

ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE LARNAXOLIDA A Y B, NUEVOS WITHANOLIDOS DE *LARNAX GLABRA* (STANDL.) SAWYER

STRUCTURE AND LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF LARNAXOLIDE A AND B, NEW WITHANOLIDES FROM *LARNAX GLABRA* (STANDL.) SAWYER

Diana Cardona¹, Winston Quiñones¹, Fernando Torres¹, Iván D. Vélez², Clara I. Orozco³, Javier Garzón³, Fernando Echeverri¹

Resumen

Dos nuevos withanolidos, Larnaxolida A (**1**) y Larnaxolida B (**2**), fueron aislados del extracto en etanol de las hojas de *Larnax glabra* (Standl.) Sawyer. Las estructuras de los compuestos fueron establecidas con base en RMN (HMQC, HMBC y COSY) y aspectos biogénéticos. Estos compuestos muestran una actividad leishmanicida promisoriosa y una toxicidad reducida en comparación con otros withanolidos ya reportados.

Palabras claves: actividad leishmanicida, *Larnax glabra*, nuevos compuestos, Solanaceae, withanolidos.

Abstract

Two new withanolides, Larnaxolide A (**1**) and Larnaxolide B (**2**), were isolated from ethanolic extract of *Larnax glabra* (Standl.) Sawyer's leaves. The structures of these compounds were established according to NMR experiments (HMQC, HMBC, and COSY) and biogenetic aspects. These compounds shown a promising leishmanicidal activity and reduced toxicity compared to another withanolides.

Key words: *Larnax glabra*, leishmanicidal activity, new compounds, Solanaceae, withanolides.

INTRODUCCIÓN

Colombia es el segundo país megadiverso del mundo y además cuenta con hondas tradiciones etnomédicas, específicamente en lo relacionado con el uso de plantas para curar enfermedades. Esta biodiversidad representa una alternativa farmacológica pero también es fuente de materiales valiosos para la industrias farmoquímica, ali-

menticia y cosmética; por razones políticas y sociales en las dos últimas décadas estas industrias han estado alejada de esta fuente de sustancias bioactivas, pero recientemente han renovado su interés en ella (Cragg y Newman, 2005). Por esta razón se emprendió un estudio para tratar de detectar actividad leishmanicida en algunas solanáceas colombianas usadas en la etnomedicina para combatir dicha enfermedad.

Universidad de Antioquia-SIU. A. A. 1226. Medellín (Antioquia), Colombia: ¹ Grupo Química Orgánica de Productos Naturales, ² Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales.

³ Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies colectadas para este trabajo pertenecen a la familia Solanaceae y un ejemplar de cada una de ellas se encuentra en el herbario del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia. Como se describe a continuación: *Solanum aphyodendron* S. Knapp (CIO 3723), *Solanum leptorhachis* Bitter (JCG 716), *Solanum* sp. (JCG 384), *Solanum* sección *geminata* (JCG 761), *Larnax sachapapa* Hunz. (JGV 190L), *Larnax glabra* (Standl.) Sawyer (JGV 175), *Acnistus arborescens* (L.) Schltldl (JGV 133) y *Schultesianthus coriaceus* (Kuntze) Hunz (JGV 127).

Obtención de extractos. El material vegetal seco se picó con etanol al 90% y después de eliminar el solvente bajo presión reducida se redisolvió el extracto en la mezcla triple (n-hexano:diclorometano:metanol 2:1:1); la parte insoluble se solubilizó en metanol. Posteriormente, se sometieron a ensayos de bioactividad.

Larnaxolidos A y B. Hojas secas (200 g) de la planta fueron trituradas con etanol (2 x 0,5 l) y luego evaporados al vacío hasta sequedad. El residuo (2g) fue disuelto en una mezcla de C_6H_6 - CH_2Cl_2 :MeOH (2:1:1) y se realizó una columna de sephadex-LH 20 utilizando el eluyente antes mencionado, colectando alrededor de 20 fracciones. En las fracciones 6-10 se encontraba Larnaxolida A como componente mayoritario, que repurificado mediante una columna de silica gel utilizando C_6H_6 -EtOAc (4:1). Posteriormente, de las fracciones 11-15 se obtuvo el compuesto Larnaxolida B que fue repurificado en una columna de silica gel utilizando CH_2Cl_2 :EtOAc (2:3).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN 1H y ^{13}C) se realizaron en $CDCl_3$ y CD_3OD , utilizando un equipo Bruker AMX 300 MHz; se reportan los desplazamientos químicos (δ) en ppm con base al solvente de referencia y las constantes de acoplamiento (J) en Hz. La determinación de

los tipos de carbono presentes en la molécula se realizó por medio de los experimentos desacoplados DEPT 135 y JMOD.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en un Perkin-Elmer Spectrum RXL1 FTIR en KBr; solo se incluyen las absorciones características.

Actividad leishmanicida y citotoxicidad. Los ensayos de actividad leishmanicida y de citotoxicidad in vitro se realizaron en cooperación con el PECET de acuerdo a protocolos previamente descritos (Weniger et al., 2001; Robledo et al., 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se encuentran los resultados de la evaluación de ocho especies pertenecientes a los géneros *Acnistus*, *Solanum* y *Larnax*. En cada una de las especies se observa que el porcentaje de inhibición se establece a concentraciones diferentes en cada caso, esto se debe a que para determinarlo se utilizan concentraciones inferiores a la concentración letal cincuenta, garantizando que la efectividad no está enmascarada por la citotoxicidad del extracto o producto evaluado. De acuerdo a lo anterior se encontró que tres de las especies exhiben altos índices de actividad leishmanicida en un rango del 89,9 a 97,2% a dosis tan bajas como 15, 5 y 2,5 mg/ml; otro grupo posee niveles de inhibición entre el 73-77,4% pero a dosis superiores a las descritas anteriormente; las toxicidades de estos extractos brutos son relativamente bajas. Es de anotar que ninguna de las especies evaluadas de manera preliminar en este trabajo ha sido analizada como fuente de antiparasitarios ni explorada en sus aspectos químicos, excepto *Acnistus arborescens* en la cual se reporta la presencia de varios withanolidos citotóxicos (Minguzzi et al., 2002) análogos a las acnistinas (en especial A, B y E), compuestos típicos de este género y de *Dunalia* (Luis et al., 1994), lo cual a su vez está de acuerdo con la alta actividad y elevada toxicidad encontradas.

Tabla 1. Citotoxicidad (U937) y Actividad Leishmanicida en amastigotes intracelulares de *Leishmania (V.) panamensis* de extractos de especies de la familia Solanaceae

Nombre científico	Parte utilizada	Tipo de extracto	CI ₅₀ (µg/ml)	Inhibición (%)
<i>Solanum aphyodendron</i> S. Knapp	hojas	etanólico (fracción soluble en mezcla triple **)	260,5	56,2 ^a
<i>Solanum leptorhachis</i> Bitter	hojas	etanólico (fracción soluble en mezcla triple **)	44,6	73 ^e
		fracción soluble en metanol	14,8	54 ^c
<i>Acnistus arborescens</i> (L.) Schltld	hojas	etanólico	< 7,8	43,3 ^h
	tallos	etanólico	18,1	89,9 ^c
<i>Larnax sachapapa</i> Hunz,	hojas	etanólico	23,7	91,1 ^h
<i>Larnax glabra</i> (Standl.) Sawyer	hojas	etanólico (fracción soluble en mezcla triple **)	41,6	60,4 ^a
	tallos	etanólico	58,6	50,4 ⁱ
<i>Solanum</i> sp. *	hojas	etanólico	14,9	77,4 ^c
		etanólico partición en Hexano	15,2	24,8 ^f
		etanólico partición en CH ₂ Cl ₂	< 7,8	49,1 ^h
<i>Solanum</i> sp. (sección <i>geminata</i> *)	hojas	etanólico (fracción soluble en mezcla triple**)	20,1	63,4 ^h
		fracción soluble en metanol	10,0	97,2 ^k
<i>Schultesianthus coriaceus</i> (Kuntze) Hunz	hojas	acuoso/líofilizado	24,0	75,5 ^d

* Sin identificación completa. ** Mezcla triple: n-hexano:diclorometano:metanol (2:1:1). Concentraciones máximas evaluadas: ^a 10 µg/ml; ^b 20 µg/ml; ^c 15 µg/ml; ^d 32,5 µg/ml; ^e 40 µg/ml; ^f 3,75 µg/ml; ^g 3,125 µg/ml; ^h 5 µg/ml; ⁱ 1,25 µg/ml; ^j 12,5 µg/ml; ^k 2,5 µg/ml.

Para las dos especies del género *Larnax* se evidencia que sus extractos no son tan citotóxicos como el extracto de *Acnistus*, pero su porcentaje de inhibición es superior. Sin embargo, de estas dos especies el extracto de *Larnax glabra* es el más interesante para la búsqueda de nuevos sistemas farmacofóricos activos contra amastigotes de *Leishmania* debido a que su toxicidad es aproximadamente seis veces menor que la de *Acnistus*, por su parte *Larnax sachapapa* es tres veces menos tóxica.

Dado el panorama anterior se continuó con el estudio fitoquímico del extracto de *Larnax glabra*, ais-

lando mediante combinación de técnicas cromatográficas dos compuestos (**1** y **2**) siendo el primero de ellos el más abundante. La asignación de sus estructuras por RMN en 1D y 2D se desarrolló como se describe a continuación.

El espectro JMOD (tabla 2) del compuesto **1**, denominado Lanaxolida A, mostró la presencia de las siguientes señales: cinco grupos metilos en 12,5, 13,1, 15,2, 17, 19,5 ppm; seis grupos CH₂ en 22, 23,7, 27,6, 29,7, 36,9, 40,3 ppm; once grupos CH en 35,7, 35,9, 39,2, 51,5, 52,5, 56,4, 57,4, 65,4, 92,2, 129,5, 140 ppm; y seis carbonos cuaternarios en 44, 51,4, 64,2, 65,5, 73,7, 203,7

ppm. Los átomos de carbono oxigenados se distribuyen así: dos carbonos metínicos de un epóxido en 56,4 y 57,4 ppm, dos metinos en 65,4 y 92,2 ppm, dos carbonos cuaternarios 44 y 51,4 ppm; tres carbonos cuaternarios oxigenados en δ 64,2, 65,5, 73,7 y en δ 203,7 un carbonilo a,b insaturado por las señales en ^1H a δ 5,85 (dd, $J = 2,4$ y 10 Hz) y δ 6,58 (dq, $J = 2,8, 5,1$ y $10,1$ Hz). El espectro de RMN de este compuesto tiene varios puntos que lo diferencian de los withanolidos normales. Así, no se aprecia la señal típica de la d-lactona en aproximadamente 177 ppm y la señal para H-22 se encuentra desplazada ahora en δ 3,72 según se deduce del experimento HMQC; adicionalmente se encuentra un metino oxigenado en 92,2 ppm el cual se asigna a un hemicetal y su presencia se explica por la reducción de la lactona (Zhu et al., 2001). De otro lado el desplazamiento químico de 27-Me y 28-Me a campos más bajos en el espectro de ^1H RMN indican la presencia de sendos hidroxilos geminales, lo cual explica los carbonos cuaternarios en 64,2 y 65,5 ppm.

La funcionalización de los anillos A y B del núcleo del withanolido se deduce por el espectro de ^1H RMN, ya que se encuentra un sistema del tipo 2-en-1-ona en 5,85 (dd, $J = 2,4$ y 10 Hz) y 6,58 (dq, $J = 2,8, 5,1$ y $10,1$ Hz), el cual según el espectro COSY ^1H - ^1H se encuentra acoplado con los protones de un metileno en 2,51 (dd, $J = 5,1, 18,7$ Hz) H4ax y en 2,66 m, H4ec.

Ahora bien, por HMBC (figura 1) se deduce la presencia de un grupo hidroxilo en el C-5 por las correlaciones a larga distancia que se observan con los protones de Me-19, con un carbonilo en 203,7 ppm, así como con un carbono cuaternario en 73,7 ppm. La presencia de un grupo epóxido se asigna por las señales dos metinos en 3,05 (d, $J = 3,9$) y 3,15 (m) ppm ^1H RMN y en 56,4 y 57,4 ppm en ^{13}C RMN; esta última correlaciona a larga distancia con C-5. El desplazamiento químico coincide con el reportado en la literatura para un grupo a-epoxido (Cirigliano et al., 1995).

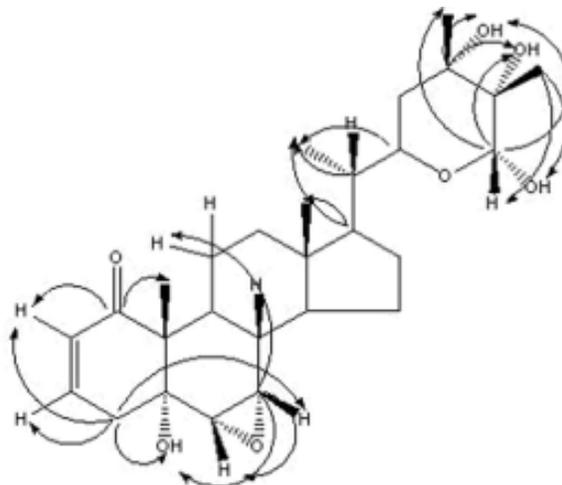


Figura 1. Correlaciones a larga distancia de Larnaxolida A

Esta es la primera vez que se reporta esta sustancia en la literatura a la cual se le asignó el nombre de Larnaxolida A. Adicionalmente, es la primera especie estudiada en el género, y por este tipo de compuestos se sitúa biogénicamente más cercano al género *Acnistus* que a *Solanum*.

Larnaxolida B (**2**) posee hechos estructurales muy similares a los de Larnaxolida A (tabla 2), solamente que la señal asignada anteriormente al átomo de carbono hidroxílico se ha desplazado ahora a campos más altos en 75,3 ppm; por lo tanto posee una estructura similar a la Larnaxolida A, pero en este caso con el hidroxilo ubicado en el C5 en configuración b.

Los dos larnaxolidos tienen una alta actividad contra amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* (Larnaxolida A, $\text{CE}_{50} = 23,7$ y Larnaxolida B, $\text{CE}_{50} = 34,9$ $\mu\text{g/ml}$) pero también una reducida citotoxicidad (> 500 $\mu\text{g/ml}$ en ambos casos) en células humanas; esta toxicidad difiere mucho de la exhibida por la withajardina A y la acnistina E que tienen $\text{CE}_{50} = 30,8$ y 1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente y $\text{CL}_{50} = 18,4$ y 1 $\mu\text{g/ml}$. El sistema farmacofórico de larnaxolidos es diferente al de las acnistinas y withajardinas y en estas últimas parece que la lactona en la cadena lateral tiene una alta contribución a la toxicidad.

Tabla 2. RMN de Larnaxolida A y B

Átomo	Larnaxolida A (1) CDCl ₃			Larnaxolida B (2) CD ₃ OD		
	¹ H	¹³ C	Correlación HMBC	¹ H	¹³ C	Correlación HMBC
1 C=O		203,7			205,0	
2 CH	5,85 <i>dd</i> (2,4, 10,0)	129,5	C4, C10	5,85 <i>dd</i> (2,4, 10,0)	129,9	C4, C10
3 CH	6,58 <i>dq</i> (2,84, 5,06 y 10,1)	140,0	C=O, C4, C5	6,58 <i>dq</i> (2,84, 5,06 y 10,1)	142,7	C=O, C4, C5
4 CH ₂	2,51 <i>dd</i> (5,1, 18,7), 2,66 <i>m</i>	36,9	C2, C3, C5, C10	2,51 <i>dd</i> (5,1, 18,7), 2,66 <i>m</i>	37,5	C2, C3, C5, C10
5 C		73,7			75,3	
6 CH	3,30 <i>m</i>	57,4	C7, C8, C9	3,30 <i>m</i>	57,6	C7, C8, C9
7 CH	3,05 <i>d</i> (3,9)	56,4	C4, C5, C6, C10	3,05 <i>d</i> (3,9)	57,5	C4, C5, C6, C10
8 CH	1,65-1,85 <i>m</i>	35,7	C14	1,65-1,85 <i>m</i>	37,6	C14
9 CH	1,55 <i>m</i>	35,9		1,55 <i>m</i>	37,5	
10 C		51,4			44,8	
11 CH ₂	1,20-1,32 <i>m</i> , 2,7 <i>m</i>	22,0	C7, C13	1,20-1,32 <i>m</i> , 2,7 <i>m</i>	23,4	C7, C13
12 CH ₂	1,65-1,85 <i>m</i>	27,6	C13	1,65-1,85 <i>m</i>	28,7	C13
13 C		44,0			41,7	
14 CH	1,35 <i>m</i>	51,5		1,35 <i>m</i>	53,0	
15 CH ₂	1,20-1,32 <i>m</i>	23,7		1,20-1,32 <i>m</i>	24,0	
16 CH ₂	1,20-1,32 <i>m</i> , 1,95 <i>m</i>	40,3	C14, C18, C8, C13	1,20-1,32 <i>m</i> , 1,95 <i>m</i>	37,0	C8, C14, C13, C18
17 CH	1,1 <i>m</i>	52,5	C21	1,1 <i>m</i>	54,1	C21
18 CH ₃	0,72 <i>s</i>	12,5	C12, C13, C17	0,72 <i>s</i>	12,5	C12, C13, C17
19 CH ₃	1,15 <i>s</i>	15,2	C=O, C5, C9, C10, C12	1,15 <i>s</i>	15,6	C=O, C5, C9, C10, C12
20 CH	1,65-1,85 <i>m</i>	39,2		1,65-1,85 <i>m</i>	41,7	
21 CH ₃	0,90 <i>d</i> (6,8)	13,1	C17, C20, C22, C25	0,90 <i>d</i> (6,8)	14,0	C17, C20, C22, C25
22 CH	3,72 <i>m</i>	65,4	C21	3,72 <i>m</i>	74,7	C21
23 CH ₂	1,65-1,85 <i>m</i>	29,7	C22	1,65-1,85 <i>m</i>	28,7	C22
24 C		64,2			52,8	
25 C		65,5			55,2	
26 CH	4,98 <i>s</i>	92,2	C27	4,98 <i>s</i>	98,2	C27
27 CH ₃	1,41 <i>s</i>	17,0	C23, C26	1,41 <i>s</i>	23,4	C23, C26
28 CH ₃	1,41 <i>s</i>	19,5	C22, C23, C26	1,41 <i>s</i>	23,4	C22, C23, C26
5-OH	3,15 <i>sa</i>		C4, C5, C7	3,15 <i>sa</i>		C4, C5, C7
24-OH	3,59 <i>s</i>		C24, C26	3,59 <i>s</i>		C24, C26
25-OH	3,62 <i>s</i>		C24, C26	3,62 <i>s</i>		C24, C26
26-OH	5,1 <i>s</i>		C27	5,1 <i>s</i>		C27

Adicionalmente, el extracto de *Solanum aphyodendron* S. Knapp, amerita continuar un estudio exhaustivo ya que tiene un buen nivel de inhibición (56,2%) y una citotoxicidad mínima ($CL_{50} = 260,5$ $\mu\text{g/ml}$) comparada con las otras tres especies de *Solanum* que se describen en la tabla 1; el perfil cromatográfico en capa fina y el espectro del crudo por RMN indican la presencia de alcaloides esteroideos.

De igual manera la especie nueva del género *Schultesiantus* es de interés valioso, dada su novedad botánica, porcentaje de inhibición (75,5%) a solo una concentración de 32,5 mg/ml y grado de citotoxicidad intermedia entre las especies de los géneros *Acnistus* y *Glabra*.

REFERENCIAS

- Cirigliano A, Veleiro AS, Oberti JC, Burton G.** 1995. A 15b-hydroxywithanolide from *Datura ferox*. *Phytochemistry*, 40:611-613.
- Cragg GM, Newman DJ.** 2005. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77:7-24.
- Luis JG, Echeverri F, Gonzalez AG.** 1994. Acnistins C and D, withanolides from *Dunalia solanacea*. *Phytochemistry*, 36:1297-1301.
- Minguzzi S, Barata LES, Geun Shin Y, Jonas PF, Chai H-B, Park EJ, Pezzuto J M, Cordell GA.** 2002. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. *Phytochemistry*, 59:635-641.
- Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG.** 1999. Sensitivity to glucantime of *Leishmania viannia* isolates from patients prior to treatment. *Journal of Parasitology*, 85:360-366.
- Weniger B, Robledo SM, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R.** 2001. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 78:193-200.
- Zhu XH, Takagi M, Ikeda T, Midzuki K, Nohara T.** 2001. Withanolide-type steroids from *Solanum cilistum*. *Phytochemistry*, 56:741-745.

CONCLUSIONES

Se han encontrado una serie de extractos promisorios contra *Leishmania (V.) panamensis* que ameritan continuar su estudio como son *Solanum aphyodendron* S. Knapp y *Schultesiantus coriaceus*, dado su nivel de citotoxicidad y grado de inhibición. Adicionalmente se ha encontrado un nuevo farmacóforo con un grado de efectividad apreciable y lo más importante, con un grado de citotoxicidad 500 veces menor que los withanolidos del tipo acnistinas y withajardinas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia y Colciencias por la financiación del proyecto. De igual manera, Diana Cardona agradece a Colciencias por una beca doctoral.