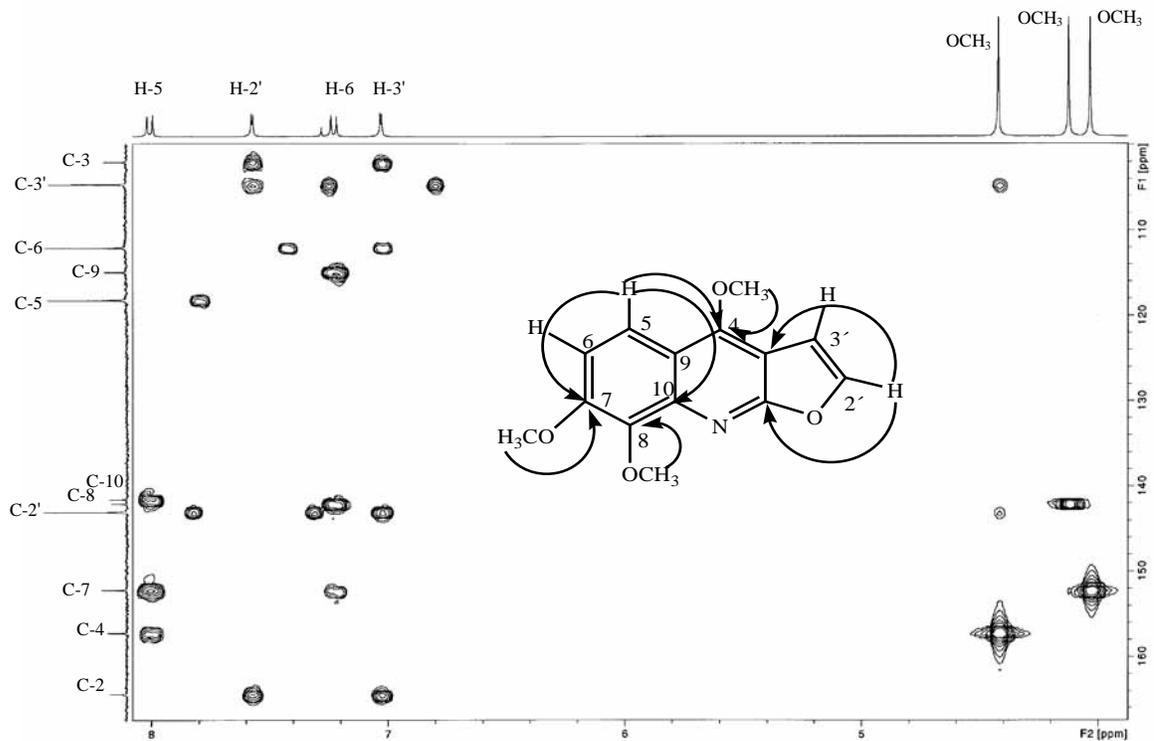


Figura N°29. Experimento HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) de **13**.

### Determinación estructural del compuesto **28**

El compuesto **28** sólido blanco, muestra en su espectro de masas un ión molecular a 229  $m/z$ , correspondiente a una formula molecular  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos significativos a 214  $m/z$  [ $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{NO}_3$ ], 186  $m/z$  [ $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{NO}_2$ ] y 149  $m/z$  [ $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_2$ ], figura N°30.

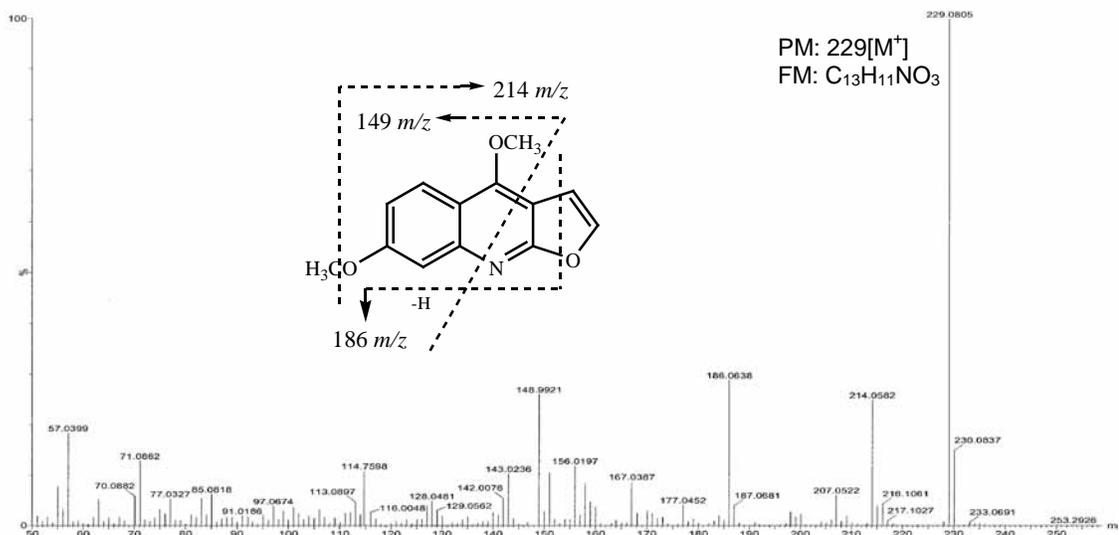


Figura N°30. Espectro de masas de baja resolución de **28**.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H en la región alifática se observaron dos singuletes a  $\delta_H$ : 3.94 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>) y 4.43 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>) correspondientes a dos metoxilos, en la región aromática se observaron señales como un doblete a  $\delta_H$ : 7.09 (1H, dd,  $J=9.3$  y  $2.5$ Hz, H-6), así mismo cuatro dobletes a  $\delta_H$ : 7.05 (1H, d,  $J=2.8$ Hz, H-3'), 7.32 (1H, d,  $J=2.2$ Hz, H-8), 7.57 (1H, d,  $J=2.8$ Hz, H-2') y 8.15 (1H, d,  $J=9.3$ Hz, H-5), el conjunto de estos determinan la estructura de (**28**) como evolitrina, acorde a los datos reportados en la literatura,<sup>5</sup> figura N°31.

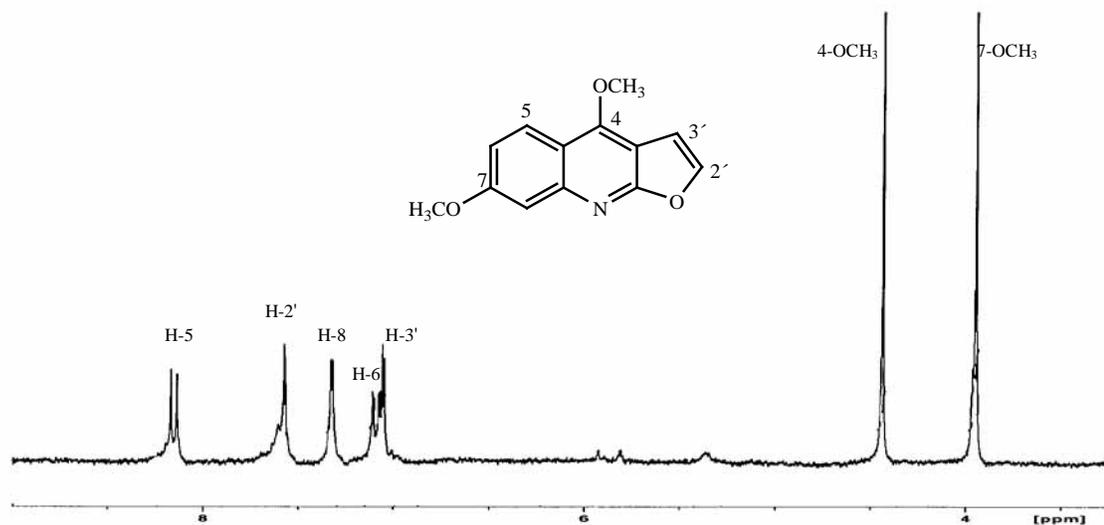
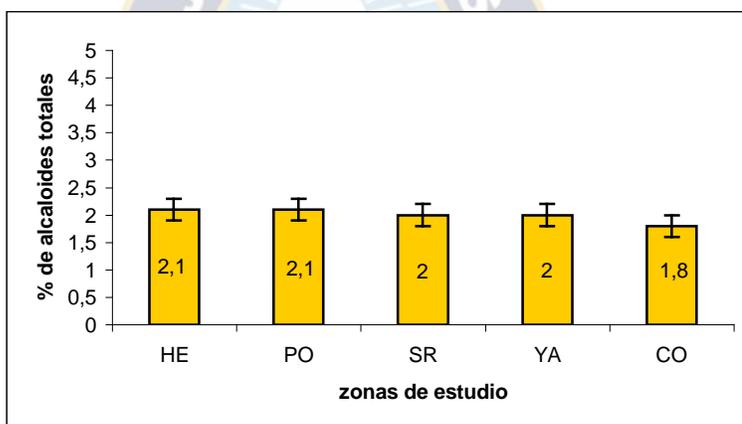


Figura N°31. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de **28**.

<sup>5</sup> Andrade, M. R. *Alcaloides de Rutaceae: Química y actividad biológica*, Tesis Doctoral en Química. **2003**, 120-122.

## Análisis comparativo de alcaloides totales obtenido de corteza de *G. longiflora* recolectadas en diferentes zonas

Siguiendo con los objetivos planteados en la presente memoria obtuvimos los alcaloides totales de corteza de árboles *G. longiflora* de la zona de Hernández (**HE**), Luz Porvenir (**PO**), Santa Rosa (**SR**), Y-abanico (**YA**) y Covendo (**CO**), de acuerdo a metodología descrita anteriormente. El porcentaje de alcaloides totales obtenidos en las zonas de (**HE**) y (**PO**) fue 2.1%, seguido de (**SR**), (**YA**) con 2.0% y (**CO**) con 1.8%, figura N°32.



**Figura N°32.** Porcentaje de alcaloides totales de corteza árboles de las zonas de HE, PO, SR, YA y CO.

Posteriormente, los alcaloides totales obtenidos de las muestras de **HE**, **PO**, **SR**, **YA**, **CO**, fueron sometidos a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna, utilizando como sistema de elusión mezclas de éter de petróleo- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80:20),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (95:5), obteniéndose 3 fracciones (**I-III**).

En todas las fracciones **I** se observó la precipitación de cristales blancos en forma de agujas, el cual fue identificado como 2-fenilquinolina. El análisis del contenido de alcaloides en la fracción **I** de la zona de **YA** (66.1%) fue el de mayor porcentaje de rendimiento, seguido de la zonas **HE** (63%), **SR** (61.5%), **CO** (58.4%), y **PO** (49.4%), figura N°33.

Las fracciones **II**, todos de aspecto aceitoso, el contenido de alcaloides en la zona de **PO** (23%) fue el mayor porcentaje, en las zonas de **HE** (6.8%) y **CO** (6.1%) fueron los de menores porcentajes, figura N°33.

Las fracciones **III**, todos de aspecto aceitoso, el contenido de alcaloides en la zona de **HE** (31.7%) fue el de mayor porcentaje y en la zona de **YA** (1.3%) fue el de menor porcentaje, figura N°33.

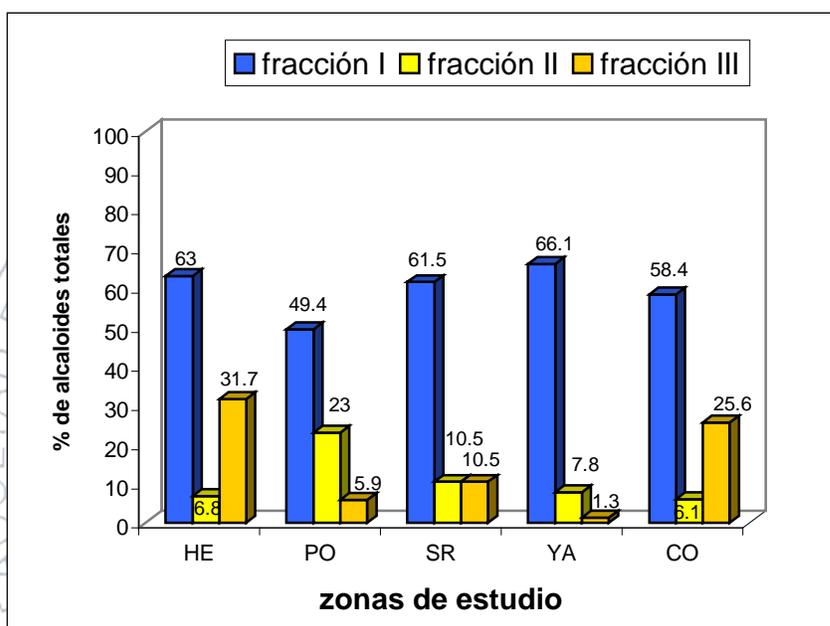


Figura N°33. Porcentaje de las fracciones I, II y III a partir de 1 g de alcaloides totales de corteza de árboles de HE, PO, SR, YA y CO.

### Análisis químico comparativo de alcaloides presentes en la corteza de árboles recolectadas en cinco zonas

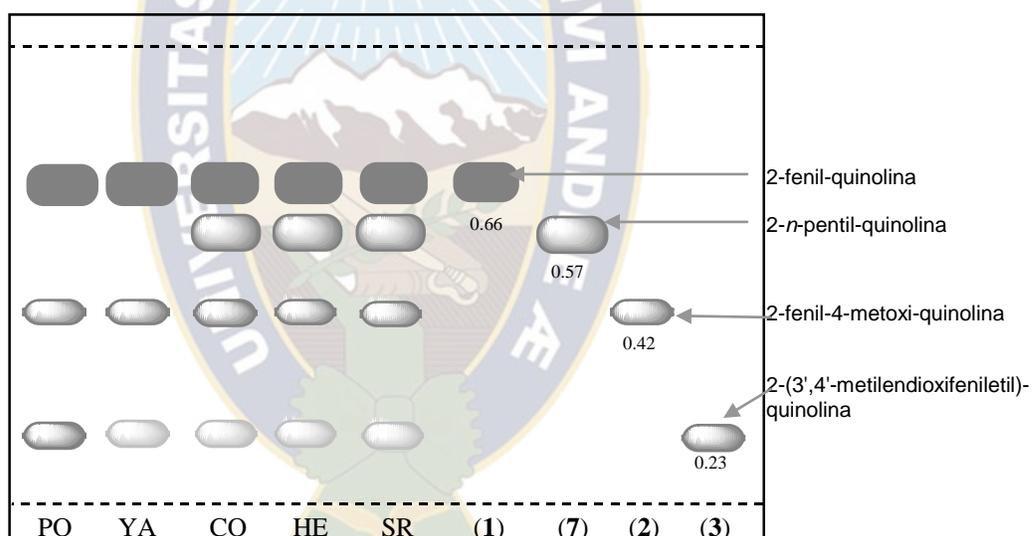
Las fracciones **I**, **II**, **III** de las muestras de **PO**, **YA**, **CO**, **HE**, **SR**, fueron separadas mediante cromatografía en placa fina para definir los perfiles cromatográficos y realizar el análisis químico comparativo con los patrones de referencia: 2-fenil-quinolina (**1**), 2-fenil-4-metoxi-quinolina (**2**), 2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**3**), 2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina (**4**), 2-*n*-pentil-quinolina (**7**), shiquimianina (**13**) y evolitrina (**28**).

La fracción (**F-I**), fue analizada mediante cromatografía en placa fina utilizando como sistema de elución *n*-hexano-Et<sub>2</sub>O (90:10), identificándose en todas ellas la presencia de un compuesto mayoritario, la 2-fenil-quinolina (**1**), así mismo otros compuestos en pequeña proporción que se detallan en la tabla N°4 y figura N°34.

**Tabla N°4.** Compuestos identificados en la fracción I de muestras de PO, YA, CO, HE y SR.

FRACCION I	R <sub>f</sub>	PO	YA	CO	HE	SR
2-fenil-quinolina ( <b>1</b> )	0.66	+	+	+	+	+
2- <i>n</i> -pentil-quinolina ( <b>7</b> )	0.57	-	-	+	+	+
2-fenil-4-metoxi-quinolina ( <b>2</b> )	0.42	+	+	+	+	+
2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina ( <b>3</b> )	0.23	+	+/-	+/-	+/-	+/-

(+) Presencia, (+/-) poca cantidad, y (-) ausencia de compuestos.



**Figura N°34.** CCF (*n*-hexano-Et<sub>2</sub>O 90:10) de la fracción I.

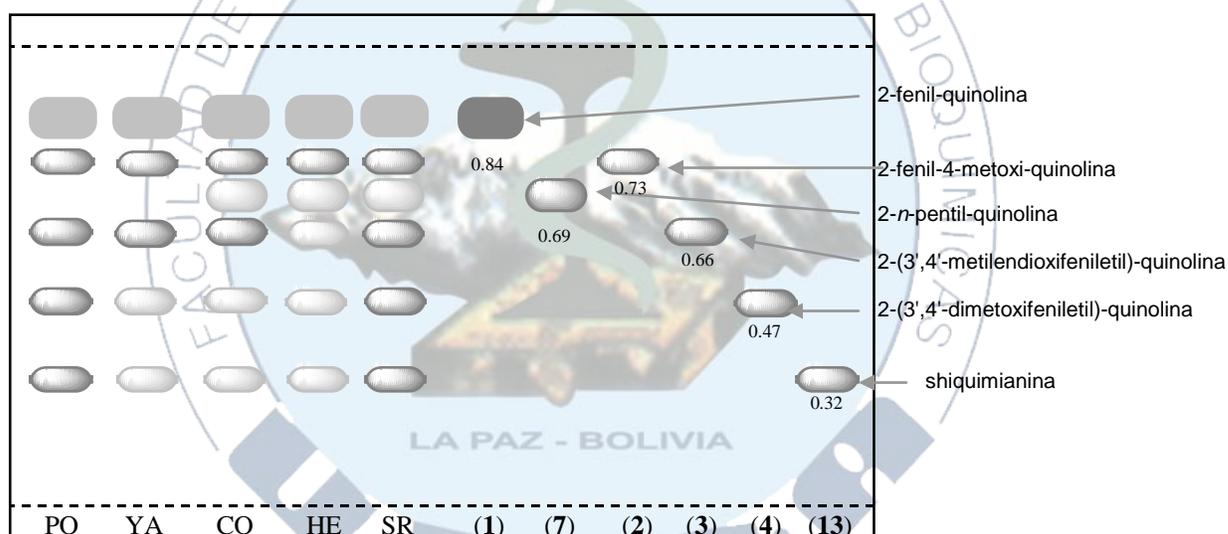
En la muestra de **PO**, además se observó la presencia de dos productos no identificados con R<sub>f</sub> = 0.28 y 0.15.

La fracción (F-II), fue analizada mediante cromatografía en placa fina utilizando como sistema de elusión  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-Me}_2\text{CO}$  (95:5), identificándose en todas ellas la presencia de los compuestos que se detallan en la tabla N°5 y figura N°35.

**Tabla N°5.** Compuestos identificados en la fracción II de muestras de PO, YA, CO, HE y SR.

FRACCION II	R <sub>f</sub>	PO	YA	CO	HE	SR
2-fenil-quinolina (1)	0.84	+	+	+	+	+
2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)	0.73	+	+	+	+	+
2- <i>n</i> -pentil-quinolina (7)	0.69	-	-	+/-	+/-	+/-
2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-quinolina (3)	0.66	+	+	+	+/-	+
2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina (4)	0.47	+	+/-	+/-	+/-	+
Shiquimianina (13)	0.32	+	+/-	+/-	+/-	+

(+) Presencia, (+/-) poca cantidad, y (-) ausencia de compuestos.



**Figura N°35.** CCF ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-Me}_2\text{CO}$  95:5) de la fracción II.

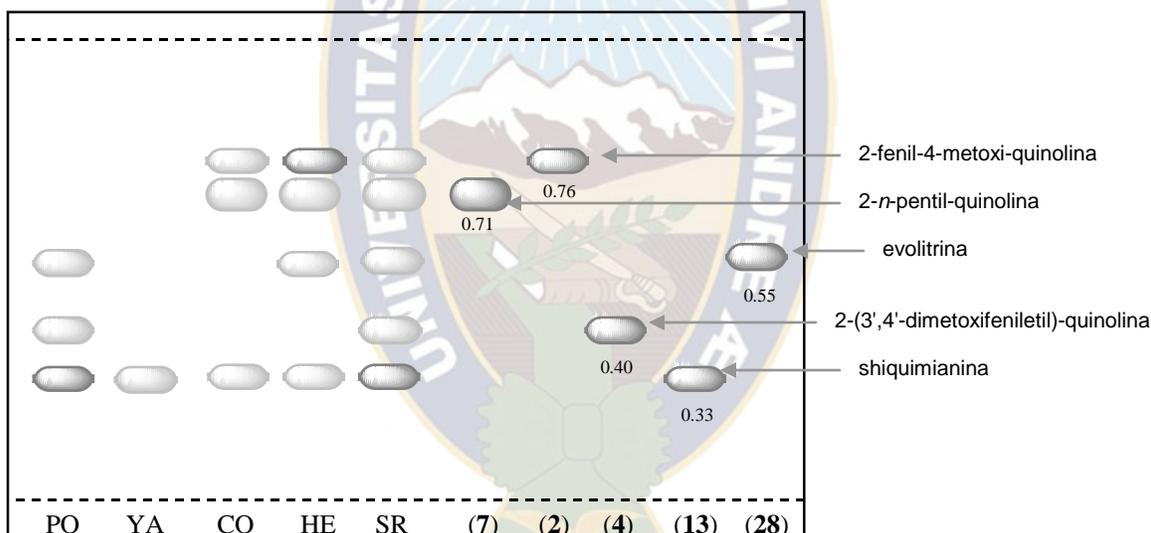
Por otra parte se observó en todas las fracciones la presencia de dos productos no identificados con R<sub>f</sub> = 0.60 y 0.53; en las muestras de **PO** y **SR** dos productos con R<sub>f</sub> = 0.5 y 0.37.

La fracción (**F-III**), fue analizada mediante cromatografía en placa fina utilizando como sistema de elución CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5), identificándose en todas ellas la presencia de los compuestos que se detallan en la tabla N°6 y figura N°36.

**Tabla N°6.** Compuestos identificados en la fracción III de muestras de PO, YA, CO, HE y SR.

FRACCION III	R <sub>f</sub>	PO	YA	CO	HE	SR
2-fenil-4-metoxi-quinolina ( <b>2</b> )	0.76	-	-	+/-	+/-	+/-
2- <i>n</i> -pentil-quinolina ( <b>7</b> )	0.71	-	-	+/-	+/-	+/-
Evolitrina ( <b>28</b> )	0.55	+/-	-	-	+/-	+/-
2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina ( <b>4</b> )	0.40	+/-	-	-	-	+/-
Shiquimianina ( <b>13</b> )	0.33	+	+/-	+/-	+/-	+

(+) Presencia, (+/-) poca cantidad, y (-) ausencia de compuestos.



**Figura N°36.** CCF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5) de la fracción III.

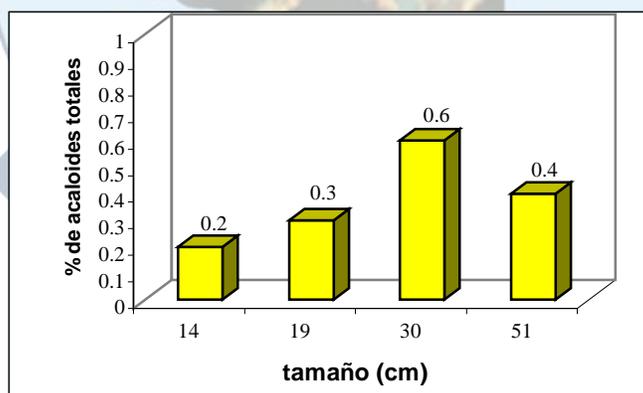
También se observaron en las muestras de **PO** y **SR** tres productos no identificados con R<sub>f</sub> = 0.60, 0.52 y 0.45.

Analizando las fracciones **I**, **II** y **III**, de las muestras de **PO** y **YA** podemos deducir la ausencia de 2-*n*-pentil-quinolina (**7**); por otro lado en la fracción **III** de las muestras de **YA** y **CO** no se observa la presencia de evolitrina (**28**).

## Análisis comparativo de alcaloides totales de plantines

En el estudio de los diferentes plantines, colectadas dentro de una “mancha de Evanta de plantines”, el promedio de crecimiento fue de 4 cm de altura en un periodo de 10 meses; clasificando a los plantines en 4 grupos de acuerdo al tamaño los de 14, 19, 30 y 51 cm.

La corteza de los plantines, fue sometida a extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y posterior extracción ácido-base (de acuerdo a metodología descrita) se obtuvieron los alcaloides totales de los plantines de cada una de las muestras. El análisis del contenido de alcaloides totales en los plantines de diferentes tamaños, nos muestra que los plantines de **14 cm** fue el de menor porcentaje de rendimiento (0.2%), en el de **19 cm** se observó un ligero aumento (0.3%) respecto al de **14 cm**; sin embargo en el de **30 cm** se observó un mayor porcentaje (0.6%), seguidamente en el de **51 cm** hay un descenso (0.4%) del contenido de alcaloides totales, figura N°37.



**Figura N°37.** Porcentaje de alcaloides totales de corteza de plantines de 14 cm, 19 cm, 30 cm, 51 cm.

Los alcaloides totales de plantines de **14 cm**, **19 cm**, **30 cm**, **51 cm** de tamaño, fueron sometidos a un fraccionamiento cromatográfico utilizando como sistema de elusión mezclas de: éter de petróleo- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80:20),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (95:5), obteniéndose 3 fracciones (**I-III**).

En todas las fracciones I se observó la precipitación de cristales blancos en forma de agujas, el cual fue identificado como 2-fenil-quinolina (1), mientras que las fracciones II y III presentaban un aspecto aceitoso. El análisis del contenido de alcaloides en los plantines se observa en la figura N°38.

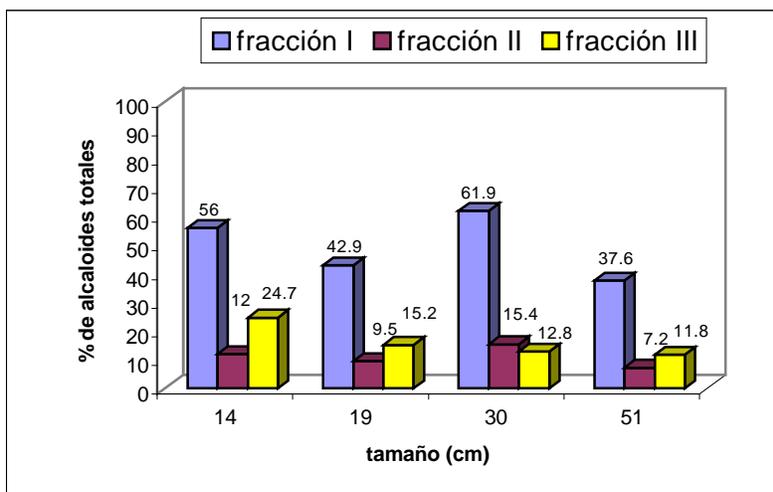


Figura N° 38. Porcentaje de las fracciones I, II y III a partir de 1 g de alcaloides totales de plantines de 14 cm, 19 cm, 30 cm y 51 cm.

### Análisis químico comparativo de alcaloides presentes en la corteza de plantines de diferentes tamaños

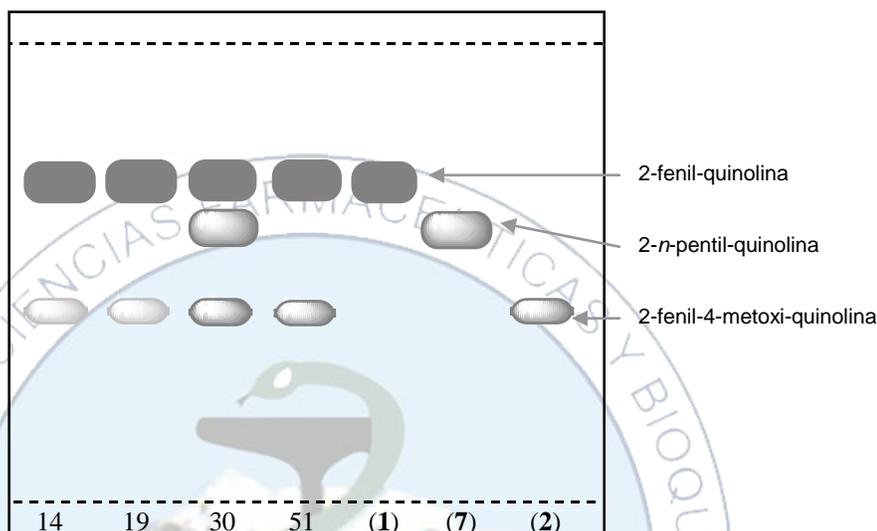
Las fracciones I, II y III, de los plantines de 14, 19, 30 y 51 cm fueron analizadas mediante cromatografía en placa fina y comparadas con patrones de referencia para definir los perfiles cromatográficos en cada una de las fracciones.

La fracción (F-I), fue analizada mediante cromatografía en placa fina utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-Et<sub>2</sub>O (90:10), identificándose en todas ellas en mayor proporción la presencia de 2-fenil-quinolina (1), así mismo compuestos en pequeña proporción que se detallan en la tabla N°7 y figura N°39.

**Tabla N°7.** Compuestos identificados en la fracción I de muestras de plantines de 14 cm, 19 cm, 30 cm y 51 cm.

FRACCIÓN I	R <sub>f</sub>	14	19	30	51
2-fenil-quinolina (1)	0.66	+	+	+	+
2-n-pentil-quinolina (7)	0.57	-	-	+	-
2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)	0.42	+/-	+/-	+	+

(+) Presencia, (+/-) poca cantidad, y (-) ausencia de compuestos.



**Figura N°39.** CCF (*n*-hexano-Et<sub>2</sub>O 90:10) de la fracción I de plantines.

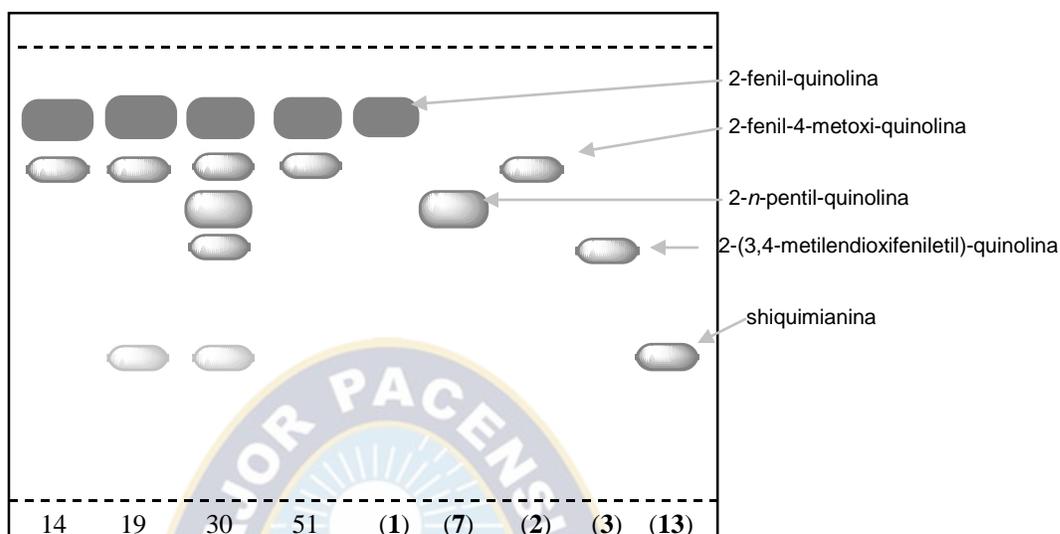
Por otra parte, en los plantines de **30 cm** y **51cm** de tamaño también se observó la presencia de un producto no identificado con un R<sub>f</sub> = 0.43.

La fracción (**F-II**) fue analizada mediante cromatografía en placa fina utilizando como sistema de elusión CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Me<sub>2</sub>CO (95:5), identificándose los compuestos que se detallan en la tabla N°8 y figura N°40.

**Tabla N°8.** Compuestos identificados en la fracción II de muestras de plantines de 14 cm, 19 cm, 30 cm y 51 cm.

FRACCIÓN II	R <sub>f</sub>	14	19	30	51
2-fenil-quinolina (1)	0.84	+	+	+	+
2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)	0.73	+	+	+	+
2-n-pentil-quinolina (7)	0.69	-	-	+	-
2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (3)	0.66	-	-	+	-
Shiquimianina (13)	0.32	-	+/-	+/-	-

(+) Presencia, (+/-) poca cantidad, y (-) ausencia de compuestos.



**Figura N°40.** CCF ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-Me}_2\text{CO}$  95:5) de la fracción II de plantines.

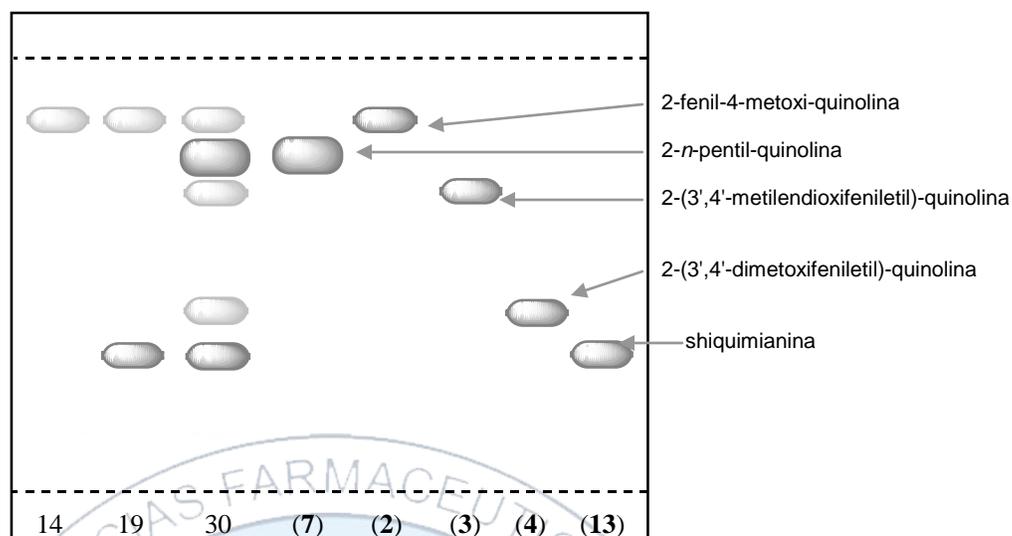
Por otra parte, se observó en los plantines de **14 cm** y **19 cm** la presencia de dos productos no identificados de  $R_f = 0.51$  y  $0.47$ .

La fracción (**F-III**) fue analizada mediante cromatografía en placa fina utilizando como sistema de elución  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (95:5), identificándose la presencia de los compuestos que se detallan en la tabla N°9 y figura N°41.

**Tabla N°9.** Compuestos identificados en la fracción III de muestras de plantines de 14 cm, 19 cm, 30 cm y 51 cm.

<b>FRACCION III</b>	<b>R<sub>f</sub></b>	<b>14</b>	<b>19</b>	<b>30</b>	<b>51</b>
2-fenil-4-metoxi-quinolina ( <b>2</b> )	0.76	+/-	+/-	+/-	-
2-n-pentil-quinolina ( <b>7</b> )	0.71	-	-	+	-
2-(3',4'-metilendioxifeniletíl)-quinolina ( <b>3</b> )	0.67	-	-	+/-	-
2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina ( <b>4</b> )	0.40	-	-	+/-	-
Shiquimianina ( <b>13</b> )	0.33	-	-	+	-

(+) Presencia, (+/-) poca cantidad, y (-) ausencia de compuestos.



**Figura N°41.** CCF (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 95:5) de la fracción III de plantines.

Por otra parte en los plantines de **30 cm** y **51 cm** se observó la presencia de cuatro productos no identificados con  $R_f = 0.5, 0.36, 0.33$  y  $0.26$ .

Las fracciones **I**, **II** y **III**, de los plantines de **14 cm**, **19 cm** y **51 cm** no presenta 2-*n*-pentil-quinolina, sin embargo en la muestra de **30 cm** se evidencia claramente; por otro lado en las mismas fracciones no se observa la 2-(3',4'-metilendioxfifeniletil)-quinolina (**3**). Es importante resaltar que en los plantines de **30 cm** se identificaron seis de alcaloides quinolinicos (**1**, **2**, **3**, **4**, **7** y **13**) presentes en las plantas adultas.

### **Elaboración de la emulsión con el extracto de alcaloides totales de *G. longiflora***

Habiendo identificado los componentes presentes en el extracto de alcaloides totales de corteza de *G. longiflora*, y siguiendo con uno de los objetivos de la presente memoria, se ha desarrollado la formulación de una emulsión con el extracto de alcaloides totales.

## Preparación de jarabe simple

Se pesaron 204 g de sacarosa y se disolvió en 60 mL de agua destilada esterilizada, luego aforado a un volumen final de 120 mL, mezclados sobre un agitador magnético hasta obtener una solución homogénea, posteriormente con la finalidad de clarificar la solución, fue llevado a una filtración al vacío.

## Preparación de la emulsión de alcaloides totales de *G. longiflora*

Todos los componentes de la formulación que se describen en la tabla N°10 fueron pesados y medidos. Posteriormente en un baño María (65°C) fue atemperado un envase cónico metálico, al cual se añadieron glicerina (240 mL), propilparabeno (0.2 g), metilparabeno (2 g) y los alcaloides totales (20 g), los cuales fueron mezclados hasta obtener una solución homogénea, manteniendo la temperatura entre 60-65°C. La solución fue llevado a temperatura ambiente y se adicionó aceite de maíz (420 mL), polisorbato 20 (40 mL), jarabe simple (240 mL) y saborizante (60 mL); toda la solución obtenida fue llevado a agitación por una hora hasta obtener una solución homogénea. Luego fueron trasvasados en los envases opacos correspondientes e identificados. Todo el proceso de preparación, fue efectuado en condiciones de esterilidad.

**Tabla N°10.** Componentes para la elaboración de la emulsión de *G. longiflora*

<b>Componentes</b>	<b>1000 mL Cantidad</b>
Glicerina	240 mL
Aceite de Maíz	420 mL
Jarabe simple	240 mL
Tween 20	40 mL
Alcaloides totales de <i>G.longiflora</i>	20 g
saborizante	60 mL
Propil parabeno	0.2 g
Metil parabeno	2 g
<i>Stevia rebaudiana</i>	0.02 g



**Metodología:**  
*Galipea longiflora*

## **Obtención de alcaloides totales de *Galipea longiflora***

### **Colección del material vegetal**

La corteza de los árboles de *Galipea longiflora* (Rutaceae) fue colectada en el departamento de La Paz en las comunidades de:

- ✓ Santa Rosa de Maravilla (**SR**), entre las latitudes sud: 13°56'587 y oeste: 68°00'308, a 293 m.s.n.m., en la provincia Abel Iturralde, en los meses de agosto y septiembre de 2006.
- ✓ Hernández (**HE**), entre las latitudes sud: 15°21'302-15°21'342 y oeste: 67°20'238-67°20'345, a 514 m.s.n.m., de la Provincia Sud Yungas, en el mes de agosto de 2007.
- ✓ Covendo (**CO**), Y-abanico (**YA**) y Luz Porvenir (**PO**) de la provincia Sud Yungas, colectadas en el mes de agosto de 2007.

Por otra parte, se colectaron la corteza de 160 plantines de un tamaño promedio de **14 cm, 19 cm, 30 cm y 51 cm**, en la comunidad de Santa Rosa de Maravilla (latitudes sud: 13°57'321 y oeste: 68°00'430, a 304 m.s.n.m.), de la Provincia A. Iturralde del departamento de La Paz, en septiembre de 2006.

Su identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con las muestras de vaucher (AS49, SD17) del Herbario Nacional de La Paz, Bolivia.

### **Preparación del extracto crudo a escala piloto**

La corteza seca finamente molida (15 Kg) fue macerado por 5 días en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (75 L), en tres diferentes percoladores cónicos de acero inoxidable 316L (diámetro inferior 22 cm x diámetro superior 42 cm x 74 cm de alto), cada percolador con 5 Kg de corteza y 25 L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , posteriormente fue filtrado, evaporado a 40°C en el rotaevaporador y secado con una bomba de alto vacío hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 4.6% con relación al peso seco de la planta.

## Tiempo de maceración y punto de saturación del solvente

Durante la maceración se obtuvo 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (fase orgánica) del percolador, una vez por día, este fue filtrado y sometido a tres lavados sucesivos con 1 mL de HCl 1N, agitado por 1 minuto, posteriormente se separó la fase ácida de la fase orgánica, de la fase ácida 200 uL fueron disueltos en 3 mL de HCl, luego se obtuvieron las absorbancias a una longitud de onda de 332 nm en el espectrofotómetro de luz UV-Visible (Cintra 5), y se aplicó la siguiente fórmula<sup>1</sup> para hallar la concentración:

$$X = \frac{Y - 0.3769}{45.273}$$

Y = absorbancia de la muestra

X = concentración mg/mL

## Obtención de alcaloides totales a escala piloto

El extracto crudo (690 g) fue disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.5 L) y sometido a lavados sucesivos con HCl 1N (1 L x 3 veces, c/u por 10 minutos en agitadores mecánicos a 1800-2000 rpm). Los lavados ácidos fueron controlados con un espectrofotómetro de luz UV-Visible (Cintra 5), combinados y llevados a precipitación completa con NaOH 2N (1.5 L). El sólido formado fue extraído con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 L x 3 veces). La solución orgánica fue secada con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, filtrada, y evaporada a 40°C en el rotaevaporador y llevado a sequedad al vacío hasta peso constante, obteniéndose 300 g de alcaloides totales, 2% con relación al peso seco de la planta.

<sup>1</sup> Avila, J. A. Formula obtenido del cuaderno de laboratorio del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, 2007.

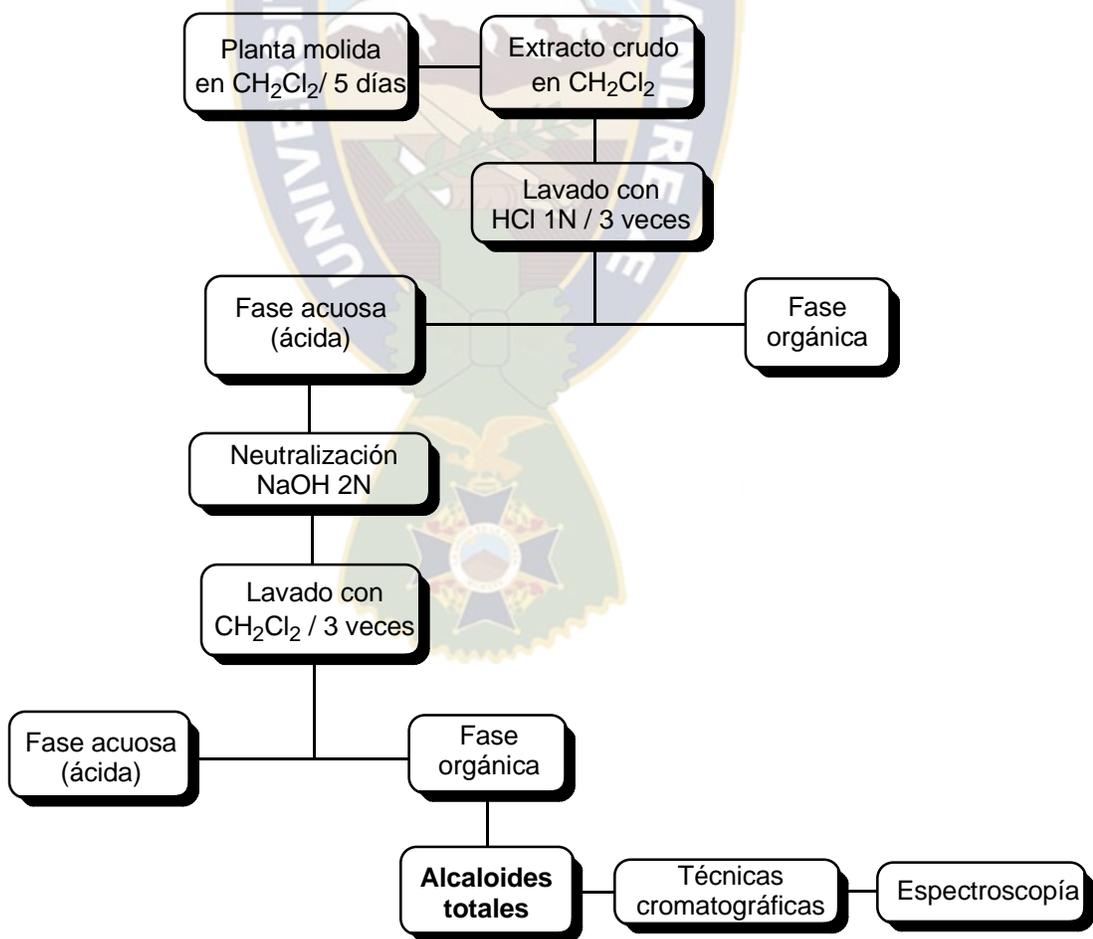
## Obtención de alcaloides totales de corteza de árboles y de plantines

Una vez secas y pulverizadas las cortezas de árboles y de plantines de *G. longiflora* fueron pesadas como se detallan a continuación:

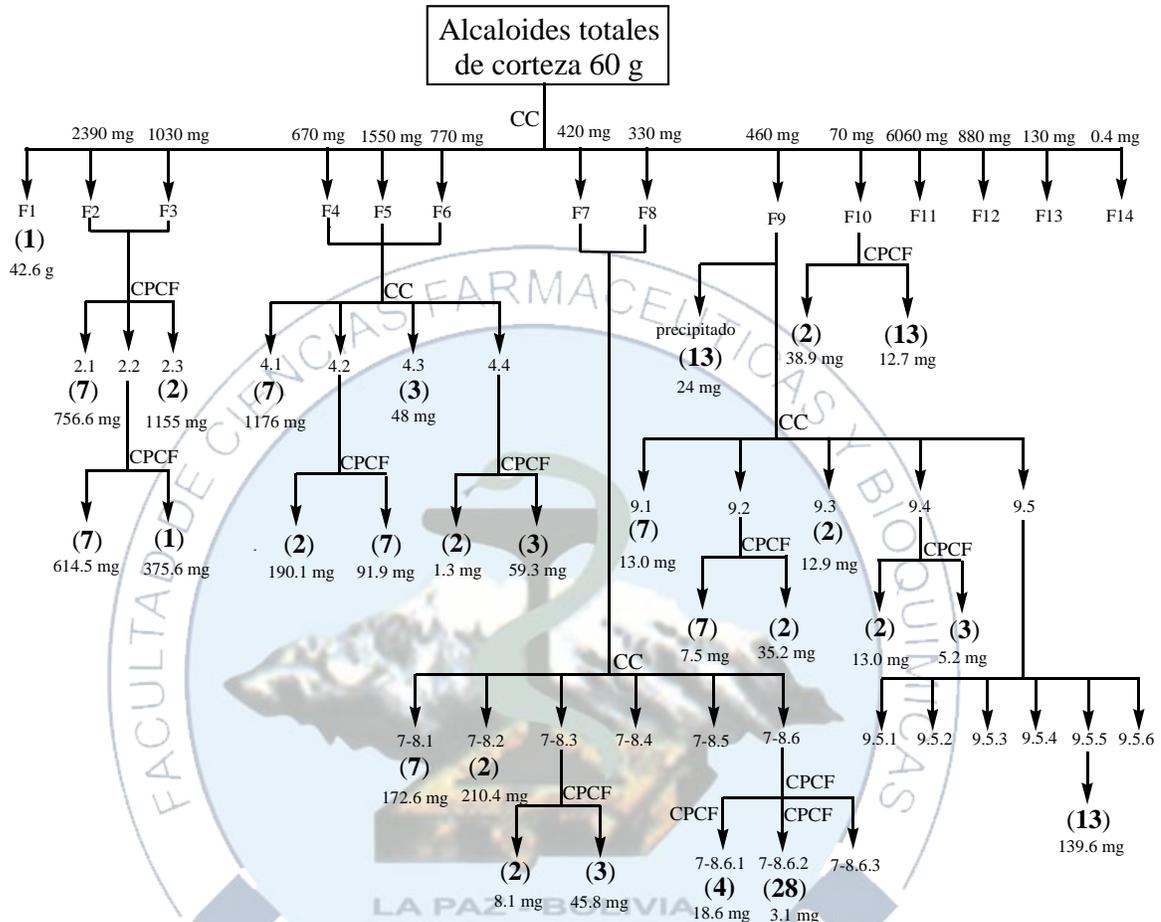
árboles zonas	peso corteza	plantines tamaño	peso corteza
SR	200 g	14 cm	8.7 g
HE	200 g	19 cm	7.3 g
CO	197.2 g	30 cm	24.1 g
YA	197.6 g	51 cm	21.4 g
PO	200 g		

Posteriormente de todas ellas se obtuvieron los extractos crudos y los alcaloides totales como se detalla en el siguiente esquema:

### Obtención de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora*



## Aislamiento de metabolitos bioactivos de la corteza de *Galipea longiflora*



### Separación y aislamiento de los componentes de alcaloides totales

El extracto de alcaloides totales (60 g) fue fraccionado por cromatografía en columna, utilizando como sistema de elusión mezclas de tolueno-Et<sub>2</sub>O, en orden creciente de polaridad, tolueno-MeOH (80:20), obteniéndose 14 fracciones (F1-F14).

De la fracción **F1** se aisló **2-fenil-quinolina (1)** (42.6 g).

La fracción (**F2-F3**) de 3.42 g fue separada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-Me<sub>2</sub>CO (85:15), obteniéndose tres fracciones. La fracción F2.1 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-Me<sub>2</sub>CO (95:5), aislándose **2-*n*-pentil-quinolina (7)** con Rf=0.31 (756.6 mg). La fracción F2.2 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-Me<sub>2</sub>CO (75:25) aislándose **2-*n*-pentil-quinolina (7)** con Rf=0.68 (614.5 mg) y **2-fenil-quinolina (1)** con Rf=0.58 (375.6 mg). De la fracción F2.3 se aisló **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** con Rf=0.39 (1150 mg).

La fracción (**F4-F5-F6**) de 2.99 g fue purificada por cromatografía en columna sobre gel de sílice con una mezcla *n*-hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad, obteniéndose 4 fracciones. De la fracción F4.1 se aisló **2-*n*-pentil-quinolina (7)** (1176 mg). La fracción F4.2 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-AcOEt (85:15), aislándose **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** con un Rf=0.52 (190.1 mg) y **2-*n*-pentil-quinolina (7)** con Rf=0.59 (91.9 mg). De la fracción F4.3 se aisló **2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (3)** (48 mg). La fracción F4.4 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-AcOEt (75:25), aislándose **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** con un Rf=0.47 (1.3 mg) y **2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (3)** con un Rf=0.37 (59.3 mg).

La fracción (**F7-F8**) de 0.75 g fue purificada por cromatografía en columna sobre gel de sílice con una mezcla *n*-hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad, obteniéndose 6 fracciones. De la fracción F7-8.1 se aisló **2-*n*-pentil-quinolina (7)** (172.6 mg). De la fracción F7-8.2 se aisló **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** (210.4 mg). La fracción F7-8.3 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-AcOEt (75:25), aislándose **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** con un

Rf=0.47 (8.1 mg) y **2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (3)** con Rf=0.37 (45.8 mg). La fracción F7-8.6 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (50:45:5 dos corridas), obteniéndose 3 fracciones. La fracción F7-8.6.1 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-Me<sub>2</sub>CO (95:5), aislándose **2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina (4)** con un Rf=0.06 (18.6 mg). La fracción F7-8.6.2 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-Me<sub>2</sub>CO (95:5), aislándose **Evolitrina (28)** con un Rf=0.03 (3.1 mg).

La fracción (**F9**) de 0.46 g fue purificada por cromatografía en columna sobre gel de sílice con una mezcla *n*-hexano-AcOEt en orden creciente de polaridad, obteniéndose un precipitado identificado como **shiquimianina (13)** (24.0 mg) y 5 fracciones. De la fracción F9.1 se aisló **2-*n*-pentil-quinolina (7)** (13.0 mg). La fracción F9.2 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-AcOEt (75:25), aislándose **2-*n*-pentil-quinolina (7)** con Rf=0.64 (7.5 mg) y **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** con un Rf=0.53 (35.2 mg). De la fracción F9.3 se aisló **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** (12.9 mg). La fracción F9.4 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-AcOEt (75:25), aislándose **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** con un Rf=0.47 (13.0 mg) y **2-(3',4'-metilendioxfeniletíl)-quinolina (3)** con un Rf=0.37 (5.2 mg). La fracción F9.5 fue purificada por cromatografía en columna sobre sílica gel con una mezcla *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, en orden creciente de polaridad, obteniéndose 6 fracciones. De la fracción F9.5.5 se aisló **shiquimianina (13)** (139.6 mg).

La fracción (**F10**) de 0.07 g fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-AcOEt (80:20), aislándose **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)** con un Rf=0.53 (38.9 mg) y **shiquimianina (13)** con un Rf=0.05 (12.7 mg).

## Estudio cromatográfico de los alcaloides totales

Cada extracto de alcaloides totales de los árboles y plantines fueron fraccionados por cromatografía en columna abierta, utilizando como sistema de elusión mezclas de: éter de petróleo-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80:20), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5), obteniéndose 3 fracciones (**I-III**); posteriormente cada una fue separada mediante cromatografía en placa fina para definir los perfiles cromatográficos utilizando como sistema de elusión mezclas de *n*-hexano-Et<sub>2</sub>O (90:10), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Me<sub>2</sub>CO (90:10), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (95:5).

### Datos espectrométricos y espectroscópicos

El compuesto **2-fenil-quinolina (1)**: Cristales blancos en *n*-hexano, 42.98 g, 71.6% de los alcaloides totales, p.f. 76.5°C. EM *m/z* (%): 205 [M<sup>+</sup>] (91.9), 102 (39.3). EMAR: Observado 205.0878, calculado para C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N, 205.0891. RMN-<sup>1</sup>H: 7.48 (1H, t, *J*=7.5Hz, H-4'), 7.53 (2H, t, *J*=7.4Hz, H-3', H-5'), 7.75 (1H, t, *J*=8.4Hz, H-7), 7.52 (1H, m, H-6), 7.84 (1H, d *J*=8.0Hz, H-5), 7.86 (1H, d, *J*=8.6Hz, H-3), 8.17 (2H, d, *J*=6.8Hz, H-2',H-6'), 8.19 (1H, d, *J*=8.5Hz, H-8), 8.23 (1H, d, *J*=8.7Hz, H-4). RMN-<sup>13</sup>C: 118.7 (C-3), 126.1 (C-4'), 127.4 (C-5), 127.5 (C-6', C-2'), 128.7 (C-3', C-5'), 129.2 (C-6), 129.5 (C-7), 129.6 (C-8), 136.6 (C-4), 127.0 (C-9), 139.5 (C-1'), 148.1 (C-10), 157.0 (C-2).

El compuesto **2-fenil-4-metoxi-quinolina (2)**: Líquido aceitoso de color amarillo, 1.66 g, 2.8% de los alcaloides totales. EM *m/z* (%): 235 [M<sup>+</sup>] (100), 204 (50), 143 (23.7). EMAR: Observado 235.0986, calculado para C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO, 235.0997. RMN-<sup>1</sup>H: 4.12 (3H, s, O-CH<sub>3</sub>), 7.18 (1H, s, H-3), 7.47 (1H, t, *J*=7.0Hz, H-4'), 7.54 (2H, t, *J*=6.7Hz, H-5',H-3'), 7.72 (1H, t, *J*=8.3Hz, H-7), 7.51 (1H, m, H-6), 7.71 (1H, d, *J*=8.4Hz, H-5), 8.11 (1H, d, *J*=7.3Hz, H-8), 8.20 (1H, d, *J*=7.4Hz, H-2', H-6'). RMN-<sup>13</sup>C: 55.4 (O-CH<sub>3</sub>), 97.8 (C-3), 121.4 (C-8), 125.2 (C-4'), 127.3 (C-2', C-6'), 128.5 (C-3', C-5'), 128.9 (C-6), 129.0 (C-7), 129.7 (C-5), 120.1 (C-9), 140.2 (C-1'), 148.9 (C-10), 158.6 (C-2), 162.6 (C-4).

El compuesto **2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-quinolina (3)**: Líquido aceitoso de color amarillo, 0.16 g, 0.3% de los alcaloides totales. EM  $m/z$  (%): 277 [ $M^+$ ] (91.9), 156 (29.0), 135 (84.5). EMAR: Observado 277.1095, calculado para  $C_{18}H_{15}NO_2$ , 277.1103. RMN- $^1H$ : 3.06 (2H, dd,  $J=10.2$  y 8.8Hz, H-1'), 3.25 (2H, dd,  $J=10.4$  y 8.8Hz, H-2'), 5.91 (2H, s,  $OCH_2O$ ), 6.67 (1H, dd,  $J=8.0$  y 1.3Hz, H-6''), 7.51 (1H, dd,  $J=7.8$  y 7.3Hz, H-6), 7.71 (1H, dd,  $J=7.9$  y 7.4Hz, H-7), 6.72 (1H, d,  $J=7.9$ Hz, H-5''), 6.75 (1H, d,  $J=1.3$ Hz, H-2''), 7.22 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-3), 7.78 (1H, d,  $J=8.1$ Hz, H-5), 8.06 (2H, d,  $J=8.2$ Hz, H-4, H-8). RMN- $^{13}C$ : 35.4 (C-2'), 41.0 (C-1'), 100.5 ( $OCH_2O$ ), 107.9 (C-6''), 108.8 (C-2''), 121.1 (C-5''), 121.4 (C-3), 125.6 (C-6), 127.3 (C-5), 128.6 (C-8), 129.2 (C-7), 136.0 (C-4), 126.6 (C-9), 135.1 (C-1''), 145.5 (C-4''), 147.3 (C-10), 147.7 (C-3''), 161.4 (C-2).

El compuesto **2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina (4)**: Sólido blanco, 0.02 g, 0.03% de los alcaloides totales. EM  $m/z$  (%): 293 [ $M^+$ ] (93.0), 278 (30.9), 156 (14.4), 151 (100). EMAR: Observado 293.1428, calculado para  $C_{19}H_{19}NO_2$ , 293.1416. RMN- $^1H$ : 3.08 (2H, dd,  $J=10.2$  y 8.9Hz, H-1'), 3.29 (2H, dd,  $J=10.4$  y 9.0Hz, H-2'), 3.80 (3H, s, 4''- $OCH_3$ ), 3.85 (3H, s, 3''- $OCH_3$ ), 6.76 (2H, d,  $J=8.0$ Hz, H-6'', H-5''), 6.78 (1H, d,  $J=1.3$ Hz, H-2''), 7.23 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-3), 7.78 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-5), 8.05 (1H, d,  $J=8.6$ Hz, H-4), 8.09 (1H, d,  $J=8.7$ Hz, H-8), 7.51 (1H, dd,  $J=7.8$  y 7.1Hz, H-6), 7.69 (1H, dd,  $J=8.3$  y 7.1Hz, H-7).

El compuesto **2-*n*-pentil-quinolina (7)**: Líquido aceitoso de color amarillo, 2.83 g, 4.7% de los alcaloides totales. EM  $m/z$  (%): 199 [ $M^+$ ] (100). RMN- $^1H$ : 0.79 (3H, t,  $J=6.8$ Hz, H-5'), 1.27 (4H, m, H-3', H-4'), 1.70 (2H, m, H-2'), 2.85 (2H, dd,  $J=8.1$  y 7.6Hz, H-1'), 7.30 (1H, dd,  $J=7.6$  y 7.2Hz, H-6), 7.51 (1H, dd,  $J=7.5$  y 7.2Hz, H-7), 7.08 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-3), 7.57 (1H, d,  $J=8.5$ Hz, H-5), 7.83 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-8), 8.00 (1H, d,  $J=8.4$ Hz, H-4). RMN- $^{13}C$ : 13.7 (C-5'), 22.2 (C-4'), 29.3 (C-2'), 31.4 (C-3'), 38.8 (C-1'), 120.9 (C-3), 125.2 (C-6), 127.0 (C-5), 128.4 (C-7), 128.8 (C-8), 135.7 (C-4), 126.3 (C-9), 147.5 (C-10), 162.5 (C-2).

El compuesto **shiquimianina (13)**: Sólido, blanco, amorfo, 0.18 g, 0.3% de los alcaloides totales, p.f. 157°C. EM  $m/z$  (%): 259 [ $M^+$ ] (80.3), 244 (100.0), 230 (49.9), 216 (22.7), 201 (18.3). EMAR: Observado 259.0843, calculado para  $C_{14}H_{13}NO_4$ , 259.0845. RMN- $^1H$ : 4.01 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 4.10 (3H, s, 8-OCH<sub>3</sub>), 4.40 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>), 7.00 (1H, d,  $J=2.8$ Hz, H-3'), 7.20 (1H, d,  $J=9.4$ Hz, H-6), 7.55 (1H, d,  $J=2.8$ Hz, H-2'), 7.98 (1H, d,  $J=9.4$ Hz, H-5). RMN- $^{13}C$ : 56.5 (7-OCH<sub>3</sub>), 58.7 (4-OCH<sub>3</sub>), 61.4 (8-OCH<sub>3</sub>), 104.4 (C-3'), 111.7 (C-6), 117.9 (C-5), 142.7 (C-2'), 101.7 (C-3), 114.6 (C-9), 141.2 (C-10), 141.7 (C-8), 151.9 (C-7), 156.9 (C-4) y 164.1 (C-2).

El compuesto **evolitrina (28)**: Sólido blanco amorfo, 0.003 g, 0.005% de los alcaloides totales. EM  $m/z$  (%): 229 [ $M^+$ ] (100), 214 (25.0), 186 (28.9), 149 (26.0). EMAR: Observado 229.0735, calculado para  $C_{13}H_{11}NO_3$ , 229.0739. RMN- $^1H$ : 3.94 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 4.43 (3H, s, 4-OCH<sub>3</sub>), 7.09 (1H, dd,  $J=9.3$  y 2.5Hz, H-6), 7.05 (1H, d,  $J=2.8$ Hz, H-3'), 7.32 (1H, d,  $J=2.2$ Hz, H-8), 7.57 (1H, d,  $J=2.8$ Hz, H-2'), 8.15 (1H, d,  $J=9.3$ Hz, H-5).

## Ficha técnica de elaboración<sup>2</sup> de la emulsión de alcaloides totales de *G. longiflora*

Ficha N°1. Ficha técnica de elaboración de la emulsión de alcaloides totales de *G. longiflora*.

<b>I.I.F.B. - UMSA</b>			
<b>INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS</b>			
<b>AREA DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA</b>			
<b>FICHA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN</b>			
PRODUCTO: Emulsión de alcaloides totales de <i>Galipea longiflora</i>			LOTE: 001
PRESENTACION: Frascos cilíndricos de 100 mL			FECHA:
CÓDIGO DE PRODUCTO:	LOTE: 100 mL (10 frascos)		HOJA N°:
FÓRMULA MAGISTRAL N°1			PROD.: Escala Laboratorial
FÓRMULA: Para 1000 mL			
Código	Materia prima	Cantidad	N° Control
	Glicerina	240 mL	
	Aceite de Maíz	420 mL	
	Jarabe simple	240 mL	
	Tween 20	40 mL	
	Extracto de alcaloides totales	20 g	
	Saborizante	60 mL	
	Propil parabeno	0.2 g	
	Metil parabeno	2 g	
	<i>Stevia rebaudiana</i>	0.02 g	
MATERIAL PESADO POR:			
OPERADOR:			
MATERIA IDENTIFICADO POR:			
<b>PRECAUCIONES:</b>			
Mantener las condiciones de higiene recomendadas			
Acondicionar las etiquetas después de producción			
Emplear normas BPM durante el proceso de producción			
<b>MATERIALES</b>			
Recipiente de acero inoxidable de capacidad adecuada			
Vaso de precipitados de 500 mL y 250 mL (Borosilicato)			
Probetas de 50 y 100 mL			
Kitasato			
Embudo buchner			
Bomba de vacío			
Agitador magnético			
Hornilla			
Varillas y espátulas			
Baño María			
Termómetro de 0 a 100°C			

<sup>2</sup> Sharapin, N.; Machado, L.; Souza, E.; Rocha, E. M.; Macedo dos Santos, E. V. Lopes, J. M. *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santa fé de Bogotá, D. C., Colombia. **2000**. 212.



SEGUNDA PARTE:

*Estudios de Bowdichia virgilioides*



Género *Bowdichia*

## Género *Bowdichia*

Especies del género *Bowdichia* están distribuidas en el trópico de Sud América y se expande desde Costa Rica, Venezuela, Colombia, Guyana, Perú, Brasil y Paraguay, figura N°42.<sup>1</sup>

En Bolivia la especie *Bowdichia virgilioides* Humboldt, Bonpland y Kunth, se distribuye en los departamentos de La Paz, Beni y Santa Cruz.<sup>2</sup>

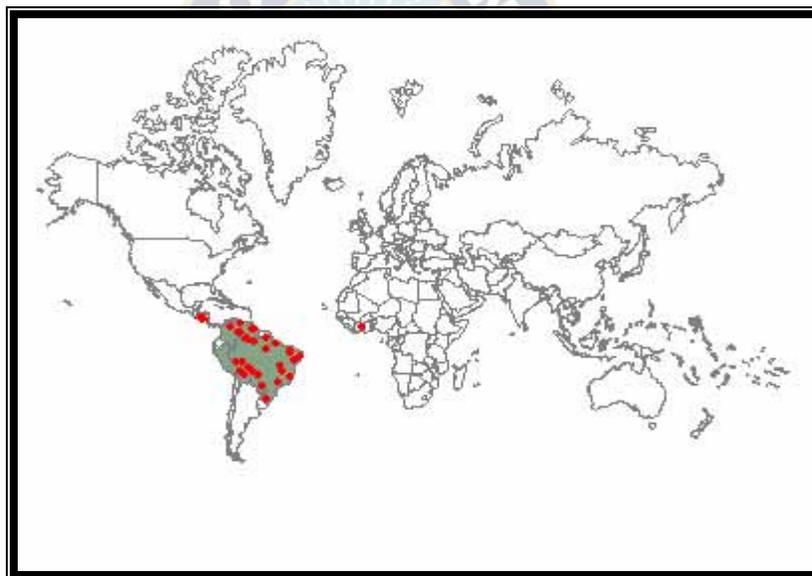


Figura N°42. Distribución mundial del género *Bowdichia*<sup>1</sup>

Es un árbol pequeño de 4 m de altura, en Brasil la corteza de este árbol es utilizada como laxante, desinfectante,<sup>3</sup> las semillas son usadas en el tratamiento de la artritis, diabetes, reumatismo,<sup>4</sup> diarreas crónicas y enfermedades de la piel.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Polhill, R. M. Papilionoideae, In Advances in Legume Systematics Part 1, *Royal Botanic Gardens*, Raven. **1981**, 191-208.

<sup>2</sup> Bravo, J. A.; Lavaud, C.; Bourdy, G.; Deharo, E.; Giménez, A.; Sauvain, M., *Revista Boliviana de Química*. **2002**, 19, 1, 12-17.

<sup>3</sup> Calle, A. J.; Rivera U. A.; Moreno, E. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. **1983**, 4, 1, 93-94.

<sup>4</sup> Correia, M. P. *Diccionario de plantas utilizadas en Brasil*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil. **1984**, 6, VI, 149.

<sup>5</sup> Marinho, L. C.; Carneiro Da Cunha, M. T. M.; Thomas, G.; Barbosa-Filho, J. M. *Fitoterapia*. **1994**, 65, 5, 475.

En Bolivia en la etnia Tacana *Bowdichia virgilioides* es conocida como *Nuriri aquí* o *Chiriguano*, la corteza es utilizada para la disentería, malaria y leishmaniasis en forma de cocción o cataplasma; para tratar la leishmaniasis aplicar un puñado de corteza del tronco, pulverizado, en la úlcera como emplasto y cambiar regularmente hasta que se cure la herida; para la malaria y disentería se hierva un pedazo de la corteza del tronco de 5 cm x 10 cm en 2 L de agua hasta que quede 1 L, beber 3 pequeños vasos al día, durante 3 días, figura N°44.<sup>6,7</sup>



Figura N°43. Hojas de *B. virgilioides*



Figura N°44. Corteza de *B. virgilioides*.<sup>6</sup>

### Clasificación taxonómica<sup>8,9</sup>

<b>Dominio:</b>	<i>Eukariota</i>
<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino:</b>	<i>Viridaeplantae</i>
<b>Phylum:</b>	<i>Magnoliofita</i>
<b>Subphylum:</b>	<i>Spermatofitina</i>
<b>Infraphylum:</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Clase:</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase:</b>	<i>Rosidae</i>
<b>Superorden:</b>	<i>Fabanae</i>
<b>Orden:</b>	<i>Fabales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Subfamilia:</b>	<i>Papilionoideae</i>
<b>Genero:</b>	<i>Bowdichia</i>
<b>Especie:</b>	<i>B. virgilioides pubescens</i>
<b>Nombre común:</b>	<i>Alcornoque, Sebipira</i> ,(Colombia), <i>Sucupira</i> , (Brasil), <i>Nuriri aquí</i> o <i>Chiriguano</i> (Bolivia).

<sup>6</sup> Bourdy, G.; Giménez, A.; Quenevo, C. "Tacana: Ecuánasha aquí, ecuanasha id'rene cuana, me schanapaque" (Tacana: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas). Editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD. Plural, La Paz, Bolivia. 1999, 273-274.

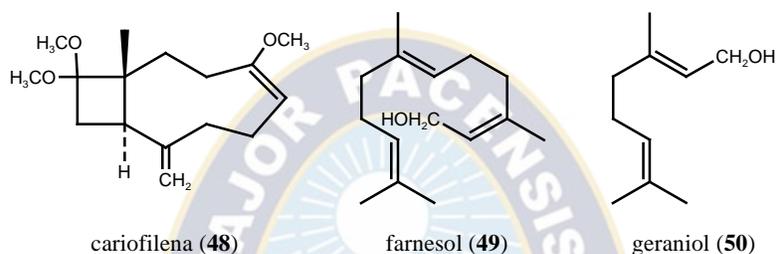
<sup>7</sup> Deharo, E.; Bourdy, G.; Quenevo, C.; Muñoz, V.; Ruiz, G.; Sauvain, M. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001, 77, 91-98.

<sup>8</sup> [www.Missouribotanicalgarden.com](http://www.Missouribotanicalgarden.com). Fecha de acceso julio 2007.

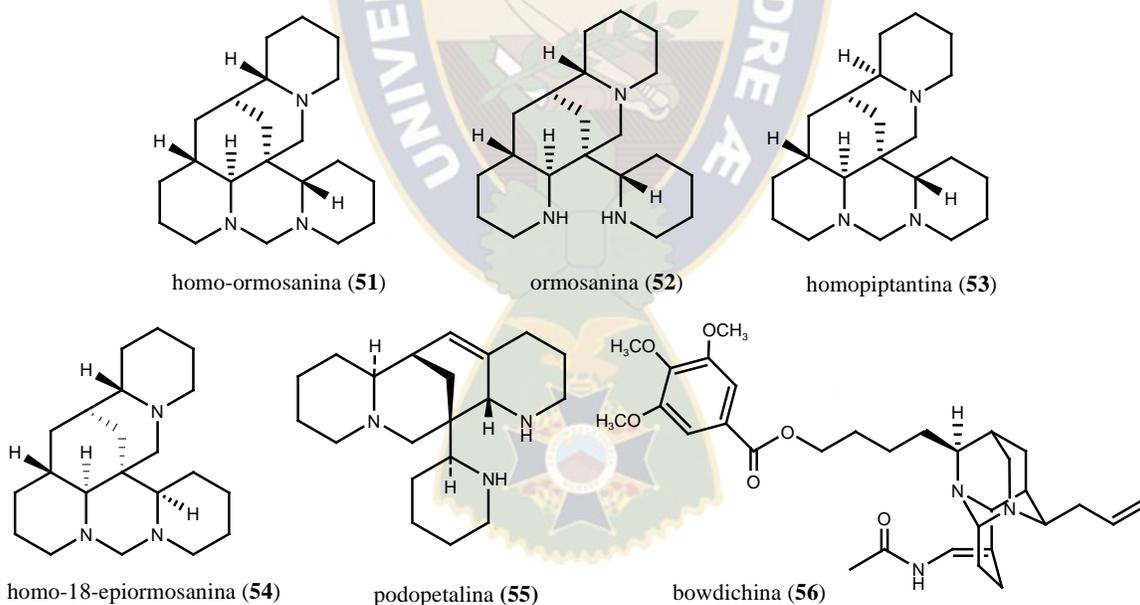
<sup>9</sup> [www.Zipcodezoo.com/Plants/B/Bowdichia\\_virgilioides.asp](http://www.Zipcodezoo.com/Plants/B/Bowdichia_virgilioides.asp). Fecha de acceso julio 2007.

## Estudios fitoquímicos y biológicos

Según los estudios fitoquímicos de *Bowdichia virgilioides* se identificaron en las semillas oleorresinas, aceites esenciales rico en cariofilina (**48**),<sup>10,11</sup> en los frutos aceites esenciales como el farnesol (**49**), geraniol (**50**) y (**48**).<sup>12</sup>



En la corteza de *B. virgilioides* se identificaron los **alcaloides** homo-ormosanina (**51**),<sup>13</sup> ormosanina (**52**), homopiptantina (**53**), y homo-18-epiormosanina (**54**),<sup>14</sup> podopetalina (**55**),<sup>5</sup> bowdichina (**56**), y acosmina (**57**).<sup>15</sup>



<sup>10</sup> Machado, A. *Revista da Associação Brasileira de Farmaceuticos*. **1936**, 17, 117-118.

<sup>11</sup> Machado, A. *Revista de Química Industrial*. **1939**, 8 (84, 85), 23-24, 19-20.

<sup>12</sup> Netto, J. *Revista de Faculdade de Farmacia e Odontologia de Araraquara*. **1970**, 4, 1, 203-204.

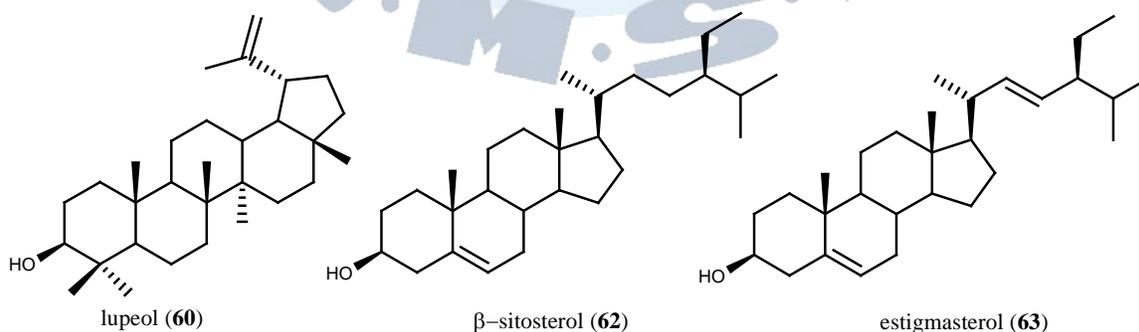
<sup>13</sup> Torrenegra G. R.; Escarria R. S.; Bauereiss, P.; Achenbach, H. *Planta Médica*. **1985**, 3, 276-277.

<sup>14</sup> Torrenegra, R.; Bauereib, P. Achenbach, H. *Phytochemistry*. **1989**, 28, 8, 2219-2221.

<sup>15</sup> Barbosa-Filho, J. M.; Guedes Da Silva A., J. R.; De Oliveira, V. C.; Vasconcelos L. E.; Sobral Da Silva, M.; Braz-Filho, R. *Journal of Asian Natural Products Research*. **2004**, 6, 1, 11-17.

El extracto etanólico de corteza de *B. virgilioides* en pruebas *in vitro* presentó actividad antiplasmódica frente a *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente con una  $CI_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$ , el extracto en pruebas *in vivo* fue tóxico a dosis de 250 mg/Kg.<sup>7</sup> La mezcla compuesta por tres alcaloides homormosanina (**51**), ormosanina (**52**) y homopiptantina (**53**), presentó actividad antiplasmódica *in vitro* frente a *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente con una  $CI_{50} = 0.5 \mu\text{g/mL}$ ; la mezcla y cada uno de los alcaloides fue evaluado la actividad citotóxica frente a células KB y Hela, no encontrándose citotoxicidad en ninguno de ellos. De los mismos también se ha evaluado la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia Coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Neurospora crassa*, *Mycobacterium smegmatis* y *Candida albicans*, siendo todos los alcaloides inactivos.<sup>2</sup> El compuesto homo-18-epiormosanina (**54**) demostró actividad citotóxica en cultivos de tejido de embrión de ratones.<sup>14</sup>

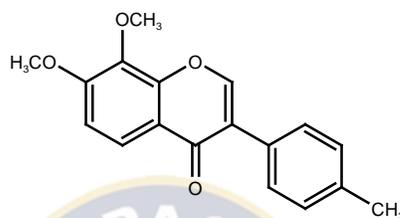
En la corteza de *B. virgilioides* también fueron identificados **triterpenos** como ácido betunílico (**58**), betulinol (**59**),<sup>5</sup> lupeol (**60**)<sup>3</sup>, acetato de lupeol (**61**) y esteroides como  $\beta$ -sitosterol (**62**) y estigmasterol (**63**).<sup>16</sup> El compuesto lupeol (**60**), no mostró actividad citotóxica frente a las líneas celulares tumorales: HT-29 (cáncer colorectal), MCF-7 (cáncer de mama), HEP-2 (cáncer de laringe) y MKN-45 (cáncer gástrico).<sup>17</sup>



<sup>16</sup> Melo, F. N.; Navarro, V. R.; Da Silva, M. S.; Da-Cunha E. V. L.; Barbosa-Filho, J. M.; Braz-Filho, R. *Natural Product Letters*. **2001**, 15, 4, 261-266.

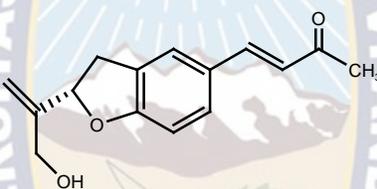
<sup>17</sup> Cordero, C. P.; Gómez-González, S.; León-Acosta, C. J.; Morantes-Medina, S. J.; Aristizabal, F. A. *Fitoterapia*. **2004**, 75, 225-227.

De la corteza de *B. virgilioides* se aislaron **isoflavonoides** como el 7,8,4'-trimetoxiisoflavona, (**64**), 7,8,4'-trimetoxiisoflavonona (**65**), y calicosina (**66**).<sup>16</sup>



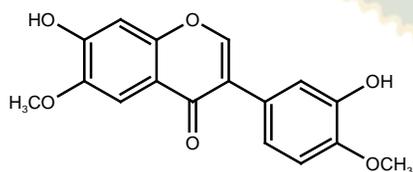
7,8,4'-trimetoxiisoflavona (**64**)

También se aislaron **hidrobenzilfuranos** como el bowdenol (**67**) y sus derivados,<sup>16</sup> además de otros compuestos como isoliquiritigenina (**68**), pterocarpana (**69**), maackianina (**70**).<sup>18</sup>

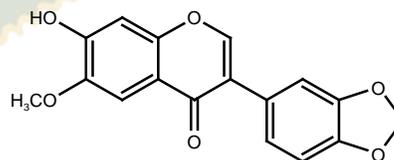


bowdenol (**67**)

En la raíz de *B. virgilioides* se identificaron **isoflavonas** como odoratina (**71**), fujikinetina (**72**), isohemifloina (**73**), afromosina (**74**), wistina (**75**), cladrastina (**76**), cladrastina 7-O- $\beta$ -D-glucosido (**77**), fujikinina (**78**)<sup>19</sup> y odoratina 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosida (**79**).<sup>20</sup> En pruebas *in vitro* el compuesto (**79**) demostró que inhibe la proliferación de linfocitos T y B los resultados sugieren que este compuesto sea utilizado como agente terapéutico antiinflamatorio e inmunoregulador.<sup>19</sup>



odoratina (**71**)

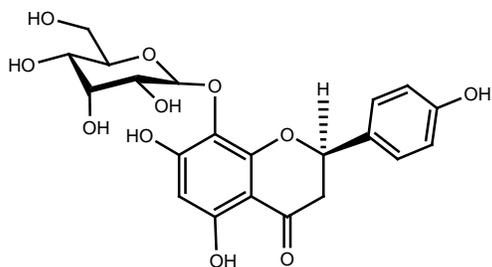


fujikinetina (**72**)

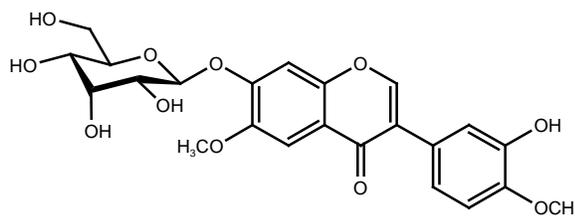
<sup>18</sup> Juck, D. B. F.; De Rezende, L. C.; David, J. P.; De Queiroz, L. P.; David, J. M. *Natural Product Research*. **2006**, 20, 1, 27-30.

<sup>19</sup> Velozo, L. S. M.; Da Silva, B. P.; Da Silva, E. M. B.; Parente, J. P. *Fitoterapia*. **1999**, 70, 532-535.

<sup>20</sup> Velozo, L. S. M.; Da Silva, B. P.; Bernardo, R. R.; Parente, J. P. *Phytochemistry*. **1999**, 52, 1473-1477.

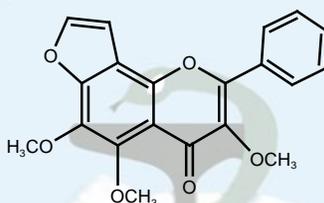


isohemifloina (73)



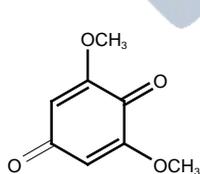
odoratina 7 O-β-D-glucopiranosida (79)

También se aislaron **flavonoides** como el 3,6-dimetoxi-6,6-dimetilcromeno-(7,8,2,3)-flavona (**80**) y 3,5,6-trimetoxifurano-(7,8,2,3)-flavona (**81**).<sup>21</sup>

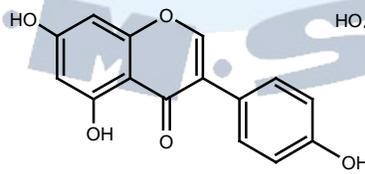


3,5,6-trimetoxifurano-(7,8,2,3)-flavona (81)

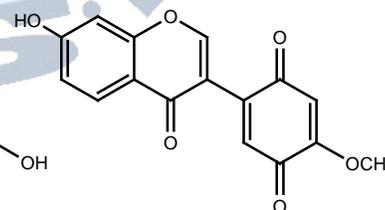
En otros estudios realizados en la especie *Bowdichia nitida* fue aislada la 2,6 dimetoxi-1,4-benzoquinona (**82**), la cual fue descrita como un alergeno.<sup>22</sup> También se identificaron **isoflavonas** como la genisteína (**83**), y la bowdichiona (**84**) y el 3'-hidroxiformononetina (**85**).<sup>23</sup>



2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (82)



genisteína (83)



bowdichiona (84)

<sup>21</sup> Arriaga, A. M. C.; Gomes, G. A.; Braz-Filho, R. *Fitoterapia*. **2000**, 71, 211-212.

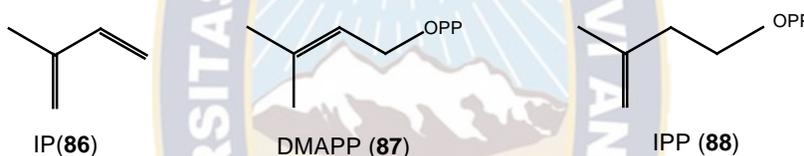
<sup>22</sup> Hausen B. M. *Contact dermatitis*. **1978**, 4, 4, 204-213.

<sup>23</sup> Brown, M. P.; Thomson, R. H.; Hausen, B. M., Simatupang, M. H. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. **1974**, 8, 1295-1300.

## Terpenoides

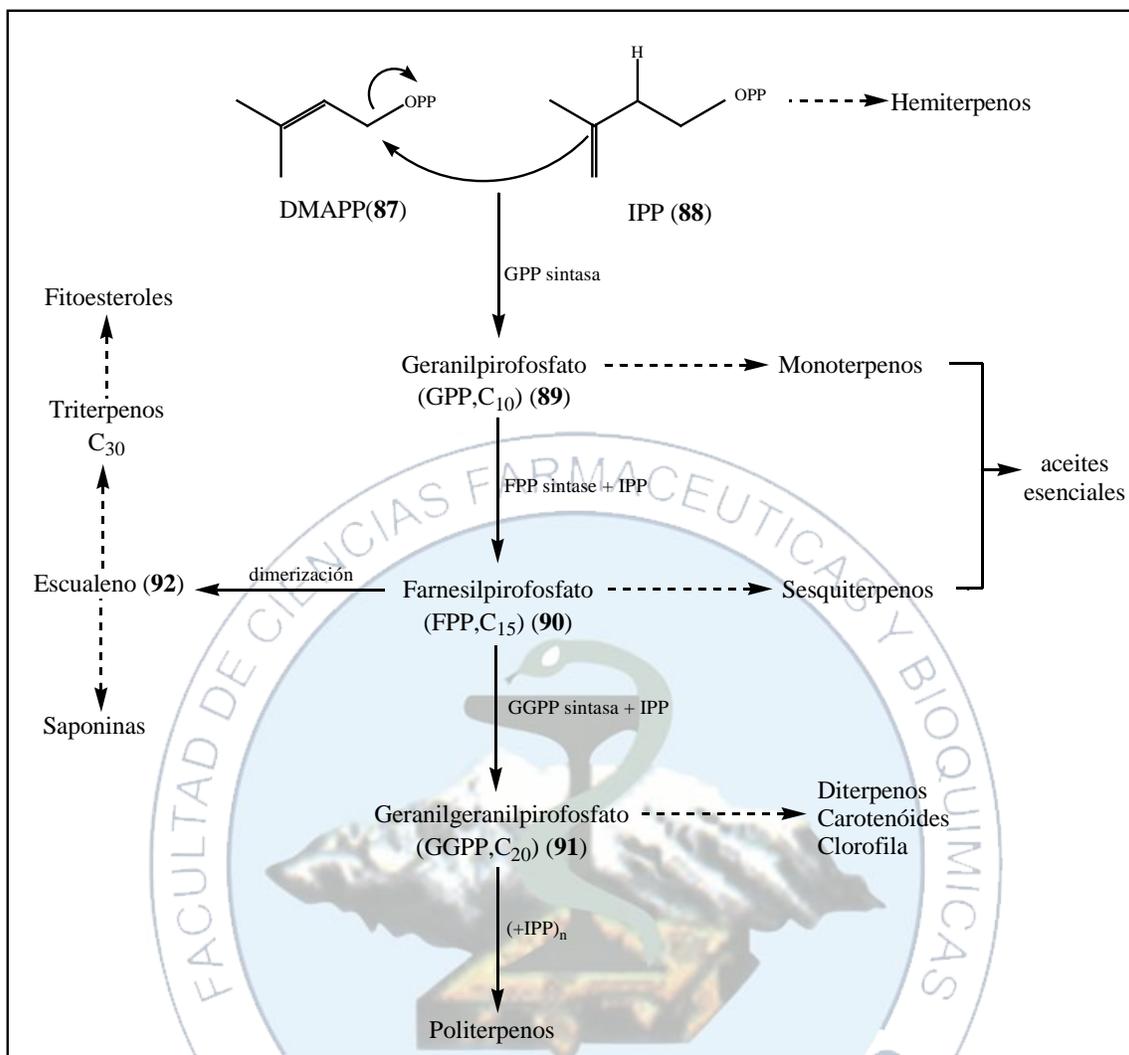
Conocidos por sus importantes funciones biológicas y fisiológicas, existen aproximadamente cerca de 30.000 terpenos, los cuales son clasificados de acuerdo con el número de unidades de isopreno en: hemiterpenoides ( $C_5$ ), monoterpenoides ( $C_{10}$ ), sesquiterpenoides ( $C_{15}$ ), diterpenoides ( $C_{20}$ ), triterpenoides ( $C_{30}$ ) y tetraterpenoides ( $C_{40}$ ).<sup>24</sup>

El isopreno (IP) (**86**), es producido naturalmente, pero no está envuelto directamente en la formación de los productos pertenecientes a esta clase. La unidad bioquímicamente activa de isopreno es en realidad el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (**87**) o el isopentenil pirofosfato (IPP) (**88**).



La adición de unidades de DMAPP (**87**) al carbono activo  $C_5$  de IPP (**88**), genera el isómero geranil pirofosfato (GPP,  $C_{10}$ ) (**89**). Cada adición de una unidad de isopentenil pirofosfato (**88**) forma sucesivamente los prenilados pirofosfatos superiores como el farnesil pirofosfato (FPP,  $C_{15}$ ) (**90**) y el geranilgeranil pirofosfato (GGPP,  $C_{20}$ ) (**91**). Una condensación de unidades de IPP (**88**) con unidades de GPP (**89**) genera los triterpenos y tetraterpenos, respectivamente. En la naturaleza, la mayoría de los terpenoides no existen en su forma lineal, se presentan en forma de estructuras cíclicas, obtenidas a través de reacción de oxidación, reducción, hidratación e isomerización, llevando a una gran variedad de estructuras, el esquema N°2 muestra la síntesis general de la formación de algunos terpenoides encontrados en plantas superiores.<sup>24</sup>

<sup>24</sup> Yunes, R.A.; Filho, V.C. *Química de productos naturales, nuevos fármacos y la moderna farmacognosia*. Ed. Univali Itajaí, Santa Catarina, 1ra. Ed. 2007, 239-257.

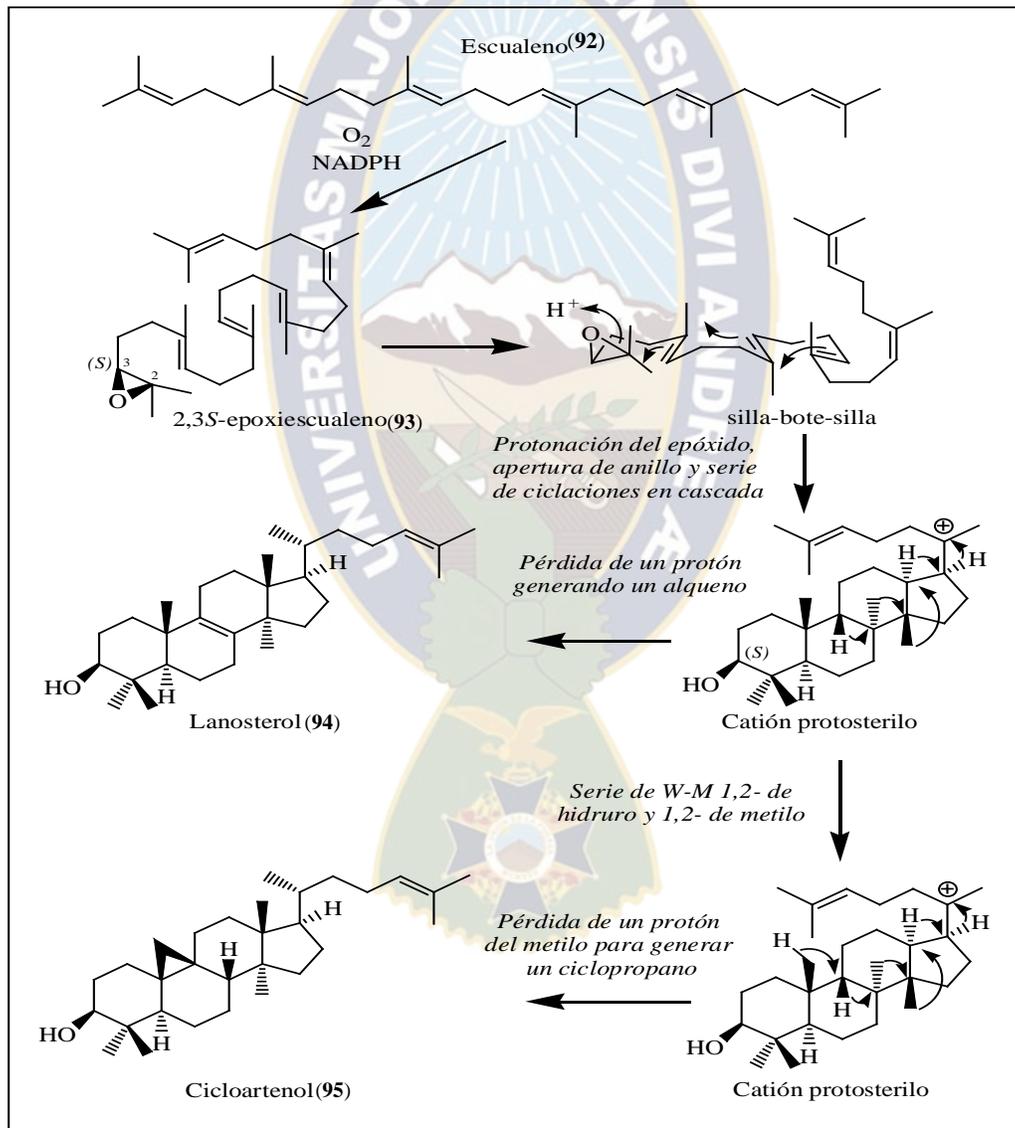


**Esquema N°2.** Biogénesis general de la formación de terpenoides.<sup>24</sup>

Los triterpenos constituyen un grupo muy amplio de metabolitos secundarios, con más de 5000 compuestos descritos hasta el momento, que pueden dividirse en diferentes familias químicas. Estos terpenos se forman por la unión de dos unidades de farnesil pirofosfato (90), que da lugar al escualeno (92), el cual es epoxidado enantioselectivamente por la cara  $\beta$  mediante acción enzimática, formándose el 2,3 S-epoxiesqualeno (93).<sup>25</sup>

<sup>24</sup> Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons, Ltd., Baffins Lane, Chichester, 2da. Ed. 2002, 212-226.

La mayoría de los esqueletos triterpénicos, tanto tetracíclicos como pentacíclicos, derivan de la ciclación de dos posibles confórmers de este epóxido, el silla-bote-silla y el silla-silla-silla. Una apertura regioselectiva del grupo epóxido, mediante protonación y a través de una secuencia de adiciones electrofílicas a los dobles enlaces presentes, da lugar a la formación de los correspondientes anillos, generándose dos intermedios claves, el catión protosterilo y el catión dammarenilo, esquema N°3.<sup>26</sup>



**Esquema N°3.** Biosíntesis del lanosterol y cicloartenol a partir del escualeno.<sup>26</sup>

<sup>26</sup> Nuñez, M. *Metabolitos Secundarios bioactivos aislados de Maytenus chiapensis y Crossopetalum uragoga*. Tesis Doctoral. **2003**, 183-193.

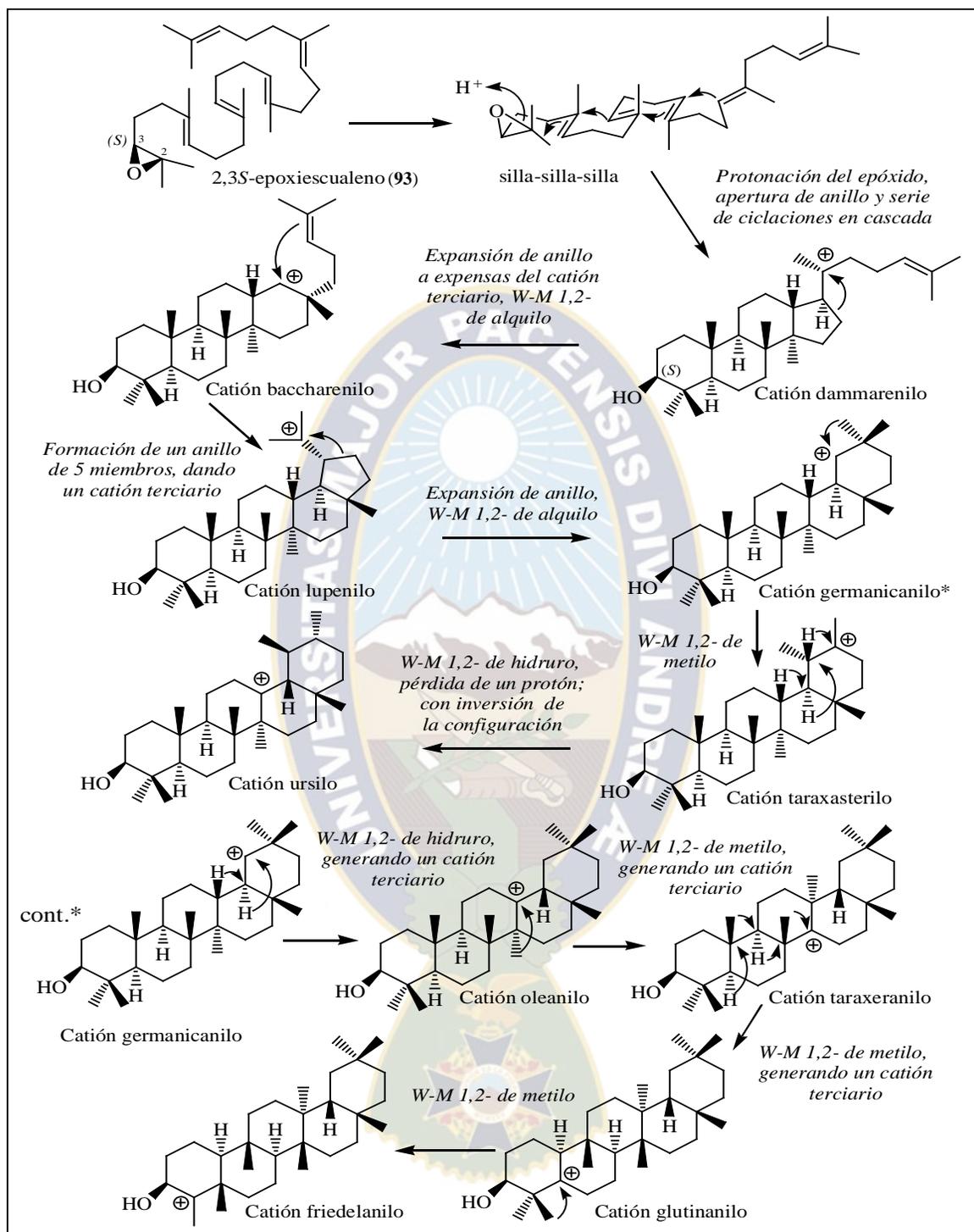
Los **esteroles** se forman a partir del catión protosterilo, que da lugar al lanosterol (**94**), en animales y hongos o al cicloartenol (**95**) en plantas. Los esteroles juegan un importante papel biológico ya que forman parte de las membranas celulares y actúan como precursores de las hormonas esteroideas, pertenecen a esta familia los compuestos tales como el  $\beta$ -sitosterol (**62**), estigmasterol (**63**), fucosterol (**96**), ergosterol (**97**) y campesterol (**98**).<sup>26</sup>

Un esteroles presente en muchas plantas superiores es el  $\beta$ -sitosterol (**62**), sobre él se ha publicado una extensa relación de actividades biológicas. Así, cabe destacar que posee actividad antiinflamatoria y antipirética, con un efecto similar a la hidrocortisona (**99**) y la oxifenbutazona (**100**). Además, presenta un amplio margen de seguridad debido a su mínimo efecto ulcerogénico, lo que le confiere un alto valor terapéutico. Recientemente, se ha descrito como posible fármaco para el tratamiento de la hiperplasia benigna de próstata.<sup>27</sup>

Un gran número de triterpenos pentacíclicos se obtienen a partir del catión dammarenilo.<sup>25</sup> Los triterpenos pentacíclicos están constituidos por un esqueleto de 30 carbonos que pueden estar dispuestos en cinco anillos de seis miembros, como es el caso de los triterpenos con esqueleto de ursano, oleano, taraxerano, glutinano y friedelano,<sup>28</sup> como ejemplos podemos mencionar a los ácidos ursólicos e oleanólicos como  $\alpha$ -amirina (**101**) y  $\beta$ -amirina (**102**), respectivamente, además de otros; los triterpenos con esqueleto de lupano y hopano dispuesto en cuatro anillos de seis miembros y uno de cinco tales como el ácido betunílico (**58**), lupeol (**60**), betulina (**103**), lupenona (**104**), entre otras. En el esquema N°4 se describe la biosíntesis de los diferentes triterpenos a partir del compuesto escualeno.<sup>25</sup>

<sup>27</sup> Wilt, T. J. *B. J. U. Int.* **1999**, 83, 976-983.

<sup>28</sup> Marciano, D.; Hasegawa, M. *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela, Caracas. **1991**.



**Esquema N°4.** Biosíntesis de los diferentes triterpenos a partir del escualeno.<sup>26</sup>

En los últimos años, los triterpenos han tomado relevancia debido al amplio espectro de actividades biológicas que presentan, entre las que cabe destacar actividad antibacteriana,<sup>29</sup> antifúngica,<sup>30</sup> antiinflamatoria,<sup>31</sup> antitumoral,<sup>32</sup> antituberculosa,<sup>33</sup> y anti-VIH.<sup>34</sup>



<sup>29</sup> Nozaki, H.; Matsuura, Y.; Hirono, S.; Kasai, R.; Chang, J. J.; Lee, K. *J. Nat. Prod.* **1990**, 53, 1039-1041.

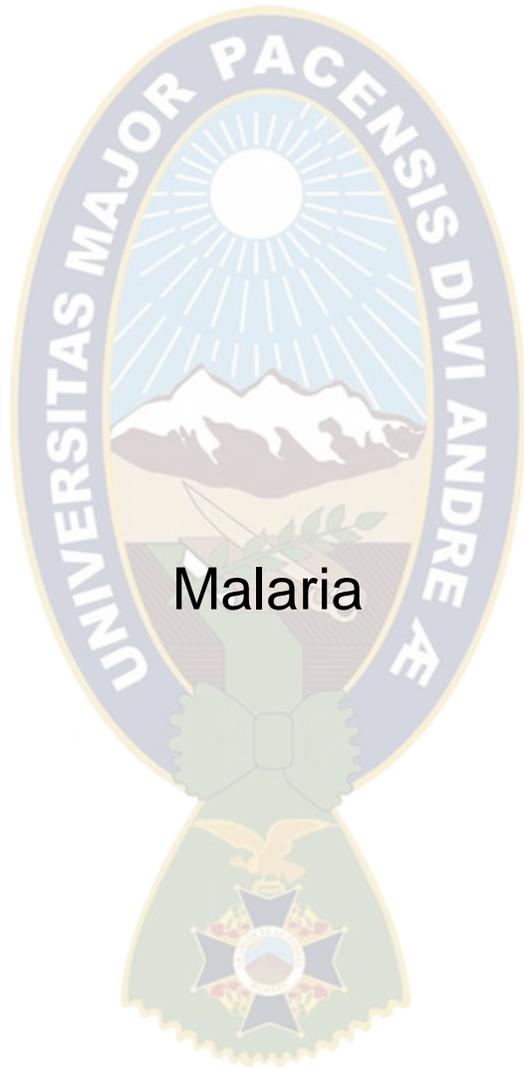
<sup>30</sup> Tane, P.; Tsopmo, A.; Ngnokam, D.; Ayafor, J. F.; Sterner, O. *Tetrahedron.* **1996**, 47, 14989-14994.

<sup>31</sup> Kuo, Y.H.; Yang-Kio, L. M. *Phytochemistry.* **1997**, 44, 1257-1281.

<sup>32</sup> Wächter, G. A.; Valvic, S.; Franzblau, S. C.; Suarez, E.; Timmermann, B. N. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 37-41.

<sup>33</sup> Kashiwada, Y.; Chiyo, J.; Ikeshiro, Y.; Nagao, T.; Okabe, H.; Cosentino, L. M.; Fowke, K.; Lee, K. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 183-185.

<sup>34</sup> Zhang, H.-J.; Tan, G. T.; Hoang, V. D.; Hung, N. V.; Cuong, N. M.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. H. S. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 263-268.



Malaria

## Malaria o paludismo

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria provocada por la infección de diferentes especies de protozoos parásitos pertenecientes al género *Plasmodium*. La enfermedad en el hombre esta causada por cuatro especies diferentes: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, y *P. malariae*. De todas ellas la especie *P. falciparum* es la más importante por ser altamente infectante, por producir gran morbilidad, por ser la especie más agresiva con el índice de mortalidad más alto, por estar ampliamente distribuida y ser la causa más frecuente de malaria endémica (provoca el 80% de los casos de malaria), figura N°45 y N°46.<sup>1</sup>



Figura N°45. *Anopheles*

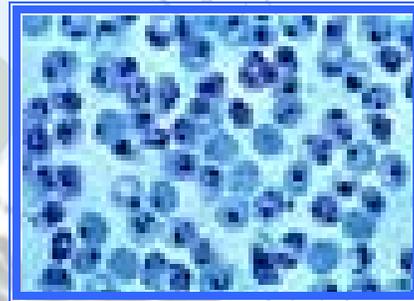


Figura N°46. *P. falciparum*

El parásito causante de la malaria tiene un ciclo vital que se reparte entre un huésped vertebrado y un insecto vector el mosquito *Anopheles*. El parásito se transmite de una persona a otra únicamente a través de la picadura de los mosquitos hembra. De las 380 especies de *Anopheles* sólo las hembras de 60 especies son capaces de transmitir la enfermedad.<sup>1</sup>

Las manifestaciones clínicas de la malaria son escalofríos y palidez cutánea, que se alterna con sensación de calor y rubefacción cutánea sequedad e hipertermia. Frecuentemente, el paroxismo febril se acompaña de cefalea, mialgia, hepatoesplenomegalia y anemia, figura N°47.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>World Health Organization. [www.who.int/tdr/disease/malaria/diseaseinfo.htm](http://www.who.int/tdr/disease/malaria/diseaseinfo.htm). Fecha de acceso Julio 2006.

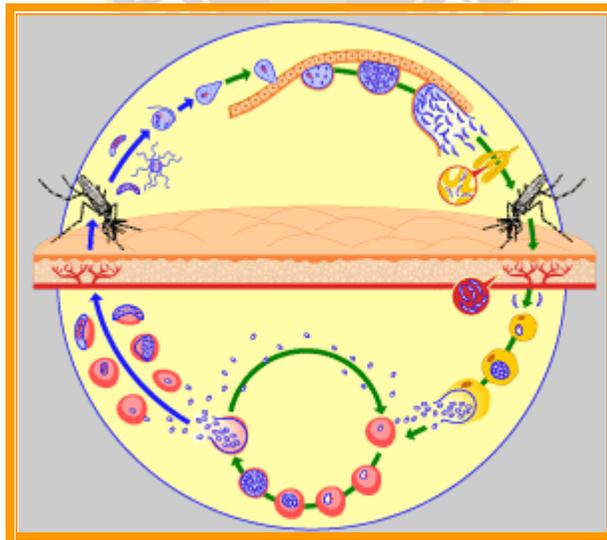


**Figura N°47.** Enfermo de malaria

La infección por *P. falciparum* puede complicarse con un cuadro de malaria grave, caracterizada por una anemia importante (hematocrito <20%), hiperparasitemia (>5%), hipoglucemia, afectación renal, afectación cerebral con la alteración de la conciencia y coma.<sup>1</sup>

### Ciclo biológico

El ciclo vital del parásito es heteroxénico, con alternancia de la reproducción sexual (esporogónica), que ocurre en el mosquito *anopheles*, y la asexual (esquizogónica), que tiene lugar en el hombre, figura N°48.<sup>2,3</sup>



**Figura N°48.** Ciclo biológico de *Plasmodium*

<sup>2</sup> Granda, S.; Jiménez, M. *Control de Calidad SEIMC*. 2003, 1-10.

<sup>3</sup> Flores, N. *Metabolitos secundarios bioactivos de especies del género Piper de la flora Boliviana*. Tesis doctoral. 2007.

El ciclo comienza cuando un mosquito *Anopheles* hembra libre de parásitos pica a una persona infectada con malaria, ingiere con la sangre gametocitos sexuales del parásito, macrogametocitos (femeninos) y microgametocitos (masculino), los cuales al llegar al estomago del parásito inician la reproducción sexual, el microgametocito se une al macrogametocito formándose un ooquinetto que atraviesa la pared del estomago, transformándose en ooquiste. Del ooquiste se liberan esporozoitos no infectivos que, gracias a su capacidad de movilidad y desplazamiento, migran a las glándulas salivales donde maduran, convirtiéndose en infectivos. Cuando este mosquito infectado pica a un segundo hospedador, la saliva que contiene los esporozoitos infectivos se inyectan en el torrente circulatorio del hombre. Después de circular por sangre durante aproximadamente 20 a 30 minutos, los esporozoitos penetran en las células parenquimatosas del hígado, donde forman una vacuola, y comienzan a multiplicarse convirtiéndose en merozoítos que pasan al torrente circulatorio y penetran en los eritrocitos. Dentro del eritrocito el merozoíto sufre una serie de cambios adoptando una forma de anillo: el trofozoito, éste entra en división esquizogónica dando lugar a esquizontes inmaduros, que al madurar liberan nuevos merozoítos. Después de varios ciclos eritrocíticos, algunos merozoitos se transforman en gametocitos sexuales. De esta manera continúa el ciclo biológico del parásito, cuando el mosquito se alimenta nuevamente.<sup>3</sup>

El período de incubación del *plasmodium* es variable, los períodos mas cortos se presentan en *P. vivax*, *P. ovale* y *P. falciparum*, con una media de 7-12 días mientras que en el caso de *P. malariae* es más prolongado, entre 27 a 40 días.<sup>1,2</sup>

Estos mosquitos se reproducen en aguas estancadas donde tardan de 1 a 3 semanas en completar su ciclo vital y son frecuentes en todas las regiones tropicales y de clima templado, pero a menudo, el parásito *Plasmodium* que transportan, sólo se puede desarrollar en condiciones muy cálidas.<sup>1,2</sup>

## Epidemiología

La malaria es una enfermedad infecciosa que afecta de 200 a 300 millones de personas anualmente y por la que fallecen 2.5 millones al año en el mundo. Actualmente esta enfermedad es endémica en 100 países y se manifiesta principalmente en las regiones tropicales y subtropicales menos desarrolladas de África, Asia y América Latina. Es una de las enfermedades infecciosas con mayor índice de morbilidad y mortalidad, figura N°49.<sup>4</sup>

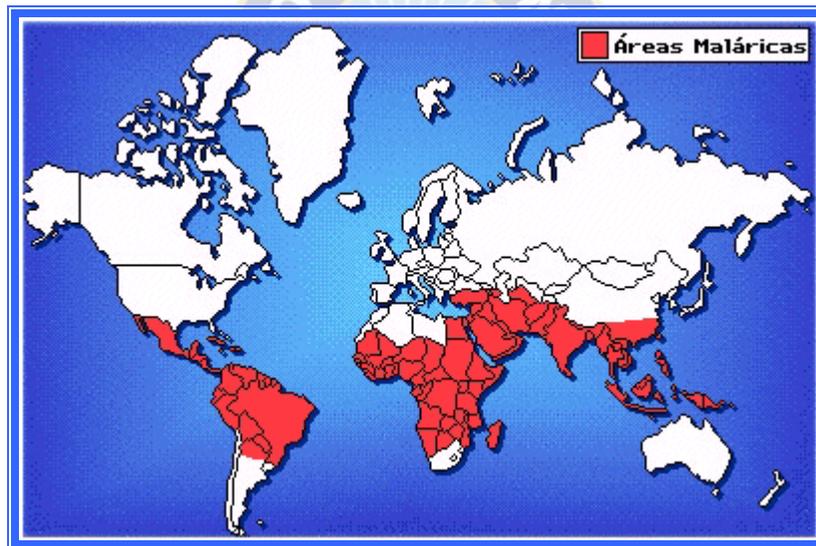


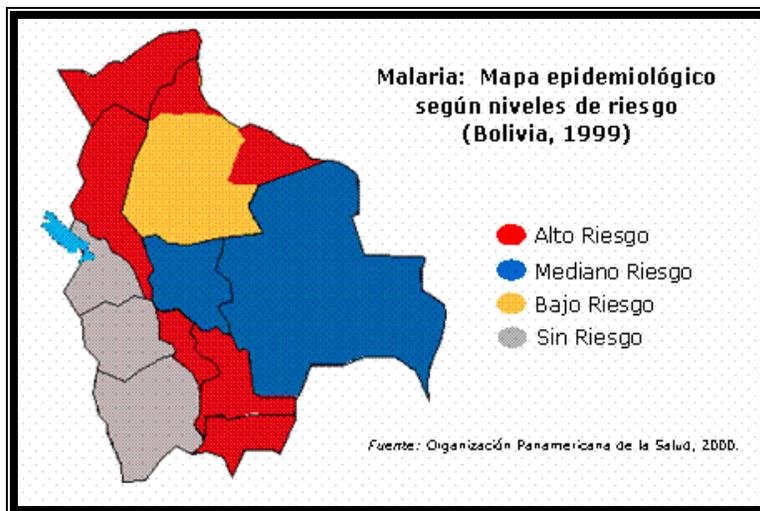
Figura N°49. Distribución geográfica mundial de malaria<sup>3</sup>

En Bolivia, la malaria es un problema de Salud pública que tiene repercusión en el desarrollo socioeconómico de las regiones endémicas, provocando discapacidades que se traducen en pérdidas económicas para el estado.<sup>4</sup>

El área endémica de la malaria representa el 75% de la superficie total boliviana, que comprende los llanos orientales, el chaco boliviano y los valles, con una población en riesgo de 3.5 millones de habitantes, figura N°50.<sup>5</sup>

<sup>4</sup> Hay, S. I. *Lancet Infect. Dis.* 2004, 4, 327-336.

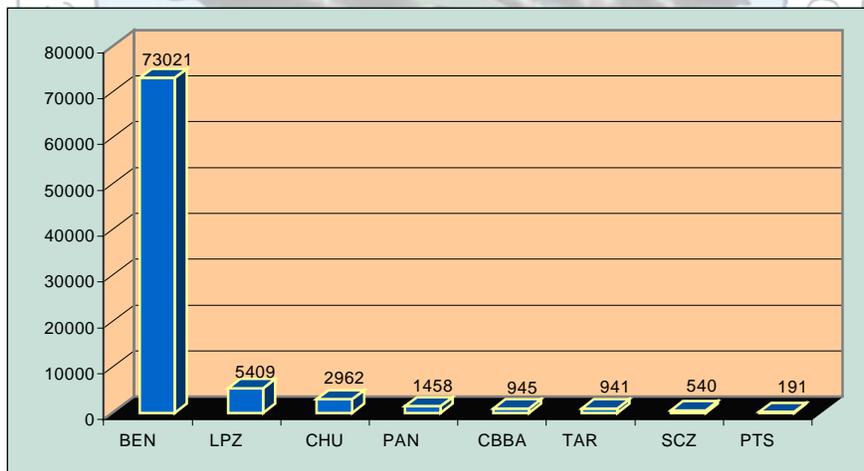
<sup>5</sup> Mollinedo-Llave, E. E. *OMS-OPS Anuario Epidemiológico 2000.* 2000, 53-63.



**Figura N°50.** Zonas endémicas de malaria en Bolivia 2000.<sup>4</sup>

Durante el año 2007 en Bolivia se notificaron 85467 casos de Malaria, donde el 85.4% de los casos notificados pertenecen al departamento de Beni, cuadro N°2.<sup>6</sup>

**Cuadro N°2.** Número de casos notificados de malaria por departamentos en Bolivia registrados en la gestión 2007.



Beni (BEN), La Paz (LPZ), Chuquisaca (CHU), Pando (PAN), Cochabamba (CBBA), Tarija (TAR), Santa Cruz (SCZ) y Potosí (PTS).

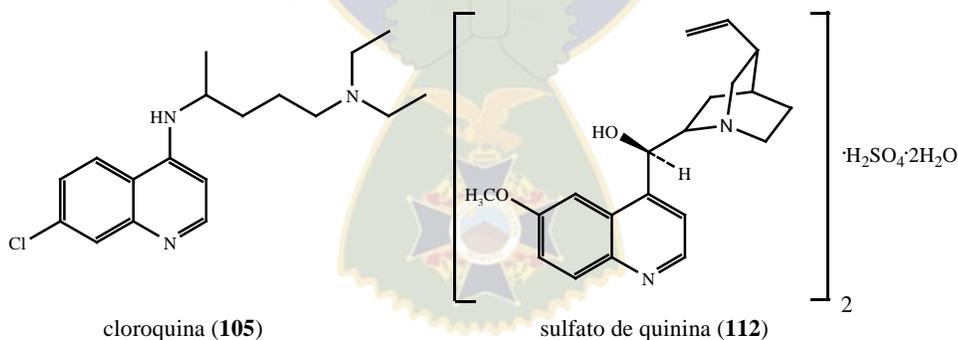
<sup>6</sup> [www.sns.gov.bo/snis](http://www.sns.gov.bo/snis). Fecha de acceso marzo 2008.

## Tratamiento de malaria

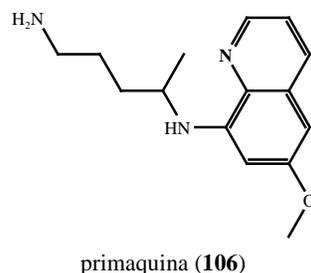
De todos los fármacos disponibles en la actualidad para el tratamiento de la malaria, ninguno actúa sobre todos los estadios del ciclo vital del parásito, las drogas disponibles las podemos clasificar en:

*Derivados quinolínicos*, entre los que podemos citar a la cloroquina (105), primaquina (106), quinina (107), mefloquina (108), quinidina (109), amodiaquina (110) y halofantrina (111). Estas drogas inhiben la actividad de la hemopolimerasa en la vacuola alimenticia del parásito, interfiriendo en la conversión del hemo en hemozoina no tóxica; además ejercen una acción secundaria, que involucra la inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos y las proteínas del parásito.<sup>3</sup>

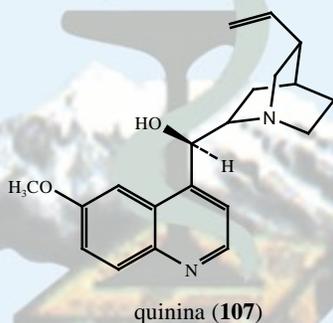
La cloroquina (105) es el fármaco de primera elección en caso de infección por *P. vivax*, *P. ovale*, y *P. malariae*. El fármaco se administra por vía oral o intravenosa; el índice de curación supera el 95%. Usualmente es bien tolerado, los efectos secundarios son transitorios. En caso de resistencia a cloroquina (105), los pacientes son tratados con mefloquina (108), halofantrina (111) o sulfato de quinina (112) más tetraciclinas o sulfonamidas.<sup>3</sup>



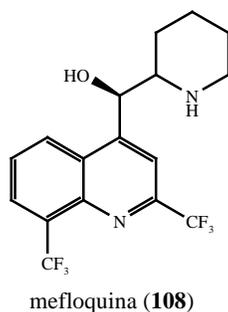
La primaquina (106) es utilizada para prevenir la recaída por infección con *P. vivax* y *P. ovale*. Es el único fármaco aceptado para la erradicación del parásito en los hepatocitos.<sup>3</sup>



La quinina (107) es la terapia recomendada para pacientes con malaria por *P. falciparum* resistente a cloroquina (105), en forma de sulfato, se administra por vía oral combinado con pirimetamina (113). La eficacia de los regímenes a base de quinina (107) es mayor al 90% en la mayoría de las áreas endémicas. En pacientes que no toleran la terapia oral se administra gluconato o clorhidrato de quinina por vía intravenosa.<sup>3</sup>

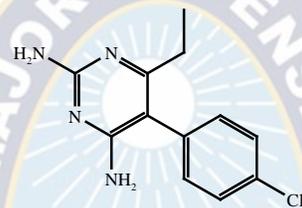


La mefloquina (108) es el fármaco que cura 90 a 95% de la malaria por *P. falciparum*, sus efectos secundarios son vómitos, toxicidad neurológica y convulsiones. Sus limitaciones son que no puede administrarse en niños, ni en pacientes que este recibiendo quimioprolifaxis, para evitar la resistencia cruzada.<sup>3</sup>



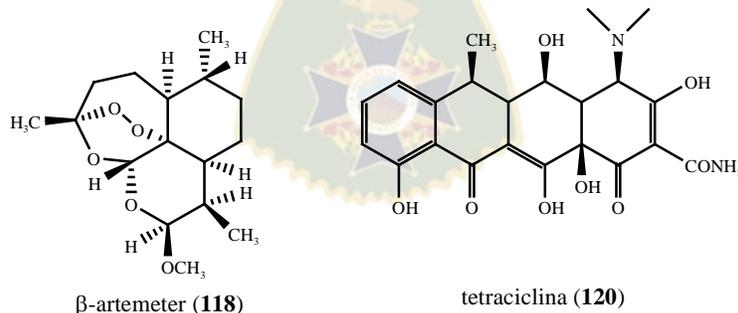
Los antifolatos: Pirimetamina (113), sulfonamidas, dapsona (114), proguanil (115) y la combinación de pirimetamina-sulfadoxina (116), tienen acción sobre las formas intrahepáticas del parásito.<sup>3</sup>

La pirimetamina (113) es además gametocida con lo cual previene la transmisión por el mosquito y el mantenimiento de la enfermedad en el hombre (profilaxis verdadera).<sup>7</sup>



pirimetamina (113)

Derivados de artemisinina: Artemisinina (117),  $\beta$ -artemeter (118), artesunato (119), estos fármacos actúan interfiriendo en la conversión del hemo en hemozoina no tóxica. Son el tratamiento de elección para *P. falciparum* resistente a quinina (107); estos fármacos eliminan la parasitemia rápidamente. Cuando se administra solo deben darse por 5 a 7 días, para evitar recrudescencia que se observa cuando se da monoterapia; deben ser combinados preferiblemente con mefloquina (108), tetraciclina (120) o clindamicina (121).<sup>8,3</sup>



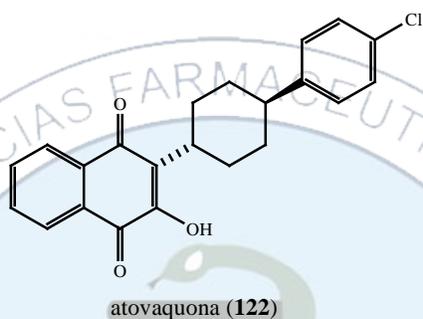
$\beta$ -artemeter (118)

tetraciclina (120)

<sup>7</sup> Barat, L. M.; Bloland, P. B.; *Infect. Dis. Clin North Am.* **1997**, 11, 969.

<sup>8</sup> Price, R.; Van Vugt, M.; Nosten, F. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **1998**, 59, 833.

*Antibióticos:* Clindamicina (**121**), atovaquona (**122**), y tetraciclinas. Tienen efectos sinérgicos con los derivados quinolónicos, incrementando la acción esquizotóxica sanguínea. La Atovaquona, (**122**), no se administra sola por que desarrollo resistencia rápida; se combina frecuentemente con proguanil (**115**), ya que se ha demostrado su sinergismo, reportándose índices de curación del 95% en malaria causada por *P. falciparum* sin efectos adversos severos.<sup>9,3</sup>



El desarrollo de la multiresistencia a fármacos en los parásitos ha forzado al uso de regímenes combinados de fármacos antimaláricos para incrementar la eficacia de la terapia. Estas combinaciones han disminuido el tiempo de duración del tratamiento, el riesgo de desarrollo de resistencia por el parásito durante la terapia y ha mejorado su utilización en niños y mujeres embarazadas.<sup>10</sup> Sin embargo aún estamos lejos de descubrir el régimen ideal, siendo las mejores opciones: mefloquina + artesunato; clindamicina + quinina, efectivos en pacientes inmunocomprometidos.<sup>3</sup>

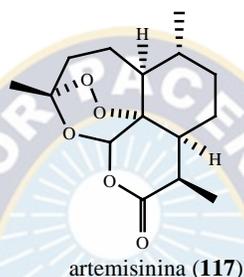
### **Productos naturales con actividad antiplasmódica**

La evaluación científica de las plantas medicinales utilizadas en la preparación de remedios caseros, ha proporcionado a la medicina moderna fármacos efectivos para el tratamiento de la malaria. Algunos de los metabolitos obtenidos de plantas utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad incluyen quinonas, alcaloides y terpenos. Como un ejemplo de ello es importante recordar

<sup>9</sup> Looareesuwan, S.; Chulay, J. D.; Canfield, C. D. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, 60, 533.

<sup>10</sup> Kreamsner, P. G.; Krishna, S. *The Lancet.* **2004**, 364, 285-294.

que el primer producto farmacéutico desarrollado para el tratamiento de la malaria y la amebiasis fueron los alcaloides quinina (**107**) y emetina (**123**), obtenidos de especies del género *Cinchona* y *Cephaelis*, respectivamente. Recientemente, la artemisinina (**117**), una lactona sesquiterpénica, aislada de *Artemisia annua*,<sup>11,12</sup> es usada en clínica para el tratamiento de la malaria.



Dentro de los productos naturales con actividad antiplasmódica podemos citar la 2-*n*-pentilquinolina (**7**), aislada de las hojas de *Galipea longiflora*, el metabolito más activos frente a *P. vincckei* petteri en comparación con la cloroquina.<sup>13</sup>

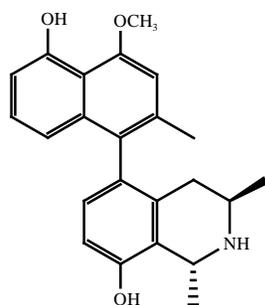
Dioncofilina A (**124**), B (**125**), C (**126**), y dioncopeltina A (**127**), aislados de *Triphyophillum peltatum*, han sido evaluados frente a *P. falciparum* sensible y resistente a cloroquina, presentando una elevada actividad frente a las dos cepas. También fueron evaluados en un modelo *in vivo* frente a *P. Berghei*, obteniéndose resultados prometedores con dioncofilina C (**126**).<sup>14</sup> Esta planta es utilizada en la medicina de África y Asia para el tratamiento de la fiebre, la malaria y la elephantiasis.

<sup>11</sup> Ziffer, H.; Hight, R.J.; Klayman, D. L. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1997**, 72, 121-214.

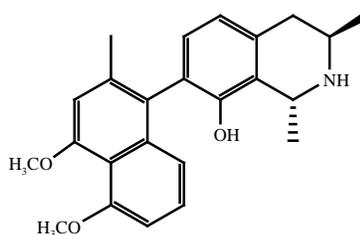
<sup>12</sup> Castel, D. A.; *Nat. Prod. Rep.* **1999**, 16, 55-73.

<sup>13</sup> Gantier, J. C.; Fournet, A.; Muñoz, M.; Hocquemiller, R. *Planta Medica.* **1996**, 62, 285-286.

<sup>14</sup> Francois, C.; Timperman, G.; Holenz, J.; Aké Assi, L.; Geuder, T.; Maes, L.; Dubois, J.; Hanocq, M.; Bringmann, G. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1996**, 90, 115-123.



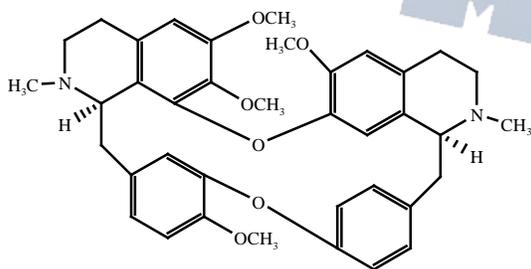
dioncofilina C (126)



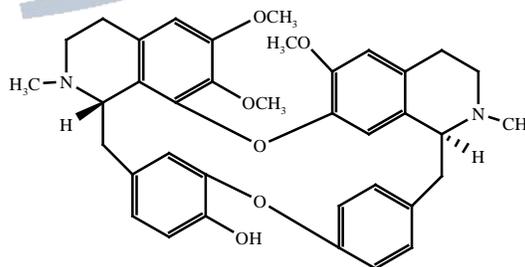
dioncopeltina A (127)

Dentro de los alcaloides bisbenziloquinolínicos, cefrantina (128) presenta actividad moduladora de la resistencia frente a *P. falciparum* resistente a cloroquina (105) y los resultados obtenidos muestran una actividad 50 veces mayor que el verapamilo (129), un conocido revertidor de la multiresistencia a fármacos.<sup>15</sup>

El compuesto tetrandine (130), aislado de las raíces de *Cyclea barbata*, presentó actividad frente a *P. falciparum*, otro alcaloide, pendulina (131), aislado de *Isopyrun thalictroides* es 5 veces más efectivo que tetrandine (130), con bajos niveles de toxicidad y un índice de seguridad del 100%, lo que indica que podría ser un prometedor compuesto antiplasmódico.<sup>16</sup> Este tipo de compuestos ha llamado la atención por su acción sinérgica de los fármacos antiplasmódicos comerciales; así, combinaciones de tetrandine (130), con cloroquina (105) y artemisinina (117), están en estudio.<sup>6</sup>



tetrandine (130)

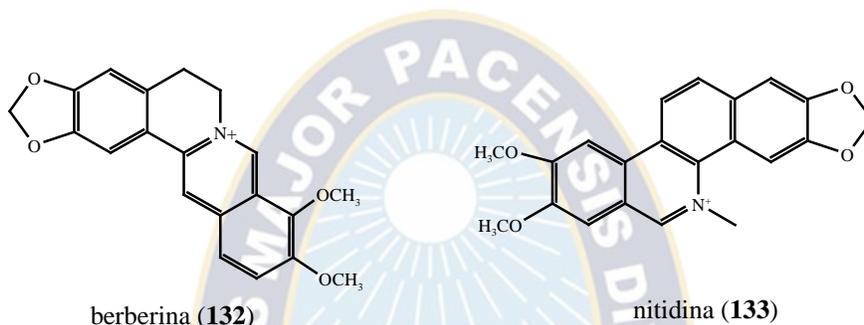


pendulina (131)

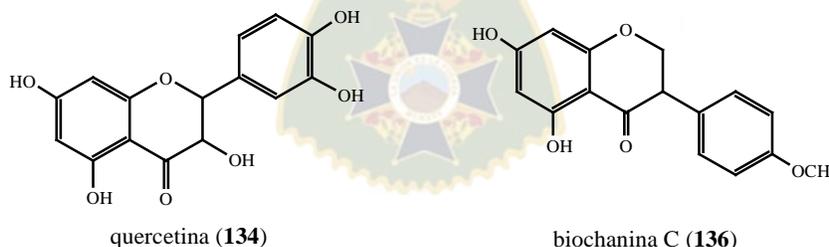
<sup>15</sup> Haruky, K.; Bray, P. G.; Ono, M.; Ward, S. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, 44, 2706-2708.

<sup>16</sup> Valentin, A.; Benoit-Vical, F.; Moulis, C.; Stanislas, E.; Mallié, M.; Fouraste, I.; Bastide, J. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, 41, 2305-2307.

Diversos alcaloides tipo protoberberina como la berberina (**132**), son compuestos muy potentes y actúan inhibiendo la proliferación de los parásitos de malaria en un modelo *in vitro* pero no son efectivos *in vivo*.<sup>17</sup> La nitidina (**133**), es muy activo y su mecanismo podría estar relacionado con la inhibición de las topo-isomerasas, sin embargo ensayos clínicos como agente antileucémicos indican que el compuesto es tóxico.<sup>18</sup>



Las flavonas en general son compuestos que tienen una moderada actividad como agentes antiplasmódicos, así por ejemplo la quercetina (**134**), tiene un  $CI_{50}$  de 21  $\mu$ M, mientras que su glucósido rutina (**135**) no presenta actividad.<sup>19</sup> En contraste, los isoflavonoides como la biochanina C (**136**), tienen actividad similar a las chalconas. La licochalcona A (**137**), aislada de *Glycyrrhiza sp*, presenta actividad *in vitro* e *in vivo* frente a *P. falciparum* sensible a la cloroquina (**105**) y la administración oral de este flavonoide en ratones infectados con *P. yoelii*, mostró ser eficaz al controlar la infección.<sup>20</sup>



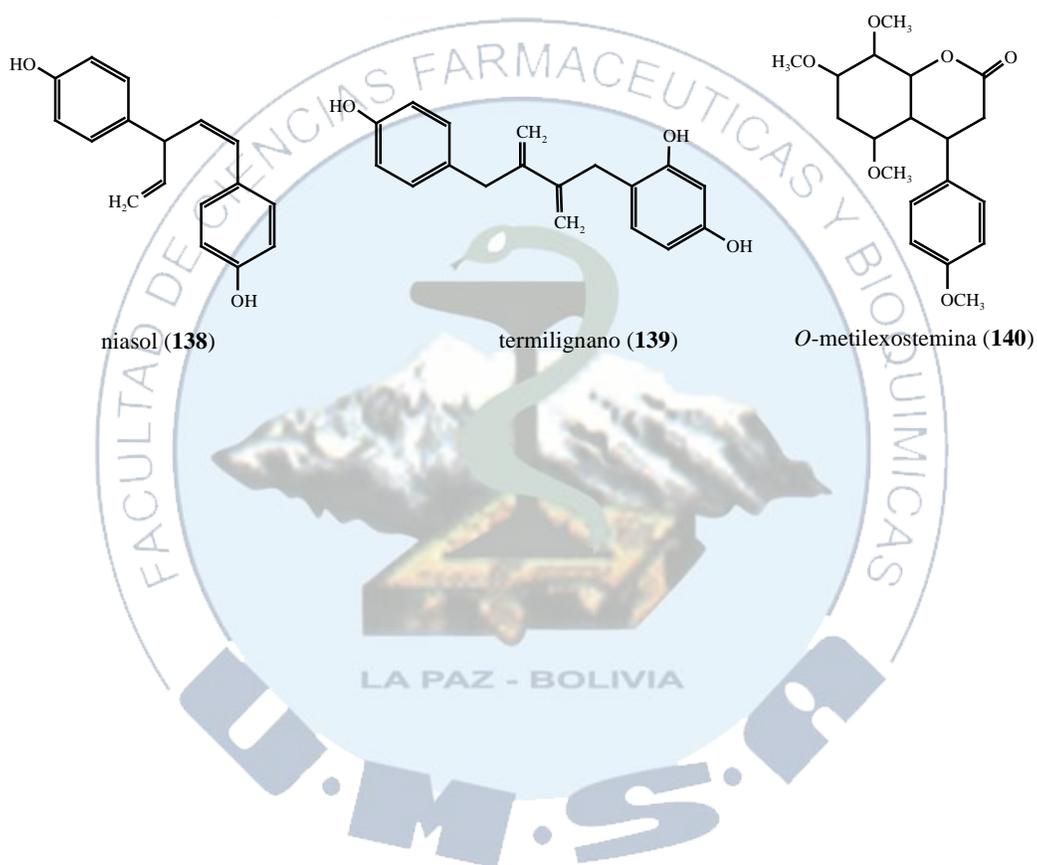
<sup>17</sup> Wright, C. W.; Marshall, S. J.; Russell, P.F.; Anderson, M. M.; Phillipson, J. D.; Kirby, G. C.; Warshurst, D. C.; Schiff, P. L. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1638-1640.

<sup>18</sup> Gakunju, D. M.N.; Mberu, E.K.; Dossaji, S.F.; Gray, A. I.; Waigh, R. D.; Waterman, P. G. Watkins, W. M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, 39, 2606-2609.

<sup>19</sup> Khalid, S. A.; Farouk, A.; Geray, T. G.; Jensen, J. B. *J. Ethnopharmacol.* **1986**, 15, 201-209.

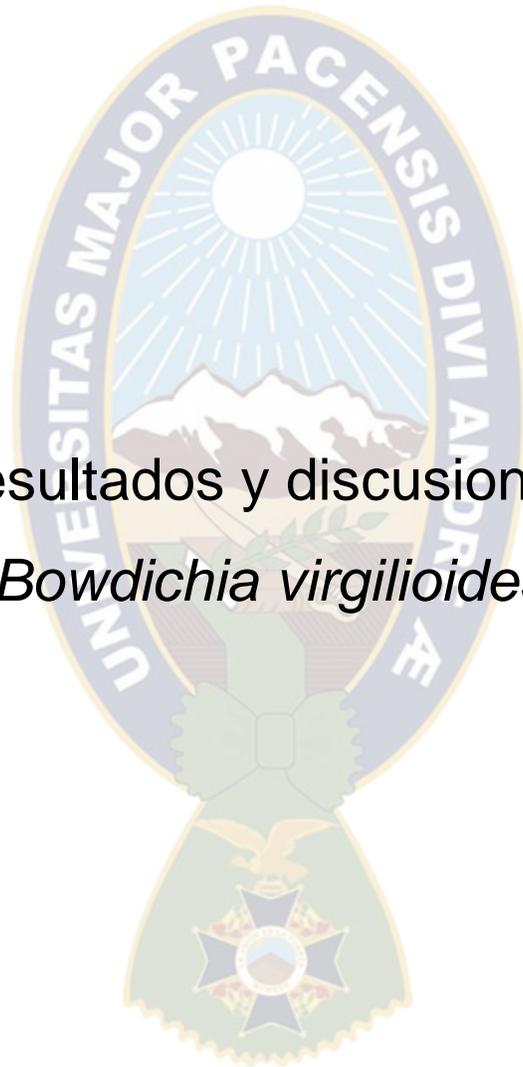
<sup>20</sup> Kharazmi, A.; Chen, M.; Zhai, L.; Theander, T. G.; Christensen, S. *Antrop. Med. Parasitol.* **1997**, 91, S91-95.

Los neolignan tipo niasol (**138**), y termilignano (**139**), inhiben de manera significativa el desarrollo de cepas de *P. falciparum* cloroquina sensible y resistente. Del fraccionamiento bioguiado del extracto de *Exostema mexicanun*, conocida como “quina” en México y utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de la malaria, se aislaron fenilcumarinas de las cuales *O*-metilexostemina (**140**), mostró actividad antiplasmódica frente a *P. falciparum*.<sup>21</sup>



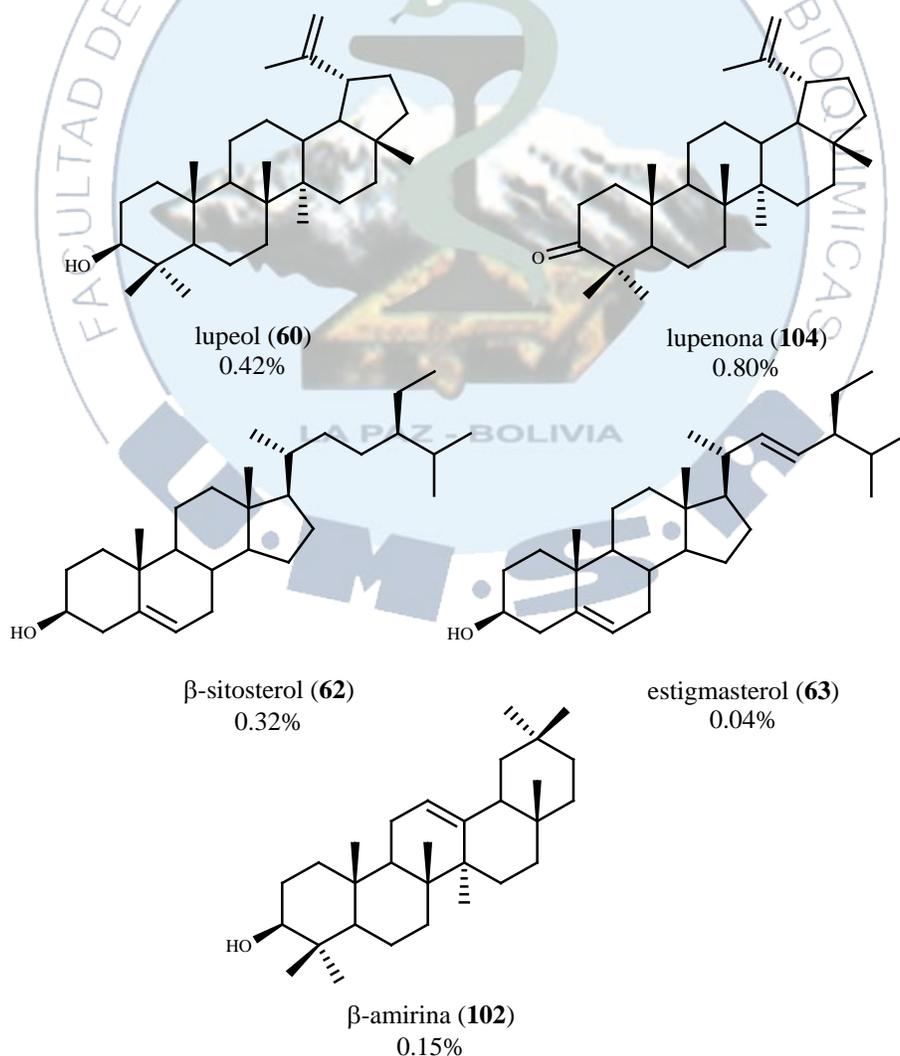
<sup>21</sup> Köhler, I.; Jenett-Siems, K.; Mockenhaupt, F. P.; Siems, K.; Gonzales, J.C.; Hernandez, M. A.; Ibarra, R. A.; Berendsohn, W. G.; Bienzle, U.; Eich, E. *Planta Med.* **2001**, 67, 89-91.

Resultados y discusiones:  
*Bowdichia virgilioides*



## Metabolitos aislados del extracto de hojas de *Bowdichia virgilioides*

Las hojas secas y molidas de *Bowdichia virgilioides* fueron sometidas a una extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, obteniéndose 10.5 g de extracto crudo al evaporar el solvente. El extracto orgánico crudo fue sometido a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna, obteniéndose diez fracciones, las cuales fueron sometidas a purificación por diferentes técnicas cromatográficas como: cromatografía en columna, cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex LH-20, cromatografía en capa fina y preparativa, que permitieron el aislamiento e identificación de dos compuesto de la serie lupano: lupeol y lupenona, dos de la serie esteroides: β-sitosterol y estigmasterol, y uno de la serie oleano: β-amirina.



## Determinación estructural del compuesto 60

El compuesto **60** muestra en su espectro de masas un ión molecular a 426  $m/z$ , de una fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de masas de baja resolución se observaron la pérdida de fragmentos a 411  $m/z$  correspondiente a la pérdida de un metilo [ $M^+ - CH_3$ ], pérdida de un metilo y agua a 393  $m/z$  [ $M^+ - CH_3 - H_2O$ ], a 218, 207, 203 y 189  $m/z$ ,<sup>1</sup> correspondiente a las principales fragmentaciones de un esqueleto de la serie lupano, figura N°51 y esquema N°5.

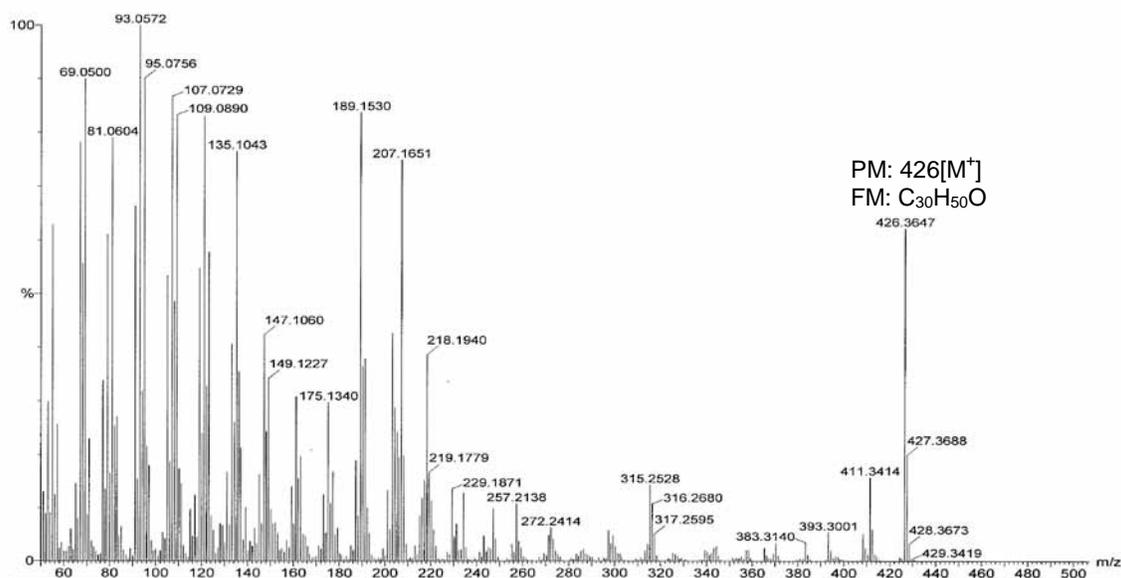
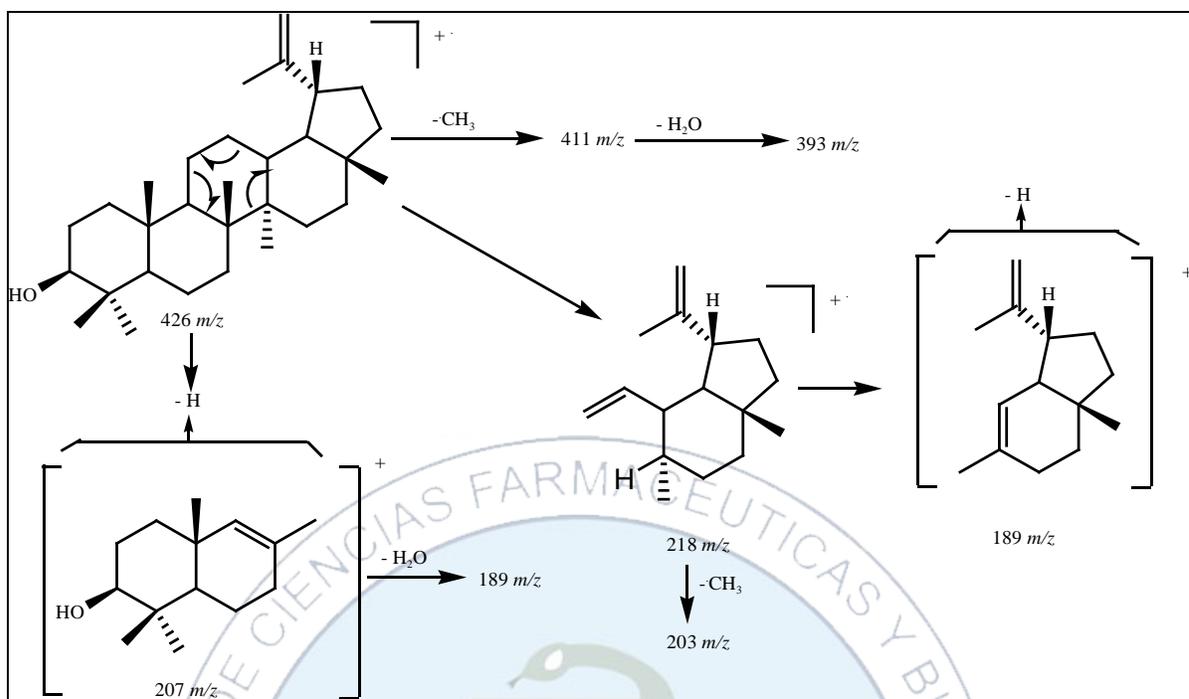


Figura N°51. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **60**.

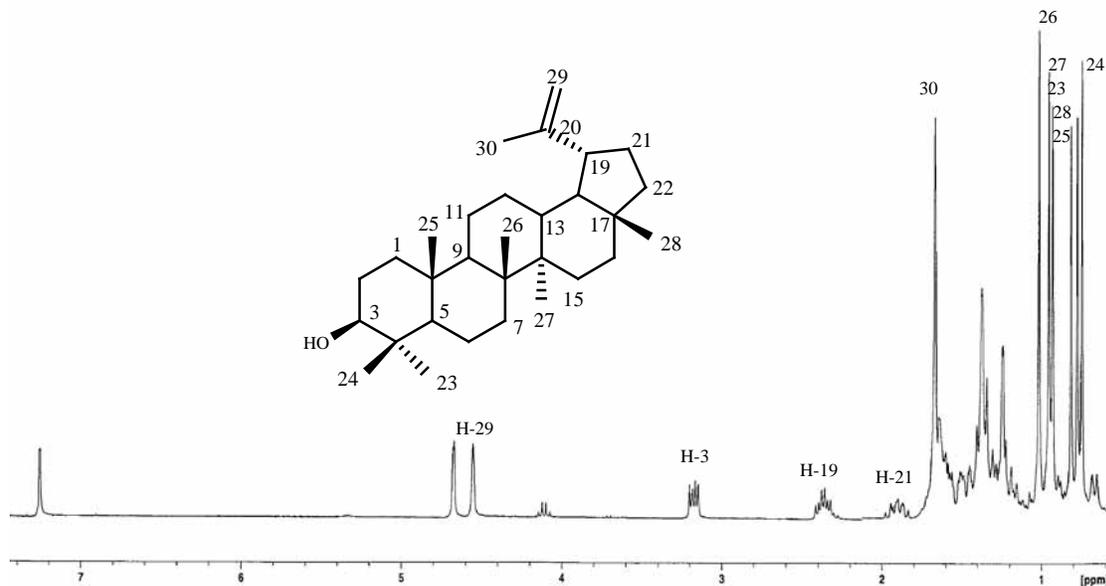
<sup>1</sup> Rasool, N. *Estudio químico de los componentes de Psoralea Plicata y Pentatropis spiralis*. Tesis Doctoral. **1991**, 64-71.



Esquema N°5. Fragmentación del compuesto 60.<sup>2</sup>

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H presento seis señales como singletes que integra cada uno para tres protones a  $\delta_H$ : 0.77 (3H, s, Me-24), 0.81 (3H, s, Me-28), 0.86 (3H, s, Me-25), 0.93 (3H, s, Me-27), 0.95 (3H, s, Me-23) y 1.02 (3H, s, Me-26), a campos mas bajos otro singlete a  $\delta_H$ : 1.67 (3H, s, Me-30) asignable a un metilo sobre doble enlace, un multiplete de base ancha correspondiente a protones de un metileno a  $\delta_H$ : 1.94 (2H, m, H-21), dos doble dobletes, uno a  $\delta_H$ : 2.4 (1H, dd,  $J=11.0$  y  $5.7$ Hz, H-19) asignable a un protón metínico y 3.20 (1H, dd,  $J=10.9$  y  $5.3$ Hz, H-3) asignable a un protón geminal a un alcohol secundario; dos dobletes correspondiente a protones de un metileno exocíclico a  $\delta_H$ : 4.55 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29) y 4.67 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura del compuesto **60** como lupeol, figura N°52.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Bravo, J. A. *Estudio químico y biológico de metabolitos de seis plantas bolivianas con actividad antiparasitaria, antibacteriana y antifúngica*, Tesis doctoral. 1999, 163-164, 215-217.



**Figura N°52.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) del compuesto **60**.

### Determinación estructural del compuesto **62**

El compuesto **62** muestra en su espectro de masas un ión molecular a 414  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$ , determinada por espectrometría de alta resolución. En el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos significativos a 396  $m/z$  pérdida de una molécula de agua [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ] y 381  $m/z$  [ $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ ] pérdida de un grupo metilo, a 329, 303 y 273  $m/z$ , fragmentaciones que corresponden al esqueleto de la serie esteroides, figura N°53 y esquema N°6.<sup>1</sup>

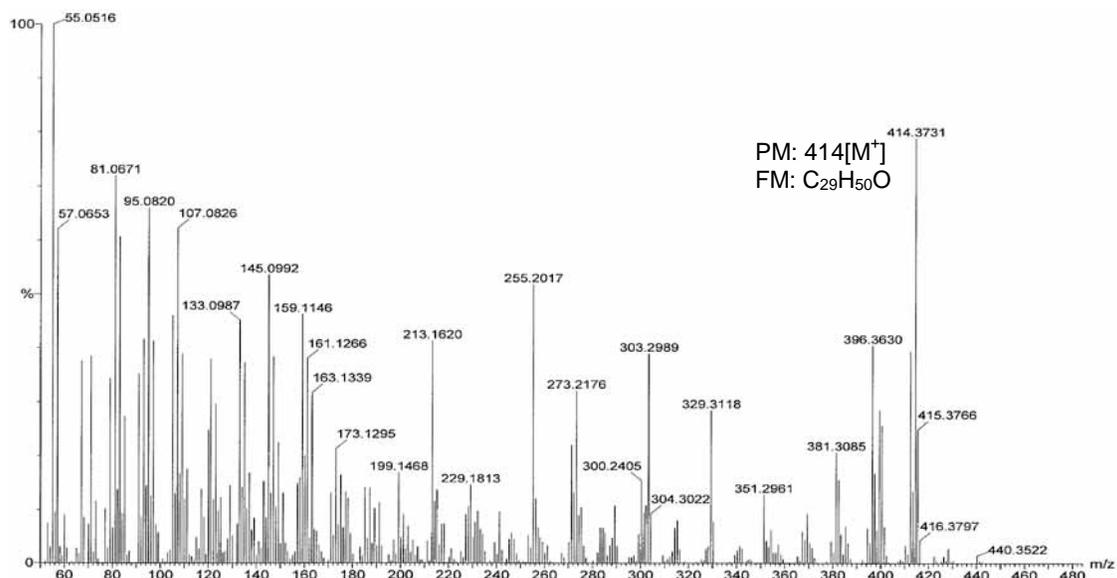
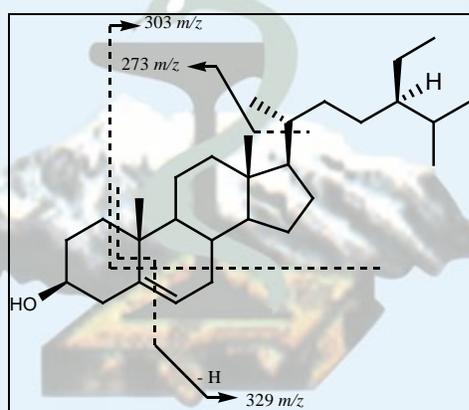


Figura N°53. Espectro de masas de baja resolución del compuesto **62**.



Esquema N°6. Fragmentación del compuesto **62**.<sup>1</sup>

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H presento seis señales la región de los metilos que integra cada una para tres protones, dos singletes correspondientes a metilos angulares a  $\delta_H$ : 0.69 (3H, s, Me-18) y 1.00 (3H, s, Me-19), tres dobletes característicos de metilos de la cadena alifática a  $\delta_H$ : 0.82 (3H, d,  $J=6.3$ Hz, Me-27), 0.84 (3H, d,  $J=6.5$ Hz, Me-26), 0.93 (3H, d,  $J=6.4$ Hz, Me-21), y un triplete a  $\delta_H$ : 0.86 (3H, t,  $J=2.7$ Hz, Me-29); así mismo un multiplete a  $\delta_H$ : 3.54 (1H, m, H-3) asignable a un protón geminal a un alcohol, un doblete de protón vinílico a  $\delta_H$ : 5.35 (1H, d,  $J=4.2$ Hz, H-6). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura del compuesto **62** como  $\beta$ -sitosterol, figura N°54.<sup>2</sup>

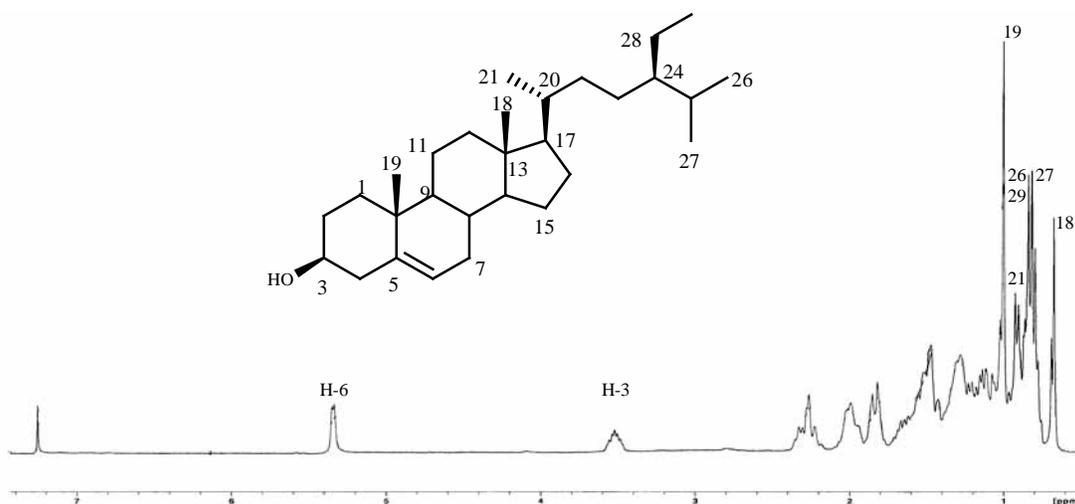
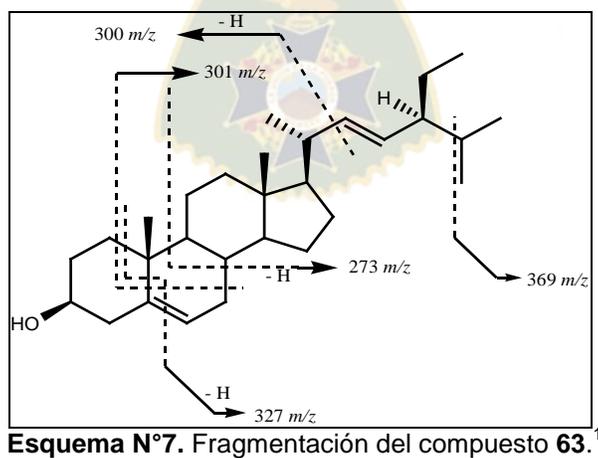


Figura N°54. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) del compuesto **62**.

### Determinación estructural del compuesto **63**

El compuesto **63** muestra en su espectro de masas un ión molecular a 412  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ , determinada por espectrometría de masas de alta resolución, en el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos a 394  $m/z$ , correspondientes a la pérdida de agua [ $\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$ ] y 379  $m/z$  a la pérdida de un metilo y agua [ $\text{M}^+ - \text{CH}_3 - \text{H}_2\text{O}$ ], 369, 327, 301, 300 y 273  $m/z$  característico del esqueleto de la serie esteroides, esquema N°7.<sup>1</sup>



Esquema N°7. Fragmentación del compuesto **63**.<sup>1</sup>

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H presento dos señales como singuletes a  $\delta_H$ : 0.69 (3H, s, Me-18) y 1.00 (3H, s, Me-19) correspondientes a los dos metilos angulares, así mismo señales para cuatro metilos, uno como triplete a  $\delta_H$ : 0.82 (3H, t,  $J=6.3$ Hz, Me-29) y tres como dobletes a  $\delta$  0.86 (3H, d,  $J=7.1$ Hz, Me-27), 0.87 (3H, d,  $J=2.7$ Hz, Me-26) y 1.02 (3H, d,  $J=7.0$ Hz, Me-21), además de tres multipletes asignables a protones metilenos a  $\delta_H$ : 1,63 (2H, m, H-1), 2,31 (2H, m, H-2), y uno asignable a un protón del alcohol secundario a  $\delta_H$ : 3.56 (1H, m, H-3), dos doble dobletes a  $\delta_H$ : 5.02 y 5.18 (2H, dd,  $J=16.6$  y 9.3Hz, H-23, H-22), y un doblete a  $\delta$  5.35 (1H, d,  $J=4.2$ Hz, H-6) correspondientes a protones metínicos. Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura del compuesto **63** como estigmasterol, figura N°55.<sup>3</sup>

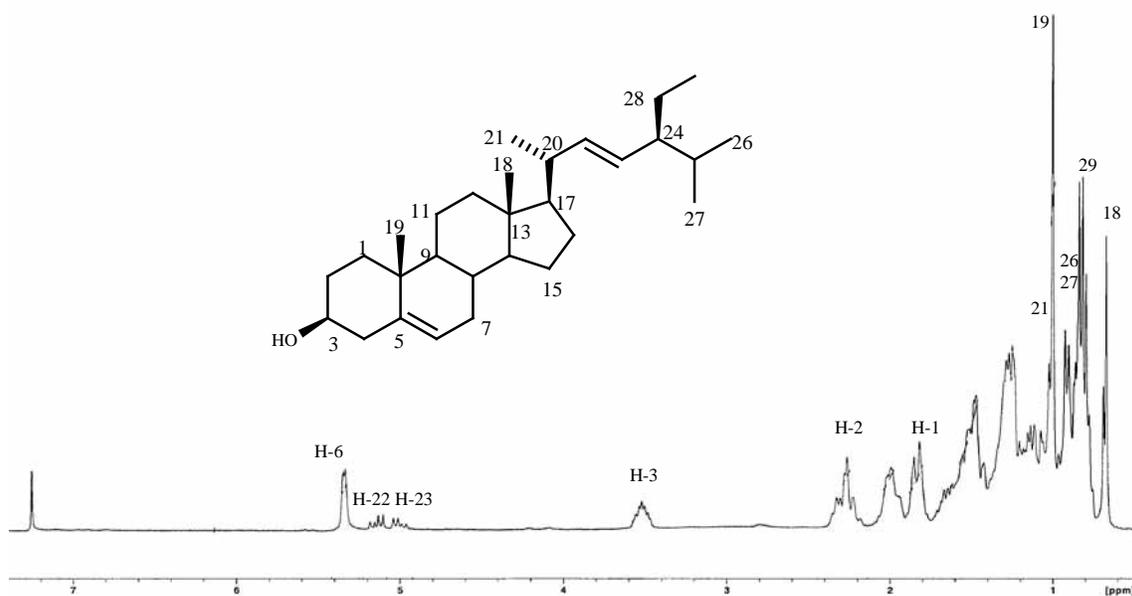
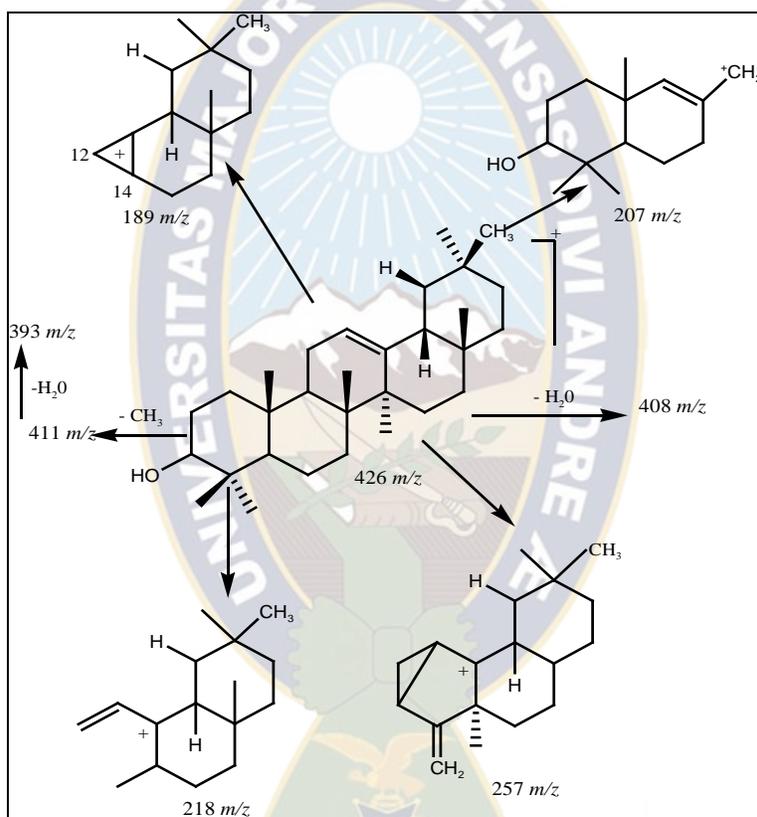


Figura N°55. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) del compuesto **63**.

<sup>3</sup> Bravo, J. A. *Saponines de Myrsine coriacea*. Tesis de Maestría. **1993**, 12.

## Determinación estructural del compuesto 102

El compuesto **102** muestra en su espectro de masas un ión molecular a 426  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ , determinada por espectrometría de alta resolución, en el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos a 411, 408, 393, 257, 218, 207 y 189  $m/z$ , fragmentaciones que corresponden al esqueleto de la serie oleano, esquema N°8.<sup>1</sup>



Esquema N°8. Fragmentación del compuesto 102.

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H presenta ocho señales como singuletes correspondientes a metilos a  $\delta_H$ : 0.78 (3H, s, Me-24), 0.82 (3H, s, Me-28), dos solapados a  $\delta_H$ : 0.86 (6H, s, Me-29, Me-30), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.95 (3H, s, Me-23), 0.99 (3H, s, Me-26) y 1.12 (3H, s, Me-27), que integran cada uno para tres protones, un multiplete a  $\delta_H$ : 3.22 (1H, m, H-3) asignable a un protón del alcohol secundario, un triplete a  $\delta_H$ : 5.12 (1H, t,  $J=3.4\text{Hz}$ , H-12), correspondiente a un protón metínico. Estos datos comparados con los reportados en la

bibliografía confirmaron la estructura del compuesto **102** como  $\beta$ -amirina, figura N°56.<sup>4</sup>

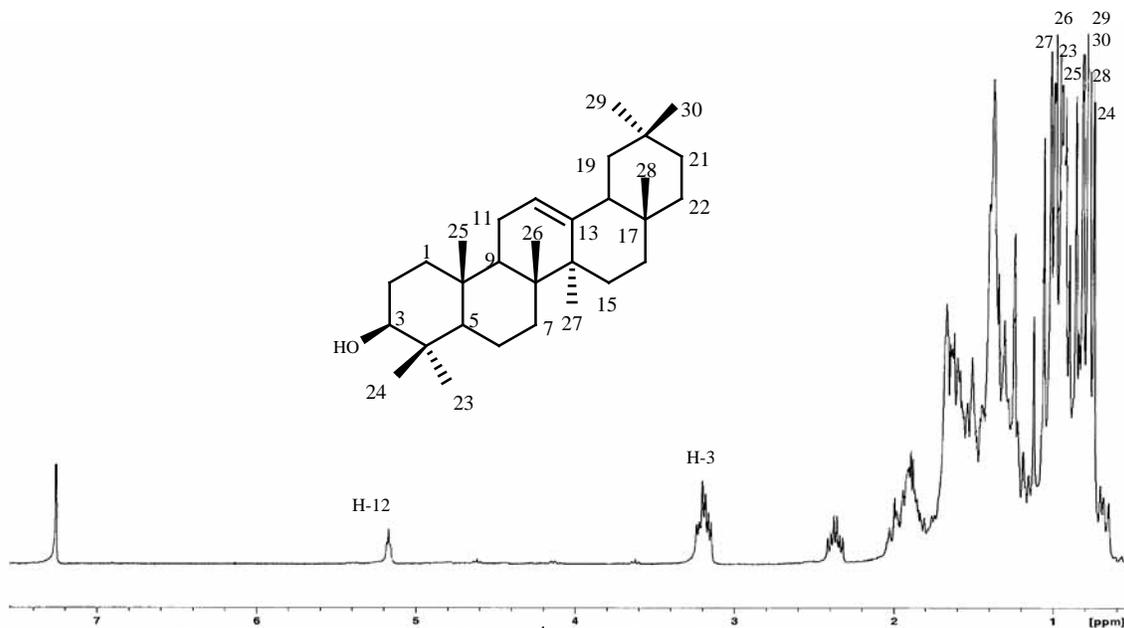
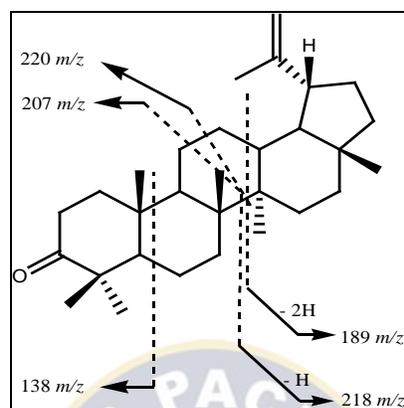


Figura N°56. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) del compuesto **102**.

### Determinación estructural del compuesto **104**

El compuesto **104** muestra en su espectro de masas un ión molecular a 424  $m/z$ , correspondiente a una fórmula molecular C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O, determinada por espectrometría de masas de alta resolución. En el espectro de masas de baja resolución, se observaron fragmentos significativos a 409  $m/z$  [M<sup>+</sup>-CH<sub>3</sub>] y 205  $m/z$  [M<sup>+</sup>-C<sub>16</sub>H<sub>27</sub>], 220, 218, 207, 189 y 138  $m/z$  correspondiente a las principales fragmentaciones del esqueleto de la serie lupano,<sup>4</sup> esquema N°9.<sup>1</sup>

<sup>4</sup> Buduzikiewicz, H.; Djerassi, C.; Williams D.H. *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*. Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes. San Francisco: Holden-Day. **1964**, 2.



Esquema N°9. Fragmentación del compuesto **104**.<sup>1</sup>

En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H presento siete señales como singuletes que integra cada una para tres protones, a  $\delta_H$ : 0.78 (3H, s, Me-24), 0.90 (3H, s, Me-28), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.98 (3H, s, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-26), 1.53 (3H, s, Me-23), y uno a 1.68 (3H, s, Me-30) asignable a un metilo sobre doble enlace, un triplete asignable a protones de un metileno a  $\delta_H$ : 2.37 (2H, t,  $J=5.3\text{Hz}$ , H-2), dos dobletes correspondiente a protones de un metileno exocíclico a  $\delta_H$ : 4.57 (2H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ , H-29) y 4.68 (2H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ , H-29). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura del compuesto **104** como lupenona, figura N°57.<sup>5</sup>

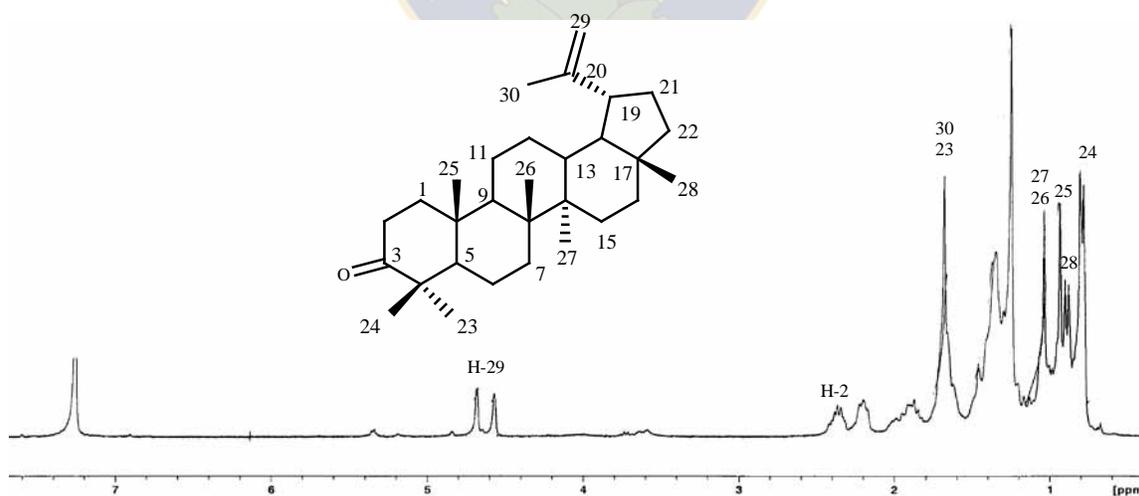


Figura N°57. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) del compuesto **104**.

<sup>5</sup> Viqar Uddin Ahmad, Atta-Ur-Rahman. *Handbook of Natural Products Data*. Pentacyclic Triperpenoids. Elsevier, Amsterdam-Netherlands. 1994, 1, 3, 21-22, 1029-1030.

Este trabajo constituye el primer estudio de las hojas de *Bowdichia virgilioides*, aislándose terpenos de la serie lupano, esteroides y oleano; estudios realizados en la corteza aislaron alcaloides de tipo ormosia, ormosanina y homormosanina reportados por Bravo *et. al.*,<sup>6</sup> estos datos muestran la presencia de diferente tipo de metabolitos, alcaloides en la corteza, triterpenos y esteroides en las hojas.

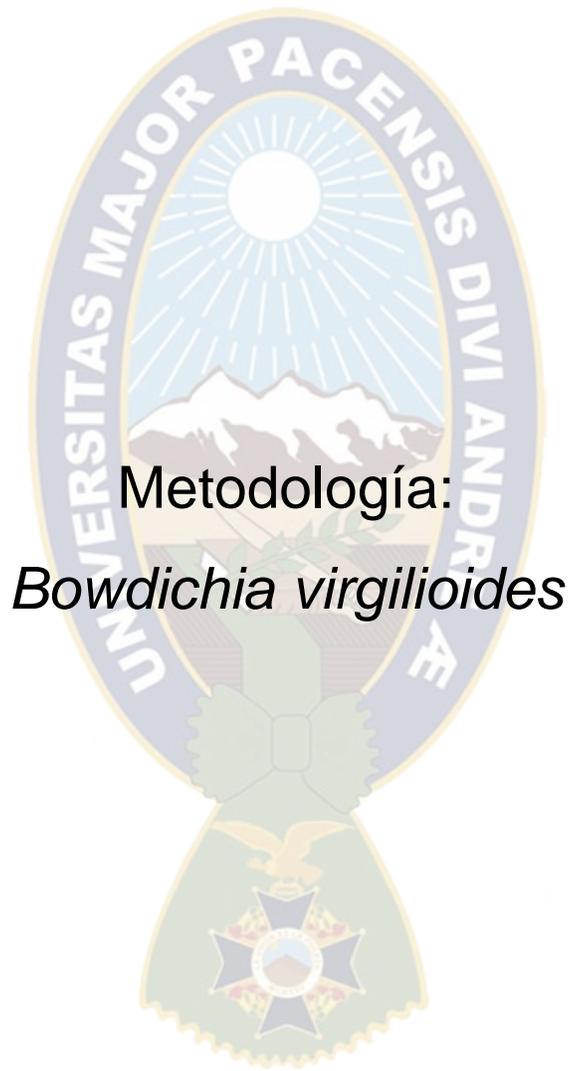
### Actividad antiplasmódica

El extracto crudo y los cinco productos aislados: lupeol, lupenona,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol y  $\beta$ -amirina, fueron evaluados *in vitro* frente a parásitos de *Plasmodium falciparum* en estadio esquizonte,

Los resultados de la actividad antiplasmódica nos muestran un valor de  $CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ , para todas las muestras evaluadas, por lo tanto resultaron inactivas. Se ha utilizado como control positivo cloroquina a una concentración de 10 nM.

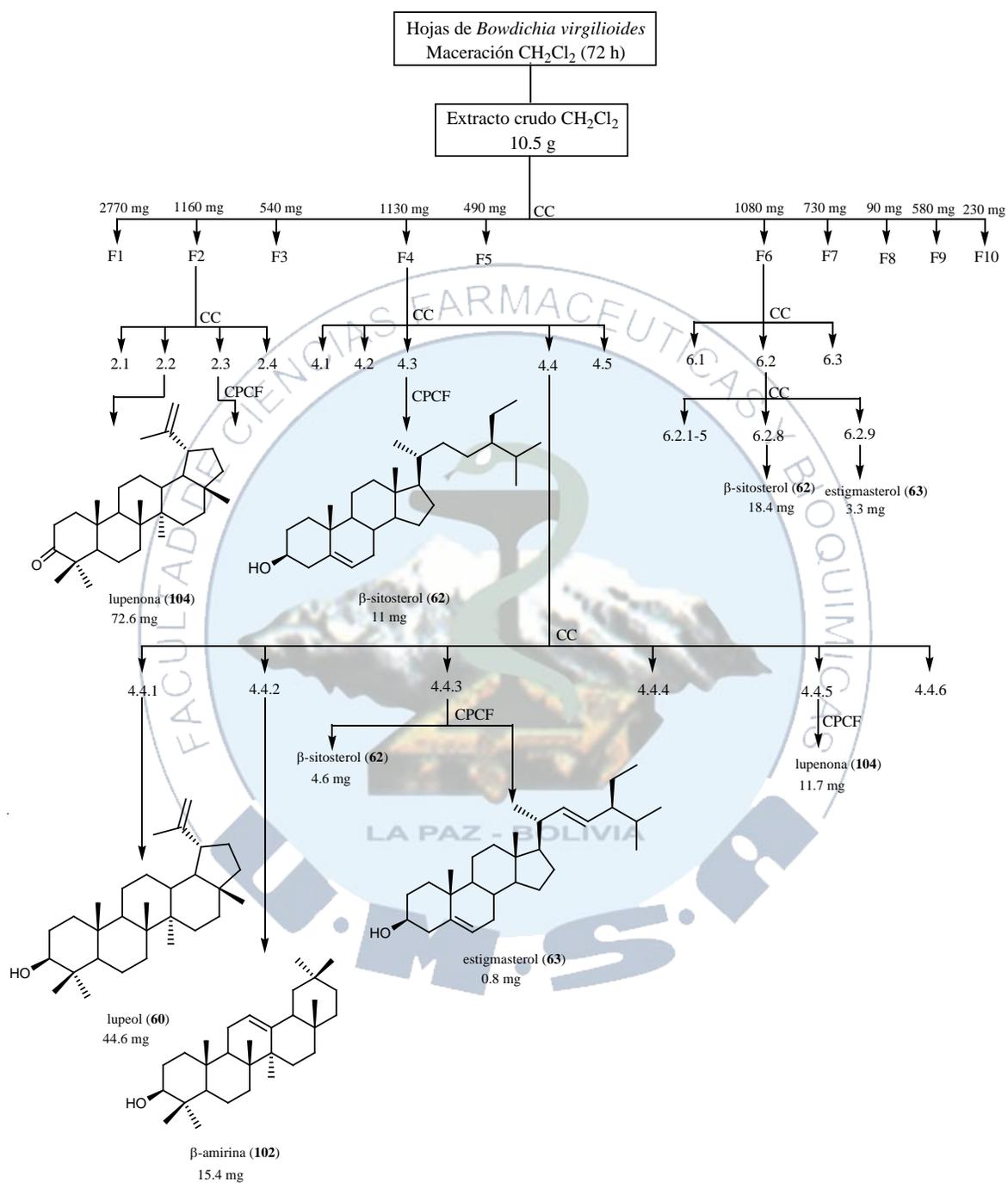
---

<sup>6</sup> Bravo, J.A.; Lavaud, C.; Bourdy, G.; Deharo, E.; Giménez, A.; Sauvain, M. *Revista Boliviana de Química*. 2002, 19, 1, 12-17.



Metodología:  
*Bowdichia virgilioides*

## Aislamiento de los metabolitos de hojas de *Bowdichia virgilioides*



## Colección del material vegetal

Las hojas de *Bowdichia virgilioides* familia Fabaceae fueron colectadas en Macagua, provincia Abel Iturralde, del departamento de La Paz, en mayo y septiembre del 2006 (Sud 13°48'337 y al Oeste 68°06'707 a una altura de 360 m.s.n.m.). Muestras de herbario fueron depositadas en el Herbario Nacional de La Paz y su identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con las muestras de vaucher (GB1734, GB1820 y GB1831) del Herbario Nacional de La Paz, Bolivia.

## Preparación del extracto

Las hojas secas (753 g) y pulverizadas, fueron sometidos a una maceración con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:10) durante 72 horas a temperatura ambiente. El residuo obtenido fue filtrado, evaporado, concentrado a 40°C en el rotaevaporador y llevado a sequedad, obteniéndose 10.5 g de extracto crudo, 1.39% con relación al material seco.

## Separación y aislamiento de los componentes del extracto

El extracto crudo, fue fraccionado por cromatografía en columna, utilizando como sistema de elusión mezclas de *n*-hexano:AcOEt en orden creciente de polaridad, llegando a obtener 10 fracciones (**F1-F10**).

La fracción **F2** fue recromatografiada en columna de Sephadex LH-20 suspendida y eluída con la mezcla *n*-hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1:1), obteniéndose 4 fracciones. De la fracción F2.2 se aisló **lupenona** (71.8 mg). La fracción F2.3 fue separada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-Et<sub>2</sub>O (8:2), aislándose **lupenona** con R<sub>f</sub>=0.36 (0.8 mg).

La fracción **F4** fue recromatografiada en columna en Sephadex LH-20 suspendida y eluída con la mezcla *n*-hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1:1), obteniéndose 5 fracciones. La fracción F4.3 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de *n*-hexano-EtOAc (85:15), aislándose **β-sitosterol** con un Rf=0.19 (11 mg). Los componentes de la fracción F4.4 fueron separados mediante cromatografía en columna sobre sílica gel con sistemas de elución de *n*-hexano-Me<sub>2</sub>CO con polaridad creciente, obteniéndose 6 fracciones. De la fracción F4.4.1 y F4.4.2 se aislaron **lupeol** (44.6 mg) y **β-amirina** (15.4 mg) respectivamente. La fracción F4.4.3 fue separada mediante cromatografía en placa preparativa con *n*-hexano-Me<sub>2</sub>CO (75:25) aislándose **β-sitosterol** con un Rf=0.55 (4.6 mg) y **estigmasterol** con Rf=0.45 (0.8 mg). La fracción F4.4.5 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa con *n*-hexano-Me<sub>2</sub>CO (75:25) aislándose **lupenona** con un Rf=0.42 (11.7 mg).

La fracción **F6** fue recromatografiada en columna en Sephadex LH-20 suspendida y eluída con la mezcla *n*-hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1:1), obteniéndose 3 fracciones. La fracción F6.2 fue purificada por cromatografía en columna sobre sílica gel con una mezcla de *n*-hexano-Et<sub>2</sub>O en polaridad creciente, llegando a obtener nueve fracciones, de las fracciones F6.2.8 y F6.2.9 se aislaron **β-sitosterol** (18.4 mg) y **estigmasterol** (3.3 mg) respectivamente.

### Datos espectroscópicos y espectrométricos

Compuesto **lupeol (60)**: sólido amorfo amarillo, 44.6 mg, 0.42% del extracto crudo. EM *m/z* (%): 426 [M<sup>+</sup>] (62.2), 411 (15.8), 393 (5.4), 218 (38.6), 207 (74.9), 203 (42.6), 189 (83.6). EMAR: Observado 426.3883, calculado para C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O, 426.3862. RMN-<sup>1</sup>H: 0.77 (3H, s, Me-24), 0.81 (3H, s, Me-28), 0.86 (3H, s, Me-25), 0.93 (3H, s, Me-27), 0.95 (3H, s, Me-23), 1.02 (3H, s, Me-26), 1.67 (3H, s, Me-30), 1.94 (2H, m, H-21), 2.4 (1H, dd, *J*=11.0 y 5.7Hz, H-19), 3.20 (1H, dd, *J*=10.9 y 5.3Hz, H-3), 4.55 (2H, d, *J*=2.0Hz, H-29), 4.67 (2H, d, *J*=2.0Hz, H-29).

Compuesto  **$\beta$ -sitosterol (62)**: sólido amorfo blanco, 34.0 mg, 0.32% del extracto crudo. EM  $m/z$  (%): 414 [ $M^+$ ] (78.8), 396 (40.4), 381 (20.7), 329 (28.5), 303 (38.9), 273 (32.1), calculado para  $C_{29}H_{50}O$ . RMN- $^1H$ : 0.69 (3H, s, Me-18), 1.00 (3H, s, Me-19), 0.82 (3H, d,  $J=6.3$ Hz, Me-27), 0.84 (3H, d,  $J=6.5$ Hz, Me-26), 0.93 (3H, d,  $J=6.4$ Hz, Me-21), 0.86 (3H, t,  $J=2.7$ Hz, Me-29), 3.54 (1H, m, H-3), 5.35 (1H, d,  $J=4.2$ Hz, H-6).

Compuesto **estigmasterol (63)**: sólido amorfo blanco, 4.1mg, 0.04% del extracto crudo. EM  $m/z$  (%): 412 [ $M^+$ ] (39.2), 394 (6.5) 379 (4.0), 369 (9.3), 327 (2.6), 301 (9.5), 300 (15.5), 273 (32.1), calculado para  $C_{29}H_{48}O$ . RMN- $^1H$ : 0.69 (3H, s, Me-18), 1.00 (3H, s, Me-19), 0.82 (3H, t,  $J=6.3$ Hz, Me-29), 0.86 (3H, d,  $J=7.1$ Hz, Me-27), 0.87 (3H, d,  $J=2.7$ Hz, Me-26), 1.02 (3H, d,  $J=7.0$ Hz, Me-21), 1.63 (2H, m, H-1), 2.31 (2H, m, H-2), 3.56 (1H, m, H-3), 5.02 y 5.18 (2H, dd,  $J=16.6$  y 9.3Hz, H-23, H-22), 5.35 (1H, d,  $J=4.2$ Hz, H-6)

Compuesto  **$\beta$ -amirina (102)**: sólido amorfo blanco, 15.4mg, 0.15% del extracto crudo. EM  $m/z$  (%): 426 [ $M^+$ ] (7.0), 411 (2.1), 408 (0.5), 393 (0.5), 257 (0.5), 218 (100), calculado para  $C_{30}H_{50}O$ . RMN- $^1H$ : 0.78 (3H, s, Me-24), 0.82 (3H, s, Me-28), 0.86 (6H, s, Me-29, Me-30), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.95 (3H, s, Me-23), 0.99 (3H, s, Me-26), 1.12 (3H, s, Me-27), 3.22 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, t,  $J=3.4$ Hz, H-12).

Compuesto **lupenona (104)**: sólido amorfo blanco, 84.3 mg, 0.80% del extracto crudo. EM  $m/z$  (%): 424 [ $M^+$ ], (0.7) 409 (0.3), 205 (72.0), 220, 218, 207, 189 y 138, calculado para  $C_{30}H_{48}O$ . RMN- $^1H$ : 0.78 (3H, s, Me-24), 0.90 (3H, s, Me-28), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.98 (3H, s, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-26), 1.53 (3H, s, Me-23), 1.68 (3H, s, Me-30), 2.37 (2H, t,  $J=5.3$ Hz, H-2), 4.57 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29), 4.68 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29).

## Actividad antiplasmódica

El extracto (2 mg) disuelto en dimetilsulfóxido (200  $\mu$ L) y de esta se realizan las respectivas diluciones para obtener una concentración de 10  $\mu$ g/mL. Los controles fueron dimetilsulfóxido en dilución 1:100 en RPMI para el control negativo y cloroquina como control positivo a las concentraciones de 10, 100, 1000 nM.

## Preparación de la placa

En cada pozo se colocan 100  $\mu$ L de glóbulos rojos con un hematocrito del 2% (RPMI con suero o plasma al 20%), y una parasitemia del 1% (los parásitos deben de estar en estadio anillo en su mayoría, no se toman en cuenta los otros estadios), y luego se añaden las concentraciones seriales de las drogas (obteniendo un volumen final de 200  $\mu$ L), esta placa se incubó a 37°C por el lapso de 48 hrs. Por último se observó en el microscopio, con lente de inmersión X 100, contando tanto glóbulos rojos no infectados (GRL) como infectados (GRI), para así obtener el % de inhibición. El cálculo para hallar la Concentración Inhibitoria del 50% en la maduración de los esquizontes ( $CI_{50}$ ), se hizo por el método gráfico mediante el programa Cricket Graph 1.3, considerándose como activos aquellos que presentaron un  $CI_{50}$  menor a 10  $\mu$ g/mL.

Las pruebas fueron realizadas por el M Sc. David Gutiérrez, bajo la dirección del Dr. Alberto Giménez T., en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.



TERCERA PARTE:

Técnicas experimentales

## **Técnicas Cromatográficas**

### Cromatografía en capa fina (CCF)

Las cromatografías en capa fina se realizan sobre cromatofolios (20 x 20 cm) de gel de sílice tipo G de 0.25 mm de espesor, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G/UV<sub>254</sub>. La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 360 nm, o bien fue rociado con óleum (disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4%, CH<sub>3</sub>COOH, 80%, H<sub>2</sub>O, 16%) y posterior calentamiento a 120°C.

### Cromatografía preparativa en capa fina (CPCF)

Se utilizan placas (20 x 20 cm) de 1 mm de espesor de gel de sílice tipo G, con indicador de fluorescencia a 254 nm, de la empresa Macherey-Nagel Sil G-100 UV<sub>254</sub>. La cantidad de muestra a sembrar en estas placas es de unos 40 mg, usándose para la elusión de diferentes mezclas de disolventes.

La detección de los productos sobre las placas se realiza por fluorescencia con luz ultravioleta a 254 y/o 260 nm, o bien rociado con óleum sobre el borde, después de proteger convenientemente el resto de la placa con una lámina de vidrio y posterior calentamiento de la zona tratada con una pistola de calor.

### Cromatografía en columna (CC)

En la realización de columnas cromatográficas (secas y húmedas) se emplea gel de sílice fina, (0.063-0.200 mm de diámetro), de la empresa Macherey-Nagel. Las columnas secas se montan aplicando vacío a la columna mientras se carga lentamente con gel de sílice. La mezcla a resolver se coloca en la parte superior de la columna, adsorbida en gel de sílice gruesa, (0.2-0.5 mm de diámetro), de la empresa Merck. Las columnas húmedas se montan con

gel suspendido en un disolvente, con posterior compactación por presión, colocando la muestra a resolver disuelta en la mínima cantidad de disolvente.

#### Cromatografía líquida al vacío (CLV)

En la realización de las columnas cromatográficas se emplea gel de sílice fina, (0.063-0.200 mm de diámetro), de la empresa Macherey-Nagel. Las columnas se montan aplicando vacío, mientras se carga lentamente con gel de sílice. La mezcla a resolver se coloca en la parte superior de la columna, adsorbida en gel de sílice gruesa (0.2-0.5 mm de diámetro), de la empresa Merck. La cromatografía se realiza aplicando vacío, el cual proporciona un aumento de la velocidad del flujo de la fase móvil y las fracciones se recogen en un matraz de fondo redondo.

#### Cromatografía de exclusión molecular (CEM)

Se usa como soporte Sephadex LH-20, que suministra la empresa Pharmacia (Sigma) y se requiere una previa estabilización del polímero en suspensión con metanol (4.1 mL/g) durante, al menos, dos horas. A continuación, se vierte en la columna y se deja reposar durante una hora, aproximadamente. Esta columna se estabiliza, posteriormente en la disolución que se va a usar como eluyente, tres veces la cantidad correspondiente al volumen muerto. El eluyente que se utiliza es *n*-hexano - cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) - metanol (MeOH) (2:1:1). La muestra a cromatografiar tras ser filtrada se coloca en la cabeza de la columna, disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen muerto de la columna. La columna puede ser reutilizada tras ser lavada con metanol y estabilizada con el eluyente que se va utilizar.

### Fraccionamiento químico

Los extractos obtenidos fueron fraccionados por cromatografía líquida al vacío (CLV), usando como sistema de elusión mezclas de *n*-hexano-Acetato de etilo (AcOEt), en orden creciente de polaridad obteniéndose así numerosas fracciones (según se detalla en cada esquema para cada especie vegetal). Las fracciones de *B. virgilioides* fueron recromatografiadas utilizando cromatografía de exclusión molecular en Sephadex LH-20 (*n*-hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH: 2:1:1).

Las restantes fracciones de ambas especies, fueron recromatografiadas, utilizando cromatografía flash, cromatografía en placa preparativa y cromatografía en capa fina, usando como eluyente diferentes mezclas de AcOEt, *n*-hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Me<sub>2</sub>CO, Et<sub>2</sub>O, para aislar e identificar los metabolitos presentes en estas fracciones.

### **Técnicas espectroscópicas y espectrométricas**

#### Espectrometría de masas de baja resolución (EM)

Los espectros de masas de baja resolución se realizaron en espectrómetros Hewlett-Packard, modelo 5995 y VG Micromass ZAB-2F.

#### Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)

La determinación de las fórmulas moleculares de fragmentos y/o iones moleculares fueron realizados en un espectrómetro VG Micromass ZAB-2F (a potenciales de ionización de 15-70 e.V.), o Fisons Instruments modelo VG Autospec.

## Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{H}} = 7.24$  ppm, 300 MHz); RMN  $^{13}\text{C}$ , ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta_{\text{C}} = 77.24$  ppm, 75MHz) y DEPT fueron obtenidos en espectrómetros Bruker Avance 300 (300 MHz) y Bruker Avance 400 (400 MHz). Para la realización de los experimentos los productos fueron disueltos en un disolvente deuterado, preferiblemente si el producto es soluble, en cloroformo deuterado,  $\text{CDCl}_3$ , que contiene tetrametilsilano (TMS), como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hz.

Los experimentos bidimensionales se realizaron utilizando programas de COSY, ROESY, HSQC y HMBC. Los estudios espectroscópicos y espectrométricas fueron realizados en el Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González" de la Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España.





## CUARTA PARTE:

### Conclusiones

## CONCLUSIONES

- ✓ Se realizó el estudio químico de corteza de *Galipea longiflora* y hojas de *Bowdichia virgilioides*.
- ✓ Se ha obtenido el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la corteza de *G. longiflora* a escala piloto, determinándose que el tiempo de maceración óptimo es de 5 días, con un rendimiento de 4.6%.
- ✓ Del extracto de *G. longiflora* se aislaron siete alcaloides quinolínicos: 2-fenil-quinolina, 2-*n*-pentil-quinolina, 2-fenil-4-metoxi-quinolina, 2-(3',4'-metilendioxifeniletíl)-quinolina, 2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina, shiquimianina y evolitrina.
- ✓ Se han obtenido los alcaloides totales de corteza de *G. longiflora* de las zonas de Hernández (**HE**), Luz Porvenir (**PO**), Santa Rosa de Maravillas (**SR**), Y-abanico (**YA**) y Covendo (**CO**).
- ✓ Se realizó el fraccionamiento cromatográfico de las muestras de (**HE**), (**PO**), (**SR**), (**YA**) y (**CO**) obteniéndose tres fracciones en cada caso.
- ✓ En todas las fracciones **I** se ha observado la presencia de 2-fenil-quinolina como el compuesto mayoritario.
- ✓ Se ha observado la presencia de 2-fenil-4-metoxi-quinolina y 2-(3',4'-metilendioxifeniletíl)-quinolina, en las fracciones **I** de todas las muestras.
- ✓ En las fracciones **II** además de 2-fenil-quinolina se observó la presencia de 2-*n*-pentil-quinolina, 2-fenil-4-metoxi-quinolina, 2-(3',4'-metilendioxifeniletíl)-quinolina, 2-(3',4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina y shiquimianina.

- ✓ En las muestras de **PO** y **YA** no se observa la presencia de 2-*n*-pentil-quinolina.
- ✓ En las fracciones **III** se determinaron la presencia de 2-*n*-pentil-quinolina, 2-fenil-4-metoxi-quinolina, 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina, shiquimianina y evolitrina.
- ✓ No se ha observado evolitrina en la fracción **III** de las muestras de **YA** y **CO**.
- ✓ Se obtuvo los alcaloides totales de la corteza de los plantines de *G. longiflora* de 14 cm, 19 cm, 30 cm y 51 cm de tamaño.
- ✓ Se realizó el fraccionamiento cromatográfico de cada una de las muestras de los plantines, obteniéndose tres fracciones.
- ✓ Se determinó la presencia de 2-fenil-quinolina como el compuesto mayoritario en las fracciones **I**.
- ✓ En las fracciones **II** de todas las muestras de los plantines se identificaron 2-fenil-quinolina y 2-fenil-4-metoxi-quinolina.
- ✓ Se identificaron shiquimianina en las fracciones **II** y **III** de los plantines de **19 cm** y **30 cm**.
- ✓ En los plantines de **14 cm**, **19 cm** y **51 cm** no se observa 2-*n*-pentil-quinolina.

- ✓ Se identificaron en los plantines de **30 cm** los alcaloides 2-fenil-quinolina, 2-*n*-pentil-quinolina, 2-fenil-4-metoxi-quinolina, 2-(3',4'-metilendioxfeniletil)-quinolina, 2-(3',4'-dimetoxifeniletil)-quinolina, shiquimianina.
- ✓ En los plantines de **30 cm** se han identificado seis de los siete alcaloides presentes en las plantas adultas.
- ✓ Los plantines de **30 cm** son una excelente alternativa como fuente de alcaloides totales tipo quinolina para la obtención a gran escala.
- ✓ Se realizó la preparación de una formulación oral líquida en forma de emulsión en base a los extractos de alcaloides totales.
- ✓ Este trabajo constituye el primer estudio de las hojas de *Bowdichia virgilioides*.
- ✓ Se realizó el estudio fitoquímico de las hojas de *Bowdichia virgilioides*.
- ✓ Se aislaron y determinaron la estructura de tres triterpenos, se obtuvieron dos de la serie del lupano: lupeol, lupenona y uno de la serie del oleano:  $\beta$ -amirina, además de dos esteroides:  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol.
- ✓ Los productos aislados nos muestran la presencia de diferente tipo de metabolitos: alcaloides en la corteza y triterpenos en las hojas.
- ✓ El extracto de diclorometano de las hojas de *Bowdichia virgilioides*, los tres triterpenos y los dos esteroides aislados, fueron evaluados para determinar la actividad antiplasmódica, los resultados obtenidos mostraron a todas las muestras como inactivas con una  $CI_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$ .



**QUINTA PARTE:**

**Publicaciones**

# ESTUDIOS QUÍMICOS, BIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS DE *Galipea longiflora*, Krause

Alberto Giménez<sup>a</sup>, J. Antonio Avila<sup>a</sup>, Grace Ruiz<sup>a</sup>, Magali Paz<sup>a</sup>, Enrique Udaeta<sup>a</sup>, J. Carlos Ticona<sup>a</sup>, Efraín Salamanca<sup>a</sup>, Crispín Paredes<sup>a</sup>, Norika Rodríguez<sup>a</sup>, Katia Quints<sup>a</sup>, Carolina Feraud<sup>b</sup>, Iván Gutiérrez<sup>c</sup>, Rogelio Chuqui<sup>d</sup>, Celín Quenevo<sup>e</sup>, María Fanny Dalence<sup>f</sup> y Marcelo Bascope<sup>f</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas-IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Casilla 3239, La Paz, Bolivia. <sup>b</sup> Laboratorio de Patología del Hospital General de Clínicas, La Paz. <sup>c</sup> Universidad Nacional Autónoma Gabriel Rene Moreno, Santa Cruz, Bolivia. <sup>d</sup> Comunidad de Santa Rosa de Maravilla, Provincia A. Iturrealde, La Paz, Bolivia. <sup>e</sup> Consejo Indígena de los Pueblos Tacana-CIPTA, Tumupasa, La Paz, Bolivia. <sup>f</sup> Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.

\*[agimenez@megalink.com](mailto:agimenez@megalink.com)

**Key words:** *Galipea longiflora*, evanta, *Leishmania*, alcaloides quinolínicos, toxicidad aguda y subcrónica, parámetros farmacocinéticos, cultivo semi-continuo

## RESUMEN

La especie medicinal *Galipea longiflora* (Evanta) es utilizada por las etnias amazónicas: Tacana, Mosekene y Tsimane, como antiparasitario. Los alcaloides totales de esta especie vegetal serán centro de estudios clínicos como tratamiento alternativo para la leishmaniasis cutánea. Nuestros estudios detallan el aislamiento y caracterización de alcaloides quinolínicos, de la corteza y hojas, todos con actividad leishmanicida evaluada sobre promastigotes de: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. chagasi*. Mediante modelos toxico cinéticos, se ha determinado la toxicidad aguda, subcrónica y parámetros farmacocinéticos, para el extracto crudo, en modelo murino. Se establecen las condiciones para el cultivo semi-continuo, *in vitro*, de células de Evanta.

## ABSTRACT

The medicinal species *Galipea longiflora* (Evanta) is used as antiparasitic agent by the amazonian ethnic groups: Tacana, Mosekene and Tsimane. The total alkaloids, of this plant, will be focus of clinical studies against *Leishmania* cutaneous. The current studies give details of the isolation and characterization of quinolinic alkaloids, from bark and leaves, with leishmanicidal activity evaluate on promastigote of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* and *L. chagasi*. We have evaluated the acute and subchronic toxicity together with pharmaco-kinetic parameters, for the crude extract, in murine model. Details for the, *in vitro*, semi continuous cell culture of Evanta are provided.

## INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis es una histoparasitosis de gran importancia epidemiológica y de múltiples manifestaciones clínicas, causada por protozoarios de género *Leishmania* transmitido al hombre mediante la picadura de dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. El género *Leishmania* está constituido por una gran cantidad de especies y subespecies las cuales varían dependiendo de su ubicación geográfica y de sus características bioquímicas e inmunobiológicas. Cerca de 20 especies de *Leishmania* han sido involucradas como causantes de enfermedad en humanos. Esta enfermedad, manifestada por sus formas: cutánea, mucocutánea, y/o visceral, es el resultado de la compleja interacción entre la especie del parásito involucrado y la respuesta inmunológica del paciente<sup>1</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud, hay cerca de 1.500.000 de personas afectadas por las diversas formas de leishmaniasis en todo el mundo, con una incidencia de 600.000 casos nuevos declarados cada año y distribuidos en 88 países<sup>2</sup>. Estas cifras representan evidentemente una importante subestimación del problema debido a diferentes factores: lugares de transmisión muy dispersos, casos no diagnosticados o diagnóstico erróneo y medicamentos específicos no disponibles. La leishmaniasis representa un freno al desarrollo, al retrasar o detener proyectos agrícolas e industriales. En América del Sur, la leishmaniasis es uno de los factores que contribuye a la inestabilidad de asentamientos humanos.

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentran en alto riesgo de infectarse con parásitos de *Leishmania* en 7 de 9 Departamentos. En el Brasil la forma cutánea y mucocutánea están muy difundidas, en 24 de los 26 Estados se han registrado casos de leishmaniasis cutánea. Los agentes etiológicos son: *L. guyanensis*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis*, así como algunas nuevas especies, *L. lainsoni*, *L. maiffi* y *L. shawi*<sup>3</sup>.

En el Perú la leishmaniasis andina (UTA) y la selvática (ESPUNDIA) son las dos formas que pertenecen al género *Viannia*. El año 1990 se han notificado 5.500 casos (22% leishmaniasis andina y 78% leishmaniasis selvática). La transmisión humana se relaciona directamente con las actividades ocupacionales en el bosque primario, donde existe mucho contacto entre el hombre y el vector, los casos se están incrementando debido a los nuevos asentamientos en tierras bajas. La forma UTA con lesiones en la cara especialmente en niños se presenta en las laderas occidentales de los Andes y valles interandinos entre 900 y 3.000 m.s.n.m. Vectores potenciales son: *Lu. peruensis* y *Lu. verrucarum* además de la *Lu. ayacuchensis* y *Lu. osornoi*<sup>3</sup>.

En algunas de las enfermedades parasitarias la quimioterapia tiene poca eficacia, mayormente debido a la supresión o a la distorsión de la respuesta inmune. Los tratamientos comúnmente empleados contra la leishmaniasis (cutánea, mucocutánea y visceral) incluyen los derivados pentavalentes de antimonio, glucantime y pentostan, ketoconazol y algunos derivados imidazólicos, anfotericina B, sulfato de aminosidina y pentamidina<sup>4</sup>. Todos estos medicamentos presentan el inconveniente de ser mal tolerados por el paciente provocando importantes efectos secundarios (fiebres, trastornos cardíacos, hepáticos y renales) y en muchos casos haciendo necesaria su hospitalización, lo cual representa una carga social sumamente elevada.

Entre los años 1985-91, un grupo de investigadores Franco-Boliviano, que trabajo en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA), de la Facultad de Medicina de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), La Paz, Bolivia, confirmó la actividad antiparasitaria, de los extractos de la especie Evanta (*Galipea longiflora*), planta medicinal antiparasitaria utilizada por el pueblo Tsimane. Un total de 12 alcaloides quinolínicos, fueron aislados e identificados de las hojas, raíces y corteza de tronco de esta especie<sup>5,6,7</sup>. Algunos de los principios activos aislados de las hojas de esta especie, resultaron ser nuevas estructuras y debido a la eficacia demostrada<sup>8,9,10</sup> y la baja toxicidad determinada en modelos *in vivo*<sup>11,12,13</sup>,

fueron patentados (Chimaninas A, B, C y D, US4209519/15/04/93), estrategia que a la fecha no ha dado ningún resultado tangible.

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, desde 1993 esta trabajando en la evaluación biológica de especies medicinales listadas en Farmacopeas Tradicionales<sup>14,15,16</sup> a través de proyectos multidisciplinarios<sup>17,18,19</sup>. Nuestro mayor éxito, es el estar involucrados en el equipo que esta preparando los estudios clínicos sobre leishmaniasis en los que se utilizarán formulaciones desarrolladas, en el IIFB, sobre la base de extractos de Evanta (*Galipea longiflora*) planta medicinal antiparasitaria conocida por las etnias: Tacana, Mosekene y Tsimane, asentadas en la amazonía Boliviana. Esta especie ha sido seleccionada de entre mas de 800 extractos que han sido evaluados por su actividad antiparasitaria *in vitro* en la última década<sup>20,21,22</sup>.

Los resultados clínicos permitirán establecer las bases para un estudio de aprovechamiento sostenible de esta especie medicinal involucrando en el proceso a comunidades Tsimane, Tacana, Mosekene, Colonos, la Universidad y la Empresa Privada. Como una estrategia de apoyo en el tratamiento de infectados con *Leishmania* y al mismo tiempo promover un turismo mas seguro, en las zonas tropicales gracias al desarrollo de un profiláctico natural, de amplio espectro, que ayudaría a proteger del contagio de infecciones parasitarias incluyendo leishmaniasis, durante la estadía de los turistas en las zonas tropicales de mayor incidencia.

*Galipea longiflora* Krause (sinónimo *Angostura longiflora* (Krause) Kallunki.) tiene diversos nombres comunes, pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta. Es un árbol de hasta 12 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un peciolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos. En Bolivia se la encuentra en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos en los departamentos del Beni y La Paz. El uso tradicional mas frecuente es en forma de cocción en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos<sup>15</sup>. Para el tratamiento de la leishmaniasis, la corteza fresca o seca es molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las ulceras, además de beber infusiones durante tres días. Este género cuenta con unas cuarenta especies distribuidas desde Guatemala, Cuba, hasta Bolivia y el Sur de Brasil<sup>23</sup>.

Sobre la base de los antecedentes arriba descritos, el IIFB ha desarrollado formulaciones farmacéuticas, tópicos y sistémicas, a base de los alcaloides totales de corteza de la Evanta. Como parte de un grupo multidisciplinario, estamos a punto de iniciar estudios clínicos Fase I (tratamiento de un número reducido pero representativo de voluntarios sanos para documentar posibles alteraciones bioquímicas al recibir la medicación) y Fase II (tratamiento de un grupo selecto de enfermos seleccionados de acuerdo a parámetros médicos bien definidos). El presente trabajo presenta los resultados de nuestros estudios pre-clínicos que han permitido generar el primer proyecto, a nivel nacional, sobre estudios clínicos a partir de una planta documentada en farmacopeas tradicionales amazónicas, que cuenta con el apoyo del Ministerio de Salud, La Sociedad Boliviana de Medicina Tradicional y la Agencia Internacional de Cooperación de Suecia<sup>24</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El aislamiento y purificación de los metabolitos biológicamente activos se logró entre los laboratorios del IIFB-UMSA y el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Lund, mediante cromatografía líquida al vacío (CLV) sobre Sílica gel, 70-230mesh, (Aldrich), cromatografía en capa delgada, (TLC) sobre placas DC-Alufolien 20x20cm, Sílica gel 60 F254 (Merck), placas preparativas (PLC) sobre placas de vidrio 20x20cm Sílica gel 60 F254, 1 y 2mm (Alltech), con los sistemas de eluyentes: A) Tolueno:Acetato de etilo (90:10); B) Tolueno:Dietil eter (80:20) y C) n-Hexano:Dietil eter:Metanol (75:15:5, x3corridas). Los solventes para cromatografía fueron: Toluene puriss (Riedel-deHaen, 24529), n-Hexane (Merck, Suprasolv), Dichloromethane (Merck, Lichrosolv), Diethyl ether (ACS reagent, Aldrich), Methanol (HPLC, Lab Scan). Los espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C NMR (1D, 2D, COSY, HMBC y HMQC) fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker operando a 400.1316 MHz (<sup>1</sup>H) y 100.6337 MHz (<sup>13</sup>C), con CDCl<sub>3</sub> como solvente y referencia interna a 7.24 y 77.24ppm para <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron en un equipo Micro mass Q-Tof micro, operando con Electrón Spray a: Polarity ES+; Reference cone Voltage (V) 90.000; Capillary (V) 1469.0; Sample Cone (V) 40.0; Extraction Cone (V) 0.5; Source Temp (C) 80.0; Syringe rate (ul) 5.0; Collision Energy 7.0; Low and High resolution 3.0; RF lens 10.9; Pre/post filter 8.5. Los espectros de UV se obtuvieron en un espectrofotómetro de doble haz Cintra 5(180-400nm) en celdas de cuarzo de 5mm utilizando HCl 1N como disolvente. Los rotaevaporadores utilizados fueron: Buchi rotavapor RE 111, y Heidolph Laborota-400 con bomba de vacío

Diaphragm Vacuum Pump DC-4. Las bombas de alto vacío fueron: AEG-VDE0530 y Edwards 5 (ambas de doble etapa). Para las evaluaciones biológicas y cultivos celulares, los materiales y medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave All American 25X, por 15 min. a 121°C.

## Colectas Vegetales

La colecta de árboles de Evanta, se ha llevado a cabo alrededor de la Comunidad Tacana de Santa Rosa de Maravilla, entre los meses de Agosto de 2003 (S13°56'587 y W0.68°00'308) y Septiembre y 2004 (S13°56'574 W0.68°00'474) a una altura de 293 m.s.n.m, en la Provincia Abel Iturralde, La Paz, Bolivia. Su identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con las muestras vaucher (AS49 y SD17) depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia.

## Métodos de Extracción

### Extracción continua

En dos equipos de extracción continua (soxhlet), corteza (25g) y hojas (25g), finamente molidos fueron extraídos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(250mL) por 2.5hr. Los extractos obtenidos, por rotaevaporación (120rpm y 40°C), fueron secados con bomba de alto vacío, hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 3.7% (corteza) y 3.1% (hojas), con relación al peso seco de la planta.

### Maceración

El material vegetal seco finamente molido (4K) fue macerado por 3 días en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10L x 3veces), en percoladores cónicos de acero inoxidable (diámetro inferior 22cm x diámetro superior 42cm x 74cm de alto). El extracto fue filtrado y concentrado a 40°C y secado con una bomba de alto vacío hasta peso constante. El rendimiento de la extracción fue de 4.6% (corteza) y 3.9% (hojas), con relación al peso seco de la planta.

### Obtención de alcaloides totales

El extracto crudo (50g) fue disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(100mL) y sometido a lavados sucesivos con HCl 1N(100mL x 3veces, c/u por 30min. sobre agitador magnético). Los lavados ácidos fueron controlados con un espectrofotómetro UV, combinados y llevados a precipitación completa con NaOH 2N(ca.150mL). El sólido formado fue extraído con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100mLx3veces). La solución orgánica fue deshidratada con NaSO<sub>4</sub>, filtrada, evaporada al vacío y secada con una bomba de alto vacío hasta peso constante. Los rendimientos fueron del 2.0%(corteza) y 0.57%(hojas).

### Purificación de los alcaloides de la corteza

Los alcaloides totales (17.6g) fueron disueltos en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (70mL) y se adiciono Sílica gel (65g). La muestra fue secada utilizando rotaevaporador y sometida a alto vacío por 30min. Este material fue utilizado como cabeza en la columna VLC (10cm diámetro x10cm alto), con Sílica gel (275g). La columna fue eluida (bajo vacío) con Tolueno (2L, Fracción 1, 4.5g); Tolueno-dietil eter (80:20; 0.50L, Fracción 2, 4.7g); Tolueno-dietil eter (80:20; 0.75L, Fracción 3, 4.1g) y Tolueno-metanol (80:20, 0.50L, Fracción 4, 3.5g). Las Fracciones 1 y 2, fueron controladas por TLC (solvente A), unidas y sometidas a cristalización con n-hexano caliente, para obtener la 2-fenil-quinolina (**1**) (51%, con relación al peso de alcaloides totales),  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ , estructura confirmada por espectros de MS de alta resolución;  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D. La Fracción 3 fue analizada por TLC-MS, confirmándose la presencia de los alcaloides **1**  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ ; **2**  $[\text{MS}+1]=200.1439(\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N})$ ; **3**  $[\text{MS}+1]=236.1075(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO})$  y **4**  $[\text{MS}+1]=172.1126(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N})$ . La fracción fue purificada por PLC (Solvente B) y los principales alcaloides: **2**, **3** y **4** se identificaron por MS alta resolución;  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D. La Fracción 4, fue analizada por TLC-MS, confirmándose la presencia de los alcaloides **1**  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ ; **2**  $[\text{MS}+1]=200.1439(\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N})$ ; **3**  $[\text{MS}+1]=236.1075(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO})$ ; **4**  $[\text{MS}+1]=172.1126(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N})$  y **5**  $[\text{MS}+1]=278.1181(\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_2)$ , acompañados de los alcaloides minoritarios **6**  $[\text{MS}+1]=230.1545(\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO})$  y **7**  $[\text{MS}+1]=308.1287(\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3)$ . La fracción fue purificada por PLC (Solvente C) y los principales alcaloides: **4** y **5** fueron identificados por MS de alta resolución;  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D

### Purificación de los alcaloides de las hojas

La purificación de los principios activos a partir de los extractos totales de hojas, siguieron los procedimientos arriba descritos para la corteza. Así de la Fracción 1, mediante cristalización con n-hexano caliente, se obtuvo la 2-fenil-quinolina (30%, con relación al peso de alcaloides totales),  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ , estructura confirmada por espectros de MS de alta resolución;  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D. Las Fracciones 2, 3 y 4 fueron analizadas por TLC-MS, encontrándose como alcaloides mayoritarios a las moléculas **1**  $[\text{MS}+1]=206.0970(\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N})$ ; **3**  $[\text{MS}+1]=236.1075(\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO})$ ; **4**  $[\text{MS}+1]=172.1126(\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{N})$ ; **8**  $[\text{MS}+1]=200.1075(\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{NO})$ ; **9**  $[\text{MS}+1]=186.0919(\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO})$  y **10**  $[\text{MS}+1]=170.0970(\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N})$ . Los alcaloides mayoritarios **8**, **9** y **10** fueron purificados por PLC (Solvente C) y se identificaron por MS de alta resolución,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, 1 y 2D. Como alcaloides

minoritarios en los extractos de hojas se detectaron por MS de alta resolución, a los compuestos **7**  $[\text{MS}+1]=308.1287(2(\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_3))$  y **11**  $[\text{MS}+1]=294.1494(\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_2)$

### Evaluaciones antiparasitarias *in vitro*

La actividad de las muestras fue medida sobre cultivos *in vitro* del estadio promastigote de *Leishmania*: complejo *L. amazonensis* (cepa PH8, cepa 690), complejo *L. braziliensis* (cepa M2903, cepa 2252), complejo *L. donovani* (cepa pp75) y complejo *L. chagasi* (cepa 642), cultivados a 26°C en medio Schneider suplementado al 5% con suero bovino fetal inactivado (56°C x 30min). Parásitos en fase de crecimiento logarítmico fueron distribuidos en microplacas de 96 pozos a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL, cada pozo fue tratado con diferentes concentraciones de los extractos: 100, 50 y 25 µg/mL. Los resultados de actividad leishmanicida son expresados en valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentración de la droga que inhibe el 50% del desarrollo del parásito), obtenido mediante una típica curva dosis respuesta (log de la concentración de la droga vs % de inhibición), como factor de tratamiento fueron realizadas tres replicas. Las cepas fueron provistas por Dr. Jean-Pierre Dedet (Instituto Pasteur-Francia).

### Estudios tóxico-cinéticos

En el bioterio del IIFB, ratones albinos de la cepa Balb/c adultos, de ambos sexos (25-30g), fueron organizados en grupos experimentales y ratas Wistar (200-300g), fueron mantenidos en condiciones controladas, iluminación (ciclo claro/oscuras de 12hr), temperatura (18 y 20°C) con agua y alimento *ad libitum* y humedad relativa entre 30-70%. Los animales permanecieron de 8 a 24 horas en ayunas antes de la administración por vía oral (cánulas 19G x1-1/2 pulg para ratones y 18G x3-1/2 pulg para ratas) del extracto de la Evanta, en un vehículo oleoso a dosis de: 5.0, 2.5, 1.0 y 0.5g/kg de peso. Observándose a los animales en ambulancia sobre una superficie plana libre. Los ratones fueron evaluados según criterios establecidos<sup>25</sup>.

### Determinación de toxicidad aguda

La dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ) se determino en condiciones de bioterio arriba descritas. Un grupo de ratones (10 animales de 25 a 30g) recibió por vía oral el extracto oleoso (5.0g/kg peso, el grupo control recibió el vehículo oleoso, volumen calculado según peso) los cuales fueron observados por 14 días. El experimento se realizó por triplicado (ratones hembras y machos) para valorar la repetición. La  $\text{DL}_{50}$  se determino usando el método de Hill<sup>26</sup>.

### Determinación de toxicidad subcrónica

Los niveles de toxicidad subcrónica se determinaron en condiciones de bioterio descritas. Un grupo de ratones (60 animales con  $\pm$ 20% variación de peso) recibió por vía oral el extracto oleoso diariamente a la misma hora por un periodo de 28 días (5.0, 2.5 0.5g/kg, el grupo control recibió el vehículo oleoso, volumen calculado según peso). Paralelamente se trabajo con un grupo satélite de 20 ratas (10 por cada sexo) tratadas con el extracto (2.5g/kg) por 28 días para las determinaciones bioquímicas clínicas (urea, fosfatasa alcalina, GOT/AST, GPT/AST) en sangre cada 7 días. Los exámenes histopatológicos se realizaron cada 7 días (cerebro, hígado y riñón) en concordancia a criterios establecidos<sup>27</sup>.

### Determinación de los parámetros farmacocinéticos

Grupos de ratones (8 animales con  $\pm$ 20% variación de peso) fueron administrados con extracto oleoso (1.0g/kg y grupo control, con vehículo oleoso). Muestras de sangre de la cola se colectaron en tubos de hematocrito heparinizado (1, 2, 3, 5, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 55hr). Las muestras sanguíneas fueron tratadas con de fosfato buffer (pH 7.4, 2mL) y extraídas con  $\text{CHCl}_3$  (20mL), y secadas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (2.0g). La cuantificación de alcaloides se realizo utilizando el

espectrofotómetro UV-Vis entre 200-400nm mediante parámetros definidos<sup>28</sup>.

### Inducción del cultivo de Evanta *in vitro*

Hojas de plántulas de *G. longiflora* fueron esterilizadas superficialmente en etanol 70%(v/v x30seg) y cloruro de piridonio 0.15%(v/v x30seg), hipoclorito de sodio 2%(v/v x30min), Benlate® 0,1%(p/v, x5 min) y anfotericina B (15mg/L x10 min). Las hojas tratadas fueron seccionadas en piezas de 5mm por lado y colocadas en cajas de Petri conteniendo el medio basal M&S completo<sup>29</sup> (Sigma) con la adición de vitaminas Gamborg's B5 (Sigma) y la adición de 100mg/L de mio-inositol y 3%(p/v) de sacarosa. A este medio se adicionaron las combinaciones hormonales (2,4-D/BAP; 2,4-D/Kin; NAA/BAP y NAA/Kin) descritas, el medio fue ajustado a pH 5,8 y se adicionó agar 8%(p/v) (Sigma) y esterilizado en autoclave. El medio fue transferido a cajas de Petri, una vez gelificado, se transfirieron segmentos de hojas y se incubaron a 25 °C dentro de una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16hr. luz a una intensidad de  $50\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ . Las porciones friables de los callos fueron sub-cultivados durante ocho ciclos de 3 semanas c/u en los medios sólidos antes de inducir las suspensiones celulares.

Combinaciones Hormonales	Tratamiento A 2,4-D/BAP	Tratamiento B 2,4-D/Kin	Tratamiento C NAA/BAP	Tratamiento D NAA/KIN
M1	0/10	0/10	0/10	0/10
M2	0.1/5	0.1/5	0.1/5	0.1/5
M3	0.5/5	0.5/5	0.5/5	0.5/5
M4	1/1	1/1	1/1	1/1
M5	5/5	5/5	5/5	5/5
M6	5/0.1	5/0.1	5/0.1	5/0.1
M7	10/0	10/0	10/0	10/0
M8	0	0	0	0

### Suspensiones celulares semi-continuas

Las suspensiones celulares se iniciaron a partir de tejido de callo (1.0g) y se transfirieron a matraces (125mL) con medio liquido M&S (50mL), vitaminas medio Gamborg's B5, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (5mg/L) y cinetina (0.1mg/L). Los cultivos celulares fueron incubados en cámara de cultivo a 25°C sobre un agitador orbital rotatorio (Heidolph 2010) a 100r.p.m. en oscuridad completa, por un periodo de 30 días, monitoreando en intervalos de 5 días el incremento de biomasa y la producción de alcaloides en el medio liquido.

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

Un total de 10 árboles de Evanta, de entre 7 a 11 metros de altura y entre 10 a 12 cm de diámetro a la altura del pecho, fueron colectados y los diferentes órganos secados y tamizados por separado. La Figura 1 presenta el promedio de peso, seco en kilogramos, de los órganos por árbol. El material fue extraído y los extractos evaluados frente a parásitos de *Leishmania*, en modelos *in vitro*, este trabajo se centra sobre los extractos de hojas y de corteza principal.

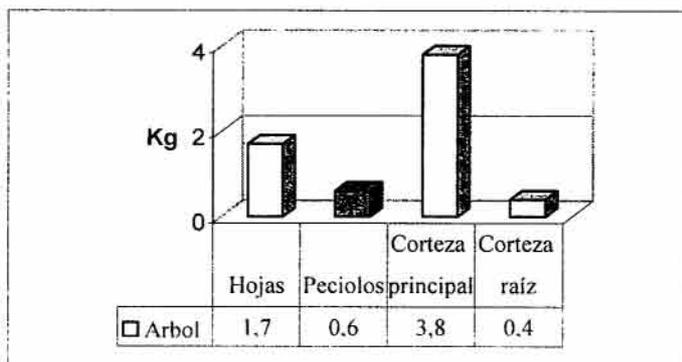


Figura 1. Peso seco promedio, en kilogramos, de los diferentes órganos de árboles de Evanta.

El material vegetal, seco y finamente molido fue sometido a procesos de extracción por maceración y por extracción continua (soxhlet), con y sin previa humectación utilizando NaOH 0.1N(10,15, 20mL) y

1N (10, 20mL). La Figura 2 presenta, los resultados de las extracciones con y sin humectación y la Figura 3 muestra que es conveniente llevar el proceso de maceración por 3 días, sin humectación previa.

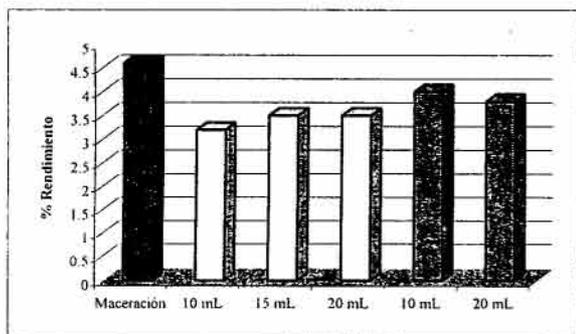


Figura 2. Rendimientos de extracción por maceración sin humectación (Maceración). Humectando con NaOH 0.1N, 10, 15 y 20mL y Humectando con NaOH 1.0N, 10 y 20mL.

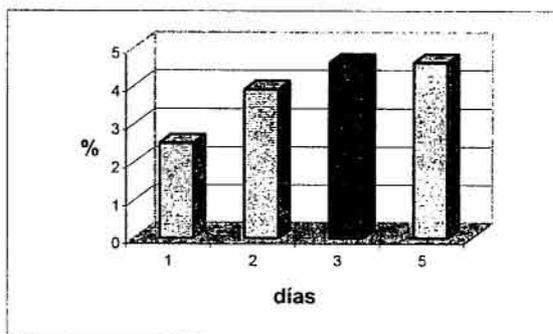


Figura 3. Rendimiento de extracción por Maceración, sin previa humectación, en días.

Los rendimientos de obtención de los alcaloides totales, con HCl 1N, a partir del extracto crudo se muestra en la Figura 4, mientras que en la Figura 5 se

muestra, mediante espectros de UV de cada uno de los tres lavados realizados, la extracción sucesiva de los alcaloides.

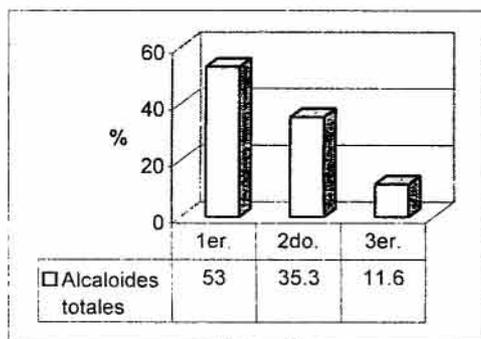


Figura 4. Rendimiento de los lavados del extracto crudo de corteza en la obtención de alcaloides totales utilizando HCl 1N.

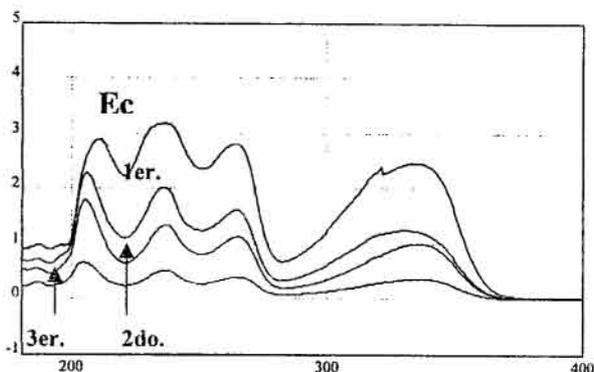


Figura 5. Espectros de UV del extracto crudo (Ec), primero (1er), segundo (2do) y tercer (3er) lavados en medio ácido.

Nuestros estudios de extracción, de tres repeticiones, de 4.0 kilogramos de corteza seca y molida rindieron un promedio de 185.7 gramos de extracto crudo (4.6%, con relación al peso seco de la planta), a partir del cual se obtuvieron como promedio 83.0 gramos de alcaloides totales (2.0% con relación al peso seco de la planta y/o un 44.7% a partir del extracto crudo). De igual manera, partir de 3.8 kilogramos de hojas secas y pulverizadas se obtuvieron 147.8 gramos de extracto crudo (3.9%, con relación al peso seco de la planta) y 21.7 gramos de alcaloides totales (0.57% con relación

al peso seco de la planta y/o un 14.6% a partir del extracto crudo).

Los extractos crudos y los alcaloides totales obtenidos, fueron evaluados frente a las cepas de parásitos de *Leishmania* que se manejan en el IIFB. En la Tabla 1. se presentan los promedios de los valores de la IC50 (entre 58 a 61 repeticiones) y se puede observar que los alcaloides totales de la corteza muestran una actividad superior cercana a cuatro veces la del extracto crudo y los alcaloides totales de hojas muestran actividad superior a más de dos veces a actividad del extracto crudo correspondiente.

Tabla 1. Promedios de valores de IC50 de extractos crudos y alcaloides totales de corteza y hojas de *G. longiflora* frente a diferentes cepas de *Leishmania*.

Cepas de <i>Leishmania</i>	IC50 en µg/ml Corteza Principal		IC50 en µg/ml Hojas	
	E. crudo	A. Totales	E. crudo	A. Totales
<i>L. amazonensis</i> (PH8)	86.4	21.5	55.6	20.8
<i>L. amazonensis</i> (690)	98.4	-	60.2	-
<i>L. braziliensis</i> (M2903)	91.1	22.1	52.7	20.7
<i>L. braziliensis</i> (2252)	76.5	-	64.7	-
<i>L. donovani</i> (pp75)	90.4	26.4	52.8	21.8
<i>L. chagasi</i> (642)	125.2	-	77.9	-

Los extractos orgánicos de hojas (IC50 entre 52.8 y 77.9µg/ml) y de corteza (IC50 entre 76.5 y 125.2µg/ml) presentan actividad Leishmanicida *in vitro* sobre promastigotes de cepas de *Leishmania*: *L. amazonensis* (690 y PH8) *L. braziliensis* (M22903 y 2252), *L. donovani* (pp75) y *L. chagasi* (642). Utilizando el programa estadístico ANOVA, del análisis de varianza, una vía, en base a los valores de las IC50 se observó que no existen diferencias significativas en la actividad leishmanicida (entre cepas de la misma patología) y podemos concluir que, en términos generales, los extractos orgánicos de hojas presentan una mayor actividad leishmanicida que los extractos de corteza, excepto frente a la cepa *L. braziliensis* (2252) que pese a presentar diferencias en sus medias (corteza 76.5µg/ml y hoja 64.7µg/ml), la variabilidad existente entre las poblaciones estudiadas son del mismo orden de magnitud que de los errores, por lo tanto, se considera que las medias de los

tratamientos son iguales y las diferencias observadas se deben a la variabilidad biológica o a un error experimental. Sin embargo al realizar el mismo análisis sobre especies diferentes *L. donovani* (pp75, corteza 90.4µg/ml y hoja 52.8µg/ml) y *L. chagasi* (642, corteza 125.2µg/ml y hoja 77.9µg/ml), cepas que representan la misma patología (leishmaniasis visceral) se puede evidenciar actividad biológica significativamente diferente. Por un análisis semejante, podemos concluir que no existen diferencias significativas entre los valores de las IC50 de los alcaloides totales, de hojas y corteza, frente a las cepas evaluadas.

Los alcaloides totales fueron parcialmente purificados y divididos en cuatro fracciones por cromatografía de vacío (VLC) sobre sílica gel utilizando mezclas de tolueno, éter dietílico y metanol, de acuerdo a polaridad creciente, la Tabla 2 presenta los rendimientos de las fracciones respectivas.

Tabla 2. Resultados del fraccionamiento de los alcaloides totales en cromatografía de V/LC

	Corteza		Hojas	
Extracto crudo	17.6g		6.9g	
SiO <sub>2</sub> cabeza	65.0g		25.0g	
SiO <sub>2</sub> columna	275.0g		124.0g	
Fracción 1: Tolueno (Tol)	4.2g	26%	2.1g	33%
Fracción 2: Tol-(Etil) <sub>2</sub> O (8:2)	4.7g	28%	3.1g	46%
Fracción 3: Tol-(Etil) <sub>2</sub> O (8:2)	4.1g	25%	1.1g	16%
Fracción 4: Tol-MeOH (8:2)	3.5g	21%	0.3g	5%
Total Fracciones	16.5g		6.6g	

De las fracciones 1 y 2 de los alcaloides totales de la corteza y de la Fracción 1 de los alcaloides totales de las hojas, se aisló la 2 fenil quinolina (**1**), por cristalización de n-hexano caliente, con un rendimiento de 51% (con relación al peso de los alcaloides totales de la corteza) y 30% (con relación al peso de los alcaloides totales de las hojas). En los alcaloides totales de la corteza el compuesto **1**, esta acompañado de los compuestos: 2-pentil-quinolina (**2**); 4-metoxi-2-fenil-quinolina (**3**); 2-propil-quinolina (**4**) y 2-(3,4-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**5**), en relación 1:05:0.28:0.28, respectivamente. Las moléculas **1** a **5** representan cerca del 99% del total de los alcaloides totales. Las estructuras fueron determinadas por espectrometría de masas de alta resolución y por RNM de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (1 y 2D), las asignaciones correspondientes están detalladas en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

Por técnicas de TLC-MS, se ha podido establecer que entre los alcaloides minoritarios se encuentran las sustancias 4-metoxi-2-pentil-quinolina (**6**) y 4-metoxi-2-(3,4-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**7**).

Mientras que en los alcaloides totales de las hojas, el compuesto **1** esta acompañado de los compuestos: 4-metoxi-2-fenil-quinolina (**3**); 2-propil-quinolina (**4**); 4-metoxi-2-(E)-prop-1'-enilquinolina (Chimanina C, **8**); Chimanina D (**9**) y Chimanina B (**10**). Las estructuras fueron determinadas por espectrometría de masas de alta resolución y por espectroscopia de RNM de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (1 y 2D). Por técnicas de TLC-MS, se ha podido establecer que entre los alcaloides minoritarios se encuentran las sustancias 4-metoxi-2-(3,4-metilendioxfeniletíl)-quinolina (**7**) y 2-(3,4-dimetoxifeniletíl) fenilquinolina (**11**).

Tabla 3. Asignación de los desplazamientos químicos de <sup>1</sup>H de los alcaloides quinolínicos obtenidos de la corteza de Evanta (CDCl<sub>3</sub>, δ = 7.24ppm y 400MHz)

□ Protón	1	2	3	4	5
C3	7.85(1H, d) J=8.6Hz	7.20(1H, d) J=8.4Hz	7.07(1H, s)	7.15(1H, d) J=8.4Hz	7.08(1H, d) J=8.4Hz
C4	8.23(1H, br d) J=8.6Hz	7.95(1H, brd) J=8.4Hz	-	7.95(1H, brd) J=8.4Hz	7.93(1H, brd) J=8.4Hz
C6	7.81(1H, brd) J=8.1Hz	7.63(1H, brd) J=8.0Hz	7.73(1H, brd) J=8.1Hz	7.63(1H, brd) J=8.4Hz	7.63(1H, brd) J=8.0Hz
C7	7.51(1H, m)	7.35(1H, dd) J=8.0 y 6.7Hz	7.51(1H, m)	7.35(1H, dd) J=8.4 y 6.7Hz	7.35(1H, dd) J=8.0 y 6.7Hz
C8	7.76(1H, t) J=7.9Hz	7.56(1H, dd) J=7.1 y 6.7Hz	7.76(1H, t) J=7.9Hz	7.56(1H, dd) J=7.1 y 6.7Hz	7.56(1H, dd) J=7.1 y 6.7Hz
C9	8.18(1H, brd) J=7.9Hz	7.79(1H, brd) J=7.1Hz	8.18(1H, brd) J=7.9Hz	7.97(1H, brd) J=7.1Hz	7.97(1H, brd) J=7.1Hz
C1'	-	2.90(2H, brdd) J=7.8 y 8.0Hz	-	2.83(2H, dd) J=7.6 y 6.1Hz	2.83(2H, dd) J=7.6 y 6.1Hz
C2'	8.20(2H, d) J=7.0Hz	1.75(2H, brpen) J=7.5Hz	8.20(2H, d) J=7.0Hz	1.76(2H, sex) J=7.7Hz	Sist AB 3.13 (2H) (J=10.2 y 8.9Hz)
C3'	7.55(2H, t) J=7.0Hz	1.32(4H, brm)	7.55(2H, t) J=7.0Hz	0.91(3H, t) J=7.3Hz	Sist AB 2.97 (2H) (J=10.2 y 8.8Hz)
C4'	7.48(1H, t) J=7.0Hz	1.32(4H, brm)	7.48(1H, t) J=7.0Hz	-	-
C5'	7.55(2H, t)	0.85(3H, t)	7.55(2H, t)	-	-

	$J=7.0\text{Hz}$	$J=7.1\text{Hz}$	$J=7.0\text{Hz}$		
C6'	8.20(2H, d) $J=7.0\text{Hz}$	-	8.20(2H, d) $J=7.0\text{Hz}$	-	-
C2''	-	-	-	-	6.56(1H,dd) $J=8.0$ y $1.3\text{Hz}$
C3''	-	-	-	-	6.80(1H,d) $J=8.0\text{Hz}$
C6''	-	-	-	-	6.97(1H,d) $J=1.3\text{Hz}$
OCH <sub>3</sub>	-	-	3.94(3H,s)	-	
OCH <sub>2</sub> O	-	-	-	-	5.77(2H,s)

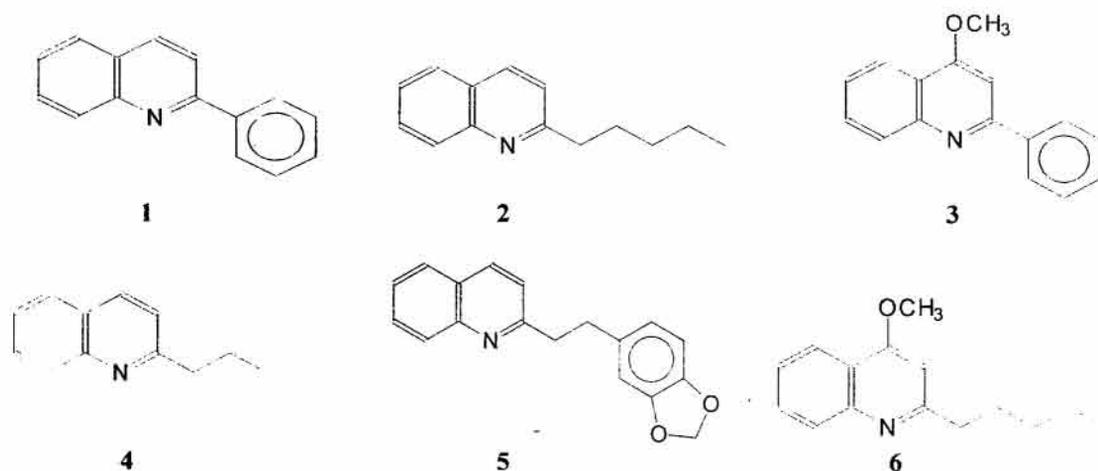
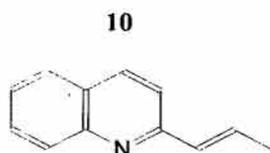
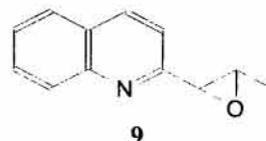
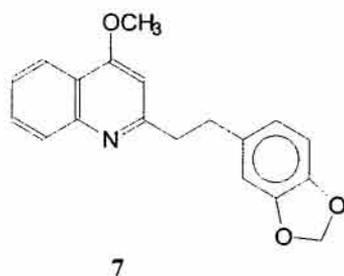


Tabla 4. Asignación de los desplazamientos químicos de <sup>13</sup>C de los alcaloides quinolinicos obtenidos de la corteza y hojas (CDCl<sub>3</sub>, δ=77.24ppm, 100MHz)

□ Carbono	1	2	3	4	5	8	9	10
C2	157.2	162.7	158.8	163.5	162.5	156.5	156.5	158.0
C3	118.0	121.3	98.0	121.5	121.6	97.2	118.4	116.7
C4	136.6	136.1	162.8	136.3	136.2	158.8	136.2	137.5
C5	127.3	126.6	120.3	126.8	126.9	121.5	127.2	127.8
C6	127.4	127.4	130.0	127.6	127.5	125.0	127.6	127.7
C7	129.5	125.2	129.1	125.7	125.9	125.0	125.9	126.5
C8	129.8	128.7	129.2	129.5	129.4	130.1	129.6	129.8
C9	129.9	129.2	121.6	128.9	128.8	129.4	128.9	129.2
C10	148.2	147.8	149.1	148.0	147.0	148.8	148.2	147.6
C1'	139.6	39.3	140.3	41.4	41.3	132.5	60.4	132.4
C2'	127.6	29.7	127.6	23.4	35.7	132.8	58.3	132.2
C3'	128.9	31.7	128.7	14.1	-	18.8	17.9	18.4
C4'	126.2	22.5	125.4	-	-	-	-	-
C5'	128.9	14.0	128.7	-	-	-	-	-
C6'	127.6	-	127.6	-	-	-	-	-
C1''	-	-	-	-	135.4	-	-	-
C2''	-	-	-	-	109.1	-	-	-
C3''	-	-	-	-	147.1	-	-	-
C4''	-	-	-	-	145.6	-	-	-
C5''	-	-	-	-	121.4	-	-	-
C6''	-	-	-	-	108.2	-	-	-
OCH <sub>3</sub>	-	-	55.6	-	-	55.5	-	-
OCH <sub>2</sub> O	-	-	-	-	100.8	-	-	-



El extracto de la corteza de la Evanta, disuelto en un vehículo oleoso, fue administrado a ratones albinos de la cepa BALB/c por vía oral a concentración de 5g/kg y dio como resultado una Dosis Letal cero (DL<sub>0</sub>), dado que no se observaron signos de toxicidad ni muertes entre el grupo control que recibió solamente el vehículo, por tanto se concluye que ambos grupos tienen un efecto similar. A partir de los resultados obtenidos en el estudio preclínico de los extractos de la Evanta, mediante modelos toxicocinéticos en ratones BALB/c y ratas Wistar podemos inferir que el uso popular de la Evanta utilizada por las etnias Tacana,

Chiman y Mosetene en el tratamiento de la leishmaniasis no evidencia toxicidad por vía oral.

Con respecto al estudio hematológico podemos concluir que no se observaron diferencias significativas en los valores de hematocrito entre el grupo control y el grupo tratado con el extracto de la Evanta, a una concentración de 2.5g/kg, y que ambos grupos tienen un valor similar de hematocrito en %, las diferencias observadas en la medias de tratamientos son debidas al azar. La evaluación de parámetros químicos clínicos en ratas Wistar evidencia cambios pocos significativos en el procesamiento enzimático ver cuadro (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados de los estudios de toxicidad subcrónica, en ratones BALB/c y ratas Wistar administrados con extractos crudos de Evanta

ESPECIE UTILIZADA	PARÁMETRO EVALUADO	RESULTADO
Ratón albino cepa BALB/c	Mortalidad	Ninguna
Ratón albino cepa BALB/c	Peso corporal	Promedio 30g <sup>±</sup> /.5g
Ratón albino cepa BALB/c	Consumo de agua y alimentos	Agua = 3mL <sup>±</sup> /.0.5mL día. Comida = 4g <sup>±</sup> /.0.5g día.
Ratón albino cepa BALB/c	Ensayos hematológicos	Hematocrito = 63% <sup>±</sup> /.5 %. Recuento de GB = 10.062mm <sup>3</sup> Cayados = 0% Segmentados = 32% Eosinófilos = 0% Basófilos = 0% Linfocitos = 66% Monocitos = 2%
Ratas Wistar	Bioquímico Clínicos	Urea = 36 – 45mg/L GOT/AST = 137–146U/L GPT/AST = 42–46U/L Fosfatasa Alcalina = 209–243U/L

El estudio histopatológico muestra que no existe evidencia de daño en los órganos diana expuestos en el tratamiento subcrónico. (ver Cuadro 2). Los resultados del modelo farmacocinético, contribuyen a proponer un régimen de dosificación a partir de los datos obtenidos, puesto que al conocer la cinética del extracto es posible calcular la dosis de carga debido a las diferencias entre las concentraciones en función al tiempo. Este trabajo fue el primer paso en este tipo de investigaciones donde se ha cumplido una primera fase, que son los problemas en la administración por vía oral.

Actualmente, se está trabajando en determinar los niveles de bio-disponibilidad de los alcaloides totales, en forma de sustancias puras, utilizando conejos, para

poder definir las concentraciones ideales de los preparados farmacéuticos sistémicos, elaborados a base de Evanta y que serían utilizados en los estudios clínicos.

La semivida de eliminación o vida media biológica (tiempo necesario para que desaparezca del organismo el 50% del extracto) encontrado para el extracto de Evanta es de 17.41 horas (la quinina tiene  $11 \pm 2$  horas). Esto se debe a que la constante de absorción,  $K_a=0.5389$ , es mayor que la de eliminación  $K_e=3.98 \times 10^{-2}$  lo cual muestra una absorción más rápida que la eliminación. Este dato nos permite plantear un esquema de administración en forma tal que se asegure el mantenimiento a un nivel sanguíneo efectivo sin peligro de intoxicación (Cuadro 3)

*Cuadro 2. Estudio histopatológico en ratones BALB/c tratados con extractos crudos de Evanta*

ESPECIE /CEPA UTILIZADA	PARÁMETRO	RESULTADO	
Ratón albino cepa BALB/c	Histopatológico	Primera Semana	Cerebro: Histográficamente preservado, sin lesión patológica. Hígado: Histográficamente preservado sin lesión patológica. Riñón: Discreta necrosis tubular por hipoxia y cambios post mortem iniciales.
Ratón albino cepa BALB/c	Histopatológico	Segunda Semana	Cerebro: Discreto edema inicial por signos de hipoxia leve. Hígado: tumefacción turbia y congestión de venas centrales. Riñón: marcada infiltración grasa.
Ratón albino cepa BALB/c	Histopatológico	Tercera Semana	Cerebro: sin lesión patológica. Hígado: sin lesión patológica. Riñón: Sin lesión patológica, solo se evidencian cambios iniciales post mortem.
Ratón albino cepa BALB/c	Histopatológico	Cuarta Semana	Cerebro: sin lesión patológica. Hígado: sin lesión patológica. Riñón: sin lesión patológica. Cambios iniciales post mortem.

Para determinar la cinética del extracto crudo de Evanta (absorción, distribución y eliminación en función al tiempo), se administró por vía oral una dosis de 1g/kg de peso a grupos de 4 ratones con un peso

promedio de 25-30g, a los cuales se les tomó sangre a diferentes horas para cuantificar por espectroscopia de UV la concentración del extracto de Evanta en sangre (Figura 6).

Cuadro 3. Resultados de los parámetros fármaco-cinéticos

PARAMETRO	UNIDAD
Volumen de distribución (Vd)	96.70 L
Constante de absorción (Ka)	A = -4.86 B = 0.5389
Constante de eliminación (Ke)	A = 4.86 B = $3.98 \times 10^{-2}$
Semivida de Absorción ( $t_{1/2}$ )	1.28 horas
Semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ )	17.41 hr
Area bajo la curva ABC	98.121 $\mu\text{g/hr/mL}$
Depuración	3.84 mL/min

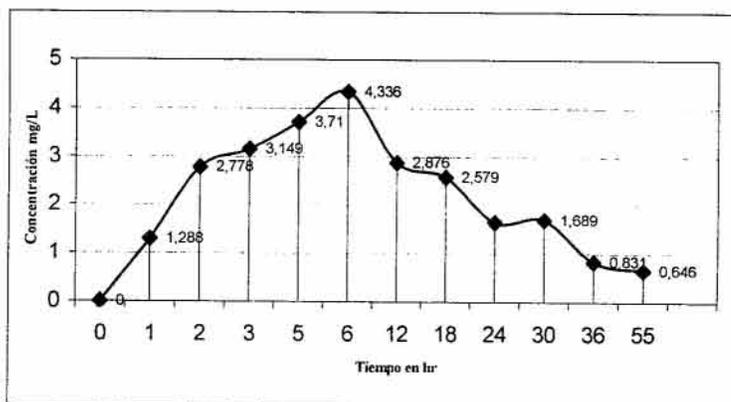
➤ El cálculo de los resultados se realizó por el programa computarizado Tallarida<sup>30</sup>.

El volumen de distribución fue de 96.70 litros, y es otro parámetro de importancia para discutir los procesos de disponibilidad de los fármacos, puesto que nos ayuda a relacionar la cantidad de extracto administrado y su concentración en sangre. Este valor elevado, hace suponer que la mayor parte del compuesto estaría unido a la albúmina o a una glucoproteína, por la naturaleza del alcaloide básico. El volumen de distribución puede variar ampliamente con dependencia del pKa del extracto oleoso, del grado de fijación a las proteínas plasmáticas, del coeficiente de

partición lipídico del extracto. También puede variar en función a la edad, sexo o una patología y la composición orgánica del organismo sobre el que se aplica.

La determinación del área bajo la curva (ABC) es el parámetro más importante de la biodisponibilidad pues determina la cantidad del medicamento absorbido en la circulación después de la administración del extracto, indicando la magnitud de absorción y la bioequivalencia (ver Figura 6)

Figura 6. Tiempo en horas vs. concentración en mg/L del extracto de Evanta en plasma sanguíneo



A partir de los resultados obtenidos en el estudio preclínico de los extractos de la Evanta, mediante modelos toxicocinéticos, podemos inferir que su uso popular por las etnias Tacana, Chiman y Mosekene como alternativa en el tratamiento de la leishmaniasis no evidencia toxicidad por vía oral.

La validez del modelo planteado obedece a la repetición de los resultados en función al análisis estadístico, lo que nos inclina a concluir que el extracto oleoso de la corteza de la Evanta, proveniente de los bosques tropicales en los últimos contrafuertes

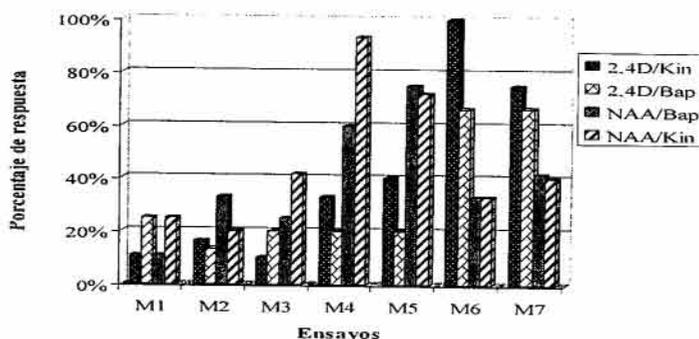
bolivianos del Alto Beni de los departamentos de La Paz y el Beni, administrados a ratones albinos de la cepa BALB/c por vía oral no mostraron toxicidad significativa. No se observaron diferencias significativas sobre los signos de toxicidad ni muertes entre el grupo control que recibió solamente el vehículo, ni el grupo que recibió el extracto a una concentración de 5g/kg.

Dada la importancia de esta especie medicinal, en el desarrollo de tratamientos alternativos para la leishmaniasis, hemos comenzado estudios orientados al

establecimiento *in vitro* de un sistema de cultivo celular semi-continuo, destinado al estudio de la producción de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida, bajo condiciones controladas. Así los tejidos de hojas esterilizadas y expuestos a la combinación de 5mg/L de 2,4-DAA y 0.1mg/L de cinetina dieron lugar a la formación de callos friables a los 20 días de iniciado su cultivo (Figura 7). En los demás tratamientos, si bien se observó la formación de callos, los mismos presentaron una consistencia poco friable. Por otra parte se ha determinado que la exposición de los callos a la luz condiciona un proceso de vitrificación evidente del material vegetal, en oscuridad completa este proceso no fue observado.

Disponer de un sistema de cultivos en suspensión de esta planta es relevante para futuros trabajos, dirigidos a incrementar el contenido de alcaloides, dado que permitiría la aplicación de condiciones de inducción tanto biótica como abiótica que puedan promover la acumulación de estos alcaloides. Este sistema permitirá también realizar estudios sobre la enzimas involucradas en la síntesis de los alcaloides de interés con el fin de identificar los puntos de regulación más importantes. Estudios orientados a la producción de estos alcaloides leishmanicidas, *in vitro*, están en curso.

Figura 7. Porcentaje de formación de callos a partir de explantes de hojas de *G. longiflora* en función a la concentración de auxinas y citocininas. El % de respuesta se refiere al número de eventos de formación de callos a partir de 18 explantes después de 30 días de cultivo.



## AGRADECIMIENTOS

Los estudios biológicos, han sido parcialmente financiados por la OEA Proyecto Multilateral "Flora Regional como Fuente de nuevos Fármacos". El aislamiento y la asignación estructural de las sustancias activas se ha desarrollado en la Universidad de Lund, programa UMSA-Sida/SAREC, proyecto BIOMIC, Laboratorios de Bioteknik, Prof. Bo Mattiasson, y los

espectros de RMN y MS fueron obtenidos en los laboratorios de Bioorganisk Kemi, Prof. Olov Sterner. Los estudios de establecimiento de sistemas celulares semi-continuos, se ha logrado a través del proyecto "Jeunes Equipe" (IRD-BIOLEISH). Los estudios de Evanta se han iniciado dentro del programa CYTED, Sub Programa X, Proyecto X.5.

## Referencias Bibliográficas

- Giménez, A.; Gupta, M.; Deharo, E. Editores. "Manual de Técnicas de Laboratorio para la Evaluación de Sustancias Tripanocidas y Leishmanicidas" Editorial Prisa, La Paz, Bolivia, 2005, pp 85-88
- Desjeux P., *Leishmaniosis*, (1993), WHO/CTD/MIP/WP, 93, 8.
- OPS/OMS-Bolivia, Ministerio de Salud y Previsión Social, Dirección General de Epidemiología "Anuario Epidemiológico 2000" Editorial Quality s.r.l., La Paz, Bolivia, 2000, pp 75-81.
- Dedet, J.P., "*Les Leishmanioses*", University Francophones, 1999, pp 213-226.
- Fournet, A.; Vagneur, B.; Richomme, P.; Bruneton, J. *Can. J. Chem.*, **1989**, 67, 2116 – 2118.
- Fournet, A.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cave, A.; Richomme, P.; Bruneton, J. *Journal of Natural Products*, **1993** 56, 1547 – 1552
- Munos, M.H.; Mayrargue, J.; Fournet, A.; Gantier, J.C.; Hocquemiller, R.; Moskowit, H. *Chem. Pharm., Bull.* **1994** 42 (9) 1914-1916.

- <sup>1</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V. *Journal of Ethnopharmacology*, **1994**, *41*, 19-37
- <sup>1</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Cave, A.; Bruneton, J. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**, *37*, 859-863.
- <sup>1</sup> Fournet, A.; Ferreira, M.E.; Rojas de Arias, A.; Torres de Ortiz, S.; Fuentes, S.; Nakayama, H.; Hocquemiller, R. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1996**, *40* (11), 2447-2451.
- <sup>1</sup> Fournet, A.; Angelo, A.; Muñoz, V.; Hocquemiller, R.; Roblot, F.; Cave, A.; Richomme, P.; Bruneton, J. *Phytotherapy Research* **1994**, *8*, 174-178.
- <sup>1</sup> Fournet, A.; Gantier, J.C.; Gautheret, A.; Leysalles, L.; Munos M.H.; Mayrargue, J.; Moskowit, H.; Cave, A.; Hocquemiller, R.; *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1994**, *33*, 537-544.
- <sup>1</sup> Gantier, J.C. et al *Planta Medica* **1996**, *62* 3: 285-286
- <sup>1</sup> Bourdy, G.; Conbes, I.; varios otros coautores "Plantas del Chaco II. Usos tradicionales Izoceño-Guarani". Editores: UMSA; Fundación KAA IYA; IRD; WCS Bolivia; HNB; CYTED; OEA; Ediciones SIRENA color, Santa Cruz, Bolivia, 2002, pp 10-441
- <sup>1</sup> Bourdy, G.; Giménez, A.; Quenevo, C.; varios otros coautores "TACANA: ECUANASHA AQUÍ, ECUANASHA ID'RENE CUANA, ME SCHANAPAQUE" (TACANA: Conozcan nuestros árboles; nuestras hierbas). Editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD (ex ORSTOM): Ediciones Plural, La Paz, Bolivia, 1999, pp 11-496
- <sup>1</sup> Bourdy, G.; Giménez, A. y varios otros coautores "Guía de Salud: Utilización de las Plantas Medicinales Tacana y de Algunos Remedios de la Farmacia". Editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; ORSTOM; UNICEF. Ediciones Plural, La Paz, Bolivia, 1998, pp 9-238
- <sup>1</sup> Bourdy, G.; Oporto, P.; Giménez, A. Deharo, E. *Journal of Ethnopharmacology*, **2004** *93*, 269-277
- <sup>1</sup> Muñoz, V.; Sauvain, M.; Bourdy, G.; Callapa, J.; Bergeron, S.; Rojas, I.; Bravo, J.A.; Balderrama, L.; Ortiz, B.; Giménez, A.; Deharo E. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000** *69*, 127-137
- <sup>1</sup> Bourdy, G.; DeWalt, S.J.; Chávez de Michel, L.R.; Roca, A.; Deharo, E.; Muñoz, V.; Balderrama, L.; Quenevo, C.; Giménez, A. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000** *70*, 87-109
- <sup>1</sup> Proyecto Multilateral OEA "Flora Regional como Fuente de Fármacos contra Parásitos, Hongos y Cáncer". Coordinador CIFLOPAN de Panamá y participación de Argentina, Bolivia, Colombia y Guatemala. 2001-2004.
- <sup>1</sup> Proyecto CYTED-X.5 "Búsqueda Obtención y evaluación de Nuevos Agentes Antiparasitarios" Subprograma X, Química Fina Farmacéutica. 1999-2003.
- <sup>1</sup> UMSA: IIFB-IBBA-IIQ y IRD Proyecto de "Validación de la Medicina Tradicional a través de estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos en Bolivia I y II" Financiado por FONAMA-EIA, 1993-1999.
- <sup>1</sup> Killen, T.; Garcia, E.; Stephan, B. "Guía de Árboles de Bolivia" Editorial Quipus s.r.l., La Paz, Bolivia, 1993, pp 709-710.
- <sup>1</sup> Programa UMSA-Asdi Sarec, Proyecto "Enfermedades Infecciosas" Financiamiento de Asdi-Sarec, Universidad de Estocolmo, Departamento de Inmunología Prof. Marita Troye-Blomberg, y Servicios de Laboratorio y Diagnóstico en Salud (SELADIS) UMSA
- <sup>1</sup> M. H. Malone *Pharmacological Approaches to Natural Product Screening and Evaluation*. 1977
- <sup>1</sup> Goodman, Alfred y otros, *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. México D. F. Editorial Médica Panamericana. Octava Edición. 1990.
- <sup>1</sup> Guidelines for testing chemical by repeated dose in oral toxicity-rodent, 90 days study. 1987.
- <sup>1</sup> Manual of Pharmacological Calculations With computer Programs 1987.
- <sup>1</sup> Murashige T & F. Skoog *Physiol. Plant.* **1962**, *15*: 473-497
- <sup>1</sup> Tallarida, Ronald., Rodney B. Murray, *Manual of Pharmacological Calculations*. Philadelphia. USA. Springer-Verlag. Second Edition. 1987.

## ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE *BOWDICHIA VIRGILIOIDES*

Juan Carlos Ticona<sup>a</sup>, David Gutierrez, Efraín Salamanca<sup>a</sup>, Grace Ruiz<sup>a</sup>, Crispín Paredes<sup>a</sup>, Enrique Udaeta<sup>a</sup>, Nayra Rodríguez<sup>b</sup>, Gabriel García<sup>b</sup>, Isabel López<sup>b</sup>, Antonio Jiménez<sup>b</sup>, Pedro Alvarado<sup>c</sup>, Rogelio Chuquir<sup>d</sup>, Ninoska Flores<sup>a</sup>, \*Alberto Giménez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas-IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés, Casilla 3239, La Paz - Bolivia. <sup>b</sup>Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González", Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España. <sup>c</sup>Comunidad de Macahua, Provincia A. Iturrealde, <sup>d</sup>Comunidad de Santa Rosa de Maravilla, Provincia A. Iturrealde, La Paz-Bolivia.

\*Corresponding author: agimenez @megalink.com

**Key words:** *Bowdichia virgilioides*, hojas, *P. falciparum*, terpenos tipo lupano, oleanano y esteroides.

### ABSTRACT

*Bowdichia virgilioides*, is a medicinal plant used by the Tacana ethnic group. The leaves of this tree were collected, during the dry season, in the Abel Iturrealde province, Bolivia. The dry and pulverized leaves were macerated with methylenechloride, and the raw extract did not show activity at 10µg/mL, against *Plasmodium falciparum* (strand F32, sensible to chloroquine). Chromatographic studies of the crude extract and spectroscopical analysis of the isolated substances allowed us to identify: Lupeol (1), Lupenone (2), β-sitosterol (3), stigmasterol (4) and β-amirine (5), as the main triterpenes components along with non identified fatty acids.

### RESUMEN

*Bowdichia virgilioides*, es una planta medicinal utilizada por la etnia Tacana, las hojas de este árbol fueron colectadas, en época seca, en la Prov. Abel Iturrealde, Bolivia. Las hojas secas y pulverizadas fueron sometidas a maceración con diclorometano y el extracto crudo no presentó actividad antipalúdica a dosis de 10µg/mL, frente a *Plasmodium falciparum* (cepa F32, sensible a la cloroquina). Estudios cromatográficos del extracto crudo y análisis espectroscópicos de las sustancias aisladas nos han permitido identificar: Lupeol (1), Lupenona (2), β-sitosterol (3), estigmasterol (4) y β-amirina (5), como los principales componentes triterpénicos acompañados de ácidos grasos no identificados.

### INTRODUCCIÓN

*Bowdichia virgilioides* (leguminosae, subfamilia Papilionoideae, tribu soforeae), es un árbol que crece en el trópico de Sud América y se expande

desde Venezuela al este de Brazil<sup>1</sup>. La corteza de la planta es empleada para el tratamiento de la artritis, diabetes, como antirreumático y para la diarrea<sup>2</sup>. En Bolivia en la Etnia Tacana *Bowdichia virgilioides* es conocida como *Nuriri aquí* o *chiriguano* y la corteza es utilizada para la disentería, paludismo y espundia en forma de cocción o cataplasma<sup>3</sup>.

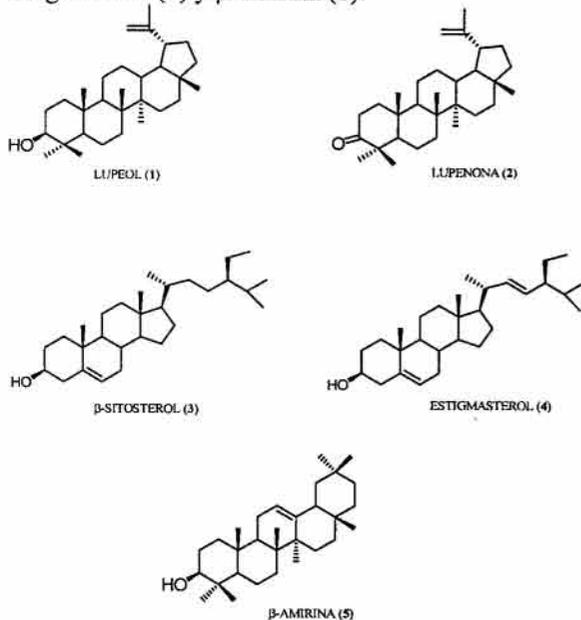
Estudios fitoquímicos anteriores de corteza y de raíz describen metabolitos secundarios de interés desde el punto de vista químico por su novedad estructural, como desde el punto de vista farmacológico por las diversas actividades biológicas. Entre los metabolitos aislados se destacan alcaloides tipo piperidina,<sup>4,5</sup> ormosia<sup>6</sup>, triterpenos<sup>7</sup>, derivados de dihidrobenzofuranos<sup>8</sup>, flavonoides, como las isoflavonoides<sup>7,9</sup> y aceites esenciales<sup>10</sup>.

El presente trabajo describe el aislamiento y la caracterización de los principales componentes presentes en extractos orgánicos de hojas de *Bowdichia virgilioides*, de los cuales se aislaron cinco triterpenos, dos de la serie del esqueleto del lupano: lupeol (1) y lupenona (2); dos de la serie de los ciclopentanos perhidrofenantrenos: β-sitosterol (3) y estigmasterol (4), y uno de la serie del oleano: β-amirina (5); este trabajo constituye la primera descripción de la presencia de este tipo de metabolitos en las hojas del género *Bowdichia*.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas secas y molidas de *Bowdichia virgilioides* fueron sometidas a una extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, obteniéndose 10.5g de extracto crudo al evaporar el solvente. Este fue evaluado frente a parásitos de *Plasmodium falciparum* en estadio esquizonte observándose que el extracto

crudo no presenta inhibición de crecimiento de los parásitos a una concentración de 10 $\mu$ g/mL. El extracto orgánico crudo fue sometido a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna, obteniéndose diez fracciones, las fracciones fueron sometidas a purificación por diferentes técnicas cromatográficas como: cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex LH-20, cromatografía en capa fina y preparativa que permitieron el aislamiento y la identificación por métodos espectroscópicos de lupeol (1), lupenona (2),  $\beta$ -sitosterol (3), estigmasterol (4) y  $\beta$ -amirina (5).



El compuesto (1) muestra en su espectro de masas un ión molecular a  $m/z=426$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ , observándose como fragmentos más significativos a  $m/z=411$  correspondiente a la pérdida de un metilo [ $M^+-CH_3$ ] y  $m/z=411$  [ $M^+-CH_3-H_2O$ ] pérdida de un metilo y agua. En su espectro de RMN- $^1H$  presento seis señales como singuletes a  $\delta$  0.77 (3H, s, Me-24), 0.81 (3H, s, Me-28), 0.86 (3H, s, Me-25), 0.93 (3H, s, Me-27), 0.95 (3H, s, Me-23) y 1.02 (3H, s, Me-26) y que integra cada una para tres protones; a campos más bajos otro singulete a  $\delta$  1.67 (3H, s, Me-30) asignable a un metilo sobre doble enlace; un multiplete de base ancha a  $\delta$  1.94 (2H, m, H-21); un doble doblete a  $\delta$  2.4 (1H, dd,  $J=11.01$  y 5.7Hz, H-19) asignable a un protón metínico; un doble doblete a  $\delta$  3.20 (1H, dd,  $J=10.9$  y 5.3Hz, H-3) asignable a un protón geminal a un alcohol secundario; dos dobletes correspondiente a protones de un metileno exocíclico a  $\delta$  4.55 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29) y 4.67 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29). Estos datos comparados con los reportados en la

bibliografía confirmaron la estructura de 1 como lupeol<sup>11</sup>.

El compuesto (2) muestra en su espectro de masas un ión molecular a  $m/z=424$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O$ , se observaron fragmentos significativos a  $m/z=409$  [ $M^+-CH_3$ ] y  $m/z=205$  [ $M^+-C_{16}H_{27}$ ] correspondiente a las principales fragmentaciones de un esqueleto de lupano<sup>12</sup>. En su espectro de RMN- $^1H$  presento seis señales como singuletes, que integra cada una para tres protones, a  $\delta$  0.78 (3H, s, Me-24), 0.90 (3H, s, Me-28), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.98 (3H, s, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-26), 1.53 (3H, s, Me-23), un singulete a  $\delta$  1.68 (3H, s, Me-30) asignable a un metilo sobre doble enlace; un triplete a  $\delta$  2.37 (2H, t,  $J=5.3$ Hz, H-2); dos dobletes correspondiente a protones de un metileno exocíclico a  $\delta$  4.57 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29) y 4.68 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura de 2 como lupenona<sup>13</sup>.

El compuesto (3) muestra en su espectro de masas un ión molecular a  $m/z=414$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{29}H_{50}O$ , se observaron fragmentos significativos a  $m/z=396$  pérdida agua [ $M^+-H_2O$ ] y  $m/z=381$  [ $M^+-CH_3O$ ] correspondiente a la pérdida de un grupo metilo y agua. En su espectro de RMN- $^1H$  presento seis señales la región de los metilos; dos singuletes correspondientes a metilos angulares a  $\delta$  0.69 (3H, s, Me-18) y  $\delta$  1.00 (3H, s, Me-19); tres dobletes característicos de metilos de la cadena lateral a  $\delta$  0.82 (3H, d,  $J=6.3$ Hz, Me-27), 0.84 (3H, d,  $J=6.5$ Hz, Me-26), 0.93 (3H, d,  $J=6.4$ Hz, Me-21) y un triplete a  $\delta$  0.86 (3H, t,  $J=2.7$ Hz, Me-29); un multiplete a  $\delta$  3.54 (1H, m, H-3) asignable a un protón geminal a un alcohol; un doblete de protón vinílico a  $\delta$  5.35 (1H, d,  $J=4.2$ Hz, H-6). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura de 3 como  $\beta$ -sitosterol.<sup>11</sup>

El compuesto (4) muestra en su espectro de masas un ión molecular a  $m/z=412$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{29}H_{48}O$ . En el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos significativos a  $m/z=394$  pérdida de agua [ $M^+-H_2O$ ] y  $m/z=379$  [ $M^+-CH_3O$ ]. En su espectro de RMN- $^1H$  presento dos señales como singuletes a  $\delta$  0.69 (3H, s, Me-18) y  $\delta$  1.00 (3H, s, Me-19) correspondientes a los dos metilos angulares; señales para cuatro metilos uno como triplete a  $\delta$  0.82 (3H, s,  $J=6.3$ Hz, Me-29) y tres como

dobletes a  $\delta$  0.86 (3H, d,  $J=7.1$ Hz, Me-27), 0.87 (3H, d,  $J=2.7$ Hz, Me-26) y  $\delta$  1.02 (3H, d,  $J=7.0$ Hz, Me-21),  $\delta$  1.63 (2H, m, H-1),  $\delta$  2.31 (2H, m, H-2); un multiplete a  $\delta$  3.56 (1H, m, H-3) asignable a un protón del alcohol terciario; dos doblete de dobletes a  $\delta$  5.02 (1H, d,  $J=9.3$  y 16.6Hz, H-23) y  $\delta$  5.18 (1H, d,  $J=9.3$  y 16.6Hz, H-22) y un doblete a  $\delta$  5.35 (1H, d,  $J=4.2$ Hz, H-6). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura de **4** como **estigmasterol**<sup>14</sup>.

El compuesto (**5**) muestra en su espectro de masas un ión molecular a  $m/z=426$ , correspondiente a una fórmula molecular  $C_{30}H_{50}O$ . En el espectro de masas de baja resolución se observaron como fragmentos mas significativos a  $m/z=411$  [ $M^+-CH_3$ ] y  $m/z=393$  [ $M^+-CH_5O$ ]. En su espectro de RMN-<sup>1</sup>H presenta 7 señales como singuletes a  $\delta$  0.78 (3H, s, Me-24), 0.82 (3H, s, Me-28), 0.86 (6H, s, Me-29 y Me-30), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.95 (3H, s, Me-23), 0.99 (3H, s, Me-26) y 1.12 (3H, s, Me-27), un multiplete a  $\delta$  3.22 (1H, m, H-3) asignable a un protón del alcohol terciario, un triplete a  $\delta$  5.17 (1H, t,  $J=12$ Hz, H-12). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura de **5** como  **$\beta$ -amirina**.<sup>13</sup>

Este trabajo constituye el primer estudio de las hojas de *Bowdichia virgilioides*, aislándose terpenos de la serie del lupano, oleano y esteroides; estudios reportados por Bravo *et al.*<sup>15</sup> de la corteza demuestran la presencia de alcaloides tipo ormosia, ormosanina y homormosanina, estos datos nos muestran la presencia de diferente tipo de metabolitos en la corteza y en las hojas, alcaloides en la corteza y triterpenos en las hojas.

## EXPERIMENTAL

### Estudios espectroscópicos

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C fueron obtenidos en espectrómetros BRUKER AVANCE 300 Y AMX500, utilizando programas de COSY, DEPT, HMQC, HMBC Y ROESY. Para la realización de los experimentos los productos fueron disueltos en CDCl<sub>3</sub>. Los espectros de masas de baja resolución se realizaron en espectrómetros HEWLETT-PACKARD, modelo 5995 y VGMICROMASS ZAB-2F. La determinación de las fórmulas moleculares de fragmentos y de iones moleculares fueron realizados en un espectrómetro VGMICROMASS ZAB-2F (potencia de ionización de 15 o 70 CV), y FISONS INSTRUMENTS modelo VG Autospec. Los estudios espectroscópicos fueron

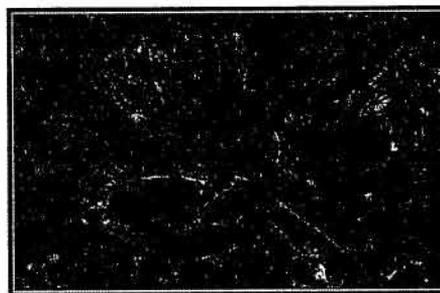
realizados en el Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González" de la Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España.

### Estudios cromatográficos

Las técnicas que se utilizaron para el aislamiento y purificación de los metabolitos fueron técnicas cromatográficas tales como: cromatografía de exclusión molecular en columna empacada con Sephadex LH-20 (Pharmacia), suspendida y eluida con la mezcla A: *n*-hexano-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1:1); cromatografía líquida al vacío (CLV) con gel de sílice de 0.063-0.020 mm de diámetro, eluida con diferentes mezclas de AcOEt, *n*-hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, (Me)<sub>2</sub>CO, Et<sub>2</sub>O; cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas cromatográficas con soporte de gel sílice con fluorescencia UV 254 nm (Macherey-Nagel) de 25  $\mu$ m de espesor con base de aluminio; cromatografía en capa fina preparativa en placas de 1 mm de espesor, tipo G1510/LS254.

### Colección del material vegetal

Las hojas y corteza de *Bowdichia virgilioides* (Papilionaceae) fueron colectadas en Macagua, provincia Abel Iturralde, del departamento de La Paz, en mayo y septiembre del 2006 (Sud 13°48'337 y al Oeste 68°06'707 a una altura de 360 m.s.n.m.). Muestras de herbario fueron depositadas en el Herbario Nacional de La Paz y su identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con las muestras de vaucher (GB1734, GB1820 y GB1831) del Herbario Nacional de La Paz, Bolivia.



*Bowdichia virgilioides* (Papilionaceae)  
Foto: Leslie Cayo, Madidi.

### Preparación del extracto

Las hojas secas (753g) y pulverizadas, fueron sometidas a una maceración con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:10) durante 72 horas a temperatura ambiente. El residuo obtenido fue filtrado, evaporado a 40°C y llevado a sequedad, obteniéndose 10.5g de extracto crudo, 1.39% con relación al material seco.

### Separación y aislamiento de los componentes del extracto

El extracto crudo fue fraccionado por cromatografía en columna, utilizando como sistema de elusión con mezclas de *n*-hexano:AcOEt en orden creciente de polaridad, obteniéndose 10 fracciones (F1-F10). La fracción (F2) fue recromatografiada en columna de Sephadex LH-20 suspendida y eluida con la mezcla A, obteniéndose 4 fracciones. De la fracción F2-2 se aisló **lupenona** (71.8mg). La fracción F2-3 fue separada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-eter etílico (8:2), aislándose **lupenona** con Rf=0.36 (0.8mg, un total de 72.6mg 0.69% del extracto crudo).

La fracción (F4) fue recromatografiada en columna en Sephadex LH-20 suspendida y eluida con la mezcla A, obteniéndose 5 fracciones. La fracción F4-3 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de *n*-hexano-EtOAc (85:15), obteniéndose  **$\beta$ -sitosterol** con un Rf=0.19 (11mg, 0.10% del extracto crudo). Los componentes de la fracción F4-4 fueron separados mediante cromatografía en columna sobre sílica gel con sistemas de elusión de *n*-hexano-acetona con polaridad creciente, obteniéndose 5 fracciones. De la fracción F4-4.1 se aislaron **lupeol** (44.6mg) y  **$\beta$ -amirina** (15.4mg). La fracción F4-4.2 fue separada mediante cromatografía en placa preparativa con *n*-hexano-acetona (75:25) obteniéndose  **$\beta$ -sitosterol** (4.6mg) con un Rf=0.55 y **estigmasterol** con un Rf=0.45 (0.8mg). La fracción F4-4.4 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa con *n*-hexano-acetona (75:25) obteniéndose **lupenona** con un Rf=0.42 (11.7mg).

La fracción 6 (F6) fue recromatografiada en columna en Sephadex LH-20 suspendida y eluida con la mezcla A, obteniéndose 3 fracciones. La fracción F6-2 fue purificada por cromatografía en columna sobre sílica gel con una mezcla de *n*-hexano-éter etílico en polaridad creciente, obteniéndose nueve fracciones, y de las cuatro últimas se obtuvo  **$\beta$ -sitosterol** (18.4mg) y **estigmasterol** (3.3mg).

Compuesto (1) **lupeol**: 44.0mg, 0.42% del extracto crudo, EIMS (rel. int.)  $m/z$  426 (62.2%),  $C_{30}H_{50}O$ , a  $m/z=411$  (15.8%) [ $M^+-CH_3$ ] y  $m/z=411$  (15.8%) [ $M^+-CH_5O$ ]. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz),  $\delta$  0.77 (s, Me-24), 0.81 (s, Me-28), 0.86 (s, Me-25), 0.93 (s, Me-27), 0.95

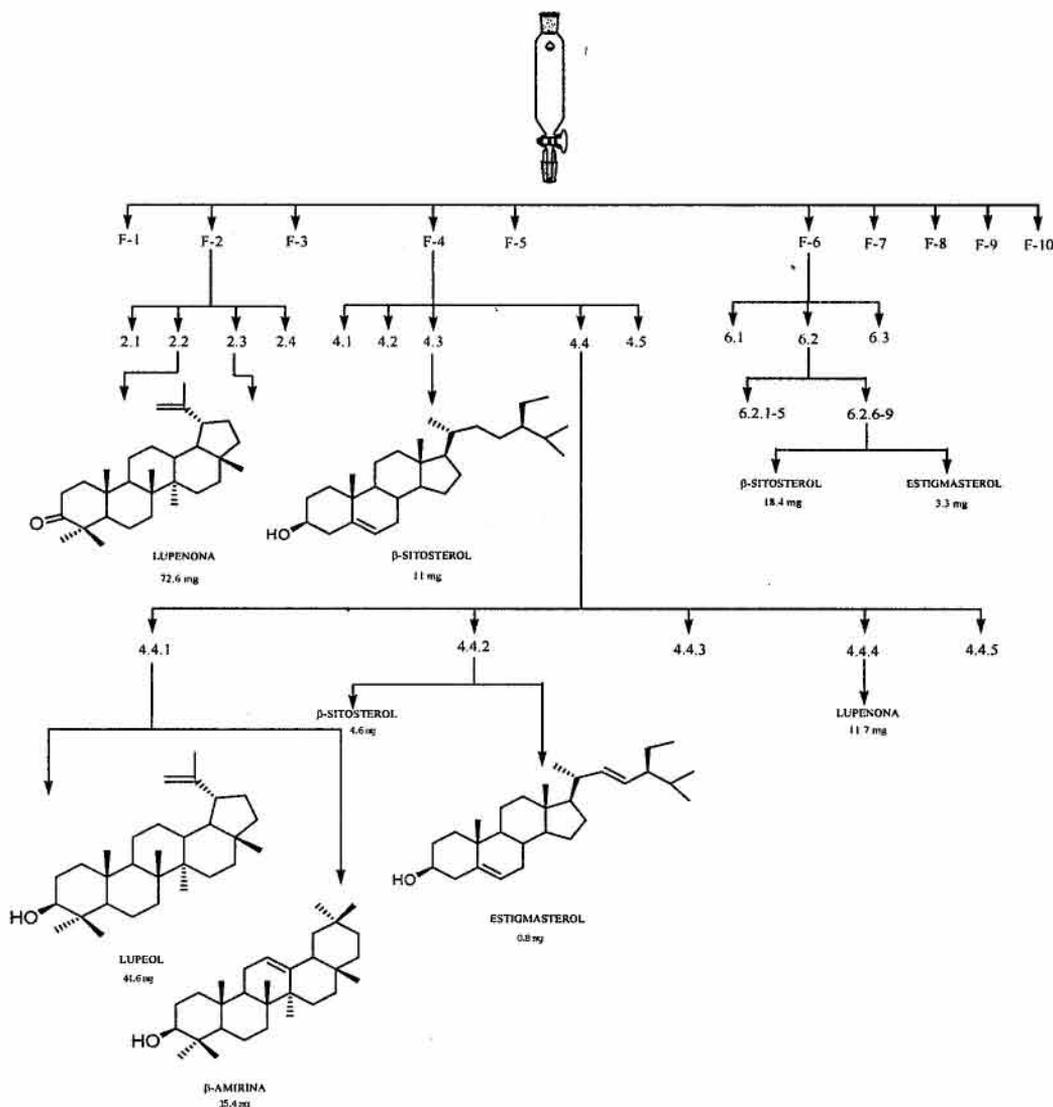
(s, Me-23) y 1.02 (s, Me-26)  $\delta$  1.67 (s, Me-30);  $\delta$  1.94 (2H, m, H-21);  $\delta$  2.4 (1H, dd,  $J=11.01$  y 5.7Hz, H-19);  $\delta$  3.20 (1H, dd,  $J=10.89$  y 5.3Hz, H-3);  $\delta$  4.55 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29) y 4.67 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29).

El compuesto (2) **lupenona**: 83.3mg, 0.79% del extracto crudo EIMS (rel. int.)  $m/z$  424 (0.7%),  $C_{30}H_{48}O$ ,  $m/z=409$  (0.27%) [ $M^+-CH_3$ ] y  $m/z=205$  (72.0%) [ $M^+-C_{18}H_{27}$ ]. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz),  $\delta$  0.78 (3H, s, Me-24), 0.90 (3H, s, Me-28), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.98 (3H, s, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-26), 1.53 (3H, s, Me-23),  $\delta$  1.68 (3H, s, Me-30);  $\delta$  2.37 (2H, t,  $J=5.3$ Hz, H-2);  $\delta$  4.57 (2H, d,  $J=2.2$ Hz, H-29) y 4.68 (2H, d,  $J=2.0$ Hz, H-29).

Compuesto (3)  **$\beta$ -sitosterol**: 34.0mg, 0.32% del extracto crudo, EIMS (rel. int.)  $m/z=414$  (78.8%),  $C_{29}H_{50}O$ ,  $m/z=396$  (40.4%) [ $M^+-H_2O$ ] y  $m/z=381$  (20.7%) [ $M^+-H_2O-CH_3$ ]. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz),  $\delta$  0.69 (3H, s, Me-18) y  $\delta$  1.00 (3H, s, Me-19);  $\delta$  0.82 (3H, d,  $J=6.3$ Hz, Me-27), 0.84 (3H, d,  $J=6.5$ Hz, Me-26), 0.93 (3H, d,  $J=6.4$ Hz, Me-21),  $\delta$  0.86 (3H, t,  $J=2.7$ Hz, H-29);  $\delta$  3.54 (1H, m, H-3);  $\delta$  5.35 (1H, d,  $J=4.2$ Hz, H-6).

Compuesto (4) **estigmasterol**: 4.1mg, 0.04% del extracto crudo, EIMS (rel. int.)  $m/z$  412 (39.2%),  $C_{29}H_{48}O$ ,  $m/z$  394 (6.52%) [ $M^+-H_2O$ ] y  $m/z$  379 (4.02%) [ $M^+-H_2O-CH_3$ ]. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz),  $\delta$  0.69 (3H, s, Me-18) y  $\delta$  1.00 (3H, s, Me-19);  $\delta$  0.82 (3H, t,  $J=6.3$ Hz, Me-29),  $\delta$  0.86 (3H, d,  $J=7.1$ Hz, Me-27), 0.87 (3H, d,  $J=2.7$ Hz, Me-26) y  $\delta$  1.02 (3H, d,  $J=7.0$ Hz, Me-21),  $\delta$  1.63 (2H, m, H-1),  $\delta$  2.31 (2H, m, H-2),  $\delta$  3.56 (1H, m, H-3),  $\delta$  5.02 (1H, dd  $J=16.6$  y 9.3Hz, H-23) y  $\delta$  5.18 (1H, dd,  $J=16.6$  y 9.3Hz, H-22),  $\delta$  5.35 (1H, d,  $J=4.2$ Hz, H-6).

Compuesto (5)  **$\beta$ -amirina**: 15.4mg, 0.15% del extracto crudo, EIMS (rel. int.)  $m/z=426$ ,  $C_{30}H_{50}O$ ,  $m/z=411$  (2.1%) [ $M^+-CH_3$ ] y  $m/z=393$  (0.5%) [ $M^+-CH_5O$ ]. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.78 (3H, s, Me-24), 0.82 (3H, s, Me-28), 0.86 (6H, s, Me-29 y Me-30), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.95 (3H, s, Me-23), 0.99 (3H, s, Me-26) y 1.12 (3H, s, Me-27),  $\delta$  3.22 (1H, m, H-3),  $\delta$  5.17 (1H, t,  $J=12$ Hz, H-12).



Esquema 1. Aislamiento de los metabolitos de *Bowdichia virgilioides*.

**Actividad antiplasmódica**

El extracto (2mg) disuelto en DMSO (200µL) y de esta se realizan las respectivas diluciones para obtener una concentración de 10µg/mL. Los controles fueron DMSO en dilución 1:100 en RPMI para el control negativo y Cloroquina como control positivo a las concentraciones de 10, 100, 1000 nM

**Preparación de la placa.**

En cada pozo se colocan 100µL de glóbulos rojos con un hematocrito del 2% (RPMI con suero o plasma al 20%), y una parasitemia del 1% (los parásitos deben de estar en estadio anillo en su mayoría, no se toman en cuenta los otros estadios), y luego se añaden las concentraciones seriales de las drogas (dando un volumen final de 200µL), esta placa se incubaba a 37°C por el lapso de 48hrs. Por último se

observó en el microscopio, con lente de inmersión X 100, contando tanto glóbulos rojos no infectados (GRL) como infectados (GRI), para así obtener el % de inhibición. El cálculo para hallar la Concentración Inhibitoria del 50% en la maduración de los esquizontes (CI<sub>50</sub>), se hizo por el método gráfico mediante el programa Cricket Graph 1.3, considerándose como activos aquellos que presentaron un CI<sub>50</sub> menor a 10µg/mL.

**AGRADECIMIENTOS**

A la AECI Programa Intercampus (PCI-Iberoamerica) de Cooperación Inter-universitaria 2007 por el financiamiento del proyecto (PCI A/4954/07). Al Programa ASDI-SAREC-UMSA proyecto Enfermedades Infecciosas. A la Red RIBIOFAR del CYTED.

Al CIPTA, las comunidades de Santa Rosa de Maravilla y Macahua, por el acceso a las especies medicinales.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas. Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

## REFERENCIAS

- <sup>1</sup> POLHILL, R.M. Papilionoideae, In *Advances in Legume Systematics Part 1*, Royal Botanic Gardens, Eds. Raven, 1981, pp 191-208.
- <sup>2</sup> CORREIA, M. P. *Diccionario das plantas Úteis do Brasil*, Eds. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, 1984, 6-VI, p 149.
- <sup>3</sup> BOURDY, G., GIMENEZ, A. Y OTROS. "Tacana: Ecuánasha aquí, ecuanasha id'rene cuana, me schanapaque" (Tacana: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas). Editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD. Eds. Plural, La Paz, Bolivia, 1999, pp 11-496.
- <sup>4</sup> TORRENEGRA, R., BAUEREISS, P., ACHENBACH, H. *Phytochemistry*, 1989, **28**, 2219.
- <sup>5</sup> MARINHO, L. C., DA CUNHA, C. M. T. M., THOMAS, G., BARBOSA-FILHO, J. M. *Fitoterapia*, 1994, **65**, 475.
- <sup>6</sup> TORRENEGRA, R., ESCARRIA, S., BAUEREISS, P., ACHENBACH, H. *Planta Médica*, 1985, **3**, 276.
- <sup>7</sup> ARRIAGA, A. M. C., GOMES, G. A., BRAZ-FILHO, R. *Fitoterapia*, 2000, **71**, 211.
- <sup>8</sup> MELO, F. N. NAVARRO, V. R., DA SILVA, M. S., DA-CUNHA, E. V. L., BARBOSA-FILHO, J. M., BRAZ-FILHO, R., *Natural Product Letters*, 2001, **15**, 261.
- <sup>9</sup> VELOZO, L. S. M., DA SILVA, B. P., BERNARDO, R. R., PARENTE, J. P. *Phytochemistry*, 1999, **52**, 1473.
- <sup>10</sup> ARRIAGA, A. M. C., MACHADO, M.I.L., GOMES, G.A., CRAVEIRO, A. A. *Journal of Essential Oil Research*, 1998, **10**, 205.
- <sup>11</sup> BRAVO, J.A. "Étude chimique et biologique des métabolites de six plantes boliviennes á activité antiparasitaire, antibactérienne et antifongique", Thèse doctorale, 1999, pp 163-164, 215-217.
- <sup>12</sup> BUDZIKIEWICZ H., DJERASSI C., WILLIAMS D.H. *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry. Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes*. San Francisco: Holden-Day, 1964, **2**.
- <sup>13</sup> VIQAR UDDIN AHMAD, ATTA-UR-RAHMAN. *Handbook of Natural Products Data. Pentacyclic Triperpenoids*. Eds., Elsevier, Amsterdam-Netherlands, 1994, **1, 3**, pp 21-22;1029-1030.
- <sup>14</sup> BRAVO, J.A. *Saponines de Myrsine coriacea*. Thèse de Master Université de Reims, 1993, p 12.
- <sup>15</sup> BRAVO, J.A., LAVAUD, C., BOURDY, G., DEHARO, E., GIMÉNEZ, A., SAUVAIN, M. *Revista Boliviana de Química*, 2002, **19**, 12.