

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIPALÚDICO DE ESPECIES SELECTAS
DEL GÉNERO *PICRAMNIA* (SIMAROUBACEAE)**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

MARÍA DEL ROSARIO HERNÁNDEZ MEDEL



TUTOR: ROGELIO PEREDA MIRANDA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autoriza a la Dirección General de Estadística de la UNAM a disponer en formato electrónico e impreso el contenido de los datos estadísticos.

NOMBRE Ma. del Rosario
Hernandez Medel

FECHA 03/Agosto/2006

FIRMA Ma. del Rosario Hernandez Medel

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 123 de la Facultad de Química, Edificio E, Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Rogelio Pereda Miranda, con una beca otorgada por la Universidad Veracruzana.



236

Sisonia stipularis

En la página anterior se muestra una ilustración del siglo XVIII de la *Picramnia antidesma* realizada durante la Real Expedición Botánica Española a la Nueva España, los ilustradores la nombraron como *Fessonia dependens*, como se constata al calce del dibujo. La identificación como *P. antidesma* se describe en: Rogers McVaugh (2000). *Botanical Results of the Sessé & Mociño Expedition (1787-1803) VII. A Guide to relevant Scientific Names of Plants*. Hunt Institute for Botanical Documentation, Carnegie Mellon University: Pittsburgh, pp. 495.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	ii
RESUMEN	iv
SUMMARY	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Generalidades de la familia Simaroubaceae	5
2.2. Etnobotánica del género <i>Picramnia</i>	8
2.3. Descripción del material vegetal de estudio	10
2.3.1. <i>Picramnia antidesma</i>	10
2.3.2. <i>Picramnia xalapensis</i>	11
2.3.3. <i>Picramnia hirsuta</i>	11
2.4. Antecedentes fitoquímicos del género <i>Picramnia</i>	11
2.5. Biosíntesis de las antraquinonas	15
2.5.1. Policétidos	15
2.5.2. Ácidos siquímico-mevalónico	18
2.6. Propiedades espectroscópicas de las antraquinonas	20
2.7. Métodos usados para establecer la configuración relativa y absoluta .	20
2.8. Antecedentes del paludismo	25
2.8.1. Esquizonticidas tisulares utilizados en la profilaxia causal	28
2.8.2. Esquizonticidas tisulares utilizados para evitar recaídas	28
2.8.3. Esquizonticidas (hemáticos) utilizados en la curación clínica	

y de supresión	29
2.8.4. Gametocidas	29
2.8.5. Esporonticidas	30
2.8.6. Desintoxicación del grupo hemo	30
2.8.7. Metabolismo de pirimidina y transporte de electrones	30
2.8.8. Metabolismo del folato	30
2.8.9. Inhibidores de la topoisomera II	31
2.8.10. Síntesis de proteínas	31
2.8.11. Quelación del Fe(III)	31
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. OBJETIVOS	39
5. PARTE EXPERIMENTAL	
5.1. Procedimientos generales	41
5.1.1. Técnicas cromatográficas	41
5.1.1.1. Cromatografía de columna (cc)	41
5.1.1.2. Cromatografía en capa delgada (ccd)	41
5.1.2. Instrumental analítico	42
5.2. Material vegetal	
5.2.1. <i>Picramnia antidesma</i>	42
5.2.2. <i>Picramnia xalapensis</i>	42
5.2.3. <i>Picramnia hirsuta</i>	43
5.3. Extracción del material vegetal	43
5.4. Ensayos biológicos	
5.4.1. Evaluación antipalúdica <i>in vitro</i>	43

5.4.2. Evaluación citotóxica <i>in vitro</i>	45
5.4.2.1. Líneas celulares	45
5.4.2.2. Protocolo de evaluación	45
5.3. Análisis químico	
5.5.1. Análisis de <i>Picramnia antidesma</i>	47
5.5.2. Análisis de <i>Picramnia xalapensis</i>	52
5.5.3. Análisis de <i>Picramnia hirsuta</i>	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1. Análisis fitoquímico de <i>Picramnia antidesma</i>	59
6.1.1. Caracterización del uveósido (1)	61
6.1.2. Caracterización del 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	69
6.1.3. Caracterización del desoximayósido (3) y del desoxisarósido (4) .	78
6.1.4. Caracterización del fragmento glicosídico	90
6.1.5. Determinación de la configuración absoluta de las antronas	
uveósido (1) y 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	95
6.2. Análisis fitoquímico de <i>Picramnia xalapensis</i>	96
6.3. Análisis fitoquímico de <i>Picramnia hirsuta</i>	97
6.4. Evaluación biológica de los derivados antraquinónicos	99
6.5. Conformación más estable de los metabolitos 1-6 por el programa	
computacional PcModel	101
7. CONCLUSIONES	104
8. BIBLIOGRAFIA	106
9. ARTÍCULO DERIVADO DEL PRESENTE PROYECTO	126

LISTA DE FIGURAS

1. Ruta biosintética de las antraquinonas a partir de policétidos	16
2. Incorporación de dos moléculas de glucosa a una antrona	18
3. Origen biogenético mixto de las antraquinonas mediante la ruta de los ácidos siquímico-mevalónico	19
4. Estructura de las aloínas A y B	23
5. Ciclo vital del <i>Plasmodium falciparum</i>	27
6. Fraccionamiento biodirigido del extracto etílico de <i>Picramnia antidesma</i>	60
7. Espectro de RMN- ¹ H del uveósido (1)	62
8. Ampliación de la zona aromática del espectro de 1, que muestra la sobreposición de las señales para los protones H-6, H-3" y H-5"	62
9. Espectro de RMN- ¹³ C del uveósido (1)	63
10. Espectro de correlación ¹ H- ¹ H (COSY) del uveósido (1)	65
11. Espectro de correlación ¹ H- ¹³ C (HMQC) del uveósido (1)	66
12. Ampliaciones del experimento HMBC del uveósido (1)	67
13. Espectros de RMN- ¹ H del uveósido (1) y del 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	71
14. Estructuras del par de antronas uveósido (1) y 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	71
15. Espectro de RMN- ¹³ C del 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	72
16. Ampliación de la zona aromática del espectro de RMN- ¹³ C del 10- <i>epi</i> -uveósido (2).....	73
17. Espectro de correlación homonuclear del 10- <i>epi</i> -uveósido (2).....	74

18. Experimento HMQC del 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	75
19. Espectro HMBC del 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	75
20. Ampliaciones del espectro de HMBC del 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	76
21. Espectros de RMN- ¹ H del desoximayósido y del desoxisarósido	80
22. Espectros de correlación ¹ H- ¹ H del desoximayósido y del desoxisarósido	81
23. Espectro de RMN- ¹³ C del desoximayósido y del desoxisarósido	82
24. Espectros de correlación HMQC del desoximayósido y del desoxisarósido	84
25. Espectros HMBC del desoximayósido y del desoxisarósido	85
26. Ampliaciones del espectro HMBC del desoximayósido	86
27. Ampliaciones del espectro HMBC del desoxisarósido	87
28. Ampliaciones de los espectro de RMN- ¹ H del uveósido y del 10- <i>epi</i> -uveósido	92
29. Ampliaciones de los espectros de RMN- ¹ H del desoximayósido y del desoxisarósido	93
30. Difracción de rayos X de las oxantronas mayósido y sarósido	95
31. Espectros de DC del uveósido (1) y del 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	96

LISTA DE TABLAS

1. Datos de DC para antronas y oxantronas naturales	24
2. Pesos de extractos obtenidos de las especies de <i>Picramnia</i>	43
3. Citotoxicidad de los compuestos aislados de la subfracción activa B del EEtPAR	49
4. Resultados de la evaluación citotóxica de los extractos crudos obtenidos a partir de las especies del género <i>Picramnia</i> en estudio	58
5. Datos espectroscópicos para el compuesto uveósido (1)	68
6. Datos espectroscópicos para el compuesto 10- <i>epi</i> -uveósido (2)	77
7. Datos espectroscópicos para el compuesto desoximayósido (3)	88
8. Datos espectroscópicos para el compuesto desoxisarósido(4)	89
9. Datos espectroscópicos de las oxantronas mayósido (5) y sarósido(6)	98
10. Resultados de las evaluaciones citotóxica y antipalúdica de algunos de los metabolitos aislados de <i>Picramnia</i>	100
11. Estructura molecular y confórmeros más estables de los compuestos aislados en este trabajo	103

RESUMEN

La presente investigación forma parte de un proyecto dirigido hacia el descubrimiento de compuestos bioactivos de origen natural de las especies del género *Picramnia*. Parte de ésta se desarrolló en la Facultad de Química de la UNAM y comprendió la evaluación citotóxica y antipalúdica *in vitro* de los extractos de tres especies: *Picramnia antidesma*, *Picramnia xalapensis* y *Picramnia hirsuta*. La evaluación del potencial citotóxico se llevo a cabo mediante la línea celular derivada del carcinoma nasofaríngeo humano (KB) y la evaluación antipalúdica *in vitro* se realizó con dos cepas de *Plasmodium falciparum* en etapa asexual eritrocítica, una susceptible y otra resistente a la cloroquina (D6 y W2, respectivamente).

La selección del extracto por trabajar se realizó mediante la evaluación del potencial citotóxico de los extractos totales de cada una de las especies, eligiéndose al extracto de éter etílico de la raíz de *P. antidesma* ya que su citotoxicidad (KB: $CI_{50} = 0.97 \mu\text{g/mL}$) fue considerablemente mayor que la observada para los otros extractos, mostrando además, una significativa actividad antipalúdica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*.

El fraccionamiento biodirigido de dicho extracto se realizó monitoreando la actividad citotóxica de las fracciones; aislándose de esta manera, dos pares de antranas diastereoisoméricas: uveósido (**1**), 10-*epi*-uveósido (**2**), desoximayósido (**3**) y desoxisarósido (**4**). La elucidación estructural de estos metabolitos activos se estableció mediante estudios espectroscópicos de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C y

espectrometría de masas, determinándose su configuración absoluta por dicroísmo circular.

Las evaluaciones de las actividades citotóxica [empleando un panel de cuatro líneas celulares derivadas de tumores humanos: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de colon (HCT-15), adenocarcinoma de ovario (OVCAR) y carcinoma de células escamosas de cervix (SQC-1 UISO)] y antipalúdica *in vitro* de estos metabolitos, demostró que las cuatro antronas **1-4** no presentaron una actividad selectiva ya que desplegaron una considerable actividad tanto citotóxica como antipalúdica.

Del extracto de éter etílico del tallo de *Picramnia xalapensis* ($CI_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$) se aislaron crisofanol, β -sitosterol, 7-hidroxycoumarina y ácido betulínico. Estos compuestos se identificaron comparando sus datos espectroscópicos con los de muestras auténticas, así como con los reportados en la literatura.

Del extracto de metanol de la raíz de *Picramnia hirsuta* se lograron purificar crisofanol, emodina, β -sitosterol, 7-hidroxycoumarina, glucósido de emodina y el par de oxantronas diastereoisoméricas mayósido (**5**) y sarósido (**6**). Los compuestos se identificaron por comparación de sus datos espectroscópicos con los de muestras auténticas. La evaluación citotóxica y antipalúdica de estas oxantronas **5-6** demostró que este par de metabolitos tuvieron una actividad selectiva hacia ambas cepas del *Plasmodium falciparum*, principalmente el sarósido (**6**).

SUMMARY

The present investigation is part of a project directed toward the discovery of bioactive compounds of natural origin from species of the *Picramnia* genus. Part of this one developed in the Facultad de Química de la UNAM and it understood the cytotoxic and antimalarial *in vitro* activity evaluation of the extracts of three species: *Picramnia antidesma*, *Picramnia xalapensis* and *Picramnia hirsuta*.

A preliminary selection of the total extracts was carried out for each one of the species by means of the evaluation of its cytotoxicity against cultured mammalian cell line from the nasopharyngeal carcinoma (KB) and their *in vitro* antimalarial activity against asexual erythrocytic stages of two clones of *Plasmodium falciparum* (D6/chloroquine-sensitive and W2/chloquine-resistant). The ethyl ether extract of the root of *P. antidesma* was selected for further chemical investigation due to its cytotoxicity (KB: $IC_{50} = 0.97 \mu\text{g/mL}$) that was considerably higher than the one observed for the other plant extracts tested. This crude total extract also displayed a significant antiplasmodial activity against *Plasmodium falciparum*.

Bioassay-directed fractionation of the above mentioned extract was conducted using the evaluation of the cytotoxic activity against cultured KB cell line. Thus, two pairs of diastereoisomeric anthrones were isolated: uveoside (**1**), 10-*epi*-uveoside (**2**), desoximayoside (**3**) and desoxisaroside (**4**). The structural elucidation of these active compounds was achieved by means of spectroscopic methods including NMR- ^1H , NMR- ^{13}C and Mass Spectrometry. The establishment

of the absolute configuration of these compounds carried out from circular dichroism data interpretation.

The cytotoxic evaluation [using a panel of four cell lines derived from human tumors: nasopharyngeal carcinoma (KB), colon cancer (HCT-15), ovarian adenocarcinoma (OVCAR) and squamous cell cervix carcinoma (SQC-1 UISO)] and the *in vitro* antimalarial activity of these isolated metabolites demonstrated that four antranas **1-4** presented a considerable unspecific cytotoxicity correlatable to their antimalarial activity. Therefore, these secondary metabolites did not represent antimalarial agents with a selective activity.

Of the ethyl ether extract of the stem from *Picramnia xalapensis* ($IC_{50} = <20$ $\mu\text{g/mL}$) chrysophanol, β -sitosterol, 7-hydroxycoumarin and betulinic acid were isolated. These known compounds were identified by comparison of their spectroscopic data with those values of authentic samples in addition to comparison with literature values.

The purification procedures applied to the methanol root extracts of *Picramnia hirsuta* allowed the isolation of chrysophanol, emodin, β -sitosterol, 7-hydroxycoumarin, emodin glucoside and the pair of diastereoisomeric oxantrones: mayoside (**5**) and saroside (**6**). The compounds were identified by comparison of their spectroscopic data with those values registered for authentic samples. The cytotoxic and antimalarial *in vitro* activities obtained for these oxantrones **5-6** proved that this pair of compounds displayed a selective activity towards both clones of the *Plasmodium falciparum*.

1. INTRODUCCIÓN

El paludismo es una de las principales enfermedades de países tropicales y subtropicales del mundo y se define como una parasitosis producida por una de las cuatro diferentes especies de protozoarios del género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*. Desde el punto de vista epidemiológico, *P. falciparum* y *P. vivax* son los más importantes, siendo el primero el que produce la forma más grave de la enfermedad.¹

Cada año, según la Organización Mundial de la Salud (WHO), ocurren entre millón y medio y cerca de tres millones de defunciones a consecuencia del paludismo; las víctimas son, principalmente, niños menores de cinco años de países africanos. Las consecuencias de esta enfermedad las sufren entre trescientos y quinientos millones de seres humanos y, económicamente, es considerada como una carga pesada para los países, sobre todo de África, donde es endémica, por lo que esta enfermedad se ha contemplado como un gran obstáculo para el progreso y desarrollo de estos países.^{1,2}

A más de un siglo del descubrimiento del mosquito *Anopheles* como el agente transmisor del paludismo, el impacto de la enfermedad sigue en aumento, y a medida que se incrementa la resistencia a los fármacos antipalúdicos y a la pérdida de la sensibilidad a los insecticidas por parte de los mosquitos transmisores, la humanidad se encuentra sin medicamentos nuevos para contrarrestar esta enfermedad.^{1,3}

El desarrollo de medicamentos para tratar el paludismo ha proporcionado pocos resultados, sobre todo por la falta de interés de los grandes laboratorios

farmacéuticos, para quienes los problemas de los países pobres en vías de desarrollo son un “mal negocio”.

La búsqueda de nuevos compuestos efectivos contra las cepas de *Plasmodium* resistentes a los fármacos sintéticos ampliamente usados, ha conducido a intensificar el interés mostrado por las investigaciones farmacognósticas de los remedios antipalúdicos de origen vegetal;⁴ los cuales se han venido usando, de manera empírica y desde tiempos inmemoriales, para la cura de muy diversos padecimientos.

El uso actual de plantas para propósitos medicinales refleja, por un lado, el apego de la gente a sus tradiciones culturales y, por el otro, la falta de acceso a la medicina moderna lo cual se encuentra asociado, generalmente, con la pobreza extrema.

Si las plantas están siendo utilizadas como fuente de compuestos antipalúdicos resulta conveniente explorar los metabolitos secundarios responsables de las propiedades atribuidas a la droga cruda, ya sea para evidenciar su potencial curativo o tóxico.⁵ En este sentido, se pueden mencionar algunos metabolitos secundarios utilizados como fármacos para el tratamiento del paludismo, como es el caso de la quinina, extraída de la corteza de varias especies del género *Cinchona* (Rubiaceae),⁶ la artemisinina, de *Artemisa annua* (Asteraceae),⁷⁻⁹ y la febrifugina de *Dichroea febrifuga* (Saxifragaceae)^{10,11} entre otros. Estos trabajos han contribuido a considerar a la flora medicinal como una fuente inagotable de investigación para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

Debido a la necesidad de encontrar nuevos y más efectivos fármacos para el tratamiento de las diversas enfermedades existentes, incluyendo las que han resurgido por la resistencia que han desarrollado los microorganismos a los medicamentos hasta ahora utilizados, es importante tomar en cuenta el conocimiento empírico que se tiene sobre la herbolaria tradicional, con el propósito de obtener metabolitos bioactivos que sirvan como prototipos estructurales novedosos para el desarrollo de productos de posible aplicación terapéutica.

Numerosas especies de la familia Simaroubaceae se utilizan empíricamente en el tratamiento de afecciones febriles, disentería y el paludismo¹²⁻¹⁴, como *Picrasma excelsa*, *Castela tortuosa*, *Quassia amara*, *Brucea javanica* y *Simarouba glauca*, entre otras, algunas de éstas han sido objeto de investigación con el propósito de aislar sus principios activos^{6,15}. La mayoría de los compuestos bioactivos que se han obtenido de estas especies pertenecen al grupo de metabolitos secundarios distintivos de esta familia, los quasinoídes o simaroubolidanos, los cuales han mostrado una potente actividad amebicida y antipalúdica *in vitro*,^{6,10,16-24}

Algunas especies del género *Picramnia*, que también pertenece a la familia Simaroubaceae, poseen una amplia reputación etnomédica como febrífugos e incluso contra el paludismo.²⁵⁻²⁷ Por esta razón, resulta interesante estudiar el contenido metabólico de estas plantas, analizar su potencial biológico e identificar nuevos candidatos a fármacos para el desarrollo de nuevos agentes antipalúdicos.

En el presente trabajo se realiza la evaluación de las actividades citotóxica y antipalúdica de los extractos de diversas especies del género *Picramnia*, con la finalidad de explorar el potencial biológico de sus metabolitos secundarios

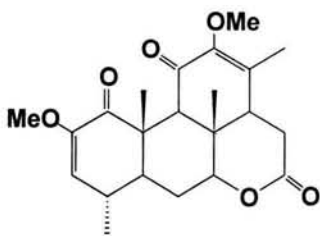
biodinámicos de este género, enfocando la investigación a su potencial citotóxico y antipalúdico con el objeto de establecer si éstas son específicas o no en su acción. Los resultados pueden corroborar el uso popular que se les ha dado a las especies de este género y, si así fuera el caso, evidenciar los riesgos que conlleva el uso y manejo de estas plantas empleadas empíricamente como remedio para la cura de diversos padecimientos asociados a las fiebres palúdicas y disentéricas.

2. ANTECEDENTES

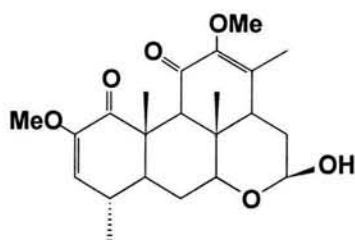
2.1. Generalidades de la familia Simaroubaceae.

La familia Simaroubaceae comprende arbustos y árboles de tamaño mediano, e incluye especies utilizadas en la medicina tradicional como *Quassia amara* y algunas ornamentales como *Ailanthus altissima*. Esta familia presenta una distribución pantropical principalmente con cerca de treinta y dos géneros y doscientas especies.^{2,28} Tradicionalmente, se han usado las infusiones de algunas especies para combatir fiebres y disenterías, figurando en numerosas farmacopeas desde el siglo pasado,²⁹ como es el caso del “chaparro amargoso” (*Castela tortuosa*) que se utiliza como un sustituto de la emetina en el tratamiento de las infecciones amibianas,^{12,13} y del “hombrón” u “hombre grande” (*Quassia amara*) cuya madera es utilizada para combatir las fiebres.³⁰

Muchas especies de esta familia, por ejemplo *Quassia amara* y *Picrasma excelsa*, se aprecian desde el siglo pasado por contener sustancias amargas. Sin embargo, no fue sino hasta los años sesenta, con ayuda de la espectroscopía de RMN, que se pudo establecer la estructura de los primeros compuestos aislados de esta familia, la quasina y la neoquasina.¹⁶

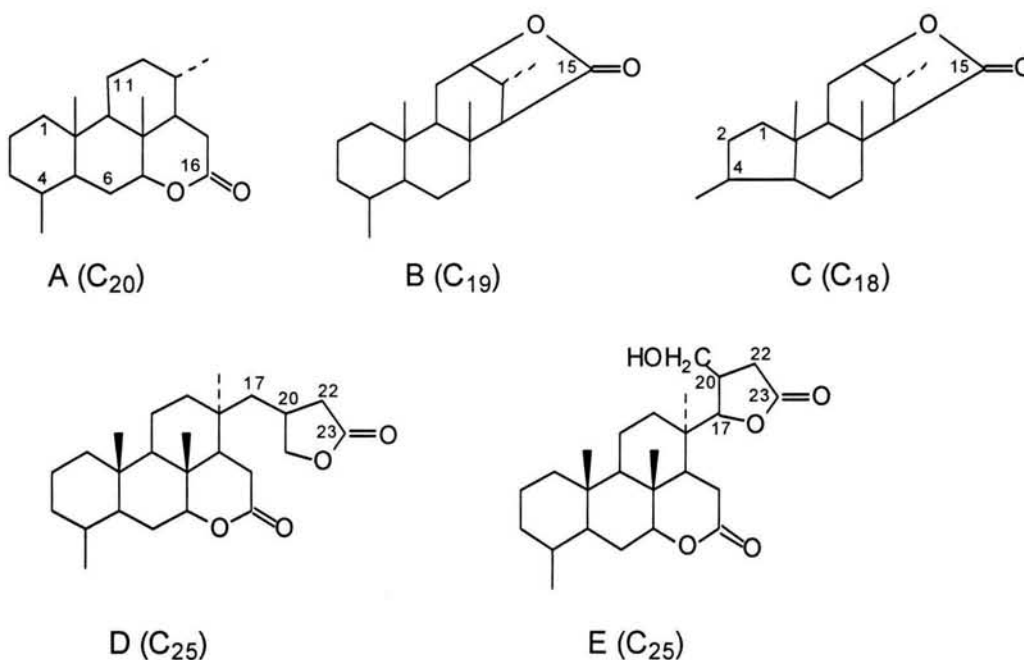


Quasina



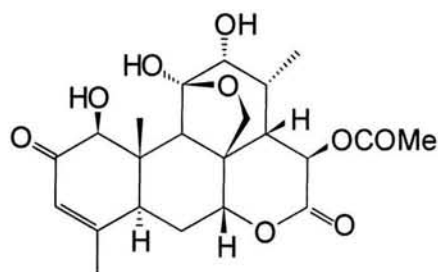
Neoquasina

Investigaciones posteriores demostraron la presencia de sustancias, todas ellas caracterizadas por un sabor amargo y estructuralmente relacionadas, a las cuales se les conoce como simaroubolidanos o quasinoídes. Estos terpenoides presentan como característica estructural la polioxigenación del esqueleto hidrocarbonado, en forma de grupos lactónicos, carbonilos e hidroxilos, además de exhibir cinco tipos de esqueletos o núcleos terpénicos básicos (A-E):

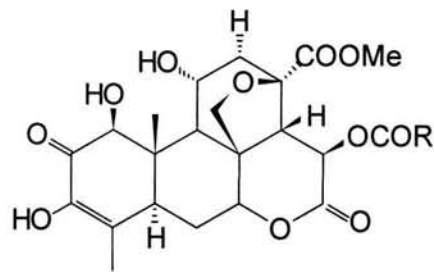
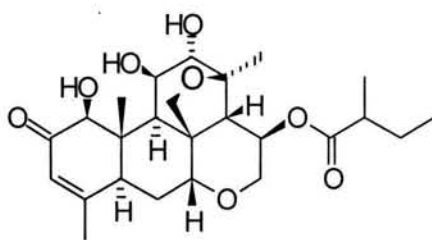


La mayoría de los quasinoídes están constituidos por veinte átomos de carbono y presentan el esqueleto A. El interés por este tipo de compuestos se ha incrementado debido a que un gran número de ellos posee diversas actividades biológicas como las siguientes: amebicida, antipalúdica, antiinflamatoria, antileucémica, antiviral, e insecticida.¹⁶⁻¹⁸ Por ejemplo, los extractos orgánicos totales de *Brucea javanica*,^{6,19,21} *Ailanthus altissima*,¹⁹ *Simaba cedron*,¹⁹ *Simarouba amara*,²⁰ *Eurycoma longifolia*^{6,22} y *Picrolemma pseudocoffea*,²³ entre

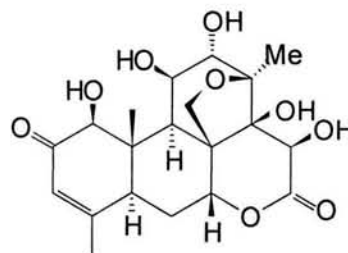
otras, presentan actividad antipalúdica *in vitro*; y una gran cantidad de los quasinoídes constitutivos de estas especies, entre los que se encuentran el brusatol, la bruceantina, la ailantona, la bruceína D y la simalikalactona D, han demostrado una actividad antipalúdica selectiva (CI_{50} = 0.003, 0.0008, 0.009, 0.015, 0.0009 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente)²⁴ a la cual pueden atribuirse las propiedades medicinales de sus fuentes naturales.^{6,10} Además de la actividad antipalúdica, los quasinoídes también han mostrado una potente actividad amebicida como la simalikalactona D (0.05 $\mu\text{g/mL}$) y la bruceantina (0.02 $\mu\text{g/mL}$).¹⁰



Halocantona

Bruceantina R= -CH=C(Me)CHMe₂Brusatol R= -CH=CMe₂

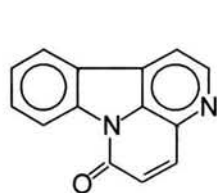
Simalikalactona D



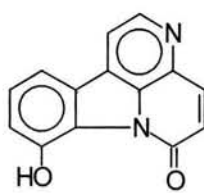
Bruceína D

De algunos géneros de esta familia, particularmente de *Picrasma*, *Hannoa*, *Ailanthus* y *Eurycoma*, también se han aislado varios alcaloides con núcleos

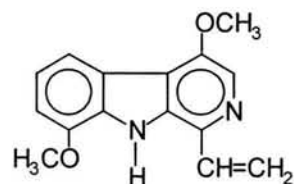
estructurales de β -carbolina y cantin-6-ona,³¹⁻⁴³ algunos ejemplos se ilustran a continuación:



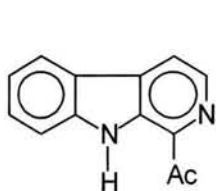
Cantin-6-ona



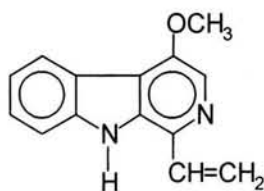
8-Hidroxicanti-6-ona



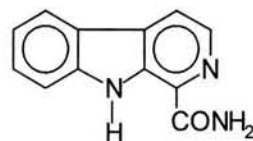
Dehidrocrenatidina



1-Acetil- β -carbolina

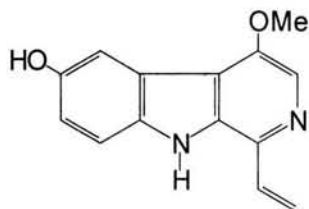


Dehidrocrenatina

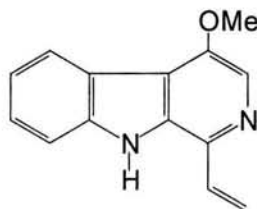


1-carbamoil- β -carbolina

Alcaloides como la 4-metoxi-1-vinil- β -carbolina y su análogo 6-hidroxilado, han desarrollado una actividad antipalúdica en pruebas *in vitro*.¹⁸



6-hidroxi-1-vinil- β -carbolina



4-metoxi-1-vinil- β -carbolina

2.2. Etnobotánica del género *Picramnia*.

El género *Picramnia* había sido considerado como el más grande y complejo de la familia Simaroubaceae.^{44,45} Recientemente, se ha propuesto promoverlo a una nueva categoría taxonómica, la familia Picramniaceae, dadas las diferencias morfológicas y quimiotaxonómicas que presentan las especies que la constituyen

(*Picramnia* y *Alvaradoa*) con relación a las otras incluidas en los distintos géneros de las simarubáceas.^{46,47}

Picramnia comprende cuarenta especies distribuidas a lo largo del trópico americano, desde Florida hasta el norte de Argentina y Paraguay,^{44,45} incluyendo varias especies que han sido muy apreciadas en la medicina tradicional por sus propiedades estimulantes del apetito y curativas de diversos padecimientos, como son las afecciones gástricas e intestinales, las fiebres intermitentes, las úlceras en la piel, así como para tratar enfermedades venéreas, erisipelas y paludismo.^{25,26,28,48,49} Por ejemplo, la decocción de la corteza o la raíz de *P. carpintera*, llamada corteza amarga en Costa Rica y Panamá, se utiliza como tónico para estimular el apetito y facilitar la digestión, también como febrífugo; *P. pentandra*, nativa del sur de Florida, las islas del Caribe, Venezuela y Colombia, se ha utilizado en la misma forma para tratar el dolor de estómago y las diarreas, además se emplea como sustituto de la quinina en el tratamiento del paludismo; *P. gracilis*, procedente de Venezuela, fue empleada por los indígenas para aliviar el dolor de estómago y mareos;⁵⁰ *P. pistaciaefolia*, también conocida como “cáscara amarga” en la región del estado de Oaxaca, es usada como remedio para la sífilis;⁵¹ *P. antidesma* llamada comúnmente “chilillo” en el estado de Chiapas y “quinina” en Honduras, la corteza se emplea, además del tratamiento de fiebres intermitentes, afecciones gástricas e intestinales, para combatir el paludismo y como remedio contra la erisipela y las enfermedades venéreas, siendo objeto de comercio tanto en México como en América Central.^{25,26,51-53}

2.3. Descripción del material vegetal de estudio

El presente trabajo de investigación fitoquímica incluye tres especies del género *Picramnia*: *P. antidesma* Swartz, *P. hirsuta* W.W. Thomas y *P. xalapensis* Planch, cuyas características botánicas se describen a continuación.

2.3.1 *Picramnia antidesma*

Picramnia antidesma es una planta nativa del sur de México, Belice, Honduras, Guatemala, Cuba y Jamaica. En México, se encuentra distribuida principalmente en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz, donde es conocida comúnmente como "chilillo". Esta especie es un arbusto o árbol usualmente de 6 a 9 metros de altura cuyas ramas jóvenes presentan, a menudo, vellosidades con hojas alternas imparipinadas (hojas compuestas en forma de pluma de ave y con un número impar de folíolos los cuales se insertan a lo largo del ráquis que tiene en el extremo un foliolo terminal) usualmente de 7 a 13 folíolos ya sea ovaladas u oblongovaladas de 2.5-14.0 cm de largo y de 1.5-6.0 cm de ancho; sus flores son dioicas y pequeñas de color blanquecino verdoso o amarillentas; sus frutos son de forma elipsoidal de aproximadamente 1.5 cm de largo de un color rojo encontrándose en forma de inflorescencia.^{49,51,52,54,55}

El uso tradicional que se le ha dado, tanto a las hojas como a la corteza de esta planta es como remedio casero contra la malaria y las afecciones estomacales e intestinales. En Jamaica, se continúa utilizando para el tratamiento de las encías de los bebés cuando les brotan los dientes, también está indicado contra las enfermedades venéreas, cólicos, fiebres intermitentes y úlceras en la piel; además, se tiene conocimiento de que en el siglo XVIII,⁵⁶ la corteza se

exportaba de América a Europa donde era utilizada en el tratamiento de enfermedades venéreas y erisipelas.^{26,49,51-53}

2.3.2 *Picramnia xalapensis*

Picramnia xalapensis es un arbusto escaso de follaje perenne, de 2 a 3 m de altura, que crece en los bosques templados y húmedos de la zona centro del estado de Veracruz; posee hojas compuestas lanceoladas de 1.5 a 3.5 cm de longitud con una corteza áspera y amarga, presenta una inflorescencia muy pequeña con panículas en espiga o rama, y su fruta es una baya también pequeña.^{51,57} No existe información de aplicaciones terapéuticas sobre esta especie.

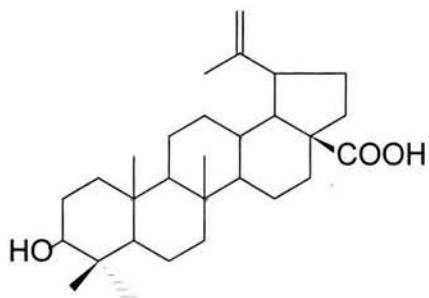
2.3.3 *Picramnia hirsuta*

La localización de *Picramnia hirsuta* está restringida a la selva húmeda del Istmo de Tehuantepec, encontrándose desde Catemaco, Ver., hasta la región de Uxpanapa, entre los estados de Oaxaca y Veracruz. Esta especie es un árbol dioico de 2 a 7 m de altura, la mayor parte de su superficie es velluda (los filamentos miden de 1 a 3 mm de largo), sus hojas se encuentran en forma alternada y, tanto su inflorescencia como sus frutos, se distribuyen en forma de racimos colgantes.⁵⁸ Para esta especie no se cuenta con información sobre usos en la medicina tradicional.

2.4. Antecedentes fitoquímicos del género *Picramnia*

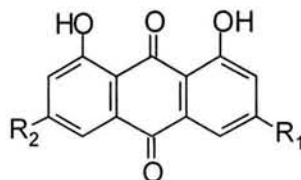
A pesar de ser escasos los estudios fitoquímicos que se han realizado con las especies de este género, se han logrado identificar metabolitos de tipo antraquinónico principalmente, aunque también se ha conseguido encontrar algunos triterpenos y cumarinas sencillas como la 7-hidroxycumarina.

En 1972, de la corteza de *P. pentandra*, Herz y colaboradores aislaron ácido *epi*-betulínico,⁵⁹ y de *P. sellowii*, se aislaron las antraquinonas crisofanol, emodina y parietona, además de los ácidos betulínico, 3-epibetulínico, y benzoico.^{60,61}



Ácido betulínico

De la corteza, hojas y tallo de *P. parvifolia* se lograron aislar crisofanol, parietona, emodina, aloe-emodina y reinina. Por la similitud de compuestos presentes en los extractos de esta especie, los autores proponen que ésta puede ser usada como un sustituto de la cáscara sagrada, *Rhamnus purshiana* (Rhamnaceae), la cual se utiliza como un laxante.⁶²



- crisofanol: R₁ = CH₃, R₂ = H
- emodina: R₁ = OH, R₂ = CH₃
- parietona: R₁ = OCH₃, R₂ = CH₃
- aloe-emodina: R₁ = CH₂OH, R₂ = H
- reinina: R₁ = COOH, R₂ = H

De las hojas de *P. macrostachys* se aislaron crisofanol y parietona, además, el extracto acuoso liofilizado mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* β -hemolítico, y una ligera actividad contra *Candida albicans*.⁶³

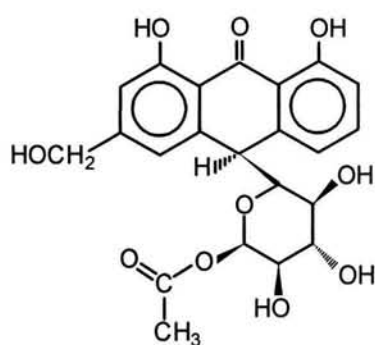
Del estudio realizado tanto a la raíz como al tallo de *P. xalapensis* se aislaron crisofanol, β -sitosterol y 7-hidroxicoumarina,⁶⁴ mostrando el extracto metanólico del tallo, principalmente, actividad antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.⁶⁵

De *P. hirsuta* se logró el aislamiento de crisofanol, emodina, β -sitosterol, 7-hidroxicoumarina y una oxantrona nueva con una estructura del tipo de emodina C-glicósido a la que se le llamó mayósido.⁶⁶ Los extractos del tallo de esta especie mostraron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* y *Bacillus subtilis*.⁶⁷

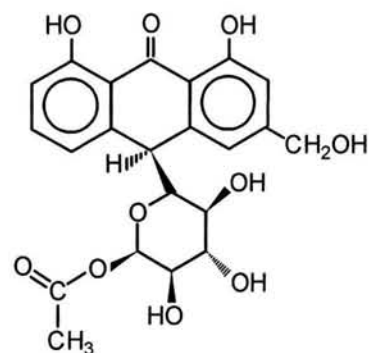
Del extracto metanólico de las hojas de *P. antidesma ssp. fessonina*, mediante un fraccionamiento biodirigido usando células KB y ensayos de toxicidad para las larvas del crustáceo *Artemia salina*, se aislaron tres compuestos nuevos con una estructura del tipo aloe-emodina C-glicósido, los picramniósidos A, B y C, además de aloe-emodina y su antrona;⁶⁸ sin embargo, no se determinó si estos metabolitos eran los responsables de la actividad citotóxica mostrada por la fracción de donde se aislaron.

Del estudio de los extractos del tallo así como de la raíz de esta especie, *P. antidesma*, se lograron identificar crisofanol, emodina y su glucósido, aloe-

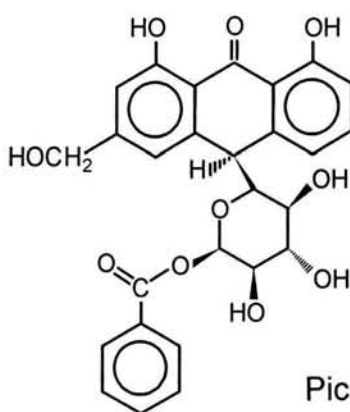
emodina, 7-hidroxycoumarina, β -sitosterol y su glucósido, mayósido y su isómero sarósido,⁶⁹ estos últimos compuestos de esqueleto semejante a los aislados de la hoja solo que éstos son derivados oxantrónicos de emodina C-glicósido, además de que algunos de los extractos produjeron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus pyogenes*.⁷⁰



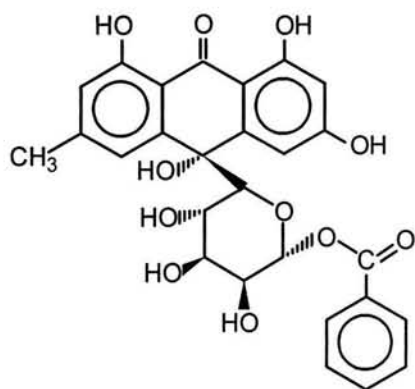
Picramniósido C



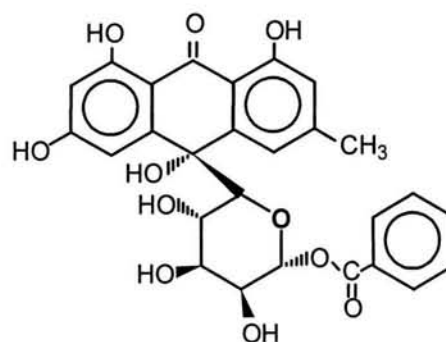
Picramniósido B



Picramniósido A



Mayósido



Sarósido

Recientemente, de *P. teapensis* se aislaron oxantronas y antronas con una estructura del mismo tipo de los aislados de raíz y tallo de *P. antidesma*, emodina C-glicósido, realizando, también, evaluaciones antifúngicas^{71,72} con algunos de ellos. Igualmente, en *P. sellowii* se encontraron ácidos ursólico y oleanólico y los picramniósidos A y C.⁷³

El reporte más reciente de un estudio fitoquímico sobre el género *Picramnia* trata sobre el aislamiento de dos antronas-C-glicósidos (picramniosidos G y H), dos oxantronas C-glicósidos (mayósidos D y E) y una benzantrona de hojas y raíz de la especie *P. latifolia* colectada de Perú,⁷⁴ los cuales no poseen actividad citotóxica.

De acuerdo a lo anterior, resulta evidente que la presencia de compuestos antraquinónicos es una característica de estas especies. Compuestos tan conocidos como el crisofanol, la emodina y la aloe-emodina poseen diversas actividades biológicas, por ejemplo, larvicida,⁷⁵ antibacteriana,⁷⁶ antiviral,⁷⁷⁻⁸¹ genotóxica,⁸²⁻⁸⁷ antitumoral,^{88,89} antiinflamatoria,⁹⁰ antimutagénica,⁹¹⁻⁹³ anticancerígena,⁹⁴⁻⁹⁹ y tuberculostática;¹⁰⁰ además, se ha observado que las antronas han sido eficaces contra la psoriasis.¹⁰¹

2.5. Biosíntesis de las antraquinonas.

Las rutas mediante las cuales se realiza la biosíntesis de las antraquinonas son dos: policétidos y ácidos siquímico-mevalónico.¹⁰²⁻¹⁰⁵

2.5.1 Policétidos: Un gran número de antraquinonas tiene su origen en la formación de ciclos a partir de β -policetoésteres, como se puede deducir de la

estructura de 1,8-dihidroxiantraquinonas, tal como el crisofanol, la emodina y la islandicina (Fig. 1). La formación de policétidos, como la biosíntesis de los ácidos grasos, involucra la condensación de acetil-CoA con el número apropiado de unidades de malonil-CoA, la cual generalmente se deriva de la carboxilación de la acetil-CoA aunque también se puede derivar del ciclo del ácido cítrico, vía el intermediario oxaloacetato.

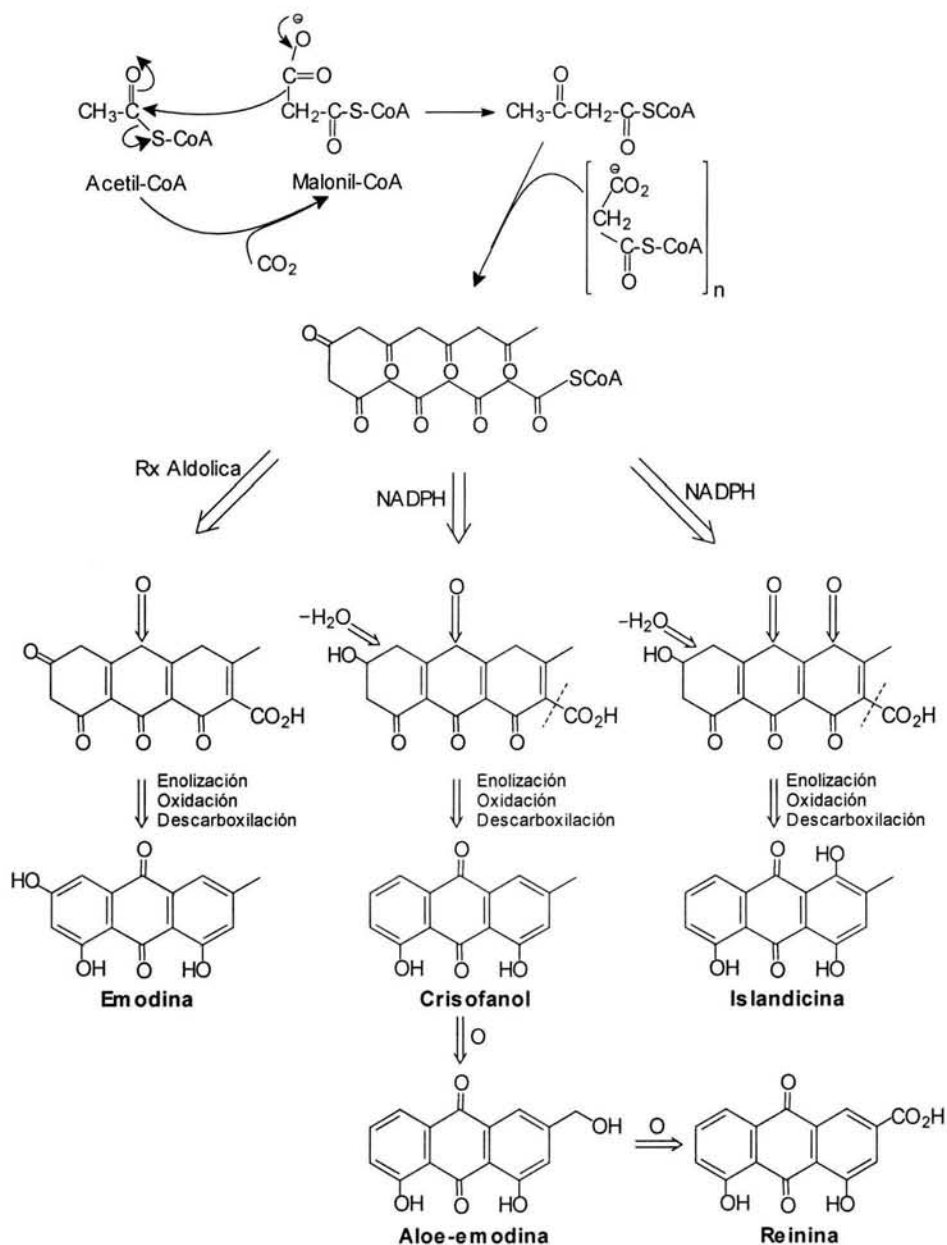


Fig. 1. Ruta biosintética de las antraquinonas a partir de policétidos.

En el caso de las antraquinonas, se necesita la formación de un octacétido, así como de las enzimas y cofactores que intervienen en ello como: NADP, NADPH, CoA, etc. En la figura 1 se muestra que, después de tres condensaciones tipo aldólicas, se obtienen tres posibles intermediarios, los cuales derivan, por el grado de oxidación en cada estructura, en antraquinonas diferentes después de reacciones secundarias de enolización, deshidratación, oxidación y descarboxilación. Emodina, crisofanol, aloe-emodina y reinina forman la base de derivados antraquinónicos encontrados en extractos de plantas de los géneros *Cassia*, *Rhamnus*, *Rheum* y *Aloe*, cuyos usos como laxante son muy conocidos.

Las antraquinonas libres tienen poca actividad terapéutica y necesitan estar glicosiladas para solubilizarse en agua y ejercer su acción laxante, como los compuestos conocidos como cascarósidos (*Rhamnus purshianus*) y senósidos (*Cassia senna*). Los cascarósidos presentan uniones O-glucosa, así como C-glucosa (Fig. 2) y, probablemente, derivan de estructuras intermediarias tipo antrona, las cuales actúan como sustrato para la O- y C-glucosilación empleando la UDPGlu (difosfato de uridina y glucosa) como donador de la molécula de glucosa.

Muchas otras antraquinonas presentan un origen mixto ya que se forman a través de las rutas del siquimato-mevalonato y, por lo tanto, no contienen el patrón de oxigenación en *meta* (alternación 1,3 de las posiciones oxigenadas) característico de las que derivan de policétidos. Así, con frecuencia éstas sólo presentan una posición oxigenada del anillo antraquinónico.

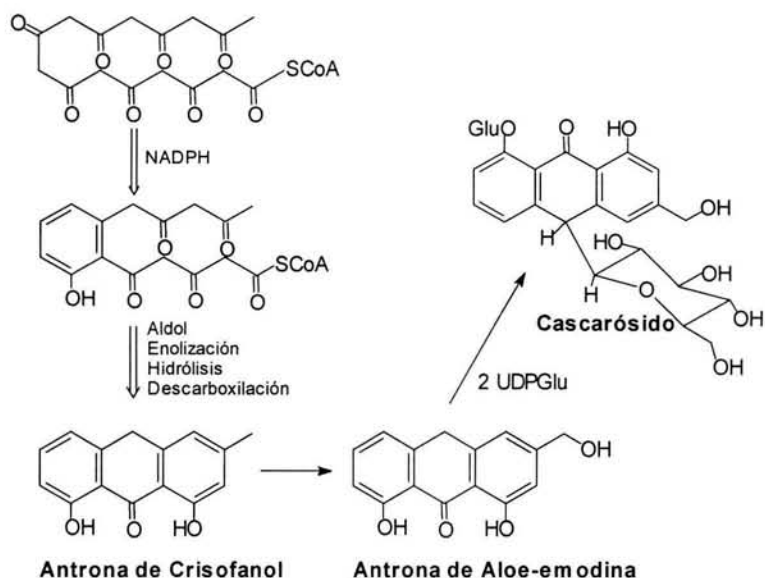


Fig. 2. Incorporación de dos moléculas de glucosa a una antrona.

2.5.2. Ácidos siquímico-mevalónico: Esta ruta es la más común en plantas superiores, y tiene su origen en el metabolismo de los carbohidratos, iniciándose con la condensación estereoespecífica entre el fosfoenolpiruvato y la D-eritrosa-4-fosfato para dar el ácido 3-desoxi-D-arabino-7-fosfato heptulosónico (DAHP), el cierre del ciclo en DAHP produce el ácido dehidroquinico (DHQ), el cual genera al ácido siquímico. La condensación de este último con fosfoenolpiruvato y posterior eliminación de ácido fosfórico, produce el ácido corísmico. Este ácido se isomeriza a isocorísmico, el cual es atacado por el anión producto de la reacción entre el ácido 2-oxo-glutárico y la tiamina difosfato (TPP), posterior eliminación de ácido pirúvico y deshidratación produce el ácido o-succinilbenzóico. Éste se activa con la CoA y se cicla al ácido 1,4-dihidroxi-2-naftóico (DHNA), el precursor de las naftoquinonas. La isoprenilación en las posiciones C-2 o C-3 con dimetialildifosfato (DMAPP) lleva a las antraquinonas (Fig. 3). Como puede notarse, los

sustituyentes oxigenados normalmente no están presentes en las posiciones alternas 1,3 correspondientes a la ruta de los policétidos. Este es el caso de las antraquinonas aisladas de Rubiaceae.¹⁰⁶

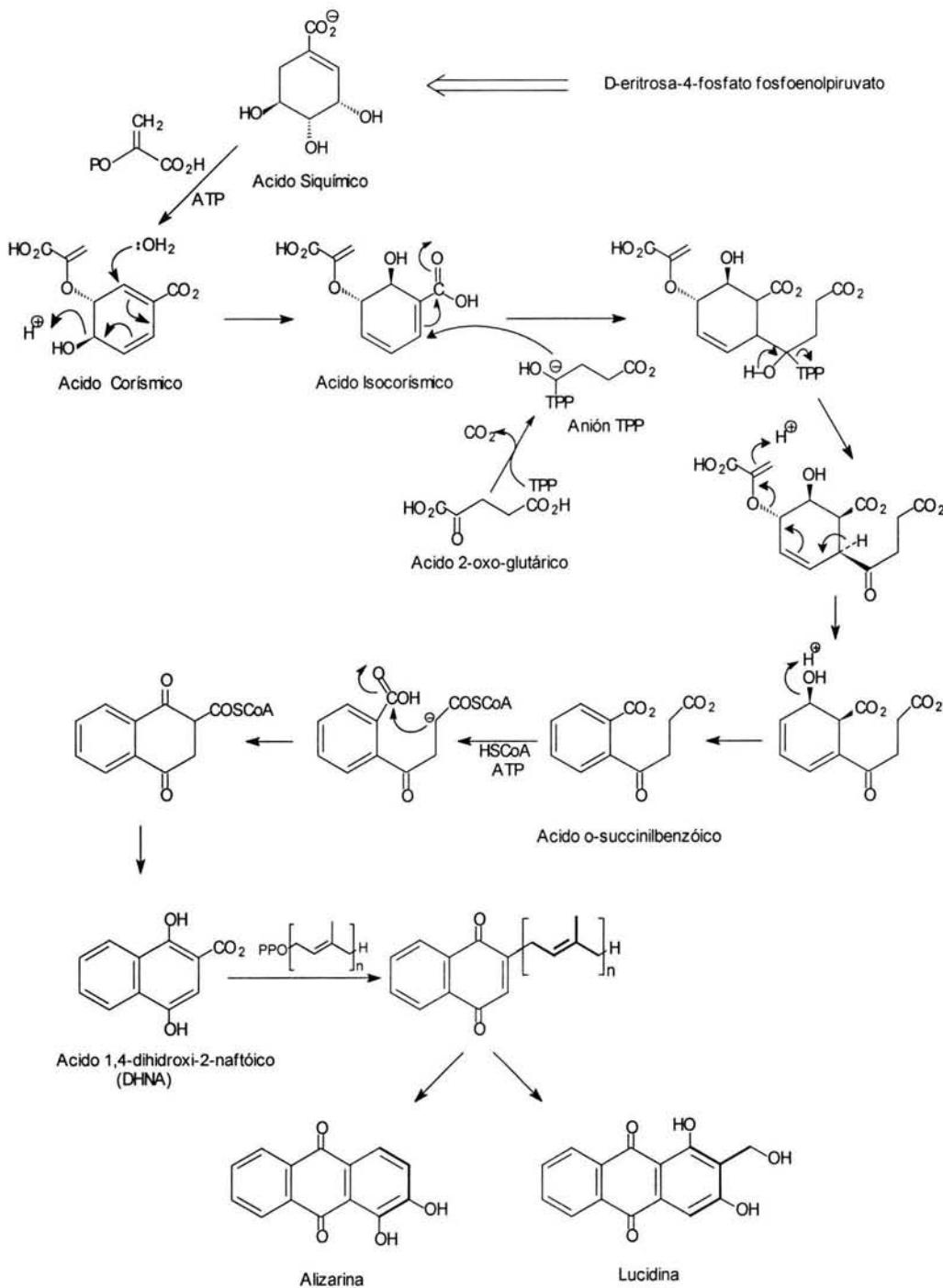


Fig. 3. Origen biogénico mixto de las antraquinonas mediante la ruta de los ácidos siquímico-mevalónico.

2.6. Propiedades espectroscópicas de antraquinonas.

El establecimiento de la estructura molecular de compuestos como las antraquinonas está basado tanto en datos químicos como espectrales. Por ejemplo, hidroxiantraquinonas dan un resultado positivo en la reacción de Bornträger con soluciones alcalinas produciendo un color rojo para 1,8-dihidroxiantraquinonas (emodina) y un color azul-violeta para 1,2-dihidroxiantraquinonas (alizarina).

Las señales a campo bajo (cerca de 11-12 ppm) pueden ser indicativas de hidroxilos en las posiciones 1 y 8 de un núcleo antraquinónico; de igual forma, la presencia de un grupo metilo (3H) como sustituyente en el anillo antraquinónico, puede deducirse de una señal simple (3H) centrada aproximadamente en 2.5 ppm, en el espectro de RMN-¹H. En los espectros de RMN-¹³C, las señales entre 190-180 ppm corresponden a carbonilos de las posiciones 9 y 10 del núcleo antraquinónico, la señal característica de una oxantrona y de una antrona (del carbono 10) se observa alrededor de 76 ppm y de 44 ppm, respectivamente. Las bandas de absorción en el IR, por ejemplo, a 3330, 1680, 1640 y 1600 cm⁻¹ son indicativas de hidroxilos, carbonilos conjugados y dobles enlaces, respectivamente.^{102,107,108}

2.7. Métodos usados para establecer la configuración relativa y absoluta.

La asignación correcta de la configuración absoluta de materiales quirales es de fundamental importancia en muchas áreas de la química y sobre todo en el desarrollo de compuestos farmacológicamente activos.

El establecimiento total de la estructura química de un metabolito secundario se puede realizar mediante diversos estudios espectroscópicos y espectrométricos (RMN, IR, UV, MS, etc.). Sin embargo, cuando existen carbonos quirales en la molécula existe la posibilidad de encontrar estereoisómeros y, por lo tanto, para determinar perfectamente cual es la estructura que corresponde al metabolito en cuestión pueden emplearse, además de los métodos antes mencionados, técnicas degradativas, preparación de derivados con reactivos quirales, análisis conformacional mediante mecánica molecular en conjunto con la difracción de rayos X, etc.

Se dice que dos compuestos son estereoisómeros cuando tienen la misma fórmula molecular y la misma conectividad entre sus átomos, pero se diferencian en la forma en que sus grupos se disponen en el espacio. Dos estereoisómeros para los que todas las distancias interatómicas coinciden, pero cuyos grupos están colocados en una secuencia diferente respecto a un elemento central, se denominan enantiómeros, ambos se comportan como un objeto y su imagen en el espejo y, por lo tanto, no son superponibles. La propiedad de un objeto de ser no superponible a su imagen en el espejo se denomina quiralidad (del griego "quiros"=mano). En la práctica, la causa más frecuente de quiralidad es la existencia en la molécula de centros estereogénicos, es decir, átomos que presentan cada uno de sus enlaces dirigidos hacia un grupo diferente, como en un "carbono asimétrico" el que está unido a cuatro grupos distintos.

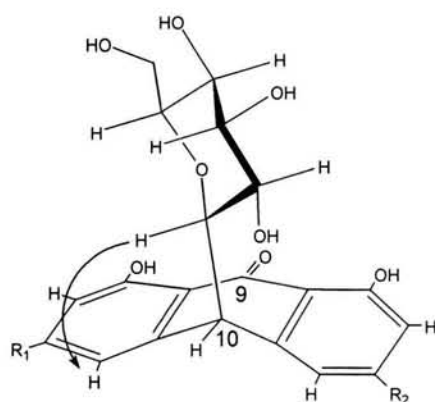
Conocer la configuración absoluta de los enantiómeros implica conocer exactamente la disposición de los grupos alrededor de un grupo estereogénico. La configuración se designa con los términos *R* ó *S*, siguiendo las normas de Cahn,

Ingold y Prelog para clasificar los grupos unidos al centro estereogénico. La configuración absoluta puede determinarse por técnicas espectropolarimétricas aunque el único método absolutamente fiable es una técnica especial de difracción de rayos X debida a Bijvoet.^{109,110} También es posible utilizar métodos de correlación química, transformando un compuesto de configuración desconocida en otro de configuración conocida, a través de reacciones cuyo curso estereoquímico sea también conocido y no afecten los centros estereogénicos, o lo hagan de una forma predecible.^{111,112}

Las propiedades quirópticas de una sustancia se originan de la interacción no destructiva con la radiación anisotrópica (luz polarizada); estas propiedades pueden diferenciar entre dos enantiómeros de un compuesto quiral.¹¹³ A continuación se describe la metodología que se siguió para establecer la conformación y configuración absoluta de los metabolitos aislados en el presente estudio.

Manitto y colaboradores¹¹⁴ establecieron la configuración absoluta del par diastereoisomérico de aloínas A y B, mezcla de antronas conocida como "barbaloina" y que, se presume, es el principio laxante de varias especies de *Aloe*. Este grupo de investigación se basó en los datos espectroscópicos de RMN-¹H, experimentos sobre el efecto nuclear de Overhauser (nOe) de protones específicos así como las analogías que presentaron los espectros de dicroísmo circular (DC) del par de epímeros, consideraron que, de acuerdo con la constante de acoplamiento entre los protones H-1' y H-10 de 2.00 Hz, la conformación preferida para estos compuestos en solución es la que se representa en la figura 4. En esta conformación el anillo central del sistema antracénico adopta una

conformación de “sobre” con el sustituyente voluminoso (glucosa) en posición quasi-axial para evitar las interacciones estéricas con los hidrógenos “peri” en posiciones C-4 y C-5.



aloína A: $R_1 = H$, $R_2 = CH_2OH$

aloína B: $R_1 = CH_2OH$, $R_2 = H$

Fig. 4. Estructura de las aloínas A y B

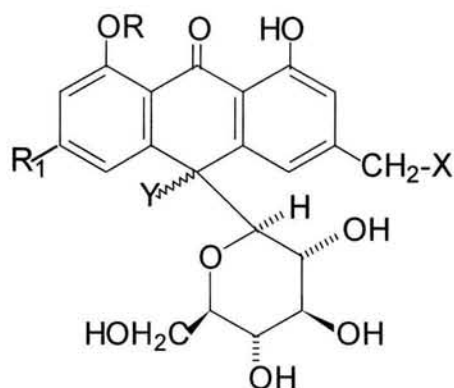
También estimaron que el fragmento glucosilo pasa la mayor parte del tiempo sobre el plano del antraceno con el oxígeno del piranosilo cercano al carbonilo C-9, de tal manera que los diferentes efectos nucleares de Overhauser (nOe) observados pudieron utilizarse para determinar la configuración de C-10; de hecho, los nOe entre H-1' con H-5 en la aloína A y con H-4 en la aloína B, mostraron consistencia con la conformación preferida para cada epímero (Fig. 4) de tal forma que la aloína A resultó ser 10*S* y la aloína B, 10*R*. Por otra parte, los espectros de DC de ambas aloínas reflejaron claramente la configuración opuesta de C-10 y, por lo tanto, el signo alterno del efecto Cotton en los rangos de 270-310 nm y 310-340 nm así como el nOe mostrado por el protón anomérico H-1' con los hidrógenos H-4 y H-5 son de valor diagnóstico para determinar la configuración de las 10-C-β-D-glucopiranosilantrones sustituidas asimétricamente.

De manera semejante, Rauwald y Lohse¹¹⁵ establecieron la configuración absoluta de las 10-hidroxi aloínas A y B como 10*R* y 10*S*, respectivamente, mediante el análisis estructural por cristalografía de rayos X de los derivados octaacetilados del par diastereoisomérico y la confirmación por comparación de espectros de DC con los análogos aloínas A y B, demostrando con ello la utilidad de los espectros de DC para establecer futuras configuraciones de metabolitos con estructuras similares a las antronas-C-glicósidos y oxantronas-C-glicósidos.

Existen varias referencias de determinaciones de configuraciones absolutas mediante el uso de espectros de DC de metabolitos con estructuras parecidas a las aloínas, en la tabla 1 se muestran algunos ejemplos de derivados antraquinónicos cuyas configuraciones absolutas se realizaron por comparación de espectros de DC.

Compuesto	Efecto Cotton	λ (nm)	Estereoquímica para C10
aloína A ¹¹⁴	+	290	10 <i>S</i>
aloína B ¹¹⁴	-	290	10 <i>R</i>
hidroxíaloína A ¹¹⁵	+	300	10 <i>R</i>
hidroxíaloína B ¹¹⁵	-	300	10 <i>S</i>
casarósido A ¹¹⁶	-	310	10 <i>S</i>
casarósido B ¹¹⁶	+	310	10 <i>R</i>
casarósido C ¹¹⁶	-	310	10 <i>S</i>
casarósido D ¹¹⁶	+	310	10 <i>R</i>
casarósido E ¹¹⁷	-	310	10 <i>R</i>
casarósido F ¹¹⁷	+	315	10 <i>S</i>

Tabla 1. Datos de DC para antronas y oxantronas naturales.



R	R ₁	X	Y	
H	H	OH	H	aloínas A y B
H	H	OH	OH	hidroxialoínas A y B
β -D-Glu	H	OH	H	cascarósidos A y B
β -D-Glu	H	H	H	cascarósidos C y D
β -D-Glu	OH	H	H	cascarósidos E y F

2.8. Antecedentes del paludismo.

El paludismo, como se describe previamente en la Introducción, es una enfermedad que se localiza, preferentemente, en áreas tropicales y subtropicales del mundo; en la actualidad es endémica en cerca de cien países de esas regiones. Esta infección parasitaria es una de las enfermedades que produce el mayor número de muertes por año, afectando alrededor de 300 millones de personas y produciendo entre 0.5 y 2.5 millones de defunciones anuales. El 90% de las muertes ocurren en África, siendo la mayoría niños menores de cinco años de edad.^{1,2}

El paludismo humano es causado por protozoarios del género *Plasmodium* existiendo cuatro especies que producen la enfermedad: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*; ésta se transmite por el piquete de mosquitos hembras del género *Anopheles*, siendo mayor el riesgo de contagio al final de la temporada de lluvia y, principalmente, entre la puesta del sol y el amanecer. Es una enfermedad febril con un periodo de incubación del parásito de siete días o más, la forma más severa es causada por *P. falciparum* (baste mencionar que más del 85% de los casos de paludismo en seres humanos y gran parte de las muertes por ese origen son causados por esta especie de plasmodio), produciendo síntomas parecidos inicialmente, a los de una gripe, es decir, fiebre, escalofrío, dolor de cabeza y muscular, náusea, diarrea, fatiga, dolor de garganta o tos. Si el paciente no es atendido, las manifestaciones se vuelven más severas ya que se presentan complicaciones como insuficiencia renal aguda, convulsiones generalizadas, colapso circulatorio seguido por coma y, finalmente, culmina con la muerte.

Un diagnóstico oportuno así como un tratamiento eficaz pueden ser la diferencia entre la vida y la muerte. La parasitosis producida por las otras tres especies *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, aunque raramente es fatal, es causa de una morbilidad considerable.³

El ciclo de vida del *Plasmodium* (figura 5) atraviesa varias etapas de desarrollo en el huésped vertebrado (esporozoitos, etapas asexuales exo-eritrocíticas e intraeritrocíticas y gametocitos) y otras más en el invertebrado (gametos, cigoto, oocisto, oocineto, y esporozoito) cada etapa expresa proteínas específicas motivando que su estudio se vuelva muy complejo, pero al mismo tiempo permite la acción farmacológica en varios puntos de éste.¹¹⁸ La fase sexual

que parasita a los vertebrados se denomina esquizogonia y la fase sexual en el mosquito se llama esporogonia.

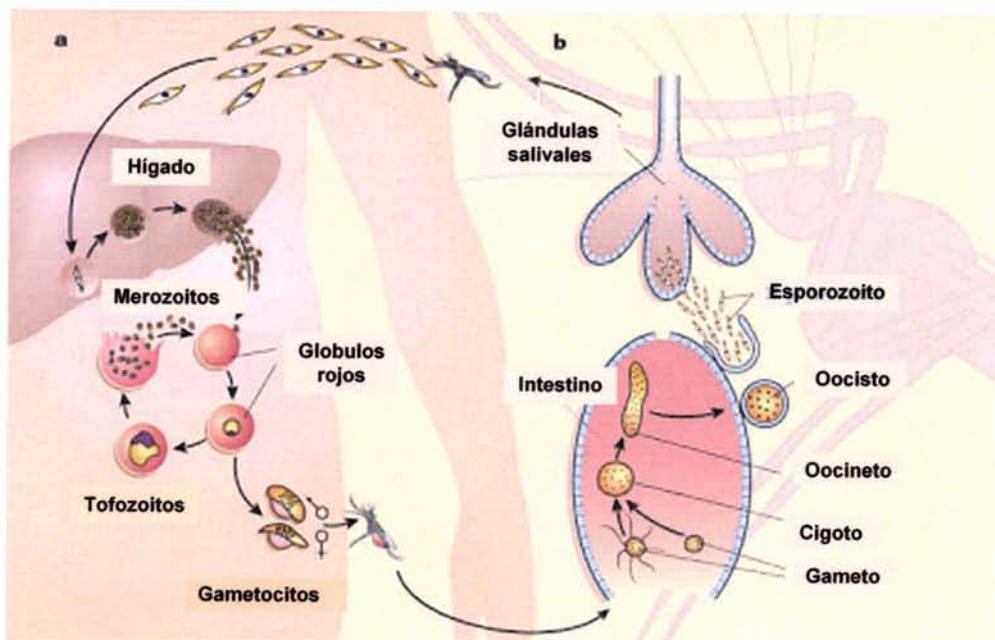


Figura 5. Ciclo de vida del *Plasmodium falciparum*.

Una vez infectado el huésped humano, el parásito invade y se desarrolla en los hepatocitos (fase tisular primaria), los cuales más tarde revientan liberando cientos de merozoitos; éstos invaden rápidamente los eritrocitos (fase eritrocítica) multiplicándose de trofozoitos a esquizontes antes de reventar y liberar más merozoitos que vuelven a invadir eritrocitos. La infección parasitaria se expande aproximadamente diez veces por ciclo asexual. Algunos parásitos intraeritrocíticos se desarrollan en gametocitos los cuales, al ser liberados, son tomados por el mosquito vector al momento de picar; es en el estómago del insecto donde se multiplican sexualmente, se desarrollan en el intestino y glándulas salivales, transmitiendo el esporozoito a otro hospedero humano cuando vuelve a picar.

Tanto *P. falciparum* como *P. malariae* sólo tienen un ciclo de invasión de hepatocitos y después la multiplicación se limita a los eritrocitos. Las otras especies tienen una etapa hepática latente que causa infecciones recurrentes y recaídas después de la recuperación aparente del huésped desde el contagio inicial.

Actualmente, los fármacos usados para tratar el paludismo son los arilaminoalcoholes, antagonistas del folato, antibióticos y los nuevos derivados de artemisinina; la mejor elección depende de la disponibilidad del medicamento, del nivel de inmunidad de los pacientes, de los efectos secundarios y del costo del fármaco, así como del sitio donde la infección fue adquirida, debido al patrón de resistencia.³

Los antipalúdicos pueden clasificarse de acuerdo a la etapa del ciclo vital del parásito que atacan y del objetivo clínico correspondiente en: esquizonticidas tisulares utilizados en la profilaxia causal, esquizonticidas tisulares utilizados para evitar recaídas, esquizonticidas (hemáticos) utilizados en la curación clínica y de supresión, gametocidas y esporonticidas.^{3,119}

2.8.1. Esquizonticidas tisulares utilizados en la profilaxia causal. Estos fármacos actúan contra las formas hícticas primarias del parásito en hígado, evitando así la invasión de los eritrocitos y la transmisión persistente de la infección. El proguanil es un antipalúdico usado para profilaxis causal contra *P. falciparum*, aunque también la primaquina, potencialmente tóxica, se puede emplear con el mismo fin.

2.8.2. Esquizonticidas tisulares utilizados para evitar recaídas. Estos fármacos básicamente actúan sobre las formas latentes de *P. ovale* y *P. vivax* que persisten

después de que pasaron a la circulación las formas hepáticas primarias, y que finalmente maduran invadiendo la circulación y producen una recaída o paludismo recidivante, meses o años después de la infección inicial. Estos esquizonticidas se utilizan en la profilaxis terminal o para la cura radical de infecciones palúdicas recidivantes. La primaquina es el fármaco prototípico utilizado para evitar recaídas que es el término reservado para especificar la infección eritrocítica repetitiva que es causada por plasmodios tisulares latentes.

2.8.3. Esquizonticidas (hemáticos) utilizados en la curación clínica y de supresión. Estos fármacos actúan en las etapas eritrocíticas asexuales de los parásitos del paludismo para interrumpir la esquizogonia eritrocítica y terminar, de esta forma, los ataques clínicos. También producen “cura supresiva” que denota la eliminación completa de los parásitos del cuerpo por medio de terapia ininterrumpida. Con excepción de la primaquina todos los antipalúdicos utilizados en humanos fueron sintetizados por su acción esquizonticida en sangre. Existen los esquizonticidas hemáticos de acción rápida que incluyen los clásicos alcaloides antipalúdicos como cloroquina, quinina y sus derivados, quinidina, mefloquina y halofantrina; la artemisina también pertenece a esta categoría. Los esquizonticidas hemáticos de acción más lenta y menos eficaces incluyen a los antifolatos y antibióticos antipalúdicos y se utilizan junto con equivalentes de acción más rápida.

2.8.4. Gametocidas. Los medicamentos de esta clase actúan contra las formas eritrocíticas sexuales de los plasmodios y así evitan la transmisión del paludismo a los mosquitos. La cloroquina y la quinina poseen actividad gametocida contra *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, en tanto que la primaquina tiene actividad

especialmente potente contra *P. falciparum*. Sin embargo, los antipalúdicos raramente se utilizan en seres humanos sólo por sus acciones gametocidas.

2.8.5. Esporonticidas. Estos fármacos anulan la transmisión del paludismo al evitar o inhibir la producción de oocistos y esporozoitos palúdicos en mosquitos infectados. La cloroquina bloquea el desarrollo normal de los parásitos dentro del mosquito, sin embargo, no se utiliza para este fin.

Los fármacos antipalúdicos también pueden dividirse de acuerdo a sus mecanismos de acción en: desintoxicación del grupo hemo, metabolismo de pirimidina y transporte de electrones, metabolismo del folato, inhibidores de la topoisomeras II, síntesis de proteínas y quelación del Fe(III).¹

2.8.6. Desintoxicación del grupo hemo. El grupo hemo (hemina) de la hemoglobina es tóxico para el parásito por lo que, para evitar esta toxicidad, el parásito lo polimeriza convirtiéndolo en hemozoína o pigmento palúdico. Los antipalúdicos quinonólicos como la cloroquina, la quinina, la mefloquina y la halofantrina actúan bajo este mecanismo. La artemisinina también actúa mediante este mecanismo y frecuentemente se usa en combinación con la mefloquina o tetraciclinas.

2.8.7. Metabolismo de pirimidina y transporte de electrones. La atovacuona parece bloquear la síntesis de pirimidina por inhibición de la cadena respiratoria, aunque también se ha sugerido que inhibe la formación de la hemozoína.

2.8.8. Metabolismo del folato. Las mezclas de sulfonamidas y antifolatos, como la pirimetamina, son ampliamente usadas como antipaludicos debido a que ambos compuestos inhiben la formación del dihidrofolato necesario para la

biosíntesis de las pirimidinas. Un ejemplo de fármaco que actúa mediante este mecanismo es el Fansidar.

2.8.9. Inhibidores de la topoisomerasa II. Se han desarrollado experimentos con inhibidores de la topoisomerasa II como la Pironaridina.¹²⁰

2.8.10. Síntesis de proteínas. Las tetraciclinas como la doxiciclina, se usan para tratar el paludismo, pero por ser de naturaleza lenta, generalmente se emplean en combinación con antipalúdicos como la cloroquina o la quinina de acción más rápida. Se cree que el mecanismo por el que trabajan es inhibiendo la síntesis de proteínas en las mitocondrias.

2.8.11. Quelación del Fe(III). Varios compuestos de Fe (III) poseen actividad antipalúdica *in vitro*, aparentemente actuando como secuestradores del Fe vital para las rutas metabólicas intraeritrocíticas del parásito, o bien formando complejos tóxicos con él. En casos leves y complicados se emplea la desferrioxamina.

La prevención y el tratamiento del paludismo cada vez es más difícil debido, por una parte, a que *P. falciparum* ha aumentado su resistencia a varios antipalúdicos y, por la otra, a la resistencia desarrollada por los mosquitos vectores a los insecticidas empleados para su erradicación. Esto ha frustrado los intentos de erradicar esta enfermedad por quimioterapia, amenazando con volver obsoletos los fármacos antipalúdicos actuales, de tal forma que la resistencia a los medicamentos constituye un problema clínico grave.^{119,121}

Los mosquiteros han demostrado que reducen la incidencia del paludismo severo en muchas áreas, sin embargo, se necesita con urgencia una vacuna efectiva.³ A pesar de las amplias investigaciones realizadas, no se puede predecir

que, en un futuro cercano, pueda obtenerse una vacuna, debido a la gran diversidad genética de los parásitos de *P. falciparum* así como a la compleja e ineficiente respuesta inmune humana. Las dificultades para el desarrollo de la vacuna sugieren que puede ser más práctico desarrollar una vacuna que reduzca los síntomas (antienfermedad) más que prevenir la infección parasitaria. Vacunas de multi-etapas de DNA son los candidatos más probables para entrar en la práctica clínica.

El fracaso en los programas implementados para la erradicación del mosquito así como la evolución alarmante de la resistencia a los medicamentos antipalúdicos más comunes y baratos, ha dejado a la saga el desarrollo de nuevos fármacos, ocasionando que el paludismo continúe afectando a la población más pobre, ya que ésta no cuenta con el acceso a fármacos y artículos necesario para su prevención o curación. Todos estos factores se han combinado para crear un problema grave e inmanejable.

Dada la importancia de combatir el paludismo como una enfermedad de la pobreza, se ha formado una campaña global conocida como "Roll Back Malaria" (RBM), dicha iniciativa consiste en una alianza mundial en la que participan países con paludismo endémico, donantes bilaterales y multilaterales, el sector privado y organizaciones no gubernamentales, esperando lograr una mayor sensibilidad mundial acerca de esta enfermedad, más recursos y un consenso acerca de los instrumentos y las intervenciones prioritarias que se necesitan para combatirla, nombrándose, además, un día específico (25 de abril) como "el día mundial del paludismo".

La cloroquina continua siendo el fármaco antipalúdico de primera elección a pesar de la resistencia significativa que el parásito ha desarrollado contra ella, ya que es barata y de fácil disponibilidad; se emplea en áreas de bajo grado de resistencia y en coadministración con el antibiótico clindamicina y con el antihistamínico clorfeniramina o prometazina. Sin embargo, la quinina administrada en forma intravenosa o intramuscular sigue siendo el fármaco por excelencia para la forma más grave del paludismo. La quinina oral también puede combinarse con un antibiótico para tratar el paludismo leve en áreas de multirresistencia al fármaco.

Los derivados de artemisinina han tenido un impacto clínico importante sobre el tratamiento del paludismo resistente y sobre la incidencia de la enfermedad en áreas de baja transmisión, pero también ha empezado a desarrollar resistencia.

Pocos antipalúdicos prometedores han sido probados clínicamente pero hay una necesidad imperiosa de abaratar medicamentos que sean bien tolerados y que puedan ser usados por periodos cortos como una estrategia para retardar el inicio de la resistencia al fármaco.

Ante la proliferación de cepas de *Plasmodium falciparum* multirresistentes a la colección de fármacos antipalúdicos empleados hoy en día, se ha puesto especial énfasis en el mecanismo de acción de estos medicamentos, ya que dependiendo de la forma como actúan pueden diseñarse compuestos, por síntesis, que tengan mayor efectividad y/o menores efectos secundarios.^{122,123} Así se han sintetizado diversos análogos de cloroquina como las 8-aminoquinolinas,¹²³

4-aminoquinolinas,¹²⁴ 4-anilinoquinolinas,¹²⁵ También se han sintetizado algunos derivados de la artemisinina con mayor actividad antipalúdica *in vitro*.¹²⁶

En virtud de que agentes antipalúdicos como la quinina y la artemisinina se han aislado de especies vegetales, la búsqueda de compuestos efectivos contra cepas de *Plasmodium* resistentes a fármacos se ha enfocado a la información existente sobre los remedios palúdicos de fuentes naturales.⁴ Varias especies vegetales con propiedades antipalúdicas y/o antipiréticas empíricas poseen antraquinonas entre sus metabolitos secundarios. Tal es el caso de *Morinda lucida*,¹ *Morinda elliptica*,¹²⁷ algunas especies del género *Cassia*,^{128, 129} y las especies de *Picramnia*.^{51,52} Sin embargo, la pobre eficacia antipalúdica *in vitro* que han mostrado algunas antraquinonas presupone que no poseen actividad antipalúdica.¹ No obstante, es posible que algunos derivados antraquinónicos sean eficaces contra esta enfermedad, como es el caso de las vismionas H y D aisladas de *Vismia guineensis*,¹¹ ya que se tiene conocimiento sobre las diversas actividades biológicas que varias antraquinonas poseen. (Ver 2.4)

La Naturaleza ha probado ser una buena fuente de estructuras prototipo, pero no en todos los casos éstos son buenos candidatos a fármacos. Las investigaciones de la última década han demostrado que los organismos marinos también pueden ofrecer nuevos modelos estructurales para candidatos a medicamentos antipalúdicos.¹

La publicación reciente del genoma del parásito *Plasmodium falciparum* y del mosquito *Anopheles gambiae*, el que comúnmente transmite el paludismo, aporta nuevas herramientas y revelaciones que pueden facilitar la identificación rápida de blancos hacia el desarrollo de nuevos y más eficaces medicamentos y

vacunas, también puede permitir idear estrategias de control mediante la producción de insecticidas más específicos y menos tóxicos para el hombre.^{130,131}

El conocimiento de los genomas del parásito, del mosquito vector y del hombre, debe aprovecharse para diseñar tratamientos eficaces y novedosos que contribuyan al control y erradicación de esta terrible enfermedad.

3. JUSTIFICACIÓN

Un alto porcentaje de la población hace uso de las plantas como parte de la medicina tradicional para el cuidado de la salud ya sea por su bajo costo, porque no existe medicina alópata en su región o porque actualmente muchas de las enfermedades han manifestado resistencia a los fármacos convencionales.

La familia de las simarubáceas ha sido motivo de diversas investigaciones debido a que diversas especies se emplean en la medicina tradicional de múltiples partes del mundo. Destacan varios géneros porque la mayoría de los metabolitos característicos de esta familia, los quasinoídes, han mostrado actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo*.^{15,132} Los quasinoídes, que se han aislado de las especies usadas para combatir el paludismo, han presentado actividad antipalúdica, por lo que la presencia de estos compuestos bioactivos en dichas especies, justifica y valida su uso tradicional.^{6,10,18,24}

Hasta la fecha, del género *Picramnia* no se han logrado aislar quasinoídes¹³³ o alcaloides bioactivos (antipalúdicos); sin embargo, algunas especies se usan tradicionalmente como febrífugos o contra el paludismo. Las propiedades medicinales atribuidas así como la actividad antimicrobiana en experimentos *in vitro* para algunas de estas especies,^{62,65,67,68} permiten suponer, por lo tanto, la existencia de otro tipo de metabolitos secundarios con actividad biológica de posible interés terapéutico.

La presencia de compuestos antraquinónicos es característica en estas especies y, puesto que algunas antraquinonas presentan propiedades

farmacológicas,⁷⁵⁻¹⁰¹ bien pueden ser éstas las responsables de las propiedades antimicrobianas que algunos extractos de estas plantas muestran.

Como se menciona previamente, en virtud de que algunas especies del género *Picramnia* se usan en la medicina tradicional de nuestro país para combatir el paludismo, mediante este estudio se espera aislar el o los metabolitos bioactivos responsables de las propiedades atribuidas a estas especies e, igualmente, se pueda correlacionar el uso popular que se les ha dado en la medicina tradicional a plantas de este género por la presencia de principios activos contra esta enfermedad.

Para realizar la presente investigación se seleccionaron las especies *P. antidesma*, *P. hirsuta* y *P. xalapensis*. La primera es una de las especies más empleadas en la medicina tradicional,^{26,52,53} mientras que en las dos especies adicionales, se puede esperar que por un criterio quimitaxonómico presenten una actividad biológica similar a *P. antidesma* y que posean metabolitos secundarios biodinámicas semejantes.

Por todo lo citado anteriormente, y dado que son escasos los estudios relacionados con el aislamiento de principios bioactivos del género *Picramnia*, resulta interesante realizar el estudio biodirigido de los extractos de tres especies de este género para aislar los metabolitos secundarios bioactivos mediante el monitoreo de su actividad citotóxica como indicador de una posible actividad farmacológica, y posterior evaluación antipalúdica *in vitro*. Todo ello con la finalidad de aprovechar íntegramente nuestros recursos naturales como una fuente potencial de agentes terapéuticos, teniendo presente que la investigación de las propiedades biológicas y químicas de los productos naturales en el pasado

produjo, no solamente fármacos para el tratamiento de muchos trastornos humanos sino que además ha permitido el descubrimiento de nuevos medicamentos, estimulado el desarrollo de la síntesis química moderna y el surgimiento de la química medicinal como una ruta principal para la exploración de nuevos y más efectivos agentes terapéuticos.¹³⁴

4. OBJETIVOS

Los antecedentes del género *Picramnia* señalan la ausencia de los quasinoídes o alcaloides biodinámicos constitutivos de la familia de las simarubáceas, en cambio indican la presencia de compuestos de tipo antraquinónico y triterpénico, y dado que este tipo de compuestos pueden ser biológicamente activos, los objetivos del presente proyecto consisten en:

1. Evaluar la actividad citotóxica de especies selectas de este género.
2. Evaluar la actividad antipalúdica de especies selectas de este género.
3. Aislar y purificar los metabolitos bioactivos existentes en las especies seleccionadas de este género.

Los objetivos particulares que se proponen alcanzar al realizar el presente proyecto son:

- a) Obtener los extractos de las especies seleccionadas de *Picramnia*, utilizando éter etílico y metanol para ello.
- b) Evaluar el potencial citotóxico de cada uno de los extractos obtenidos de las especies seleccionadas.
- c) Seleccionar los extractos que muestren actividad citotóxica significativa, de una especie en particular, y realizar el estudio fitoquímico biodirigido de los mismos, mediante el monitoreo de la actividad citotóxica presente.
- d) Aislar y purificar los metabolitos bioactivos de posible interés terapéutico presentes en los extractos.

- e) Establecer la estructura molecular de los compuestos aislados mediante el uso de las técnicas espectroscópicas, principalmente la RMN en sus diferentes modalidades así como la espectrometría de masas.
- f) Evaluar el potencial citotóxico de los metabolitos puros
- g) Evaluar la actividad antipalúdica *in vitro* de los compuestos puros que exhiban citotoxicidad.
- h) Corroborar el uso tradicional de las especies del género *Picramnia* para combatir el paludismo.

El logro de estos objetivos puede permitir la confirmación de las bondades medicinales de las especies de *Picramnia* de uso en la herbolaria tradicional de nuestro país, así como ampliar los escasos conocimientos que se tienen de los constituyentes de las especies de este género.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Procedimientos generales.

5.1.1. Técnicas cromatográficas.

Se emplearon dos técnicas de cromatografía de adsorción diferentes:

- a) Cromatografía en columna (cc)
- b) Cromatografía en capa delgada (ccd)

5.1.1.1. Cromatografía en columna (cc).

Esta técnica se desarrolló empacando una columna de vidrio con gel de sílice (0.064-0.200 mm y 0.040-0.063 mm, Merck). La fase móvil consistió de diferentes disolventes, según la polaridad de la mezcla por eluir. La elución se efectuó por gravedad o aplicando, algunas veces, una presión de 7 lb/pulg² empleando para ello una bomba de mediana presión (COMVER).

5.1.1.2. Cromatografía en capa delgada (ccd).

Para el análisis de los extractos orgánicos totales y cada una de las fracciones obtenidas mediante la cromatografía en columna, se utilizaron cromatoplasmas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60 (Merck) para la cromatografía en capa delgada (ccd). La detección de los constituyentes se realizó mediante el empleo de luz ultravioleta (UV) de onda larga (365 nm), además de una solución de KOH alcohólico al 5% y cloruro de cobalto (2 g de CoCl₂ en 100 ml de H₂SO₄ al 10%) como agentes cromógenos.

5.1.2. Instrumental analítico.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no fueron corregidos. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (16-PC-FT-IR y 2000 FT explorer) en película con acetona. Los espectros de masas fueron registrados mediante bombardeo rápido de átomos bajo la modalidad positiva (FAB⁺) utilizando una matriz de alcohol m-nitrobencílico en un espectrómetro JEOL DX300. Las curvas de dicroísmo circular (CD) se registraron en un espectropolarímetro JASCO 720 a 25°C en CH₃OH. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H: 500 MHz) y de carbono-13 (RMN-¹³C: 125.7 MHz), así como los experimentos COSY, DEPT, HMQC y HMBC se registraron en un aparato Bruker AMX-500 en (CD₃)₂CO y TMS como referencia interna.

5.2. Material vegetal.

Para la realización de la presente investigación se utilizaron tres especies del género *Picramnia*:

5.2.1. *Picramnia antidesma*: Raíz (690 g) y tallo (1000 g) de una población colectada en Yecuatla, Veracruz, México, en marzo de 1992. Un espécimen se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Ver. (XAL-107412).

5.2.2. *Picramnia xalapensis*: Raíz (250 g) y tallo (250 g) de una población recolectada en los alrededores de El Rincón del Muerto, Jilotepec, Veracruz, en mayo de 1998. Un espécimen se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología A. C., Xalapa, Ver (XAL-19707).

5.2.3. *Picramnia hirsuta*: Raíz (560 g) y tallo (1500 g) de una población recolectada en la zona de Uxpanapan a 5 Km del poblado La Laguna, Hidalgotitlán, Veracruz, en noviembre de 1992. Un ejemplar se depositó en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana (XALU-4213).

5.3. Extracción del material vegetal.

La raíz y el tallo de cada una de las especies finamente pulverizados se sometieron, por separado, a una extracción por maceración a temperatura ambiente inicialmente con éter etílico hasta agotamiento, concentrando el disolvente y dejando secar por completo el material vegetal resultante. Posteriormente, se realizó una segunda extracción con CH₃OH también hasta agotamiento. Después de concentrar el disolvente de cada uno de los extractos se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla 2.

	<i>P. antidesma</i>		<i>P. hirsuta</i>		<i>P. xalapensis</i>	
	(C ₂ H ₅) ₂ O	CH ₃ OH	(C ₂ H ₅) ₂ O	CH ₃ OH	(C ₂ H ₅) ₂ O	CH ₃ OH
Raíz	5.2 g	40.3 g	1.7 g	21.7 g	0.9 g	16.8g
Tallo	6.1 g	45.5 g	4.6 g	43.2 g	1.6 g	12.7 g

Tabla 2. Pesos de extractos obtenidos de las especies de *Picramnia*.

5.4. Ensayos biológicos.

5.4.1. Evaluación antipalúdica *in vitro*.

Para la evaluación de la actividad antipalúdica *in vitro*, se utilizaron dos cepas de *Plasmodium falciparum* en etapa asexual eritrocítica, una susceptible y

otra resistente a la cloroquina (D6 y W2, respectivamente) las cuales se mantuvieron en eritrocitos humanos de acuerdo a protocolos establecidos.¹³⁵ La técnica se basa en el método descrito por Desjardins,¹³⁶ que utiliza la incorporación de hipoxantina tritiada a un microcultivo de este parásito, mediante la siguiente secuencia de acciones: 200 μL de una suspensión de eritrocitos infectados con *P. falciparum* (0.5-1.0% de parasitemia, 1.0% de hematocrito) fueron colocados en microplacas de 96 cavidades junto con 25 μL de diferentes concentraciones de los compuestos y/o extractos por probar ($0.8-125.000 \times 10^{-9}$ g/mL). Dos series de control se realizaron, una con eritrocitos infectados y la otra con eritrocitos sanos, ambas sin muestra de compuesto o extracto por probar. Después de una preincubación de 24 h a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO_2 , 5% de O_2 y 90% de N_2 , se agregaron 25 μL (0.5 μCi) de hipoxantina tritiada ($[^3\text{H}]$ -hipoxantina, New England Nuclear Research Products, Boston, MA, EE.UU.) a cada una de las cavidades, colocándose nuevamente en incubación por 18 h adicionales, de tal manera que la incorporación de $[^3\text{H}]$ -hipoxantina se determinó después de una incubación total de 42 h. El plasmodio se recolectó en filtros de celulosa y se filtró a través de fibra de vidrio utilizando un colector celular (Skatron, Sterling, VA, EE.UU.). Los discos se lavaron, secaron y se pusieron en contacto con 3.5 mL de líquido de centelleo. La radioactividad se determinó por 1 min en un contador Betaplate (Modelo 1205, Wallac) Se utilizó cloroquina como control positivo, en concentraciones de $0.1-250 \times 10^{-9}$ g/mL. Las concentraciones de los compuestos de prueba requeridas para inhibir la incorporación de $[^3\text{H}]$ -hipoxantina al 50% (CI_{50}) fueron determinadas por un análisis de regresión lineal de las curvas

dosis-respuesta generadas por los gráficos semilogarítmicos obtenidos entre la dosis ensayada de cada muestra de prueba y el porcentaje de incorporación del compuesto radioactivo. Cloroquina: CI_{50} 6.8×10^{-9} M (D6), 1.4×10^{-7} M (W2).

Estos bioensayos se realizaron en colaboración con el Dr. M. Iwu del Walter Reed Army Institute of Research, Division of Experimental Therapeutics, (Washington, D. C.)

5.4.2. Evaluación citotóxica.

5.4.2.1. Líneas celulares. Para la evaluación del potencial citotóxico se utilizaron los procedimientos metodológicos descritos en la literatura,^{137,138} empleando cuatro líneas celulares derivadas de tumores humanos: carcinoma nasofaríngeo (KB), carcinoma de colon (HCT-15), adenocarcinoma de ovario (OVCAR) y carcinoma de células escamosas de cervix (SQC-1 UISO). Debido a la sensibilidad demostrada por la línea celular del carcinoma nasofaríngeo (KB), ésta se utilizó para detectar la actividad citotóxica en los extractos totales así como para realizar el monitoreo de la misma a lo largo de todo el estudio fitoquímico. De esta manera, se efectuó un fraccionamiento biodirigido, el cual permitió el aislamiento de los principios activos cuyo potencial citotóxico fue establecido con las líneas celulares restantes siguiendo los lineamientos experimentales implementados por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos.¹³⁸

5.4.2.2. Protocolo de evaluación. Todas las líneas celulares se mantuvieron en medio RPMI 1640 (10X) complementado con 10% de suero bovino fetal y se cultivaron a 37 °C bajo atmósfera de CO₂ al 5% en aire y 100% de humedad

relativa. Los cultivos celulares se utilizaron para el ensayo cuando se encontraban en su fase logarítmica de crecimiento.

El biensayo se realiza en microplacas de plástico de 96 cavidades (250 μL), en cada una de las cuales se depositan 190 μL de la suspensión celular, adicionando 10 μL de la solución de prueba en diferentes concentraciones finales (20.0, 4.0, 0.8, 0.16 y 0.032 $\mu\text{g}/\text{mL}$), haciéndose por triplicado. Al mismo tiempo, se preparan ensayos, tanto de un blanco (190 μL de suspensión celular con 10 μL de DMSO al 10%), como un control positivo (elipticina, en 3 concentraciones finales de 2.0, 0.4 y 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por otro lado, se depositaron 190 μL de suspensión celular en una placa inicial y se determinó su densidad óptica. Todas las placas de prueba y los controles se incuban a 37 °C durante 72 hrs, mientras que las etiquetadas como iniciales se incuban a la misma temperatura por 30 minutos. Concluido el periodo de incubación, la capa celular se somete a un proceso de fijación adicionando 100 μL de ácido tricloroacético al 20% en cada una de las cavidades de la microplaca incubándose por 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, se lavan con agua por cuatro veces y se secan al aire. Después se tiñen con una solución de 100 μL de sulforrodamina B (0.4%) en ácido acético al 1% por 30 minutos, eliminándose el exceso de tinción y secándose nuevamente. Finalmente, se adicionan 200 μL de Tris base 10 mM (tris-hidroximetilaminometano) a un pH de 10, por cinco minutos y agitación moderada. La densidad óptica se registra en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. El porcentaje de la sobrevivencia celular se determina mediante la fórmula:

$$\left[\frac{\text{OD (cel + muestra)} - \text{OD (día inicial)}}{\text{OD (cel + DMSO al 10\%)} - \text{OD (día inicial)}} \right] 100 = \% \text{ de Supervivencia}$$

Donde OD representa el promedio de la densidad óptica de las concentraciones celulares. A través de un análisis de regresión lineal, se determina la concentración efectiva 50 (CE₅₀), la cual constituye la dosis efectiva necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50%. Se consideran activos los extractos y compuestos puros cuyos valores de CE₅₀ sean $\leq 20 \mu\text{g/mL}$ y $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se utilizó elipticina como un control positivo, CE₅₀: 0.24 $\mu\text{g/mL}$ (KB); 0.36 $\mu\text{g/mL}$ (HCT-15); 0.42 $\mu\text{g/mL}$ (SQC-1 UIISO) y 0.61 $\mu\text{g/mL}$ (OVCAR).

5.5. Análisis químico.

5.5.1. Análisis de *Picramnia antidesma*.

El extracto de éter etílico de la raíz (5.0 g, EEtPAR) fue sometido a una separación por cc empleando 120 g de gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm) como fase estacionaria y un gradiente de CHCl₃-CH₃OH, eluyendo un total de 28 fracciones de 250 mL cada una, mismas que se analizaron por ccd para reunir aquellas que presentaron el mismo R_f. De esta manera, se lograron obtener cuatro concentrados (A-D), los cuales fueron evaluados para conocer su citotoxicidad (Véase Sección 5.4.2, Parte Experimental). La actividad citotóxica se concentró en la subfracción B.

La subfracción B (1.6 g) fue sometida a una nueva separación mediante cc utilizando 70 g de gel de sílice 60 (0.040-0.063 mm) como fase estacionaria y un

gradiente de CHCl_3 - $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$; se obtuvieron 55 subfracciones de 20 mL cada una, las cuales se reagruparon de acuerdo a su ccd en los siguientes concentrados: de la fracción 2-12 se lograron purificar dos compuestos antraquinónicos que fueron identificados como crisofanol (25 mg) y emodina (25 mg); en el concentrado 19-30 se presentó una mezcla de dos compuestos mayoritarios con $R_f = 0.45$ y 0.40 (CHCl_3 - CH_3OH , 9:1), los cuales desarrollaron una coloración anaranjada al ser expuestos a la luz UV y de color roja con la solución de potasa. Las fracciones 32-50 presentaron una segunda mezcla de dos compuestos mayoritarios con $R_f = 0.32$ y 0.27 (CHCl_3 - CH_3OH , 9:1), estos compuestos revelaron de color amarillo con luz UV y de color rojo con KOH.

El concentrado de las fracciones 19-30 se pasó nuevamente por cc usando gel de sílice (0.040-0.063 mm) y una mezcla de CHCl_3 - $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (7:3 v/v) como eluyente, lográndose purificar 20 mg de un sólido cristalino de color amarillo en forma de agujas, el cual resultó ser el uveósido (**1**) y 15 mg de un segundo compuesto cristalino amarillo que fue denominado con el nombre trivial de 10-*epi*-uveósido (**2**).

El concentrado de las fracciones 32-50 se separó nuevamente por cc con gel de sílice fina (0.040-0.063 mm) y CHCl_3 - $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (7:3 v/v) como mezcla eluyente, lográndose purificar 25 mg de picramniósido D (**3**, desoximayósido) y 15 mg de picramniósido E (**4**, desoxisarósido).

La evaluación biológica de estos compuestos **1-4** permitió identificarlos como citotóxicos. En la tabla 3 se presentan los resultados de esta evaluación, empleándose además de la línea celular del carcinoma nasofaríngeo (KB), la del

carcinoma de colon (HCT-15), del carcinoma de células escamosas de cervix (SQC-1 UISO) y del adenocarcinoma de ovario (OVCAR).

Compuesto	Actividad Citotóxica (CE ₅₀ , µg/mL)			
	KB	HCT-15	SQC-1UISO	OVCAR
crisofanol	> 20	> 20	> 20	> 20
emodina	> 20	6.04	> 20	16.74
uveósido (1)	2.22	2.35	5.08	2.27
10-epi-uveósido (2)	0.29	1.18	2.26	4.42
picramniósido D (3) (desoximayósido)	1.66	3.20	2.10	2.80
picramniósido E (4) (desoxisarósido)	1.74	3.16	1.44	5.50

Tabla 3. Citotoxicidad de los compuestos aislados de la subfracción activa B de EEtPAR.

Crisofanol:¹³⁹ Agujas de color naranja (CHCl₃-C₆H₁₄); pf = 195-197 °C,

Emodina:¹³⁹ Agujas de color naranja (CHCl₃-(CH₃)₂CO); pf = 264-266 °C,

Uveósido (1):¹⁴⁰ Agujas amarillas (C₆H₆-Me₂CO); pf = 228-231 °C; IR (KBr) ν_{max}, (cm⁻¹): 3409, 1724, 1638, 1618, 1595, 1454, 1296, 1237. UV λ_{max} (MeOH) (nm): 223, 268, 297 y 360. CD (c 0.12, MeOH) Δε (nm): +1.34 (348), -5.09 (297), -3.94 (266), 0.0 (250), -2.45 (236), +9.79 (224), -6.57 (210); RMN-¹H [(CD₃)₂CO] δ 12.08 (s, OH-8), 11.93 (s, OH-1), 7.85 (2H, m, H-2" y H-6"), 7.65 (1H, m, H-4"), 7.52 (2H, m, H-3" y H-5"), 7.53 (1H, t, J = 7.9 Hz, H-6), 6.69 (1H, dd, J = 0.8, 0.7 Hz, H-4), 7.19 (1H, ddd, J = 7.5, 1.0, 0.8 Hz, H-5), 6.48 (1H, dd, J = 0.8, 0.7 Hz, H-2), 6.89 (1H, ddd, J = 8.4, 1.1, 0.3 Hz, H-7), 5.85 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-1'), 4.66 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-10), 4.00 (1H, dd, J = 10.0, 2.4 Hz, H-5'), 3.87 (2H, m, H-2',

H-3'), 3.66 (1H, ddd, $J = 9.9, 8.6, 5.1$ Hz, H-4'), 1.89 (3H, s, Me); RMN- ^{13}C δ 194.96 (C-9), 163.99 (C-1''C=O), 163.16 (C-1, C-8), 148.83 (C-3), 146.65 (C-5a), 142.17 (C-4a), 136.18 (C-6), 134.18 (C-4''), 130.49 (C-1''), 130.29 (C-2'' y C-6''), 129.44 (C-3'' y C-5''), 119.98 (C-4), 121.22 (C-5), 118.28 (C-8a), 116.44 (C-2), 116.93 (C-7), 116.03 (C-1a), 95.30 (C-1'), 81.95 (C-5'), 73.55 (C-3'), 70.69 (C-2'), 68.44 (C-4'), 43.69 (C-10), 21.63 (C-11).

CE₅₀: 4.5×10^{-6} M (KB), 4.7×10^{-6} M (HCT-15), 4.6×10^{-6} M (OVCAR), 1.0×10^{-5} M (UIISO SQC-1); CI₅₀ 2.4×10^{-6} M (D6), 2.5×10^{-6} M (W2).

10-epi-uveósido (2): agujas amarillas (C₆H₆-Me₂CO); pf = 215-217 °C; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3422, 1733, 1697, 1637, 1617, 1601, 1454, 1294, 1228; UV λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ) 359 (4.08), 315 (3.77), 297 (4.00), 276 (3.74), 268 (3.99), 255 (3.87), 204 (4.54); CD (c 0.13, MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) +0.95 (352), -0.51 (324), +4.74 (298), -4.10 (269), +1.02 (240), -2.91 (233), +8.50 (224), -3.97 (206); RMN- ^1H [(CD₃)₂CO]: δ 12.01 (s, OH-8), 11.95 (s, OH-1), 7.82 (2H, m, H-2'' y H-6''), 7.64 (1H, m, H-4''), 7.49 (2H, m, H-3'' y H-5''), 7.14 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-6), 7.04 (1H, dd, $J = 1.4, 0.7$ Hz, H-4), 6.88 (1H, ddd, $J = 7.5, 1.0, 0.9$ Hz, H-5), 6.73 (1H, dd, $J = 1.3, 0.7$ Hz, H-2), 6.66 (1H, dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz, H-7), 5.89 (1H, d, $J = 1.2$ Hz, H-1'), 4.67 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-10), 4.00 (1H, dd, $J = 10.0, 2.5$ Hz, H-5'), 3.87 (1H, m, H-2'), 3.85 (1H, m, H-3'), 3.67 (1H, ddd, $J = 9.9, 8.8, 5.1$ Hz, H-4'), 2.37 (3H, s, Me); RMN- ^{13}C δ 193.75 (C-9), 164.23 (C-1''C=O), 163.26 (C-1), 162.87 (C-8), 148.01 (C-3), 146.45 (C-5a), 142.29 (C-4a), 136.60 (C-6), 134.21 (C-4''), 130.47 (C-1''), 130.33 (C-2'' y C-6''), 129.33 (C-3'' y C-5''), 122.38 (C-4), 119.01 (C-5), 118.15 (C-8a), 117.15 (C-2), 116.26 (C-7), 116.10 (C-1a), 95.50 (C-1'), 81.88 (C-

5'), 73.39 (C-3'), 70.69 (C-2'), 68.34 (C-4'), 43.88 (C-10), 22.15 (C-11). HRFABMS m/z 493.1499 $[M + H]^+$ (calculado para $C_{27}H_{24}O_9$, 493.1498); CE_{50} : 5.8×10^{-7} M (KB), 2.3×10^{-6} M (HCT-15), 8.9×10^{-6} M (OVCAR), 4.5×10^{-6} M (UIISO SQC-1); Cl_{50} 5.1×10^{-6} M (D6), 4.5×10^{-6} M (W2).

Desoximayósido (3, Picramniósido D): Agujas de color amarillo pálido (C_6H_6 - Me_2CO); pf = 242-244 °C. IR ν_{max} (cm^{-1}) 3362, 1713, 1645, 1622, 1606, 1486, 1293, 1251. Las constantes registradas en la RMN estuvieron de acuerdo con los valores descritos en la literatura. ^{71}RMN - 1H [$(CD_3)_2CO$]: δ 12.26 (s, OH-1), 12.14 (s, OH-8), 7.85 (2H, m, H-2'' y H-6''), 7.62 (1H, m, H-4''), 7.48 (2H, m, H-3'' y H-5''), 6.97 (1H, d, $J = 0.5$ Hz, H-5), 6.67 (1H, d, $J = 0.5$ Hz, H-7), 6.46 (1H, dd, $J = 2.5$, 0.7 Hz, H-4), 6.13 (1H, dd, $J = 2.5$, 0.7 Hz, H-2), 5.91 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-1'), 4.55 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-10), 4.04 (1H, dd, $J = 9.8$, 2.3 Hz, H-5'), 3.88 (1H, br, H-2'), 3.84 (2H, dd, 9.0, 4.0 Hz, H-3'), 3.69 (1H, t, $J = 9.5$ Hz, H-4'), 2.33 (3H, s, H-11); RMN - ^{13}C δ 193.04 (C-9), 165.63 (C-1), 165.33 (C-3), 164.46 (C-1''C=O), 163.00 (C-8), 148.88* (C-4a), 146.95 (C-6), 141.94* (C-5a), 134.11 (C-4''), 130.53 (C-1''), 130.22 (C-2'' y C-6''), 129.40 (C-3'' y C-5''), 122.10 (C-5), 117.02 (C-7), 115.87 (C-8a), 111.63 (C-1a), 107.86 (C-4), 101.95 (C-2), 95.70 (C-1'), 82.52 (C-5'), 73.30 (C-3'), 70.64 (C-2'), 68.25 (C-4'), 44.14 (C-10), 22.05 (C-11). CE_{50} : 3.2×10^{-6} M (KB), 6.3×10^{-6} M (HCT-15), 5.5×10^{-6} M (OVCAR), 4.1×10^{-6} M (UIISO SQC-1); Cl_{50} 1.1×10^{-5} M (D6), 9.4×10^{-6} M (W2).

Desoxisarósido (4, Picramniósido E): Agujas de color amarillo pálido (C_6H_6 - Me_2CO); pf = 250-252 °C. IR ν_{max} (cm^{-1}) 3429, 1710, 1644, 1622, 1600, 1486, 1291, 1255. Las constantes registradas en la RMN estuvieron de acuerdo con los

valores descritos en la literatura.⁷¹ RMN-¹H [(CD₃)₂CO]: δ 12.35 (s, OH-1), 12.10 (s, OH-8), 9.55 (1OH, br, OH-3), 7.84 (2H, m, H-2" y H-6"), 7.64 (1H, m, H-4"), 7.50 (2H, m, H-3" y H-5"), 6.72 (1H, dd, J = 2.5, 1.0 Hz, H-4), 6.62 (1H, d, J = 0.5, H-5), 6.43 (1H, d, J = 0.5 Hz, H-7), 6.31 (1H, dd, J = 2.0, 1.0 Hz, H-2), 5.86 (1H, s, H-1'), 4.54 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-10), 4.03 (1H, dd, J = 10.0, 2.5 Hz, H-5'), 3.92 (1H, d, 3.5 Hz, H-3'), 3.90 (1H, br, H-2'), 3.77 (1H, dd, 9.5, 9.0 Hz, H-4'), 1.84 (3H, s, H-11); RMN-¹³C δ 193.03 (C-9), 165.84 (C-1), 164.76 (C-3), 163.92 (C-1"=O), 162.80 (C-8), 147.71 (C-6), 146.10* (C-4a), 144.28* (C-5a), 134.12 (C-4"), 130.42 (C-1"), 130.23 (C-2" y C-6"), 129.38 (C-3" y C-5"), 119.69 (C-5), 116.28 (C-7), 116.20 (C-8a), 111.68 (C-1a), 110.09 (C-4), 102.51 (C-2), 95.27 (C-1'), 82.15 (C-5'), 73.54 (C-3'), 70.71 (C-2'), 68.13 (C-4'), 43.56 (C-10), 21.49 (C-11). CE₅₀: 3.4 × 10⁻⁶ M (KB), 6.2 × 10⁻⁶ M (HCT-15), 1.0 × 10⁻⁵ M (OVCAR), 2.8 × 10⁻⁶ M (UIISO SQC-1); CI₅₀ 1.1 × 10⁻⁵ M (D6), 9.3 × 10⁻⁶ M (W2).

5.5.2. Análisis químico de *Picramnia xalapensis*.

El extracto de éter etílico del tallo de *P. xalapensis* (1.5 g, EEtPXT) se sometió a una separación por cc, empleando para ello 50 g de gel de sílice normal (0.063-0.200 mm) y un gradiente de CHCl₃-(CH₃)₂CO obteniéndose 15 fracciones de 250 mL cada una, las cuales fueron analizadas y reunidas entre sí según el comportamiento que presentaron en ccd.

La purificación de las subfracciones 1-3 (0.11 g), mediante una cc, utilizando 12 g de gel de sílice (0.040-0.063 mm) y hexano-CHCl₃ (1:1) como eluyente, produjo 3 mg de crisofanol. El concentrado 4-7 (0.32 g) fue sometido a

cc con 25 g de gel de sílice (0.040-0.063 mm) y mezclas de hexano y CHCl_3 en diferentes proporciones para obtener 15 mg de agujas blancas de β -sitosterol.

El concentrado 8-11 (0.60 g) también fue sometido a cc empleando 40 g de gel de sílice (0.040-0.063 mm) y mezclas de hexano y AcOEt, obteniéndose 90 mg de ácido betulínico y 3 mg de 7-hidroxicoumarina. Las subfracciones 12-15 (300 mg) presentaron por ccd, una mezcla muy compleja de compuestos.

Crisofanol: Agujas de color naranja brillante. Constantes físicas de acuerdo con la literatura.¹³⁹

β -sitosterol: Agujas blancas. Constantes físicas de acuerdo con la literatura.¹⁴¹

Ácido betulínico: Sólido amorfo de color blanco. Constantes físicas de acuerdo con la literatura.¹⁴²⁻¹⁴⁴

7-hidroxicoumarina: Agujas de color amarillo pálido. Constantes físicas de acuerdo con la literatura.¹⁴⁵

5.5.3. Análisis químico de *Picramnia hirsuta*.

Esta especie no mostró actividad citotóxica, sin embargo se hizo un fraccionamiento por cc del extracto metanólico de la raíz (EMPHR) ya que fue el único de los obtenidos de esta especie que por ccd mostraba la presencia de posibles compuestos de estructura antraquinónica. El extracto (14.0 g) fue sometido a una cromatografía en columna con 240 g de gel de sílice normal (0.063-0.200 mm) y un gradiente de CHCl_3 - CH_3OH , se obtuvieron 26 fracciones de 500 ml cada una, y como en las cc anteriores, las fracciones que presentaron semejanzas en R_f se agruparon.

Las fracciones reunidas 1-3 (0.11 g) se sometieron nuevamente a una cc usando gel de sílice (0.040-0.063 mm) y hexano-CHCl₃ (1:1), obteniéndose 5 mg de crisofanol. Del concentrado 4-7 (0.22 g), después de someterlo a cc con gel de sílice fina (0.040-0.063 mm) y mezclas de hexano-CHCl₃ en orden de polaridad creciente, se pudieron aislar y purificar crisofanol (5 mg), emodina (10 mg) y β-sitosterol (15 mg). Igualmente, las subfracciones 8-10 (0.10 g) fueron sometidas a cc con las mismas condiciones del concentrado 4-7, lográndose purificar emodina (5 mg) y 7-hidroxycoumarina (10 mg).

La fracción 11 (0.11 g) se trató por una cc sobre gel de sílice fina (0.040-0.063 mm) y C₆H₆-(CH₃)₂CO (3:2) para purificar 8 mg de agujas finas de color amarillo que correspondieron al mayósido (**5**). El concentrado 12-13 (0.45 g) se sometió a cc en condiciones semejantes a las anteriores, obteniéndose la purificación de 4 mg de mayósido y 10 mg de sarósido (**6**) como agujas amarillas. La fracción 14 (1.92 g) presentó, por ccd, la mezcla de mayósido y sarósido junto con otro compuesto que también reveló con luz UV de color naranja oscuro, por lo que fue sometido a cc con gel de sílice purificándose principalmente 5 mg de glucósido de emodina en forma de un sólido amorfo de color naranja.

El concentrado 15-21 (6.31 g) resultó ser una mezcla muy compleja, lo mismo que el concentrado 22-25 (1.45 g) y la última fracción 26 (3.15 g), ya que por ccd y a pesar de haber utilizado varias mezclas de disolventes para la elución, no se pudo observar alguna definición cromatográfica en los componentes presentes.

Crisofanol: Agujas de color naranja brillante. Constantes físicas de acuerdo con la literatura.¹³⁹

Emodina: Agujas de color naranja cuyas constantes físicas están de acuerdo con la literatura.¹³⁹

β -sitosterol: Agujas blancas. Constantes físicas de acuerdo con la literatura.¹⁴¹

7-hidroxicoumarina: Agujas de color amarillo pálido. Constantes físicas de acuerdo con la literatura.¹⁴⁵

Mayósido (5): Agujas amarillas [$C_6H_6-(CH_3)_2CO$]; pf = 238-240 °C; los datos de IR, UV y NMR estuvieron de acuerdo con los valores de la literatura.⁶⁶ RMN-¹H δ 12.22 (1OH, s, OH-1), 12.18 (1OH, s, OH-8), 9.67 (1OH, br, OH-3), 7.85 (2H, m, H-2" y H-6"), 7.63 (1H, m, H-4"), 7.50 (2H, m, H-3" y H-5"), 7.25 (1H, d, J = 1.1 Hz, H-5) 6.83 (1H, d, J = 2.2, Hz, H-4), 6.74 (1H, s, H-7), 6.62 (1OH, s, OH-10), 6.14 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 5.82 (1H, d, J = 0.9 Hz, H-1'), 5.82 (1OH, br, OH-4'), 4.47 (1OH, d, J = 2.9 Hz, OH-2'), 4.19 (1OH, d, J = 6.8Hz, OH-3'), 3.86 (2H, m, H-2' y H3'), 3.77 (1H, dd, 9.5, 9.0 Hz, H-4'), 3.73 (2H, m, H-4' y H-5'), 2.42 (3H, s, H-11); RMN-¹³C δ 191.06 (C-9), 165.12(C-3), 164.23 (C-1), 163.54 (C-1"=O), 161.66 (C-8), 150.62 (C-6), 146.27* (C-5a), 144.53* (C-4a), 133.36 (C-4"), 129.39 (C-2" y C-6"), 129.34 (C-1"), 128.60 (C-3" y C-5"), 119.39 (C-5), 116.93 (C-7), 113.77 (C-8a), 109.43 (C-1a), 105.68 (C-4), 101.53 (C-2), 94.39 (C-1'), 79.49 (C-5'), 75.30 (C-10), 71.93 (C-3'), 69.20 (C-2'), 68.73 (C-4'), 21.45 (C-11). KB: CE₅₀ > 4 X 10⁻⁵ M; W2: CI₅₀ > 2.5 X 10⁻⁴ M.

Sarósido (6): Agujas amarillas, [$C_6H_6-(CH_3)_2CO$]; pf= 215-218 °C; los datos de IR, UV y NMR estuvieron de acuerdo con los valores de la literatura.⁶⁹ RMN-¹H δ

12.38 (1 OH, s, OH-1), 12.06 (1OH, s, OH-8), 9.65 (1OH, br, OH-3), 7.87 (2H, m, H-2" y H-6"), 7.67 (1H, m, H-4"), 7.54 (2H, m, H-3" y H-5"), 7.02 (1H, dd, J = 1.6, 0.5 Hz, H-5) 6.94 (1H, d, J = 2.2, Hz, H-4), 6.49 (1H, dd, J = 1.6, 0.8 Hz, H-7), 6.45 (1OH, br, OH-10), 6.37 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2), 5.82 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-1'), 4.38 (1OH, br, OH-2'), 3.92 (1H, dd, J = 8.9, 3.6 Hz, H-3'), 3.87 (1H, m, H-2'), 3.83 (1H, dd, J = 9.5, 8.8 Hz, H-4'), 3.73 (1H, d, 9.5 Hz, H-5'), 1.80 (3H, s, H-11); RMN-¹³C δ 192.89 (C-9), 166.13 (C-1), 165.31 (C-3), 163.99 (C-1"=O), 162.91 (C-8), 148.83* (C-5a), 148.62* (C-4a), 148.26 (C-6), 134.52 (C-4"), 130.65 (C-2" y C-6"), 129.77 (C-3" y C-5"), 118.41 (C-5), 117.71 (C-7), 114.87 (C-8a), 110.70 (C-1a), 108.61 (C-4), 103.45 (C-2), 95.07 (C-1'), 80.54 (C-5'), 76.57 (C-10), 73.48 (C-3'), 70.69 (C-2'), 70.18 (C-4'), 22.00 (C-11). KB: CE₅₀>4 × 10⁻⁵ M; W2: CI₅₀>2.5 × 10⁻⁴ M. KB: CE₅₀>4 × 10⁻⁵ M; W2: CI₅₀> 2.5 × 10⁻⁴ M.

Glucósido de emodina: Sólido amorfo de color naranja oscuro. Constantes físicas de acuerdo con la literatura.¹⁴⁶

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Numerosas especies del género *Picramnia* se reconocen ampliamente como remedios populares para el tratamiento de fiebres intermitentes, enfermedades gastrointestinales, úlceras en la piel y paludismo.^{26-28,51} Estos usos tradicionales permiten suponer la presencia de metabolitos bioactivos en las especies medicinales de este género. En este sentido, es importante destacar que la especie *Picramnia antidesma* se utiliza ampliamente como un agente antipalúdico en las zonas tropicales de Centroamérica, donde se conoce con el nombre de “quinina” o “cáscara amarga” y sus usos asemejan a los de la cuasia (*Simarouba amara*). En estudios preliminares, se demostró la actividad antipalúdica potencial en ensayos *in vitro* de los extractos orgánicos totales preparados a partir de *P. antidesma* (ramas).¹⁵ Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio químico conducente a la identificación de los principios activos. Así, la presente investigación se enfocó a la caracterización del potencial citotóxico de extractos crudos preparados a partir de tres especies del género *Picramnia* y lograr la caracterización de sus principios citotóxicos. La evaluación antipalúdica *in vitro* de los metabolitos activos permitirá establecer la posibilidad de una acción selectiva en su actividad biológica.

Los resultados obtenidos de la evaluación citotóxica de los extractos crudos de las especies seleccionadas de *Picramnia* mostraron que (Ver tabla 4) los extractos preparados con éter etílico de *P. antidesma* y de *P. xalapensis*, tanto de raíz como de tallo, desarrollaron una actividad citotóxica significativa CE_{50} ($< 20 \mu\text{g/mL}$); de ellos, fue el extracto de éter etílico de la raíz de *P. antidesma* el que

manifestó una citotoxicidad considerablemente mayor que la observada para los otros (KB: $CE_{50}=0.97 \mu\text{g/mL}$). Al mismo tiempo, este extracto (EEtPAR), también presentó una actividad antipalúdica significativa *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (D_6 : $CI_{50}= 9.30\mu\text{g/mL}$; W_2 : $CI_{50}= 8.07 \mu\text{g/mL}$).

Extracto o Compuesto	Actividad Citotóxica, CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)				
	KB	HCT-15	SQC-1	UIISO	OVCAR
EEtPAR	0.97	> 20	> 20	> 20	> 20
EMPAR	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
EEtPAT	15.99	> 20	> 20	> 20	> 20
EMPAT	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
EMPAh	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
EEtPHR	-----	-----	-----	-----	-----
EMPHR	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
EEtPHT	-----	-----	-----	-----	-----
EMPHT	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
EMPHh	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
EEtPXR	15.95	> 20	18.49	> 20	> 20
EMPXR	-----	-----	-----	-----	-----
EEtPXT	17.90	> 20	> 20	> 20	> 20
EMPXT	-----	-----	-----	-----	-----
EMPXh	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20

Tabla 4. Resultados de la evaluación citotóxica de los extractos crudos obtenidos a partir de las especies del género *Picramnia* en estudio.

EEtPAR, EEtPAT: Extractos de éter etílico de raíz y tallo de *P. antidesma*; EMPAR, EMPAT, EMPAh: Extractos de metanol de la raíz, tallo y hoja de *P. antidesma*; EEtPHR, EMPHR: Extractos de éter etílico y metanol de la raíz de *P. hirsuta*; EEtPHT, EMPHT: Extractos de éter etílico y metanol del tallo de *P. hirsuta*; EMPHh: Extracto de metanol de la hoja de *P. hirsuta*; EEtPXR, EEtPXT: Extractos de éter etílico de *P. xalapensis*; EMPXR, EMPXT, EMPXh: Extractos de metanol de la raíz, tallo y hoja de *P. xalapensis*.

6.1. Análisis fitoquímico de *Picramnia antidesma*

Debido a la clara relación entre las actividades antipalúdica y citotóxica mostrada por el extracto total de éter etílico de la raíz de *P. antidesma*, la siguiente etapa en el desarrollo de la presente investigación se centró en el aislamiento de los principios activos presentes en la raíz de esta especie utilizando para ello la evaluación de la actividad citotóxica contra la línea celular derivada del carcinoma nasofaríngeo humano (KB). Este bioensayo se seleccionó debido a que esta línea celular es sumamente sensible y se utiliza rutinariamente en los estudios fitoquímicos biodirigidos para monitorear el aislamiento de principios citotóxicos a partir de fuentes naturales.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ El monitoreo de la actividad citotóxica se realizó a lo largo de todos los procedimientos utilizados para el aislamiento y la purificación de los principios activos.

El fraccionamiento primario del extracto de éter etílico de raíz de *P. antidesma* (EEtPAR, 4.9 g) se realizó mediante cromatografía en columna (cc) utilizando 120 g de gel de sílice 60 normal, generando cuatro fracciones principales (A-D). Cada una de las cuales se sometió a la evaluación de su actividad citotóxica, estableciéndose que dicha actividad se concentraba en la fracción B (KB: CE₅₀= 12.05 µg/mL). Un fraccionamiento adicional de esta fracción activa, nuevamente por cc con gel de sílice (0.040-0.063 mm), permitió obtener dos subfracciones con dos metabolitos mayoritarios cada una. La purificación de cada una de estas dos subfracciones mediante cc utilizando gel de sílice, permitió la obtención de dos pares de antranas diastereoisoméricas denominadas con los nombres triviales de uveósido (**1**, 20 mg; KB: CE₅₀= 2.22 µg/mL), 10-*epi*-uveósido

(**2**, 15 mg; KB: CE_{50} = 0.29 $\mu\text{g/mL}$), desoximayósido (**3**, picramniósido D, 25 mg; KB: CE_{50} = 1.66 $\mu\text{g/mL}$) y desoxisarósido (**4**, picramniósido E, 15 mg; KB: CE_{50} = 1.74 $\mu\text{g/mL}$), los cuales mostraron ser los principios activos de la subfracción B. Ver figura 6.

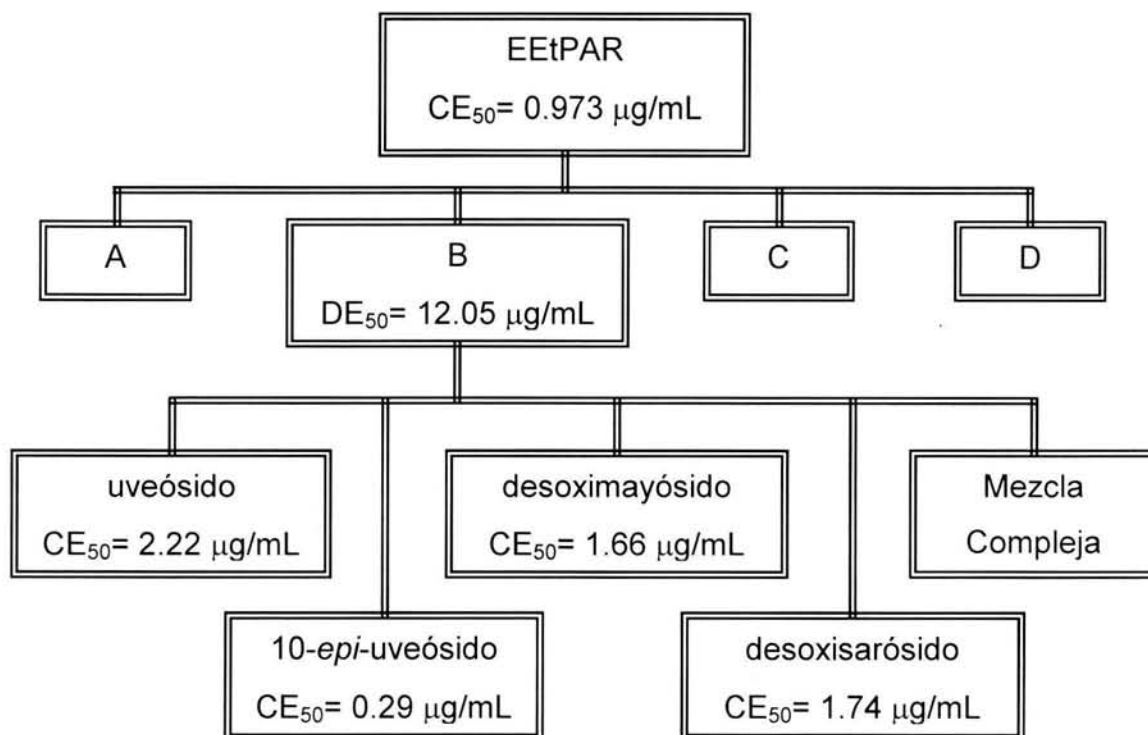


Fig. 6. Fraccionamiento biodirigido del extracto etílico de *P. antidesma* (raíz).

La cantidad obtenida de cada uno de estos compuestos bioactivos permitió su elucidación estructural, así como el establecimiento de su configuración absoluta, mediante los estudios espectroscópicos de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C , en combinación con el dicroísmo circular y la espectrometría de masas. A continuación se discute la caracterización del esqueleto básico de cada uno de los cuatro metabolitos dejando al final la discusión del fragmento glicosídico (6.1.4).

6.1.1. Caracterización del uveósido (1)

Este metabolito fue aislado en una proporción de 0.40% del peso seco. El espectro de IR mostró bandas de absorción a 3409, 1724 y 1638 cm^{-1} , señales características para grupos hidroxilos, de carbonilos de éster y carbonilos enlazados intramolecularmente con un hidrógeno de un hidroxilo, respectivamente. En el espectro de RMN- ^1H (Fig. 7) se observaron las señales que evidenciaron la estructura de una antrona,^{68,114,116,117} a saber:

- 1) Se detectaron dos señales simples en δ 12.08 y 11.93 características de hidroxilos enlazados a un carbonilo (OH-8 y OH-1);¹⁵⁰
- 2) Se observó un grupo benzoilo^{66,68,151} mediante las señales en δ 7.85 (2H, m), 7.65 (1H, dddd, 7.5, 7.5, 7.1 y 1.4 Hz) y 7.52 (2H, m);
- 3) Se presentaron cinco protones aromáticos en δ 7.53 (1H, t, 7.9 Hz), 7.19 (1H, ddd, 7.5, 1.0 y 0.8 Hz), 6.89 (1H, ddd, 8.4, 1.1 y 0.3 Hz), 6.69 (1H, dd, 0.8 y 0.7 Hz) y 6.48 (1H, dd, 0.8 y 0.7 Hz) los cuales estuvieron de acuerdo con un esqueleto parecido al del crisofanol.¹³⁹ La señal triple en δ 7.53 estuvo sobrepuesta a la señal múltiple de los protones H-3" y H-5" la cual pudo observarse en la ampliación de esta zona (Fig. 8);
- 4) Se observó el protón característico H-10 de una antrona en δ 4.66 (1H, d, 2.5 Hz),^{68,114,116,117,140,152-155} así como la presencia de un metilo aromático muy desplazado a campo alto en δ 1.89 (3H, s);¹⁵⁶
- 5) También, se evidenció la presencia de una porción glicosídica por las señales en δ 5.85 (1H, s), 4.00 (1H, dd, 10.0 y 2.4 Hz), 3.87 (2H, m), 3.66 (1H, ddd, 9.9,

8.6 y 5.1 Hz), así como las señales para los hidroxilos de este glicósido en δ 3.99 (1OH, d, 0.8), 4.18 (1OH, d, 4.0) y 4.47 (1OH, d, 5.0);¹⁵⁷

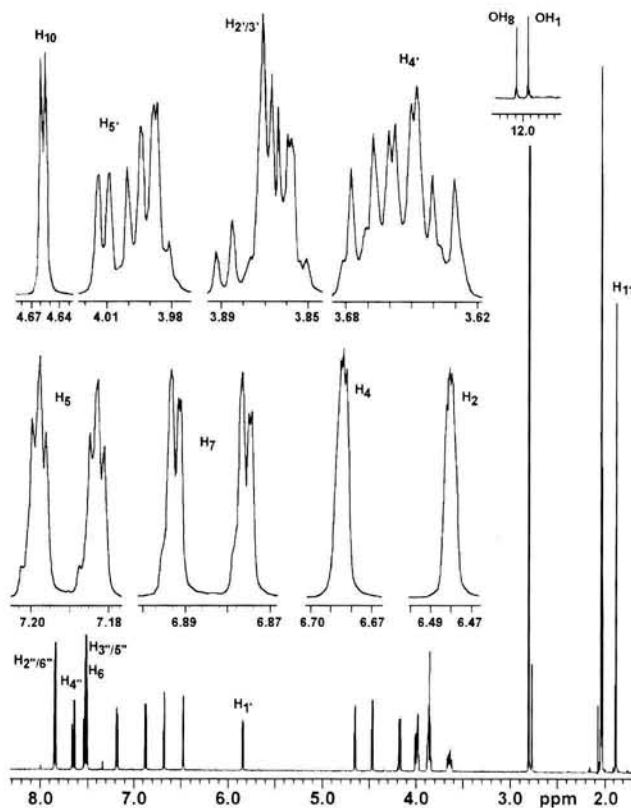


Fig. 7. Espectro de RMN-¹H del uveósido (**1**) [(CD₃)₂CO]

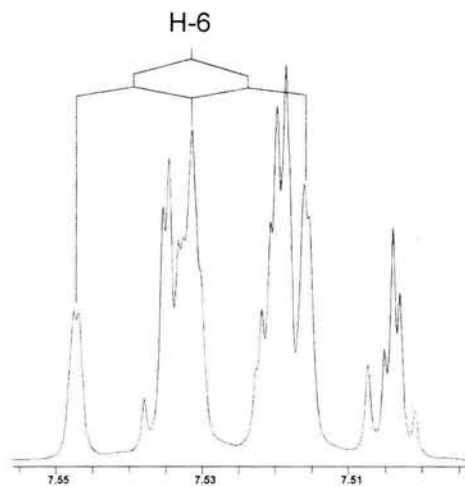


Fig. 8. Ampliación de la zona aromática del espectro de **1**, que muestra la sobreposición de las señales para los protones H-6, H-3'' y H-5''

El espectro de RMN- ^{13}C (Fig. 9) presentó veinticuatro señales las cuales confirmaron el esqueleto de una antrona, 140 principalmente por las señales del carbonilo C-9 en δ 194.96 y la señal de C-10 en δ 43.69, así como la presencia del grupo benzoato ya que las señales para C-2''/C-6'' y C-3''/C-5'' en δ 130.29 y δ 129.44, presentaron el doble de intensidad que las otras señales para los metinos, la señal de C-4'' se observó en δ 134.18. La existencia de cinco metinos aromáticos centrados δ 116.44, 116.93, 119.98, 121.22 y 136.18, evidenció el esqueleto de crisofanol como el núcleo básico para esta antrona. Las señales para el glicósido demostraron que éste estaba constituido por sólo cinco átomos de carbono.

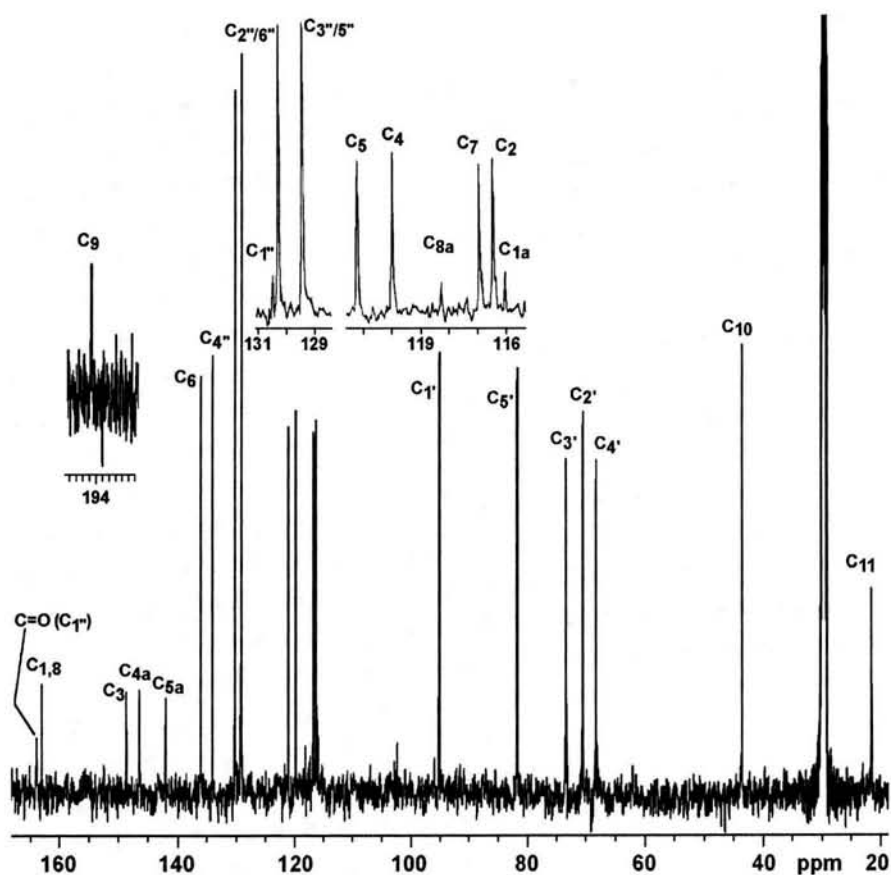


Fig. 9. Espectro de RMN- ^{13}C del uveósido (1) [(CD_3) $_2\text{CO}$]

Con el espectro de correlación ^1H - ^1H , COSY (Fig. 10) se corroboró la asignación de las señales para los protones del grupo benzoato, del núcleo de la antrona (crisofanol), además también se pudo identificar la conectividad entre los protones del núcleo glicosídico, así como las que establecían los grupos hidroxilos del mismo, de tal manera que las siguientes apreciaciones se pudieron realizar:

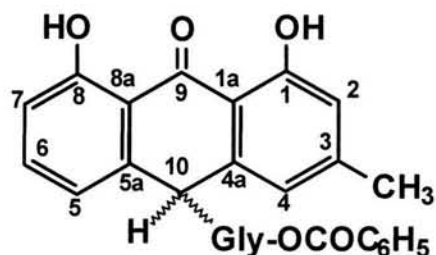
a) los protones aromáticos en δ 6.48 (H-2) y 6.69 (H-4) presentaron una correlación entre sí y una adicional con el grupo metilo (H-11) en δ 1.89.

b) los protones en δ 7.19 (H-5) y 6.89 (H-7) se relacionaron entre sí y con una señal triple sobrepuesta en δ 7.53 (H-6), estas observaciones estuvieron de acuerdo con el núcleo de crisofanol como esqueleto básico para la antrona.

c) se distinguió la relación entre los protones en δ 7.19 (H-5) y 6.69 (H-4) con el protón característico de la antrona en δ 4.66 (H-10), el cual a su vez tuvo conexión con el protón en δ 4.00 (H-5'); la relación que presentaron los protones H-10 y H-5' puso de manifiesto la unión del glicósido con el núcleo antraquinónico, de C-10 con C-5'.

d) el protón en δ 3.66 (H-4') estableció un cuadro de conectividad con los protones en δ 4.00 (H-5') y 3.87 (H-2', H-3'), así como con el hidroxilo en δ 4.47 (OH-4').

e) la señal múltiple en δ 3.87 (H-2', H-3') presentó correlación con los protones en δ 5.85 (H-1') y 3.66 (H-4'), así como con los hidroxilos en δ 4.18 (OH-2') y 3.99 (OH-3').



Estructura para el uveósido

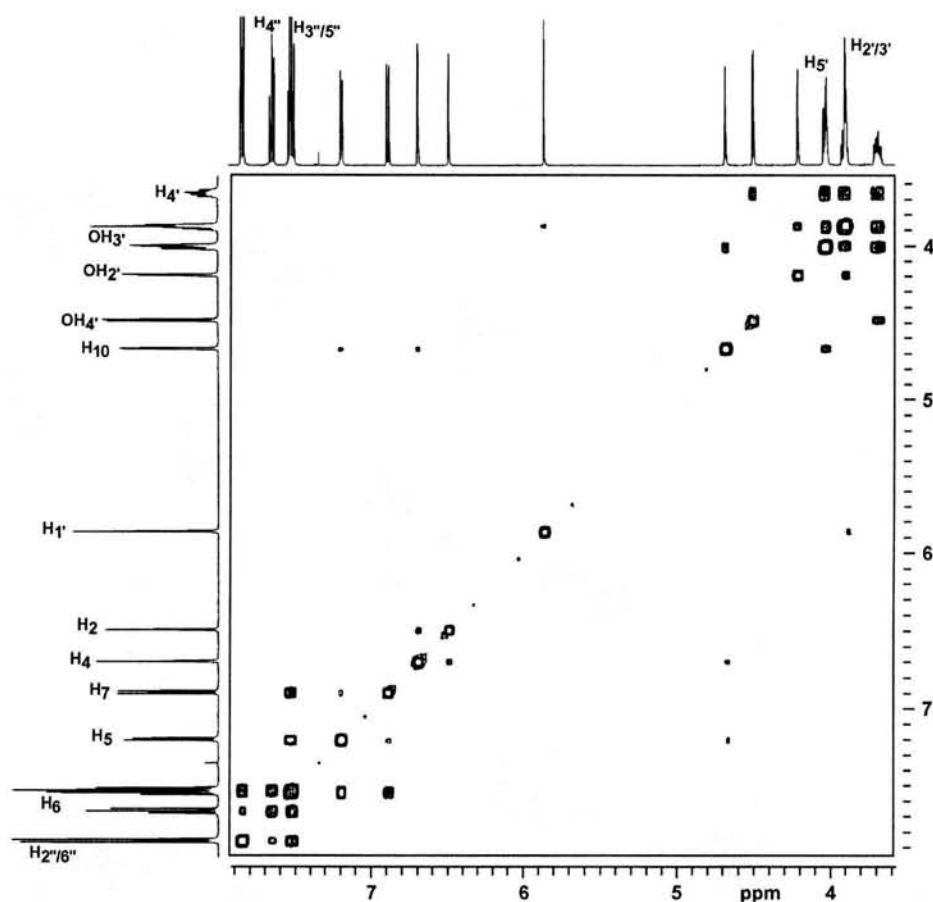


Fig. 10. Espectro de correlación ^1H - ^1H (COSY) del uveósido (**1**) $[(\text{CD}_3)_2\text{CO}]$.

Para la asignación de todos los carbonos y protones se utilizaron los espectros de correlación ^1H - ^{13}C , HMQC (Fig. 11), así como el experimento HMBC (Fig. 12) mismos que permitieron confirmar el desplazamiento de los carbonos cuaternarios. Así, se pudo determinar que la señal del C=O del grupo benzoato se

desplazó a δ 163.99 ya que esta señal presentó una correlación a tres enlaces con los protones en δ 5.85 (H-1') y 7.85 (H-2''/6''); la señal en δ 163.16 tuvo correlación a tres enlaces con el protón a δ 7.53 (H-6) y a dos enlaces con el protón a δ 6.48 (H-2), por lo que en esta señal coincidieron los carbonos C-1 y C-8. La determinación de los carbonos 1a, 4a, 5a y 8a se realizó mediante las correlaciones siguientes: C-4a, en δ 146.65, presentó una interacción a dos enlaces con la señal en δ 4.66 (H-10), mientras que C-5a mostró relaciones con δ 4.66 (H-10), 7.53 (H-6) y 4.00 (H-5'), a dos enlaces la primera y a tres enlaces las

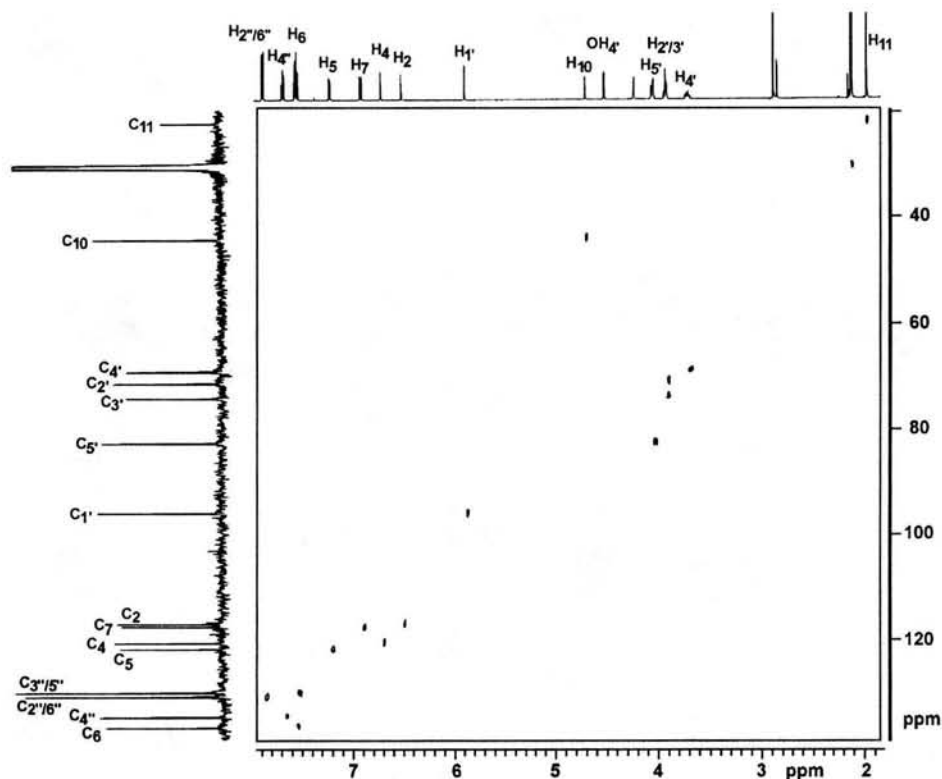


Fig. 11. Espectro de correlación ^1H - ^{13}C (HMQC) del uveósido (1).

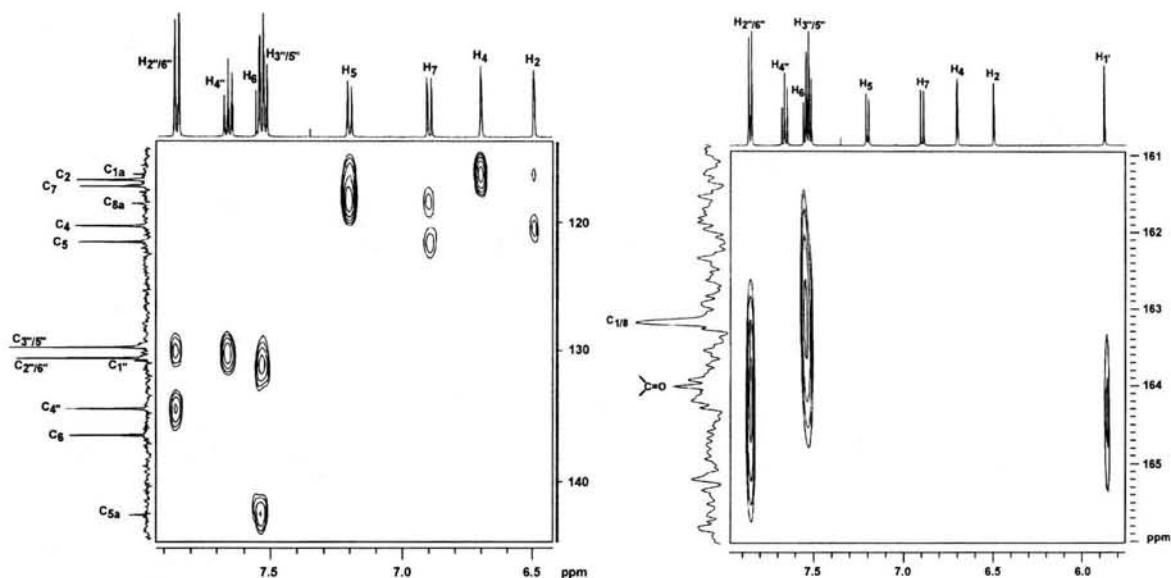


Fig. 12. Ampliaciones del experimento HMBC del uveósido (1).

siguientes; C-8a, en δ 118.28, presentó interacciones a tres enlaces con los protones en δ 7.19 (H-5), 6.89 (H-7) y 4.66(H-10); C-1a exhibió interacciones a tres enlaces con el protón en δ 6.48 (H-2) y con el hidroxilo en δ 11.93 (OH-1). En la tabla 5 se muestran los datos espectrales para los núcleos de ¹H y ¹³C para este compuesto.¹⁴⁰

Posición	δ_c (ppm)	Conectividad $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (δ , ppm)	Conectividad $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ [enlaces]	Conectividad $^1\text{H}/^1\text{H}$ (δ , ppm)	Multiplicidad RMN- ^1H (J en Hz)
1	163.16		OH-1 (11.93) [2], H-2 (6.48) [2]		
1a	116.03		OH-1 (11.93) [3], H-2 (6.48) [3]		
2	116.44	H-2 (6.48)	OH-1 (11.93) [3], H-4 (6.69) [3], H-11 (1.89) [3]	H-4 (6.69), H-11 (1.89)	dd (0.8, 0.7)
3	148.83		H-11 (1.89) [2]		
4	119.98	H-4 (6.69)	H-2 (6.48) [3], H-11 (1.89) [3]	H-2 (6.48), H-11 (1.89)	dd (0.8, 0.7)
4a	146.65		H-10 (4.66) [2]		
5	121.22	H-5 (7.19)	H-7 (6.89) [3]	H-6 (7.53), H-7 (6.89)	dd (7.5, 1.0, 0.8)
5a	142.17		H-6 (7.53) [3], H-10 (4.66) [2], H-5' (4.00) [3]		
6	136.18	H-6 (7.53)	*	H-5 (7.19), H-7 (6.89)	t (7.9)
7	116.93	H-7 (6.89)	OH-8 (12.08) [3], H-5 (7.19) [3]	H-5 (7.19), H-6 (7.53)	dd (8.4, 1.1, 0.3)
8	163.16		OH-8 (12.08) [2], H-6 (7.53) [3]		
8a	118.28		OH-8 (12.08) [3], H-5 (7.19) [3], H-7 (6.89) [3], H-10 (4.66) [3]		
9	194.96		*		
10	43.69	H-10 (4.66)	H-5 (7.19) [3], H-4 (6.69) [3]	H-5 (7.19), H-4 (6.69), H-5' (4.00)	d (2.5)
11	21.63	H-11 (1.89)	H-2 (6.48) [3], H-4 (6.69) [3]	H-2 (6.69), H-4 (6.69)	s
1'	95.30	H-1' (5.85)	OH-2' (4.18) [3]	H-2'/H-3' (3.87)	s
2'	70.69	H-2' (3.87)	OH-3' (3.99) [3]	H-1' (5.85), OH-2' (4.18)	m
3'	73.55	H-3' (3.87)	H-1' (5.85) [3], H-5' (4.00) [3]	H-4' (3.66), OH-3' (3.99)	m
4'	68.44	H-4' (3.66)	OH-4' (4.47) [2], H-2' (3.87) [3]	H-2'/H-3' (3.87), H-5' (4.00), OH-4' (4.47)	ddd (9.9, 8.6, 5.1)
5'	81.95	H-5' (4.00)	H-1' (5.85) [3], H-10 (4.66) [2], OH-4' (4.47) [3]	H-4' (3.66), H-10 (4.66)	dd (10.0, 2.4)
1" (C=O)	163.99		H-1' (5.85) [3], H-2" y H-6" (7.85) [3]		
1"	130.49		H-3" y H-5" (7.52) [3]		
2", 6"	130.29 ^a	H-2" y H-6" (7.85)	H-4" (7.65) [3]	H-3" y H-5" (7.52), H-4" (7.65)	m
3", 5"	129.44 ^a	H-3" y H-5" (7.52)	H-2" y H-6" (7.85) [2]	H-2" y H-6" (7.85), H-4" (7.65)	m
4"	134.18	H-4" (7.65)	H-2" y H-6" (7.85) [3]	H-2" y H-6" (7.85), H-3" y H-5" (7.52)	dddd (7.5, 7.1, 1.4, 1.3)

Tabla 5. Datos espectroscópicos para el compuesto uveósido (1).

RMN- ^{13}C a 125.7 MHz; RMN- ^1H a 500 MHz; en $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Las asignaciones fueron confirmadas por experimentos COSY, HMQC y HMBC.

^a La intensidad de esta señales es del doble que otras señales para CH.

* No observado.

6.1.2. Caracterización del 10-*epi*-uveósido (2)

Este compuesto se obtuvo con un rendimiento de 0.30% (peso seco). El espectro de IR mostró bandas de absorción muy parecidas a las producidas por el uveósido en 3422, 1733 y 1617 cm^{-1} , absorciones que son características de hidroxilos, de carbonilos de éster así como del enlazamiento intramolecular de carbonilos con hidrógenos de hidroxilos, respectivamente.

El espectro de RMN- ^1H (Fig. 13) también mostró una gran semejanza con el registrado para el uveósido (Fig. 7) ya que se detectaron dos señales simples en δ 12.01 y 11.95, características de hidroxilos enlazados al carbonilo (OH-8 y OH-1); igualmente, se observó un grupo benzoato en δ 7.82 (2H, m), 7.64 (1H, dddd, 7.9, 7.1, 1.4 y 1.3 Hz) y 7.49 (2H, m); se presentaron los cinco protones aromáticos del esqueleto de crisofanol en δ 7.14 (1H, t, 8.0 Hz), 7.04 (1H, dd, 1.4, 0.7 Hz), 6.88 (1H, dt, 7.5, 0.9, 0.9 Hz), 6.73 (1H, dd, 1.3 y 0.7 Hz) y 6.66 (1H, dd, 8.4 y 1.1 Hz); el protón H-10, característico de la antrona, se observó en δ 4.67 (1H, d, 2.4 Hz) y un metilo aromático en su desplazamiento normal,¹⁵⁸ en δ 2.37 (3H, s).

De igual manera, se evidenció la presencia de una porción glicosídica a través de las señales en δ 5.89 (1H, d, 1.2 Hz, H-1'), 4.00 (1H, dd, 10.0 y 2.5 Hz, H-5'), 3.87 (1H, m, H-2'), 3.85 (1H, m, H-3'), 3.67 (1H, ddd, 9.9, 8.8 y 5.1 Hz, H-4'), así como las señales para los hidroxilos de este glicósido en δ 3.98 (d, 7.0 Hz, OH-3'), 4.19 (d, 3.8 Hz, OH-2') y 4.51 (d, 5.1 Hz, OH-4').

Todas estas observaciones estuvieron de acuerdo con una antrona epimérica del uveósido, ya que se notó una marcada diferencia en los

desplazamientos entre los grupos metilo y los protones aromáticos, evidenciando un cambio de configuración en el centro estereogénico C-10.

Así, en el 10-*epi*-uveósido, la resonancia del grupo metilo aromático apareció centrada en δ 2.37, una diferencia de desplazamientos de $\Delta\delta$ 0.48 con respecto al del uveósido (δ 1.89), lo mismo sucedió para los protones aromáticos H-2 ($\Delta\delta$ 0.25) y H-4 ($\Delta\delta$ 0.35) del 10-*epi*-uveósido. Es decir, estas señales presentan un efecto paramagnético en relación con las resonancias del uveósido. El efecto anisotrópico de protección opuesto que ejerce el residuo de benzoato sobre las señales H-5 ($\Delta\delta$ -0.31), H-6 ($\Delta\delta$ -0.39) y H-7 ($\Delta\delta$ -0.23) se observó simultáneamente.

Las apreciaciones anteriores se pueden explicar si se considera que el grupo benzoato se encuentra orientado, en la conformación preferida, directamente sobre el anillo aromático que contiene al grupo metilo para el uveósido. Así, por lo tanto, el cono de protección generado por las anisotropías de las corrientes electrónicas del anillo aromático de este sustituyente provocan un efecto de desprotección para las señales del grupo metilo y los protones H-2 y H-4 del núcleo antraquinoide, como se ilustra en la figura 14.

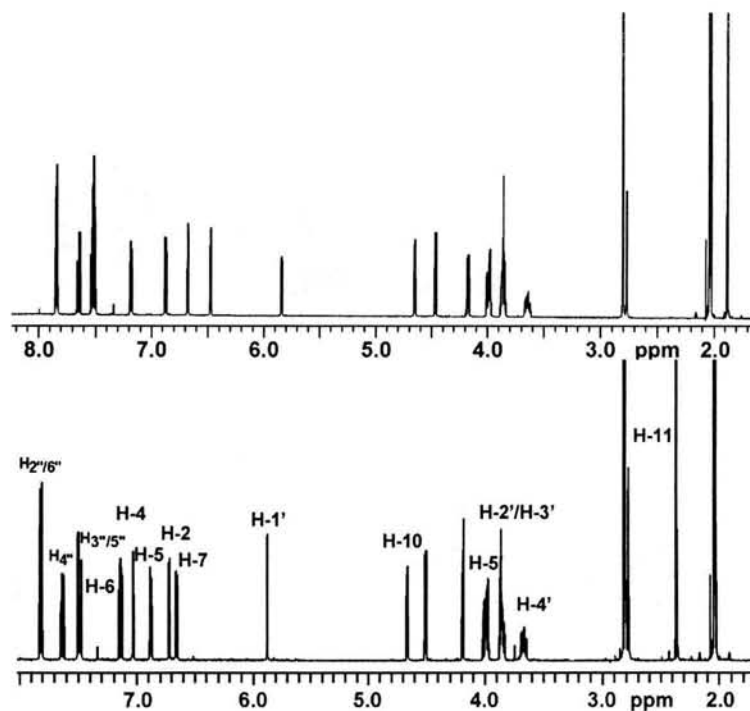


Fig. 13. Espectros de RMN-¹H del uveósido (**1**, arriba) y del 10-*epi*-uveósido (**2**, abajo) [(CD₃)₂CO]

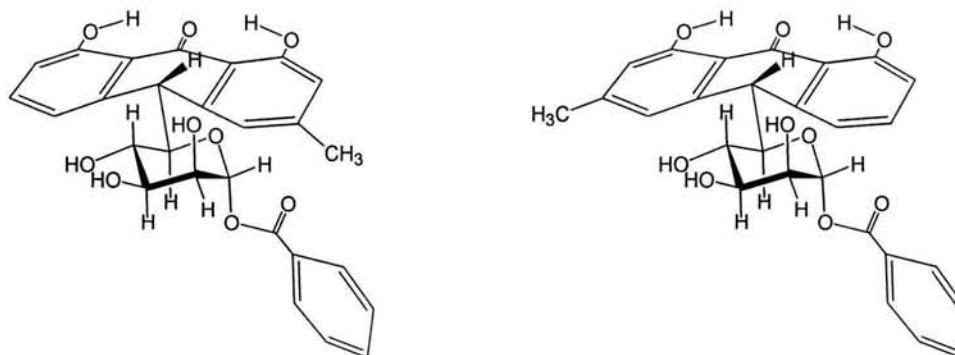


Fig. 14. Estructuras para el par de antranas diastereoisoméricas uveósido (**1**) y 10-*epi*-uveósido (**2**)

El espectro de RMN- ^{13}C del 10-*epi*-uveósido presentó veinticinco señales para un número igual de carbonos destacando, nuevamente, las señales en δ 129.33 y 130.33 que correspondieron al doble de la intensidad observada para las señales de los metinos adicionales, así como las señales del carbono C-9 en δ 193.75 y C-10 de la antrona en δ 43.88. Los carbonos de la porción glicosídica presentaron casi el mismo desplazamiento que en el uveósido, δ 95.50 (C-1'), 81.88 (C-5'), 73.39 (C-3'), 70.69 (C-2') y 68.34 (C-4'); sin embargo, los carbonos aromáticos presentaron un cambio apreciable en sus desplazamientos ya que mientras en el uveósido C-2 se encontró en δ 116.44, en el 10-*epi*-uveósido se presentó en δ 117.17, de igual manera sucedió con C-4 que pasó de δ 119.98 en el uveósido a δ 122.38 en el 10-*epi*-uveósido; en cambio los carbonos C-5 y C-7 pasaron de δ 121.22 y 116.93 en el uveósido a δ 119.01 y 116.26 en su diastereoisómero (Fig. 15 y 16).

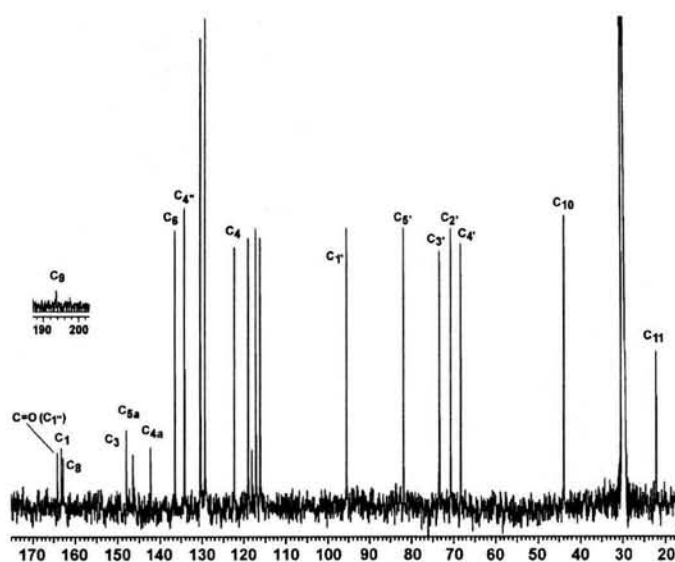


Fig. 15. Espectro de RMN- ^{13}C del 10-*epi*-uveósido (**2**) [(CD₃)₂CO]

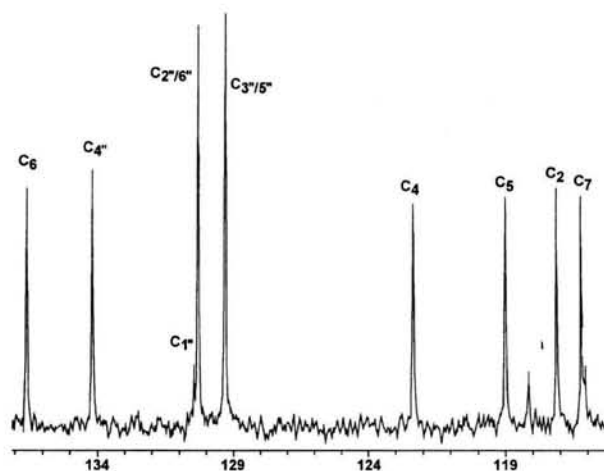


Fig. 16. Ampliación de la zona aromática del espectro de RMN- ^{13}C del 10-*epi*-veósido (**2**) [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$]

En el espectro de correlación homonuclear ^1H - ^1H de este compuesto (Fig. 17) se presentaron las siguientes relaciones: los protones en δ 6.73 (H-2) y en δ 7.04 (H-4) mostraron conexión entre ellos y con el metilo en δ 2.37, los protones en δ 6.66 (H-7), 6.88 (H-5) y 7.14 (H-6) exhibieron una correspondencia entre ellos; el protón en δ 4.67 (H-10) mostró relación con los protones en δ 7.04 (H-4) y 4.00 (H-5'), el protón en δ 5.89 (H-1') presentó interacciones con los protones en δ 3.87 (H-2') y 3.85 (H-3'), el protón en δ 3.87 (H-2') tuvo relación con las señales en δ 5.89 (H-1') y 4.19 (OH-2'); la señal en δ 3.85 (H-3') además de la interacción con δ 5.89 (H-1') y 4.19 (OH-2'); la señal en δ 3.85 (H-3') además de la interacción con δ 3.67 (H-4') presentó una interacción con la señal en δ 3.98 (OH-3'); la señal en δ 3.67 (H-4') presentó interacciones con las señales en δ 3.85 (H-3'), 4.00 (H-5') y 4.51 (OH-4'); el protón en δ 4.00 (H-5') mostró relaciones con las señales en δ 3.67 (H-4') y 4.67 (H-10), las señales del benzoato, δ 7.82 (H-2''/H-6''), 7.49 (H-3''/H-5'') y 7.64 (H-4''), presentaron correlación entre ellas.

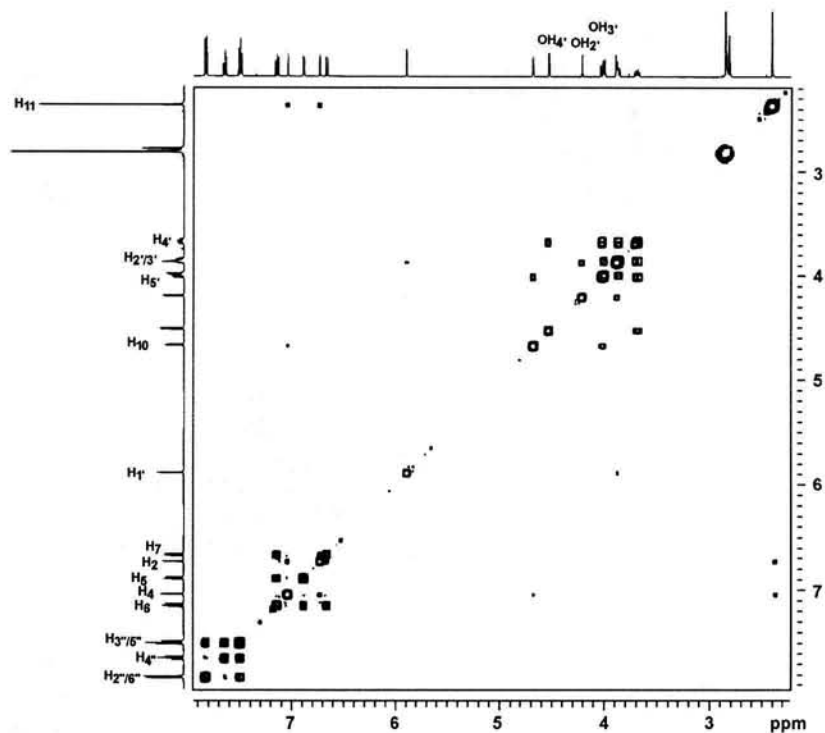


Fig. 17. Espectro de correlación ^1H - ^1H del 10-*epi*-uveósido (2).

La asignación de los carbonos se hizo gracias al experimento HMQC (Fig. 18) para los que soportaron protones y HMBC (Fig. 19) para los cuaternarios. La Fig. 20 ilustra una ampliación del experimento HMBC y se puede observar que la señal del carbonilo del grupo benzoato (δ 164.23) esta correlacionado a tres enlaces con los protones en δ 7.82 (H-2'' y H-6'') y 5.89 (H-1'); la señal en δ 162.87 muestra relación a dos enlaces con el hidroxilo en δ 12.01 (OH-8).

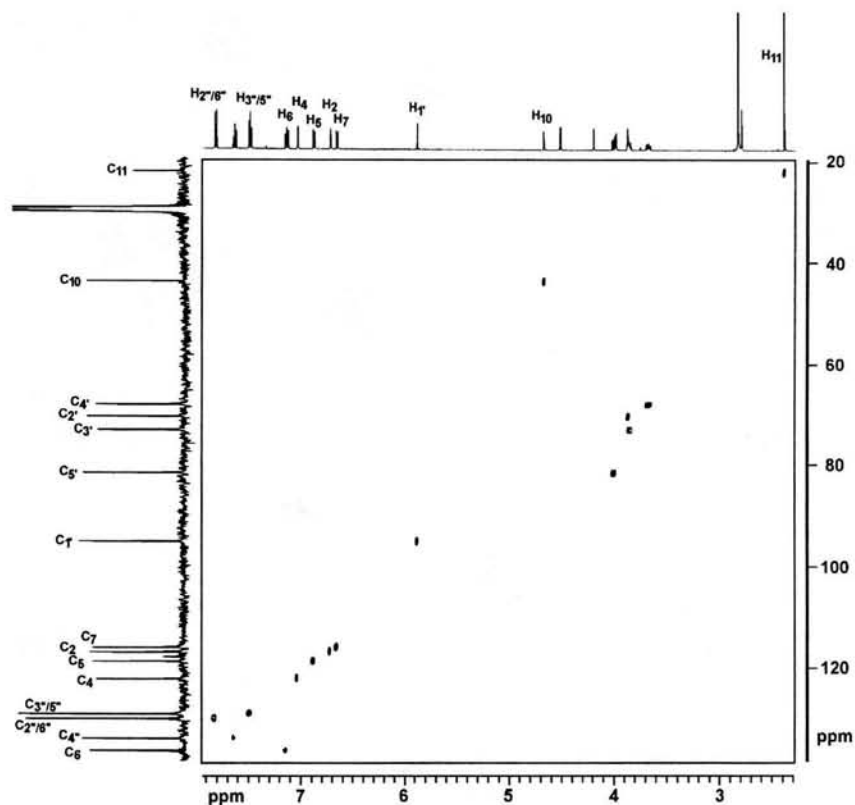


Fig. 18. Experimento HMQC del 10-*epi*-uveósido (2).

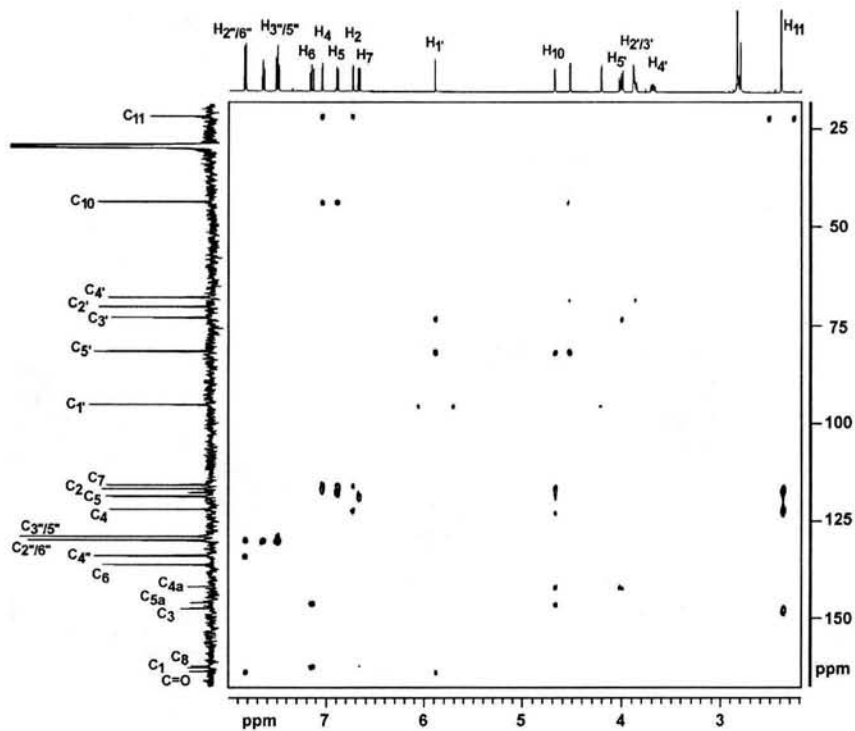


Fig. 19. Espectro HMBC del 10-*epi*-uveósido (2).

También, se observó una correlación a tres enlaces con el protón H-6 en δ 7.14, por lo que esta señal correspondió a C-8, de tal manera que la señal en δ 163.26 perteneció a C-1 y sólo mostró una relación a dos enlaces con el hidroxilo en δ 11.95 (OH-1). Las señales en δ 146.45 y 142.29 pertenecieron a los carbonos C-5a y C-4a, respectivamente, ya que la primera presentó una conexión a tres y dos enlaces con las señales en δ 7.14 (H-7) y 4.67 (H-10); mientras que la segunda exhibió relaciones a dos y tres enlaces con los protones H-10 en δ 4.67 y H-5' en δ 4.00, respectivamente. El carbono C-8a fue asignado a la señal en δ 118.15 ya que presentó conectividades a tres enlaces con los protones H-5 en δ 6.88 y H-10 en δ 4.67, y a dos enlaces con el hidroxilo en δ 12.01 (OH-8); la señal para C-1a se asignó en δ 116.10 debido a que esta señal mostró conexiones a tres enlaces con el hidroxilo en δ 11.95 (OH-1), con el protón H-2 en δ 6.73 y con el protón H-4 en δ 7.04. En la tabla 6 se presentan los desplazamientos de todos los protones y carbonos del 10-*epi*-uveósido.

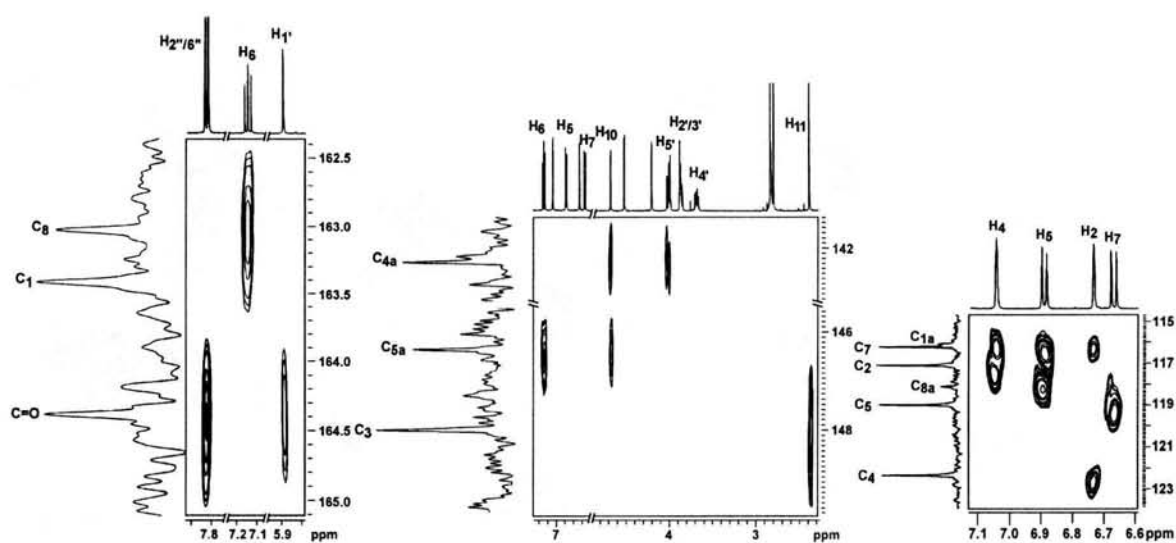


Fig. 20. Ampliaciones del espectro HMBC del 10-*epi*-uveósido (2).

Posición	δ_c (ppm)	Conectividad $^1H/^{13}C$ (δ , ppm)	Conectividad $^1H/^{13}C$ [enlaces]	Conectividad $^1H/^1H$ (δ , ppm)	Multiplicidad RMN- 1H (J en Hz)
1	163.26		OH-1 (11.95) [2]		
1a	116.10		OH-1 (11.95) [3], H-2 (6.73) [3], H-4 (7.04) [3]		
2	117.15	H-2 (6.73)	OH-1 (11.95) [3], H-4 (7.04) [3], H-11 (2.37) [3]	H-4 (7.04), H-11 (2.37)	dd (1.3, 0.7)
3	148.01		H-11 (2.37) [2]		
4	122.38	H-4 (7.04)	H-2 (6.73) [3], H-11 (2.37) [3], H-10 (4.67) [3]	H-2 (6.73), H-11 (2.37)	dd (1.4, 0.7)
4a	142.29		H-10 (4.67) [2], H-5' (4.00) [3]		
5	119.01	H-5 (6.88)	H-7 (6.66) [3], H-10 (4.67) [3]	H-6 (7.14), H-7 (6.66)	ddd (7.5, 0.9, 0.9)
5a	146.45		H-6 (7.14) [3], H-10 (4.67) [2]		
6	136.60	H-6 (7.14)	*	H-5 (6.88), H-7 (6.66)	t (8.0)
7	116.26	H-7 (6.66)	OH-8 (12.01) [3], H-5 (6.68) [3]	H-5 (6.88), H-6 (7.14)	dd (8.4, 1.1)
8	162.87		OH-8 (12.01) [2], H-6 (7.14) [3]		
8a	118.15		OH-8 (12.01) [3], H-5 (6.88) [3], H-10 (4.67) [3]		
9	193.75		*		
10	43.88	H-10 (4.67)	H-5 (6.88) [3], H-4 (7.04) [3]	H-4 (7.04), H-5' (4.00)	d (2.4)
11	22.15	H-11 (2.37)	H-2 (6.72) [3], H-4 (7.04) [3]	H-2 (6.73), H-4 (7.04)	s
1'	95.50	H-1' (5.89)	OH-2' (4.19) [3]	H-2' (3.87), H-3' (3.85)	d (1.2)
2'	70.69	H-2' (3.87)	*	H-1' (5.89), OH-2' (4.19)	m
3'	73.39	H-3' (3.85)	H-1' (5.89) [3], H-5' (4.00) [3]	H-4' (3.67), OH-3' (3.98)	m
4'	68.34	H-4' (3.67)	OH-4' (4.51) [2], H-2' (3.87) [3]	H-3' (3.85), H-5' (4.00), OH-4' (4.51)	ddd (9.9, 8.8, 5.1)
5'	81.88	H-5' (4.00)	H-1' (5.89) [3], H-10 (4.67) [2], OH-4' (4.51) [3]	H-4' (3.67), H-10 (4.67)	dd (10.0, 2.5)
1'' (C=O)	164.23		H-1' (5.89) [3], H-2'' y H-6'' (7.82) [3]		
1''	130.47		H-3'' y H-5'' (7.49) [3]		
2'', 6'' ^a	130.33 ^a	H-2'' y H-6'' (7.82)	H-2'' y H-6'' (7.82) [2], H-4'' (7.64) [3]	H-3'' y H-5'' (7.49), H-4'' (7.64)	m
3'', 5'' ^a	129.33 ^a	H-3'' y H-5'' (7.49)	H-3'' y H-5'' (7.49) [3]	H-2'' y H-6'' (7.82), H-4'' (7.64)	m
4''	134.21	H-4'' (7.64)	H-2'' y H-6'' (7.82) [3]	H-2'' y H-6'' (7.82), H-3'' y H-5'' (7.49)	dddd (7.9, 7.1, 1.4, 1.3)

Tabla 6. Datos espectrales para el compuesto 10-*epi*-uveósido (2).

RMN- ^{13}C a 125.7 MHz; RMN- 1H a 500 MHz; en $(CD_3)_2CO$.

Las asignaciones fueron confirmadas por experimentos COSY, HMQC y HMBC.

^a La intensidad de esta señales es del doble que otras señales para CH.

* No observado.

6.1.3. Caracterización del desoximayósido (3, picramniósido D) y del desoxisarósido (4, picramniósido E).

La descripción de este par de compuestos se hace de manera conjunta ya que también son diastereoisómeros. Los resultados espectroscópicos de este par de isómeros muestra un patrón semejante al de las oxantronas aisladas con anterioridad de esta especie, mayósido y sarósido,⁶⁹ con la diferencia lógica de la presencia de la señal correspondiente al protón H-10, característico de una antrona, por eso los nombres desoximayósido y desoxisarósido para este par de diasterómeros. Estos metabolitos se describen incorrectamente, de *P. teapensis*, como picramniosido D y picramniosido E,⁷¹ ya que se asigna como xilosa a la porción glicosídica y, como se va discutir en el apartado 6.1.4, es la lixosa el monosacárido que contiene.⁷²

El compuesto denominado desoximayósido (3) se obtuvo en forma de agujas de color amarillo pálido con un punto de fusión de 242-244 °C, en una proporción del 0.51% en relación con el peso del extracto; mientras que el denominado desoxisarósido (4) se aisló como agujas de color amarillo pálido (beige) con un punto de fusión de 250-252 °C, en una proporción del 0.30% en relación con el peso del extracto. Los espectros de IR de ambos compuestos mostraron semejanzas con los de las antronas descritas anteriormente, es decir, presentaron las absorciones típicas de hidroxilos, carbonilos de éster y carbonilos enlazados de forma intramolecular con protones de hidroxilos, para el desoximayósido en 3362, 1713 y 1622 cm^{-1} y para el desoxisarósido en 3429, 1710 y 1622 cm^{-1} , respectivamente.

Los espectros de RMN-¹H (Fig. 21), al igual que los de IR, muestran similitudes en las señales entre ellos así como con las antronas descritas líneas arriba, sobre todo en lo referente a las dos señales para hidroxilos en las posiciones C8 y C1^{159,160}, desplazadas a δ 12.26 y 12.12 ppm para el desoximayósido y en δ 12.35 y 12.10 ppm para el desoxisarósido, debidas al enlazamiento intramolecular con el oxígeno del carbonilo C9; asimismo las señales debidas al grupo benzoato alrededor de δ 7.85 (2H, m, H-2" y H-6"), 7.61 (1H, dddd, 7.5, 7.5, 1.5, 1.5 Hz, H-4"), 7.48 (2H, m, H-3" y H-5") para el desoximayósido y δ 7.84 (2H, m, H-2" y H-6"), 7.64 (1H, dddd, 7.5, 7.5, 1.5, 1.5 Hz, H-4"), 7.50 (2H, m, H-3" y H-5") para el desoxisarósido. Sin embargo, el núcleo antraquinóide básico cambia, con respecto al par de antronas diastereoméricas detalladas antes, ya que ambos espectros exhiben señales para cuatro protones característicos de un sistema aromático como la emodina:¹³⁹ un par de señales dobles de dobles, para el desoximayósido en δ 6.13 y 6.46 ppm (1H cada una, 2.5 y 0.7 Hz, H-2 y H-4, respectivamente) y en δ 6.31 y 6.72 ppm (1H cada una, 2.0 y 1.0 Hz, H-2 y H-4, respectivamente) para el desoxisarósido; además de un par de señales dobles, para el desoximayósido en δ 6.76 y en 6.97 ppm (1H cada una, 0.5 Hz, H-7 y H-5, respectivamente) y en δ 6.43 y 6.62 ppm (1H cada una, 0.5 Hz, H-7 y H-5, respectivamente) para el desoxisarósido.

De la misma manera, se pueden observar las señales de los protones anoméricos de una porción glicosídica en δ 5.91 ppm (1H, d, 1.5 Hz, H-1') y 5.86 ppm (1H, s, H-1') así como las señales distintivas de una antrona en δ 4.55 ppm (1H, d, 2.0 Hz, H-10) y 4.54 ppm (1H, d, 3.0 Hz, H-10) para el desoximayósido y

desoxisarósido, respectivamente. La fracción glicosídica de ambos compuestos permite visualizar y diferenciar muy bien cuatro protones con desplazamientos químicos casi idénticos en: δ 4.04 (1H, dd, 9.8 y 2.3 Hz, H-5'), en δ 3.88 (1H, br, H-2'), 3.84 (1H, dd, 9.0 y 4.0 Hz, H-3') y 3.69 (1H, t, 9.5 Hz, H-4') para el desoximayósido; mientras que para el desoxisarósido se presentan en δ 4.03 (1H, dd, 10.0 y 2.5 Hz, H-5'), en 3.90 (1H, br, H-2'), en 3.91 (1H, dd, 8.5 y 3.5 Hz, H-3') y en δ 3.77 (1H, t, 9.3 Hz, H-4'). El desplazamiento químico de la parte glicosídica es similar, también, a la que poseen el par de antranas diastereoméricas descritas antes. Finalmente, aparecen las señales simples (3H, s, H-11), para el desoximayósido en δ 2.33 y para el desoxisarósido en δ 1.84, desplazamientos congruentes con un metilo aromático.

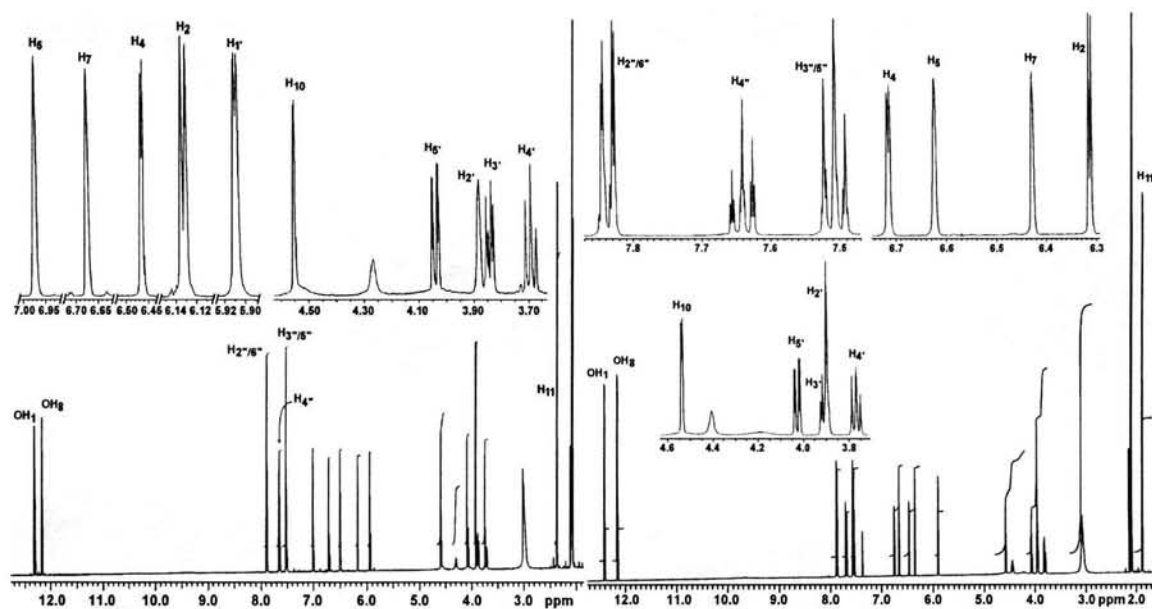


Fig. 21. Espectros de RMN-¹H del desoximayósido (izquierda) y del desoxisarósido (derecha).

Como en el compuesto denominado uveósido, tanto los protones H-5 (δ 6.62) como H-7 (δ 6.43), así como el metilo en δ 1.84 del desoxisarósido se encuentran bajo el efecto diamagnético del grupo benzoato, denotando con ello la diferencia de configuración en el centro estereogénico C-10 de ambas antronas.

Los espectros de correlación homonuclear ^1H - ^1H de estos compuestos (Fig. 22) evidenciaron las conexiones en ambos metabolitos, entre los protones H-2'' y H-6'' (cerca de δ 7.85), con los protones H-3'' y H-5'' (cerca de δ 7.50), y H-4'' (δ 7.60) del grupo benzoato; igualmente, muestran la conexión entre los protones aromáticos H-5 y H-7 y de éstos con el metilo indicando con ello que el grupo metilo se encuentra entre estos protones.

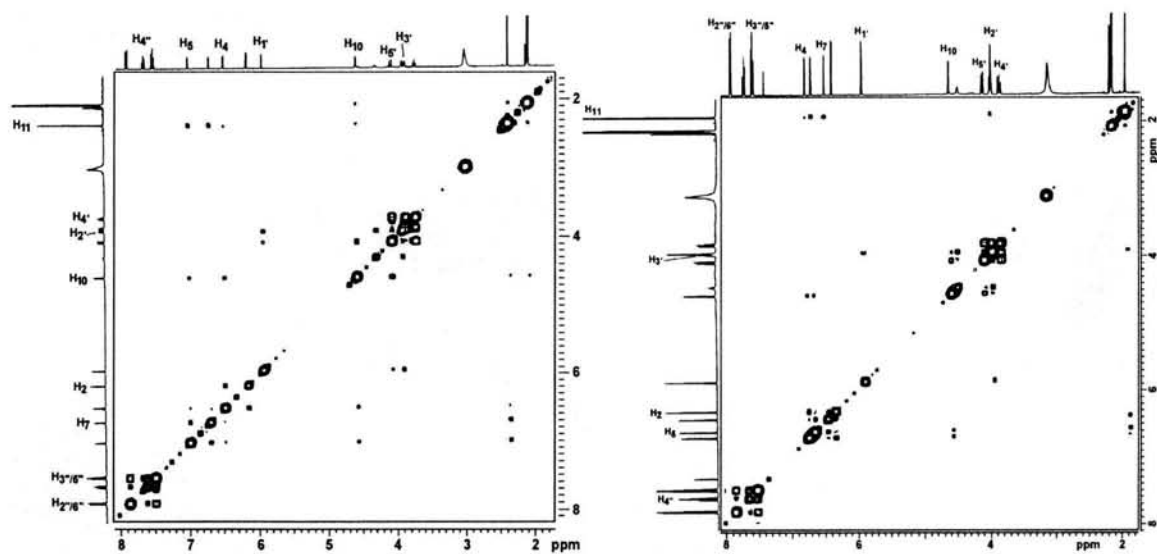


Fig. 22. Espectros de correlación ^1H - ^1H desoximayósido (izquierda) y del desoxisarósido (derecha).

Igualmente, se puede apreciar la relación entre los protones característicos de una antrona,^{153,161} H-10, con los protones aromáticos H-5 y H-4 así como con un protón del glicósido presente evidenciando la unión de la antrona con el glicósido mediante el enlace C-10 de la antrona con C-5' del glicósido. El protón anomérico del desoximayósido en δ 5.91 (H-1') muestra correlación con los protones en δ 4.04 (H-5') y en δ 3.88 (H-2'), mientras que el protón anomérico (H-1') del desoxisarósido sólo muestra correlación con el protón H-2' en δ 3.90.

Los espectros de RMN-¹³C de estos compuestos (Fig. 23) presentaron veinticinco señales para veintisiete carbonos ya que las señales correspondientes a los carbonos C-2"/C-6" y C-3"/C-5" del esqueleto del benzoato coincidieron, mostrando dos señales del doble de intensidad que las que exhiben los grupos metino restantes en, aproximadamente, δ 130.23 y 129.40, respectivamente.

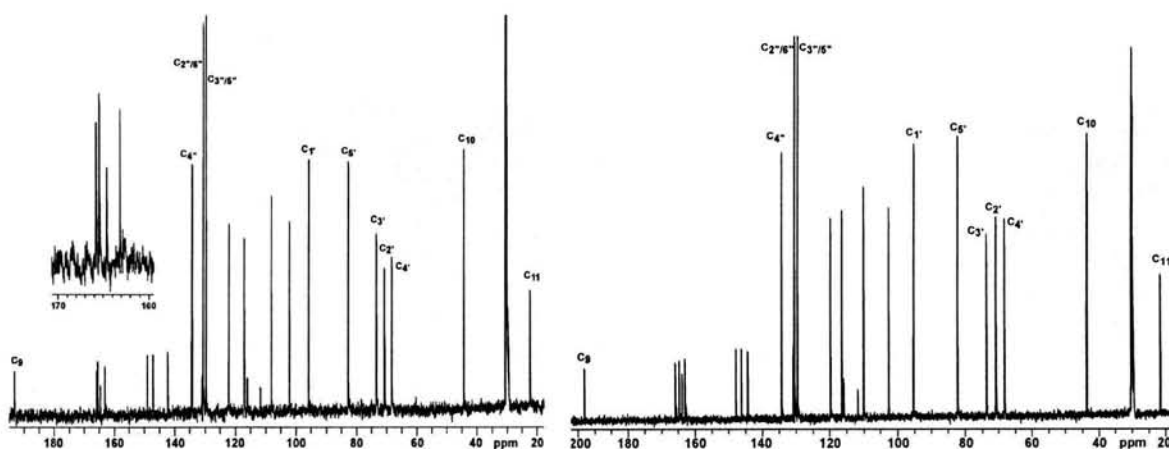


Fig. 23. Espectros de RMN-¹³C del desoximayósido (izquierda) y del desoxisarósido (derecha).

Las señales correspondientes al núcleo básico de la antrona permanecieron con desplazamientos parecidos entre ellos. Igualmente, las señales para los carbonos de la porción glicosídica presentaron casi el mismo desplazamiento que las antronas descritas anteriormente.

La asignación de los carbonos que soportan protones se realizó mediante el espectro de correlación heteronuclear ^1H - ^{13}C , experimento HMQC (Fig. 24) de tal forma que se pudieron determinar perfectamente los carbonos aromáticos C-5 ($\Delta\delta$ 0.35) en δ 122.10 para el desoximayósido y en δ 119.69 para el desoxisarósido; C-7 ($\Delta\delta$ 0.24) en δ 117.02 para el desoximayósido y en δ 116.28 para el desoxisarósido; C-4 ($\Delta\delta$ 0.26) en δ 107.86 para el desoximayósido y en δ 110.09 para el desoxisarósido; y C-2 ($\Delta\delta$ 0.18) en δ 101.95 para el desoximayósido y en δ 102.57 para el desoxisarósido.

Como puede notarse, la diferencia en desplazamiento de los carbonos que soportan protones se debe al efecto diamagnético que ejerce el anillo aromático del grupo benzoato cuando se encuentra sobre el grupo hidroxilo en C-3 para el desoximayósido, o cuando se encuentra sobre el grupo Me en C-6 para el desoxisarósido.

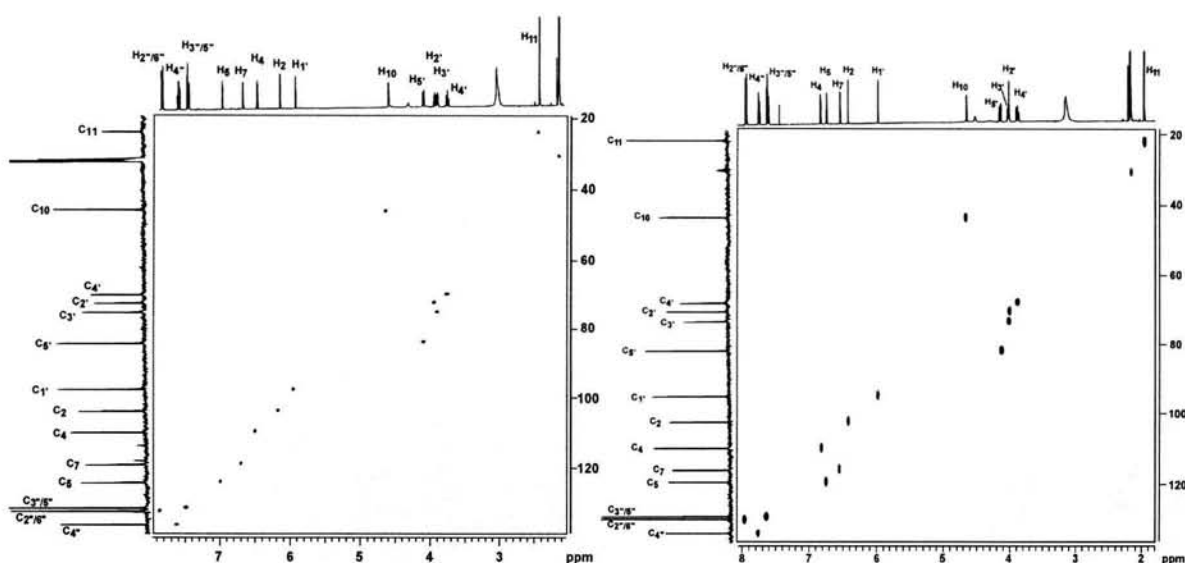


Fig. 24. Espectros de correlación ^1H - ^{13}C (HMQC) del desoximayósido (izquierda) y del desoxisarósido (derecha).

El experimento HMBC (Fig. 25) permitió la corroboración de las asignaciones descritas líneas arriba así como la de los carbonos restantes de ambas moléculas.

En las figuras 26 y 27 se muestran ampliaciones de estos espectros del desoximayósido y desoxisarósido, respectivamente; en las ampliaciones de la izquierda, se pueden apreciar claramente que las señales a campo bajo corresponden a C-1 ya que sólo muestran conexión a dos enlaces con el hidroxilo (OH-1); las siguientes a C-3, ya que ambas exhiben relación a dos enlaces con los protones H-2 y H-4; las siguientes al C=O del benzoato, porque presentan interacciones a tres enlaces con los protones H-2'' y H-6'' y con H-1'; finalmente, las que se encuentran alrededor de δ 163.00 corresponden a C-8 ya que ambas están relacionadas a dos enlaces con las señales de uno de los hidroxilos (OH-8)

y con H-7. Los carbonos C-4a y C-5a de ambas antronas no pudieron ser asignados ya que uno y otro mostraron conexiones a dos y tres enlaces con H-10 y con H-5', respectivamente. Por lo que tanto, los desplazamientos en δ 148.88 y 141.94 para el desoximayósido como en δ 146.10 y 144.28 para el desoxisarósido, pueden ser intercambiables para este par de carbonos; las señales correspondientes a los carbonos C-6 de ambos compuestos, se establecieron con base en la correlación a dos enlaces que manifestaron con el metilo, el desoximayósido únicamente mostró este nexo, mientras que el desoxisarósido además desplegó otra conexión con H-5, también a dos enlaces.

Con respecto a las señales de los carbonos C-1'', solamente la correspondiente al desoximayósido en δ 130.53 mostró conexión a tres enlaces con la señal para los protones H-3''/H-5'' en δ 7.48, la señal para este carbono del desoxisarósido no exhibió ninguna correlación.

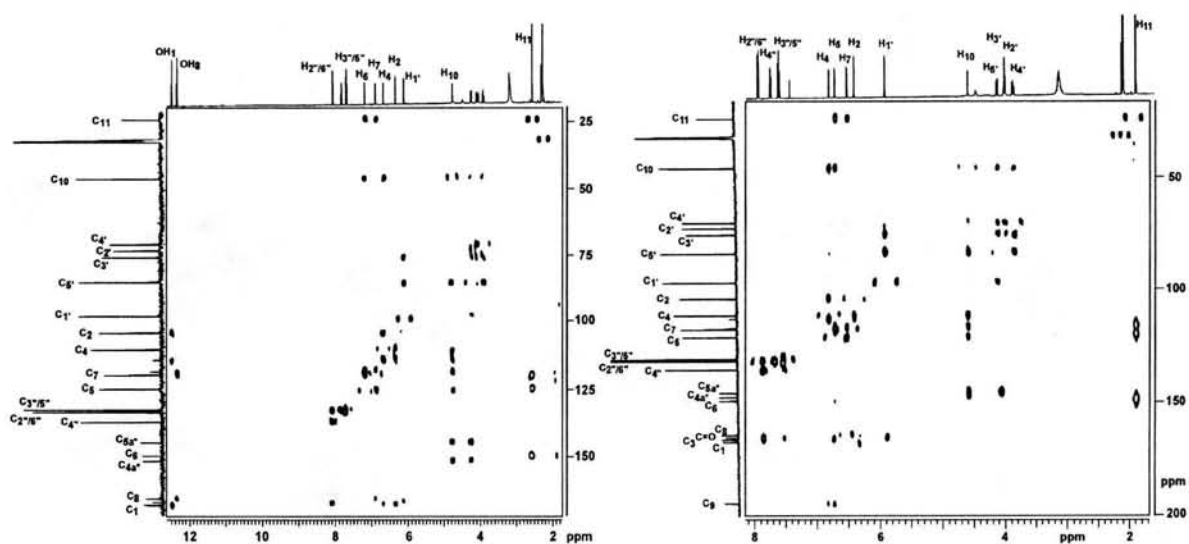


Fig. 25. Espectros HMBC del desoximayósido (izquierda) y del desoxisarósido (derecha).

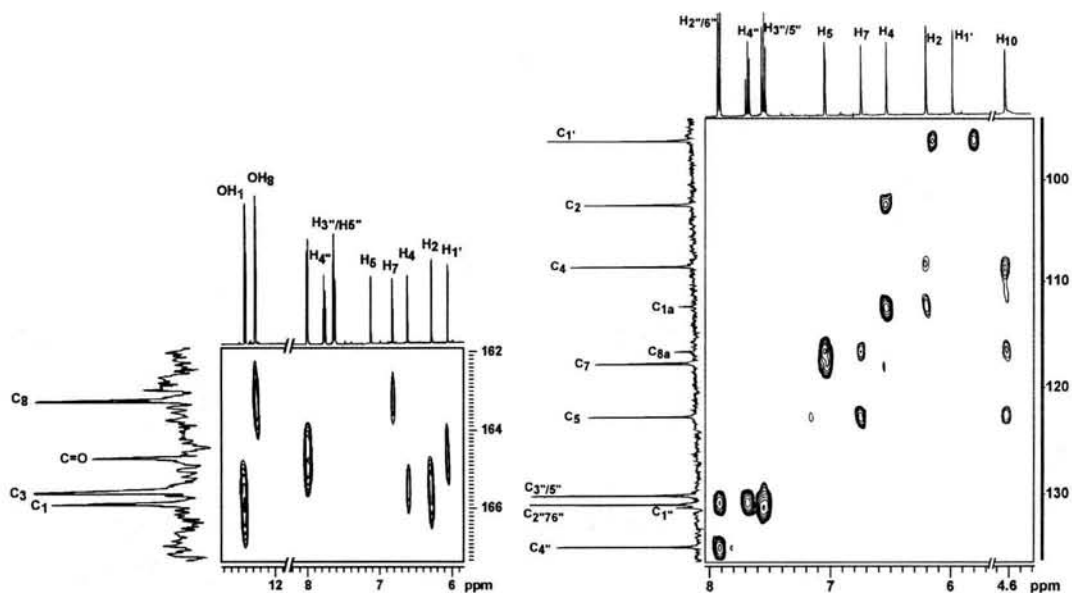


Fig. 26. Ampliaciones del espectro HMBC del desoximayósido.

Las señales correspondientes a los carbonos cuaternarios C-8a y C-1a pudieron asignarse en δ 115.87 y 111.63, respectivamente, para el desoximayósido; y en δ 115.74 y 111.68, respectivamente, para el desoxisarósido; C-8a presentó interacciones a tres enlaces con los protones H-5, H-7 y H-10 mientras que C-1a mostró conexiones con los protones H-2, H-4 y H-10, para ambos compuestos, además tanto C-1a como C-8a del desoximayósido exhibieron interacciones a tres enlaces con los grupos OH-1 y OH-8. Todas las asignaciones, tanto de protones como de carbonos de la molécula del desoximayósido se muestran en la tabla 7 y las del desoxisarósido en la tabla 8.

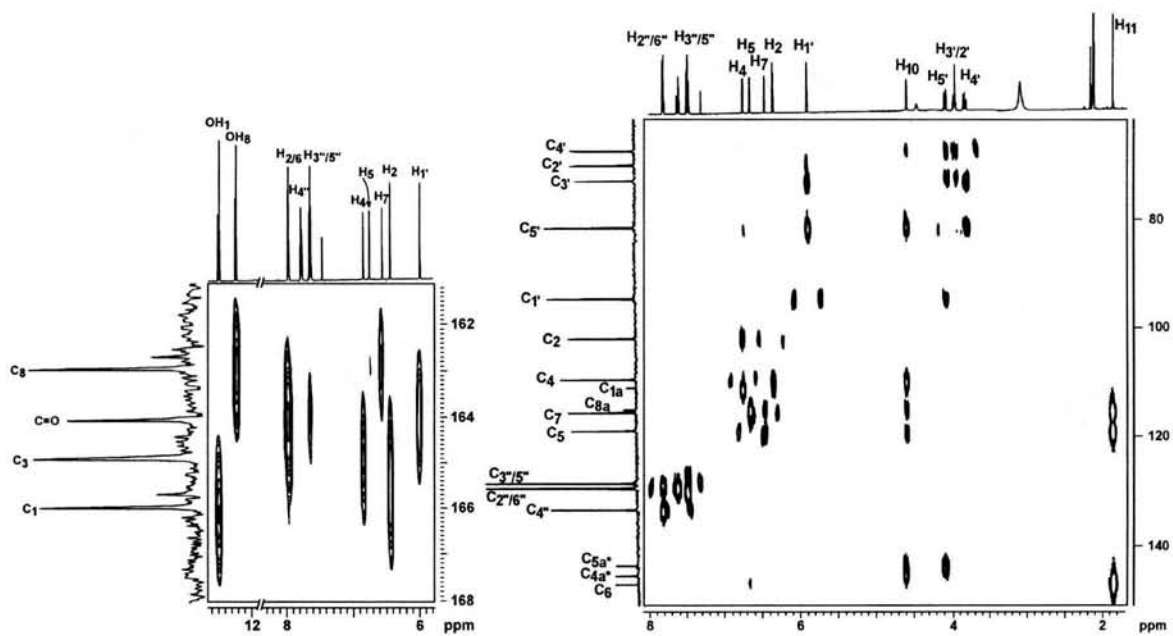


Fig. 27. Ampliaciones del espectro HMBC del desoxisarósido.

Posición	δ_c (ppm)	Conectividad $^1H/^{13}C$ (δ , ppm)	Conectividad $^1H/^{13}C$ [enlaces]	Conectividad $^1H/^1H$ (δ , ppm)	Multiplicidad RMN- 1H (J en Hz)
1	165.63		OH-1 (12.26) [2]		
1a	111.63		OH-1 (12.26) [3], H-2 (6.13) [3], H-4 (6.46) [3], H-10 (4.55) [3]		
2	101.95	H-2 (6.13)	OH-1 (12.26) [3], H-4 (6.46) [3]	H-4 (6.46)	dd (2.5, 0.7)
3	165.33		H-2 (6.13) [2], H-4 (6.46) [2]		
4	107.86	H-4 (6.46)	H-2 (6.13) [3], H-10 (4.55) [3]	H-2 (6.13), H-10 (4.55)	dd (2.5, 0.7)
4a	141.94 ^a		H-10 (4.55) [2], H-5' (4.04) [3]		
5	122.10	H-5 (6.97)	H-7 (6.67) [3], H-10 (4.55) [3], H- 11 (2.33) [3]	H-7 (6.67), H-10 (4.55), H-11 (2.33)	d (0.5)
5a	148.88 ^a		H-10 (4.55) [2], H-5' (4.04) [3]		
6	146.95		H-11 (2.33) [2]		
7	117.02	H-7 (6.67)	OH-8 (12.12) [3], H-5 (6.97) [3], H-11 (2.33) [3]	H-5 (6.97), H-11 (2.33)	d (0.5)
8	163.00		OH-8 (12.12) [2], H-7 (6.67) [2]		
8a	115.87		OH-8 (12.12) [3], H-5 (6.97) [3], H-7 (6.67) [3], H-10 (4.55) [3]		
9	193.04		*		
10	44.14	H-10 (4.55)	H-5 (6.97) [3], H-4 (6.46) [3]	H-5 (6.97), H-4 (6.46), H- 5' (4.04)	d (2.0)
11	22.05	H-11 (2.33)	H-5 (6.97) [3], H-7 (6.67) [3]	H-5 (6.97), H-7 (6.67)	s
1'	95.70	H-1' (5.91)	H-5' (4.04) [3]	H-5' (4.04), H-2' (3.88)	d (1.5)
2'	70.64	H-2' (3.88)	*	H-1' (5.91)	br
3'	73.30	H-3' (3.84)	H-1' (5.91) [3], H-2' (3.88) [2], H-4' (3.69) [2]	H-4' (3.69)	dd (9.0, 4.0)
4'	68.25	H-4' (3.69)	H-2' (3.88) [3], H-3' (3.84) [2]	H-5' (4.04), H-3' (3.84)	t (9.5)
5'	82.52	H-5' (4.04)	H-1' (5.91) [3], H-10 (4.55) [2], H-4' (3.69) [2]	H-1' (5.91), H-10 (4.55), H-4' (3.69)	dd (9.8, 2.3)
1'' (C=O)	164.46		H-2'' y H-6'' (7.85) [3], H-1' (5.91) [3]		
1''	130.53		H-3'' y H-5'' (7.48) [3],		
2'', 6''	130.22 ^b	H-2'' y H-6'' (7.85)	H-2'' y H-6'' (7.87) [3], H-4'' (7.61) [3],	H-3'' y H-5'' (7.48), H-4'' (7.61)	m
3'', 5''	129.40 ^b	H-3'' y H-5'' (7.48)	H-3'' y H-5'' (7.48) [3]	H-2'' y H-6'' (7.87), H-4'' (7.61)	m
4''	134.11	H-4'' (7.61)	H-2'' y H-6'' (7.85) [3]	H-2'' y H-6'' (7.85), H-3'' y H-5'' (7.48)	dddd (7.5, 7.5, 1.5, 1.5)

Tabla 7. Datos espectrales para el compuesto desoximayósido (3).

RMN- ^{13}C a 125.7 MHz; RMN- 1H a 500 MHz; en $(CD_3)_2CO$.

Las asignaciones fueron confirmadas por experimentos COSY, HMQC y HMBC.

^a Asignaciones intercambiables.

^b La intensidad de esta señales es del doble que otras señales para CH.

* No observado.

Posición	δ_c (ppm)	Conectividad $^1H/^{13}C$ (δ , ppm)	Conectividad $^1H/^{13}C$ [enlaces]	Conectividad $^1H/^1H$ (δ , ppm)	Multiplicidad RMN- 1H (J en Hz)
1	165.84		OH-1 (12.35) [2], H-2 (6.31) [2]		
1a	111.68		H-2 (6.31) [3], H-4 (6.72) [3], H-10 (4.54) [3]		
2	102.57	H-2 (6.31)	H-4 (6.72) [3]	H-4 (6.72)	dd (2.0, 1.0)
3	164.76		H-2 (6.31) [2], H-4 (6.72) [2]		
4	110.09	H-4 (6.72)	H2 (6.31) [3], H-10 (4.54) [3]	H-2 (6.31), H-10 (4.54)	dd (2.5, 1.0)
4a	146.10 ^a		H-10 (4.54) [2], H-5' (4.03) [3]		
5	119.69	H-5 (6.62)	H-7 (6.43) [3], H-10 (4.54) [3], H-11 (1.84) [3]	H-7 (6.43), H-10 (4.54), H-11 (1.84)	d (0.5)
5a	144.28 ^a		H-10 (4.54) [2], H-5' (4.03) [3]		
6	147.71		H-5 (6.62) [2], H-11 (1.84) [2]		
7	116.28	H-7 (6.43)	H-5 (6.62) [3], H-11 (1.84) [3]	H-5 (6.62), H-11 (1.84)	d (0.5)
8	162.80		OH-8 (12.10) [2], H-5 (6.62) [4], H-7 (6.43) [2]		
8a	115.74		H-5 (6.62) [3], H-7 (6.43) [3], H-10 (4.54) [3]		
9	193.03		H-4 (6.72) [4], H-5 (6.62) [4]		
10	43.56	H-10 (4.54)	H-4 (6.72) [3], H-5 (6.62) [3], H-4' (3.77) [3], H-5' (4.03) [2]	H-4 (6.72), H-5 (6.62) H-5' (4.03)	d (3.0)
11	21.49	H-11 (1.84)	H-5 (6.62) [3], H-7 (6.43) [3]	H-5 (6.62), H-7 (6.43)	s
1'	95.27	H-1' (5.86)	H-5' (4.03) [3]	H-2' (3.90)	s
2'	70.71	H-2' (3.90)	H-1' (5.86) [2]	H-1' (5.86)	br
3'	73.54	H-3' (3.91)	H-1' (5.86) [3], H-2' (3.92) [2], H-4' (3.77) [2], H-5' (4.03) [3]	H-4' (3.77)	dd (8.5, 3.5)
4'	68.13	H-4' (3.77)	H-10 (4.54) [3], H-2' (3.92) [3], H-3' (3.90) [2], H-5' (4.03) [2]	H-3' (3.91), H-5' (4.03)	t (9.3)
5'	82.15	H-5' (4.03)	H-1' (5.86) [3], H-10 (4.54) [2], H-4' (3.77) [2], H-4 (6.72) [4]	H-4' (3.77), H-10 (4.54)	dd (10.0, 2.5)
1" (C=O)	163.92		H-1' (5.86) [3], H-2", 6" (7.84) [3], H-3", H-5" (7.50) [4]		
1"	130.42		*		
2", 6"	130.23 ^b	H-2" y H-6" (7.84)	H-2", H-6" (7.84) [3], H-4" (7.64) [3]	H-3", H-5" (7.50), H-4" (7.64)	m
3", 5"	129.38 ^b	H-3" y H-5" (7.50)	H-3", H-5" (7.50) [3], H-4" (7.64) [3]	H-2", H-6" (7.84), H-4" (7.64)	m
4"	134.12	H-4" (7.64)	H-2", H-6" (7.84) [3]	H-3", H-5" (7.50), H-2", H-6" (7.84)	dddd (7.5, 7.5, 1.5, 1.5)

Tabla 8. Datos espectrales para el compuesto desoxisarósido (4).

RMN- ^{13}C a 125.7 MHz; RMN- 1H a 500 MHz; en $(CD_3)_2CO$.

Las asignaciones fueron confirmadas por experimentos COSY, HMQC y HMBC.

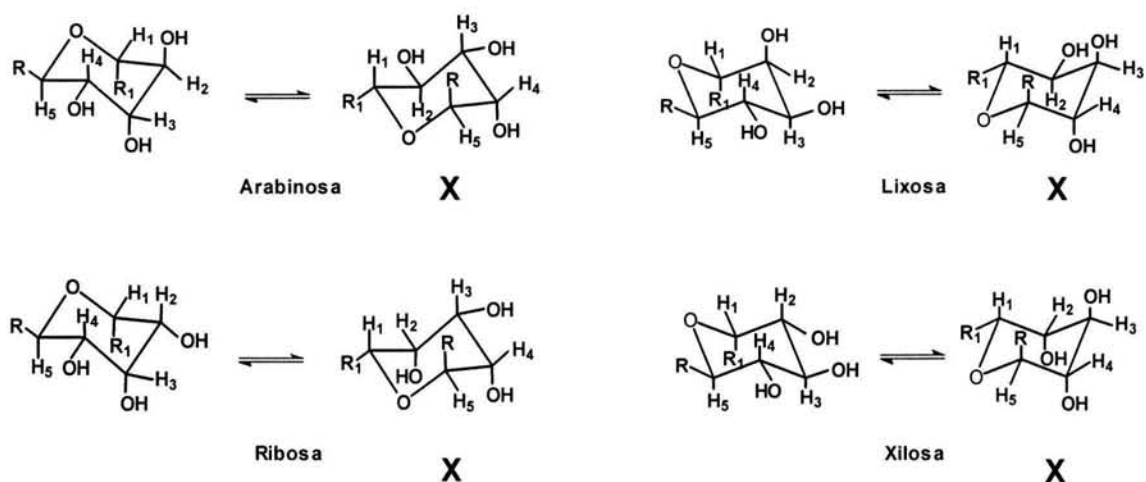
^a Asignaciones intercambiables.

^b La intensidad de esta señales es del doble que otras señales para CH.

* No observado.

6.1.4. Caracterización del fragmento glicosídico.

Para caracterizar la parte glicosídica de estas antronas, y puesto que sólo se presentaron cinco señales para igual número de carbonos en cada uno de los espectros de RMN-¹³C, se realizó un análisis de las cuatro posibles pentosas que podrían encontrarse formando parte de la molécula en cuestión: ribosa, arabinosa, xilosa y lixosa.



Dadas las constantes de acoplamiento de los protones presentes en los fragmentos correspondientes al hidrato de carbono, se puede deducir lo siguiente:

- 1) La pentosa se encuentra unida a la antrona a través de un enlace C-10-C5' en cada uno de los compuestos, ya que como se mencionó con anterioridad en los espectros de HMBC de los mismos, se presentan acoplamientos a dos enlaces de los carbonos C-5' con el protón H-10 (Véase las tablas 5, 6, 7 y 8).
- 2) La multiplicidad de cada uno de los protones H-5' muestra señales doble de dobles con constantes de acoplamiento de entre 2.3 y 10.0 Hz (Fig. 28 y 29), la primera debida al acoplamiento con el protón H-10 y la segunda producida por el

acoplamiento con el protón H-4', las cuales indican que ambos protones guardan una relación axial entre sí e, igualmente, se puede deducir que la unión de la pentosa con la antrona es β .

3) El protón H-4', en el caso de uveósido y del 10-*epi*-uveósido (Fig. 28), presenta una señal doble de doble de dobles con constantes de acoplamiento de 9.9, 8.6 y 5.1 Hz y 9.9, 8.8 y 5.1 Hz, debidas a los acoplamientos con los protones H-5', H-3' y del OH-4', respectivamente. En cambio, en los espectros del desoximayósido y desoxisarósido (Fig. 29), el protón H-4' no muestra el acoplamiento con el hidroxilo OH-4', por lo que la multiplicidad de la señal producida por este protón es dd con constantes de acoplamiento de 9.5 y 9.3 Hz, mismas que son debidas a los acoplamientos con los protones H-5' y H-3, respectivamente. El valor de las constantes de entre 8.6 y 9.3 Hz indica que el protón H-3' también se encuentra axial. Estas observaciones descartan a las pentosas ribosa y arabinosa ya que en ambas estructuras el protón H-3 se encuentra ecuatorial.

4) El protón H-1', tanto en el espectro del uveósido como del desoxisarósido, aparentemente no muestra acoplamiento con el protón H-2'. Sin embargo, en los espectros del 10-*epi*-uveósido y del desoximayósido, se observa un pequeño acoplamiento de 1.2 y 1.5 Hz, respectivamente.

5) El carbono C-1' de la pentosa soporta al grupo benzoato, ya que el carbonilo de éste muestra una correlación a tres enlaces con el protón H-1' en las cuatro antronas.

6) Debido a que las señales para los protones H-2' y H-3' coinciden como una señal múltiple en δ 3.87 en el uveósido, y en δ 3.87 (H-2') y 3.85 (H-3') para el

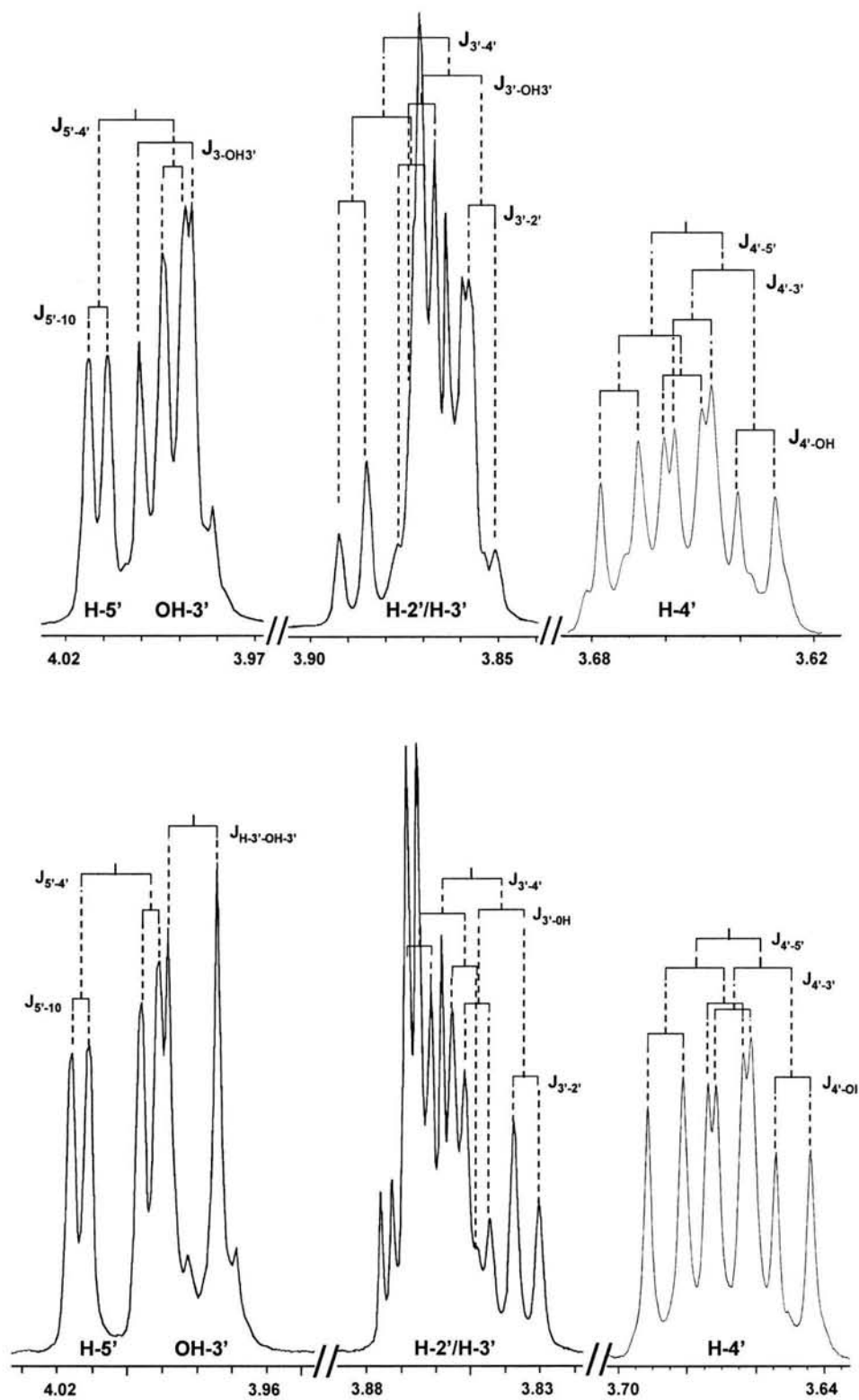


Fig. 28. Ampliaciones de los espectros de RMN- ^1H del uveósido (arriba) y del 10-*epi*-uveósido (abajo)

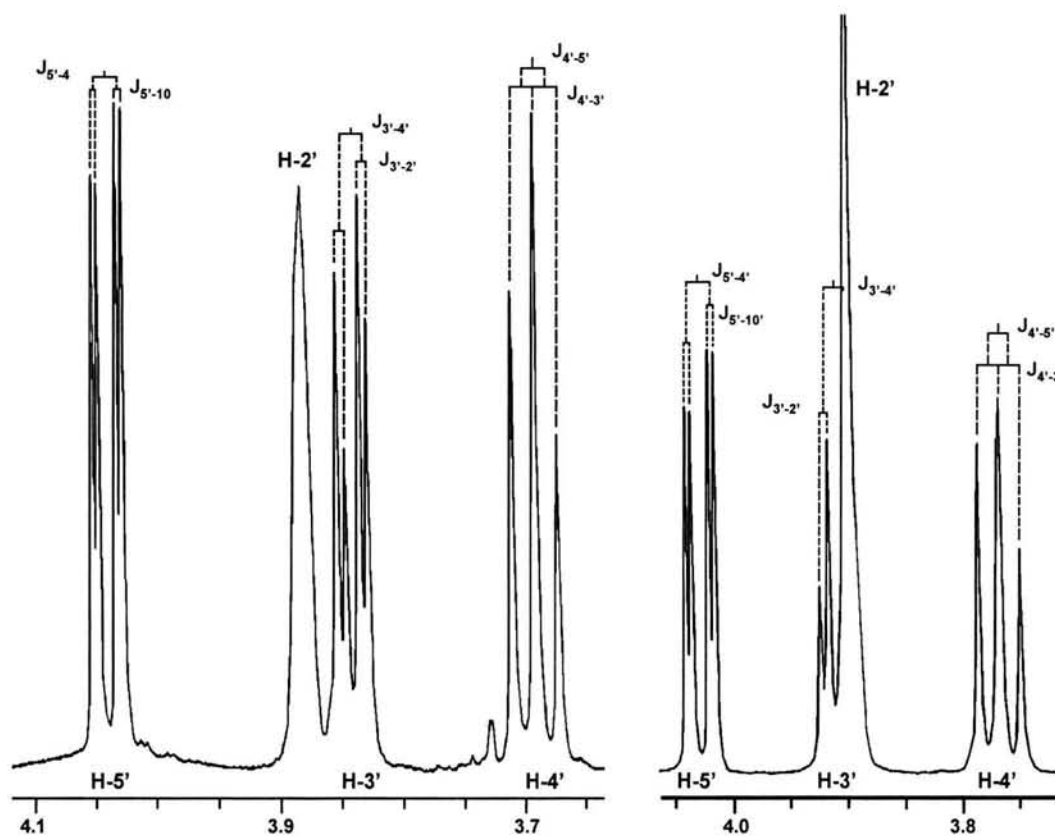


Fig. 29. Ampliaciones de los espectros de RMN-¹H del desoximayósido y del desoxisarósido.

10-*epi*-uveósido, no se puede obtener información precisa acerca de la posición que guarda el protón H-2'; sin embargo, la falta de una constante de acoplamiento entre los protones H-1' y H-2' para el uveósido y el desoxisarósido, y el valor pequeño de ésta en los espectros del 10-*epi*-uveósido y desoximayósido, permite suponer que tanto el protón H-1' como el protón H-2' se encuentran ecuatoriales ya que el grupo benzoato se debe encontrar en posición axial por el efecto anomérico.¹⁶¹

La pentosa que logra explicar los acoplamientos que se han discutido hasta aquí, es la *lixosa*, ya que la *xilosa* posee el protón H-2' en posición axial. En la elucidación estructural de los picramniósidos D (desoximayósido, **3**) y E

(desoxisarósido, **4**) equivocadamente se interpretó como xilosa a la porción glicosídica;⁷¹ sin embargo, esta asignación se rectificó⁷² cuando se publicó un estudio por cristalografía de rayos X de las oxantronas mayósido⁶⁶ y sarósido,⁶⁹ derivados 10-hidroxilados de este par de antronas, y en donde se observa claramente la estereoquímica relativa del monosacárido que presenta en su estructura y que concuerda con la lixosa (Fig. 30).

De esta manera, se puede afirmar que las antronas, uveósido (**1**), 10-*epi*-uveósido (**2**), desoximayósido (**3**) y desoxisarósido (**4**), y las oxantronas, mayósido y sarósido, aislados de las especies de *Picramnia* tienen como fragmento glicosídico en C-10 a la lixosa sustituida en C-1' con un benzoato. Desde el punto de vista biosintético, la existencia de estos glicósidos en la naturaleza se puede comprender considerando que un grupo reactivo, como un hidroxilo, se encuentra en la posición 1 del azúcar por lo que éste bien puede reaccionar con un grupo benzoato.

La existencia de este tipo de metabolitos en las especies de *Picramnia*, antronas y oxantronas unida en C-10 con una pentosa sustituida con grupos benzoato o acetato, es de gran valor taxonómico ya que hasta la fecha sólo se sabe de ellos en las especies de *Alvaradoa*¹⁶³ y *Picramnia*,^{64,66,68,69,71-74} lo que, aunado a la aparente ausencia de los metabolitos terpénicos conocidos como quasinoídes característicos de las especies de la familia Simaroubaceae, apoya la propuesta de elevar este género a una nueva familia, Picramniaceae,⁴⁶ misma que incluye a los géneros *Picramnia* y *Alvaradoa*.⁴⁷

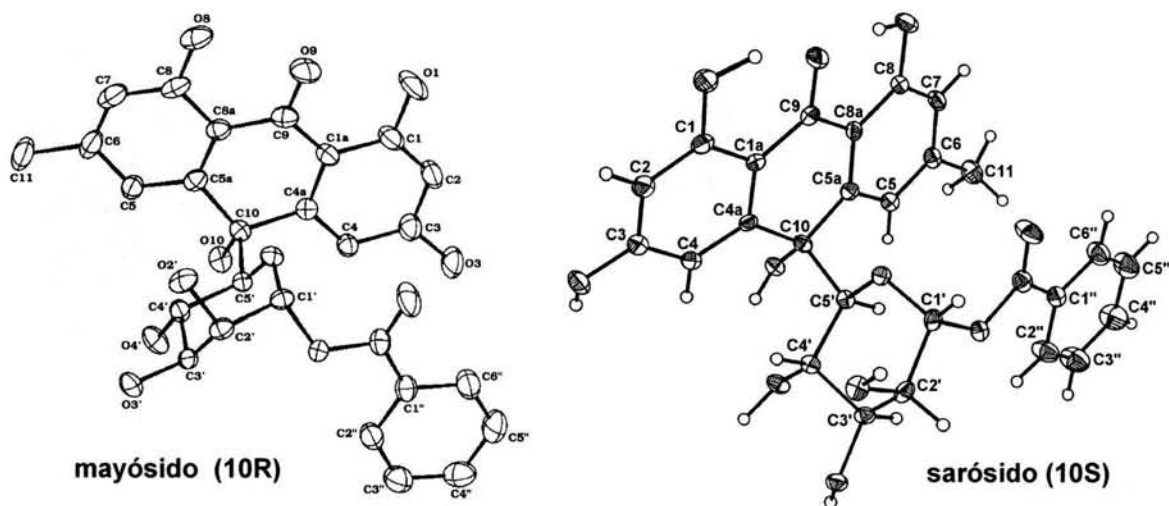


Fig. 30. Difracción de rayos X de las oxantronas mayósido y sarósido aislados de *P. antidesma*.

6.1.5. Determinación de la configuración absoluta de las antronas 1 y 2.

Para establecer la configuración de los pares de diastereómeros purificados, se llevó al cabo un análisis por dicroísmo circular (DC) de los metabolitos en estudio. En la figura 31, se muestran las curvas generadas por los compuestos uveósido (1) y 10-*epi*-uveósido (2), donde se observa claramente el efecto Cotton opuesto de este par de isómeros en la región de 297 nm, aproximadamente.

De acuerdo con los estudios de Manitto y colaboradores sobre el análisis del par de aloínas A y B,^{114,116,117} en donde la aloína A se asigna como 10S por tener un efecto Cotton positivo alrededor de 290 nm mientras que la aloína B se establece como 10R por presentar un efecto Cotton negativo en 290 nm,¹¹⁴ se puede determinar la configuración del uveósido (1) como 10R¹⁴⁰ por mostrar un efecto Cotton negativo en 290 nm, mientras que su diastereoisómero 10-*epi*-uveósido (2) se asigna como 10S por presentar un efecto Cotton positivo.

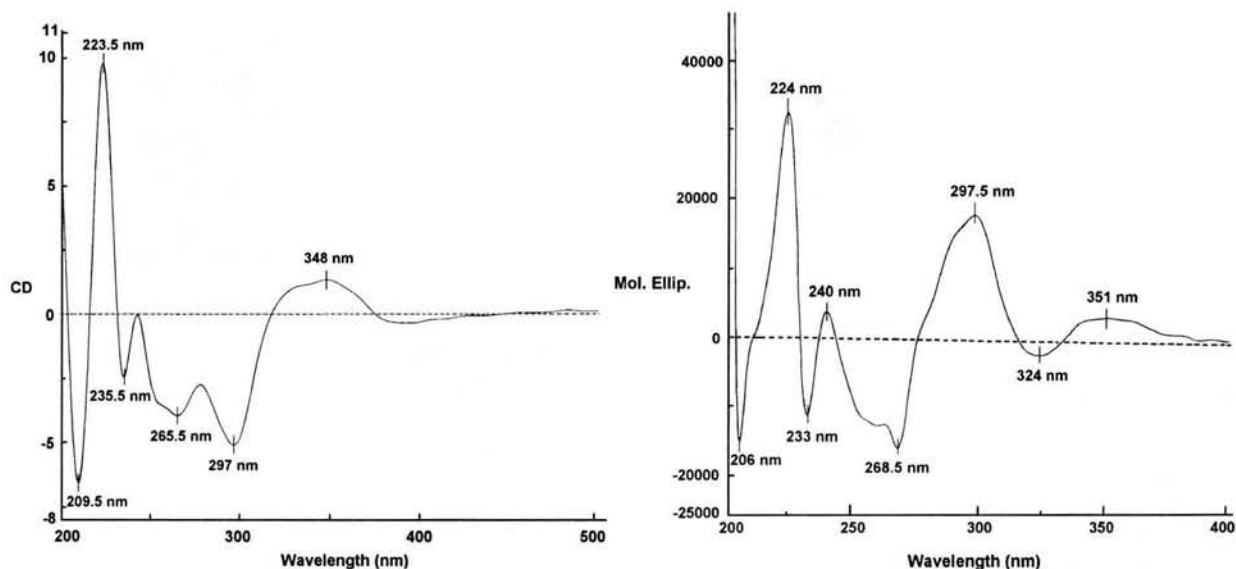


Fig. 31. Espectros de DC del uveósido (1) derecha y del 10-*epi*-uveósido (2) izquierda.

Con respecto a la configuración del otro par de antronas diastereoisoméricas, desoximayósido (3) y desoxisarósido (4), ya ha sido descrita⁷¹ como picramniósido D (10*R*) y picramniósido E (10*S*), respectivamente.

6.2. Análisis fitoquímico *Picramnia xalapensis*

En la tabla 4 se aprecia que los extractos de éter etílico tanto de raíz como de tallo muestran una ligera actividad citotóxica (KB: CE₅₀= 15.99 y 17.90 µg/mL, respectivamente). La cantidad obtenida del extracto de raíz (tabla 2) influyó para determinar trabajar con el extracto de tallo.

La separación por cc del extracto de éter etílico del tallo de *P. xalapensis* (1.5 g, EEtPXT, KB: CE₅₀= 17.90 µg/mL) facilitó la obtención de los metabolitos ya descritos en la literatura⁶⁴ como lo son crisofanol, β-sitosterol, 7-hidroxycumarina y

ácido betulínico, mismos que se identificaron por espectroscopia de RMN-¹H, así como por comparación, con muestras auténticas, de sus constantes físicas.

El ácido betulínico ha sido reportado como un agente citotóxico específico contra el melanoma humano,¹⁶⁴ además de tener actividad antipalúdica^{165, 166} y antiviral contra el VIH,¹⁴⁷ entre otras. Debido a ello, y aunado a la falta de toxicidad que también ha mostrado, este metabolito es un atractivo y promisorio prototipo contra el melanoma humano; por lo tanto, es conveniente proseguir con la exploración de los metabolitos presentes en esta especie ya que podrían contener otros compuestos bioactivos, además de continuar la búsqueda de los C-glicósidos que se han presentado en las especies de *Picramnia*.

6.3. Análisis fitoquímico de *Picramnia hirsuta*

En relación a la especie *P. hirsuta*, aunque no mostró citotoxicidad el extracto de CH₃OH (14.0 g, EMPHR), se realizó su fraccionamiento por cc debido a que fue el único de los obtenidos de esta especie que por ccd indicó la presencia de posibles compuestos de estructura antraquinónica. Se logró purificar, además de los metabolitos ya reportados en la literatura⁶⁶ como crisofanol, emodina, sitosterol, 7-hidroxicoumarina y glucósido de emodina, el par de oxantranas diastereoisoméricas mayósido (**5**) y sarósido (**6**) aisladas con anterioridad de *P. antidesma*.⁶⁹ Este es el primer reporte del aislamiento de la oxantrona sarósido de *P. hirsuta*.

La identificación de los metabolitos aislados se realizó por espectroscopia de RMN-¹H, así como por comparación de sus constantes físicas con muestras

auténticas. En la Tabla 9, se presentan los datos espectroscópicos de RMN para este par de oxantronas.

C	Mayósido (5)		Sarósido (6)	
	δ_c	δ_H	δ_c	δ_H
1	164.23	12.22 s (OH)	166.13	11.93 s (OH)
1a	109.43		110.70	
2	101.53	6.14 d (2.4)	103.45	6.37 d (2.4)
3	165.12	9.67 br (OH)	165.31	9.65 br (OH)
4	105.68	6.83 d (2.2)	108.61	6.94 d (2.2)
4a	144.53 ^a		148.62 ^a	
5	119.39	7.25 d (1.1)	118.41	7.02 dd (1.6, 0.5)
5a	146.27 ^a		148.83 ^a	
6	150.62		148.26	
7	116.93	6.74 s	117.71	6.49 dd (1.6, 0.8)
8	161.66	12.18 s (OH)	162.91	12.06 s (OH)
8a	113.77		114.87	
9	191.06		192.89	
10	75.30	6.62 s (OH)	76.57	*
11	21.45	2.42 s	22.00	1.80 s
1'	94.39	5.82 d (0.9)	95.07	5.82 d (1.5)
2'	69.20	3.86 s	70.69	3.87 m
3'	71.93	3.86 s	73.48	3.92 dd (8.9, 3.6)
4'	68.73	3.73 m	70.18	3.83 t (9.5, 8.8)
5'	79.49	3.73 m	80.54	3.73 d (9.5)
1''(C=O)	163.54		163.99	
1''	129.34		*	
2'', 6''	129.39 ^b	7.85 dd (8.3, 1.2)	130.65 ^b	7.87 dd (8.1, 1.6)
3'', 5''	128.60 ^b	7.50 dd (7.9, 7.5)	129.77 ^b	7.54 dd (8.1, 7.3)
4''	133.36	7.63 dddd (7.5, 7.3, 1.8, 1.3)	134.52	7.67 dddd (7.5, 7.3, 1.8, 1.3)

Tabla 9. Datos espectroscópicos de las oxantronas mayósido (5) y sarósido (6).

RMN-¹³C a 100 MHz; RMN-¹H a 400 MHz; en (CD₃)₂CO.

Asignaciones fueron confirmadas por COSY, HMQC y HMBC. Constantes de acoplamiento (J en Hz) en paréntesis. ^a Asignaciones intercambiables.

^b La intensidad de estas señales fue del doble de otra señal de CH.

* No observada.

6.4. Evaluación biológica de los derivados antraquinónicos.

Los resultados de la evaluación antipalúdica *in vitro* de las antronas uveósido (1), 10-*epi*-uveósido (2), desoximayósido (3) y desoxisarósido (4), así como de las oxantronas mayósido (5) y sarósido (6), se presentan en la tabla 10, en la cual se distingue claramente que aunque la intensidad de la respuesta de las antronas 1-4 contra las cepas D6 (sensible a la cloroquina) y W2 (resistente a la cloroquina) de *Plasmodium falciparum* empleadas en el presente estudio, no fue equivalente a la exhibida por la artemisinina,¹⁶⁸ compuesto empleado como control positivo, estos metabolitos manifiestan una ligera actividad antipalúdica.^{132,147,169} En general, la concentración de la respuesta antipalúdica fue equivalente o ligeramente mayor para la cepa W2 que con la D6, con la notable excepción de la emodina cuya actividad antipalúdica contra la cepa resistente a la cloroquina (W2) fue casi la mitad que para la sensible a la cloroquina (D6).

Estas observaciones demuestran, evidentemente, que la marcada citotoxicidad manifestada por las antronas 1-4 es una citotoxicidad general y no específica, ya que exhiben una notable eficacia con tres de las cuatro líneas celulares empleadas en la presente investigación, así como una ligera actividad antipalúdica *in vitro* con las cepas D6 y W2 de *P. falciparum*.^{147,169}

En cambio, del par de oxantronas inactivas en la evaluación citotóxica, solo el sarósido (6) despliega una apreciable actividad antipalúdica contra ambos clones de *P. falciparum*.

De la misma manera, en la misma tabla 10, se puede apreciar que las antraquinonas aloe-emodina y emodina, aisladas de los extractos de *P. hirsuta* y

de *P. antidesma*, exhiben un comportamiento similar al del sarósido (**6**), ya que mostraron una actividad antipalúdica sin manifestar una citotoxicidad significativa.

Extracto/ Compuesto	Actividad Citotóxica CE ₅₀ (µg/mL)				Actividad Antipalúdica CI ₅₀ (ng/mL)	
	KB	HCT-15	SQC-1	OVCAR	D6	W2
EEtPAR	0.97	> 20	> 20	> 20	9298.80	8070.50
Emodina	> 20	6.04	> 20	16.74	11167.34	5584.00
Aloe-emodina	> 20	> 20	> 20	20.30	7364.55	8434.52
Uveósido (1)	2.22	2.35	5.08	2.27	1177.40	1248.55
10- <i>epi</i> -uveósido (2)	0.29	1.18	2.26	4.42	2532.46	2240.00
Desoximayósido (3)	1.66	3.20	2.10	2.80	5835.50	4803.50
Desoxisarósido (4)	1.74	3.16	1.44	5.50	5660.86	4757.50
Mayósido (5)	> 20	> 20	> 20	> 20	> 5000	27000
Sarósido (6)	> 20	> 20	> 20	> 20	9487.09	9763.40
Elipticina	0.22	0.37	0.62	1.43	--	--
Artemisinina ¹⁶⁸	--	--	--	--	2.5±0.1	2.7±0.1
Cloroquina ¹⁶⁸	--	--	--	--	2.3±1.2	68.0±0.1

Tabla 10. Resultados de las evaluaciones citotóxica y antipalúdica de algunos de los metabolitos aislados de *Picramnia*

Estructuralmente, la actividad citotóxica del par de antronas **3** y **4**, pareciera estar relacionada con la presencia, o ausencia, de un hidroxilo en la posición C-10, ya que esta es la única diferencia notable entre el par de antronas activas **3** y **4** y las oxantronas inactivas **5** y **6**, evaluadas en la presente investigación.

Basándose en los datos presentados en la tabla 10, las antronas **1-4** no parecen ser candidatos prometedores como agentes antipalúdicos. Sin embargo, y aunque más estudios son necesarios, se observa claramente que las modificaciones estructurales de las antronas, específicamente **3** y **4**, pueden originar compuestos

capaces de demostrar selectividad, como la emodina y la oxantrona **6**, que puedan servir como prototipos de compuestos con un mayor potencial terapéutico.

Cabe destacar que el seguimiento citotóxico del estudio fitoquímico, empleando la línea celular del carcinoma nasofaríngeo (KB), no funcionó para el aislamiento de la oxantrona inactiva **6**, compuesto que mostró una actividad *in vitro* contra ambas cepas de *Plasmodium*, D6 y W2.

Los resultados obtenidos con las evaluaciones citotóxica y antipalúdica permiten ver la importancia de seguir explorando las actividades biológicas de este grupo poco común de C-glicósidos, así como el contenido de otros metabolitos bioactivos que puedan encontrarse en los extractos de estas especies y que sirvan como prototipos de fármacos antipalúdicos para contrarrestar la escasez de fármacos eficaces y de bajo costo para combatir el paludismo, beneficiando con ello a la población de bajos recursos económicos principalmente, donde se localiza el mayor número de personas afectadas por esta enfermedad.

6.5. Conformación más estable de los metabolitos 1-6 por el programa computacional PcModel

La conformación que se obtuvo en solución, por medio de las constantes de acoplamiento (J, Hz) de los metabolitos aislados, obviamente de la parte correspondiente al monosacárido, así como la proximidad que guarda el grupo benzoato con el núcleo antraquinónico, se sometió a una minimización energética con ayuda del software PcModel v. 6.0 (Serena Co.) para relacionar las conformaciones así obtenidas.

Los resultados que se produjeron con la minimización energética se presentan en la tabla 11, donde se pudo observar que las oxantronas **5** y **6** mantuvieron semejanza entre los conformeros en solución (por RMN-¹H), en sólido (por cristalografía de rayos X) y por el PcModel; igual sucedió con el par de antronas **3** y **4**, cuyos conformeros en solución así como por el software PcModel mantuvieron semejanza. Sin embargo, no pasó lo mismo con el par de antronas **1** y **2**, ya que los conformeros que se obtuvieron por RMN-¹H fueron opuestos a los obtenidos por los métodos computacionales.

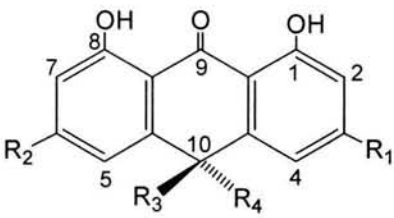
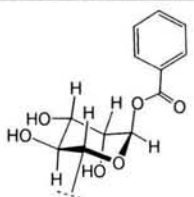
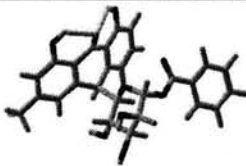
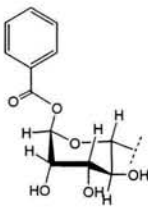
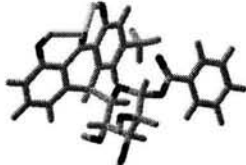
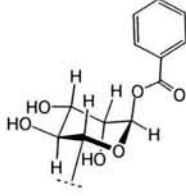

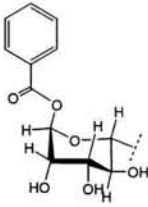

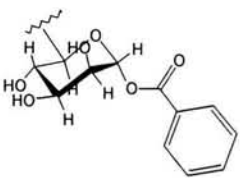
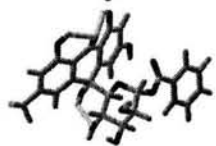
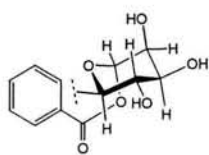

					
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	PcModel
Uveósido (1) (10R)	CH ₃	H	H		
10- <i>epi</i> -uveósido (2) (10S)	CH ₃	H		H	
Desoximayósido (3) (10R)	OH	CH ₃	H		
Desoxisarósido (4) (10S)	OH	CH ₃		H	
Mayósido (5) (10R)	OH	CH ₃		OH	
Sarósido (6) (10S)	OH	CH ₃	OH		

Tabla 11. Estructura molecular y confómeros más estables de los compuestos aislados en este trabajo.

7. CONCLUSIONES

1. La determinación del potencial citotóxico de los extractos crudos de las especies del género *Picramnia*, *Picramnia antidesma*, *Picramnia xalapensis* y *Picramnia hirsuta*, reveló que los extractos preparados de éter etílico de *P. antidesma* y de *P. xalapensis* desarrollaron una actividad citotóxica significativa ($CE_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$).
2. El extracto de éter etílico de la raíz de *P. antidesma* (EEtPAR) fue el que demostró una citotoxicidad considerablemente mayor que la observada para los otros extractos (KB: $CE_{50} = 0.97 \mu\text{g/mL}$); además, este extracto (EEtPAR) también presentó una actividad antipalúdica significativa contra *Plasmodium falciparum* (D6: $CI_{50} = 9298.80 \text{ ng/mL}$; W2: $CI_{50} = 8070.50 \text{ ng/mL}$).
3. El estudio fitoquímico biodirigido del extracto total de éter etílico de *P. antidesma* permitió el aislamiento de dos pares de antronas diastereoisoméricas citotóxicas, uveósido (**1**) (KB: $CE_{50} = 2.22 \mu\text{g/mL}$), 10-*epi*-uveósido (**2**) (KB: $CE_{50} = 0.29 \mu\text{g/mL}$), desoximayósido (**3**) (KB: $CE_{50} = 1.66 \mu\text{g/mL}$) y desoxisarósido (**4**) (KB: $CE_{50} = 1.74 \mu\text{g/mL}$). Las estructuras se establecieron por métodos espectroscópicos de RMN y la configuración absoluta se determinó por medio de espectros de dicroísmo circular.
4. La evaluación antipalúdica realizada a los metabolitos citotóxicos aislados de *P. antidesma*: uveósido (**1**) (D6: $CI_{50} = 1177.40 \text{ ng/mL}$; W2: $CI_{50} = 1248.55 \text{ ng/mL}$), 10-*epi*-uveósido (**2**) (D6: $CI_{50} = 2532.46 \text{ ng/mL}$; W2: $CI_{50} = 2240.00 \text{ ng/mL}$), desoximayósido (**3**) (D6: $CI_{50} = 5835.50 \text{ ng/mL}$; W2: $CI_{50} = 4803.50 \text{ ng/mL}$) y

desoxisarósido (4) (D6: CI_{50} = 5660.86 ng/mL; W2: CI_{50} = 4757.50 ng/mL), demostró que estos compuestos no poseen una actividad biológica selectiva ya que también demostraron una potente acción antipalúdica.

5. La actividad antipalúdica *in vitro* mostrada por la oxantrona sarósido (6) pone de manifiesto que el monitoreo de la citotoxicidad, empleando la línea celular derivada del carcinoma nasofaríngeo humano (KB), para el aislamiento de metabolitos con posible actividad antipalúdica no representa un ensayo selectivo, como ha sucedido en otros trabajos.

6. Un rasgo interesante de las antronas y oxantronas aisladas es la presencia, en C-10, de una lixosa con un benzoato unido en la posición 1'. Este azúcar se había designado erróneamente como xilosa en los picramniósidos D y E.

7. La citotoxicidad mostrada por los extractos crudos de *P. xalapensis* puede ser explicada en función de la presencia del triterpeno citotóxico conocido como ácido betulínico.

8. La existencia del tipo de antronas y oxantronas (sustituidas en C-10 con una pentosa, unida a un grupo benzoato o acetato) en las especies de *Picramnia* puede ser de valor taxonómico y respalda la propuesta de reclasificar este género dentro de una nueva familia, Picramniaceae.

9. Los resultados de la investigación de las especies de *Picramnia* sobre todo en lo referente a *P. antidesma*, que es la especie utilizada en la medicina tradicional, ponen en evidencia el riesgo que implica la utilización de este tipo de especies sin una regulación adecuada, ya que como se pudo comprobar, la presencia de las antronas altamente citotóxicas constituyen los principios activos de la planta.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Christensen, B.S., Kharazmi, A., 2001. Antimalarial Natural Products. En: *Bioactive Compounds from Natural Sources*; Corrado Tringali editor, Taylor & Francis: New York, pp. 379-432.
2. Wright, A.D., König, G.M., 1996. Antimalarial Activity: The Search for Marine-Derived Natural Products with Selective Antimalarial Activity. *Journal of Natural Products* **59**, 710-716.
3. Newton, P., White, N., 1999. Malaria: New Developments in Treatment and Prevention. *Annual Review of Medicine* **50**, 179-192.
4. Leaman, D.J., Arnason, J.T., Yusuf, R., Sangat-Roemantyo, H., Soedjito, H., Angerhofer, C.K., Pezzuto, J.M., 1995. Malaria Remedies of the Kenyah of the Apo Kayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: A Quantitative Assessment of Local Consensus as an Indicator of Biological Efficacy. *Journal of Ethnopharmacology* **49**, 1-16.
5. Randrianarivelosia, M., Rasidimanana, V., Ravarison H., Cheplogoi, P., Ratsimbason, M., Mulholland, D., Maucière, P., 2003. Plants Traditionally Prescribed to Treat Tazo (Malaria) in the Eastern Region of Madagascar. *Malaria Journal* **2**, 25- 33.
6. Phillipson, J.D., Wright, C.W., 1991. Can Ethnopharmacology Contribute to the Development of Antimalarial Agents? *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 155-165.
7. Klayman, D.L., 1993. *Artemisia annua*. En: *Human Medicinal Agents from Plants* **17**, 242-253.

8. Ziffer, H., Highet, R.J., Klayman, D.L., 1997. Artemisinin: An Endoperoxidic Antimalarial from *Artemisia annua* L. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **72**, 121-214.
9. Trigg, P.I., 1989. Qinghaosu (Artemisinin) as an Antimalarial Drug. *Economic and Medicinal Plant Research* **3**, 19-55.
10. Phillipson, J.D., O'Neill, M.J., 1987. Antimalarial and Amoebicidal Natural Products. En: *Biologically Active Natural Products*, Hostettmann, K., Lea, P.J., Eds., Oxford Science Publications, pp. 49-64.
11. Camacho-Corona, M. R., Croft, S.L., Phillipson, J.L., 2000. Natural Products as Sources of Antiprotozoal Drugs. *Current Opinion in Anti-infective Investigational Drugs* **2**, 47-62.
12. Martínez M., 1959. *Plantas Útiles de la Flora Mexicana*; Ed. Botas: México, D.F., pp. 144-146, 193-195.
13. Martínez M., 1989. *Plantas Medicinales de México*; Ed. Botas: México, D.F., pp. 92, 100-105.
14. Selecciones del Reader's Digest, Editores, 1987. *Plantas Medicinales, Virtudes Insospechadas de Plantas Conocidas*; México, D.F., pp. 162, 353-354.
15. Spencer, C.F., Koniuszy, F.R., Rogers, E.F., Shavel, J.Jr., Easton, N.R., Kaczka, E.A., Kuehl, F.A.Jr., Phillips, R.F., Walti, J., Folkers, K., Malanga, C., Seeler, A.O., 1947. Survey of Plants for Antimalarial Activity. *Lloydia* **10**, 145-174.
16. Polonsky, J., 1973. Quassinoid Bitter Principles. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* **30**, 101-150.
17. Polonsky, J., 1985. Quassinoid Bitter Principles II. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* **47**, 221-264.

18. Phillipson, J.D., 1991. Assays for Antimalarial and Amaebicidal Activities. En: *Methods in Plant Biochemistry* **6**, 135-152.
19. O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., 1985. Plants as Sources of Antimalarial Drugs Part. 1. *In vitro* Test Method for the Evaluation of Crude Extracts from Plants. *Planta Medica* **51**, 394-398.
20. O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Wright, C.W., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., Gupta, M.P., Solis, P., 1988. Plants as Sources of Antimalarial Drugs, Part. 6: Activities of *Simarouba amara* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, **22**, 183-190.
21. Pavanand, K., Nutakul, W., Dechatiwongse, T., Yoshihira, K., Yongvanitchit, K., Scovill, J.P., Flippen-Anderson, J.L., Gilardi, R., George, C., Kanchanapee. P., Webster, H.K., 1986. *In vitro* Antimalarial Activity of *Brucea javanica* Against Multi-Drug Resistant *Plasmodium falciparum*. *Planta Medica* **52**, 108-111.
22. Chan, K.L., O'Neill, M.J., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., 1986. Plants as Sources of Antimalarial Drugs Part. 3. *Eurycoma longifolia*. *Planta Medica* **52**, 105-107.
23. Fandeur, T., Moretti, C., Polonsky, J., 1985. *In vitro* and *In vivo* Assesment of the Antimalarial Activity of the Sergeolide. *Planta Medica* **51**, 20-23.
24. Phillipson, J.D., Wright, C.W., 1991. Antiprotozoal Agents from Plant Sources. *Planta Medica* **57**, S53-S59.
25. Morton, J.F., 1981. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America –Bahamas to Yucatan*; Charles Thomas Publisher: Springfield, Illinois, USA, pp. 386-389.
26. Martínez M., 1989. *Las Plantas Medicinales de México*; Ed. Botas: México, D.F., pp. 63-65, 393.

27. Standley, P.C., Steyermark, J.A., 1946. *Flora of Guatemala (Part V)*; Fieldiana: Botany **24**, 428.
28. Lawrence G., 1951. *Taxonomy of Vascular Plants*; Macmillan Company: New York, pp. 558-559.
29. Domínguez, X.A., 1985. *Métodos de Investigación Fitoquímica*; Ed. Limusa: México, D.F., pp. 175-194.
30. Standley, P.C., Steyermark, J.A., 1946. *Flora of Guatemala (Part V)*; Fieldiana: Botany **24**, 431-432.
31. Lumonadio, L., Vanhaelen, M., 1984. Canthin-6-one, Undulatone and Two Quassinoids from *Hannoa klaineana* Roots. *Phytochemistry* **23**, 2121-2123.
32. Ohmoto, T., Sung Y.I., 1983. Antimycotic Substances in the Crude Drug II. *Chemical Abstracts* **98**, 204263w.
33. Cordell, G.A., Ogura, M., Farnsworth, N.R., 1978. Alkaloid Constituents of *Ailanthus excelsa* (Simaroubaceae). *Chemical Abstracts* **89**, 34493v.
34. Jorshi, B.S., Kamat, V.N., Gawad, D.H., 1978. Some β -Carboline Alkaloids of *Ailanthus malabarica* D.C. *Chemical Abstracts* **88**, 34493v.
35. Sánchez, E., Comin, J., 1971. Two New β -Carboline Alkaloids from *Aeschrion crenata*. *Phytochemistry* **10**, 2155-2159.
36. Yang, J., Lou, S., Shen, X., Li, Y., 1980. Chemical Study of the Alkaloids of Ku-Mu [*Picrasma quassioides* (D. Don) Benn]. *Chemical Abstracts* **92**, 72679a.
37. Yang, J., Gong, D., 1984. Kumujancine and Kumujanrine, Two New β -Carboline Alkaloids from *Picrasma quassioides* (D. Don) Benn. *Chemical Abstracts* **101**, 207605a.

38. Ohmoto, T., and Koike, K., 1984. Studies on the Constituents of *Picrasma quassioides* Benn. III. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **32**, 3579-3583.
39. Inamoto, N., Masuda, S., Simamura, O., Tsuyuki, T., 1961. 4,5-Dimethoxycanthin-6-one and 2,6-Dimethoxy-p-Benzoquinone from *Picrasma ailanthoides* Planchon. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **34**, 888-889.
40. Wagner, H., Nestler, T., Neszmelyi, A., 1979. New Constituents of *Picrasma excelsa*. *Chemical Abstracts* **90**, 104182k.
41. Johns, S.R., Lamberton, J.A., Sioumis, A.A., 1970. 4-Methoxy-1-Vinyl- β -Carboline, a New Alkaloid from *Picrasma javanica* (Simaroubaceae). *Australian Journal of Chemistry* **23**, 629-630.
42. Arbain, D., Sargent, M.V., 1987. The Alkaloids of *Picrasma javanica*. *Australian Journal of Chemistry* **40**, 1527-1536.
43. Kuo, P.-C., Shi, L.-S., Damu, A.G., Su, C.-R., Huang, C.-H., Ke, C.-H., Wu, J.-B., Lin, A.-J., Bastow, K.F., Lee, K.-H., Wu, T.-S., 2003. Cytotoxic and Antimalarial Carboline Alkaloids from the Roots of *Eurycoma longifolia*. *Journal of Natural Products* **66**, 1324-1327.
44. Thomas, W.W., 1988. A Conspectus of Mexican and Central American *Picramnia* (Simaroubaceae). *Brittonia* **40**, 89-105.
45. Thomas, W.W., 1990. A New Species of *Picramnia* (Simaroubaceae) from Amazonian Peru. *Brittonia* **42**, 171-174.
46. Fernando, E.S., Quinn, C.J., 1995. Picramniaceae, a New Family, and a Recircumscription of Simaroubaceae. *Taxon* **44**, 177-181.

47. Jacobs, H., 2003. Comparative Phytochemistry of *Picramnia* and *Alvaradoa*, Genera of the Newly Established Family Picramniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* **31**, 773-783.
48. Ibarra O.R., 1979. *Clasificación Alfabética de las Familias de la Division Angiospermae*; IMEPLAN: México D.F., pp. 32, 40, 45.
49. Standley, P.C., Steyermark, J.A., 1946. *Flora of Guatemala (Part V)*; Fieldiana: Botany **24**, 425-434.
50. Morton, J.F., 1981. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America –Bahamas to Yucatan*; Charles Thomas Publisher: Springfield, Illinois, U.S.A., pp. 387-389.
51. Standley, P.C., 1923. *Trees and Shrubs of Mexico*. En: *Contributions from the United States National Herbarium*, Smithsonian Institution United States National Museum: Washington, U.S.A., pp. 541-542.
52. Morton, J.F., 1981. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America –Bahamas to Yucatan*; Charles Thomas Publisher: Springfield, Illinois, U.S.A., pp. 386-387.
53. Heywood, V., 1993. *Flowering Plants of the World*; Oxford University Press: New York, pp. 199-200.
54. Thomas, W.W., 1988. A Conspectus of Mexican and Central American *Picramnia* (Simaroubaceae). *Brittonia* **40**, 89-92.
55. Martínez M., 1989. *Las Plantas Medicinales de México*; Ed. Botas: México, D.F., pp. 63-65.
56. Grieve, M., 1971. *A Modern Herbal*; Dover Publications: New York, pp.166.
57. Thomas, W.W., 1988. A Conspectus of Mexican and Central American *Picramnia* (Simaroubaceae). *Brittonia* **40**, 103.

58. Thomas, W.W., 1988. A Conspectus of Mexican and Central American *Picramnia* (Simaroubaceae). *Brittonia* **40**, 99-101.
59. Herz, W., Santhanam, P.S., Wahlberg, I., 1972. 3-*epi*-Betulinic Acid, a New Triterpenoid from *Picramnia pentandra*. *Phytochemistry* **11**, 3061-3063.
60. Cam, Juan J.L., 1973. Chemical Study of *Picramnia sellowii*. *Chemical Abstracts* **81**, 132855q.
61. León, C., Juan, J., 1975. Triterpenoids and Anthraquinonic Derivates Obtained from *Picramnia sellowii*. *Chemical Abstracts* **84**, 44436k.
62. Popinigis, I., Moreira, E., Nakashima, T., Krambeck, R., Miguel, O.G., 1980. Pharmacognostic Study of *Picramnia parvifolia* Engler. Simaroubaceae. *Chemical Abstracts* **95**, 138483c.
63. Arana, A., Julca, T., 1986. *Picramnia macrostachys* Ami (Simaroubaceae). *Chemical Abstracts* **109**, 146353h.
64. Hernández-Medel, M.R., Márquez, O., García de los Salmones, I., Trigos, A., 1995. Estudio Químico de *Picramnia xalapensis*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **26**, 18-19.
65. Hernández-Medel, M.R., Márquez, O., 1995. Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Tallo y Raíz de *Picramnia xalapensis*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **27**, 18-20.
66. Hernández-Medel M.R, López-Márquez, O., Santillan, R., Trigos, A., 1996. Mayoside, an Oxanthrone from *Picramnia hirsuta*. *Phytochemistry* **43**, 279-281.
67. Hernández-Medel, M.R., Lopez-Perez, J., and Trigos, A., 1998. Anthraquinones from *Picramnia hirsuta* ítem. *Revista Latinoamericana de Química* **26**, 86-90.

68. Solis, P.N., Gutierrez Ravelo A., Gonzalez, A.G., Gupta, M.P., Phillipson, J.D., 1995. Bioactive Anthraquinone Glycosides from *Picramnia antidesma* ssp. *fessionia*. *Phytochemistry* **38**, 477-480.
69. Hernández-Medel M.R, Ramírez-Corzas, C.O., Rivera-Domínguez, M.N., Ramírez-Mendez, J., Santillan, R., Rojas-Lima, S., 1999. Diastereomeric C-Glycosyloxanthrones from *Picramnia antidesma*. *Phytochemistry* **50**, 1379-1383.
70. Hernández-Medel, M.R. y col. Datos no publicados.
71. Rodríguez-Gamboa, T.; Fernandes, J. B.; Rodrigues Fo., E.; Da Silva, M. F.; Vieira, P. C.; Castro, O. C., 1999. Two Anthrones and one Oxanthrone from *Picramnia teapensis*. *Phytochemistry* **51**, 583–586.
72. Rodríguez-Gamboa, T.; Victor, S.R., Fernandes, J. B.; Rodrigues Fo., E.; Da Silva, M. F.; Vieira, P. C.; Pagnoca, F.C., Bueno, O.C., Hebling, M.J.A., Castro, O. C., 2000. Anthrone and Oxanthrone C,O-Diglycosydes from *Picramnia teapensis*" *Phytochemistry* **55**, 837-841.
73. Balderrama, L., Braca, A., Garcia, E., Melgarejo, M., Pizza, C., De Tomáis, N., 2001. Triterpenes and Anthraquinones from *Picramnia sellowii* Planchon in Hook (Simaroubaceae)" *Biochemical Systematics and Ecology* **29**, 331-333.
74. Diaz, F., Chai, H.-B., Mi, Q., Su, B.-N., Vigo, J.S., Graham, J.G., Cabieses, F., Farnsworth, N.R., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Swanson, S.M., Kinghorn, A.D., 2004. Anthrone and Oxanthrone C-Glycosides from *Picramnia latifolia* Collected in Peru. *Journal of Natural Products* **67**, 352-356.
75. Demirezer, O., Kuruuzum, A., 1997. Rapid and Simple Biological Activity Screening of Some *Rumex* Species, Evaluation of Bioguided Fractions of *R.*

scutatus and Pure Compounds. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences* **52**, 665-669.

76. Liu, M., Koya, S., Furuta, H., Matsuzaki, S., 1996. Growth-Inhibiting Activity of Anthraquinones and Benzoquinones Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Dokkyo Journal of Medical Sciences* **23**, 85-93.

77. Andersen, D.O., Weber, N.D., Wood, S.G., Hughes, B.G., Murray, B.K., North, J.A., 1992. *In vitro* Virucidal Activity of Selected Anthraquinones and Anthraquinone Derivatives. *Chemical Abstracts* **116**, 254z.

78. Bernard, D.L., Huffman, J.H., Morris, J.L., Wood, S.G., Hughes, B.G., Sidwell, R.W., 1992. Evaluation of the Antiviral Activity of Anthraquinones, Anthrones and Anthraquinone Derivatives Against Human Cytomegalovirus. *Chemical Abstracts* **116**, 98904j.

79. May, G., Leonhardt, K., Ott, H., 1992. Use of Anthraquinone Derivatives in the Prophylaxis and Treatment of Viral Diseases. *Chemical Abstracts* **116**, 51547e.

80. Sydiskis, R.J., Owen, D.G., Lohr, J.L., Rosler, K.H., Blomster, R.N., 1992. Inactivation of Enveloped Viruses by Anthraquinones Extracted from Plants. *Chemical Abstracts* **116**, 37840p

81. Cohen, P.A., Hudson, J.B., Towers, G.H.N., 1996. Antiviral Activities Anthraquinones, Bianthrones and Hypericin Derivatives from Lichens. *Experientia (Basel)* **52**, 180-183.

82. Brusick, D., Mengs, U., 1997. Assessment of the Genotoxic Risk from Laxative Senna Products. *Environmental & Molecular Mutagenesis* **29**, 1-9.

83. Mueller, S.O., Eckert, I., Lutz, W.K., Stopper, H., 1996. Genotoxic of the Laxative Drug Components Emodin, Aloe-emodin and Danthron in Mammalian Cells: Topoisomerasa II Mediated?. *Mutation Research* **371**, 165-173.
84. Grimminger, W., Witthohn, K., 1993. Analytics of Senna Drugs with Regard to the Toxicological Discussion of Anthranoids. *Pharmacology (Basel)* **47**, (Supplement 1), 98-109.
85. Heidemann, A., Miltenburger, H.G., Mengs, U., 1993. The Genotoxicity Status of Senna. *Pharmacology (Basel)*, **47**, (Supplement 1), 178-186.
86. Blomeke, B., Poginsky, B., Schmutte, C., Marquardt, H., Westendorf, J., 1992. Formation of Genotoxic Metabolites from Anthraquinone Glycosides, Present in *Rubia tinctorum* L. *Chemical Abstracts* **126**, 123667y.
87. Westendorf, J., Marquadt, H., Poginsky, B., Dominiak, M., Schmidt, J., 1990. Genotoxic of Naturally Occurring Hydroxyanthraquinones. *Mutation Research* **240**, 1-12.
88. Darzynkiewicz, Z., Carter, S.P., Kapuscinski, J., Watanabe, K.A., 1989. Effect of the Derivatives of Chrysophanol a New Type of Potential Antitumor Agents of Anthraquinone Family on Growth and Cell Cycle of L1210 Leukemic Cells. *Cancer Letters* **46**, 181-188.
89. Kuo, Y.C., Sun, C.M., OU, C., Tsai, W.J., 1997. A Tumor Cell Growth Inhibitor from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. *Life Sciences* **61**, 2335-2344.
90. Chang, C.H., Lin, C.C., Yang, J.J., Namba, T., Hattori, M., 1996. Anti-inflammatory Effects of Emodin from *Ventilago leiocarpa* (Rhamnaceae). *American Journal of Chinese Medicine* **24**, 139-142.

91. Choi, J.S., Lee, H.J., Park, K.Y., Ha, J.O., Kang, S.S., 1977. *In vitro* Antimutagenic Effects of Anthraquinone Aglycones and Naphthopyrone Glycosides from *Cassia tora*. *Planta Medica* **63**, 11-14.
92. Su, H.-Y., Cherng, S.-H., Chen, C.-C., Lee, H., 1995. Emodin Inhibits the Mutagenicity and DNA Adducts by 1-Nitropyrene. *Mutation Research* **329**, 205-212.
93. Nakasugi, T., Komai, K., 1994. Antimutagen of *Aloe* Plants. *Chemical Abstracts* **121**, 53306w.
94. Koyama, M., Takahashi, K., Chou, T.-C., Darzynkiewicz, Z., Kapuscinski, J., Kelly, T.R., Watanabe, K.A., 1989. Intercalating Agents with Covalent Bond Forming Capability. A Novel Type of Potential Anticancer Agents. 2. Derivatives of Chrysophanol and Emodin. *Journal of Medicinal Chemistry* **32**, 1594-1599.
95. Chang, P., Lee, K.-H., 1984. Cytotoxic Antileukemic Anthraquinones from *Morinda parvifolia*. *Phytochemistry* **23**, 1733-1736.
96. Koyama, M., Kelly, T.R., Watanabe, K.A., 1988. Novel Type of Potential Anticancer Agents Derived from Chrysophanol and Emodin. Some Structure-Activity Relationship Studies. *Journal of Medicinal Chemistry* **31**, 283-284.
97. Ueno, N.T., Kiyokawa, N., Hung, M.C., 1996. Growth Suppression of Low HER-2/Neu-Expressing Breast Cancer Cell Line MDA-MB-435 by Tyrosine Kinase Inhibitor Emodin. *Oncology Reports* **3**, 509-511.
98. Zhang, L., Hung, M.C., 1996. Sensitization of HER-2/NeuOverexpressing Non-Small Cell Lung cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs by Tyrosine Kinase Inhibitor Emodin. *Oncogene* **12**, 571-576.

99. Zhang, L., Chang, C.-J., Bacus, S.S., Hung, M.C., 1995. Suppressed Transformation and Induced Differentiation of HER-2/Neu-Overexpressing Breast Cancer Cell by Emodin. *Cancer Research* **55**, 3890-3896.
100. Doff, W., 1954. *In vitro* Tuberculostatic Action of Aloe and its most Important Components. *Chemical Abstracts* **48**, 3569.
101. Alexa, M., 1985. Hydroxyanthraquinone Pharmaceuticals for Local Treatment of Psoriasis and Other Skin Disorders. *Chemical Abstracts* **102**, 12423c.
102. Van Den Berg, A.J.J. y Labadie, R.P., 1989. Quinones. En: *Methods in Plant Biochemistry* 1; Academic Press Limited: London, pp. 451-491.
103. Bruneton, J., 1993. Quinones. En: *Pharmacognosy, Phytochemistry Medicinal Plants*; Lavoisier Publishing, Inc. : Paris, Francia, pp-409-459.
104. Herbert, R., 1989. *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*; Chapman & Hall: London, U.K., pp. 31-62, 96-110.
105. Dewick, P.M., 1999. *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*; Wiley: London, UK, pp. 32-66,109-151.
106. Wijnsma, R., Verpoorte, R., 1986. Anthraquinones in the Rubiaceae. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* **49**, 79-149.
107. Bruneton, J., 1995. Quinones. En: *Pharmacognosy. Phytochemistry Medicinal Plants*; Lavoisier Publishing, Inc.: Paris, Francia, pp. 339-370.
108. Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon, W., 1989. *Tables Of Spectral Data For Structure Determination Of Organic Compounds* ¹³C-NMR ¹H-NMR IR Ms Uv/Vis; Edit. Springer-Verlag: New York, U.S.A., pp. B135, B145, C210, H30.
109. Juaristi. E., 1998. *Introducción a la Estereoquímica y al Análisis Conformacional*; Juaristi, E., editor, CIEA-IPN: México, D.F., pp 17-19.

110. Flack, H.D., Bernardinelli, G., 1999. Absolute Structure and Absolute Configuration. *Acta Crystallographica A* **55**, 908-917.
111. Avendaño, M.C., 1993. *Introducción a la Química Farmacéutica*; 2a. Edición, Interamericana-McGraw-Hill: México, D.F., pp. 807-842, 971-999.
112. Juaristi, E., 1982. Breve Introducción a la Estereoquímica. En: *Tópicos Modernos de la Estereoquímica*; Juaristi, E., editor, CIEA-IPN: Mexico, D.F., pp 1-20.
113. Eliel, E.L., Wilen, S.H., 1994. *Stereochemistry of Organic Compounds*; John Wiley & Sons, Inc.: New York, USA, pp. 991-1050.
114. Manitto, P., Monti, D. and Speranza, G., 1990. Studies on Aloe. Part 6. Conformation and Absolute Configuration of Aloins A and B and Related 10-C-Glucosyl-9-Anthrone. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I*, 1297-3000.
115. Rauwald, H.W., Lohse, K., Bats, J.W., 1991. A New Investigation on Constituents of Aloe and Rhamnus Species, XIII[1] Determination of Absolute Configurations and Conformations of the Two Diastereomeric Oxanthrone-C-glucosyls 10-Hydroxyaloin A and B. *Z. Naturforsch.* **46b**, 551-557.
116. Manitto, P., Monti, D., Speranza, G., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Griffini, A. and Pifferi, G., 1993. Conformational Studies of Natural Products. Part 4. Conformation and Absolute Configuration of Cascarosides A, B, C, D. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I*, 1577-1580.
117. Manitto, P., Monti, D., Speranza, G., Mulinacci, N., Vincieri, F.F., Griffini, A. and Pifferi, G., 1995. Studies on Cascara, Part 2. Structures of Cascarosides E and F. *Journal of Natural Products* **58**, 419-423.

118. Contreras-Ochoa, C., Ramsey, J.M., 2004. Gametocitos de *Plasmodium vivax* y *Plasmodium falciparum*: etapas relegadas en el desarrollo de vacunas. *Salud Pública de México* **46**, 64-70.
119. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Goodman, A., 1996. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*; 9a. edición, Editorial McGraw-Hill Interamericana: México, D.F., pp. 1025-1047.
120. Ringwald, P., Bickii, J., Same-Ekobo, A., Basco, L.K., 1997. Pyronaridine for Treatment of *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 2317-2319.
121. Katzung, B.G., Trevor, A.J., 1997. *Farmacología: Autoevaluación y Repaso*; 2a. edición, El Manual Moderno: México, D.F., pp. 591-593.
122. Vippagunta, S.R., Dorn, A., Matile, H., Bhattacharjee, A.K., Karle, J.M., Ellis, W.Y., Ridley, R.G., Vennerstrom, J.L., 1999. Structural Specificity of Chloroquine-Hematin Binding Related to Inhibition of Hematin Polymerization and Parasite Growth. *Journal of Medicinal Chemistry* **42**, 4630-4639.
123. Jain, R., 2002. Recent Advancements in Antimalarial Drug Development. *Current Research & Information on Pharmaceutical Science* **3**, 2-8.
124. O'Neill, P.M., Willock, D.J., Hawley, S.R., Bray, P.G., Storr, R.C., Ward, S.A., Park, B.K., 1997. Synthesis and in Vitro and in Vivo Antipalariar Activity of New 4-Anilinoquinolines. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 437-448.
125. Delarue, S., Girault, S., Maes, L., Debreu-Fontaine, M.-A., Labaeid, M., Grellier, P., Sergheraert, C., 2001. Synthesis and in Vitro and in Vivo Antimalarial Activity of New 4-Anilinoquinolines. *Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 2827-2833.

126. O'Neill, P.M., Bishop, L.P., Storr, R.C., Hawley, S.R., Maggs, J.L., Ward, S.A., Park, B.K., 1996. Mechanism-Based Design of Parasite-Targeted Artemisinin Derivatives: Synthesis and Antimalarial Activity of Benzylamino and Alkylamino Ether Analogues of Artemisinin. *Journal of Medicinal Chemistry* **39**, 4511-4514.
127. Ismail, N.H., Ali, A.M., Aimi, N., Kitajima, M., Takayama, H., Lajis, H., 1997. Anthraquinones from *Morinda elliptica*. *Phytochemistry* **45**, 1723-1725.
128. González, A.G., Bermejo-Barrera, J., Barba-Davila, B., Valencia, E., Domínguez, X.A., 1992. Anthraquinones from *Cassia greggii*. *Phytochemistry* **31**, 255-258.
129. Martínez M., 1989. *Plantas Medicinales de México*. Ed. Botas, México, D.F., pp. 426, 463.
130. De Gregorio, E., Lemaitre, B., 2002. The Mosquito Genome: The Post-Genomic Era Opens. *Nature* **419**, 496-497.
131. Heminway, J., Bates, I., 2003. Malaria: past problems and future prospects. *European Molecular Biology Organization Reports* **4**, S29-S31.
132. Phillipson, J.D., Wright, C.W., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., 1993. Tropical Plants as Sources of Antiprotozoal Agents. En: *Phytochemical Potential of Tropical Plants*; Downum, K.R., Romeo, J.T., Stafford, H.A., Eds., Plenum Press: New York, pp. 1-40.
133. Dou, J., Khan, I. A., McChesney, J., Burandt, C.L., 1996. Qualitative and Quantitative High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Quassinoids in Simaroubaceae Plants. *Phytochemical Analysis* **7**, 192-200.
134. Baker, J.T., Borris, R.P., Carté, B., Cordell, G.A., Soejarto, D.D., Cragg, G.M., Gupta, M.P., Iwu, M.M., Madulid, D.R., Tyler, V. E., 1995. Natural Product Drug

Discovery and Development New Perspectives on International Collaboration. *Journal of Natural Products* **58**, 1325-1357.

135. Milhous, W. K.; Weatherly, N. F.; Bowdre, J. H.; Desjardins, R. E., 1985. *In vitro* Activities of and Mechanisms of Resistance to Antifol Antimalarial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **27**, 525–530.

136. Desjardins, R. E.; Canfield, C. J.; Haynes, D. M.; Chulay, J. D., 1979. Quantitative Assessment of Malarial Activity *In vitro* a Semiautomated Microdilution Technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **16**, 710–718.

137. Likhivwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M., Ruangrunsi, N., 1993. Cytotoxic and Antimalarial Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products* **56**, 30-38.

138. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Boskesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R., 1990. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* **82**, 1107-1112.

139. Danielsen, K., Aknes, D.W. and Francis, G.W., 1992. NMR Study of Some Anthraquinones from *Rhubarb*. *Magnetic Resonance in Chemistry* **30**, 359-363.

140. Hernandez-Medel, M. R.; Garcia-Salmones, I.; Santillan, R.; Trigos, A., 1998. An Anthrone from *Picramnia antidesma* stem. *Phytochemistry* **48**, 2599–2601.

141. Salama, A.M., Sánchez López, M., Gutiérrez, M. and Achenbach, H., 1987. Antiinflammatory and Cardioactive Glucosides from *Sechium edule*. *Revista Latinoamericana de Química* **18**, 132-133.

142. Sholichin, M., Yamasaki, K., Kasai, R., Tanaka, O., 1980. ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance of Lupane-Type Triterpenes, Lupeol, Betulin and Betulinic Acid. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **28**, 1006-1008.
143. Otsuka, H., Fijioaka, S., Komiya, T., Goto, M., Hiramatsu, Y., Fujimura, H., 1981. Studies on Anti-inflammatory Agents. V.¹⁾ A new Anti-inflammatory Constituent of *Pyracantha crenulata* Roem.²⁾ *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 3099-3104.
144. Robinson, F. Martel, H., 1970. Betulinic Acid from *Arbutus menziesii*. *Phytochemistry* **9**, 907-909.
145. Duddeck, H., Kaiser, M., 1982. ^{13}C NMR Spectroscopy of Coumarin Derivatives. *Organic Magnetic Resonance* **20**, 55-72.
146. Coskun, M., Satake, T., Hori, K., saiki, Y., Tanker, M., 1990. Anthraquinone glycosides from *Rhamnus libanoticus*. *Phytochemistry* **29**, 2018-2020.
147. Angerhofer, C.K., Guinaudeau, H., Wongpanich, V., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., 1999. Antiplasmodial and Cytotoxic Activity of Natural Bisbenzylisoquinoline Alkaloids. *Journal of Natural Products* **62**, 59-66.
148. Lin, L.-Z., Shiem, H.-L., Angerhofer, C.K., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., 1993. Cytotoxic and Antimalarial Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Cyclea barbata* *Journal of Natural Products* **61**, 22-29.
149. Kardono, L.B.S., Angerhofer, C.K., Tsauri, S., Padmawinata, K., Pezzuto, J.M., Kinghorn, D., 1991. Cytotoxic and Antimalarial Constituents of the Roots of *Eurycoma longifolia*. *Journal of Natural Products* **54**, 1360-1367.
150. Bisrat, D., Dagne, E., Van Wyk, B.-E., Viljoen, A., 2000. Chromones and anthrones from *Aloe marlothii* and *Aloe rupestris*. *Phytochemistry* **55**, 949-952.

151. Joseph-Nathan, P., Hernandez-Medel, R., Martínez, E., Rojas-Gardida, M., Cerda, C.M., 1988. Conformation and Absolute Configuration of Naturally Occurring Parvifoline and Several Synthetic Derivates. *Journal of Natural Products* **51**, 675-689.
152. Phoung-Mai, L., Guéritte, F., Dumontet, V., Van Tri, M., Hill, B., Thoison, O., Guénard, D., Sevenet, T., 2001. Cytotoxicity of Rhamnosyl Anthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalis*. *Journal of Natural Products* **64**, 1162-1168.
153. Yenesew, A., Dagne, E., Miller, M., Steglich, W., 1994. An Anthrone, an Anthraquinone and two Oxanthrones from *Kniphofia foliosa*. *Phytochemistry* **37**, 525-528.
154. Dagne, E., Bisrat, D., Van Wyk, B.-E., Viljoen, A., Hellwing, V., Steglich, W., 1997. Anthrones from *Aloe microstigma*. *Phytochemistry* **44**, 1271-1274.
155. Okamura, N., Hine, N., Harada, S., Fujioka, T., Mihashi, K., Nishi, M., Miyahara, K., Yagi, A., 1997. Diastomeric C-Glycosylanthrones of *Aloe vera* leaves. *Phytochemistry* **45**, 1519-1522.
156. Joseph-Nathan., 1982. *Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno-1 y de Carbono-13* Monografía # 9; Sria. Gral de la Organización de los Estados Americanos: Washington, D.C., pp. 81.
157. Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon, W., 1989. *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds* ¹³C-NMR, ¹H-NMR, IR, MS, UV/VIS; Edit. Springer-Verlag: U.S.A., pp. B135, B145, C210.

158. Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon, W., 1989. *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds* ¹³C-NMR, ¹H-NMR, IR, MS, UV/VIS; Edit. Springer-Verlag: U.S.A. pp. H30.
159. Dagne, E., Van Wyk, B.-E., Stephenson, D., Steglich, W., 1996. Three Oxanthrones from *Aloe littoralis*. *Phytochemistry* **42**, 1683-1687.
160. Dagne, E., Bisrat, D., Codina, C., Bastida, J., 1998. A C,O-Diglucosylated Oxanthrone from *Aloe littoralis*. *Phytochemistry* **48**, 903-905.
161. Dagne, E., Yenesew, A., 1993. Knipholone Anthrone from *Kniphofia foliosa*. *Phytochemistry* **34**, 1440-1441.
162. Lederkremer, R.M., Varela, O., 1988. *Hidratos de Carbono Monografía # 32*; Sria. Gral. de la Organización de los Estados Americanos: Washington, D.C., pp. 9-20.
163. Harding, W.W., Henry, G.E., Lewis, P.A., Jacobs, H., McLean, S., Reynolds, W.F., 1999. Alvarodoins A-D. Anthracenone C Arabinosides from *Alvaradoa jamaicensis*. *Journal of Natural Products* **62**, 98-101.
164. Kouzi, S.A., Chatterjee, P., Pezzuto, J.M., Hamann, M.T., 2000. Microbial Transformation of the Antimelanoma Agent Betulic Acid. *Journal of Natural Products* **63**, 1653-1657.
165. Bringmann, G., Saeb, W., Assi, L.A., Francois, G., Narayanan, A.S.S., Peters, K., Peters, E.-M., 1997. Betulic Acid: Isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, Antimalarial Activity, and Crystal Structure of the Benzyl Ester. *Planta Medica* **63**, 255-257.

166. Duker-Eshun, G., Jaroszewski, J.W., Asomaning, W.A., Opong-Boachie, F., Christensen, B., 2004. Antiplasmodial Constituents of *Cajanus cajan*. *Phytotherapy Research* **18**, 128-130.
167. Kashiwada, Y., Hashimoto, F., Cosentino, L.M., Chen, Ch.-H., Garret, P.E., Lee, K.-H., 1996. Betulinic Acid and Dehidrobetulinic Acid Derivatives as Potent Anti-HIV Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **39**, 1016-1017.
168. Cimanga, K., De Bruyne, T., Pieters, L., Vlietinck, A. J., 1997. *In Vitro* and *In Vivo* Antiplasmodial Activity of *Cryptolepine sanguinolenta*. *Journal of Natural Products* **60**, 688-691.
169. MacKinnon, S., Durst, T., Arnason, J.T., Angerhofer, C., Pezzuto, J., Gbeassor, M., 1997. Antimalarial Activity of Tropical Meliaceae Extracts and Gedunin Derivatives. *Journal of Natural Products* **60**, 336-341.

9. ARTÍCULO DERIVADO DEL PRESENTE PROYECTO

Hernandez-Medel, M.R., Pereda-Miranda, R., 2002. Cytotoxic Anthraquinone Derivatives from *Picramnia antidesma*. *Planta Medica* **68**, 556-558.

Cytotoxic Anthraquinone Derivatives from *Picramnia antidesma*

María del Rosario Hernández-Medel¹, Rogelio Pereda-Miranda²

Abstract

Activity-guided investigation of crude extracts prepared from the root bark of *Picramnia antidesma*, a medicinal plant long used for the treatment of malaria in tropical areas of the Americas, when tested on KB cells led to the isolation of a new compound, 10-*epi*-uveoside, from a cytotoxic fraction containing a rich mixture of anthrone glycosides. The antiplasmodial activity proved to be a result of the high levels of cytotoxicity displayed by the anthraquinone derivatives and therefore infusions from this crude drug lack the selectivity index needed to be an effective antimalarial agent.

Members of the neotropical genus *Picramnia*, formerly the largest and most complex in the Simaroubaceae but recently promoted to integrate the new family Picramniaceae [1], are recognized traditional home remedies for intermittent fevers and malaria [2]. Previous phytochemical investigations on this genus resulted in the isolation of triterpenoids, anthraquinones, coumarins, and, recently, anthrone and oxanthrone glycosides [3], [4], [5], [6], [7].

Picramnia antidesma Swartz is a shrub, or small tree, native to Mesoamerica and the West Indies, and yields the drug known as simarouba bark. The stem and root barks macerated in water or rectified spirits produce a yellow tincture which, though very bitter, is valued for its usefulness in treating dysentery and malaria. Interestingly, *P. antidesma* was observed to give positive results against avian malarias [8], but no attempt has been made to identify the potential active principles from this plant material. In our experiments directed towards the discovery of bioactive natural products, it was found that the crude extract from the root bark of *P. antidesma* inhibited the growth of *Plasmodium falciparum*. In addition, this extract was also cytotoxic when tested *in vitro* with human nasopharyngeal carcinoma (KB). The reasonably high potency for the antimalarial activity displayed by this extract (clone D6: $IC_{50} = 9.3 \times 10^{-6}$ g/ml; clone W2: $IC_{50} = 8.0 \times 10^{-6}$ g/ml) was found to be of the same order of magnitude as that reported for other medicinal plants traditionally used in the treatment of tropical fevers [9], [10], such as those characteristic of malaria. This antiplasmodial activity showed a clear association with the strong cytotoxic effect of the root bark

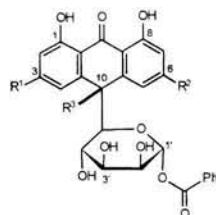
Affiliation: ¹ Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico · ² Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

Correspondence: Dr. Rogelio Pereda-Miranda · Departamento de Farmacia · Facultad de Química · Universidad Nacional Autónoma de México · 04510, Mexico City · Mexico · E-Mail: pereda@servidor.unam.mx · Fax: +52 55-5622 5329

Received: August 30, 2001 · **Accepted:** January 20, 2002

Bibliography: Planta Med 2002; 68: 556-558 · © Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York · ISSN 0032-0943

extract and, therefore, the results from these preliminary assays indicated the presence of non-selective cytotoxic constituents in *P. antidesma*. Bioassay-guided fractionation using KB cytotoxicity was carried out to achieve the isolation of two pairs of diastereoisomeric anthrones (**1–4**). Spectral evidence indicates that the new compound **1** is the 10-epimer of uveoside (**2**), a previously isolated anthrone C-glycoside from this plant species [5].



	R ¹	R ²	R ³
1	Me	H	H
2	H	Me	H
3	Me	OH	H
4	OH	Me	H
5	Me	OH	OH
6	OH	Me	OH

10-*epi*-Uveoside (**1**) exhibited a molecular formula of C₂₇H₂₄O₉ based on its HR-FAB-MS data. The ¹H- and ¹³C-NMR spectral data of **1** and **2** were closely related and revealed the spectral anisochrony (chemical shift difference, Δδ) between the two diastereoisomers because of the inversion in the configuration at C-10. For compound **1**, the signals for the aromatic methyl group (Δδ 0.48), H-2 (Δδ 0.25) and H-4 (Δδ 0.36) were downfield shifted relative to the same resonances in uveoside (**2**). The opposite anisotropic shielding effect induced by the benzoate residue on signals H-5 (Δδ -0.31), H-6 (Δδ -0.39) and H-7 (Δδ -0.23) was concurrently observed. In addition to this NMR corroboration for diastereotopicity, the CD spectrum of compound **1** showed a positive Cotton effect a 298 nm which is inverse in the rotation sign to that previously reported for uveoside (**2**) and other (10*R*)-anthrones [5].

All the anthrone glycosides displayed a considerable level of cytotoxicity (Table 1) which resulted in a poor antiparasitodal selectivity [ED₅₀ (KB cells)/IC₅₀ (*P. falciparum*)] [11]. It may be assumed that the antiparasitodal effects of *P. antidesma* are due to its general cytotoxicity and despite tradition and beliefs this drug is not a source of antiprotozoal agents. The major anthraqui-

ones present in the inactive MeOH extract of root bark (KB: ED₅₀ >2.0 × 10⁻⁵ g/mL) of this drug were the oxantrones saroside (**5**) and mayoside (**6**), which represent the 10-hydroxy derivatives of cytotoxic picramnioside D (**4**) and E (**3**), and on the contrary, these glycosides exhibited none of the cytotoxic effects of their anthrone homologues.

Materials and Methods

Isolation procedures: The plant material was collected at Yecuatla in Veracruz, Mexico in March 1992. Voucher specimens (XAL-107412) are on deposit at the Herbarium of the Instituto de Ecología A.C (Xalapa, Mexico). The dried and finely powdered root barks (690 g) were extracted with Et₂O followed by MeOH at room temperature. The solvent was removed under vacuum to yield 5.19 g of Et₂O (KB: ED₅₀ 9.7 × 10⁻⁷ g/ml) and 40.3 g of MeOH (KB: ED₅₀ >2.0 × 10⁻⁵ g/ml) extracts. The cytotoxic extract was chromatographed on silica gel (100 g) column, using CHCl₃/MeOH mixtures. Cytotoxic activity was found in the pool (0.9 g) eluted with CHCl₃/MeOH (9:1) which was further rechromatographed over silica gel (30 g) using CHCl₃/Me₂CO (7:3). A total of 55 fractions (20 ml each) were collected by monitoring on TLC (silica gel 60 UV₂₅₄; CHCl₃/MeOH, 9:1). Fractions 2–5 yielded chrysophanol (25 mg), R_f 0.85 [4]; fractions 7–11 contained emodin (25 mg), R_f 0.67 [4]. Fractions 19–23 yielded after crystallization uveoside (**2**; 20 mg), [α]_D: -3 (c 0.36, MeOH), R_f 0.45 [5]. Fractions 24–30 were further chromatographed on a silica gel column (10 g) using C₆H₆/Me₂CO (7:3) as eluent, yielding compound **1** (15 mg), R_f 0.41. Fractions 32–36 were triturated with CHCl₃ and recrystallized yielding picramnioside D (**4**; 25 mg), [α]_D: +5 (c 0.94, MeOH); R_f 0.32 [7]. Finally, fractions 38–50 were similarly rechromatographed as for **2**, giving picramnioside E (**3**; 15 mg), [α]_D: +21 (c = 0.33, MeOH); R_f 0.21 [7]. The MeOH extract (10 g) was chromatographed over a silica gel column (200 g) and eluted with CHCl₃/MeOH (4:1). Twenty fractions (250 ml each) were collected. Fractions 1–3 yielded chrysophanol (10 mg); fractions 4–10 were further purified on a silica gel column (20 g). Elution with C₆H₁₄/Me₂CO (7:3 and 6:4, respectively) yielded emodin (20 mg) and 7-hydroxycoumarin (15 mg), R_f 0.61 [4]; fractions 11–12 were rechromatographed on silica gel (10 g) using C₆H₆-Me₂CO (1:1) to afford mayoside (**6**; 2 mg), [α]_D: -7 (c 0.44, MeOH); R_f 0.35 [4]; fractions 13–19 were also purified by silica gel column chromatography (10 g) using the same eluent to yield an additional amount of mayoside (1 mg) and saroside (**5**; 3.5 mg), [α]_D: +34 (c 0.44, MeOH); R_f 0.28 [6]. The known anthraquinones derivatives **2–6** were identical (m.p., NMR and TLC) to standard samples. Copies of the original spectra are obtainable from the author of correspondence.

Biological activity: Cytotoxicity was conducted using cultured KB (nasopharyngeal carcinoma), HCT-15 (colon cancer), OVCAR (ovarian adenocarcinoma) and SQC-1 (squamous cell cervix carcinoma) cells according to previously described protocols [11]. Quantitative assesment of antimalarial activity *in vitro* was determined by means of the microculture radioisotope-incorporation techniques based upon the method described by Desjardins [12]. Two strains of *Plasmodium falciparum*, D6 (chloroquine-sensitive) and W2 (chloroquine-resistant), were used in this study [11].

Table 1 Cytotoxic and antiparasitodal activities of compounds **1–6**

Compound	ED ₅₀ [μM]				IC ₅₀ [μM]	
	KB	HCT	OVCAR	SQC-1	D6	W2
1	0.6	2.3	8.9	4.5	5.1	4.5
2	4.5	4.7	4.6	10	2.4	2.5
3	3.4	6.2	10	2.8	10	9.3
4	3.2	6.3	5.5	4.1	10	9.4
5	>40	>40	>40	>40	>20	>20
6	>40	>40	>40	>40	>20	>20
Ellipticine	0.9	1.5	2.5	5.8	-	-
Chloroquine	34	>40	>40	>40	0.007	0.1

10-epi-Uveoside (**1**): yellow needlesh [C₂₇H₄₀O₉]; m.p. 215–217 °C; [α]_D: +36 (c 0.63, MeOH); IR: ν_{max} = 3410, 1733, 1720, 1637, 1618, 1602, 1489 cm⁻¹; UV: λ_{max} nm (log ε) = 359 (4.08), 315 (3.77), 297 (4.00), 276 (3.74), 268 (3.99), 255 (3.87), 204 (4.54); CD (c 0.13, MeOH): Δε (nm) = +0.95 (352), -0.51 (324), +4.74 (298), -4.10 (269), +1.02 (240), -2.91 (233), +8.50 (224), -3.97 (206); ¹H-NMR (500 MHz, Me₂CO): δ = 12.01 (s, OH-8), 11.95 (s, OH-1), 7.82 (2H, m, H-2'' and H-6''), 7.64 (1H, m, H-4''), 7.49 (2H, m, H-3'' and H-5''), 7.14 (1H, t, J = 8.0 Hz, H-6), 7.04 (1H, dd, J = 1.4, 0.7 Hz, H-4), 6.88 (1H, ddd, J = 7.5, 1.0, 0.9 Hz, H-5), 6.73 (1H, dd, J = 1.3, 0.7 Hz, H-2), 6.66 (1H, dd, J = 8.4, 1.1 Hz, H-7), 5.88 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-1'), 4.67 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-10), 4.00 (1H, dd, J = 10.0, 2.5 Hz, H-5'), 3.87 (1H, m, H-2'), 3.85 (1H, m, H-3'), 3.67 (1H, ddd, J = 9.9, 8.8, 5.1 Hz, H-4'), 2.37 (3H, s, Me); ¹³C-NMR (125.7 MHz, Me₂CO): δ = 193.75 (C-9), 164.23 (C-1'' = O), 163.26 (C-1), 162.87 (C-8), 148.01 (C-3), 146.45 (C-5a), 142.29 (C-4a), 136.60 (C-6), 134.21 (C-4''), 130.47 (C-1''), 130.33 (C-2'' and C-6''), 129.33 (C-3'' and C-5''), 122.38 (C-4), 119.01 (C-5), 118.15 (C-8a), 117.15 (C-2), 116.26 (C-7), 116.10 (C-1a), 95.50 (C-1'), 81.88 (C-5'), 73.39 (C-3'), 70.69 (C-2'), 68.34 (C-4'), 43.88 (C-10), 22.15 (Me); HR-FAB-MS: m/z = 493.1499 [M + H]⁺ (calcd. for C₂₇H₄₀O₉ requires 493.1498).

References

- 1 Fernando ES, Quinn CJ. Picramniaceae, a new family, and a recircumscription of Simaroubaceae. *Taxon* 1995; 44: 177–81
- 2 Standley PC. *Trees and Shrubs of Mexico*. Washington: Smithsonian Institution, 1961: 541–2
- 3 Solis PN, Gutierrez Ravelo A, Gonzalez AG, Gupta MP, Phillipson JD. Bioactive anthraquinones glycosides from *Picramnia antidesma* ssp. fessonia. *Phytochemistry* 1995; 38: 477–80
- 4 Hernandez-Medel MR, Lopez-Marquez O, Santillan R, Trigos A. Mayo-side, an oxanthrone from *Picramnia hirsuta*. *Phytochemistry* 1996; 43: 279–81
- 5 Hernandez-Medel MR, Garcia-Salmones I, Santillan R, Trigos A. An anthrone from *Picramnia antidesma*. *Phytochemistry* 1998; 48: 2599–2601
- 6 Hernandez-Medel MR, Ramirez-Corzas CO, Rivera-Dominguez MN, Ramirez-Mendez J, Santillan R, Rojas-Lima S. Diastereomeric C-glycosyloxanthrones from *Picramnia antidesma*. *Phytochemistry* 1999; 50: 1379–83
- 7 Rodriguez-Gamboa T, Fernandes JB, Rodrigues Fo E, Da Silva MF, Vieira PC, Castro OC. Two anthrones and one oxanthrone from *Picramnia teapensis*. *Phytochemistry* 1999; 51: 583–6
- 8 Spencer CF, Koniuszy FR, Rogers EF, Shavel J Jr, Easton NR, Kaczka EA, Kuehl FA Jr, Phillips RF, Walti J, Folkers K, Malanga C, Seeler AO. Survey of plants for antimalarial activity. *Lloydia* 1947; 10: 145–74
- 9 Cabral JA, McChesney JD, Milhous WK. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. *Journal of Natural Products* 1993; 56: 1954–61
- 10 MacKinnon S, Durst T, Arnason JT, Angerhofer C, Pezzuto J, Sanchez-Vindas PE, Poveda LJ, Gbeassor M. Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and genudin derivatives. *Journal of Natural Products* 1997; 60: 336–41
- 11 Angerhofer CK, Guinaudeau H, Wongpanich V, Pezzuto JM, Cordell G. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products* 1999; 62: 59–66
- 12 Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1979; 16: 710–8